

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ET DE L'UNIVERSITÉ DE CARTHAGE

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ MICROBIOLOGIE

Par Jameleddine AISSA LAROUSSE

**Etude de la variabilité génétique des régions NS3, NS5A et NS5B
du virus de l'hépatite C chez des patients Tunisiens non traités**

Sous la direction de Hervé FLEURY et Henda TRIKI

Soutenue le 22 décembre 2015

Membres du jury :

M. le Docteur Michel VENTURA (Directeur de recherche, CNRS-UMR 5234)
M. le Professeur Didier HOBBER (PU-PH, Chef de Service de Virologie-CHRU de Lille)
Mme. le Docteur Dorra REZIG (MCU-HDR, Université Tunis El Manar)
M. le Professeur Hervé FLEURY (PU-PH, Chef de Service de Virologie-CHU de Bordeaux)
Mme. le Professeur Henda TRIKI (PU-PH, Chef de Service de Virologie-Institut Pasteur de Tunis)
Mme. le Docteur Pascale TRIMOULET (PH, Laboratoire de Virologie-CHU de Bordeaux)

Président
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Directeur de thèse
Invité

*« S'il n'avait pas d'hiver, le printemps ne serait pas si agréable : si nous ne
goutions pas l'adversité, la réussite ne serait pas tant appréciée »*

Anne BRADSTREET

Dédicaces

A mes parents,

Ma mère Souad et mon père Mohamed, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien-être. Que ce travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu, le tout puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A ma chère femme,

Salha, je te remercie pour ton soutien et pour l'amour que tu m'apportes surtout pendant les moments difficiles. J'ai tant de choses à te dire que j'en dirai qu'une : merci d'être là chérie.

A mes chers frères et sœurs,

J'espère vous avoir toute ma vie à mes côtés et vous souhaite tout le bonheur du monde.

A mes chers neveux et nièces

Je vous adore. Que Dieu vous garde et vous protège. Je vous souhaite une belle réussite dans vos études.

Remerciements

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Hervé FLEURY, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui a supervisé mon travail. Merci, Monsieur, de m'avoir fait confiance, en m'acceptant en tant qu'étudiant dans votre laboratoire pour réaliser cette thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie également ma directrice de thèse, Madame le Professeur Henda TRIKI, qui m'a accueilli pareillement dans son laboratoire. Merci, Madame, d'avoir accepté la réalisation de ce travail en cotutelle avec l'Université de Bordeaux. Soyez assurée de mon respect et de toute ma gratitude.

Je souhaite remercier les membres du Jury de leur intérêt pour ce travail et d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire de thèse.

Je remercie Monsieur le Docteur Michel VENTURA d'avoir accepté d'être président du Jury.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Didier HOBBER et Madame le Docteur Dorra REZIG d'avoir accepté de juger ma thèse, d'en être les rapporteurs et d'avoir consacré du temps à la lecture de mon manuscrit. Je vous prie de trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je souhaite remercier Madame le Docteur Pascale TRIMOULET qui a été l'origine de ce travail. Votre aide et vos conseils ont été précieux pour son élaboration. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. Je garderai le souvenir de votre enthousiasme, gentillesse et votre disponibilité.

Je remercie Mesieurs les Professeurs Msadak AZOUZ, chef de service de gastroentérologie de l'hôpital Mohamed Tahar Maamouri-Nabeul, Nabil BEN MAMI, chef de service de gastroentérologie B de l'hôpital La Rabta-Tunis, ainsi que Imed CHEIKH, Chef de

service de gastroentérologie de l'hôpital Habib Bougatfa-Bizerte de m'avoir permis d'accéder aux dossiers médicaux des patients inclus dans cette étude

Je souhaite remercier Madame le Docteur Patricia PINSON pour avoir partagé avec moi son expérience sur le séquençage et le pyroséquençage, toujours dans la joie et la bonne humeur.

Je souhaite remercier toute l'équipe du laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux pour le travail fait ensemble et l'amitié partagée, et particulièrement Dominique VIATEAU, Valérie FRANGNE, Christine MELON et Jennifer PAPUCHON.

J'adresse également un merci très amical à l'ensemble des techniciens du Plateau Technique de Biologie Moléculaire du CHU de Bordeaux pour leurs conseils et également pour toutes les séquences qu'ils m'ont permis de lire grâce aux automates du plateau, et particulièrement, à son ingénieur Brigitte TAUZIN.

Je souhaite remercier Madame Marie-José GRANTERAI pour sa gentillesse et son amabilité.

Je souhaite remercier toute l'équipe du laboratoire de Virologie Clinique de l'Institut Pasteur de Tunis particulièrement notre chère surveillante du service Madame Ahlem BEN YAHYA et notre maître-assistante Madame Anissa CHOUIKHA, ainsi que l'ensemble des techniciens du Laboratoire.

Je tiens également à remercier mes amies Samar BEN HALIMA et Lamia YACOUBI, ainsi que tous les doctorants du laboratoire de Virologie de l'Institut Pasteur de Tunis; je leur souhaite bon courage dans leurs thèses et leurs vies.

Table des Matières

Table des illustrations.....	9
Liste des abréviations utilisées.....	12
Introduction générale.....	15
Etat des connaissances.....	18
A- Généralités sur le VHC.....	18
1- Découverte de l'agent responsable.....	18
2- Classification	18
3- Structure du virus.....	18
4- Génome viral.....	19
4-1- Région 5' non codante.....	20
4-2- Phase ouverte de lecture.....	21
4-3- Région 3' non codante.....	22
5- Structures et fonctions des protéines virales.....	22
5-1- Protéines structurales.....	22
5-1-1- Protéine de la capside.....	22
5-1-2- Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....	23
5-1-3- Protéine p7.....	24
5-2- Protéines non structurales.....	24
5-2-1- Protéine NS2.....	24
5-2-2- Protéine NS3.....	25
5-2-3- Protéine NS4A.....	26
5-2-4- Protéine NS4B.....	29
5-2-5- Protéine NS5A.....	27
5-2-6- Protéine NS5B.....	28
6- Modèles d'étude.....	29
6-1- Modèles animaux.....	30
6-1-1- Chimpanzé.....	30
6-1-2- Autres modèles.....	30
6-2- Modèles cellulaires.....	30
6-2-1- Réplicons	30
6-2-2- Pseudo-particules virales.....	31
6-2-3- Particules virales produites en culture cellulaire.....	32
7- Cycle réplcatif viral.....	33
7-1- Fixation au récepteur et internalisation.....	34
7-2- Internalisation et fusion de la particule virale.....	35
7-3- Traduction de la protéine virale.....	36
7-4- Maturation et clivages protéolytiques de la polyprotéine.....	37
7-5- Réplication de l'ARN viral.....	37
7-6- Assemblage et libération des particules virales.....	38
8- Variabilité génétique	39
8-1- Les génotypes et les sous-types	39
8-2- Quasi-espèces.....	41

9- Epidémiologie.....	41
10- Modes de transmission et facteurs de risques.....	43
11- Diagnostic de l'hépatite C.....	43
12- Histoire naturelle de l'infection par le VHC.....	45
13- Physiopathologie.....	46
13-1- Hépatite C aiguë.....	46
13-2- Hépatite C chronique.....	46
13-3- Cirrhose du foie.....	47
13-4- Carcinome hépatocellulaire.....	47
13-5- Manifestations extra-hépatiques.....	47
13-6- Manifestations cognitives et affectives associées à l'hépatite C.....	48
14- Réponse immunitaire.....	48
14-1- Réponse immunitaire non spécifique.....	48
14-2- Réponse immunitaire spécifique.....	49
14-2-1- Réponse immunitaire humorale.....	49
14-2-2- Réponse immunitaire cellulaire.....	50
B- Traitement de l'infection chronique par le VHC.....	50
1- Histoire du traitement.....	50
2- Evaluation pré-thérapeutique.....	51
3- Objectifs du traitement et définition de la réponse.....	51
4- Indications du traitement.....	52
5- Traitement par l'interféron pégylé et la ribavirine.....	52
5-1- Interféron α	52
5-2- Interféron pégylé.....	53
5-3- Ribavirine.....	53
5-4- Recommandations en Tunisie.....	55
5-5- Surveillance.....	55
5-6- Facteurs prédictifs de la réponse.....	56
5-7- Limites de ces traitements.....	56
5-7-1- Effets secondaires.....	56
5-7-2- Echec des traitements.....	57
6- Nouvelles molécules anti-VHC.....	57
6-1- Antiviraux à action directe : Etat des lieux.....	57
6-2- Anti-protéases.....	59
6-2-1- Boceprevir.....	59
6-2-2- Telaprevir.....	60
6-2-3- Simeprevir.....	61
6-2-4- Paritaprevir/r.....	62
6-3- Anti-polymérase.....	64
6-3-1- Sofosbuvir.....	64
6-3-2- Dasabuvir.....	65
6-4- Les anti-NS5A.....	65
6-4-1- Daclatasvir.....	66
6-4-2- Ledipasvir.....	67
6-6-3- Ombitasvir.....	67
6-5- Recommandations d'utilisation en France.....	68
6-6- Résistance aux antiviraux à action directe.....	73
6-6-1- Résistance aux anti-protéases.....	73

6-6-1-1- Résistance au telaprevir.....	74
6-6-1-2- Résistance au boceprevir.....	75
6-6-1-3- Résistance au simeprevir.....	75
6-6-1-4- Résistance au paritaprevir.....	76
6-6-2- Résistance aux anti-polymérase.....	77
6-6-2-1- Inhibiteurs nucléos(t)idiques : Sofosbuvir.....	77
6-6-2-2- Inhibiteurs non nucléosidiques.....	77
6-6-3- Résistance aux anti-NS5A.....	79
6-6-3-1- Résistance au daclatasvir.....	79
6-6-3-2- Résistance au ledipasvir.....	80
6-6-3-3- Résistance à l'ombitasvir.....	80
6-6-4- Résistance « naturelle » aux antiviraux directs chez les malades naïfs de traitement	81
6-6-4-1- Inhibiteurs de protéase.....	81
6-6-4-2- Inhibiteurs de polymérase.....	82
6-6-4-3- Inhibiteurs NS5A.....	83
6-6-5- Impact de la présence des mutants associés à la résistance avant traitement sur la réponse au traitement.....	84
Objectifs de l'étude.....	88
Patients et Méthodes.....	89
A- Patients.....	89
B- Méthodes.....	89
1- Détermination de la charge virale	89
2- Génotypage du VHC.....	90
2-1- Extraction du génome viral	90
2-2- Séquençage partiel de la région NS5B.....	90
2-3- Génotypage par la technique LIPA.....	94
3- Amplification et séquençage des régions génomiques NS3, NS5B et NS5A.....	95
3-1- Amplification de la protéase NS3.....	95
3-1-1- Transcription inverse et PCR externe.....	95
3-1-2- PCR interne.....	96
3-2- Amplification de la polymérase NS5B.....	97
3-2-1- Transcription inverse et PCR externe.....	97
3-2-2- PCR interne.....	97
3-3- Amplification de la région NS5A.....	99
3-3-1- Transcription inverse et PCR externe.....	99
3-3-2- PCR interne.....	100
3-4- Séquençage des produits amplifiés.....	101
3-5- Analyse phylogénétique et vérification moléculaire du génotype.....	102
3-6- Alignement des séquences et analyse des sites associés à des mutations de résistance.....	102
4- Pyroséquençage avec la technique 454.....	104
4-1- Principe.....	104
4-2- Conception des amorces pour la région NS3.....	106

4-3- Extraction et amplification par PCR	107
4-4- Purification des amplicons.....	108
4-5- Dosage des amplicons.....	108
4-6- Amplification clonale et séquençage.....	109
4-7- Analyse des séquences.....	109
Résultats.....	110
1- Analyse de la population étudiée selon la charge virale, le génotype, l'âge, le sexe et le statut clinique.....	110
2- Etude des séquences NS3 et prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase NS3.....	110
3- Etude des séquences NS5B et prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs nucleos(t)idiques et non nucleosidiques de la polymérase NS5B.....	115
4- Etude des séquences NS5A et prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A	121
5- Prévalence des combinaisons de mutations associées à la résistance aux IP, aux IN et INN de la polymérase NS5B et aux inhibiteurs de la protéine NS5A.....	125
6- Résultats et interprétation des données du pyroséquencage	126
Discussion et conclusion.....	129
Références bibliographiques.....	136

Table des illustrations

Liste des figures :

Figure 1 :	Représentation schématique de la particule virale du VHC.....	19
Figure 2 :	Organisation génomique du VHC.....	20
Figure 3 :	Structure secondaire des régions 5'NC et 3'NC du VHC.....	21
Figure 4 :	Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC.....	23
Figure 5 :	Structure du domaine NS2 catalytique après clivage par la protéase NS2/3	25
Figure 6 :	Structure 3D du complexe NS3/4A.....	26
Figure 7 :	Représentation schématique de la protéine NS5A.....	27
Figure 8 :	Structure tridimensionnelle de la partie non transmembranaire de la protéine NS5A.....	28
Figure 9 :	Structure tridimensionnelle de la région non transmembranaire de la protéine NS5B.....	29
Figure 10 :	Représentation schématique du système des réplicons du VHC.....	31
Figure 11 :	Représentation schématique de la production des pseudo-particules virales	32
Figure 12 :	Représentation schématique de la production de VHCcc.....	33
Figure 13 :	Cycle Viral du VHC.....	34
Figure 14 :	Modèle d'entrée du VHC.....	35
Figure 15 :	Modèle de formation du complexe d'initiation de la traduction.....	36
Figure 16 :	Organisation du génome, maturation de la polyprotéine précurseur du VHC et localisation des protéines au niveau du RE.....	37
Figure 17 :	Modèle proposé pour l'assemblage du VHC.....	38
Figure 18 :	Arbre phylogénétique des souches virales VHC.....	40
Figure 19 :	Distribution géographique mondiale des génotypes VHC.....	41
Figure 20 :	Prévalence du VHC à travers le monde.....	42
Figure 21 :	Histoire naturelle de l'infection par le VHC.....	46
Figure 22 :	Réponse de l'hôte à l'infection par le VHC.....	49
Figure 23 :	Mécanismes d'action de la Ribavirine.....	54
Figure 24 :	Recommandations pour le traitement de l'hépatite C chronique utilisées à l'heure actuelle en Tunisie.....	55
Figure 25 :	Structure biochimique du boceprevir.....	60
Figure 26 :	Structure biochimique du telaprevir.....	61
Figure 27 :	Structure biochimique de simeprevir.....	62
Figure 28 :	Structure biochimique du paritaprevir.....	63
Figure 29 :	Structure biochimique du sofosbuvir.....	64
Figure 30 :	Structure biochimique du dasabuvir.....	65
Figure 31 :	Structure biochimique du daclatasvir.....	66
Figure 32 :	Structure biochimique du ledipasvir.....	67
Figure 33 :	Structure biochimique de l'ombitasvir.....	68
Figure 34 :	Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis du TVR <i>in vitro</i>	74
Figure 35 :	Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis du PTV <i>in vitro</i>	76
Figure 36 :	Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis du DSV <i>in vitro</i> chez le génotype 1a.....	78

Figure 37 :	Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis du DSV <i>in vitro</i> chez le génotype 1b.....	79
Figure 38 :	Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis de l'OBV <i>in vitro</i> chez le génotype 1a.....	80
Figure 39 :	Exemple d'électrophorégramme.....	93
Figure 40 :	Représentation schématique des bandes du test de génotypage (LIPA) VERSANT HCV version 2.0.....	95
Figure 41 :	Position des amorces utilisées pour l'amplification de la protéase NS3 du VHC de génotype 1.....	97
Figure 42 :	Position des amorces utilisées pour l'amplification de la polymérase NS5B du VHC de génotype 1.....	99
Figure 43 :	Position des amorces utilisées pour l'amplification de la région NS5A du VHC de génotype 1a.....	101
Figure 44 :	Position des amorces utilisées pour l'amplification de la région NS5A du VHC de génotype 1b.....	101
Figure 45 :	Amplification clonale dans une micro-gouttelette d'émulsion.....	104
Figure 46 :	Réaction de pyroséquençage dans chaque micro-puits de la Pico Titer.....	105
Figure 47 :	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR interne de la région NS3 du génome du VHC.....	111
Figure 48 :	Analyse phylogénétique des séquences de protéase NS3 provenant des patients de l'étude ainsi que des souches de référence issues de la base de données GenBank.....	112
Figure 49 :	Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase NS3 dans la population étudiée.....	114
Figure 50 :	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR interne de la région NS5B du génome du VHC...	115
Figure 51 :	Analyse phylogénétique des séquences de la polymérase NS5B provenant des patients de l'étude ainsi que des souches de référence issues de la base de données GenBank.....	117
Figure 52 :	Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs de polymérase dans la population étudiée.....	120
Figure 53 :	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR interne de la région NS5A du génome du VHC de sous-type 1a.....	122
Figure 54 :	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR interne de la région NS5A du génome du VHC de sous-type 1b.....	123
Figure 55 :	Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs NS5A dans la population étudiée.....	125
Figure 56 :	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR interne de la région NS3 du génome du VHC de sous-type 1b.....	127

Liste des tableaux :

Tableau 1 :	Agents disponibles ou en cours de développement dans le traitement de l'hépatite C.....	58-59
Tableau 2 :	Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la polymérase NS5B en vue du génotypage.....	91
Tableau 3 :	Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la protéase NS3.....	96
Tableau 4 :	Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la polymérase NS5B.....	98
Tableau 5 :	Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la région NS5A.....	100
Tableau 6 :	Séquences de références de GenBank utilisées pour la construction des arbres phylogénétiques.....	103
Tableau 7 :	Caractéristiques de la population investiguée.....	110
Tableau 8 :	Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase NS3 dans la population étudiée.....	114
Tableau 9 :	Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs de polymérase NS5B dans la population étudiée.....	119
Tableau 10 :	Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs NS5A dans la population étudiée.....	125
Tableau 11 :	Combinaison de mutations associées à la résistance aux IP, aux IN et INN de la polymérase NS5B et aux inhibiteurs de la protéine NS5A dans la population étudiée.....	126
Tableau 12 :	Comparaison entre les résultats du séquençage par technique Sanger et le pyroséquençage chez les dix patients de génotype 1b.....	128

Publications :

Article 1: «Natural prevalence of hepatitis C virus (HCV) variants resistant to protease and polymerase inhibitors in patients infected with HCV genotype 1 in Tunisia». Journal of Medical Virology 2014; 86: 1350-1359.

Article 2: «Prevalence of hepatitis C virus (HCV) variants resistant to NS5A inhibitors in naïve patients infected with HCV genotype 1 in Tunisia». Virology Journal 2015; 12: 84.

Liste des abréviations utilisées

AA : Acide Aminé
AAD : Antiviraux à Action Directe
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AFEF : Association Française pour l'Etude du Foie
ALAT: Alanine Amino Transférase
Alb-uPA : Albumin-urokinase-type Plasminogen Activator
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ATP: Adénosine Triphosphate
ARN: Acide Ribonucléique
ARFP: Alternate Reading Frame Protein
BET: Bromure d'Ethidium
BOC: Boceprevir
CDD: Charge Coupled Device
CE₅₀ : Concentration Efficace Médiane
CHC : Carcinome Hépatocellulaire
CPAg : Cellule Présentatrice de l'Antigène
ddNTP : di-déshydro-nucléotide
DDT : Dithiothreitol
DSV : Dasabuvir
eIF2 : Facteur d'Initiation de la Transcription eucaryote
eIF3 : Facteur d'Initiation de la Transcription eucaryote
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
emPCR: PCR émulsion
FDA: Food and Drug Administration
GAG : Glycosaminoglycanes
GTP : Guanosine Triphosphate
HDL : Lipoprotéine de Haute Densité
HVR 1 : Région Hypervariable 1
HVR 2 : Région Hypervariable 2
HVR 3 : Région Hypervariable 3
IgG : Immunoglobulines
IN : Inhibiteurs Nucléos(t)idiques
INN : Inhibiteurs Non Nucléos(t)idiques
IFN-PEG : Interféron pégylé
IFN- α : Interféron-alpha
IFN- β : Interféron-beta
IMPDH : Inosine Monophosphate Déshydrogénase
IP : Inhibiteur de Protéase
IRES: Site Interne d'Entrée du Ribosome
IRF-3: Interferon Regulatory Factor 3
ISG: IFN stimulated genes
Jak-STAT: Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
JFH-1 : Japanese Fulminant Hepatitis
LD : Gouttelettes Lipidiques
LDL : Lipoprotéines de Faible Densité

LDL_{ox} : Lipoprotéine de Faible Densité Oxydée
LDL-R : Récepteur des Lipoprotéines de Faible Densité
LDV : Ledipasvir
LPL : Lipoprotéine Lipase
MID : Multiplex Identifiant
MLV : Virus de la Leucémie Murine
MTP : Protéine Microsomale de Transfert
NANBH : Hépatite non-A, non-B
NF-κB : Nuclear Factor κB
NK : Cellule Natural Killer
NGS : Next generation sequencing
OBV : Ombitasvir
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert)
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
PHB : Ponction Biopsie Hépatique
PCR : Polymérase Chaîne Réaction
PKA : Protéine Kinase A
PKR : Protéine Kinase R
PTP : Pico Titer Plate
PVT : Paritaprevir
r : ritonavir
RBV : Ribavirine
RC : Complexe de Réplication
RE : Réticulum Endoplasmique
RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante
RIG-1 : Retinoic Acid Inducible Gene 1
RT : Reverse transcription (transcription inverse)
RVS : Réponse Virologique Soutenue
SAA : Apolipoprotéine Sérum Amyloïde A
SCID : Severe Combined Immuno-Deficiency
SMV : Simeprevir
TBE 1X : Tris Borate EDTA
TG : Triglycérides
Th : T-helper
TLR3 : Toll-Like Receptor 3
TMA : Transcription-mediated amplification
TSH : Thyroïdostimuline
TVR : Telaprevir
UDPS : Ultra-deep pyrosequencing
VEMC : Virus de l'Encéphalomyocardite
VHA : Virus de l'Hépatite A
VHB : Virus de l'Hépatite B
VHC : Virus de l'Hépatite C
VHC_{cc} : Système de Culture Cellulaire du VHC
VHC_{pp} : Modèle des pseudo-particules virales du VHC
VIH : Virus de l'Immunodéficiência Humaine
VLDL : Lipoprotéines de Très Faible Densité
VPL : Lipo-Viro-Particules
3' NC : 3' Non Codante

5'NC : 5' Non Codante

Introduction générale

Le virus de l'hépatite C (VHC) est l'une des premières causes de pathologie hépatique dans le monde. Ce virus à ARN est responsable de l'hépatite C qui, dans sa forme chronique, peut conduire au développement de la cirrhose et du cancer du foie. L'infection par le VHC est un problème majeur de santé publique. Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le VHC infecte actuellement plus de 170 millions de personnes, soit 3% de la population mondiale (Lam et al., 2011). Il s'agit d'un petit virus enveloppé d'environ 55 nm ayant une capsidie icosaédrique. Il possède un génome composé d'un ARN simple brin de polarité positive. L'étude des séquences virales a permis de le classer dans la famille des *Flaviviridae* qui comporte 3 genres : *Flavivirus*, *Pestivirus* et *Hepacivirus*. Le VHC est le seul représentant du genre *Hepacivirus* (Miller et al., 1990).

En Tunisie, la prévalence du VHC dans la population générale est de l'ordre de 0,4 à 1% avec une large prédominance du génotype 1b (Djebbi et al., 2004). La norme actuelle du traitement des patients présentant une hépatite C chronique en Tunisie est la bithérapie interféron pégylé (pegIFN) associé à la ribavirine (RBV) pendant 24 ou 48 semaines. Cette bithérapie est caractérisée par des effets secondaires importants et, pour les patients infectés par le génotype 1, le plus répandu, une réponse virologique soutenue (RVS) ne peut être atteinte que dans environ 50 % des cas (Susser et al., 2009).

A l'heure actuelle, différentes molécules ciblant spécifiquement le VHC et appelées antiviraux à action directe (AAD) sont en cours de développement ou déjà mises sur le marché dans certains pays développés. Ces molécules apparaissent comme une révolution dans le traitement de l'infection par le VHC. Elles visent à bloquer une des étapes du cycle viral afin d'empêcher la production des particules virales infectieuses par les hépatocytes infectés. Elles comprennent les inhibiteurs de protéase NS3 (IP), les inhibiteurs nucléos(t)idiques (IN) et les inhibiteurs non nucléosidiques (INN) de la polymérase NS5B et les inhibiteurs de la protéine NS5A, permettant, lorsqu'elles sont utilisées en association, d'augmenter le taux de succès thérapeutique chez les patients chroniquement infectés (Susser et al., 2009 ; Pawlotsky, 2011 ; Pawlotsky, 2014). Les IP se lient au site catalytique de la protéase et bloquent la transformation post-traductionnelle de la polyprotéine virale empêchant la libération des protéines non structurales fonctionnelles (Pawlotsky, 2014). Concernant la polymérase, deux types d'inhibiteurs ont été développés présentant différents modes d'action : les IN entrent en compétition avec le substrat naturel pour se lier au site actif

de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et ont un effet terminateur de chaîne après incorporation dans l'ARN nouvellement synthétisé. Par contre, les INN inhibent l'activité enzymatique par fixation à l'un des quatre sites allostériques à la surface de l'enzyme entraînant une altération de la conformation de la polymérase, bloquant sa fonction catalytique et donc la réplication (Bartenschlager et al., 2013). Les inhibiteurs de la protéine NS5A ciblent le domaine I de celle-ci. Ils bloquent sa phosphorylation, essentielle à la réplication de l'ARN viral et inhibent l'assemblage et la libération des particules virales infectieuses (Pawlotsky, 2014). Plusieurs études cliniques ont montré l'efficacité de ces différents inhibiteurs ainsi que l'augmentation des taux de réponse virale soutenue (RVS) dans les schémas thérapeutiques incluant ces molécules (Hezode et al., 2012; Dore et al., 2013 ; Jacobson et al., 2013 (a) ; Lawitz et al., 2013 ; Manns et al., 2014).

Le VHC présente une grande diversité génétique. Cette diversité résulte de l'absence d'activité exonucléasique correctrice 5'→ 3' de l'ARN polymérase ARN dépendante mais également du niveau élevé de réplication (Neumann et al., 1998). Sur un plan global, l'analyse phylogénétique a permis de classer le VHC en sept génotypes et différents sous-types (Smith et al., 2014) ; sur un plan individuel, la variabilité est à l'origine de la distribution en quasi-espèce du virus. Cette quasi-espèce est formée d'un mélange complexe de variants viraux parmi lesquels se trouvent des variants associés à des degrés variables à la résistance aux AAD. La prévalence d'un variant résistant dans la quasi-espèce virale est généralement déterminée par sa capacité répliquative et l'avantage sélectif qu'il présente par rapport aux autres sous-populations virales. En général, les substitutions qui affectent les nucléotides situés à proximité du site actif hautement conservé d'une enzyme (site catalytique de la protéase par exemple) ont un fort impact sur la fonction enzymatique ; il en résulte une diminution de la capacité répliquative de la population virale. En revanche, les substitutions concernant des résidus moins critiques participant à la liaison des AAD au niveau du site allostérique par exemple seront mieux tolérées et auront des conséquences moindres sur l'activité enzymatique et le fitness viral (Ceccherini-Silberstein et al., 2004). En conséquence, les variants résistants aux AAD peuvent exister naturellement dans la quasi-espèce, le plus souvent sous forme de populations virales minoritaires, et sont souvent sélectionnés au moment de l'échec thérapeutique. Il est donc important d'établir la prévalence naturelle de ces variants en raison de leur impact potentiel sur la réponse aux différents traitements par AAD. Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer la prévalence des différentes mutations impliquées dans la résistance aux IP, aux IN et INN de la polymérase NS5B et aux inhibiteurs

de la protéine NS5A avant tout traitement par ces molécules inhibitrices (Bartels et al., 2013 ; Cento et al., 2012 ; Dierynck et al., 2014 ; Di Maio et al., 2014 ; Plaza et al., 2012).

En conséquence, il semble important d'évaluer la prévalence naturelle des variants portant des mutations associées à une sensibilité diminuée aux AAD dans les souches tunisiennes circulantes en préambule à l'introduction de ces molécules en Tunisie.

Etat des connaissances

A- Généralités sur le VHC

1- Découverte de l'agent responsable

Durant les années 70, le développement des tests sérologiques permettant la détection des deux agents viraux responsables des hépatites A (VHA) et B (VHB) a permis à Feinstone et ses collaborateurs d'observer que certains patients étaient séronégatifs pour ces deux virus. Ils ont conclu à l'existence d'un agent inconnu pouvant causer des cas d'hépatites qui furent dénommées hépatites « non-A, non-B » (Feinstone et al., 1975).

En 1989, Qui-Lim Choo et al. ont identifié l'agent responsable de la majorité des hépatites « non-A, non-B » que nous appelons aujourd'hui le VHC. La découverte du VHC a constitué une grande révolution en virologie car le virus a été identifié par des techniques purement moléculaires. Afin de caractériser le génome du virus, Choo et al. ont utilisé du sérum de chimpanzé infecté par l'agent responsable d'une hépatite « non-A, non-B » pour produire une banque d'ADN complémentaire qui fut clonée dans un bactériophage. Le criblage de cette banque d'ADN complémentaire par des sérums de patients atteints d'une hépatite « non-A, non-B » et des expériences complémentaires ont permis de mettre au point les premiers tests sérologiques de recherche des anticorps (AC) anti-VHC (Choo et al., 1989).

2- Classification

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae*. Cette famille se subdivise en trois genres : le genre *Flavivirus* (West-Nile virus, virus de la fièvre jaune, virus de la dengue), le genre *Pestivirus* (virus de la diarrhée bovine, virus de la peste porcine) (Miller et al., 1990) et le genre *Hepacivirus* auquel appartient le VHC (Roberston et al., 1998). Le VHC infecte principalement les hépatocytes mais il peut aussi être présent dans les cellules mononucléées sanguines et les cellules dendritiques (Okuda et al., 1999 ; Navas et al., 2002). Le VHC est réparti en 7 groupes (1 à 7) appelés génotypes et en plusieurs sous-types. Les génotypes et les sous-types se distinguent entre eux par une divergence de 30 à 35% et de 20 à 25% de leurs séquences nucléotidiques, respectivement (Smith et al., 2014).

3- Structure du virus

Le VHC est un petit virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre (Kaito et al., 1994; Shimizu et al., 1996). Son génome est une molécule d'ARN simple brin de polarité positive

d'environ 9,6 kb. Il est constitué d'une nucléocapside protéique de symétrie icosaédrique comportant 32 capsomères et d'une enveloppe lipidique dérivant des membranes du réticulum endoplasmique (RE) de la cellule hôte et dans laquelle les glycoprotéines E1 et E2 du virus sont ancrées sous forme d'hétérodimères (**Figure 1**) (Reed et Rice., 2000).

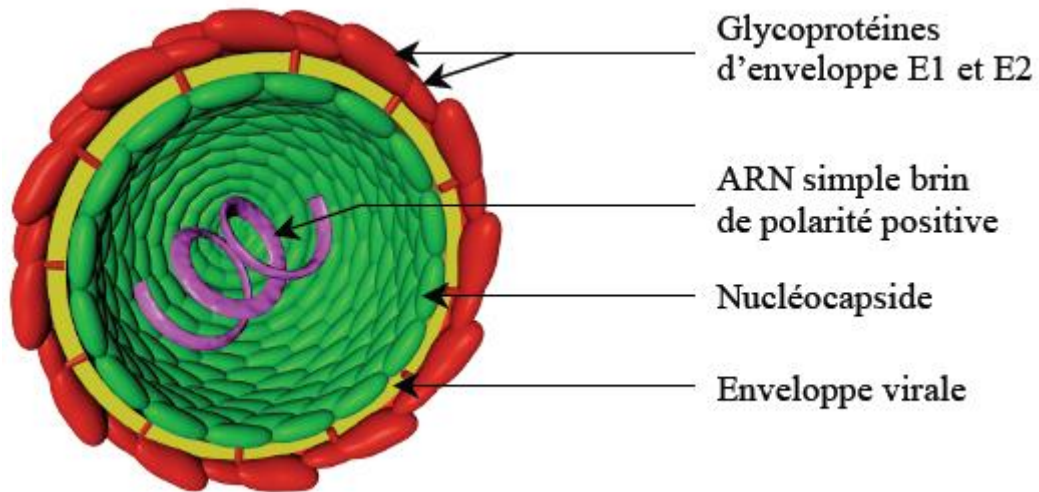


Figure 1 : Représentation schématique de la particule virale du VHC

Chez les patients infectés, le VHC peut circuler dans le sang sous différentes formes : libre ou en association avec les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les lipoprotéines de faible densité (LDL) ou circulant sous formes de virions associés à des immunoglobulines G (IgG), ce qui se traduit par une large hétérogénéité de la densité des fractions virales (Kanto et al., 1994 ; Andre et al., 2002). Les particules virales de faible densité liées aux VLDL ou aux LDL sont les plus infectieuses alors que les particules de haute densité liées aux IgG sont peu infectieuses. Les particules virales infectieuses de faible densité sont désignées par le terme lipo-viro-particules (LVP) (Andre et al., 2002) qui sont des particules sphériques riches en triglycérides, Apo B ou Apo E contenant l'ARN viral, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et les protéines de la nucléocapside (Diaz et al., 2006).

4- Génome viral

Le génome du VHC est une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive. Il comporte deux régions non codantes : la région 5' non codante (5'NC) et la région 3' non codante (3'NC) flanquant de part et d'autre un seul cadre de lecture ouvert ou ORF. Ce cadre de lecture ouvert code pour une polyprotéine précurseur d'environ 3010 acides aminés (AA) (Penin et al., 2004). Cette polyprotéine subit une maturation post-traductionnelle, elle est

clivée par des protéases virales et cellulaires au niveau de la membrane du RE pour donner naissance à 10 protéines virales (**Figure 2**):

- 3 protéines structurales : la protéine de la capsid ou protéine C, les 2 glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.
- 7 protéines non structurales : p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

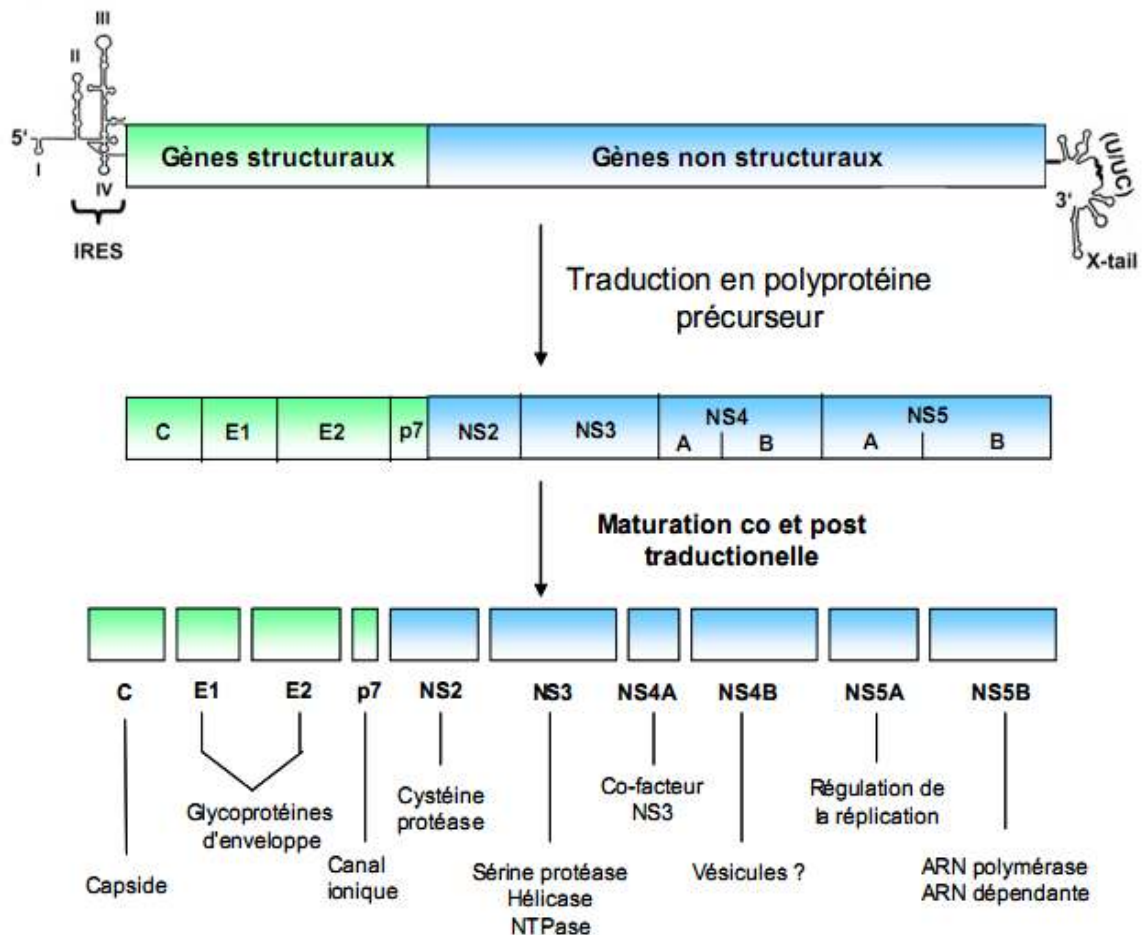


Figure 2 : Organisation génomique du VHC

Le génome du VHC comporte deux régions non codantes (5'NC et 3'NC) et un cadre de lecture ouvert qui code pour une polyprotéine d'environ 3010 AA.

4-1- Région 5' non codante

L'extrémité 5' NC est une région hautement structurée et très conservée au sein des différents génotypes du VHC. Cette région très organisée renferme 341 nucléotides et joue un rôle important dans la synthèse des protéines virales. Sa structure secondaire montre quatre grands domaines structuraux différents (I à IV) dont les domaines II, III et IV ainsi que le début de la séquence codante constituent le site interne d'entrée du ribosome (IRES)

indispensable pour la traduction (Fraser et Doudna., 2007) (**Figure 3**). Le domaine I est nécessaire à la réplication de l'ARN viral. Le domaine III permet la fixation à la sous-unité 40S du ribosome et à eIF2 (Facteur d'initiation de la transcription eucaryote) au niveau de l'IRES pour l'initiation de la synthèse protéique (Reynolds et al., 1995). Le domaine IV comprend le codon d'initiation AUG qui détermine le début de la traduction.

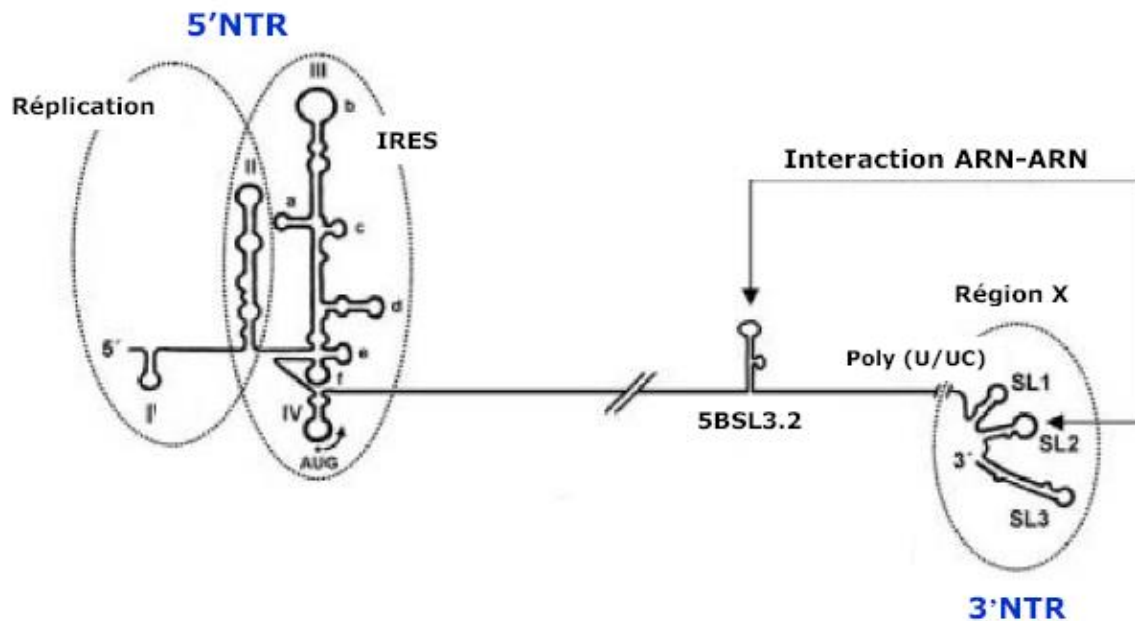


Figure 3: Structure secondaire des régions 5'NC et 3'NC du VHC (d'après Kolykhalov et al., 1996 ; Appel et Bartenchlager., 2006)

4-2- Phase ouverte de lecture

Le génome du VHC comporte un seul ORF qui code pour une polyprotéine de 3010 AA environ. Après avoir subi la maturation post-traductionnelle, cette polyprotéine est clivée par des protéases cellulaires et virales en dix protéines. Deux types de protéines sont produites : les protéines structurales : protéine de la capsid C et les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 formant ainsi les particules virales du VHC et les protéines non structurales : p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B qui sont essentiellement impliquées dans la réplication de l'ARN viral. La protéine p7 qui est une viroporine transmembranaire joue un rôle dans le relargage des particules virales infectieuses (Steinmann et al., 2007).

4-3- Région 3' non codante

L'extrémité 3'NC est de longueur et de séquence variable. Elle comporte 3 domaines fonctionnels différents en allant dans le sens 5'-3' (**Figure 3**):

- Une séquence de 40 nucléotides variable selon les isolats VHC formant deux structures tiges-boucles. Cette séquence n'est pas essentielle pour la réplication de l'ARN mais une délétion dans celle-ci entraîne un ralentissement de la réplication (Yanagi et al., 1999).
- Une séquence poly-uracile/pyrimidine de longueur variant de 30 à 150 nucléotides.
- Une région très conservée de 98 nucléotides appelée région X. Celle-ci forme 3 structures tiges-boucles successives SL1, 2 et 3.

Les deux dernières régions jouent un rôle primordial dans la réplication du VHC (Kolykhalov et al., 1996).

5- Structure et fonctions des protéines virales

5-1- Protéines structurales

5-1-1- Protéine de capsidie ou protéine C

La protéine de capsidie est la première protéine produite à partir de l'extrémité C-terminale de la polyprotéine virale ; elle contient une séquence peptide signal à cette position. Cette protéine est hautement conservée et riche en proline et en résidus basiques. Son rôle essentiel consiste en la formation de la nucléocapsidie virale.

La signal peptidase virale est responsable du clivage entre la capsidie et la glycoprotéine E1 donnant ainsi naissance à la forme « immature » de la protéine basique de 191 AA (McLauchlan, 2000). Ensuite, la maturation se poursuit par un second clivage protéolytique par action de la signal peptidase produisant ainsi la forme « mature » (Suzuki et al., 1999 ; McLauchlan et al., 2002). La protéine C mature s'associe aux gouttelettes lipidiques induisant une accumulation lipidique intracellulaire (Boulant et al., 2006 ; Jhaveri et al., 2009) et elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la libération des particules virales infectieuses (Targett-Adams et al., 2008).

La protéine de capsidie mature se divise en deux domaines. Le domaine 1, hydrophile, riche en AA basiques, est inclus dans la liaison avec l'extrémité 5'NC de l'ARN du VHC induisant la formation de la nucléocapsidie du virus (Klein et al., 2005). Le domaine 2, hydrophobe, permet la maturation, le bon repliement et le maintien de la conformation et de la stabilité du domaine 1 (Boulant et al., 2005). La protéine C pourrait être impliquée dans l'expression de plusieurs gènes cellulaires intervenant dans la prolifération cellulaire,

l'altération du métabolisme lipidique, la modulation de la réponse immunitaire et l'apoptose (Nguyen et al., 2006 ; Jackel-Cram et al., 2007).

5-1-2- Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont deux protéines transmembranaires de 160 et 334 AA, respectivement. Elles sont constituées d'un domaine N-terminal hautement glycosylé et d'un court domaine transmembranaire C-terminal comprenant une trentaine d'AA hydrophobes. La synthèse et la glycosylation des deux protéines E1 et E2 se font au niveau du RE (**Figure 4**).

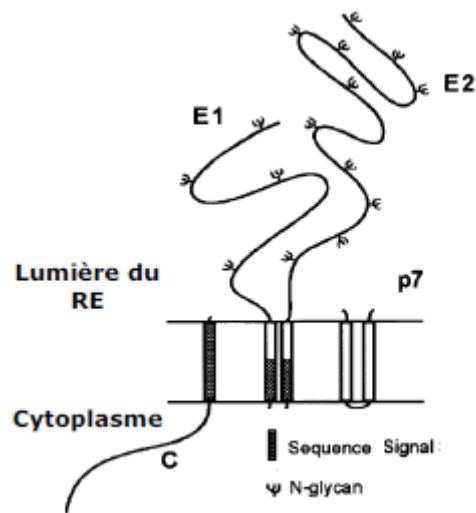


Figure 4 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC (d'après Op De Beek et al., 2001)

Ces protéines sont les constituants essentiels de l'enveloppe virale et sont responsables de l'entrée du VHC dans les cellules cibles. Elles permettent la fixation du VHC sur les récepteurs cellulaires spécifiques, induisant ainsi la fusion membranaire de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire de l'hôte, permettant la pénétration du virus dans les cellules cibles (Op De Beek et al., 2001). La protéine E2 renferme deux régions hypervariables appelées HVR1 et HVR2 qui résulteraient de la pression de sélection exercée par le système immunitaire et qui sont à l'origine de variants d'échappement.

5-1-3- Protéine p7

La protéine p7 est une petite protéine de 63 AA possédant deux domaines transmembranaires connectés par une petite boucle cytoplasmique, elle est localisée dans la membrane du RE (Haqshenas et al., 2007). Il semblerait que p7 soit essentielle pour l'infection par le VHC mais pas pour la réplication virale. Elle est nécessaire à la sécrétion des particules virales infectieuses (Steinmann et al., 2007).

5-2- Protéines non structurales

5-2-1- Protéine NS2

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire de 217 AA (résidus 810 à 1026) et de 23 kDa, liée au RE par l'intermédiaire de son extrémité N-terminale hydrophobe. Son extrémité C-terminale forme avec le domaine N-terminal de la protéine NS3, une protéase responsable du clivage protéolytique entre NS2 et NS3. La protéine NS2 est une protéine non essentielle à la formation du complexe de réplication (Lohmann et al., 1999 ; Blight et al., 2000), mais elle joue un rôle dans la formation des particules virales infectieuses suggérant qu'elle pourrait agir dans la morphogénèse du VHC (Jones et al., 2007).

L'analyse de la structure du domaine catalytique NS2 a révélé qu'il s'agit d'une protéase à cystéine dimérique avec deux sites actifs (**Figure 5**). Les résidus His143 et Glu13 d'un monomère et le résidu Cys184 de l'autre monomère pour chaque site catalytique constituent le site actif de la protéase NS2 (Lorenz et al., 2006).

NS2 est une protéine multifonctionnelle. Elle est indispensable à la formation de la nucléocapside virale ; en se fixant sur E2 et p7, elle permet la libération des glycoprotéines de l'enveloppe. Elle est impliquée dans l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A. D'autre part, la région N-terminale de NS2 bloque les promoteurs de certains gènes cellulaires comme celui de l'interféron-beta (IFN- β). Cette protéine a été aussi associée à la perturbation de l'homéostasie des lipides, la modification du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire *in vitro* permettant ainsi la mise en place d'un environnement cytosolique favorable pour la réplication virale (Dubuisson, 2007 ; Welbourn et Pause., 2007).

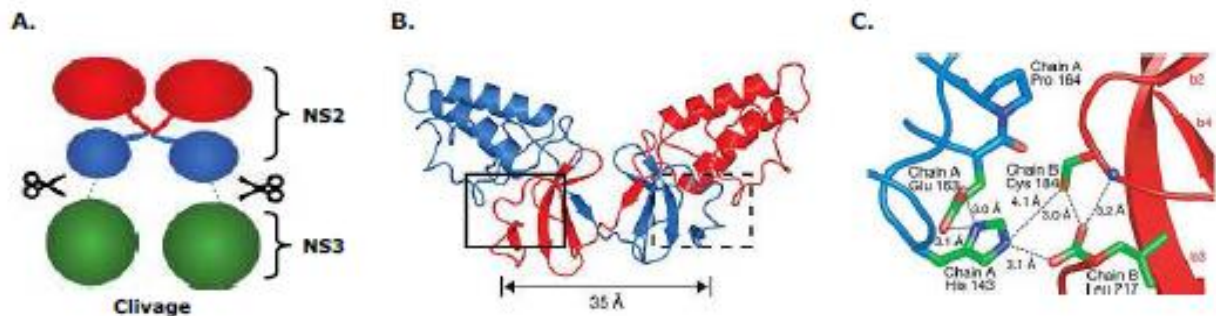


Figure 5 : Structure du domaine NS2 catalytique après clivage par la protéase NS2/3 (d'après Lorenz et al., 2006)

A : Modèle d'action de la protéase NS2/3. **B :** NS2 sous forme de dimère : un monomère est représenté en rouge et l'autre en bleu. **C :** Site actif de la protéase avant le clivage qui nécessite le rapprochement des extrémités C-terminales des deux monomères.

5-2-2- Protéine NS3

La protéine NS3 est une protéine hydrophile de 70 kDa. C'est une protéine multifonctionnelle qui possède une double activité enzymatique : une activité sérine protéase située dans sa partie N-terminale et une activité hélicase/ATPase localisée dans sa partie C-terminale (**Figure 6**).

La partie N-terminale est une sérine protéase qui doit interagir en association avec la protéine NS4A afin d'assurer l'activité enzymatique responsable du clivage efficace de NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A et NS5A/5B (Failla et al., 1994 ; Bartenschlager et al., 1995). Via son domaine hydrophobe, la protéine NS4A assure à la fois la stabilisation de la protéine NS3 et son adressage dans la membrane du RE (Wolk et al., 2000). La sérine protéase NS3 semble également capable d'interagir avec des protéines cellulaires de l'hôte au cours de l'infection.

Le domaine C-terminal possède une activité hélicase/ATPase (Tai et al., 1996), cette activité est nécessaire à l'infection *in vivo* (Kolykhalov et al., 2000) et à la réplication *in vitro* (Lam et Frick., 2006). L'activité hélicase de la protéine NS3 participe à la séparation des ARN double brin ou au déroulement des structures secondaires lors de l'initiation de la réplication, le déplacement des protéines liées à l'ARN ou encore la dissociation de la forme répliquative de l'ARN. De plus, cette activité hélicase est impliquée dans la régulation de la transduction du signal par la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA), ce qui semble influencer la survie et la prolifération de sa cellule hôte (Krekulova et al., 2006 ; Brass

et al., 2008). Cette protéine est une cible majeure des nouvelles molécules thérapeutiques anti-VHC.

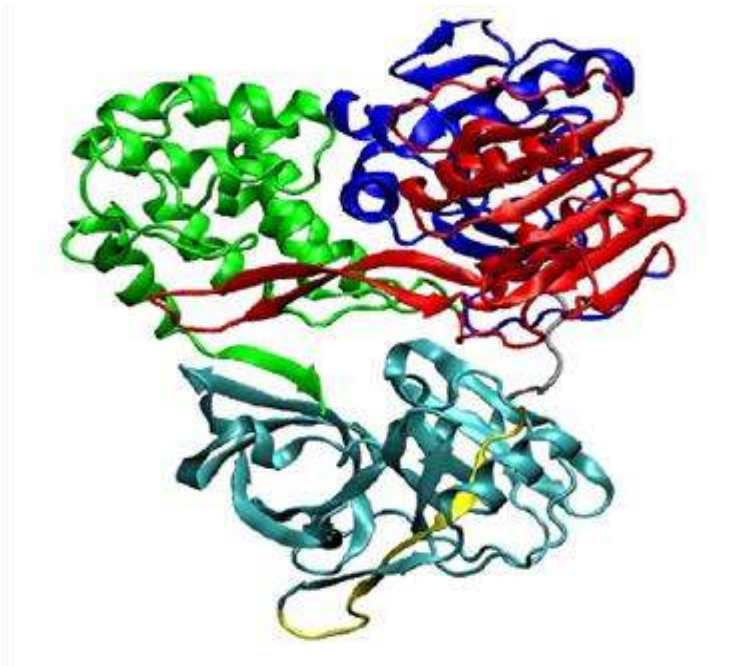


Figure 6: Structure 3D du complexe NS3/4A

Les différentes structures sont représentés par des couleurs différentes : En cyan la protéase (du 1^{er} au 181^{ème} résidu) ; en jaune le cofacteur NS4A (12^{ème} au 24^{ème} résidu) ; en bleu, rouge et vert les domaines I, II et III de l'hélicase ; en argent la séquence liant le domaine protéase au domaine hélicase (linker). Cette structure est issue de la Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org> (code pdb : 1CU1).

5-2-3- Protéine NS4A

La protéine NS4A est la plus petite protéine non structurale du VHC, c'est une protéine hydrophobe de 54 AA et de 8 kDa. NS4A constitue le cofacteur essentiel de l'activité sérine protéase NS3 permettant ainsi tous les clivages réalisés par cette dernière. Elle permet aussi l'ancrage de NS3 dans la membrane cellulaire du RE. De plus, NS4A joue un rôle important dans la régulation de la phosphorylation de la protéine NS5A (Koch et Bartenschlager., 1999).

5-2-4- Protéine NS4B

La protéine NS4B est une protéine hydrophobe de 270 AA et de 27 kDa. Elle est localisée dans la membrane du RE et ses extrémités N- et C-terminales sont orientées vers le cytoplasme (Hugle et al., 2001). L'expression de la protéine NS4B permet la formation d'une structure membranaire multi-vésiculaire dérivée des membranes du RE appelée « membranous web ». Ce réseau membranaire est le siège de la réplication virale (Egger et al.,

2002). On y retrouve la protéine NS4B associée aux protéines non structurales dans le complexe de réplication virale. De plus, il a été montré que des mutations dans le domaine C-terminal de NS4B diminuent la réplication.

5-2-5- Protéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine hydrophile de 447 AA ancrée dans la membrane du RE. Cette protéine est constituée de trois domaines distincts I, II et III (**Figures 7 et 8**). Le domaine I permet la fixation de l'ARN. Il est composé de deux sous-domaines : le sous-domaine IA est riche en AA basiques. Il contient quatre résidus cystéine (Cys 39, Cys 57, Cys 59 et Cys 80) très conservés, fixant un ion zinc nécessaire à la réplication (Tellinghuisen et al., 2004). Le sous-domaine IB contient deux autres résidus cystéine (Cys 142 et Cys 190) qui sont reliés par une liaison disulfure. Cette liaison semble être importante pour réduire les contraintes sur les positions des chaînes latérales mais elle a peu d'effet sur la réplication de l'ARN viral. La formation des homodimères par contact entre les deux sous-domaines IA et IB permet la formation d'un sillon basique cytosolique constituant le site d'ancrage de l'ARN (Tellinghuisen et al., 2005).

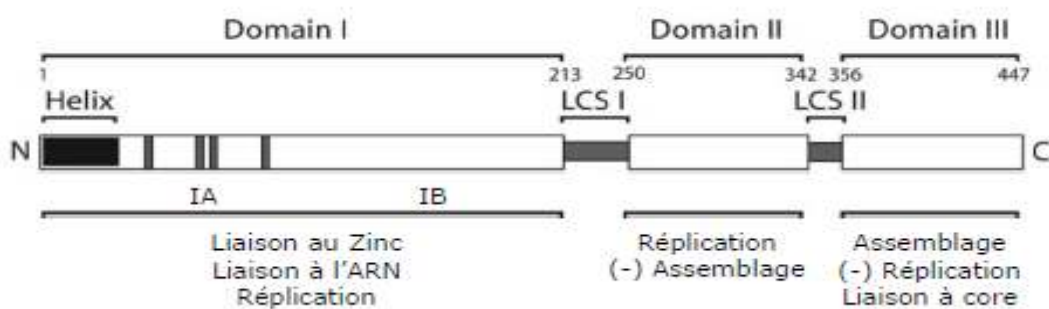


Figure 7 : Représentation schématique de la protéine NS5A (d'après Telleghuisen et al., 2005)

Les quatre résidus cystéine correspondant au site de coordination de l'ion de zinc sont indiqués par des petites barres dans le domaine I de la protéine.

Le domaine II joue un rôle important dans l'inhibition de la protéine kinase PKR, stimulée par l'IFN en réponse à l'existence de l'ARN double brin dans la cellule (Gale et al., 1998) ; le domaine II joue un rôle important dans la réplication virale (Tellinghuisen et al., 2005). Des études ont montré que le domaine III intervient dans l'assemblage des particules virales (Appel et al., 2008). Ce domaine est l'une des régions les plus variables du génome du VHC.

La protéine NS5A peut être phosphorylée sur plusieurs résidus sérine ; de ce fait, elle peut exister sous deux formes distinctes hypophosphorylée et hyperphosphorylée de masses

moléculaires respectives 56 kDa et 58 kDa. L'état de phosphorylation de cette protéine affecte la réplication virale. En raison de son implication dans la réplication et l'assemblage des particules virales, la protéine NS5A a été identifiée comme une cible majeure pour l'inhibition virale conduisant ainsi, au développement de nouveaux agents thérapeutiques (Pawlotsky, 2013).

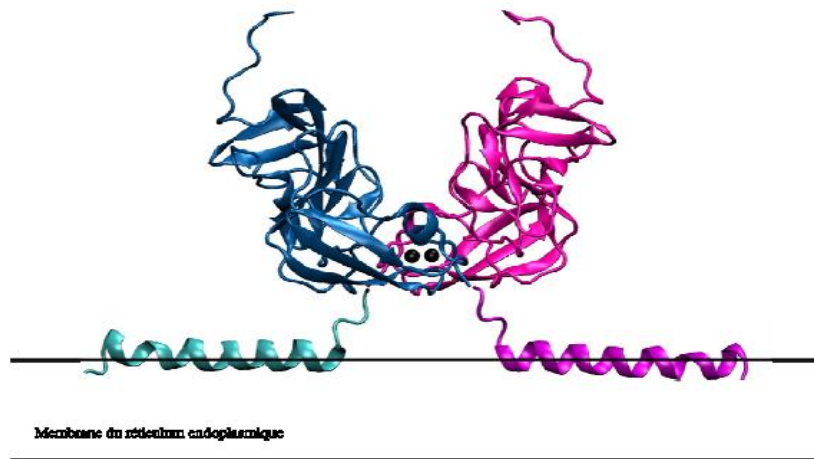


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de la partie non transmembranaire de la protéine NS5A

La structure représente le dimère NS5A comportant son domaine I et l'hélice amphiphile. Sa position par rapport à la membrane du RE est indiquée. Les différentes structures sont représentées par des couleurs différentes : en bleu foncé et rose, un dimère de NS5A, domaine I ; en noir l'ion Zn^{2+} ; en bleu clair et magenta les hélices alpha amphiphiles de NS5A. Cette structure est issue de la Protein Data Bank <http://www.rcsb.org> (code pdb :1ZH1 et 1R7F).

5-2-6- Protéine NS5B

NS5B est une phosphoprotéine membranaire de masse moléculaire 68 kDa, c'est une RdRp qui joue le rôle de catalyseur au sein de la machinerie de réplication virale du VHC. Elle possède un motif en AA très conservé (Gly-Asp-Asp) (G-D-D) caractéristique de toutes les RdRp (Lohmann et al., 1997). La structure cristallographique de cette protéine montre une structure en forme de main droite avec des « doigts », un « pouce » et une « paume » (**Figure 9**) (Bressanelli et al., 1999 ; Bressanelli et al., 2002). Le site actif enzymatique se trouve au niveau de la « paume », alors que les « doigts » et le « pouce » forment un canal par lequel l'ARN simple brin est directement acheminé au site actif (Bressanelli et al., 2002). L'entrée des nucléotides nécessaire à l'élongation de l'ARN au niveau du site actif se fait via un autre canal chargé positivement. Le domaine transmembranaire C-terminal de la protéine NS5B permet sa fixation à la membrane du RE (Ivashkina et al., 2002). Cette fixation de la NS5B à la membrane du RE est nécessaire pour la réplication virale (Moradpour et al., 2004).

Cette protéine est une cible pour le développement des molécules antivirales dirigées contre le VHC (De Francesco et Migliaccio., 2005).

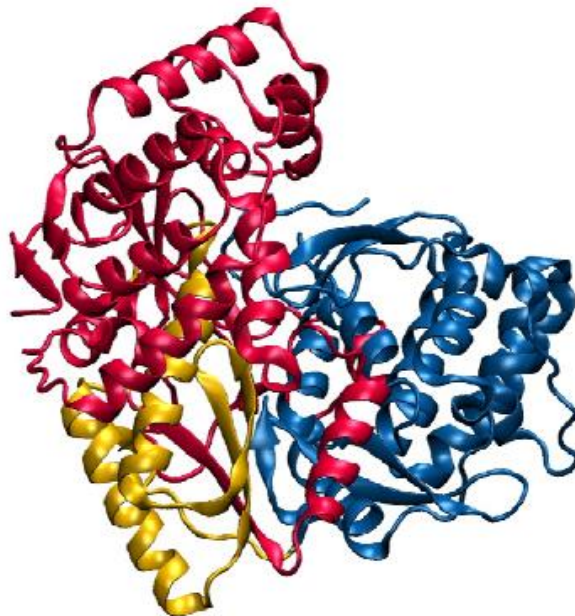


Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la région non transmembranaire de la protéine NS5B

La structure 3D représente la protéine NS5B dépourvu de ses 23 AA. Ses différents domaines sont représentés par des couleurs différentes : en rouge le domaine « doigt » ; en jaune le domaine « paume » ; en bleu le domaine « pouce ». Cette structure est issue de la Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org> (code pdb :2FVC).

6- Modèles d'étude

Les techniques de biologie moléculaire ont permis la découverte du VHC, mais également l'étude de son organisation génomique et la caractérisation biochimique de ses protéines virales. Pendant de nombreuses années, l'étude du cycle infectieux du virus était bloquée en raison de l'absence d'un modèle de culture cellulaire efficace ou d'un modèle animal permettant l'amplification génomique du VHC et la production des particules virales infectieuses. L'étude des propriétés physico-chimiques et la pathogenèse du VHC ont été réalisées sur des extraits cliniques et par infection expérimentale du chimpanzé par le sérum des patients infectés par le VHC. Afin de caractériser les étapes du cycle infectieux et d'étudier les interactions du virus avec les cellules cibles, certains modèles ont été mis en place. Un système de culture cellulaire du VHC a été développé en 2005, « VHCcc », permettant la production de particules virales infectieuses. D'autres modèles d'étude ont été développés comme le modèle des réplicons génomiques et subgénomiques et le modèle des pseudo-particules virale du VHC « VHCpp ». Le développement des modèles d'études du

VHC a permis des avancées importantes dans l'étude de la réplication virale. Ces systèmes ont contribué au développement, à l'étude de l'efficacité et des mécanismes d'action des nouvelles molécules thérapeutiques.

6-1- Modèles animaux

6-1-1- Chimpanzé

Naturellement, le VHC n'infecte que les êtres humains. Le seul animal pouvant être infecté d'une manière expérimentale par le VHC est le chimpanzé. L'infection du chimpanzé est stable, reproductible et progresse d'une manière similaire à celle observée chez l'homme. Cette infection expérimentale est caractérisée par une virémie, c'est-à-dire la présence d'un ARN viral détectable dans le sang, et par le développement de réponses immunitaires non spécifiques et adaptatives. En revanche, l'utilisation du modèle du chimpanzé est limitée car la sévérité de la maladie hépatique est moins importante que chez l'homme (Bradley, 2000). Pour des raisons éthiques et de rareté de l'animal, le chimpanzé étant une espèce protégée, son utilisation a été stoppée dans la plupart des pays.

6-1-2- Autres modèles

Des efforts importants ont été développés afin de chercher des modèles animaux plus abordables pour améliorer les systèmes cellulaires permettant la production des virions. Récemment, le modèle des souris xéno greffées, « humanisées » par la greffe d'hépatocytes humains a été développé. Ces souris utilisées sont immunodéprimées « souris SCID » (Severe Combined Immuno-Deficiency), portant un transgène activateur de plasminogène « Alb-uPA » (Albumin-urokinase-type Plasminogen Activator) permettant la destruction de leur foie, qui sera par la suite colonisé par des cellules hépatiques humaines. L'infection expérimentale de ces souris par le sérum des patients infectés par le VHC assure la production des virions.

6-2- Modèles cellulaires

6-2-1- Réplicons

Le développement de réplicons du VHC a constitué une avancée majeure dans l'étude de la réplication de ce virus. Il s'agit d'ARN répliatifs autonomes. Ils sont typiquement bicistroniques, constitués d'une séquence codant un marqueur de sélection, placée sous le contrôle de l'IRES du VHC, et de la séquence codant les protéines du VHC, placée sous le contrôle de l'IRES hétérologue du virus de l'encéphalomyocardite (VEMC), le tout étant encadré par les régions 5'NC et 3'NC du VHC. Les réplicons génomiques, qui possèdent

l'intégralité du génome viral, et les réplicons subgénomiques se répliquent de manière efficace dans les cellules hépatocytaires « Huh7 » (**Figure 10**) (Lohmann et al., 1999).

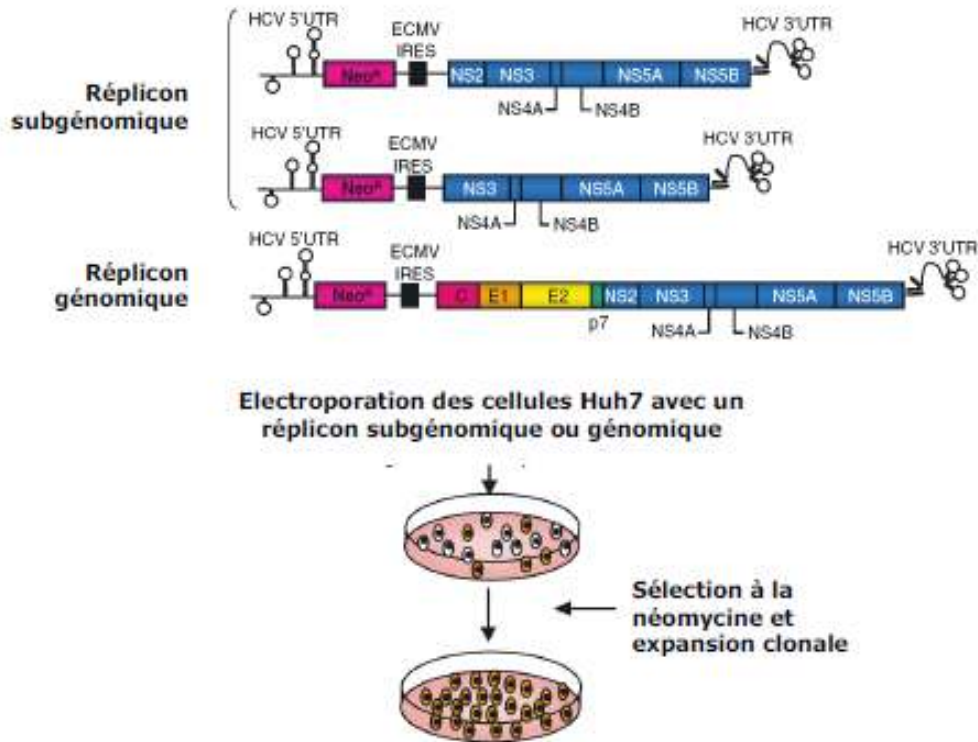


Figure 10 : Représentation schématique du système des réplicons du VHC

6-2-2- Pseudo-particules virales

Le développement des pseudo-particules virales du VHC « VHCpp » a constitué une étape majeure dans l'étude de l'entrée du virus dans la cellule cible (Bartosch et al., 2003 ; Drummer et al., 2003). Ces pseudo-particules sont des virus chimériques obtenus après transfection des cellules embryonnaires humaines HEK-293T par trois vecteurs (**Figure 11**). Le premier vecteur code les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC, le deuxième code la capside du virus de la leucémie murine (MLV) ou du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le troisième vecteur exprime un gène rapporteur codant la protéine fluorescente verte « GFP » ou la luciférase. Une fois formées, les pseudo-particules virales sont secrétées dans le milieu de culture cellulaire permettant ainsi l'infection des cellules.

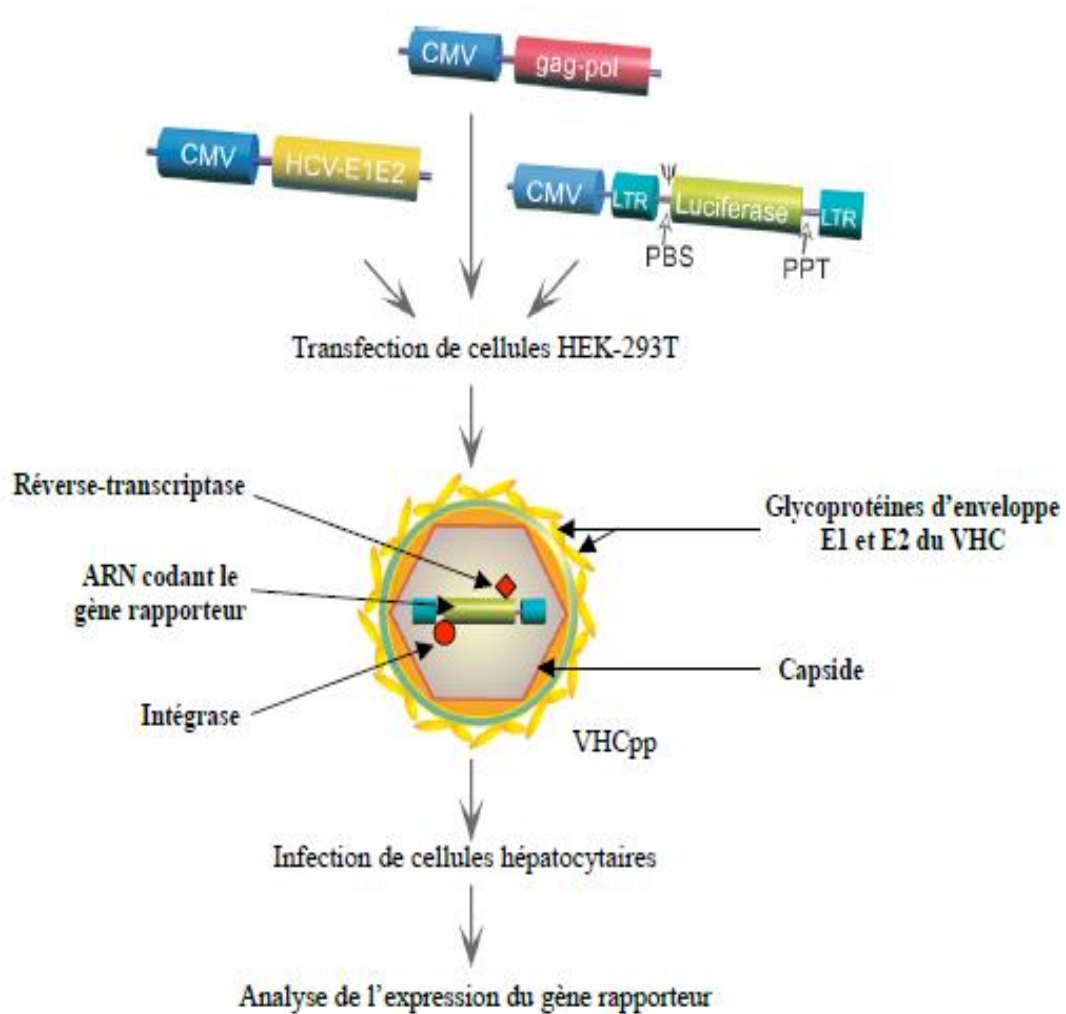


Figure 11 : Représentation schématique de la production des pseudo-particules virales

6-2-3- Particules virales produites en culture cellulaire

En 2001, Kato et ses collaborateurs ont pu isoler un clone particulier du VHC provenant d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante. Il s'agissait du VHC de génotype 2a, nommé JFH-1 (Japanese fulminant hepatitis) (Kato et al., 2001). En 2003, ces mêmes auteurs ont pu construire un réplicon subgénomique capable de se répliquer d'une manière efficace et autonome dans les cellules hépatocellulaires humaines Huh-7 (Kato et al., 2003). En 2005, l'équipe de Wakita et ses collaborateurs a pu mettre en place un système de culture cellulaire permettant la production de particules virales infectieuses (Wakita et al., 2005). La transfection des cellules Huh-7 par l'ARN viral du clone JFH-1, assure la production des virions (**Figure 12**). La production du VHC en culture cellulaire est désignée par « VHCcc ». Elle a permis l'étude du cycle viral complet puisque les cellules infectées produisent de nouvelles particules virales.

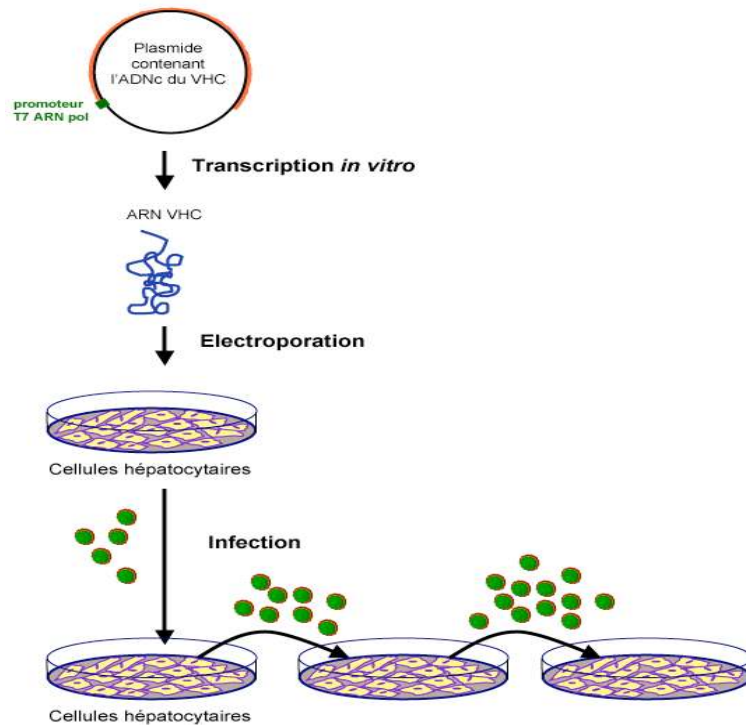


Figure 12 : Représentation schématique de la production de VHCcc

L'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARN génomique viral JFH-1 est transcrit *in vitro* à partir du promoteur T7. Les ARNs viraux produits sont utilisés pour transfecter les cellules hépatocytaires humaines naïves Huh-7. Les cellules transfectées sont capables de produire des particules virales infectieuses appelées « VHCcc » qui sont à leur tour utilisées pour infecter des nouvelles cellules hépatocytaires. Cette infection permet l'étude du cycle infectieux complet car les cellules infectées sont capables de produire des nouvelles particules virales.

7- Cycle répliatif viral

Grâce à l'utilisation de différents modèles décrits précédemment, mais également par analogie avec des virus phylogénétiquement proches, un schéma général des différentes étapes du cycle viral du VHC a pu être établi (**Figure 13**).

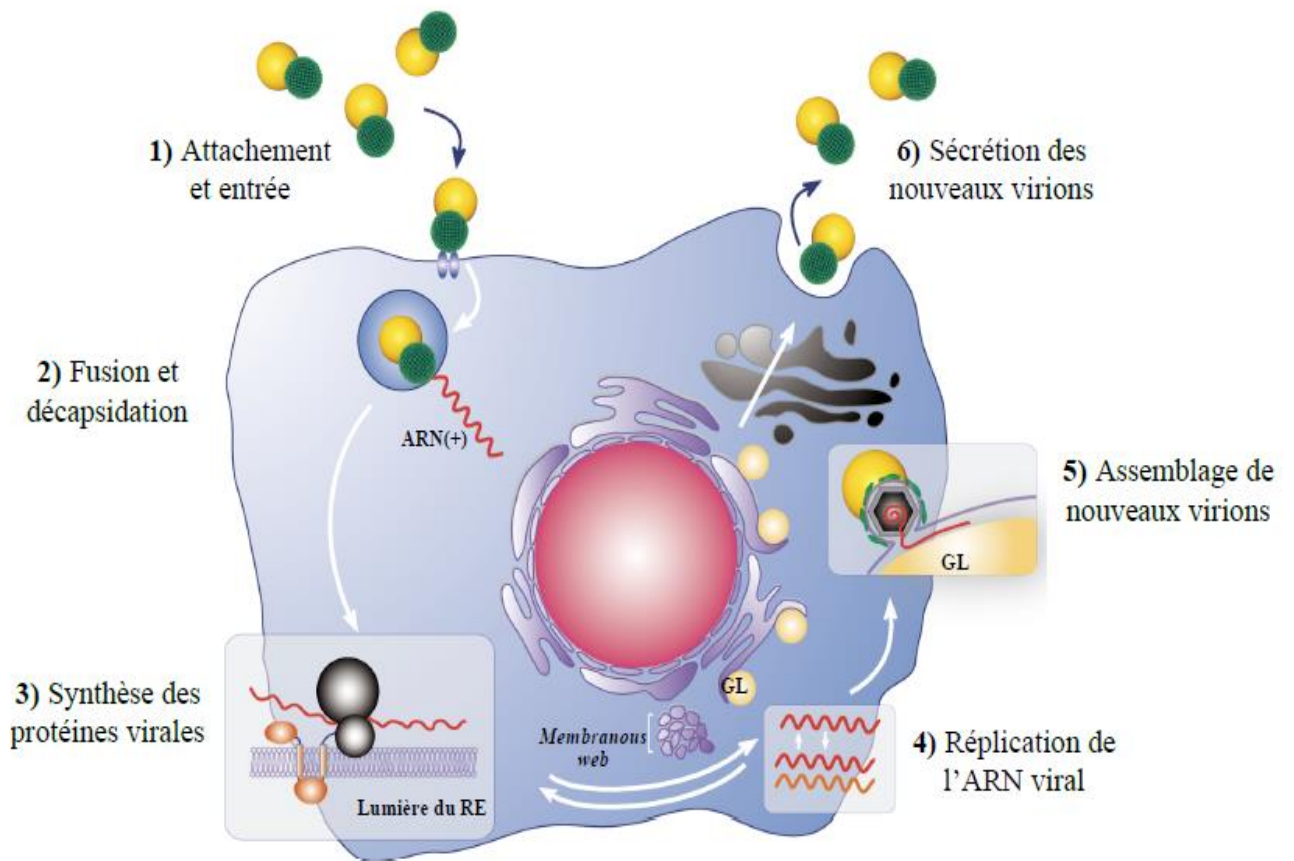


Figure 13 : Cycle Viral du VHC (d'après Dubuisson, 2007)

(1) Attachement du virus et neutralisation ; (2) Relargage cytoplasmique et décapsidation ; (3) Traduction médiée par l'IRES et clivage de la polyprotéine ; (4) Réplication de l'ARN ; (5) Empaquetage et assemblage des virions ; (6) Maturation et excrétion des virions.

7-1- Fixation au récepteur et internalisation

Les glycoprotéines E1 et E2 sont des constituants essentiels de l'enveloppe virale et jouent un rôle important dans l'entrée du VHC dans les cellules cibles. Bartosch et ses collaborateurs ont montré que l'hétérodimère E1-E2 est impliqué dans l'entrée cellulaire du VHC (Bartosch et al., 2003). Le domaine de liaison au récepteur CD81, situé sur E2, assure le bon repliement de cette glycoprotéine lui permettant de jouer son rôle comme facteur d'entrée cellulaire du VHC. D'autre part, cette glycoprotéine contient une région hypervariable appelée « HVR1 » présentant une séquence très hétérogène permettant au virus d'échapper au système immunitaire et donc de persister chez son hôte (Von Hahn et al., 2007). Les travaux de Scarselli et al. ont montré que la région HVR1 est impliquée dans l'interaction du virus avec le récepteur scavenger SR-BI (Scarselli et al., 2002). D'autres régions hypervariables

sont décrites dans la littérature comme pouvant jouer un rôle dans l'entrée cellulaire du VHC telles que les régions hypervariables 2 et 3, appelées « HVR2 » et « HVR3 » (Roccasecca et al., 2003 ; Troesch et al., 2006). La glycoprotéine E1 joue un rôle dans la fusion et l'internalisation du virus dans la cellule cible (Lavillette et al., 2007).

Une organisation séquentielle de la cascade des événements permettant l'entrée du VHC dans la cellule hôte a pu être établie. Cette organisation est résumée dans la **Figure 14** ci-dessous.

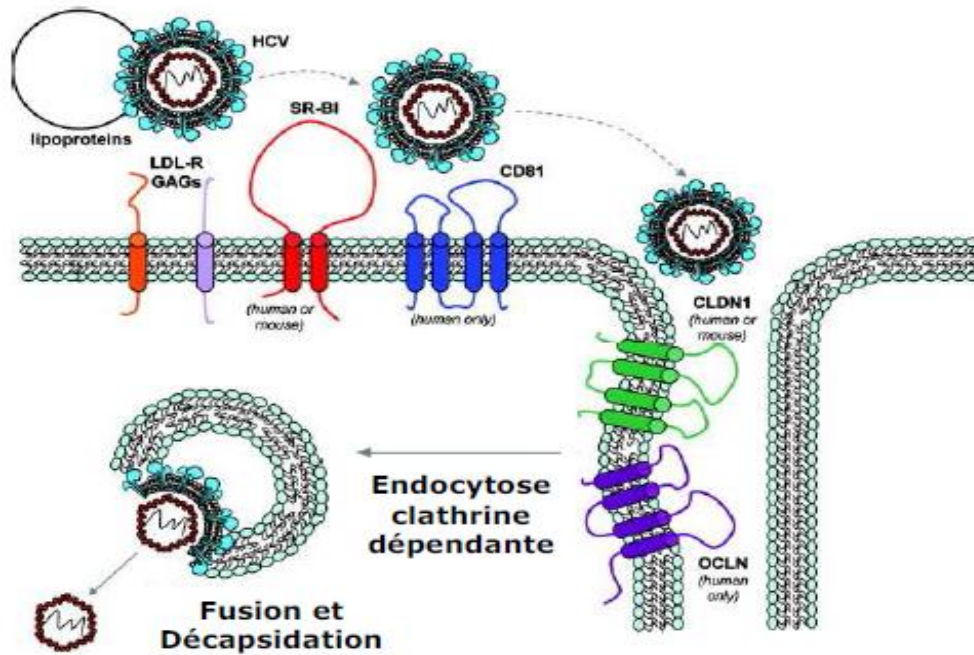


Figure 14 : Modèle d'entrée du VHC (d'après Eyre et al., 2009)

Le récepteur des LDL « LDL-R » et les glycosaminoglycanes « GAGs » facilitent la fixation initiale du VHC sur les cellules hôtes via une interaction directe avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 ou à travers les lipoprotéines. Cette fixation initiale permet à la particule virale de réagir avec différents récepteurs cellulaires spécifiques tels que « SR-BI » « CD81 » « CLDN1 » et « OCLN ». Différents agents stimulent l'entrée du VHC comme les lipoprotéines de haute densité « HDL » qui facilitent la fixation cellulaire du VHC. D'autres inhibent cette étape comme la protéine EWI-2wint, l'apolipoprotéine sérum amyloïde A « SAA », les LDL oxydées « LDLox » ainsi que la lipoprotéine lipase « LPL ». Enfin la particule virale est internalisée par endocytose dépendante de la clathrine.

7-2- Internalisation et fusion de la particule virale

L'internalisation des virus enveloppés dans la cellule cible peut se faire selon deux façons : soit par endocytose de la particule virale et fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome, soit par fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane cellulaire (Sollner, 2004). Il a été montré que l'entrée du VHC dans la cellule hôte se fait à travers une

voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Sous l'effet d'un pH acide, la membrane virale et la membrane endosomale fusionnent et libèrent le génome viral dans le cytoplasme (Blanchard et al., 2006 ; Meertens et al., 2006).

7-3- Traduction de la protéine virale

Après sa libération dans le cytosol, l'ARN viral est traduit afin de donner naissance à une polyprotéine précurseur d'environ 3010 AA. La traduction de l'ARN du VHC est assurée par la présence de l'IRES situé au niveau de la région 5'NC. L'IRES forme une structure tertiaire complexe organisée en trois domaines (II, III, IV). Il permet l'entrée de la petite sous-unité 40S du ribosome et assure sa fixation sur la méthionine initiatrice (AUG) au niveau du domaine II. L'IRES favorise ensuite la liaison du facteur d'initiation eucaryote « eIF3 ». L'étape suivante est la fixation, de manière GTP-dépendante, de la grande sous-unité 60S pour former le complexe d'initiation de la traduction 80S (**Figure 15**).

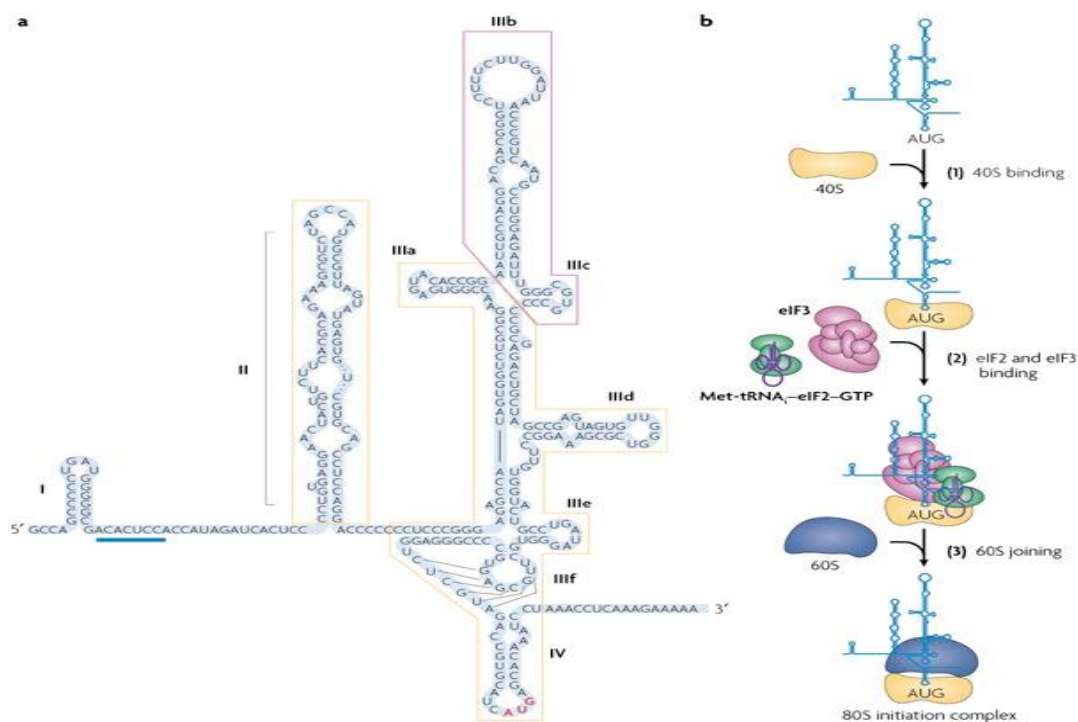


Figure 15 : Modèle de formation du complexe d'initiation de la traduction (d'après Fraser et Doudna., 2007)

a) La structure secondaire de la région 5'NC du VHC comprend 4 domaines notés de I à IV. L'IRES inclut les domaines II, III et IV. Les domaines importants pour la fixation du complexe 40S sont encadrés en jaune et le site de fixation pour le facteur d'initiation « eIF3 » est encadré en magenta. Le codon AUG est en rouge. **b)** L'initiation de la traduction à partir de l'IRES du VHC commence avec le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome directement sur l'IRES en absence des facteurs d'initiation. Ensuite « eIF3 » et le complexe Met-tRNA_i/eIF2-GTP sont recrutés à la surface de la sous-unité 40S du ribosome. L'hydrolyse du GTP permet ensuite le recrutement de la sous-unité 60S pour former le complexe d'initiation de la traduction 80S.

7-4- Maturation et clivages protéolytiques de la polyprotéine

La polyprotéine précurseur subit la maturation co- et post-traductionnelle à travers des protéases virales et cellulaires pour donner naissance aux protéines structurales et non-structurales. La signal peptidase du RE assure le clivage protéolytique des protéines structurales c'est-à-dire les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, la protéine C et la protéine p7. Il existe deux protéases virales, la protéase auto-catalytique NS2/3 et la protéase NS3/4, qui assurent le clivage des protéines non structurales. Tous ces clivages se réalisent au niveau de la membrane du RE où se localisent les protéines du VHC (**Figure 16**).

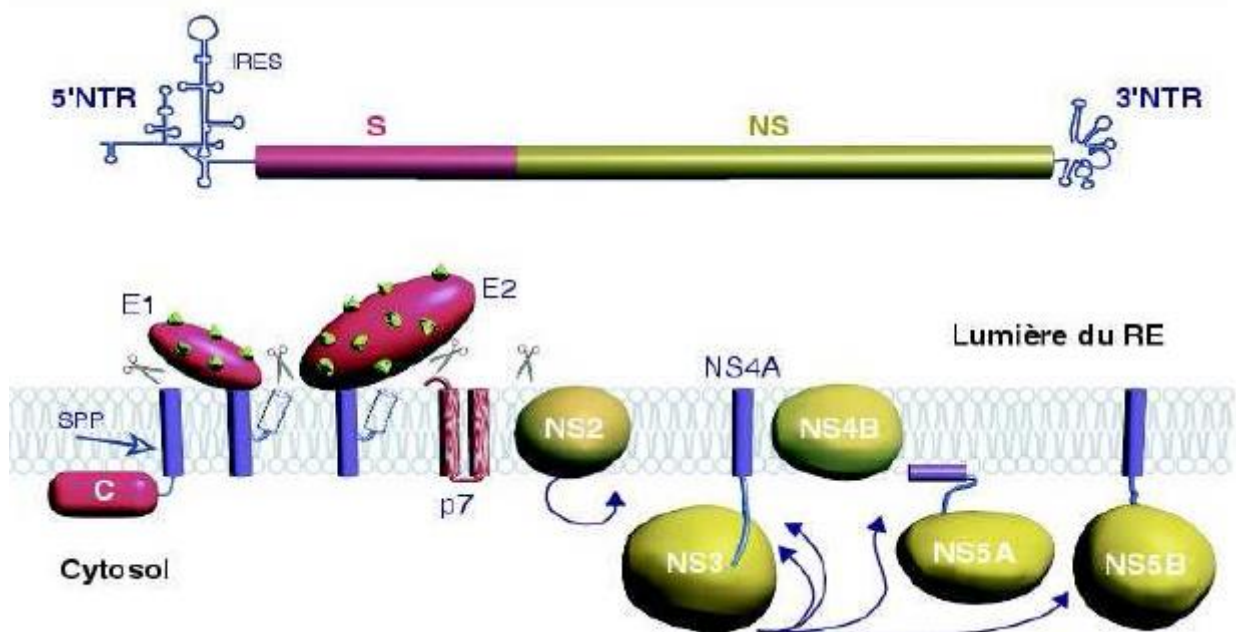


Figure 16 : Organisation du génome, maturation de la polyprotéine précurseur du VHC et localisation des protéines au niveau du RE (d'après Penin et al., 2004)

7-5- Réplication de l'ARN viral

La libération des protéines structurales et non-structurales, suite à la maturation de la polyprotéine précurseur du VHC, permet l'initiation de la réplication et la formation du complexe de réplication. La réplication de l'ARN du VHC de polarité positive débute par la synthèse d'un ARN complémentaire de polarité négative. Celui-ci servira de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin de polarité positive. La protéine non-structurale NS5B grâce à son activité RdRp catalyse la réplication virale de l'ARN génomique du VHC.

7-6- Assemblage et libération des particules virales

Lors de l'étape d'assemblage, les ARN du VHC produits forment des virions qui seront libérés dans le milieu extracellulaire par exocytose (**Figure 17**).

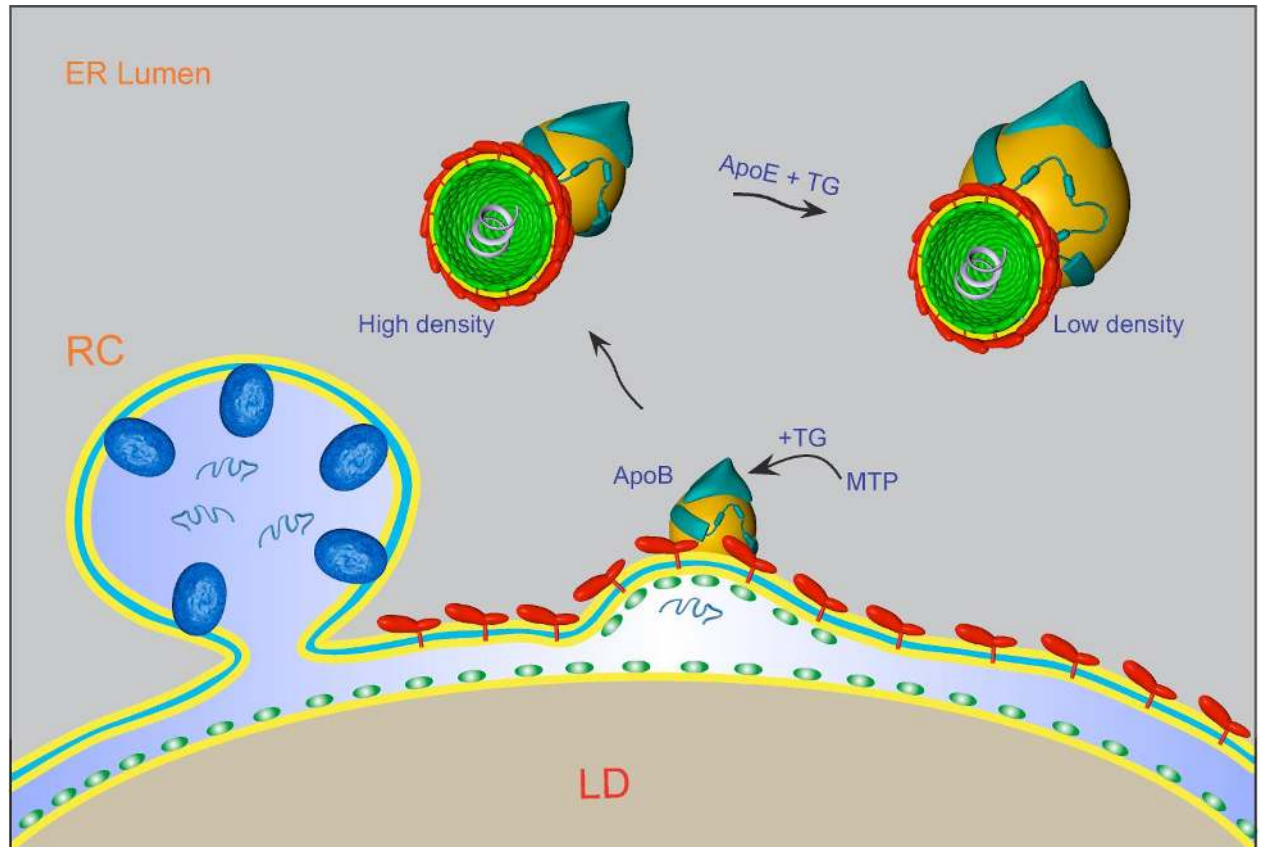


Figure 17 : Modèle proposé pour l'assemblage du VHC (d'après Popescu et Dubuisson., 2009)

L'association de la protéine de capsid (vert) avec des gouttelettes lipidiques (LD) et le recrutement de complexe de réplication (RC) sont essentiels. L'interaction de la protéine de capsid avec l'ARN viral déclenche le bourgeonnement des virions arborant les glycoprotéines d'enveloppe (en rouge). L'assemblage des virions est dépendant de la machinerie de formation des VLDL. La protéine microsomale de transfert (MTP) permet la lipodation de l'apolipoprotéine B (Apo B), ce qui conduirait à la formation de particules infectieuses de forte densité (high density). Une seconde étape de lipodation impliquant la MTP et l'apolipoprotéine E (Apo E) permettrait la formation de particules infectieuses de faible densité (low density).

Il est probable que l'assemblage des particules virales soit déclenché par interaction entre l'ARN viral et la protéine de capsid permettant ainsi la formation de la nucléocapsid (Roingard et Hourieux., 2008). A l'intérieur du RE, les virions semblent être formés par bourgeonnement ; ils sont ensuite libérés par voie d'exocytose. D'autre part, différentes

études ont montré que les protéines NS2 et p7 jouent un rôle important dans la production des particules virales infectieuses (Jones et al., 2007 ; Yi et al., 2009).

8-Variabilité génétique

Comme la plupart des virus à ARN, le VHC est caractérisé par une grande diversité génétique expliquée par le fort taux de réplication virale (10^{12} nouveaux virions par jour) et par les erreurs de transcription de l'ARN polymérase associées à l'absence d'activité correctrice 5'-3', aboutissant à un taux élevé de mutations (Neumann et al., 1998). La plupart des mutations accumulées lors de la réplication virale sont synonymes ou silencieuses et n'ont pas d'impact sur la séquence en AA de la protéine virale. En revanche, les mutations non-synonymes induisent un changement de la séquence de la protéine virale et provoquent l'émergence du polymorphisme génétique.

La diversité génétique varie d'une région génomique à l'autre, ce qui permet l'identification de régions plus ou moins polymorphes. Parmi les régions les plus conservées, la région 5'NC présente 90% d'homologie entre les séquences de différentes souches (Bukh et al., 1995) et la région codant la protéine C présente une homologie de séquence de 81 à 88% entre les souches du VHC (Simmonds et al., 1994). A l'opposé, les travaux de Troesch et ses collaborateurs ont montré l'existence de régions variables situées au niveau des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 appelées « HVR1 », « HVR2 » et « HVR3 » (Troesch et al., 2006).

8-1- Les génotypes et les sous-types

Les approches phylogénétiques ont permis d'établir une classification des variants du VHC en 7 génotypes et de nombreux sous-types (**Figure 18**). Un système de nomenclature consensuel a été mis en place. Les génotypes sont exprimés en chiffre arabe (génotype 1, 2, 3 ...) et les sous-types en lettre minuscule (sous-type 1a, 1b, 2a...) (Smith et al., 2014). L'analyse phylogénétique des régions core, NS5A, NS5B ou du génome complet permet d'attribuer un génotype à chaque virus. La variabilité génétique entre les séquences nucléotidiques des différents génotypes est de 30 à 35%. Cette diversité est de 20 à 25% entre les différents sous-types. La détermination du génotype viral est un élément incontournable du bilan pré-thérapeutique car il constitue l'un des facteurs prédictifs de la réponse au traitement et détermine le choix des molécules utilisées avec les nouveaux traitements anti-VHC.

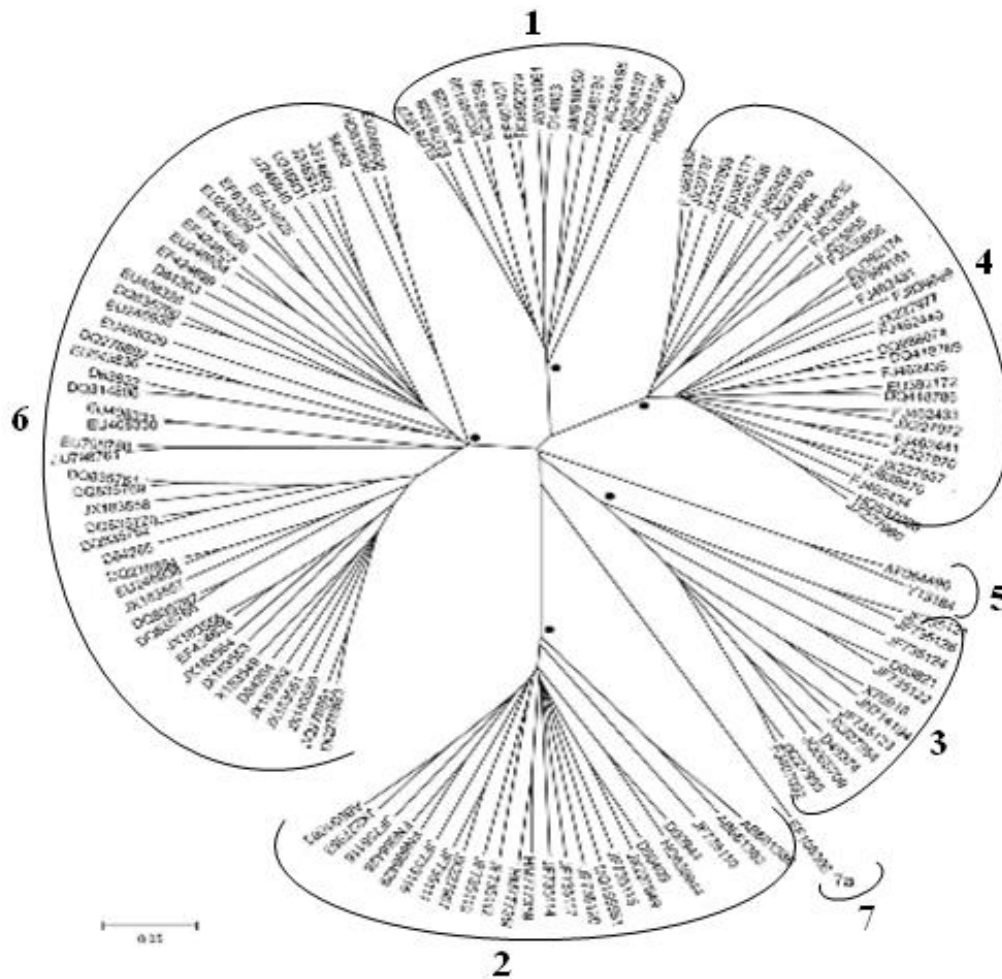


Figure 18 : Arbre phylogénétique des souches virales VHC (Smith et al., 2014)

La distribution géographique mondiale des génotypes et des sous-types du VHC est très variable (**Figure 19**) (Messina et al., 2015). Les génotypes 1a, 1b, 2 et 3 sont répartis partout dans le monde, tandis que les génotypes 4, 5 et 6 sont plutôt caractéristiques de certaines régions. En Tunisie, il y a une large prédominance du génotype 1b avec une fréquence de 80%, suivi du génotype 2 avec une fréquence de 10% (Djebbi et al., 2004). Selon les études effectuées en France chez des patients ou chez les donneurs de sang, le génotype 1 est majoritaire comptant pour 57 à 61% parmi lequel 28 à 31% de génotype 1b et 17 à 25% de génotype 1a. Il est suivi par le génotype 3 (19 à 21%), le génotype 2 (9 à 12%), le génotype 4 (9%), le génotype 5 (2 à 3%) et le génotype 6 (<1%) (Payan et al., 2005; Laperche et al., 2012).

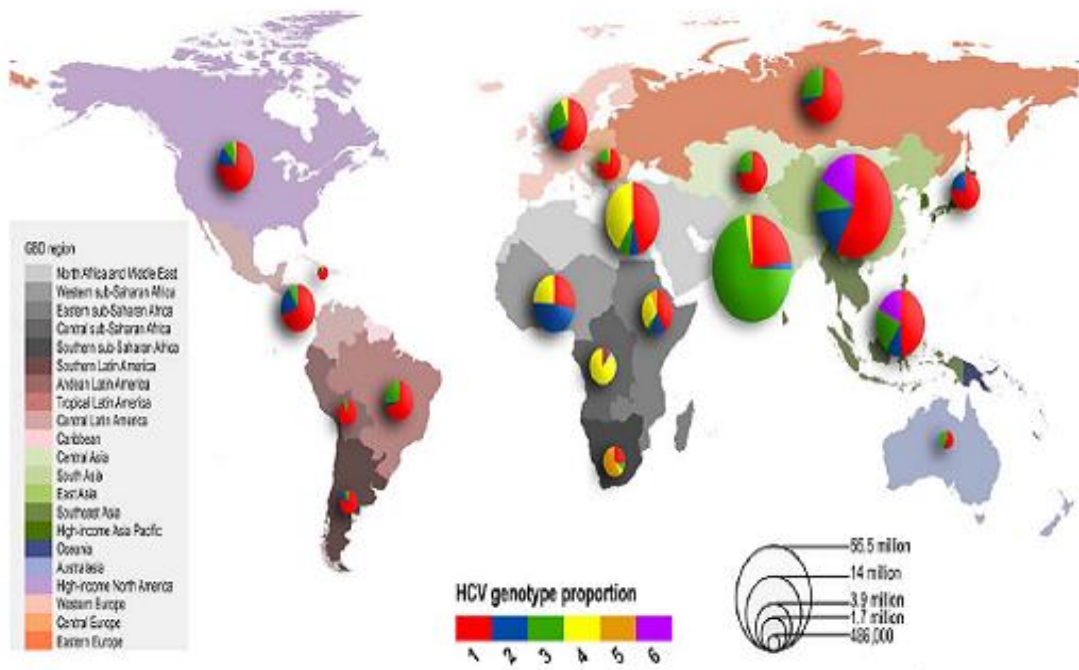


Figure 19 : Distribution géographique mondiale des génotypes VHC (d'après Messina et al., 2015).

8-2- Quasi-espèces

Chez un individu donné, l'évolution génétique du virus au cours du temps entraîne, sous l'effet de la pression immunitaire de l'hôte, la sélection de mutants viraux. Ceci conduit chez les sujets infectés à une hétérogénéité de la population virale qui apparaît composée d'un mélange complexe et en équilibre instable de variants génétiquement distincts mais apparentés appelé « quasi-espèce » (Martell et al., 1992 ; Domingo et Gomez., 2007). Le degré de complexité et de diversité de la quasi-espèce reflète les interactions entre la capacité de réplication propre du virus et les nombreuses pressions environnementales. L'adaptation de la quasi-espèce aux modifications de l'environnement joue un rôle primordial dans la physiopathologie de l'infection, au niveau de la résistance aux traitements antiviraux, mais également au niveau de la persistance virale.

9- Epidémiologie

Le VHC est présent sur l'ensemble de notre planète, c'est une cause majeure d'hépatite aiguë et d'affection hépatique chronique. L'OMS estime que la prévalence moyenne de l'infection par le VHC est de 3%, soit 170 millions de personnes infectées dans le monde dont 130 millions chroniquement infectées et exposées au risque de développer une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (CHC). Cette prévalence est très variable et n'est

pas la même dans toutes les régions du globe (**Figure 20**). Elle varie de 0,5% à 6% et peut dépasser parfois les 10% notamment dans certains pays d'Afrique (WHO, 2002).

Cinq niveaux de prévalence peuvent être décrits:

- Très basse prévalence où les marqueurs du VHC sont trouvés chez moins de 1% des donneurs de sang : pays scandinaves, Australie, Canada et Suisse.
- Basse prévalence où les taux d'infection par le VHC sont compris entre 1% et 2,4% : majorité des pays d'Amérique, d'Europe et d'Asie du sud-est.
- Prévalence intermédiaire définie par des taux de 2,5 à 4,9% : régions de la méditerranée orientale et du Pacifique occidental.
- Forte prévalence avec un pourcentage de sujets infectés compris entre 5 et 10% : Gabon, Lybie, Nouvelle-Guinée, Zaïre et Vietnam.
- Très forte prévalence, supérieure à 10% : Burundi, Cameroun, Bolivie, Mongolie, Guinée, Tanzanie, Rwanda et Egypte.

En Tunisie, la prévalence de l'infection chronique par le VHC est très basse, il s'agit d'un pays de faible endémicité. Elle est estimée entre 0,4 et 1% (Slama et al., 1991 ; Triki et al., 1997 ; Gorgi *et al.*, 1998).

La France est aussi un pays de faible endémicité pour l'infection chronique par le VHC. L'enquête de prévalence de l'hépatite C en France en 2004 a estimé la prévalence des anticorps contre le VHC chez les adultes âgés de 18 à 80 ans à 0,84% (Meffere et al., 2010).

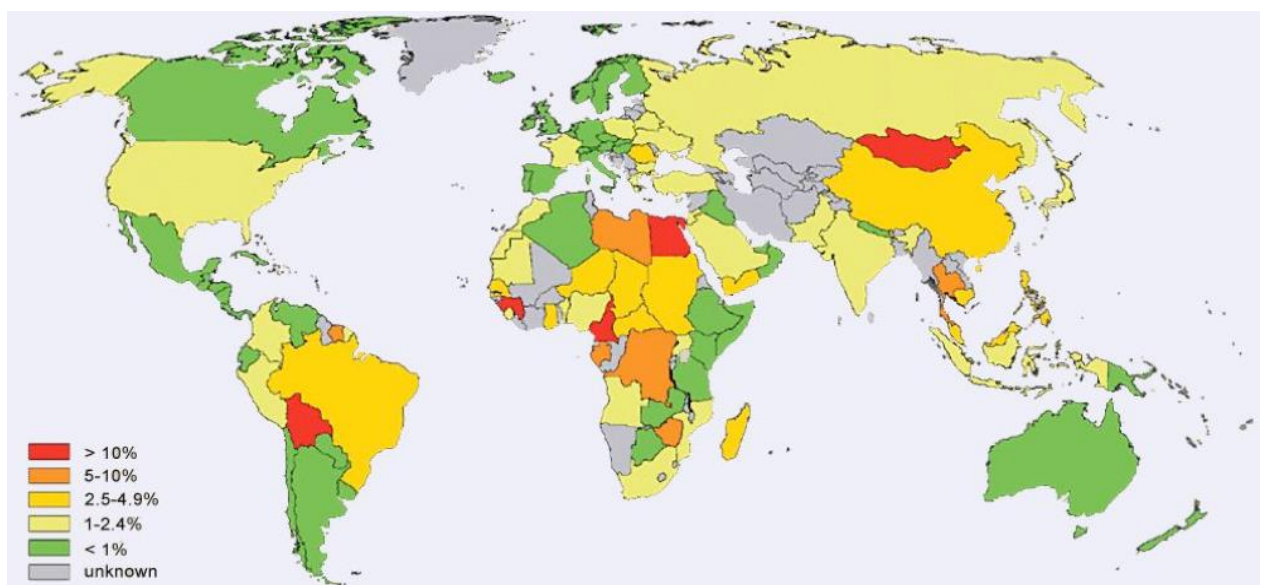


Figure 20 : Prévalence du VHC à travers le monde (D'après WHO, 2002)

10- Modes de transmission du VHC et facteurs de risques

La voie parentérale constitue le mode de transmission majeur du VHC (Lemon et al., 2007). Avant l'apparition des tests sérologiques en 1991 permettant le dépistage systématique des dons de sang, la cause majeure de contamination par le VHC était la transfusion sanguine ou les dons d'organes provenant de sujets infectés. De nos jours, le risque résiduel de transmettre l'infection a été estimé sur la période 2008-2010 en France à 1/7 000 000 grâce au dépistage systématique des anticorps anti-VHC et de l'ARN-VHC sur les dons de sang (Pillonel et al., 2012).

A l'heure actuelle, la principale cause de transmission du VHC dans les pays développés est la toxicomanie impliquant l'échange entre les toxicomanes de seringues contaminées par du sang infecté (Murray et al., 2003).

Les infections nosocomiales, notamment chez les hémodialysés, ont été rapportées ainsi que l'exposition accidentelle au sang contaminé par le VHC chez les professionnels de santé (Sanchez-Tapias, 1999).

D'autres cas de transmission du VHC ont été rapportés par l'intermédiaire d'actes chirurgicaux, piercing, tatouage, scarifications religieuses, circoncisions, acupuncture et rasage chez le barbier pouvant transmettre l'hépatite C d'une personne à une autre par l'exposition percutanée au sang (Rhoads, 2003 ; Alter, 2007).

Les risques de transmission sexuelle avec un partenaire infecté par le VHC sont extrêmement faibles, voire nuls (Vandelli et al., 2004), en dehors de rapports sanglants ou traumatiques. Il existe un risque notamment chez les homosexuels masculins où de nombreux cas d'hépatite aiguës ont été documentés (Larsen et al., 2011).

La transmission verticale mère-enfant pendant l'accouchement est bien décrite mais faible. Le risque est plus important dans le cas d'une co-infection par le VIH (Conte et al., 2000).

Le mode de contamination reste inconnu dans environ 20% des cas (Alter, 2007). Pour certains, la transmission pourrait être l'effet d'une transfusion ou d'un acte médico-chirurgical ignoré ou oublié mais aussi d'un contact avec le sang contaminé en dehors de tout contexte de toxicomanie ou de transfusion.

11- Diagnostic de l'hépatite C

En France, les recommandations de dépistage de l'infection par le VHC ciblent actuellement les personnes exposées au risque d'infection. Cela peut être des :

- Personnes ayant reçu des produits sanguins stables avant 1988 ou des produits sanguins labiles avant 1992 ou une greffe de tissu, de cellules ou d'organe avant 1992.
- Personnes ayant utilisé au moins une fois dans leur vie des drogues par voie intraveineuse.
- Personnes ayant eu une exposition à des actes de soins invasifs avant 1997.
- Personnes hémodialysées.
- Enfants nés de mère séropositive pour le VHC.
- Personnes découvertes séropositives pour le VIH.
- Partenaires sexuels et membres de l'entourage familial de sujets atteints d'hépatite C.
- Personnes séjournant ou ayant séjourné en milieu carcéral.
- Personnes originaires de ou ayant reçu des soins dans des pays de fortes prévalence du VHC (Asie du Sud-Est, Moyen-Orient, Afrique, Amérique du Sud).
- Personnes ayant eu des tatouages, piercing, mésothérapie ou acupuncture sans utilisation de matériel à usage unique ou personnel.
- Personnes chez lesquelles sont trouvées des valeurs élevées d'alanine amino-transférase (ALAT) sans cause connue.

Le diagnostic des infections par le VHC repose, comme celui de toute infection virale, sur 2 types de tests :

- **Les tests indirects** : tests sériques immuno-enzymatiques. Il s'agit des tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de troisième génération dont la spécificité est de l'ordre de 99%. Le dépistage consiste en la recherche des AC anti-VHC chez les personnes à risque. A la différence des tests de première et de deuxième génération qui ne sont plus commercialisés en France, la sensibilité des tests de troisième génération semble satisfaisante chez les hémodialysés et les sujets infectés par le VIH en dehors d'immunodépression profonde. Chez les patients immunodéprimés (patients sous chimiothérapie, patients transplantés), les AC peuvent ne pas être détectés, la recherche de l'ARN VHC est alors recommandée. La sérologie peut être faussement négative en cas d'immunodépression sévère ou d'hépatite C aiguë. Il faut toujours contrôler les sérologies positives par un deuxième test différent du premier sur un autre prélèvement.

La détection d'AC anti-VHC par les tests sérologiques révèle une exposition au virus mais ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'une infection en cours ou d'une

infection ancienne guérie. Toutes les personnes ayant des AC anti-VHC positifs doivent faire l'objet de tests supplémentaires, moléculaires, pour rechercher la présence du VHC lui-même afin de déterminer si l'infection est en cours d'évolution.

- **Les tests directs :** tests de biologie moléculaire permettant la détection et la quantification de l'ARN VHC. Les techniques les plus souvent utilisées sont la technique d'amplification de la cible par polymérase chain reaction (PCR) en temps réel et la transcription-mediated amplification en temps réel (TMA).
 - ❖ PCR en temps réel : le principe de la PCR en temps réel est de détecter la synthèse des produits d'amplification au cours de la réaction de PCR et d'en déduire la quantité de génome viral présente initialement dans l'échantillon grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente. Les valeurs obtenues doivent être exprimées en UI/ml, idéalement en log UI/ml, afin de pouvoir comparer les résultats émanant de différents laboratoires et en utilisant des techniques de détection et de quantification différentes. Elles sont plus sensibles que les techniques de PCR classiques, n'exposent pas au risque de faux-positifs liés à des contaminations et peuvent être entièrement automatisées, ce qui réduit le temps d'analyse.
 - ❖ TMA en temps réel : contrairement à la PCR qui utilise plusieurs températures et une ADN polymérase thermostable, la TMA en temps réel est isothermique et utilise deux enzymes, une transcriptase inverse et une T7 ARN polymérase. Son principe est de quantifier le génome viral présent initialement dans l'échantillon grâce à une sonde fluorescente.

La détection et la quantification de l'ARN du VHC sont indispensables en pratique clinique afin de poser le diagnostic d'hépatite C, d'identifier les patients qui ont une indication de traitement, d'évaluer la réponse aux traitements antiviraux et de détecter l'émergence de variants viraux résistants au cours des traitements sans IFN (EASL, 2011 ; Ghany et al., 2011).

12- Histoire naturelle de l'infection par le VHC

L'hépatite C est une maladie progressive qui affecte le foie. L'infection par le VHC est la cause majeure d'hépatite aiguë, elle évolue dans 80% des cas vers la chronicité. La persistance de l'infection virale peut conduire dans 20% des cas au développement d'une cirrhose, voire un carcinome hépatocellulaire (CHC) (**Figure 21**). Plusieurs facteurs comme

l'âge avancé, la consommation d'alcool ou la co-infection par le VHB ou le VIH peuvent accélérer l'évolution vers la cirrhose (Marcellin, 1999). En 2001, la cirrhose décompensée liée à l'hépatite C a été identifiée comme la cause majeure de transplantation hépatique dans les pays occidentaux. L'évolution silencieuse de la maladie et la fréquence élevée de passage à la chronicité pourraient expliquer le grand réservoir de sujets infectés.

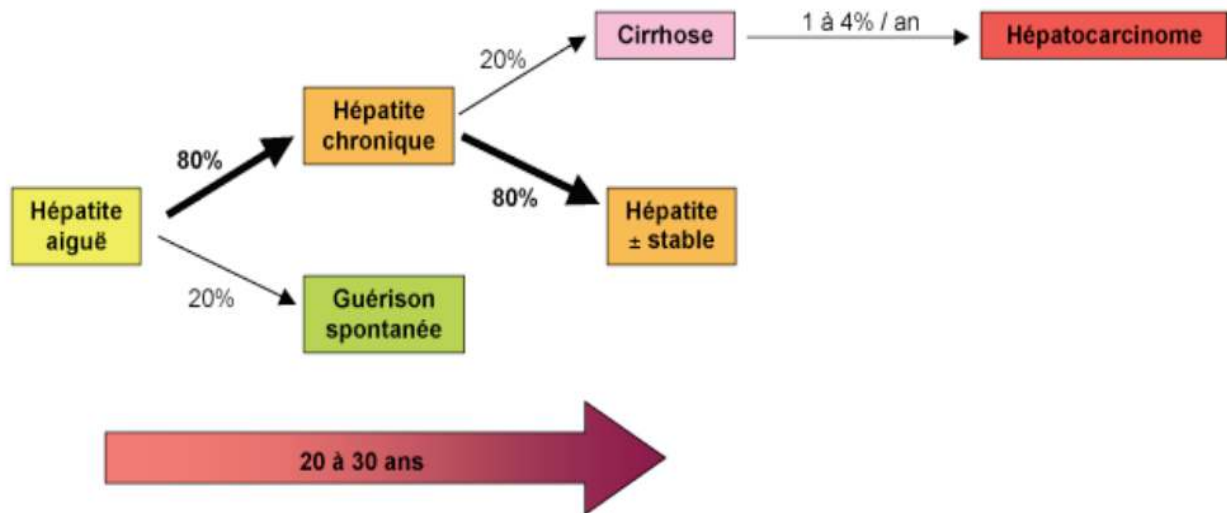


Figure 21 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC (adapté d'après Amarapurkar, 2000)

13- Physiopathologie

13-1- Hépatite C aiguë

Dans la plupart des cas, cette phase est asymptomatique et désigne la période allant du début de l'infection jusqu'aux six premiers mois. Chez une minorité de patients, soit environ 20%, des symptômes caractéristiques d'une hépatite (nausée, ictère, vomissement, anorexie) peuvent être observés. L'infection aiguë est définie par une virémie positive et une sérologie anti-VHC négative. On observe également une élévation des taux des transaminases sériques. Dans 20% des cas, la guérison survient d'une manière spontanée grâce à une réponse immunitaire efficace. Elle est définie par la disparition de l'ARN viral dans le sérum des patients et par la normalisation des tests hépatiques (Grange, 2002).

13-2- Hépatite C chronique

Dans environ 80% des cas, l'infection par le VHC persiste plus de six mois et évolue vers la chronicité. L'hépatite C chronique est définie par une virémie persistante qui se traduit par la présence durable de l'ARN viral dans le sérum et une augmentation des taux de transaminases sériques au-delà de six mois après l'infection (Barrera et al., 1995). Cette

hépatite chronique est asymptomatique dans la majorité des cas, mis à part une importante fatigue. Plusieurs facteurs tels que l'âge, le sexe, la co-infection VIH ou VHB, l'excès de poids peuvent influencer sur l'évolution de l'infection (Paccagnini et al., 1995). La persistance de l'infection peut conduire chez 10 à 20% des patients chroniquement infectés au développement d'une cirrhose du foie (Gale et Foy., 2005).

13-3- Cirrhose du foie

La cirrhose du foie induite par l'hépatite C chronique peut rester silencieuse pendant plusieurs années. En effet, cette cirrhose, habituellement asymptomatique, est le plus souvent découverte lors d'une échographie ou autre explorations radiographiques. Histologiquement, la cirrhose est une fibrose importante diffuse entourant des nodules de régénération. Cette cirrhose est due à la destruction progressive des hépatocytes et aux mécanismes antiviraux de type inflammatoire aboutissant à la perte de l'architecture normale du foie (Pol et Zylbergberg., 2000).

13-4- Carcinome hépatocellulaire

Après 20 ou 30 ans, la cirrhose du foie évolue à son tour en CHC dans 1 à 4% des cas (Pol et Zylbergberg., 2000). Le CHC est la plus fréquente tumeur maligne et primitive du foie. Les protéines virales telles que la protéine C jouent un rôle important dans la dérégulation des réponses de la cellule hôte. Aucune signature spécifique pouvant expliquer l'oncogenèse provoquée par le VHC n'a été mise en évidence. En termes d'incidence, le CHC est le cinquième cancer mondial (Maillard, 2011).

13-5- Les manifestations extra-hépatiques

Certaines manifestations extra-hépatiques, souvent d'origine immunologique, ont été associées à l'infection par le VHC (Marcellin et al., 1995). La maladie la plus courante associée avec l'infection par le VHC est la cryoglobulinémie mixte (Lunel et al., 1994). Cette maladie est définie par la présence dans le sérum d'IgG anormales dont la propriété est de précipiter de manière réversible à une température inférieure à 37°C. La cryoglobulinémie est le résultat d'une atteinte des minuscules vaisseaux de certains organes en particulier des nerfs périphériques des reins et du système nerveux. On note aussi que l'infection par le VHC peut être associée à des troubles dermatologiques et des troubles de la thyroïde (Gallossi et al., 2007).

13-6- Manifestations cognitives et affectives associées à l'hépatite C

Au cours de l'hépatite C, les manifestations psychiatriques et psycho-comportementales peuvent survenir. Elles sont observées dans environ 6% des cas. La manifestation la plus fréquente est la dépression, suivie de l'anxiété et de la psychose. Des troubles cognitifs pourraient être associés avec l'infection par le VHC tels que la perte de la mémoire, de l'attention et de la concentration. Le système nerveux central peut être aussi affecté par l'infection qui peut entraîner des perturbations du métabolisme cérébral.

14- Réponse immunitaire

Généralement, la réponse immunitaire innée est déclenchée en réponse à l'infection par le VHC. Elle active les cellules Natural Killer (NK) conduisant à la production des cytokines antivirales, qui à leur tour activent les cellules présentatrices de l'antigène (CPAg) qui stimulent les réponses immunitaires humorales par différenciation des lymphocytes B conduisant à la sécrétion des AC et les réponses immunitaires cellulaires par activation des lymphocytes T cytotoxiques. De ce fait, la nature de la réponse immunitaire de l'hôte va déterminer la persistance ou la suppression de l'infection par le VHC.

14-1- Réponse immunitaire non spécifique

Au cours du premier stade de l'infection, l'immunité non spécifique est le premier mécanisme de défense mis en œuvre par l'hôte pour détruire l'agent pathogène. Cette immunité non spécifique ou innée active les cellules NK et induit la sécrétion des interférons de type I (IFN- α/β) par les hépatocytes infectés par le VHC (Hiroishi et al., 2008). Grâce à leur activité cytotoxique permettant la production rapide des cytokines, les cellules NK jouent un rôle primordial dans la réponse antivirale. La persistance virale se traduit par l'altération de ces cellules. Ainsi, Nattermann et ses collaborateurs ont montré que la sous-expression des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules NK inhibe l'activité cytotoxique et aboutit à la persistance du VHC (Nattermann et al., 2006).

Le VHC est capable de stimuler les voies de signalisations cellulaires conduisant à la sécrétion de l'IFN de type I par les hépatocytes infectés, stimulant à son tour différents gènes provoquant un état antiviral dans la cellule. La reconnaissance entre des récepteurs spécifiques et des régions d'ARN double brin stimule la sécrétion de l'IFN de type I (IFN- α/β). Ces régions d'ARN viral double brin sont connues comme des pathogen-associated molecular pattern (PAMP). Les récepteurs mis en jeu dans cette reconnaissance sont les toll-like receptors 3 (TLR3) présents à la surface des cellules et les retinoic acid

inducible genes 1 (RIG-1) présents à l'intérieur des cellules. La reconnaissance spécifique entre ces récepteurs et les régions d'ARN viral double brin « PAMP » conduit à l'activation des facteurs de transcription « IRF-3 » pour interferon regulatory factor 3 et « NF-κB » pour nuclear factor κB permettant ainsi la sécrétion des IFN (IFN-α/β). Les IFN sécrétés agissent par voies autocrine ou paracrine en se fixant sur les récepteurs spécifiques des (IFN-α/β). Cette fixation permet l'activation de la voie de signalisation cellulaire « Jak-STAT » (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) qui, à son tour, active la transcription des gènes stimulés par l'IFN appelés « ISG » pour IFN stimulated genes. L'activation de ces gènes dans les cellules non infectées permet de limiter la prolifération du VHC (**Figure 22**) (Gale et Foy., 2005).

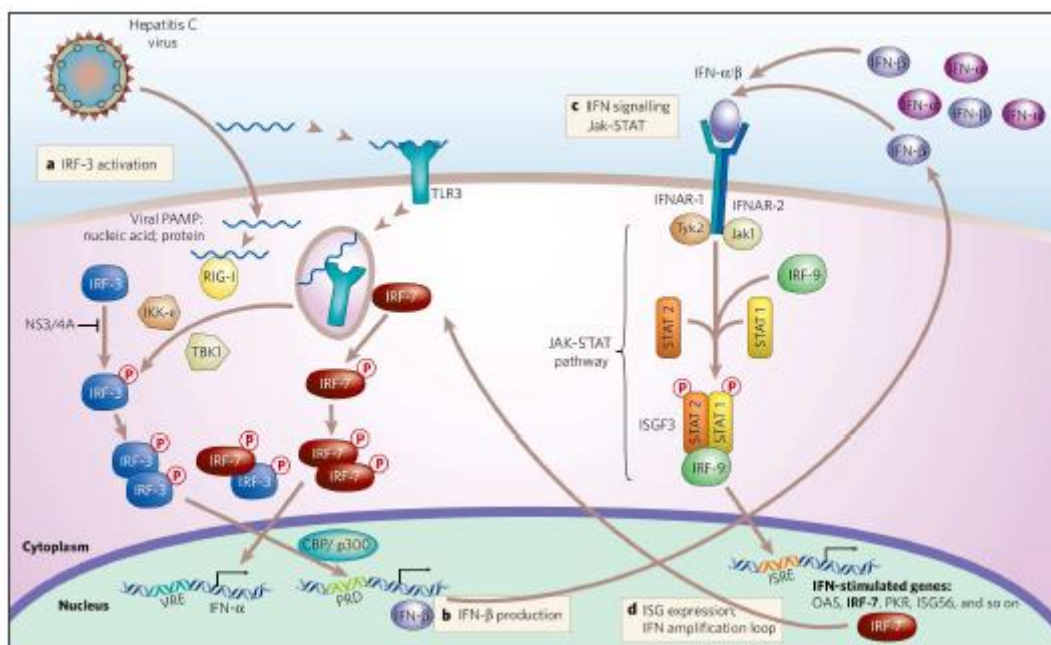


Figure 22: Réponse de l'hôte à l'infection par le VHC (d'après Gale et Foy., 2005)

14-2- Réponse immunitaire spécifique

La réponse immunitaire spécifique ou adaptative comprend deux types de réponses : la réponse immunitaire humorale et la réponse immunitaire cellulaire.

14-2-1- Réponse immunitaire humorale

La production des AC spécifiques neutralisants joue un rôle primordial dans l'élimination virale. Dans le cas de l'infection par le VHC, la protéine NS3 et la protéine de la capsid sont les premières cibles des AC neutralisants détectables dans le sérum. Ensuite,

apparaissent les AC spécifiques dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 localisées à la surface des particules virales infectieuses et contre la protéine NS4A (Netski et al., 2005).

Les AC neutralisants ne sont pas efficaces malgré leur présence à titre élevé. L'infection persiste, ceci pouvant être expliqué par la grande variabilité génétique du VHC.

14-2-2- Réponse immunitaire cellulaire

Les cytokines secrétées par les cellules NK lors de la réponse immunitaire innée stimulent les cellules dendritiques et les CPAg permettant ainsi le déclenchement de la réponse immunitaire spécifique cellulaire faisant intervenir les lymphocytes T cytotoxiques « CD8+ » et les lymphocytes T auxiliaires « CD4+ ».

Les cellules T CD4+ sont détectables dans le sang périphérique 3 à 4 semaines après l'infection par le VHC. Ces cellules jouent un rôle important dans l'activation des cellules B et des cellules T CD8+. Day et al., ont montré qu'une réponse vigoureuse des cellules T CD4+ permet de limiter l'infection au cours de la phase aiguë (Day et al., 2002). Des études plus récentes ont démontré que sans la réponse T CD4+, les cellules T CD8+ et les AC neutralisants ne parviennent pas à contrôler la virémie (Kaplan et al., 2007). D'autres études ont montré que la réponse T CD4+ était dirigée contre les protéines non structurales du VHC (Hoffmann et al., 1995 ; Rosen et al., 2002).

La détection de la réponse T CD8+ suite à une infection par le VHC est variable en termes de temps. Gruner et al., ont montré qu'une réponse lymphocytaire T CD8+ spécifique et vigoureuse permettait d'éliminer le virus chez les patients au cours de la phase aiguë de l'infection (Gruner et al., 2000). Cependant, d'autres études ont montré que pour bien remplir leur rôle, les cellules T CD8+ nécessitaient l'aide des cellules T CD4+ ou « Th » pour T-helper.

L'évolution de l'infection par le VHC est dépendante de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Une participation des deux populations CD4+ et CD8+ semble être essentielle pour contribuer à l'élimination virale.

B- Traitement de l'infection chronique par le VHC

1- Historique du traitement

Depuis la découverte du VHC en 1989, des progrès considérables ont été réalisés afin d'améliorer l'efficacité du traitement de l'hépatite C, qu'elle soit chronique ou aiguë. Au début des années 90, la thérapie des infections par le VHC reposait sur la monothérapie avec

IFN α qui permettait d'obtenir 20% de RVS. En 1998, les travaux de McHutchison et al., et Poynard et al., ont montré que l'utilisation d'une bithérapie associant l'IFN α et la RBV permettait l'augmentation significative du taux de RVS obtenue chez 40% des patients infectés (McHutchison et al., 1998 ; Poynard et al., 1998). En 2001, il a été démontré que l'utilisation de l'IFN α conjugué à du polyéthylène glycol (pegIFN α) était plus efficace que l'IFN α . La bithérapie associant le pegIFN α et la RBV permettait d'avoir une RVS dans 50% des cas (Lindsay et al., 2001 ; Manns et al., 2001 ; Fried et al., 2002). A l'heure actuelle, des nouvelles approches thérapeutiques faisant appel à des AAD ont été développées pour le traitement de l'hépatite C chronique. Ces molécules inhibent certaines des étapes du cycle viral et empêchent la production de particules virales par les hépatocytes infectés.

2- Evaluation pré-thérapeutique

L'évaluation de l'intensité de la réplication sanguine du VHC s'effectue par la détermination de la charge virale par PCR en temps réel ou TMA.

La détermination du génotype est indispensable. Le génotypage du VHC peut être réalisé par différentes techniques. L'amplification et le séquençage de la région NS5B reste la méthode de référence.

L'évaluation de la fibrose hépatique est systématiquement recommandée avant traitement. Elle pourra être réalisée soit par des tests non invasifs (élastométrie et marqueurs biologiques) soit par la ponction-biopsie hépatique (PBH). La PBH permet d'apprécier d'une part la présence et l'étendue de la fibrose, et d'autre part est utile pour la réalisation du diagnostic de lésions hépatocytaires, vasculaires et biliaires. Le score METAVIR quantifie deux paramètres : l'activité de l'hépatite (inflammation et nécrose), représentée par la lettre A et échelonnée de 0 à 3, ainsi que la fibrose représentée par la lettre F et gradée de 0 à 4 (Restellini et Spahr., 2012).

3- Objectifs du traitement et définition de la réponse

Le traitement de l'hépatite C a pour objectif d'éradiquer l'infection virale, de ralentir la fibrose, mais aussi d'empêcher l'installation de la cirrhose et de ses complications comme le CHC. De plus, l'objectif du traitement est d'atteindre la réponse virologique soutenue (RVS) qui est définie par un ARN VHC indétectable 24 semaines après la fin du traitement, dans le cas d'un traitement par pegIFN α -RBV et 12 semaines après la fin du traitement en cas d'utilisation des AAD.

L'évolution de la charge virale pendant et après le traitement définit quatre types de réponse à un traitement anti-VHC par pegIFN α -RBV:

Réponse virologique soutenue (RVS): elle est caractérisée par une charge virale négative 3-6 mois après la fin du traitement.

Rechute : elle est caractérisée par une charge virale indétectable pendant et à l'arrêt du traitement mais l'ARN VHC devient de nouveau détectable dans les 6 mois suivant la fin du traitement.

Non-Réponse : elle est caractérisée par une charge virale quantifiable pendant toute la durée du traitement.

Echappement : il est caractérisé par une charge virale indétectable pendant le traitement et par une réapparition d'un ARN VHC quantifiable en cours de traitement.

4- Indications du traitement

Le traitement est indiqué chez l'adulte ayant une répllication virale confirmée. Les différents génotypes du virus peuvent réagir différemment au traitement. Un dépistage précis est nécessaire avant de commencer celui-ci afin de déterminer les modalités de traitement les plus appropriées. L'indication du traitement antiviral est fondée sur la sévérité de l'hépatite chronique, évaluée notamment par le degré de fibrose, le risque de complications à court et moyen terme, l'existence de manifestations extra-hépatiques, mais aussi la motivation du patient et son adhésion au projet thérapeutique. Pour les scores METAVIR F0 ou F1 avec des transaminases normales, il faut surveiller la progression de la maladie. Un examen clinique et un dosage des transaminases sont pratiqués tous les six mois. Cependant, des transaminases normales ne sont pas synonymes d'absence d'évolution histologique. Les patients atteints d'une hépatite chronique modérée ou sévère avec fibrose METAVIR F2-F3 ainsi que les patients cirrhotiques F4 doivent être traités quel que soit le grade d'activité (Fournier et Willemes., 2012)

5- Traitement par l'interféron pégylé et la ribavirine (traitement de référence en Tunisie à l'heure actuelle)

5-1- Interféron α

Les IFN sont des cytokines endogènes produites par toutes les cellules en réponse à de nombreux stimuli, notamment les infections virales. Ces molécules stimulent un réseau cellulaire qui régule la résistance aux infections virales et active la réponse immunitaire innée ou adaptative (Borden et al., 2007). Chez l'homme, les IFN α sont produits principalement par

les leucocytes (monocytes et macrophages) suite à une infection virale. Il existe plus d'une vingtaine de sous-types d'IFN α pourvus de nombreuses activités biologiques. En thérapie, les deux sous-types α -2a et α -2b sont les plus utilisés.

Les IFN permettent l'inhibition de la réplication virale, de la multiplication cellulaire, l'induction de la mort cellulaire programmée (apoptose) ainsi que la modulation et la différenciation de la réponse immunitaire. Une fois produit, l'IFN stimule une cascade de voies de signalisations aboutissant à l'induction de l'activité de nombreuses protéines comme la protéine kinase dépendante des ARN bicaténaires (PKR) qui inhibe la phosphorylation du facteur eucaryote d'initiation de la traduction eIF2 et bloque ainsi la traduction des ARN viraux. De plus, la PKR participe à l'élimination des virus en stimulant l'apoptose par différents mécanismes (Lee et al., 1997 ; Fujimoto et al., 1998).

Dans le cas de l'hépatite C chronique, il a été montré que les IFN α ont principalement quatre activités (Thomas et al., 1999) :

- La diminution de la réplication virale
- L'induction d'un état antiviral dans les cellules non infectées
- L'augmentation de la lyse cellulaire des cellules infectées
- L'inhibition de la fibrogénèse hépatique

5-2- Interféron pégylé

La pégylation de l'IFN α diminue la clairance rénale aboutissant à une augmentation importante de la demi-vie, permettant ainsi d'obtenir une concentration plasmatique plus stable et plus prolongée de celui-ci. Deux formes de pegIFN α ont été développées. Le pegIFN α -2b résulte de la combinaison de l'IFN α -2b avec une chaîne linéaire de peg de 12 kDa et le pegIFN α -2a résulte de l'association entre l'IFN α et une chaîne ramifiée de peg de 40 kDa (Fried et al., 2002).

5-3- Ribavirine

La ribavirine (RBV) est un analogue nucléosidique de la guanosine qui a été découvert en 1972. Elle a montré son efficacité sur un large spectre de virus (rhinovirus, virus respiratoire syncytial, virus de la rougeole, virus des fièvres hémorragiques...).

La RBV possède plusieurs mécanismes d'action (**Figure 23**):

- Elle agit en inhibant l'activité de coiffage des ARN. En tant qu'analogue nucléosidique, elle a la capacité d'interagir avec les enzymes de coiffage soit en les inhibant directement soit en s'incorporant à la coiffe.
- Elle inhibe l'ARN polymérase virale affectant ainsi la synthèse des protéines virales (Cannon et al., 2009).
- Elle augmente la fréquence des mutations via son incorporation dans les génomes nouvellement synthétisés. Elle induit également un défaut dans l'appariement des bases nucléotidiques. Cette stratégie de mutagenèse létale est responsable de la diminution du pouvoir infectieux du virus (Crotty et al., 2000 ; Graci et Cameron., 2006 ; Brochot et al., 2007).
- Elle induit une réduction du pool intracellulaire de GTP via l'inhibition compétitive de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH). L'IMPDH est responsable de la conversion d'inosine monophosphate en xanthine monophosphate qui sera ensuite aminée en guanosine monophosphate précurseur de la synthèse d'ARN et d'ADN.
- Elle présente un effet immunomodulateur. Elle favorise la réponse immunitaire cellulaire T de type « Th1 » en stimulant la sécrétion de cytokines (IL-12, puis d'IL-2, IFN- γ), aux dépens de la réponse des lymphocytes auxiliaires de type « Th2 » en diminuant la sécrétion de l'IL-4, IL-5 et IL-10 (Tam et al., 2001).

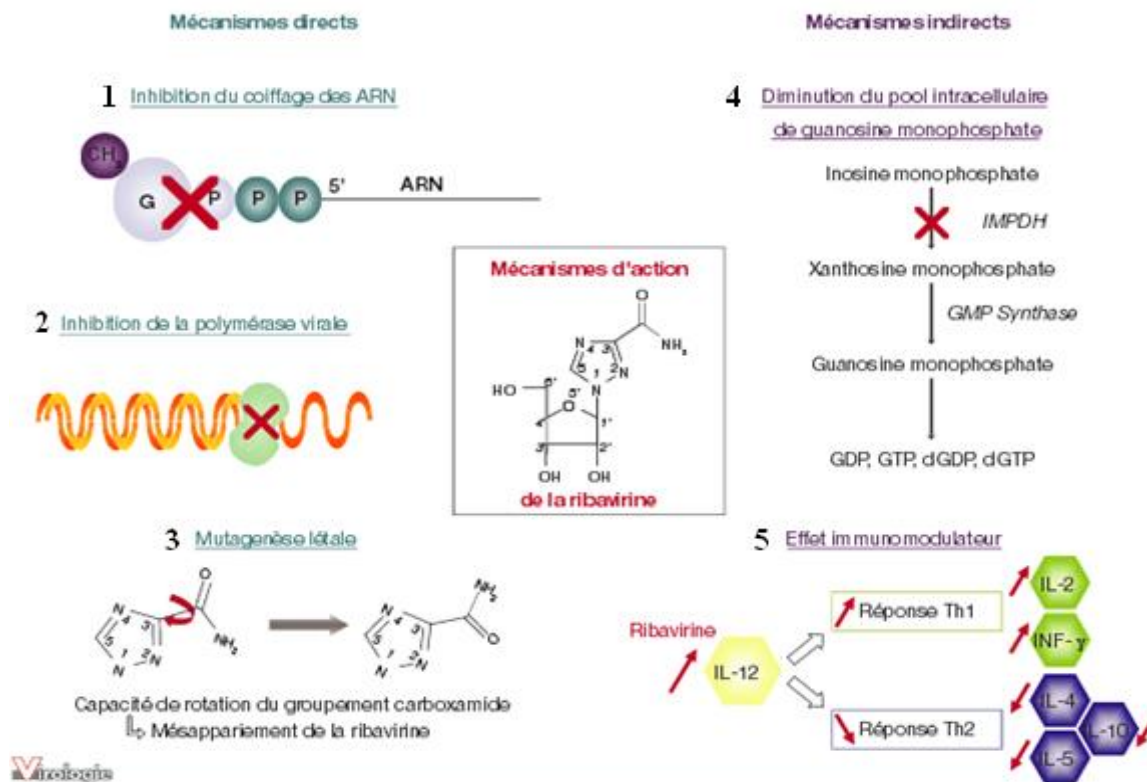


Figure 23 : Mécanismes d'action de la Ribavirine (d'après Jeulin et al., 2009)

5-4- Recommandations en Tunisie

En Tunisie, le traitement de référence actuel de l'hépatite C repose sur la bithérapie associant le pegIFN α à la RBV (**Figure 24**), suivant les recommandations de Zeuzem et al., 2009. La durée du traitement par pegIFN α -RBV est de 48 semaines pour les patients de génotypes 1, 4, 5 et 6 et de 24 semaines pour les patients de génotypes 2 et 3. Les patients infectés par un virus de génotype 2 ou 3 répondent mieux au traitement que les patients infectés par un virus de génotype 1, 4, 5 ou 6 ce qui explique le schéma thérapeutique plus court. Le taux de RVS est compris entre 42 à 46% pour les génotypes 1 et entre 76 à 80% pour les génotypes 2 ou 3 (Poynard et al., 1998).

Génotype 1 (et 4, 5 ou 6)

- Détermination de la charge virale de départ
- Initiation d'un traitement de 48 semaines (S48) par pegIFN α + RBV (adaptée au poids)
- Détermination de la réponse virologique à S12 (RVP)
 - Si la charge virale HCV a diminuée de ≥ 2 log par rapport à celle de départ, continuer le traitement jusqu'à S48, à condition que la charge virale mesurée à S24 soit indétectable
 - Si la charge virale a diminuée de < 2 log, arrêt du traitement

Génotype 2 ou 3

- Initier un traitement de 24 semaines par pegIFN α + RBV (800 mg/jour)
 - Il n'y a pas de recommandations pour mesurer la charge virale à S12, étant donné que le taux de réponse est élevé (80%)
-

Figure 24 : Recommandations pour le traitement de l'hépatite C chronique utilisées à l'heure actuelle en Tunisie (d'après Zeuzem et al., 2009)

5-5- Surveillance

Le traitement par pegIFN α -RBV a un retentissement sur les paramètres biologiques qu'il faut surveiller attentivement. Lorsque ces molécules sont utilisées, l'anémie est fréquente. Elle peut survenir précocement après instauration du traitement. Une numération globulaire doit être réalisée une fois par semaine pendant les quatre premières semaines du traitement, puis au minimum une fois par mois (Sulkowski et al., 2010). L'IFN étant à l'origine du dysfonctionnement fréquent de la thyroïde, la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) doit être dosée au moins tous les 3 mois pendant toute la durée du traitement

et jusqu'à un an après son interruption en raison des cas tardifs de dysthyroïdie (Marcellin et al., 1995). Les transaminases doivent être dosées une fois par mois pendant toute la durée du traitement puis dans les six mois qui suivent l'arrêt. Lorsque la disparition de l'ARN viral n'a pas été obtenue six mois après l'arrêt du traitement, le contrôle des transaminases doit être poursuivi 1 à 2 fois par an. L'étude de la cinétique de la charge virale est essentielle pour suivre le traitement de l'hépatite C et apprécier la réponse.

5-6- Facteurs prédictifs de la réponse

Le taux de réponse à la bithérapie pegIFN α -RBV est très variable d'un patient à l'autre et d'un virus à l'autre. Près de la moitié des patients ne répondent pas ou rechutent. Certains facteurs, virologiques ou de l'hôte, influençant la réponse au traitement ont été identifiés. Parmi ces facteurs on peut citer :

- La charge virale préthérapeutique. Une charge virale < 800 000 UI/ml entraîne une meilleure réponse au traitement (Lee et Ferenci., 2008).
- Le génotype du VHC a été identifié comme un facteur viral prédictif de la réponse au traitement. En effet, les génotypes 2 et 3 répondent mieux au traitement que les génotypes 1 et 4 (Manns et al., 2001 ; Fried et al., 2002).
- Les facteurs liés à l'hôte comme l'âge avancé, le sexe masculin, la présence d'une fibrose ainsi que l'indice de masse corporelle (IMC) élevé sont impliqués dans une moins bonne réponse au traitement (Bressler et al., 2003 ; Chen et Tung., 2009).

5-7- Limites de ces traitements

5-7-1-Effets secondaires

Le traitement peut être physiquement éprouvant, en particulier pour les patients qui ont des antécédents de toxicomanie. Les effets secondaires sont nombreux et varient suivant les personnes mais disparaissent à la fin du traitement. Dans la plupart des cas, les patients doivent cesser toute activité à cause de ces effets.

L'injection d'IFN provoque un syndrome pseudo-grippal caractérisé par une forte fièvre, des courbatures et un mal de tête. Les autres symptômes sont la fatigue, les insomnies, la perte des cheveux et la sécheresse de la peau. Un trouble du caractère et un dérèglement de la glande thyroïde peuvent également survenir.

L'effet secondaire principal de la RBV est l'anémie: essoufflement, tachycardie et fatigue.

L'association de ces deux médicaments provoque les effets secondaires mentionnés, mais ils apportent d'autres complications telles que déshydratation et soif continuelle, éruptions cutanées, conjonctivite et dépression avec envie de suicide. Les insomnies, ajoutées à la fatigue, peuvent amener à un état d'épuisement (Zeuzem et al., 2000 ; Lindsay et al., 2001).

5-7-2- Echec des traitements

Malgré l'amélioration relativement rapide de l'efficacité du traitement au cours des dernières années, près de la moitié des patients ne répondent pas ou rechutent. L'échec thérapeutique représente environ 50% des traitements pour les génotype 1 et 4 et 20% pour les génotypes 2 et 3. La forte réplication virale du VHC est certainement une des premières causes d'échec du traitement (Neumann et al., 1998).

6- Nouvelles molécules anti-VHC

Bien que la bithérapie par pegIFN α -RBV soit sans aucun doute un progrès important dans le traitement du VHC, les résultats demeurent insatisfaisants, notamment pour les patients infectés par le VHC de génotype 1 peu sensible au traitement. C'est pourquoi la mise à disposition des nouvelles molécules thérapeutiques représente une avancée considérable. Après presque 25 ans d'améliorations progressives des thérapies à base d'IFN α , d'énormes efforts de recherche et de développement ont produit un grand nombre de nouveaux traitements pour la prise en charge de l'hépatite C, en particulier les traitements à base d'antiviraux à action directe (AAD) qui sont des inhibiteurs spécifiques d'étapes du cycle viral (Troke et al., 2012).

6-1- Antiviraux à action directe : état des lieux

Les AAD déjà sur le marché ou en développement clinique comprennent les inhibiteurs de la maturation de la polyprotéine du VHC (les IP NS3/4A) et les inhibiteurs de la synthèse et de la réplication de l'ARN du VHC (les IN et les INN de la polymérase NS5B et les inhibiteurs de la protéine NS5A) (**Tableau 1**). Les deux approches antivirales sont efficacement utilisées pour l'arrêt de la production de virus dans les cellules infectées. L'inhibition de la maturation de la protéine virale inhibe également la réplication car les protéines virales non structurales fonctionnelles ne sont plus produites et ne peuvent donc pas être utilisées pour la formation de complexes de réplication. De même, l'inhibition de la réplication du VHC bloque également la synthèse des protéines virales car la quantité de

génomés VHC qui peut être utilisée comme ARN messenger diminue de façon spectaculaire dans les cellules (Pawlotsky, 2014).

Classes	Génération	Agent	Compagnie pharmaceutique	Phase de développement
Inhibiteurs de la protéase NS3-4A	Première-génération, première vague	Telaprevir	Vertex, Janssen, Mitsubichi	AMM européenne
		Boceprevir	Merck	AMM européenne
	Première génération, deuxième vague	Simeprevir	Janssen	AMM européenne
		Faldaprevir	Boehringer-Ingelhein	III
		Asunaprevir	Bristol-Myers Squibb	III
		ABT-450/r Paritaprevir/r	Abbvie	AMM européenne
		Danoprevir	Roche	II
		Sovaprevir	Achillion	II ¹
		Vedoprevir	Gilead	II
		IDX320	Idenix	II
		Vaniprevir	Merck	III (Japon)
	Deuxième génération	MK-5172	Merck	III
		ACH-2684	Achillion	II
	Inhibiteurs nucléosidiques ou nucléotidiques de la polymérase NS5B	Analogues nucléotidiques	Sofosbuvir	Gilead
VX-135			Vertex	II ²
Analogue nucléosidique		Méricitabine	Roche	II
Inhibiteurs non nucléosidiques de la polymérase NS5B	Inhibiteurs du domaine du pouce I	BMS-791325	Bristol-Myers Squibb	III
		TMC647055	Janssen	II
	Inhibiteurs du domaine du pouce II	Lomibuvir	Vertex	II
		GS-9669	Gilead	II
	Inhibiteurs du domaine de la paume I	Dasabuvir	Abbvie	AMM européenne
		ABT-072	Abbvie	II

		Setrobuvir	Roche	II
Inhibiteurs NS5A	Première génération	Daclatasvir	Bristol-Myers Squibb	AMM européenne
		Ledipasvir	Gilead	AMM européenne
		Ombitasvir	Abbvie	AMM européenne
		PPI-668	Presidio	II
		PPI-461	Presidio	II
		ACH-2928	Achillion	II
		GSK2336805	GlaxoSmithKline	II
		BMS824393	Bristol-Myers Squibb	II
		Samatasvir	Idenix	II
	Deuxième génération	MK-8742	Merck	II
		ACH-3102	Achillion	II
		GS-5816	Gilead	II

Tableau 1 : Agents antiviraux disponibles ou en cours de développement dans le traitement de l'hépatite C dont les résultats ont été publiés ou présentés dans des congrès scientifiques. Adapté de Pawlotsky, 2014 et de L'Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) l'Avis d'expert n° 6 Juin 2015

¹ Arrêt du développement en raison d'une augmentation des transaminases et de concentrations élevées de l'atazanavir chez les patients ayant une co-infection VIH-VHC.

² Arrêt partiel du développement en raison d'une augmentation des transaminases observée avec des doses élevées.

6-2- Anti-protéases

Les IP NS3/4A sont des composés peptidomimétiques. Ils se lient au site catalytique de l'enzyme et bloquent la transformation post-traductionnelle de la polyprotéine virale aux sites de clivage NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B, empêchant la libération des protéines non structurales fonctionnelles (Pawlotsky, 2014).

6-2-1- Boceprevir

Le boceprevir (BOC) a obtenu son AMM européenne en Juillet 2011. C'est un inhibiteur spécifique de la protéase NS3/4A (**Figure 25**). Il se lie de façon covalente et réversible au site actif de la protéase grâce à son groupe fonctionnel α -kétoamide. L'inhibition de cette protéase empêche la réplication et la production des particules virales. Le BOC est

approuvé pour le traitement de l'infection par le VHC de génotype 1, à une dose de 800 mg 3 fois par jour en combinaison avec pegIFN α -RBV (Chang et al., 2012). Des études *in vitro* ont confirmé l'efficacité du BOC avec une réduction de l'ARN VHC de plus de 4 log après 15 jours d'exposition à des fortes doses. La combinaison de cette molécule avec l'IFN a également montré une plus grande efficacité sur la suppression de la synthèse des réplicons (Malcolm et al., 2006)

Dans les essais cliniques SPRINT2 chez des patients naïfs de traitement et RESPOND2 chez des sujets rechuteurs ou répondeurs partiels, les taux de RVS étaient de 66 et 75%, respectivement pour un traitement associant le BOC avec le pegIFN α -RBV. L'effet indésirable le plus fréquent du BOC est l'anémie qui semble contribuer à un taux élevé d'arrêt de traitement (9 à 19%) par rapport au groupe contrôle (8%). D'autres effets ont été également observés comme les troubles digestifs, les maux de tête, la fatigue et une faiblesse musculaire (Bacon et al., 2011 ; Poordad et al., 2011).

Les recommandations pour la prise en charge de l'hépatite C ont subi des changements majeurs en 2014 du fait de l'arrivée d'une nouvelle génération d'AAD ; c'est dans ce contexte que le BOC a été retiré du marché français.

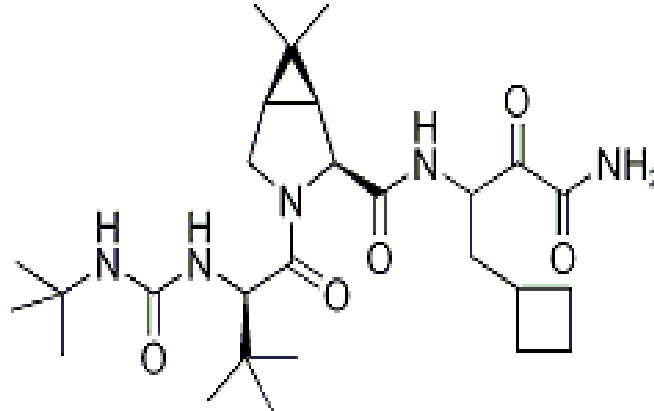


Figure 25: Structure biochimique du boceprevir
(d'après Chemical Book : <http://www.chemicalbook.com>)

6-2-2- Telaprevir

Le telaprevir (TVR) a obtenu son AMM européenne en Septembre 2011. C'est un inhibiteur réversible, sélectif et spécifique de la protéase NS3 (**Figure 26**). Cette molécule vise la région C-terminale de NS3 et bloque son activité protéasique en se fixant au niveau du site actif, empêchant ainsi la formation des protéines nécessaires à la réplication virale. Le TVR est indiqué dans le traitement des patients infectés par le génotype 1 du VHC, à une dose de 750

mg par voie orale toutes les 8 heures, administrée avec de la nourriture. Il a montré des taux de RVS plus élevés lorsqu'il est utilisé en combinaison avec pegIFN α -RBV par rapport au traitement standard à base de bithérapie pegIFN α -RBV (Forestier et al., 2007 ; Lawitz et al., 2008).

Dans les essais cliniques ADVANCE chez des patients naïfs de traitement et REALIZE chez des sujets rechuteurs ou répondeurs partiels ou nuls, les taux de RVS étaient de 79% pour les patients naïfs de traitement, 88% pour les rechuteurs, 56% pour les répondeurs partiels et 33% pour les répondeurs nuls pour un schéma thérapeutique associant le TVR au pegIFN α -RBV. Les effets indésirables du TVR comportent les rashes cutanés dans 40 à 60% des cas, sévères dans moins de 10% des cas, prurit, anémie et troubles gastro-intestinaux (Jacobson et al., 2011 ; Zeuzem et al., 2011).

Compte tenu des nouveaux traitements apparus tout récemment pour la prise en charge de l'hépatite C, le TVR a été retiré du marché français.

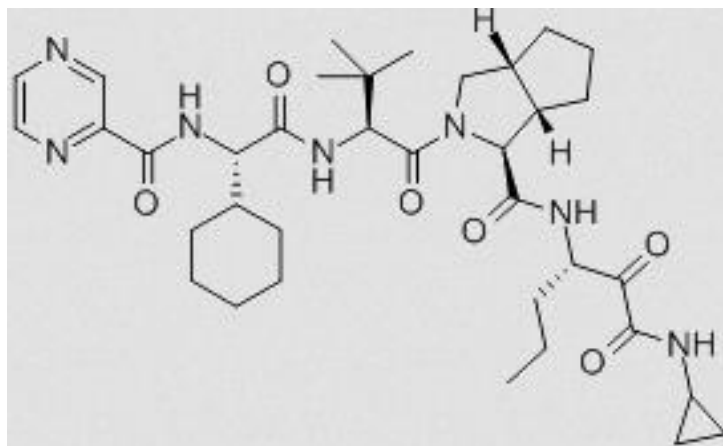


Figure 26 : Structure biochimique du telaprevir
(d'après Chemical Book : <http://www.chemicalbook.com>)

6-2-3- Simeprevir :

Le simeprevir (SMV) a obtenu une AMM européenne en Mai 2014. C'est un inhibiteur de la protéase NS3 du VHC de première génération deuxième vague (**Figure 27**). Il est indiqué en association avec d'autres médicaments pour le traitement de l'hépatite C chronique chez les patients infectés par les génotypes 1 et 4. La dose recommandée de SMV est de 150 mg par jour à prendre avec la nourriture. Cette molécule a des caractéristiques très différentes de celles des IP de première vague, TVR et BOC. Elle présente une structure macrocyclique montrant un avantage en termes d'affinité et de spécificité de liaison avec la

protéase par rapport aux premiers inhibiteurs qui présentait une structure linéaire. Les résultats des essais cliniques ont montré que le SMV est très efficace avec peu d'effets indésirables. Le prurit et les éruptions cutanées sont légèrement plus fréquents chez les groupes ayant reçu le SMV que chez les groupes contrôles (Jacobson et al., 2013 (a) ; Manns et al., 2014).

Dans les études QUEST-1 et QUEST-2 réalisées chez des patients naïfs de traitement et infectés par le VHC de génotype 1, le taux de RVS est de l'ordre de 80% pour un traitement associant le SMV au pegIFN α -RBV pendant 12 semaines. Les taux sont de 75% et 85% chez les patients infectés par le VHC de sous-types 1a et 1b, respectivement (Jacobson et al., 2013 (a) ; Manns et al., 2014). De plus, dans l'essai PROMISE effectué chez des patients rechuteurs infectés par le génotype 1 du VHC et traités par SMV et pegIFN α -RBV, le taux de RVS est de 80% (Lawitz et al., 2013).

L'étude clinique COSMOS a évalué l'efficacité de l'association sofosbuvir (SOF) SMV +/- RBV chez des patients naïfs de traitement ou non-répondeurs au pegIFN α -RBV et infectés par le VHC de génotype 1. Le taux de RVS est supérieur à 90% (Jacobson et al., 2013 (b)).

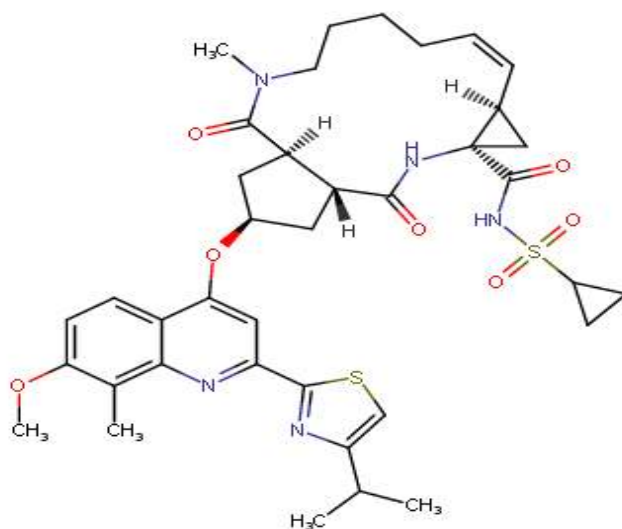


Figure 27 : Structure biochimique du simeprevir
(d'après ChemIDplus : <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>)

6-2-4- Paritaprevir

Le paritaprevir (PTV) est un inhibiteur de la protéase NS3/4A du VHC qui a obtenu son AMM européenne en Janvier 2015. (**Figure 28**). Il est indiqué dans le traitement des patients infectés par une hépatite C chronique de génotypes 1 et 4. Ce médicament est présenté sous forme d'un comprimé pelliculé contenant 12,5 mg d'ombitasvir (OBV ;

inhibiteur de la protéine NS5A), 75 mg de PTV et 50 mg de ritonavir (r), qui est un inhibiteur de la CYP3A4, qui n'est pas actif contre le VHC, mais augmente l'exposition systématique au PTV. La dose recommandée est de deux comprimés pelliculés une fois par jour administrés avec de la nourriture. Ce médicament contenant l'OBV/PVT/r peut être co-administré avec la RBV et le dasabuvir (DSV ; INN de la polymérase NS5B), associant ainsi trois agents antiviraux à action directe aux mécanismes d'action distincts, et dont les profils de résistance ne se regroupent pas, pour cibler le VHC à des multiples étapes du cycle viral (ANSM-AbbVie ; RCP Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir, Décembre 2014).

L'efficacité d'OBV/PTV/r associés au DSV et à la RBV chez des patients de génotype 1 a été évaluée lors des études cliniques de phase 3. Les études SAPPHIRE-I conduite chez des patients naïfs de traitement et SAPPHIRE-II chez des patients non répondeurs à un précédent traitement par pegINF α -RBV ont montré un taux élevé de RVS estimé à 96% (Feld et al., 2014 ; Zeuzem et al., 2014).

PEARL-I est une étude randomisée, multicentrique, internationale, menée chez des patients de génotype 4 sans cirrhose et naïfs de traitement ou non répondeurs à un précédent traitement par pegINF α -RBV. Le traitement par OBV/PTV/r/DSV avec ou sans RBV pendant 12 semaines a montré des taux très élevés de RVS de 100% et de 90,9% dans les traitements avec et sans RBV, respectivement. De plus, l'efficacité de l'association OBV/PTV/r +/- RBV a été évaluée chez des patients infectés par le génotype 4. Cette association durant 12 semaines de traitement a permis d'obtenir une RVS de 91% chez les malades naïfs traités sans RBV et de 100% dans les traitements avec RBV (Hezode et al., 2015).

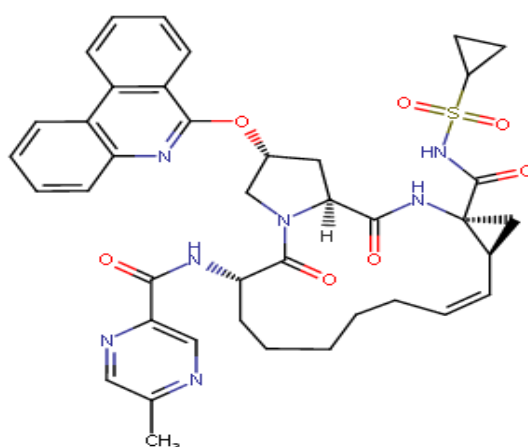


Figure 28 : Structure biochimique du paritaprevir
(d'après ChemIDplus : <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>)

6-3- Anti-polymérase

Concernant la polymérase NS5B, deux types d'inhibiteurs ont été développés présentant différents modes d'action :

➤ Les IN entrent en compétition avec le substrat naturel pour se lier au site actif de l'ARN polymérase ARN dépendante et ont un effet terminateur de chaîne après incorporation dans l'ARN nouvellement synthétisé.

➤ Les INN inhibent l'activité enzymatique par fixation à l'un des quatre sites allostériques à la surface de l'enzyme entraînant une altération de la conformation de la polymérase, bloquant sa fonction catalytique et donc la réplication (Bartenschlager et al., 2013). Les sites de fixation sont situés soit au niveau du « pouce » soit au niveau de la « paume » de la polymérase.

6-3-1- Sofosbuvir

Le sofosbuvir (SOF) a obtenu son AMM européenne en Janvier 2014 (**Figure 29**). C'est un analogue nucléotidique qui agit en tant que faux substrat de l'RdRp. Le SOF provoque l'arrêt de la synthèse de l'ARN viral après son incorporation dans la chaîne naissante d'ARN. Son activité antivirale est pangénotypique et très puissante (Sofia et al., 2010). La dose du SOF utilisée lors du traitement est de 400 mg une fois par jour, prise avec ou en dehors des repas. L'efficacité du SOF a été évaluée lors des études cliniques de phase 3. L'essai NEUTRINO, effectué chez des patients infectés par le VHC de génotypes 1, 4, 5 et 6 naïfs de traitement, a montré des taux de RVS de 91% pour un traitement de 12 semaines associant le SOF avec pegIFN α -RBV (Lawitz et al., 2013 (a)). Les résultats des études associant le SOF avec d'autres agents antiviraux sont détaillés dans les paragraphes correspondants. Le SOF est la première molécule qui ait été utilisée pour des régimes de traitement sans IFN.

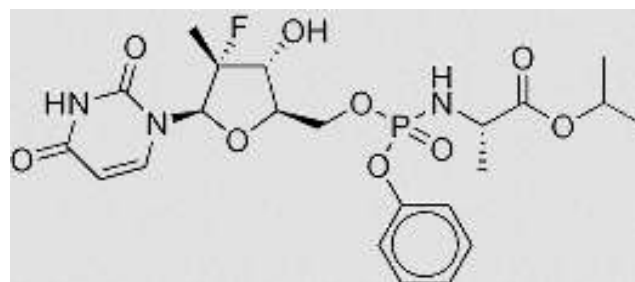


Figure 29: Structure biochimique du sofosbuvir
(d'après Chemical Book : <http://www.chemicalbook.com>)

6-3-2- Dasabuvir

Le dasabuvir (DSV) a obtenu son AMM européenne en Janvier 2015. C'est un INN de l'RdRp du VHC (**Figure 30**). Il inhibe l'activité catalytique de la polymérase nécessaire à la réplication virale par fixation sur l'un des quatre sites allostériques induisant ainsi une altération conformationnelle de l'enzyme (Chtioui et al., 2014). L'efficacité du DSV n'a pas été établie chez les patients infectés par le VHC de génotypes autres que le génotype 1. La dose recommandée de DSV est de 250 mg 2 fois par jour administrée avec la nourriture. Le DSV ne doit pas être administré en monothérapie et doit être utilisé en association avec d'autres médicaments pour le traitement de l'infection par le VHC. L'efficacité de DSV associé à l'OBV/PTV/r +/- RBV a été évaluée lors d'essais cliniques de phase 3. L'étude PEARL-IV, effectuée chez des patients naïfs de traitement et infectés par le génotype 1a du VHC, a montré des taux de RVS de 97 et 90,2% pour un traitement de 12 semaines associant DSV/OBV/PTV/r et en fonction de la présence ou non de RBV. L'essai PEARL-III conduit sur le même principe que l'étude précédente mais chez des patients infectés par le génotype 1b, a montré des taux de RVS de 99,5 et 99% lors de traitements avec ou sans RBV. Les effets indésirables les plus souvent rapportés (chez plus de 20% des patients) étaient de la fatigue et des nausées (Ferenci et al., 2014).

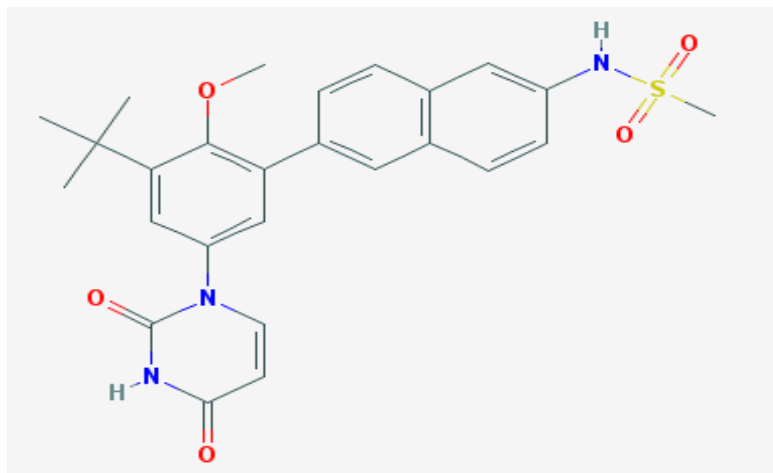


Figure 30 : Structure biochimique du dasabuvir (d'après Kati et al., 2015)

6-4-Anti-NS5A

En raison de son implication dans la réplication, la protéine NS5A a été identifiée comme une cible pour l'inhibition de la réplication virale conduisant ainsi au développement des agents thérapeutiques. *In vitro*, l'inhibition de la NS5A a été associée à une réduction

significative des niveaux de réplication de l'ARN du VHC. Les inhibiteurs de cette protéine jouent ainsi un rôle important dans l'amélioration de la réponse au traitement anti-VHC (Pawlotsky, 2013).

6-4-1- Daclatasvir

Le daclatasvir (DCV) a obtenu son AMM européenne en Janvier 2014. C'est un inhibiteur oral très sélectif de la protéine NS5A présentant une activité pangénotypique (**Figure 31**). Le DCV inhibe à la fois la réplication de l'ARN viral et l'assemblage des virions. Il interagit avec la région N-terminale du domaine 1 de la protéine NS5A induisant des distorsions structurelles qui perturbent les fonctions de cette protéine, composante essentielle du complexe de réplication. De plus, le DCV bloque l'hyperphosphorylation nécessaire au fonctionnement de la protéine NS5A ainsi que le changement de sa localisation subcellulaire (Pawlotsky, 2014). La dose recommandée de DCV est de 60 mg une fois par jour avec ou sans nourriture. Le DCV doit être utilisé en association avec d'autres agents antiviraux pour la prise en charge des patients infectés par le VHC. L'efficacité a été évaluée en association avec le SOF +/- RBV. Dans une étude menée chez des patients de génotype 1 en échec à un traitement incluant des IP (BOC ou TVR) et traités par DCV/SOF avec ou sans RBV, la RVS était de 98% (Sulkowski et al., 2014). Dans un autre essai clinique conduit chez des patients de génotype 1 non-répondeurs au traitement pegIFN α -RBV, le taux de RVS était compris entre 82 et 100% pour un traitement basé sur la combinaison DCV/SOF +/- RBV pendant 12 ou 24 semaines (Pol et al., 2015).

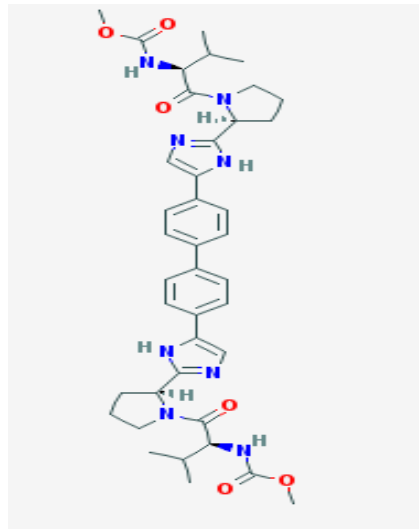


Figure 31 : Structure biochimique du daclatasvir
(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

6-4-2- Ledipasvir

Le ledipasvir (LDV) est un inhibiteur de la protéine NS5A efficace contre les génotypes 1, 4, 5 et 6 (**Figure 32**). Il a obtenu l'AMM européenne en Novembre 2014. Il inhibe la réplication virale ainsi que l'assemblage des virions. Ce médicament est présenté sous forme d'un comprimé pelliculé contenant 90 mg de LDV et 400 mg de SOF administré une fois par jour, par voie orale, avec ou sans nourriture. L'efficacité du LDV/SOF +/- RBV a été évaluée lors des études cliniques de phase 3. Dans l'essai ION-1, conduit chez des patients naïfs de traitement infectés par le génotype 1 du VHC, le taux de RVS est de 97 à 98% pour un traitement de 12 ou 24 semaines (Younossi et al., 2015) . L'étude ION-2, menée chez des patients infectés par le VHC de génotype 1 non-répondeurs à un traitement pegIFN α -RBV +/- IP de 1^{ère} génération, a montré des taux de RVS compris entre 94 et 99% pour un schéma thérapeutique identique à celui du l'essai ION-1 (Afdhal et al., 2014).

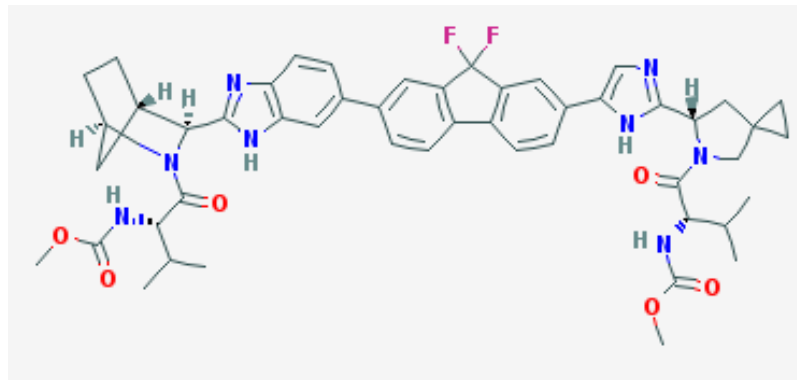


Figure 32: Structure biochimique du ledipasvir
(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

6-4-3- Ombitasvir

L'ombitasvir (OBV) a obtenu son AMM européenne en Janvier 2015. C'est un inhibiteur de la protéine NS5A (**Figure 33**). Il est indiqué dans le traitement des patients porteurs d'une hépatite C chronique de génotypes 1 et 4. Ce médicament est présenté sous forme d'un comprimé pelliculé contenant 12,5 mg d'OBV, 75 mg/50 mg de PTV/r, respectivement. La dose orale recommandée d'OBV/PTV/r est de deux comprimés une fois par jour administrée avec la nourriture. OBV/PVT/r peut être co-administré en association avec DSV +/- RBV. L'efficacité de ce traitement a été évaluée lors d'études cliniques de phase 3. Les résultats des études cliniques sont abordés dans les paragraphes traitant le PTV (rubrique 6-2-4) et le DSV (rubrique 6-3-2). Chez les patients traités par OBV/PTV/r et DSV avec RBV, les effets indésirables les plus fréquemment rapportés étaient de la fatigue et des

nausées. La proportion de patients ayant définitivement arrêté le traitement pour cause d'effets indésirables était de 0,2% (ANSM-AbbVie ; RCP Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir, décembre 2014).

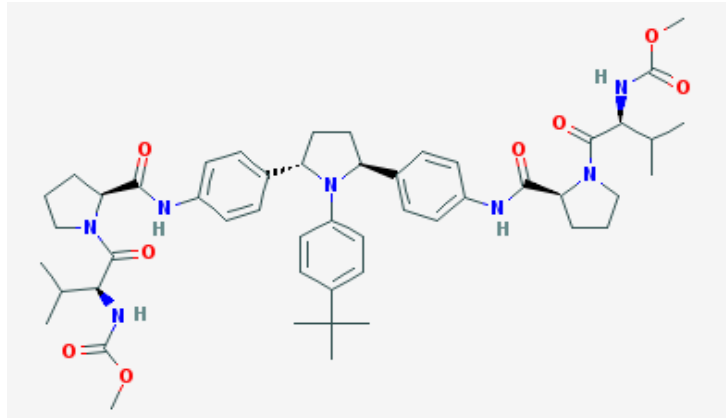


Figure 33 : Structure biochimique de l'ombitasvir (d'après Krishnan et al., 2015)

6-5- Recommandations d'utilisation en France : AFEF Avis d'experts n° 6 (Juin 2015)

Le traitement des hépatites chroniques virales C évolue chaque jour. L'AFEF (www.afef.asso.fr) propose des recommandations sur la prise en charge des hépatites chroniques virales C dans le but d'aider les soignants et l'ensemble des acteurs impliqués dans la prise en charge des patients.

Les médicaments actuellement disponibles sont :

- Inhibiteurs de protéase : Simeprevir (OLYSIO®), Paritaprevir/r
- Inhibiteurs NS5A : Daclatasvir (DAKLINZA®), Ledipasvir, Ombitasvir
- Inhibiteurs NS5B : Sofosbuvir (SOVALDI®), Dasabuvir (EXVIERA®)
- Combinaison de Sofosbuvir et de Ledipasvir (HARVONI®)
- Combinaison d'Ombitasvir + Paritaprevir/Ritonavir (VIEKIRAX®)

Ces recommandations de l'AFEF sont basées sur les publications écrites dans des revues à comité de lecture et sur les publications orales ou affichées des congrès internationaux. Le niveau d'évidence des recommandations est indiqué selon les grades de la Haute Autorité de Santé adaptés à la particularité du développement des nouveaux médicaments de l'hépatite C. Le niveau de preuve de chaque proposition thérapeutique a été défini comme suit :

- **A : Preuve scientifique établie** : fondée sur des études de fort niveau de preuve (niveau de preuve 1) : essais comparatifs randomisés de forte puissance et sans biais majeur ou méta-analyse d'essais comparatifs randomisés, analyse de décision basée sur des études bien menées, études de phase 3, études de cohorte multicentriques.
- **B : Présomption scientifique** : fondée sur une présomption scientifique fournie par des études de niveau intermédiaire de preuve (niveau de preuve 2), comme des essais comparatifs randomisés de faible puissance, des études comparatives non randomisées bien menées, des études de phase 2, des études de cohorte monocentriques.
- **C : Faible niveau de preuve** : fondée sur des études de moindre niveau de preuve, comme des études cas-témoins (niveau de preuve 3), des études rétrospectives, des séries de cas, des études comparatives comportant des biais importants (niveau de preuve 4).
- **AE : Accord d'experts** : en l'absence d'études, les recommandations sont fondées sur un accord entre experts du groupe de travail, après consultation du groupe de lecture. L'absence de gradation ne signifie pas que les recommandations ne sont pas pertinentes et utiles. Elle doit, en revanche, inciter à engager des études complémentaires.

Selon l'AFEF, les tableaux ci-dessous résument les schémas thérapeutiques recommandés en Juin 2015 pour le traitement des hépatites virales C en fonction des différents génotypes et tenant compte des antiviraux actuellement disponibles en France chez les patients ayant une fibrose sévère ou une cirrhose.

**Recommandations de traitement des patients selon leur génotype
(Avis d'expert N°6 Juin 2015)**

Génotype1	Traitement	Durée (Semaines)	Preuve
Génotype 1 non cirrhotique			
Naïfs	Sofosbuvir + Simeprevir (G1b)	12	A
	Sofosbuvir + Daclatasvir	12	A
	Sofosbuvir + Ledipasvir	12	A
	Paritaprevir/r + Ombitasvir + Dasabuvir + ribavirine (G1a)	12	A
	Paritaprevir/r + Ombitasvir + Dasabuvir (G1b)	12	A
	Grazoprevir + Elbasvir	12	A
	Daclatasvir + Asunaprevir + Beclabuvir + ribavirine (G1a)	12	A
	Daclatasvir + Asunaprevir + Beclabuvir (G1b)	12	A
	Sofosbuvir + GS-5816	12	A
Pré-traités PEG ribavirine +/- Telaprevir ou Boceprevir	Sofosbuvir + Simeprevir (G1b, échec PEG ribavirine)	12	A
	Sofosbuvir + Dasabuvir	24	A
	Sofosbuvir + Ledipasvir	12	A
	Paritaprevir/r + Ombitasvir + Dasabuvir + ribavirine (G1a, échec PEG ribavirine)	12	A
	Paritaprevir/r + Ombitasvir + Dasabuvir (G1b, échec PEG ribavirine)	12	A
	Grazoprevir + Elbasvir + ribavirine	12	A
	Daclatasvir + Asunaprevir + Beclabuvir (G1b, échec PEG ribavirine)	12	A
Génotype 1 avec cirrhose compensée			
Naïfs	Sofosbuvir + Daclatasvir + ribavirine	12	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir	24	
	Sofosbuvir + Daclatasvir + ribavirine	12	A
	Sofosbuvir + Ledipasvir	24	A
	Paritaprevir/r + Ombitasvir + Dasabuvir + ribavirine	12	A
	Grazoprevir + Elbasvir + ribavirine	12	A
	Daclatasvir + Asunaprevir + Beclabuvir + ribavirine (G1a)	12	A
	Daclatasvir + Asunaprevir + Beclabuvir (G1b)	12	A
	Sofosbuvir + GS-5816	12	B

Pré-traités PEG ribavirine +/- Telaprevir ou Boceprevir	Sofosbuvir + Daclatasvir+ ribavirine	12	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir	24	A
	Sofosbuvir + Ledipasvir + ribavirine	12	A
	Sofosbuvir + Ledipasvir	24	A
	Paritaprevir/r + Ombitasvir + Dasabuvir + ribavirine (G1a, échec PEG ribavirine)	24	A
	Paritaprevir/r + Ombitasvir + Dasabuvir + ribavirine (G1b, échec PEG ribavirine)	12	A
	Grazoprevir + Elbasvir + ribavirine	16	C
Génotypes 1 avec cirrhose décompensée Child B			
Naïfs et pré-traités	Sofosbuvir + Daclatasvir+ ribavirine	12	B
	Sofosbuvir + Daclatasvir	24	AE
	Sofosbuvir + Ledipasvir + ribavirine	12	B
	Sofosbuvir + Ledipasvir	24	AE

Génotype 2	Traitement	Durée (semaines)	Preuve
Pas de cirrhose			
Naïfs	Sofosbuvir + ribavirine	12	A
Pré-traités	Sofosbuvir + ribavirine	16	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir	12	AE
Cirrhose compensée			
Naïfs	Sofosbuvir + ribavirine	12	A
Pré-traités	Sofosbuvir + ribavirine	24	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir	12	AE
Cirrhose décompensée			
Naïfs et Pré- traités	Sofosbuvir + Daclatasvir	24	AE

Génotype 3	Traitement	Durée (semaines)	Preuve
Pas de cirrhose			
Naïfs	Sofosbuvir + ribavirine	12	A
Pré-traités	Sofosbuvir + ribavirine	12	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir	12	AE
Cirrhose compensée			
Naïfs	Sofosbuvir + ribavirine	12	A
Pré-traités	Sofosbuvir + ribavirine	24	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir	12	AE
Cirrhose décompensée			
Naïfs et Pré-traités	Sofosbuvir + Daclatasvir	24	AE

Génotype 4	Traitement	Durée (semaines)	Preuve
Pas de cirrhose			
Naïfs et pré-traités	Sofosbuvir + Simeprevir	12	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir	12	C
	Sofosbuvir + Ledipasvir	12	B
	Paritaprevir/r + Ombitasvir + + ribavirine	12	A
Naïfs	Grazoprevir + Elbasvir	12	C
	Sofosbuvir + GS-5816	12	C
Cirrhose compensée			
Naïfs et pré-traités	Sofosbuvir + Simeprevir + ribavirine	12	C
	Sofosbuvir + Simeprevir	24	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir + ribavirine	12	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir	24	C
	Sofosbuvir + Ledipasvir + ribavirine	12	AE
Cirrhose décompensée			
Naïfs et pré-traités	Sofosbuvir + Daclatasvir + ribavirine	12	C
	Sofosbuvir + Daclatasvir	24	AE
	Sofosbuvir + Ledipasvir + ribavirine	24	C

Génotypes 5 et 6	Traitement	Durée (semaines)	Preuve
Pas de cirrhose			
Naïfs et pré-traités	Sofosbuvir + Daclatasvir	12	B
	Sofosbuvir + Ledipasvir	12	C
Cirrhose compensée			
Naïfs et pré-traités	Sofosbuvir + Daclatasvir + ribavirine	12	AE
	Sofosbuvir + Daclatasvir	24	AE
	Sofosbuvir + Ledipasvir + ribavirine	12	C
	Sofosbuvir + Ledipasvir	24	C

6-6-Résistance aux antiviraux à action directe

Le VHC présente une grande diversité génétique résultant de l'absence d'activité exonucléasique correctrice 5'-3' de l'RdRp, induisant des substitutions de nucléotides et résultant également du niveau élevé de la réplication. Le traitement de référence de l'hépatite C, associant la RBV et le pegIFN, ne semble pas induire une sélection de mutants résistants. En revanche, les AAD peuvent induire la sélection de variants qui portent des mutations modifiant la conformation des sites de liaison de ces molécules ou ayant un effet terminateur de chaîne. En monothérapie, les mutants résistants peuvent apparaître après quelques jours de traitement, provoquant un rebond virologique et un échec thérapeutique. Comme pour l'infection VIH, l'utilisation d'associations d'AAD doit être la règle dans le traitement de l'infection VHC.

La résistance aux AAD est associée à la sélection de mutations à des positions différentes dans la protéase (NS3), la polymérase (NS5B) et dans la région NS5A. Chaque famille de molécules thérapeutiques affiche un profil de mutations spécifiques qui peut être influencé par le génotype ou le sous-type viral.

6-6-1- Résistance aux anti-protéases

Plusieurs études cliniques ainsi que des expérimentations réalisées *in vitro* ont permis de caractériser différentes mutations impliquées dans la résistance aux IP.

6-6-1-1- Résistance au téléprevir

Des variants résistants au TVR ont été identifiés et caractérisés *in vitro*. Le système du réplicon, à partir d'un isolat de génotype 1b, a montré une mutation à la position 156 du domaine de la protéase NS3 avec la substitution de l'alanine en serine (A156S), en valine (A156V), ou en thréonine (A156T). En outre, d'autres mutations ont été identifiées conférant un faible niveau de résistance comme la V36M/A, la T54A et la R155K/T/Q ou un niveau de résistance élevé comme l'association de mutations en positions 36/155 et 36/156 (Halfon et Locarnini., 2011 ; Pawlotsky, 2011). La capacité de répliation est diminuée pour les virus porteurs des mutations R155K/T/Q et A156T/V, par contre elle est peu affectée pour les virus porteurs des mutations V36A/M et T54S qui conservent, *in vitro*, une capacité de répliation supérieure à 60% à celle de la souche sauvage (Poveda et Garcia., 2013) (**Figure 34**) Deux autres substitutions secondaires ont été observées *in vitro* (Q41R et F43S) avec un faible impact sur la résistance (Halfon et Locarnini., 2011).

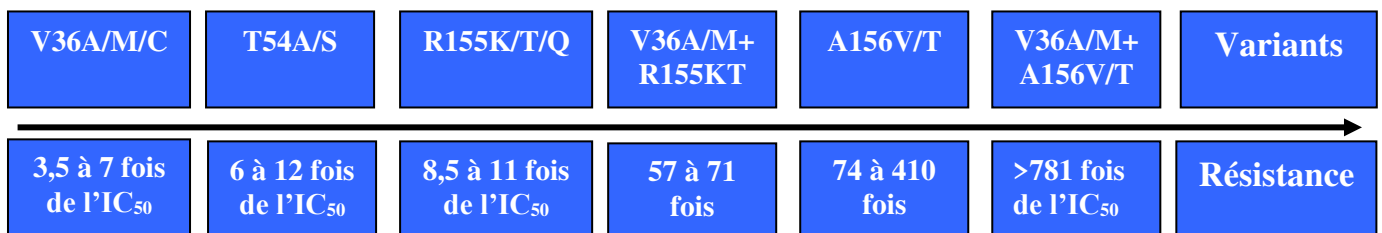


Figure 34 : Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis du TVR *in vitro* (d'après Pawlotsky, 2011)

Note : L'IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50) représente la concentration nécessaire pour inhiber de 50 % la croissance du virus et apporte des informations objectives sur le niveau de la résistance.

In vivo, les substitutions à la position 156 sont sélectionnées en début de traitement. Elles sont rapidement remplacées par des variants aux positions 155, 36+155, 36+156 (Pawlotsky, 2011). Chez les patients qui ont eu un rebond virologique avec le TVR en monothérapie, les mutations R155K/T et A156V/T sont détectées au cours de la forte baisse initiale de l'ARN VHC. Au cours de l'échappement avec rebond virologique, les substitutions R155K/T et A156V/T sont remplacées par la double mutation V36M/A+R155K/T (Halfon et Locarnini., 2011). Les profils de résistance sont différents en fonction des sous-types. Les patients infectés par le VHC de génotype 1a et qui n'ont pas présenté une RVS sélectionnent principalement les mutations V36M et R155K/T/Q, alors que les patients infectés par le VHC de génotype 1b sélectionnent principalement les substitutions V36A, T54S et A156S (Poveda

et Garcia., 2013 ; Lontok et al., 2015). Cette différence dans les profils de résistance peut être expliquée par le nombre de changements nucléotidiques nécessaires à la position 155 pour les génotypes 1a et 1b par exemple. Le génotype 1b a besoin de deux changements nucléotidiques en position 155 pour entraîner la résistance (R155K: CGG → AAG) alors qu'un seul changement est nécessaire pour le sous-type 1a (R155K: AGG → AAG). Deux étapes sont donc nécessaires pour obtenir la résistance du génotype 1b en position 155 ce qui explique que le génotype 1b ait une plus grande barrière de résistance que le génotype 1a (Poveda et Garcia., 2013).

6-6-1-2- Résistance au boceprevir

Le profil de résistance observé avec le BOC est proche de celui du TVR. Des études *in vitro* ont révélé que les mutations T54A, R155K/T/Q, A156S/T, V170A sont associées à différents niveaux de résistance au BOC.

Des études cliniques de phases II et III (SPRINT-1 et SPRINT-2) ont montré que les substitutions A156S/T et V36M sont les plus fréquemment observées. Les substitutions retrouvées chez plus de 25% des patients en échec étaient la V36M, la T54S, et la R155K, tandis que les substitutions moins communes présentes chez 5 à 25% des patients étaient la T54A, la V55A, la R155Y, la A156S/T, la V158I et la V170A. Les changements peu fréquents <5% incluent les mutations V36A, V36L, et I170T (Halfon et Locarnini, 2011). D'autre part Lontok et al. ont montré que les mutations les plus fréquemment observées chez les patients infectés par le VHC de génotype 1a à l'échec sont la V36M, la T54S et la R155K alors que celles observées chez le génotype 1b étaient la T54A/S, la V55A, la A156V et la V170A (Lontok et al., 2015). Ces mutations présentent différents niveaux de résistance. Globalement, les mutations V36M, T54S et R155K confèrent un bas niveau de résistance, cependant que la mutation A156S/T confère un haut niveau de résistance et réduit la capacité de réplication *in vitro* (Halfon et Locarnini, 2011).

6-6-1-3- Résistance au simeprevir

La deuxième vague des IP anti-VHC comprend des agents ayant une meilleure puissance antivirale mais qui génèrent cependant des mutants résistants dont les profils de résistance sont semblables à ceux du TVR et du BOC comme les mutations R155K/T/Q et V/I170A/T/L. La première et la deuxième vagues des IP de première génération sont caractérisées par une faible barrière génétique de résistance et par une large résistance croisée entre les composés (Poveda et Garcia., 2013). Les substitutions les plus fréquemment

observées chez les patients infectés par le génotype 1a en échec sont la R155K et la D168E/V ; chez les patients infectés par le génotype 1b on observe les mutations Q80R et D168E/V (Lontok et al., 2015).

6-6-1-4- Résistance au paritaprevir

La résistance au PTV conférée par des mutants au niveau de la NS3 sélectionnés par culture cellulaire ou identifiés lors des études cliniques de phases 2b et 3 a fait l'objet d'une caractérisation phénotypique en utilisant des réplicons de génotype 1a ou 1b. La figure ci-dessous (**Figure 35**) classe les mutations par ordre croissant de niveau de résistance au PTV chez le génotype 1a *in vitro*.

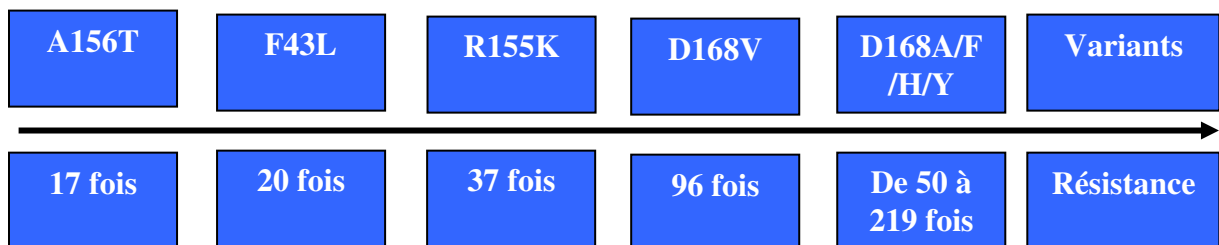


Figure 35 : Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis du PTV *in vitro*

En ce qui concerne le génotype 1a, l'activité de PTV n'est pas significativement affectée (inférieure ou égale à 3 fois) par les substitutions uniques V36A/M, V55A, Y56H, Q80K ou E357K. Par contre, des doubles mutations incluant des combinaisons de V36L/M, F43L, Y56T, Q80K ou E357K avec R155K ou une substitution de D168 ont réduit 2 à 3 fois plus l'activité du PTV que la substitution unique R155K ou une substitution en position 168. Pour le réplicon de génotype 1b, l'activité du PTV a été réduite de 76, 159 et 337 fois par les substitutions D168A, D168H, D168V et D168Y, respectivement. Y56H seule n'a pas pu être évaluée en raison d'une faible capacité de réplication, l'association de Y56H et D168A/V/Y a cependant réduit de 700 à 4118 fois l'activité de PTV. Pour le génotype 4a, les substitutions R155C, A156T/V et D168H/V au niveau de la NS3 ont réduit de 40 à 323 fois la sensibilité au PTV.

In vivo, les variants émergents pendant le traitement par PTV sont V36A/M, R155K ou D168V (ANSM-AbbVie ; RCP Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir, Décembre 2014).

6-6-2- Résistance aux anti-polymérase

6-6-2-1- Inhibiteurs nucléos(t)idiques : sofosbuvir

In vitro, l'activité antivirale du SOF contre différents génotypes et sous-types du VHC a été testée en utilisant des systèmes de réplication. Le SOF était actif contre des réplicons de génotypes 1a, 1b, 2a (souche JFH-1) et des réplicons chimériques de génotypes 2a (souche J6), 2b, et 3a. La mutation S282T était la mutation la plus commune, sélectionnée parmi tous les génotypes, mais cette mutation ne conférait une résistance au SOF que dans les génotypes 1a et 1b (augmentation de 7,8 et 13 fois du niveau de la résistance, respectivement). Elle entraînait une réduction très importante de la capacité répliquative. Les réplicons de génotype 2a abritant la mutation S282T étaient associés à une modeste réduction (2X) de la sensibilité au SOF (Lam et al., 2012). En outre, pour le génotype 1b, la mutation S282T était la seule observée tandis que pour le génotype 1a une mutation supplémentaire I434M était observée en association avec S282T. Dans le cas des réplicons de génotype 2a, au moins cinq mutations supplémentaires (T179A, M289L, I293L, M434T, et H479P) étaient observées avant et après l'apparition de la mutation S282T. Plus précisément, la mutation S282T associée à la fois à des mutations du domaine du doigt (T179A) et de la paume (M289L et I293L) était essentielle pour conférer une résistance au SOF, tandis que les changements à la surface du domaine du pouce (M434T et H479T) apparaissaient comme des mutations compensatoires induisant la restitution de la capacité répliquative (Lam et al., 2012).

In Vivo, la mutation S282T a été rarement trouvée chez des patients présentant un échec d'un traitement à base de SOF. Tout d'abord, cette mutation a été trouvée chez un patient infecté par le VHC de génotype 2b qui avait un ARN VHC détectable 12 semaines après une monothérapie à base de SOF (Gane et al., 2013), ensuite chez un patient infecté par le VHC de génotype 1 ayant rechuté à un traitement à base de SOF/RBV pendant 24 semaines (Osinusi et al., 2013) et enfin chez un autre patient infecté par le VHC de génotype 1 qui a eu une rechute virologique après 8 semaines de traitement par SOF/LDV (Lawitz et al., 2014). D'autres variants, L159F et V321A, ont été identifiés par séquençage de population dans des études cliniques de phase 3 chez des patients de génotype 3 qui n'ont pas présenté de RVS (Lontok et al., 2015).

6-6-2-2- Inhibiteurs non nucléosidiques

Les INN sont des inhibiteurs non compétitifs de la synthèse d'ARN du VHC qui interagissent avec la polymérase sur les sites allostériques en dehors du site catalytique empêchant ainsi l'induction des changements conformationnels de la polymérase essentiels à

sa fonction. Au moins quatre différents sites allostériques de liaison ont été identifiés comme cibles pour les INN (INN-1, INN-2, INN-3 et INN-4) tels que déterminés par leurs profils de résistance uniques (Pauwels et al., 2007). La polymérase du VHC est connue sous la forme d'une main droite, avec les domaines du pouce, de la paume, et des doigts. Les sites allostériques 1 et 2 sont situés sur le domaine de la paume et les sites 3 et 4 sont situés sur le domaine du pouce (Bressanelli et al., 2002). Dans l'ensemble, les INN présentent la plus faible barrière de résistance parmi les nouveaux AAD. Il n'y a pas de résistance croisée entre les différentes classes d'INN qui interagissent avec différents sites de la polymérase. Cependant, certains profils de résistance chevauchant ont été observés au niveau des sites de la paume. Plus précisément, les mutations C316Y/N et Y448H sont associées à une résistance à la fois aux INN-3 et INN-4 (Poveda et Soriano., 2012 ; Vermehren et Sarrazin., 2012). Les INN de première génération ont une barrière génétique basse et sont actifs seulement sur le VHC de génotype 1. Les INN de deuxième génération sont en phase préclinique.

- **Résistance au dasabuvir**

La résistance au DSV conférée par des substitutions au niveau du domaine I de la paume de la polymérase NS5B, sélectionnées par culture cellulaire ou identifiées lors des études cliniques de phases 2b et 3, ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique au sein des réplicons de génotypes 1a ou 1b. Pour le génotype 1a, les variants C316Y, M414T, Y448H, A553T, G554S, S556G/R et Y561H ont diminué la sensibilité au DSV. La figure ci-dessous (**Figure 36**) classe les mutations par ordre croissant de niveau de résistance au DSV chez le génotype 1a (ANSM-AbbVie ; RCP Dasabuvir, Décembre 2014).

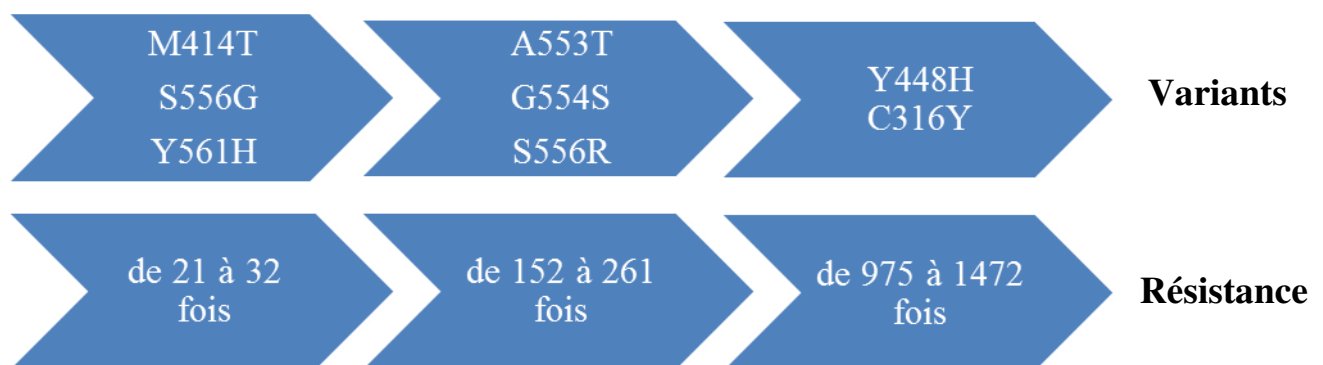


Figure 36: Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis du DSV *in vitro* chez le génotype 1a

Note : G558R et D559G/N ont été observées en tant que substitutions émergent pendant le traitement mais l'activité du DSV contre ces variants n'a pas pu être évaluée en raison d'une faible capacité de répllication.

Pour le génotype 1b, les variants C316N/Y, M414T, Y448H et S556G ont réduit la sensibilité au DSV. L'activité du DSV a été totalement conservée vis-à-vis des réplicons portant les substitutions S282T au niveau du site de liaison nucléosidique, M423T au niveau de la partie inférieure du « pouce » et P495A/S, P496S ou V499A au niveau de la partie supérieure du « pouce » (**Figure 37**).

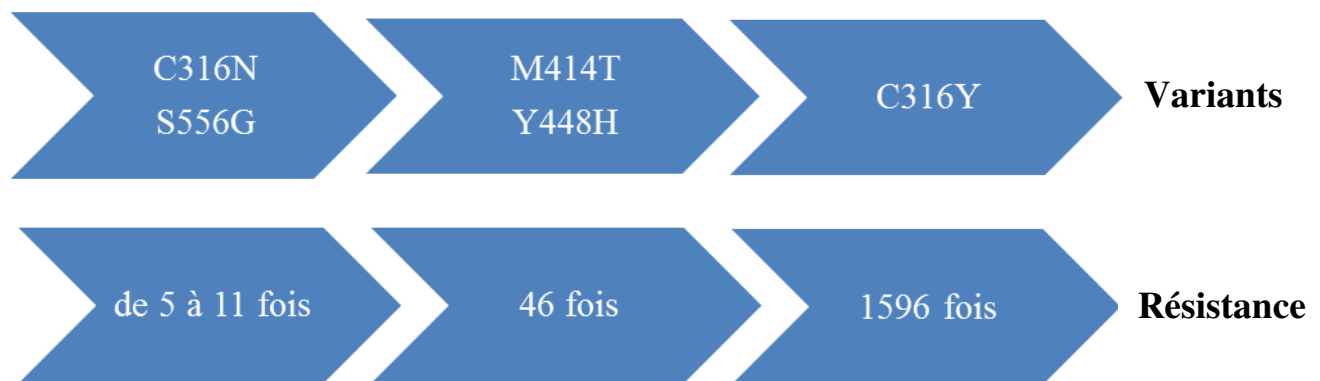


Figure 37 : Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis du DSV *in vitro* chez le génotype 1b

Dans des études cliniques de phases 2b et 3, 74 patients au total sur 2510 (3%) ont présenté un échec virologique. Les variants émergents pendant le traitement et associés à la résistance au DSV étaient M414T, G554S, S556G, G558R et D559G/N. Ces substitutions ont été détectées chez 34 patients de génotype 1a. La mutation la plus fréquemment observée était S556G avec une fréquence de 33,3% (22/67) (ANSM-AbbVie ; RCP Dasabuvir, Décembre 2014). De même, Lontok et al. ont montré que les substitutions les plus fréquemment observées chez des patients de génotype 1a qui n'ont pas atteint une RVS étaient la M414T et la S556G, alors que chez les patients de génotype 1b la mutation la plus fréquemment observée était la S556G (Lontok et al., 2015).

6-6-3- Résistance aux anti-NS5A

6-6-3-1- Résistance au daclatasvir :

Les substitutions conférant une résistance au DCV identifiées dans le système de réplication *in vitro* sont en bonne corrélation avec celles observées en clinique. Plusieurs substitutions d'AA à l'extrémité N-terminale du domaine I de la protéine NS5A aux positions M28, Q30, L31 et Y93 et aux positions L31 et Y93 ont été associées à la résistance au DCV dans les souches de VHC de génotypes 1a et 1b, respectivement (Gao, 2013 ; Poveda et al., 2014).

Les patients infectés par le VHC de génotype 1a et qui n'ont pas obtenu de RVS sélectionnent principalement les mutations M28T, Q30E/H/R, L31M, H58D et Y93H/N cependant que les patients infectés par le génotype 1b sélectionnent principalement les mutations L31M et Y93H et les patients infectés par le génotype 4 la mutation Q30H/S (Lontok et al., 2015). Le DCV est caractérisé par une faible barrière de résistance génétique, en particulier pour le VHC de génotype 1a, chez lequel la sélection d'une mutation unique est suffisante pour induire une perte de susceptibilité au DCV. Il est à noter que les substitutions Y93H/N sont associées à une diminution de la capacité de réplication virale (Gao, 2013 ; Poveda et al., 2014).

6-6-3-2- Résistance au ledipasvir :

In vitro, une résistance croisée entre le DCV et le LDV a été observée, principalement aux positions 31 et 93 (Gao, 2013).

Les patients infectés par le VHC de génotype 1a et qui n'ont pas obtenu de RVS sélectionnent principalement les mutations Q30E/R, L31M et Y93H/N cependant que les patients infectés par le génotype 1b sélectionnent principalement la mutation Y93H (Lontok et al., 2015).

6-6-3-3- Résistance à l'ombitasvir

La résistance à l'OBV conférée par des variants au niveau de la NS5A, sélectionnés par culture cellulaire ou identifiés lors des études cliniques de phases 2b et 3, a fait l'objet d'une caractérisation phénotypique au sein des réplicons de génotypes 1a et 1b. Pour le génotype 1a, les substitutions M28T/V, Q30E/R, L31V, H58D, Y93C/H/N et M28V + Q30R de la NS5A du VHC ont été associées à une diminution de la sensibilité à l'OBV (**Figure 38**) (Krishnan et al., 2015).

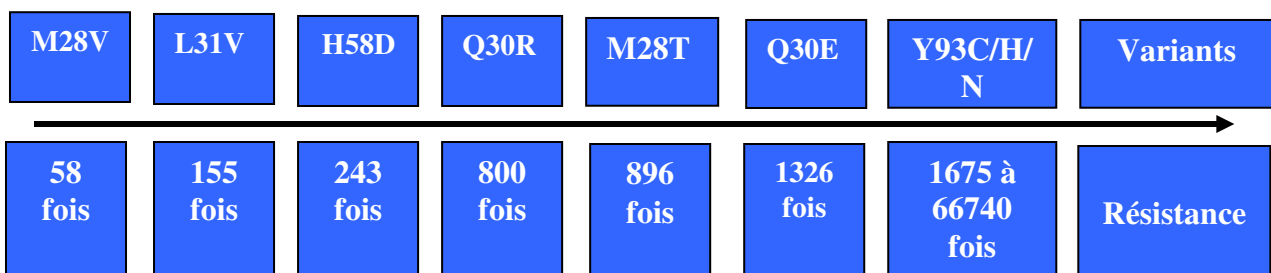


Figure 38 : Classification des mutations par ordre croissant de niveau de résistance conféré vis-à-vis de l'OBV *in vitro* chez le génotype 1a (d'après Krishnan et al., 2015)

Note : La combinaison Y93H, Y93N ou M28V avec Q30R a entraîné une réduction de l'activité de l'OBV (X 42802).

Pour le génotype 1b, les substitutions L28T, L31F/V et Y93H seules ou associées à L28M, R30Q, L31F/M/V ou P58S, ont entraîné une diminution de la sensibilité à l'OBV. L'activité de l'OBV a été réduite de moins de 10 fois par les substitutions d'AA aux positions 30 et 31 alors que elle a été réduite de 661, 77, 245 et 142 fois par les substitutions L28T, Y93H, R30Q, en combinaison avec Y93H, et L31M en combinaison avec Y93H, respectivement. Les autres doubles combinaisons de Y93H associées à des substitutions aux positions 28, 31 ou 58 ont réduit de plus de 400 fois l'activité de l'OBV (Krishnan et al., 2015).

Dans des études cliniques de phases 2b et 3, 74 patients au total sur 2510 (3%) ont présenté un échec virologique. Les variants émergents pendant le traitement et associés à la résistance à l'OBV étaient M28T, M28V, et Q30R détectés chez 37 patients de génotype 1a et Y93H détectés chez deux patients de génotype 1b (Krishnan et al., 2014 et 2015).

6-6-4- Résistance « naturelle » aux antiviraux directs chez les malades naïfs de traitement

Les mutations de résistance aux AAD ne sont pas uniquement observées chez les patients en échec de traitement. Elles ont été décrites chez des patients naïfs de traitement et en absence de toute pression médicamenteuse. Certains de ces variants résistants peuvent dominer la quasi-espèce en l'absence de toute pression antivirale et pourraient donc influencer la capacité de réplication *in vivo*.

Plusieurs travaux ont été réalisés afin de caractériser les mutations de résistance aux IP, IN et INN de la polymérase et aux inhibiteurs de la protéine NS5A avant traitement par AAD. La plupart des travaux publiés ont été réalisés sur le VHC de génotype 1.

6-6-4-1- Inhibiteurs de protéase

Une cohorte française de 298 patients infectés par le VHC de génotypes 1, 2, 3, 4 et 5 a été évaluée pour l'étude du polymorphisme naturel pouvant conférer une résistance aux IP. Cette population n'a pas montré de mutations majeures associées à la résistance au TVR (A156S/V/T et R155K/T) et au BOC (A156S/T et V170A). Quelques substitutions comme la V36L, T54S, Q80K/R, D168Q et V170T associées à un niveau faible ou modéré de résistance aux IP ont été observées avec une fréquence comprise entre 2 et 100% en fonction du génotype. La mutation T54S était observée sur 6 séquences (4 séquences de génotype 1 et 2 séquences de génotype 4) soit 2,6%. Par contre, la mutation V36L était présente chez 100% des génotypes 2, 3, 4 et 5. Tous les patients de génotype 3a ont présenté la mutation D168Q (Vallet et al., 2011).

Dans une autre étude, Trimoulet et al. ont cherché la prévalence naturelle des mutations de résistance aux IP chez des patients co-infectés VIH/VHC comparé à des patients mono-infectés par le VHC. Ils ont effectué une comparaison entre 120 séquences du gène NS3 des patients co-infectés et 501 séquences témoins des patients mono-infectés extraites de GenBank. Parmi les 76 séquences des patients co-infectés VIH/VHC de génotype 1, 6 patients (7,9%) ont présenté des substitutions d'AA associées à la résistance aux IP (V36L, V36M, T54S, et R155K). Trente et une parmi les 476 séquences de VHC de génotype 1 (6,5%) extraites de GenBank ont présenté des substitutions d'AA liées à la résistance aux IP (Trimoulet et al., 2011).

L'étude italienne de Vicenti et al. réalisée chez 120 patients infectés par le VHC de génotypes 1a et 1b (46 patients mono-infectés par le VHC et 66 co-infectés VIH/VHC), a identifié 21 patients (21/109) (19,3%) présentant des mutations liées à la résistance aux IP. Onze patients (10%) ont présenté la mutation Q80K et 10 patients (9,2%) ont présenté les mutations V36L, T54S et V55A (Vicenti et al., 2012).

6-6-4-2- Inhibiteurs de polymérase

Dans les essais de phase 3 de traitement par SOF, NEUTRINO, POSITRON, FUSION et FISSION, concernant plus de 1200 patients, la mutation S282T n'a jamais été détectée avant traitement quel que soit le génotype du VHC, ce qui est probablement à mettre en relation avec la faible capacité répliquative de ces variants (Svarovskaia et al., 2013).

Legrand-Abravanel et al. ont étudié la prévalence des substitutions connues comme conférant une résistance à la polymérase NS5B chez 124 patients français non traités infectés par le VHC de génotypes 1, 2, 3, 4 ou 5. Ces auteurs n'ont trouvé aucune substitution susceptible de conférer une résistance aux IN aux positions 96, 142 et 282. Cependant les substitutions conférant une résistance aux INN étaient fréquentes avec les souches de génotypes 1 (17%) et très communes avec les souches de génotype non-1. La mutation V499A a été trouvée chez 100% des séquences de génotypes 1a, 2, 3, et 5. Les mutations I424V et S556G ont été trouvées chez 100% des séquences de génotypes 2, 3, 4 et 5. La mutation V494A a été trouvée chez 100% des séquences de génotype 2. Les mutations L419M/I et I482L ont été trouvées chez 100% des séquences de génotypes 2, 3 et 4 et la mutation M423I était présente chez 100% des séquences de génotype 5 (Legrand-Abravanel et al., 2009).

Dans une autre étude, 806 séquences NS5B (1a = 471 ; 1b = 329 et 3a = 6) issues de la base de données Los Alamos et provenant de patients naïfs de traitement et infectés par le

VHC de génotypes 1a, 1b et 3a ont été évaluées pour la recherche des mutations de résistance aux IN et INN de polymérase NS5B. Les cinq mutations L419I, I424V, I482L, V499A et S556G ont été observées avec une fréquence élevée chez le génotype 3a et les mutations V499A et C316N ont été mises en évidence, respectivement pour 1a et 1b (Alves et al., 2013).

Dans l'étude italienne de Paolucci et al. la prévalence naturelle des mutations de résistance aux IN et INN de la polymérase NS5B chez 62 patients infectés par le VHC de génotype 1 a été recherchée (1a =32 ; 1b =30). Quatre séquences de génotype 1a (12,5%) ont présenté des mutations de résistance aux IN/INN (V321I ; M426L ; Y448H et Y452H) et 27 séquences de génotype 1b (90%) ont présenté les mutations de résistance suivantes aux IN/INN : L159F ; V321I ; C316N ; M426L ; Y452H ; R465G et V499A (Paolucci et al., 2013).

6-6-4-3- Inhibiteurs NS5A

Plaza et al. ont cherché la prévalence des mutations associées à la résistance au DCV chez 78 patients co-infectés VIH-VHC et 635 séquences NS5A de la base de données de Los Alamos. Ces auteurs n'ont pas rapporté de mutations de résistance au DCV chez les génotypes 1a ou 3. En revanche, la mutation L31M a été trouvée dans toutes les séquences de génotype 4 et chez quelques séquences de génotype 1b. La combinaison L31M et Y93H a été rapportée chez 7% des séquences de génotype 1b et 13% des séquences de génotype 4. Toutes les séquences de génotype 1b et de génotype 4 ont permis d'observer les mutations M28L et L30R (Plaza et al., 2012).

Dans l'étude japonaise de Suzuki et al. la prévalence naturelle de mutations de résistance au DCV chez 362 patients non traités et infectés par le VHC de génotype 1b a été recherchée. Trente-trois patients (33/298) (11,2%) ont présenté des mutations de résistance : la mutation prédominante était la Y93H avec une fréquence de 8,2% suivie par la mutation L31M avec une fréquence de 2,7% (Suzuki et al., 2012).

Par ailleurs, dans une autre étude, Paolucci et al. ont déterminé la prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs NS5A chez 62 patients italiens infectés par le VHC de génotype 1 (1a =32 ; 1b =30). Ces auteurs ont trouvé 4 séquences de génotype 1a (12,5%) présentant des mutations de résistance aux inhibiteurs NS5A (M28V ; L31M et H58P) et 16 séquences de génotype 1b (53,3%) présentant des mutations à ces mêmes inhibiteurs (L28V ; L31M ; Q54H et Y93H) (Paolucci et al., 2013)

Hernandez et al. ont déterminé la prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs NS5A chez des patients américains naïfs de traitement et infectés par le VHC de

génotype 3. Ces auteurs ont montré que les mutations de résistance décrites chez le génotype 1 étaient retrouvées chez le génotype 3 avec une fréquence de 1% pour la M28V, 1% pour la L31M et 8,3% pour la Y93H (Hernandez et al., 2013).

6-6-5- Impact de la présence des mutants associés à la résistance avant traitement sur la réponse au traitement

Etant donné la grande diversité génétique du VHC, certains variants associés à la résistance aux AAD ont été décrits chez les malades naïfs de traitement en l'absence de toute pression de sélection thérapeutique. Lors d'un traitement par association d'AAD, ces variants, s'ils sont présents, pourraient avoir une influence sur le taux de la RVS. De nombreuses études ont cherché à évaluer l'impact de la présence de ces variants avant traitement sur la réponse au traitement.

Dans des études de phase 3 concernant le TVR, le traitement de patients naïfs pendant 12 semaines a montré des résultats cliniques similaires chez les patients présentant des mutations de résistance au TVR avant traitement et chez ceux n'en présentant pas. Les patients présentant les mutations de résistance V36M, T54S, ou R155K avant traitement ont atteint un taux de RVS de 74%, tandis que les patients sans variant résistant ont eu un taux de RVS de 76% (Jacobson et al., 2011 ; Sherman et al., 2011).

Dans des essais de phases 2b et 3 de traitement par SMV, menés sur 2007 patients de génotype 1, les polymorphismes à l'inclusion aux positions 43, 80, 122, 155, 156 et 168 de la protéase NS3 étaient peu fréquents (1,3%), à l'exception de la substitution Q80K chez les patients infectés par le génotype 1a. La prévalence naturelle de la mutation Q80K chez les patients infectés par le génotype 1 est de 34,5% en Amérique du Nord et de 6% en Europe. Celle-ci varie en fonction des différents sous-types. En Amérique du Nord, ce polymorphisme n'a jamais été détecté chez les patients de génotype 1b alors que celui-ci s'élève à 48,1% chez les génotypes 1a. En Europe, la prévalence naturelle de cette mutation est de 0,3% chez les génotypes 1b et de 19,4 % chez les génotypes 1a. Ce polymorphisme n'a pas été observé chez les patients de génotype 4 (Lenz et al., 2014). Les études de phase 3 QUEST-1 et QUEST-2 de traitement par SMV en combinaison avec pegIFN α -RBV chez des patients naïfs infectés par le génotype 1 ont évalué l'impact de la mutation Q80K sur la RVS. Les taux de RVS observés étaient plus faibles en présence de la mutation Q80K (58%) qu'en l'absence de celle-ci (84%). (Jacobson et al., 2013 (a)). L'essai COSMOS a évalué la combinaison SOF/SMV +/- RBV chez deux cohortes de patients de génotype 1. Les malades étaient majoritairement de génotype 1a et près de 40% présentaient le polymorphisme Q80K. Les

taux de RVS dans la cohorte 1, incluant 87 patients non-répondeurs à la bithérapie pegIFN α -RBV et ayant une fibrose F₀-F₂, étaient de 100% chez les malades de génotype 1b et 1a sans mutation Q80K et de seulement 90% chez les malades 1a porteurs de cette mutation à l'inclusion. Dans la cohorte 2, comprenant 80 malades naïfs ou en échec de traitement par pegIFN α -RBV et ayant une fibrose F₃-F₄, les taux de RVS étaient de 100% chez les génotypes 1b, 95% chez les 1a sans Q80K et 96% chez les 1a avec Q80K (Jacobson et al., 2013 (b)). En conclusion, la recherche de la présence de ce polymorphisme doit être envisagée avant l'instauration du SMV en association au SOF chez les patients infectés par le VHC de génotype 1a.

L'essai SIRIUS a été mené chez des patients cirrhotiques infectés par le génotype 1 du VHC, non-répondeurs au traitement pegIFN α -RBV + IP et traités par LDV/SOF +/- RBV. Dans cet essai, 24 patients sur 155 (16%) ont présenté des variants associés à une diminution de sensibilité au LDV avant traitement. Aucun d'entre eux n'a présenté la mutation S282T. La présence à l'inclusion des mutations associées à la résistance au LDV n'a pas eu d'impact sur le taux de RVS. Parmi les 5 patients rechuteurs, 2 patients avaient des variants résistants avant traitement alors que les 3 autres n'en présentaient pas (Bourlière et al., 2015). Dans l'étude ION-4 menée chez 325 patients co-infectés VIH-VHC de génotype 1 et 4 et traités par SOF/LDV, 59 patients de génotype 1 (59/325) (18%) ont présenté des mutations de résistance au LDV avant traitement. Les taux de RVS n'étaient pas significativement différents entre les patients porteurs de mutations associées à la résistance au LDV (93%) (55/59 patients) et ceux n'en présentant pas (97%) (258/266 patients). La substitution S282T n'a pas été détectée chez les patients à l'inclusion (Naggie et al., 2015). Dans l'étude de Sarrazin et al. une prévalence de 16% des variants associés à la résistance aux anti-NS5A avant traitement a été décrite chez les patients de génotype 1. Parmi ces patients, 91% ont obtenu une RVS lors d'un traitement par SOF/LDV +/- RBV versus 98% chez les patients sans variant résistant. De plus, le taux de RVS après 12 semaines de traitements par SOF/LDV était plus faible chez les patients porteur du VHC de génotype 1a prétraités présentant avant traitement des variants associés à un haut niveau de résistance (X 100) vis-à-vis du LDV (67%) comparé aux patients prétraités sans variant résistant (97%) ou présentant des mutations associées à un bas niveau de résistance (100%) (Sarrazin et al., 2015).

Dans l'étude AI444040, les polymorphismes dans la région NS5A connus pour réduire la sensibilité du DCV *in vitro* ont été détectés initialement chez 16 % (33/203) des patients. La prévalence était variable en fonction des génotypes : 7,2% pour les souches de génotype 1a, 12% chez le génotype 1b, 61% chez le génotype 2 et 28% chez le génotype 3. Ces

polymorphismes de NS5A associés à la résistance incluait M28T, Q30E/H/R, L31M et Y93C/H/N chez les souches de génotype 1a ; L31M et Y93H chez les souches de génotype 1b ; L31M chez les souches de génotype 2 ; A30K/S, L31M, et Y93H chez les souches de génotype 3. A l'exception d'un patient infecté par un VHC de génotype 3 ayant présenté une rechute après un traitement par DCV/SOF sans RBV, tous les patients ayant des variants résistants au DCV avant traitement ont atteint une RVS. L'analyse de la résistance chez le seul patient infecté par le VHC de génotype 3 ayant rechuté n'a révélé à l'échec aucun nouveau variant résistant autre que le polymorphisme NS5A-A30K pré-existant (McPhee et al., 2014). Dans l'étude ALLY-2 menée chez 203 patients co-infectés VIH-VHC de génotypes 1 et 4 et traités par DCV/SOF pendant 12 semaines, le taux de RVS était de 97%. Parmi ces patients, 17% (33/198) ont présenté des mutations associées à la résistance au DCV aux positions 28, 30, 31 et 93 avant traitement. La présence des variants associés à la résistance avant traitement ne semble pas avoir un impact significatif sur la réponse au traitement (Wyles et al., 2015). La mutation L31M est fréquemment observée sur les séquences NS5A du génotype 2 (de 50 à 85%). L'impact de cette mutation a été évalué au cours d'un essai clinique évaluant l'activité antivirale de DCV vis-à-vis des génotypes 2 et 3. Cette étude a démontré que la présence de la mutation L31M ne permet pas de prédire l'échec thérapeutique chez les patients infectés par le VHC de génotype 2 recevant une trithérapie de 12 semaines associant DCV avec pegIFN α -RBV (Dore et al., 2013).

Dans des études cliniques de phases 2b et 3, concernant 2510 patients infectés par le VHC de génotype 1 traités par DSV, OBV et PVT/r avec ou sans RBV pendant 8, 12 ou 24 semaines, 74 patients au total (3%) ont présenté un échec virologique (essentiellement une rechute post-traitement). Etant donné les faibles taux d'échec virologique observés aux schémas de traitement recommandés pour les patients infectés par le VHC de génotypes 1a et 1b, la présence des variants résistants à l'inclusion ne semble avoir qu'un faible impact sur la probabilité d'atteindre une RVS (Krishnan et al., 2014).

En conclusion et d'après les résultats des études cliniques, l'impact de la mutation S282T, associée à la résistance au SOF, est difficile à évaluer étant donné qu'elle n'a jamais été décrite avant traitement chez les patients naïfs d'AAD. Concernant le polymorphisme Q80K, la prévalence naturelle de celui-ci est élevée chez les patients infectés par le génotype 1a. Cette mutation semble avoir un impact sur le taux de RVS chez ces patients. De ce fait, la recherche de cette substitution reste indispensable avant traitement par SMV chez les patients porteurs du VHC de génotype 1a. Enfin, les variants associés à la résistance aux anti-NS5A présents avant traitement pourraient avoir un impact sur la RVS chez certains groupes de

patients, notamment les patients prétraités par pegIFN α -RBV et qui sont porteurs de variants associés à un haut niveau de résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A.

Objectif de l'étude

L'objectif de notre travail est l'étude du polymorphisme génétique du VHC aux positions impliquées dans la résistance aux AAD dans les régions NS3, NS5B et NS5A du génome viral chez des patients tunisiens atteints d'hépatite C chronique avec ou sans cirrhose, avec des présentations cliniques et des niveaux de réplication virale variables, en dehors de tout traitement anti-VHC.

Il s'agit d'une étude génomique préliminaire à l'entrée des IP, des IN et INN de la polymérase et des inhibiteurs de la protéine NS5A en Tunisie, déterminant la prévalence naturelle des mutations de résistance à ces molécules dans les souches circulant dans le pays.

Actuellement, il n'y pas de données concernant la prévalence naturelle des mutations de résistance aux IP, IN et INN de la polymérase ainsi qu'aux inhibiteurs de la protéine NS5A en Tunisie. Notre étude est la première à fournir des données sur la fréquence de ces mutations dans les souches tunisiennes circulantes. La présence avant traitement de ces variants associés à la résistance pourrait être prise en considération lors du traitement des patients par AAD du fait de leur impact potentiel sur la RVS.

Patients et Méthodes

A- Patients

Notre population d'étude est constituée de patients présentant une hépatite C chronique, vus en consultation entre 2009 et 2011 dans les services de gastroentérologie de trois hôpitaux en Tunisie : Hôpital Universitaire Mohamed Taher Maamouri, Nabeul ; Hôpital Universitaire La Rabta, Tunis et Hôpital Habib Bougatfa, Bizerte. Les prélèvements de cas patients ont été adressés au laboratoire de Virologie Clinique de l'institut Pasteur de Tunis dans le cadre d'un bilan pré-thérapeutique. A partir d'une liste de départ d'environ 300 malades et selon la disponibilité des informations cliniques et de sérums en quantités suffisantes, une population finale de 149 patients a été retenue.

B- Méthodes

1- Détermination de la charge virale

Elle a été réalisée en Tunisie par PCR en temps réel en utilisant le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (Roche-Diagnostics). Initialement, l'ARN du VHC est extrait des échantillons dans un extracteur automatique (AmpliPrep) puis, l'ARN extrait est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc). Des standards de quantification sont utilisés en parallèle avec les échantillons à tester, ce sont des produits de synthèse non infectieux d'ARN encapsidé qui contient des séquences VHC avec des sites de liaison aux amorces identiques à ceux de l'ARN du VHC cible et un site unique de liaison aux sondes qui permet de faire la différence entre l'amplicon du standard de quantification du VHC et l'amplicon dérivant de l'échantillon testé. L'amplification par PCR de l'ADNc cible se fait dans un mélange réactionnel contenant une paire d'amorces et des sondes spécifiques à la fois de l'ARN du VHC et de l'ARN du standard de quantification du VHC. La détection de l'ADN amplifié est réalisée à l'aide d'une sonde oligonucléotidique spécifique de la cible et d'une sonde oligonucléotidique doublement marquée spécifique du standard de quantification, qui permettent l'identification indépendante de l'amplicon du VHC et du standard de quantification du VHC. Ce dernier est incorporé dans chacun des échantillons et des témoins en nombre de copies connu. L'analyseur COBAS® TaqMan® calcule le titre d'ARN du VHC dans les échantillons testés en comparant le signal VHC au signal du standard de quantification pour chaque échantillon et chaque témoin.

2- Génotypage du VHC

Le génotypage du VHC a été réalisé en Tunisie, soit par séquençage partiel de la région NS5B, soit par le test de génotypage (LIPA) VERSANT[®] HCV version 2.0 (Innogenetics-Belgium).

2-1- Extraction du génome viral

L'extraction de l'ARN du VHC a été réalisée en utilisant le kit commercial QIAamp Viral RNA Mini kit de Qiagen. C'est une technique qui permet la lyse des cellules et des virus à l'aide d'un tampon de lyse et la récupération des acides nucléiques et des ARN viraux sur membranes après des étapes de lavage et d'élution. Brièvement, 140 µl du sérum sont traités avec le tampon de lyse AVL capteur d'ARN pour lyser la capsidie et dégrader les constituants protéiques des virus. Dans une autre étape, l'éthanol absolu est ajouté et le tout est centrifugé à 8000 tours/min pour capturer les ARN sur la membrane des colonnes. Ensuite, deux étapes de lavage successives sont effectuées et l'ARN viral est récupéré dans 60µl de tampon d'élution AVE par centrifugation à 8000 tours/min. L'extrait génomique est alors conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

Dans chaque série deux contrôles sont inclus, un contrôle positif (sérum présentant une charge virale élevée) pour valider la réaction et un contrôle négatif (eau stérile) pour détecter les éventuelles contaminations.

Cette même technique d'extraction sera utilisée pour toutes les régions génomiques étudiées et ne sera pas représentée dans les chapitres suivants.

2-2- Séquençage partiel de la région NS5B

Cette technique consiste à réaliser la transcription inverse (RT) puis l'amplification génomique par PCR de la région NS5B du VHC et enfin le séquençage des produits amplifiés.

- **Transcription inverse**

L'étape de RT est une étape qui précède la réaction de PCR en assurant la synthèse d'ADNc à partir des fragments d'ARN extraits. A 10µl d'ARN extrait, est ajouté 1µl de l'amorce antisens DM100 à 10µM (**Tableau 2**), le tout est incubé à 80°C pendant 6 min, suivi de 5 min à 42°C, puis mis directement dans la glace. Cette étape permet la linéarisation de l'ARN et facilite l'hybridation spécifique de l'amorce. Neuf microlitres d'un mélange réactionnel (mix-RT), contenant pour chaque échantillon 4µl de tampon RT 5X, 1µl de dNTP

à 20mM, 2µl de DDT (dithiothreitol) à 0,1M, 1µl de RNAsin à 40U/µl et 1µl de l'enzyme RT sont ensuite ajoutés. Les tubes sont vortexés et placés dans un thermocycleur (Applied Biosystems GenAmp PCR System 2700) 45 min à 42°C puis 15 min à 94°C (étape de dénaturation de l'enzyme). Cette étape de RT est suivie par une étape d'amplification de l'ADNc par PCR.

- **PCR externe**

La PCR externe est réalisée dans un volume réactionnel de 50µl contenant 10µl d'ADNc et 40µl du mix PCR. Le mix PCR1 est constitué de 5µl de tampon 10X, 2µl de chacune des 2 amorces externes à 10µM : l'amorce antisens DM100 (utilisée déjà pour la transcription inverse de l'ARN extrait) et l'amorce sens DM101 (**Tableau 2**), 3µl de MgCl₂ à 25mM, 1µl de dNTP à 20mM, 0,2µl de l'enzyme Taq polymérase et 28,8µl d'eau stérile. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur pour subir 30 cycles d'amplification, précédés par une dénaturation de 5 min à 94°C. Chaque cycle comporte une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une hybridation des amorces à 60°C pendant 30 sec et une extension à 72°C pendant 1 min. Le dernier cycle comporte une étape d'extension supplémentaire à 72°C pendant 7 min. La PCR externe amplifie un fragment de 385pb de la NS5B, allant du nucléotide 8256 au nucléotide 8641.

- **PCR interne**

La deuxième PCR consiste à ajouter 5µl du produit amplifié de la PCR1 à un mix PCR2 pour atteindre un volume réactionnel total de 50µl. La composition du mix PCR2 est semblable au mix PCR1 une nouvelle amorce sens étant utilisée (1s) (**Tableau 2**), le volume réactionnel étant complété par 7µl d'eau. Les 30 cycles de la PCR2 sont effectués dans les mêmes conditions que celles de la première PCR. Les produits PCR de 364pb sont ensuite purifiés et séquencés. La PCR interne produit un fragment de 364pb (8267-8630).

Noms	Sequences 5'-3'	Position (nt)	T _H °C
DM101	TTCTCRTATGAYACCCGCTGYTTTGA	8250-8274	70,2
DM100	TACCTVGT CATAGCCTCCGTGAA	8638-8616	68,4
1s	TATGAYACCCGCTGYTTT GAC	8256-8275	

Tableau 2: Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la polymérase NS5B en vue du génotypage

- **Révélation des produits amplifiés**

La révélation des produits d'amplification issus de la PCR interne se fait par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) en présence de bromure d'éthidium et visualisation sous UV. Un gramme et demi d'agarose poudre sont dissouts dans 100 ml de tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X) et chauffé pendant quelques minutes dans un four à micro-ondes. Cinq microlitres de bromure d'éthidium (BET) sont ensuite ajoutés. Le gel est versé dans le support de migration et conservé à l'air libre environ 15 min pour se solidifier. 5µl d'ADN amplifié sont ensuite mélangés avec une goutte du bleu de dépôt (bleu de bromophénol et xylène cyanol, Euromedex) et déposés dans les puits du gel d'agarose contenu dans la cuvette d'électrophorèse remplie de TBE, pour réaliser une migration d'environ 30 min à 110 V. Le gel est ensuite placé sous UV et le BET intercalé entre les bases des acides nucléiques va émettre une fluorescence révélatrice des bandes d'amplification. La taille des bandes est vérifiée en se référant à un marqueur de taille allant de 100 à 1000 pb.

- **Purification des produits amplifiés**

L'étape de purification vise à éliminer certains produits généralement présents dans les tubes réactionnels et qui peuvent gêner la réaction de séquençage : amorces, nucléotides libres, enzymes, sels. La méthode de purification utilise le kit commercial MicrospinTM S-400 HR Columns (GE Healthcare, UK) kit basé sur l'utilisation de colonnes de filtration contenant des billes de sephadex. Les membranes des colonnes vont permettre la fixation des composants réactionnels de l'amplifiat et l'élution de l'ADN après centrifugation.

- **Séquençage des produits amplifiés**

Les ADN purifiés ont été séquencés avec un séquenceur à 24 tubes capillaires (ABI 3500 xLDx, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Le principe de la réaction de séquence est basé sur la méthode de Sanger, en utilisant le réactif commercial BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Ce test de séquençage est basé sur l'utilisation de deux composants essentiels qui sont l'enzyme de séquençage (BigDye® Terminator V 3.1) et les di-deshydro-nucléotides (ddNTP) hautement marqués avec des marqueurs fluorescents. Ces ddNTP sont capables d'absorber l'énergie fournie par les rayons laser du séquençage et de la transformer en un signal d'émission détectable. Ces quatre marqueurs fluorescents donnent quatre couleurs différentes au niveau

du profil de lecture des pics de séquençage appelé électrophorégramme pour caractériser les quatre nucléotides du brin d'ADN séquençé (**Figure 39**).

Pour chaque échantillon, deux tubes réactionnels sont préparés pour le séquençage au niveau de la région NS5B contenant chacun l'amorce sens et l'amorce anti-sens. Ceci permet un séquençage des amplifiats dans les deux sens et assure une détection plus fiable des mutations ponctuelles ainsi qu'une résolution des éventuels problèmes de lecture de certains fragments de séquence

Dans un mélange réactionnel total de 20µl, un microlitre d'ADN purifié est mélangé avec 1µL de chaque amorce préparées à une concentration de 3,5µM, 1µl de BigDye, 3,5µl de tampon 5X et 13,5µl d'eau stérile. Le mélange réactionnel est dénaturé à 95°C pendant 3 min puis soumis à 25 cycles d'amplification contenant chacun une dénaturation de 10 sec à 95°C, suivie d'une hybridation de 5 sec à 50°C et d'une élongation de 4 min à 60°C. Les produits de la PCR séquençage sont ensuite purifiés avec le kit BigDye X Terminator (Applied Biosystems) pour éliminer l'excès de BigDye qui risque de perturber le signal de lecture. Les produits de PCR séquençage purifiés sont ensuite injectés dans le séquenceur pour subir une migration sur gel de polyacrylamide le long des capillaires. Les fluorochromes sont repérés et les signaux sont convertis en résultats informatisés sous forme d'électrophorégramme avec le logiciel pilotant le séquenceur montrant ainsi les pics colorés correspondant aux quatre bases nucléotidiques.



Figure 39: Exemple d'électrophorégramme

- **Analyse phylogénétique et caractérisation moléculaire**

Les fichiers ab1 fournis directement par le séquenceur, correspondant aux séquences sens et antisens, ont été traités avec le logiciel SeqScape v2.7 (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). L'analyse des séquences obtenues comporte deux étapes :

- ✓ La correction des séquences exportées, si nécessaire, et la déduction de la séquence finale appelée « séquence consensus » pour chaque échantillon.
- ✓ L'alignement des séquences consensus des différents échantillons avec la séquence de référence.

Les séquences virales ont été alignées grâce au logiciel CLUSTAL W, avec des séquences de génotypes connus issues de la base de données GenBank permettant de déterminer les génotypes et les sous-types des souches du VHC. Celles-ci ont été corrigées et une matrice double entrée a été générée. Les arbres phylogénétiques ont été construits avec la méthode des plus proches voisins à partir de la matrice de calcul des distances après correction des alignements avec l'algorithme à 2 paramètres de Kimura, en utilisant le programme « NJPLOT » et le site web « ITOL ».

2-3- Génotypage par la technique LIPA

Ce test de génotypage est un test de diagnostic *in vitro* permettant d'identifier les génotypes du virus de l'hépatite C de 1 à 6 et les sous-types viraux « a » et « b » du génotype 1. Ce test est basé sur le principe d'hybridation inverse. En effet, le produit de PCR d'ADN biotinylé, généré par l'amplification par RT-PCR des régions 5'NC et core de l'ARN du VHC, est hybridé avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques des différents types et sous-types du VHC, localisées sur des bandelettes de nitrocellulose. L'hybridation est révélée par une méthode colorimétrique enzymatique. Après l'étape d'hybridation, le produit PCR non hybridé est éliminé par lavage de la bandelette et la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline (enzyme) est liée à l'hybride biotinylé. Le substrat formé (hybride) réagit avec le complexe streptavidine-phosphatase alcaline pour former un précipité de couleur violet/marron, qui entraîne la formation d'une série de bandes visibles sur la bandelette.

Les bandelettes de test de génotypage comportent 3 lignes de contrôles et 22 lignes parallèles de sondes d'ADN contenant les séquences spécifiques des génotypes de 1 à 6 du VHC. La ligne de contrôle conjugué (CONJ CTRL) sert de contrôle à la réaction colorée. Le contrôle d'amplification (AMPL CTRL 1) situé à la ligne 2 contient des sondes universelles qui s'hybrident avec les produits PCR de la région 5'NC. Le contrôle d'amplification (AMPL

CTRL 2) situé à la ligne 23 contient des sondes universelles qui s'hybrident avec les produits PCR de la région du core. Les génotypes du VHC sont déterminés par alignement des bandelettes avec la carte de lecture du test et en comparant les séries de bandes obtenues avec les profils de bandes figurant dans le tableau d'interprétation du test de génotypage (**Figure 40**).

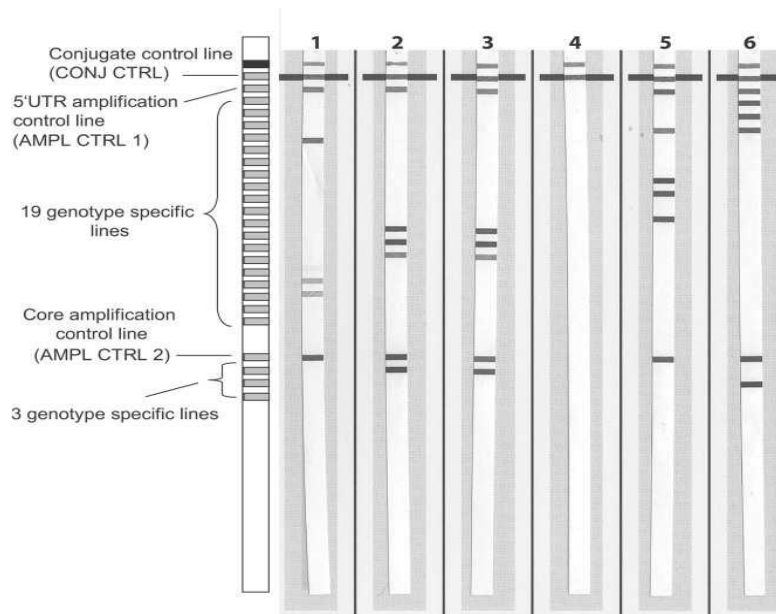


Figure 40: Représentation schématique des bandes du test de génotypage (LIPA) VERSANT HCV version 2.0 (bande 1 : génotype 4 ; bandes 2 et 3 : génotype 3a ; bande 4 : contrôle négatif ; bande 5 : génotype 2b ; bande 6 : génotype 1a). CONJ CTRL : contrôle du conjugué ; AMPL CTRL : contrôle d'amplification.

3- Amplification et séquençage des régions génomiques NS3, NS5B et NS5A

La technique d'extraction utilisée a été décrite plus haut (paragraphe 2-1)

3-1- Amplification de la protéase NS3

3-1-1-Transcription inverse et PCR externe

Il s'agit d'une transcription inverse suivie directement d'une PCR en une seule étape (one-step PCR), réalisée avec le kit SuperScript™ III : « One-Step RT-PCR system with Platinum®Taq High Fidelity DNA Polymerase » (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). 10µl d'ARN extrait sont ajoutés à 15µl du mix RT-PCR composé pour chaque échantillon de 12,5µL de tampon 2X, 0,5µl de l'amorce sens Mars F3 à 10µM, 0,5µl de l'amorce antisens Mars R2 à 10µM (**Tableau 3**), 0,5µl de l'enzyme SuperScriptIII/Platinum et 1µl d'eau stérile.

Les tubes sont mis dans un Primus HT thermocycleur (MWG Biotech AG, Germany) pour réaliser la RT pendant 30 min à 55°C suivie de l'amplification génomique avec une dénaturation à 94°C pendant 2 min suivie de 35 cycles d'amplification comportant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une hybridation à 59°C pendant 1 min et une élongation à 68°C pendant 1 min, puis une élongation supplémentaire à 68°C pendant 5 min pour le dernier cycle. Cette PCR permet l'amplification d'un fragment de 745 pb (**Figure 41**).

3-1-2- PCR interne

La PCR interne a été réalisée avec le kit AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Elle a été conduite dans un volume réactionnel total de 100µl contenant 2µl de produit de la RT-PCR et 98µl de mix PCR. Le mix est constitué de 10µl de tampon 10X, 10µl de MgCl₂ 25mM, 2µl de dNTP 10Mm, 1µl de l'amorce sens NS3G1F-Mu à 20µM, 1µl de l'amorce anti sens Mars R2 à 20µM (**Tableau 3**) (amorce déjà utilisée pour la RT), 0,4µl de l'enzyme AmpliTaq Gold et 73,6 µl d'eau stérile. Les tubes sont ensuite mis dans un Primus HT thermocycleur (MWG Biotech AG, Germany) pour subir 30 cycles d'amplification, précédés par une étape de dénaturation de 12 min à 94°C. Chaque cycle comporte une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une hybridation des amorces à 53°C pendant 1 min et une élongation à 72°C pendant 1 min. Le dernier cycle comporte une étape d'élongation supplémentaire à 72°C pendant 7 min. Cette PCR permet l'amplification d'un fragment de 712 pb (**Figure 41**).

Noms	Sequences 5'-3'	Position (nt)	T _H °C
Mars F3	ACSGCRGCRTGYGGGGACAT	3309-3328	75,6
Mars R2	GTGCTCTTRCCGCTRCCTCT	4035-4054	65,8
NS3G1F-MU	CCYCTCTCYGCYCGWAGGGG	3342-3361	70,6
Demi R2	TCRACRTTRGTRTACATYTG	3636-3655	53,3
Demi F3	CARATGTAYACYAAYGTRGA	3636-3655	54,7

Tableau 3: Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la protéase NS3

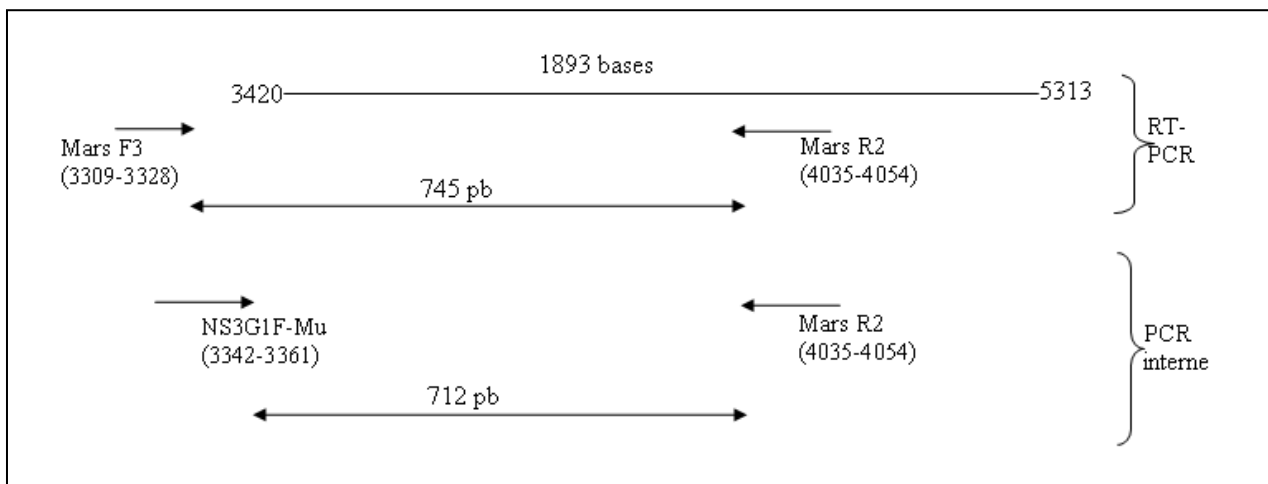


Figure 41: Position des amorces utilisées pour l'amplification de la protéase NS3 du VHC de génotype 1

3-2- Amplification de la polymérase NS5B

3-2-1- Transcription inverse et PCR externe

La stratégie d'amplification est la même que celle décrite pour NS3. 10µl d'extrait d'ARN sont ajoutés à 40µl du mix RT-PCR composé pour chaque échantillon de 25µL de tampon 2X, 1µl de l'amorce sens MD7580G1-S à 10µM, 1µl de l'amorce antisens LP11ab-AS à 10µM (**Tableau 4**), 1µl de l'enzyme SuperScriptIII/Platinum et 12µl d'eau stérile. Les tubes sont placés dans un Primus HT thermocycleur (MWG Biotech AG, Germany) pour réaliser la RT pendant 30 min à 50°C suivie de l'amplification génomique comportant une dénaturation à 94°C pendant 2 min suivie de 50 cycles d'amplification comportant chacun une dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une hybridation à 58°C pendant 30 sec et une élongation à 68°C pendant 2 min, puis une élongation supplémentaire à 68°C pendant 5 min pour le dernier cycle. Cette PCR permet l'amplification d'un fragment de 1792 pb (**Figure 42**).

3-2-2- PCR interne

L'amplification de la polymérase NS5B a été réalisée en effectuant quatre PCR internes. Elle est réalisée dans un volume réactionnel de 50µl contenant 2µl de produit de la RT-PCR et 48µl de mix PCR. Le mix PCR est identique pour les quatre PCR internes, il est constitué de 5µl de tampon 10X, 1µl de dNTP à 10 mM, 1,5µl de MgCl₂, 1µl de l'amorce sens à 10µM, 1µl de l'amorce antisens à 10µM, 0,5µl de l'enzyme AmpliTaq Gold et 38 µl d'eau stérile. Quatre fragments de la polymérase NS5B de taille 309 pb, 742 pb, 427 pb

et 399 pb ont été amplifiés. Le premier fragment a été amplifié avec l'amorce sens MD7918 et l'amorce antisens MD7930G1-AS, le deuxième avec l'amorce sens MD7930G1-S et l'amorce antisens ENO2GI-AS, le troisième avec l'amorce sens NS5B3-S et l'amorce antisens NS5B-2AS et le dernier avec l'amorce sens NS5B1-S et MD9323 (**Tableau 4**) (**Figure 42**). Les tubes sont ensuite placés dans un Primus HT thermocycleur (MWG Biotech AG, Germany) pour 40 cycles d'amplification, précédés par une étape de dénaturation de 2 min à 94°C. Chaque cycle comporte une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une hybridation des amorces à 55°C pendant 30 sec et une élongation à 72°C pendant 1 min 15 sec. Le dernier cycle comporte une étape d'élongation supplémentaire à 72°C pendant 7 min.

Noms	Sequences 5'-3'	Position (nt)	T _H °C
MD7980G1-S	ACGGARGAYGTCGTSTGCTGCTC	7581-7603	66
Lp11ab-AS	CGGTTGGGGAGSAGGTARATGCCTACCCCTRC	9342-9373	74,6
MD7918	GGACAGGCGCCCTGATCACRCCATGCGC	7618-7645	74,6
MD7930G1-AS	CGGACGTCYTTTGCCCCATAGCCAAA	7902-7927	67,2
MD7930G1-S	TTTGGCTATGGGGCAAARGACGTCCG	7902-7927	67,2
ENO2GI-AS	GCDGAGTACCTRGTGCATAGCCTCCGTGAA	8616-8644	69,3
NS5B3-S	GYCTTCACGGAGGCTATGACYAGG	8613-8636	66,1
NS5B2-AS	CCTGGAGAGTAACTRTGGAGTGAAAATGC	9012-9040	66
NS5B1-S	GCCTGYTACTCCATWGARCCACTKG	8949-8973	65,4
MD9323	CCCCTACAGAAAGTAGGAGTAGGCAC	9323-9348	66,4

Tableau 4: Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la polymérase NS5B

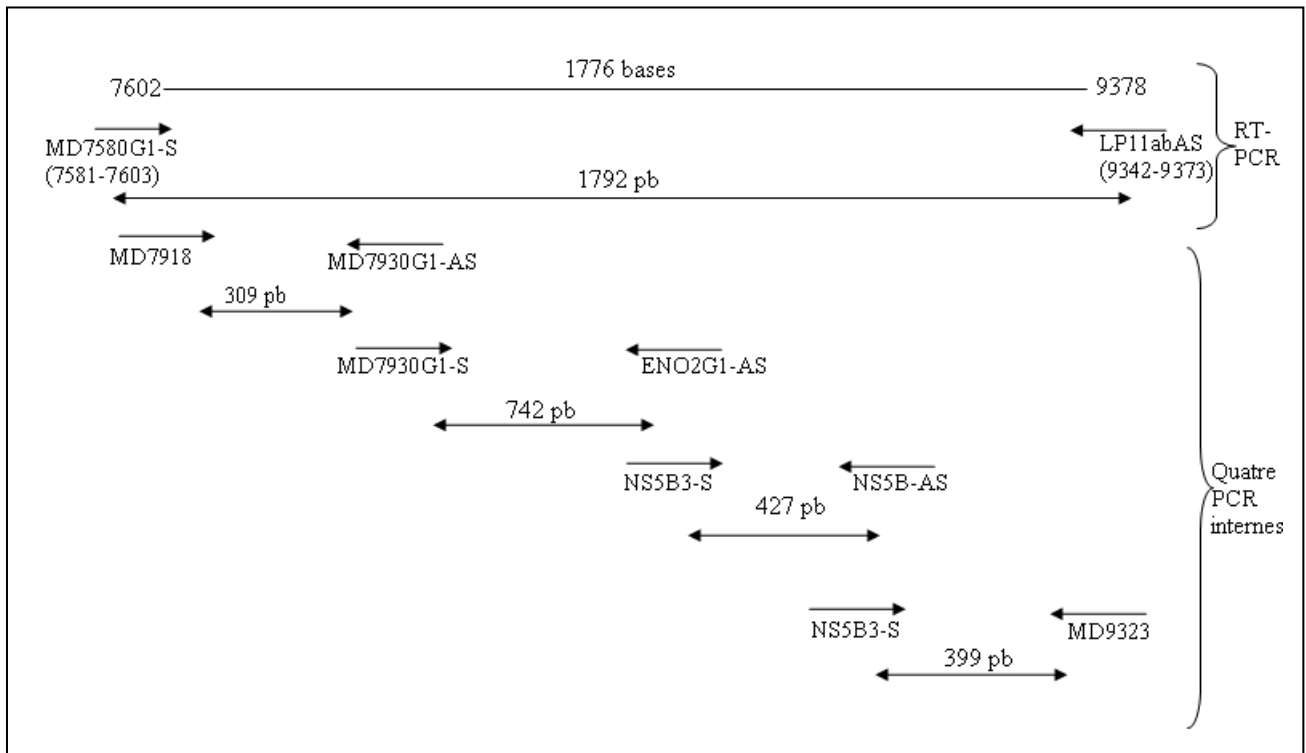


Figure 42: Position des amorces utilisées pour l'amplification de la polymérase NS5B du VHC de génotype 1

3-3 Amplification de la région NS5A

3-3-1- Transcription inverse et PCR externe

Comme précédemment l'amplification a été réalisée en une étape. 5µl d'extrait d'ARN sont ajoutés à 20µl du mix RT-PCR composé pour chaque échantillon de 25µl de tampon 2X, 1µl de l'amorce sens à 10µM, 1µl de l'amorce antisens à 10µM, 1µl de l'enzyme SuperScriptIII/Platinum et 6µl d'eau stérile. Deux couples d'amorces différents ont été utilisés pour chaque sous-type viral (**Tableau 5**). Pour le sous-type 1a, l'ARN du VHC a été amplifié avec l'amorce sens 1a-NS5A-F0 et l'amorce antisens 1a-NS5A-R0. Pour le sous-type 1b, l'ARN du VHC a été amplifié avec l'amorce sens 1b-NS5A-F0 et l'amorce antisens 1b-NS5A-R0. Les tubes sont placés dans un Primus HT thermocycleur (MWG Biotech AG, Germany) pour une RT pendant 30 min à 50°C suivie de l'amplification génomique comportant une dénaturation à 94°C pendant 10 min. suivie de 40 cycles d'amplification comportant chacun une dénaturation à 94°C pendant 15 sec, une hybridation à 60°C pendant 30 sec et une élongation à 68°C pendant 2 min, avec une élongation supplémentaire à 68°C pendant 10 min pour le dernier cycle. Cette PCR permet l'amplification d'un fragment de 1345 pb (**Figure 43**).

3-3-2- PCR interne

L'amplification de la région NS5A du VHC a été réalisée en effectuant deux PCR internes dans un volume réactionnel de 50µl contenant 2µl de produit de la RT-PCR et 48µl de mix PCR. Le mix PCR est identique pour les deux PCR internes, il est constitué de 5µl de tampon 10X, 1µl de dNTP à 10 mM, 1,5µl de MgCl₂, 1µl de l'amorce sens à 10µM, 1µl de l'amorce antisens à 10µM, 0,5µl de l'enzyme AmpliTaq Gold et 38µl d'eau stérile. Deux fragments de la région NS5A de taille 818 pb et 648 pb ont été amplifiés. Pour le sous-type 1a, le premier fragment a été amplifié avec l'amorce sens 1a-NS5A-F1 et l'amorce antisens 1a-NS5A-SeqR, le deuxième avec l'amorce sens 1a-NS5A-SeqF et l'amorce antisens 1a-NS5A-R0, la même amorce que celle utilisée au niveau de la RT-PCR (**Figure 43**). Pour le sous-type 1b, le premier fragment a été amplifié avec l'amorce sens 1b-NS5A-F1 et l'amorce antisens 1b-NS5A-SeqR et le deuxième avec l'amorce sens 1b-NS5A-SeqF et l'amorce antisens 1b-NS5A-R0, la même amorce que celle utilisée au niveau de la RT-PCR (**Tableau 5**) (**Figure 44**). Les tubes sont ensuite placés dans un Primus HT thermocycleur (MWG Biotech AG, Germany) pour 40 cycles d'amplification, précédés par une étape de dénaturation de 10 min à 95°C. Chaque cycle comporte une dénaturation à 95°C pendant 30 sec, une hybridation des amorces à 56°C pendant 30 sec et une élongation à 72°C pendant 2 min, le dernier cycle comportant une étape d'élongation supplémentaire à 72°C pendant 10 min.

Noms	Sequences 5'-3'	Position (nt)	T _H °C
1a-NS5A-F0	GACATCTGGGACTGGATATGYGA	6276-6298	61,5
1a-NS5A-R0	GTCCAGGWRTARGACATYGAGCA	7599-7621	61,5
1a-NS5A-F1	GATATGYGAGGTGYTGAGCGA	6290-6310	59,8
1a-NS5A-SeqR	AAGGAGTCCARRATCACCAC	7089-7108	57,3
1a-NS5A-SeqF	ARCTGTCYGCWCCATCTCTCAAGG	6955-6978	64,4
1b-NS5A-F0	GAYGTTTGGGAYTGGATATGCAC	6276-6298	60,6
1b-NS5A-R0	GTCCAYGWRTARGACATYGAGCA	7599-7621	60,6
1b-NS5A-F1	GATATGYACGGTGYTGAYTGA	6290-6310	56,9
1b-NS5A-SeqR	AARGAGTCCARRATYACYAC	7089-7108	54,2
1b-NS5A-SeqF	ARCTGTCYGCWCCATCTCTCAAGG	6955-6978	63,3

Tableau 5: Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la région NS5A

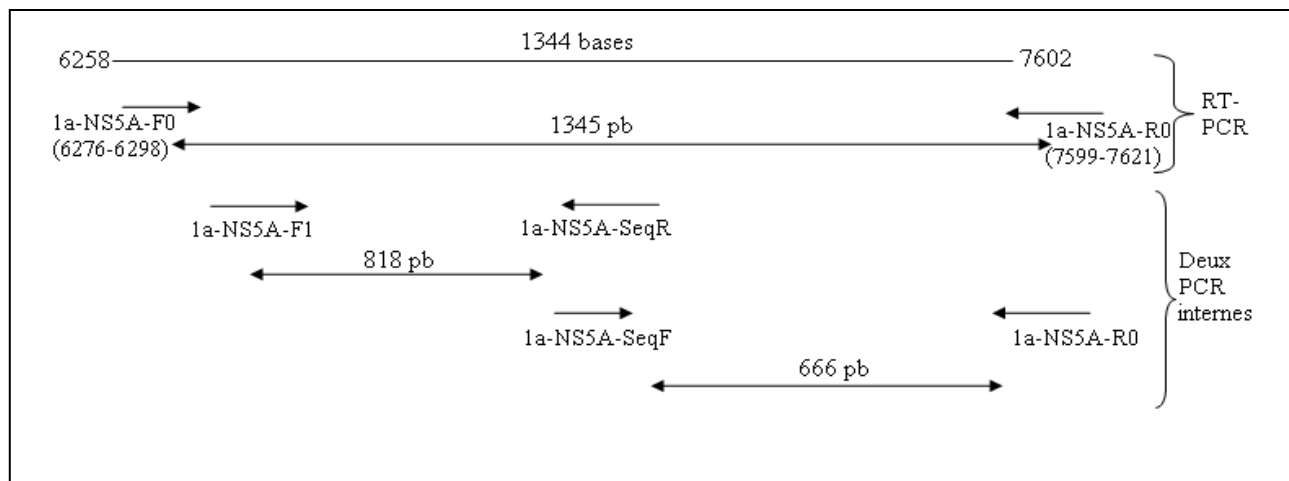


Figure 43: Position des amorces utilisées pour l'amplification de la région NS5A du VHC de génotype 1a

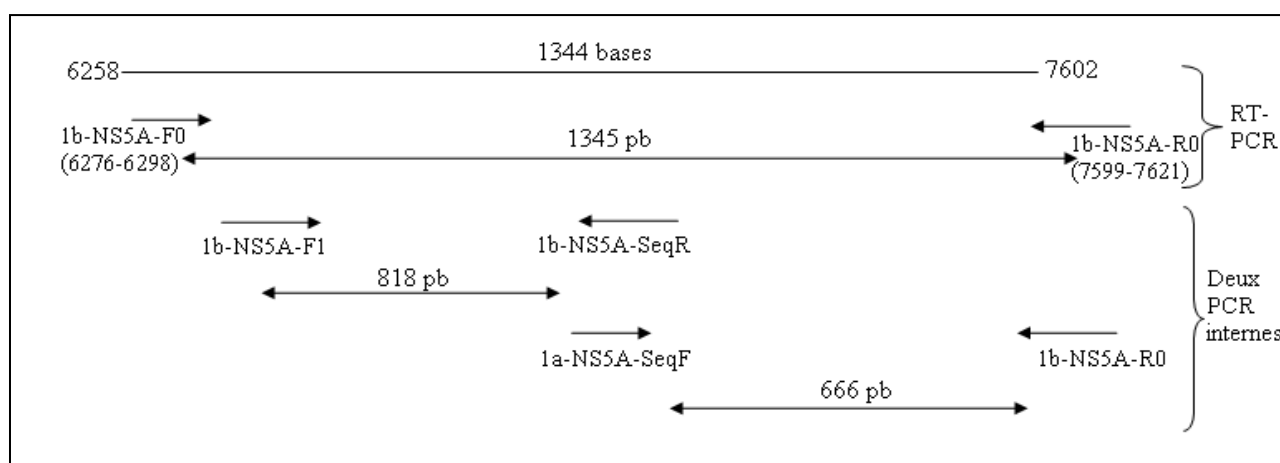


Figure 44: Position des amorces utilisées pour l'amplification de la région NS5A du VHC de génotype 1b

3-4- Séquençage des produits amplifiés

Au niveau de la protéase NS3, quatre amorces ont été utilisées pour le séquençage bidirectionnel : NS3G1F-Mu/demi F3 pour le premier fragment et demi R2/Mars R2 pour le deuxième (**Tableau 3**).

Les mêmes amorces utilisées au niveau de la PCR interne pour l'amplification de la polymérase NS5B ont été utilisées pour le séquençage de cette région (**Tableau 4**).

Concernant la région NS5A, le séquençage a été effectué avec les mêmes amorces que celles utilisées lors de la PCR interne pour l'amplification des deux sous-types viraux 1a et 1b (**Tableau 5**).

La technique de séquençage utilisée est la même que celle décrite dans le chapitre 2-2 « Séquençage partiel de la région NS5B », pages 76-77.

3-5- Analyses phylogénétiques et vérification moléculaire du génotype

Des analyses phylogénétiques ont été conduites sur les séquences NS3 et les séquences de 1792 nucléotides en NS5B afin de déterminer le génotype de nos souches et de comparer les résultats avec le génotypage préalablement déterminé par le test d'hybridation de sonde INNOLiPA ou par séquençage d'un fragment plus petit en NS5B. Les séquences obtenues dans les deux régions NS3 et NS5B ont été alignées et comparées avec des séquences de référence appartenant aux différents génotypes et sous-types du VHC publiées dans GenBank (**Tableau 6**). Ces analyses phylogénétiques ont été réalisées sur un fragment de 722 pb pour la région NS3 et un fragment de 1730 pb pour la région NS5B.

L'alignement des séquences et la réalisation des arbres phylogénétiques sont basés sur le même principe que celui utilisé pour le génotypage des souches VHC en Tunisie. Ces techniques ont été décrites plus haut (Paragraphe « Analyse phylogénétique et caractérisation moléculaire »).

3-6- Alignement des séquences et analyse des sites associés à des mutations de résistance

Quatre séquences ont été obtenues pour les régions NS3 et NS5A, huit pour la région NS5B. Les fichiers ab1 fournis directement par le séquenceur, correspondant aux séquences sens et antisens, ont été traités avec le logiciel SeqScape v 2.7 (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). L'analyse des séquences obtenues comporte deux étapes :

- ✓ Une correction des séquences exportées, si nécessaire, et déduction de la séquence finale appelée « séquence consensus » pour chaque échantillon.
- ✓ Alignement des séquences consensus des différents échantillons avec la séquence de référence et identification des mutations de résistance sur les séquences nucléotidiques et sur les séquences traduites en AA.

L'alignement des séquences de la région NS3 a été effectué avec la séquence de référence AJ238799 de génotype 1b isolé en Allemagne en 2005. Les séquences NS5B ont été alignées avec la séquence de référence AF207764 de génotype 1b isolé au Japon en 2007. Concernant les séquences NS5A l'alignement a été effectué avec la séquence de référence AF009606 pour le sous-type 1a isolé en Amérique en 1997 et la séquence de référence AY045702 pour le sous-type 1b isolé au Japon en 2007.

Génotype	Sous-types	Numéro d'accèsion	Origine	Année d'isolement
1	1a	EF407419	Amérique	2008
1	1a	M62321	Amérique	2007
1	1a	AF511950	Amérique	2002
1	1a	M67463	Amérique	2007
1	1b	AY587016	Chine	2004
1	1b	D11355	Japon	2007
1	1b	AY003965	Angleterre	2001
1	1b	AJ291273	France	2005
1	1b	AY003957	Angleterre	2001
1	1c	D14853	Indonésie	2005
1	1c	AY051292	Inde	2005
1	1d	AF037233	Burkina Faso	2001
1	1d	L38377	-	1995
1	1e	L38361	Cameroun	1995
1	1f	L38371	France	1995
1	-	AJ291257	France	2005
1	1g	AM910652	Espagne	2008
2	2a	AY746460	Japon	2007
2	2a	AB047639	Japon	2005
3	3a	AJ291256	France	2001
3	3a	X76981	Allemagne	2005
4	4a	Y11604	Egypte	2005
4	4a	AF271812	Egypte	2000
5	5a	D50467	Japon	1999
6	6a	AY859526	Hong Kong	2005
6	6a	D87356	Vietnam	1999

Tableau 6: Séquences de référence de GenBank utilisées pour la construction des arbres phylogénétiques

4- Pyroséquençage avec la technique 454

Pour dix patients porteurs de VHC de génotype 1b et présentant en Sanger des mutations de résistance dans la région NS3, nous avons souhaité recueillir des informations au niveau des sous-populations virales en utilisant une technique de next generation sequencing (NGS) : séquençage haut-débit « Ultra-deep pyrosequencing » (UDPS) 454, commercialisé par Roche Diagnostics, dont le seuil de sensibilité retenu est de 0,4% (Trimoulet et al., 2013).

4-1- Principe

La technique de pyroséquençage 454 consiste en une amplification clonale de l'ADN grâce à une PCR en émulsion (emPCR) suivie d'une réaction de pyroséquençage au sein d'un micro-puits d'une plaque Pico Titer Plate (PTP).

L'emPCR se déroule dans une micro-gouttelette qui devient un micro-réacteur au milieu d'une émulsion d'huile (**Figure 45**). Cette micro-gouttelette contient les réactifs nécessaires à la PCR avec un seul brin d'ADN fixé à une bille par un adaptateur. L'adaptateur fixé à la bille est une sonde d'ADN complémentaire de l'extrémité 5' de la molécule d'ADN qui a été préalablement rajoutée par une amorce lors de la PCR. Il existe deux types de billes (A et B) chacune spécifique d'une des deux extrémités de l'amplicon et qui possèdent des adaptateurs différents.

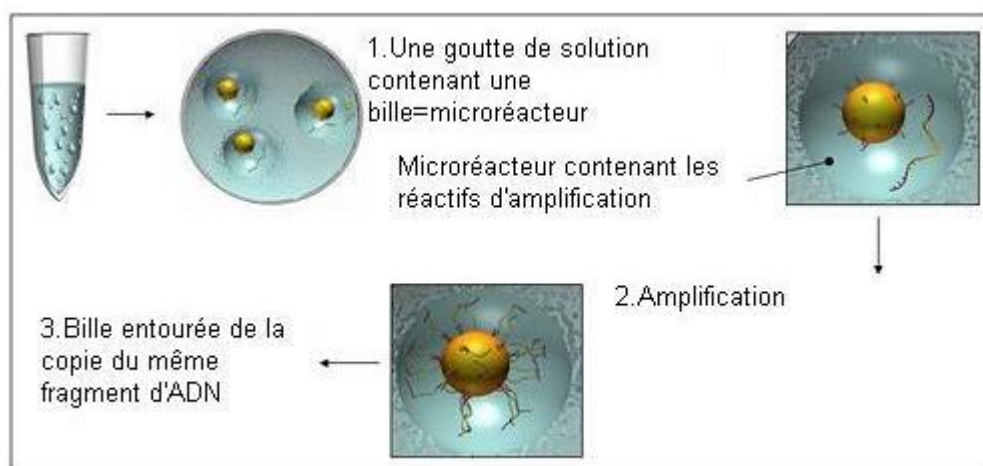


Figure 45: Amplification clonale dans une micro-gouttelette d'émulsion (d'après Roche)

Une fois l'emPCR réalisée, les billes sont transférées dans une plaque PTP contenant 5×10^5 micro-puits dont le diamètre permet d'insérer une seule bille par puits (**Figure 46**). C'est au sein de ce dernier que se déroule la réaction de pyroséquençage. Les nucléotides A,

T, G puis C sont incorporés séquentiellement et de façon cyclique. Après chaque incorporation le surplus de nucléotides est éliminé par une apyrase. Si un nucléotide est incorporé par la polymérase, un pyrophosphate inorganique est libéré et utilisé par une ATPsulfurylase pour générer une molécule d'ATP. La luciférase utilise alors cet ATP et une molécule de luciférine pour produire de l'oxyluciférine et un photon. Ce dernier est détecté par un capteur Charge-Coupled Device (CDD). A la fin de chaque séquence, le CDD produit une image de la plaque correspondant à l'émission d'un photon au niveau de chaque puits où un nucléotide a été incorporé. La succession des cycles d'incorporation de nucléotides aboutit à un pyrogramme.

Le séquenceur GS Junior permet d'obtenir en moyenne 70000 séquences d'une longueur de 400 à 500 bases maximum par série (la longueur analysée a été récemment augmentée à environ 800 bases). Des séquences provenant d'échantillons de différents patients peuvent être produites lors d'une même série. Pour ce faire, chaque échantillon est associé à un Multiplex Identifier (MID), une séquence nucléotidique spécifique ajoutée à l'amorce.

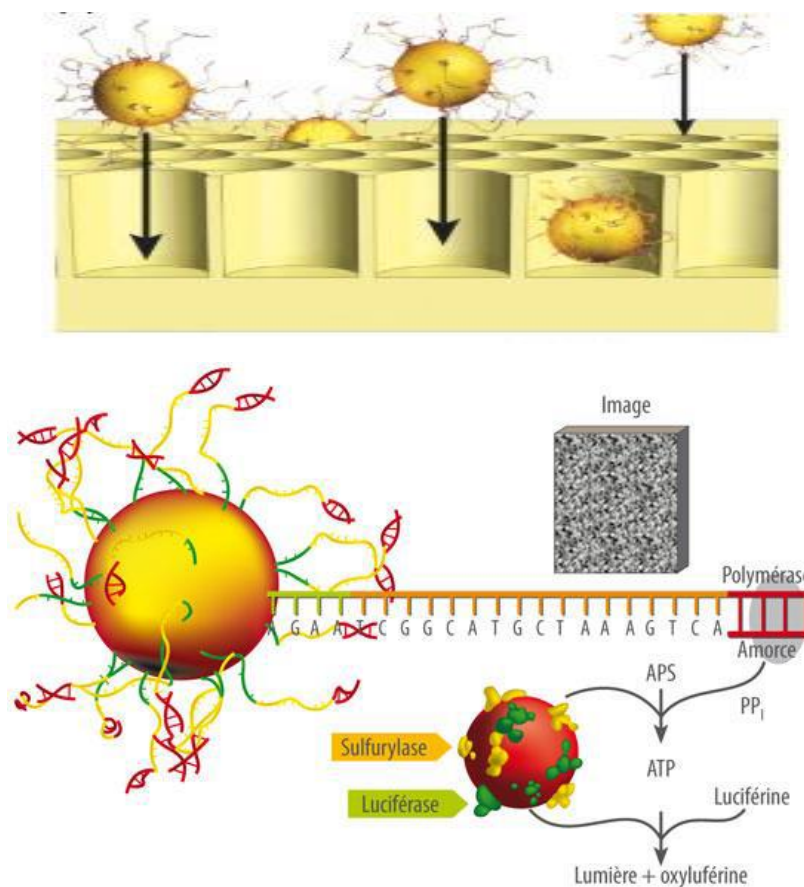


Figure 46: Réaction de pyroséquenceage dans chaque micro-puits de la Pico Titer Plate (d'après Roche)

4-2- Conception des amorces pour la région NS3

La première étape consiste en la synthèse de molécules d'ADN de taille maximale de 500 pb contenant la séquence d'intérêt flanquée à chaque extrémité d'une séquence adaptatrice différente pour les extrémités 5' et 3', d'une séquence TCAG (key pass) et d'un MID. Les amorces sont conçues de la façon suivante :

- Les 21 premiers nucléotides (**en bleu**) sont identiques pour toutes les amorces 5' et 3' et elles permettent l'hybridation sur les sondes des billes A et B, respectivement.
- Les 4 nucléotides suivants TCAG (**en rouge**), appelés KEY, permettent la calibration des fluorescences émises pour l'incorporation de chacun des 4 nucléotides et servent de contrôle qualité lors de l'analyse des séquences
- Les 10 nucléotides suivants (**en orange**) correspondent au MID et permettent d'identifier l'échantillon.
- Tous les nucléotides suivant la 35ème position (**en noir**) sont spécifiques des extrémités de la séquence de VHC.

Les séquences spécifiques de la région NS3 ont été conçues afin d'amplifier par PCR interne deux fragments chevauchants de 384 et 489 pb, respectivement.

Les produits de la PCR interne obtenus avec ces amorces sont appelés amplicons.

Plan de conception des amorces :

- **5'_MID :**

CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG{séquence spécifique de MID}-séquence spécifique de l'extrémité 5' de l'amplicon

- **3'_MID :**

CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG{séquence spécifique de MID}-séquence spécifique de l'extrémité 3' de l'amplicon

Ayant pyroséquéncé 10 échantillons par plaque, nous avons utilisé 10 séquences spécifiques de MID différentes :

MID 1: ACGAGTGCGT

MID 2: ACGCTCGACA

MID 3: AGACGCACTC

MID 4: AGCACTGTAG

MID 5: ATCAGACACG

MID 6: ATATCGCGAG

MID 7: CGTGTCTCTA

MID 8: CTCGCGTGTC

MID 9: TAGTATCAGC

MID 10: TCTCTATGCG

Séquences spécifiques des extrémités 5' et 3' des amorces utilisées pour l'obtention des amplicons:

Amplicon 1: (5' NS3GIF-Mu / 3' demi R) de taille 384 pb.

5' NS3GIF-Mu: CCYGTCTCYG

3' demi R: TCYACRTTRG

Amplicon 2: (5' MarsR2 / 3' demi F) de taille 489 pb.

5' Mars R2: GTGCTCTTRC

3' demi F: CARATGTAYA

4-3- Extraction et amplification par PCR

- L'extraction de l'ARN viral à partir des échantillons a été réalisée par la même technique que celle utilisée dans le cadre du séquençage par la technique Sanger (QIAamp Viral RNA Mini kit de Qiagen), chapitre « Génotypage du VHC », paragraphe 2-1 « Extraction du génome viral », page 74.
- L'amplification a été effectuée en deux étapes : une RT suivie d'une PCR externe en une seule étape puis une PCR interne :
 - La technique de RT-PCR était la même que celle décrite dans le chapitre « Amplification de la protéase NS3 », paragraphe 3-1-1 « Transcription inverse et PCR externe », page 79.
 - PCR interne : les deux amplicons à séquencer ont été obtenus grâce à deux PCR internes réalisées dans un volume réactionnel de 25µl contenant 3µl de produit de RT-PCR et 22µl de mix PCR. Ce mix était constitué de 5µl de tampon 10X, 1µl de dNTP à 10mM, 1,5µl de MgCl₂, 1µl de l'amorce sens à 10µM, 1µl de l'amorce antisens à 10µM, 0,5µl de l'enzyme AmpliTaq Gold et 12µl d'eau stérile. La composition du mix était identique pour les deux PCR internes hormis les amorces spécifiques qui différaient par leurs séquences MID (MID 1 – MID 10) et leurs séquences 5'→3' (la conception de ces amorces a été décrite dans le paragraphe précédent). Le premier amplicon a été obtenu avec le couple d'amorce 5' MID NS3GIF-Mu / 3' MID demi R et le deuxième avec le couple 5' MID Mars R2 / 3' MID demi F. Deux fragments de tailles 384pb et 489pb ont été obtenus pour chaque échantillon. Le programme

d'amplification était le même que celui décrit dans le chapitre « Amplification de la protéase NS3 », paragraphe 3-1-2 « PCR interne », page 80. Après amplification, les produits PCR ont été contrôlés par migration électrophorétique sur un gel d'agarose 1,5%.

4-4- Purification des amplicons avec le protocole Agencourt® Ampure® XP de Beckman Coulter® et constitution de la banque d'ADN

Les amplicons sont purifiés avec le protocole suivant :

- mélanger 20µl de produit des PCR internes par 12 flux et reflux avec 36µl de billes Ampure XP
- incubation de 10 min à température ambiante
- placer les tubes sur un portoir magnétique pendant 5min (les molécules d'ADN sont accrochées aux billes aimantées)
- enlever le surnageant
- ajouter 100µl d'éthanol 70% puis retirer le surnageant sans resuspendre les billes
- répéter l'étape précédente une fois
- faire sécher les billes à température ambiante quelques minutes
- resuspendre les billes dans 20µl de TE par 12 flux et reflux
- replacer les tubes sur un portoir magnétique pendant 5min
- récupérer 15µl de surnageant contenant les amplicons purifiés en évitant de prendre les billes

4-5- Dosage des amplicons avec le kit Quant-iT™ Picogreen dsDNA de Invitrogen®

Une gamme d'ADN standard (quantités suivantes : 20ng, 10ng, 5ng, 2,5ng, 1,25ng, 0,625ng, 0,315ng et 0ng) est utilisée pour quantifier les amplicons par fluorescence. 10µl de la gamme, soit 1µl d'amplicon + 9µl d'eau sont ajoutés à 10µl de picogreen dilué extemporanément au 1/200ème

La fluorescence émise par le picogreen a été mesurée sur LightCycler2.0® Roche® à 530 nm et la concentration en amplicon déterminée après report de la valeur de fluorescence sur une courbe standard.

$$\text{Molécules}/\mu\text{l} = \frac{\text{sample conc} [\text{ng}/\mu\text{l}] \times 6.022 \times 10^{23}}{656.6 \times 10^9 \times \text{amplicon length} [\text{bp}]}$$

Grâce à la règle de calcul ci-dessus et à partir de la quantification, les amplicons sont dilués à 10^9 molécules/ μl . A partir de ces dilutions, $10\mu\text{l}$ de chaque amplicon sont assemblés. Ce mélange est ensuite dilué au 500ème pour obtenir une librairie d'ADN à 2.10^6 molécules/ μl contenant des concentrations équimolaires des amplicons.

4-6- Amplification clonale et séquençage

Les étapes d'emPCR et de pyroséquençage ont été réalisées en utilisant les réactifs des kits GS Junior Titanium Series avec le pyroséquenceur GS Junior 454 de Roche®, en suivant le manuel d'utilisation du fournisseur. L'emPCR a été réalisée à partir de $5\mu\text{l}$ de la banque d'ADN à 2.10^6 molécules/ μl par type de billes A et B.

4-7- Analyses des séquences

Connaissant l'ordre dans lequel les 4 nucléotides sont ajoutés automatiquement, l'analyse des différentes images capturées permet la déduction de la séquence des différents morceaux d'ADN. Les séquences obtenues ont été analysées et filtrées par le logiciel GS Run Browser en mode Signal Processing for Amplicons. Ensuite, elles ont été multiplexées et alignées grâce au logiciel GS Amplicon Variant Analyser. Ce logiciel permet entre autres de quantifier le nombre de séquences porteuses de mutations de résistance.

Résultats

1- Analyse de la population étudiée selon la charge virale, le génotype, l'âge, le sexe et le statut clinique

Nous avons étudié 149 sérums provenant de 149 patients infectés par le VHC de génotype 1. Les caractéristiques de la population sont présentées dans le **Tableau 7**. Deux patients (1,3%) étaient infectés par le génotype 1, 140 (93,4%) par le sous-type 1b et 7 patients (4,7%) par le sous-type 1a, tels que déterminés par le test INNOLiPA ou par séquençage partiel en NS5B. La charge virale moyenne était de 1 955 625 UI/ml pour des charges allant de 9 140 à 16 800 000 UI/ml. On notait une large prédominance du sexe féminin avec 104 femmes, soit 69,8%, pour 45 hommes, soit 30,2%. Notre population d'étude était caractérisée par une équirépartition entre porteurs chroniques non cirrhotiques (51%) et cirrhotiques (49%). Tous les malades étaient naïfs de traitement anti-VHC et aucun d'entre eux n'était infecté par le VHB ou le VIH.

Caractéristiques des patients	N = 149
Age médian ans [18-99]	56
Sexe (H/F) [n(%)]	45/104 (43,2%)
Charge Virale moyenne UI/ml [9 140 - 16 800 000]	1 955 625
Génotype 1* [n (%)]	2 (1,3%)
Génotype 1a [n (%)]	7 (4,7%)
Génotype 1b [n (%)]	140 (93,4%)
Cirrhose [n (%)]	73 (49%)

* Génotype déterminé par INNOLiPA

Tableau 7: Caractéristiques de la population investiguée

2- Etude des séquences NS3 et prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase NS3

Sur les 149 échantillons, une amplification par PCR a été obtenue pour 131 d'entre eux, soit 88%. Sept échantillons (5,4%) étaient de sous-type 1a et 124 (94,6%) de sous-type 1b. Tous les échantillons amplifiés ont pu être séquencés. La **Figure 47** montre un exemple des produits de PCR interne obtenus pour la région étudiée. Le fragment amplifié fait 745 pb.



Figure 47: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (0,1% de bromure d'éthidium) des produits d'amplification par PCR interne de la région NS3 du génome du VHC avec le couple d'amorce MarsF3/MarsR2. M : marqueur de taille ; T⁻ : témoin négatif de la RT-PCR ; T⁻ : témoin négatif de la PCR interne ; T⁺ : témoin positif ; pistes 1 à 6 : échantillons étudiés.

Les séquences ont été comparées à des séquences VHC de génotypes connus, préalablement publiées dans GenBank et un arbre phylogénétique a été construit. L'arbre obtenu indique que 7 souches virales appartiennent au sous-type 1a, soit 5,4% et 124 au sous-type 1b, soit 94,6% (**Figure 48**). Les résultats sont cohérents avec ceux obtenus préalablement par le test d'hybridation de sonde INNOLiPA ou par séquençage d'un fragment plus petit en NS5B quoique 4 souches (548-2005, 2182-2010, 120-2010, 467-2011) se trouvaient dans une branche séparée de l'arbre phylogénétique, assez éloignées des autres souches de génotype 1b ou 1a.

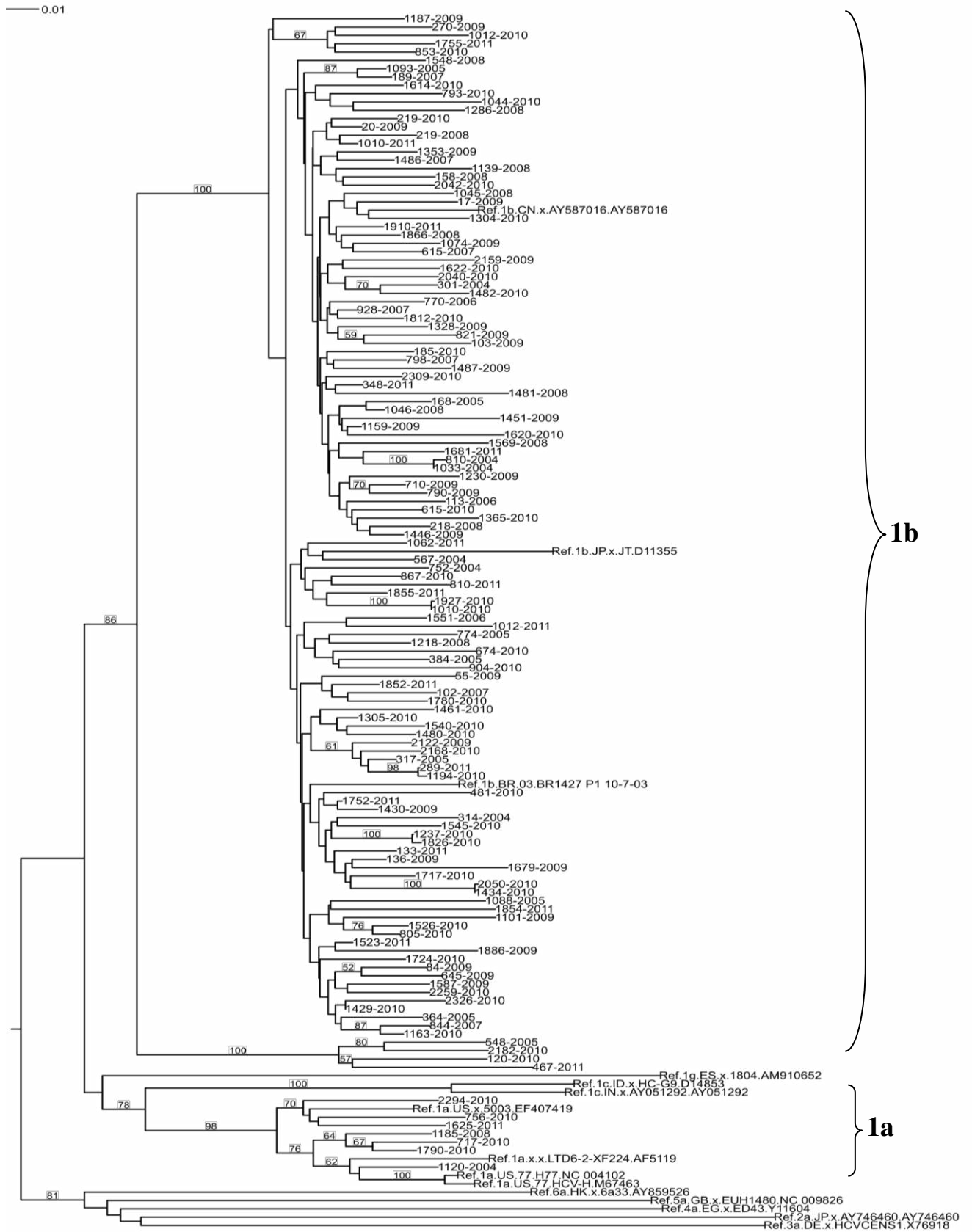


Figure 48: Analyse phylogénétique des séquences de protéase NS3 provenant des patients de l'étude ainsi que des souches de référence issues de la base de données GenBank. L'arbre phylogénétique a été construit avec Njplot. Les valeurs de bootstrap (>50%) sont présentées au niveau des nœuds de l'arbre.

Les séquences consensus des échantillons ont été alignées avec la séquence de référence AJ238799 de génotype 1b et traduites en AA. L'étude des profils mutationnels des séquences NS3 a été réalisée en considérant les positions des mutations en AA décrites comme pouvant entraîner une résistance aux IP (positions 36, 54, 55, 80, 155, 156, 168 et 170). L'alignement des 131 séquences obtenues nous a permis de déterminer la prévalence naturelle des mutations de résistance aux IP dans la population étudiée (**Tableau 8**). La plupart des échantillons (119/131) (90,8%) ont présenté des séquences virales sans aucune substitution liée à la résistance aux IP. Douze séquences (12/131 ; 9,2%) étaient porteuses de mutations connues pour conférer une résistance aux IP (**Figure 49**).

Une seule séquence de génotype 1a a présenté une mutation de résistance (1/7 ; 14,3%) ; il s'agissait de la mutation R155K.

Onze séquences de génotype 1b étaient porteuses de variants associés à la résistance aux IP (11/124 ; 8,8%). Quatre séquences (4/124 ; 3,2%) ont présenté une substitution de la thréonine « T » en sérine « S » à la position 54. Cette mutation T54S est associée à un faible niveau de résistance au TVR et au BOC. Deux séquences (2/124 ; 1,6%) ont présenté la substitution de la valine « V » en alanine « A » à la position 55. Cette mutation est connue pour conférer un faible niveau de résistance au BOC. La mutation Q80K conférant une résistance au SMV et au PTV a été observée chez 4 séquences (4/124 ; 3,2%). La mutation A156V conférant le plus haut niveau de résistance (> à 100 fois) à la plupart des IP a été détectée chez une seule séquence de génotype 1b (1/124 ; 0,8%) (**Figure 49**). Aucune séquence analysée n'a montré de mutation aux positions 36, 168 et 170.

Aucune séquence analysée n'a présenté plus d'une mutation de résistance.

Les AA décrits comme pouvant être impliqués dans des fonctions importantes de la protéase NS3, notamment au niveau de la triade catalytique (H57, D81, et S139) et des résidus de liaison au Zinc (C97, C99, C145 and H149) ont été conservés dans la plupart des séquences à l'exception d'une seule substitution H57Q et deux substitutions C97R/S. Les AA impliqués dans la liaison au substrat (L135, F154, R161 et K165) étaient aussi conservés dans la majorité des séquences à l'exception de deux variations L135M/Q. Ces positions ne sont pas impliquées dans la résistance aux IP.

Positions NS3	Mutations de résistance	Antiviraux à action directe	Mutations de résistance détectées	Prévalence des mutations de résistance détectées (%)	
				Génotype 1a=7	Génotype 1b=124
V36	M, L, A	BOC, TVR			
T54	A, S	BOC, TVR	S		4 (3,2%)
V55	A	BOC	A		2 (1,6%)
Q80	R, K	SMV, PTV	K		4 (3,2%)
R155	K	BOC, TVR, PTV	K	1 (14,3%)	
A156	V	BOC, TVR, SMV, PTV, ITMN-191, BILN-2061, SCH-446211, SCH-900518	V		1 (0,8%)
D168	A/E/H/I/K/Y/V	ITMN-191, SMV, PTV			
V170	A	BOV, TVR, SMV			

Tableau 8: Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase NS3 dans la population étudiée

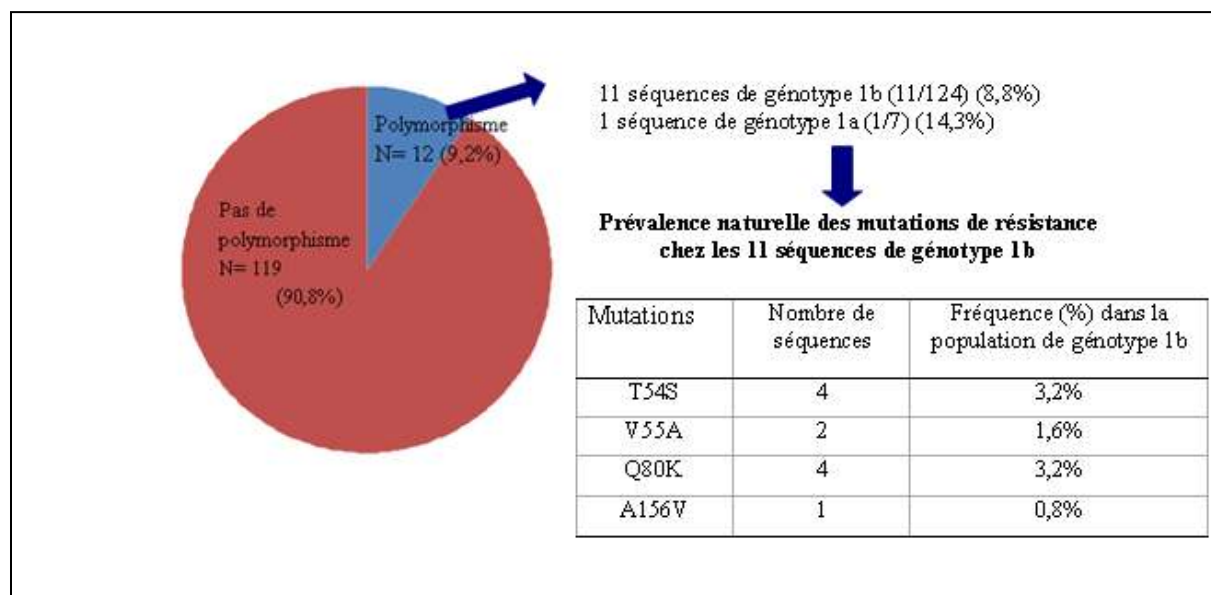


Figure 49: Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase NS3 dans la population étudiée

3- Etude des séquences NS5B et prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs nucleos(t)idiques et non nucleosidiques de la polymérase NS5B

Une amplification par PCR des 4 fragments de la région NS5B a été obtenue pour 95/149 échantillons, soit 64% d'entre eux. Six échantillons (6,3%) étaient de sous-type 1a, 87 (91,6%) de sous-type 1b et 2 (2,1%) de sous-type 1d. Tous les échantillons amplifiés ont pu être séquencés. La **Figure 50** montre un exemple des produits de PCR interne pour la région étudiée. Les 4 fragments amplifiés font 309, 742, 427 et 399 pb, respectivement.

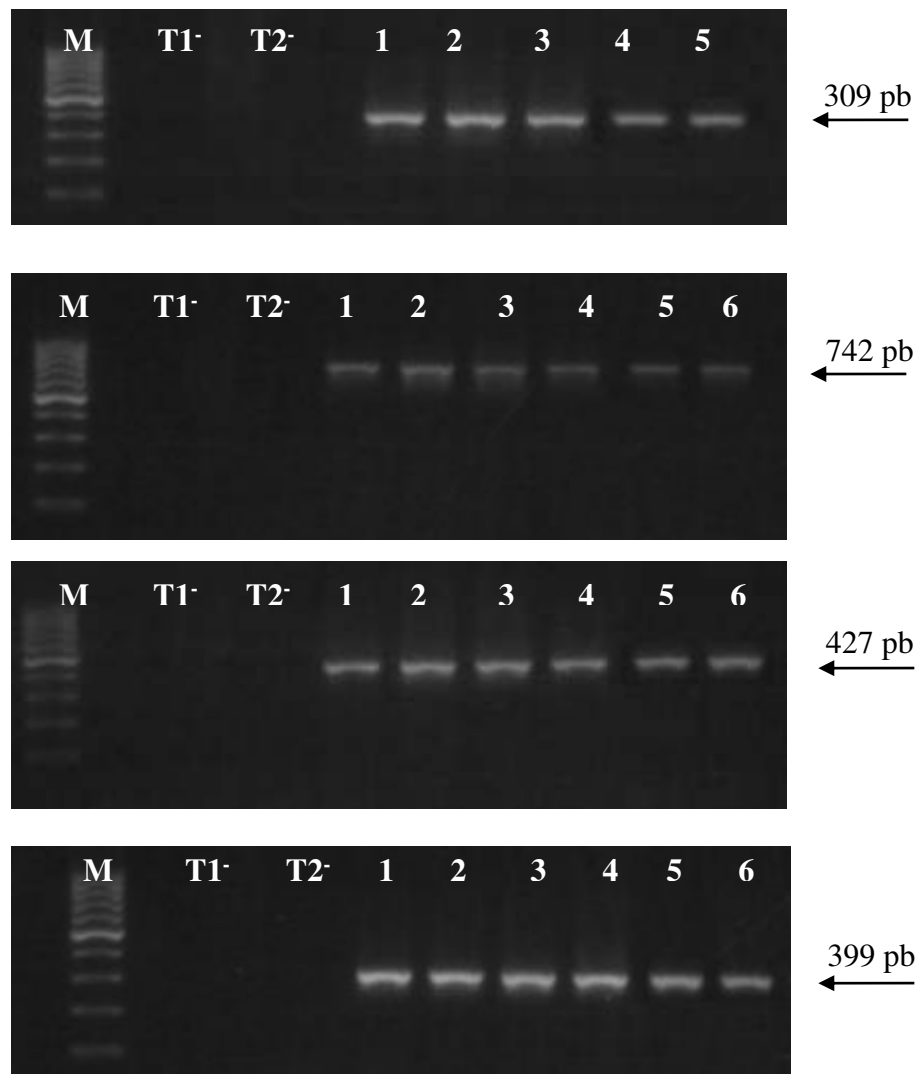


Figure 50: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (0,1% de bromure d'éthidium) des produits d'amplification par PCR interne de la région NS5B du génome du VHC obtenus avec les quatre couples d'amorces. M : marqueur du taille ; T1 : témoin négatif de la RT-PCR ; T2 : témoin négatif de la PCR interne; pistes 1 à 6 : échantillons étudiés.

Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences VHC de génotypes connus, préalablement publiées dans GenBank et un arbre phylogénétique a été construit. L'arbre obtenu indique que 87 souches appartiennent au sous-type 1b (91,6%), 6 au sous-type 1a (6,3%) et 2 (2,1%) au sous-type 1d (**Figure 51**). Les résultats étaient cohérents avec ceux obtenus préalablement par le test d'hybridation de sonde INNOLiPA ou par séquençage d'un fragment plus petit en NS5B sauf pour les deux échantillons appartenant au sous-type 1d qui avaient été identifiés comme génotype 1 par INNOLiPA.

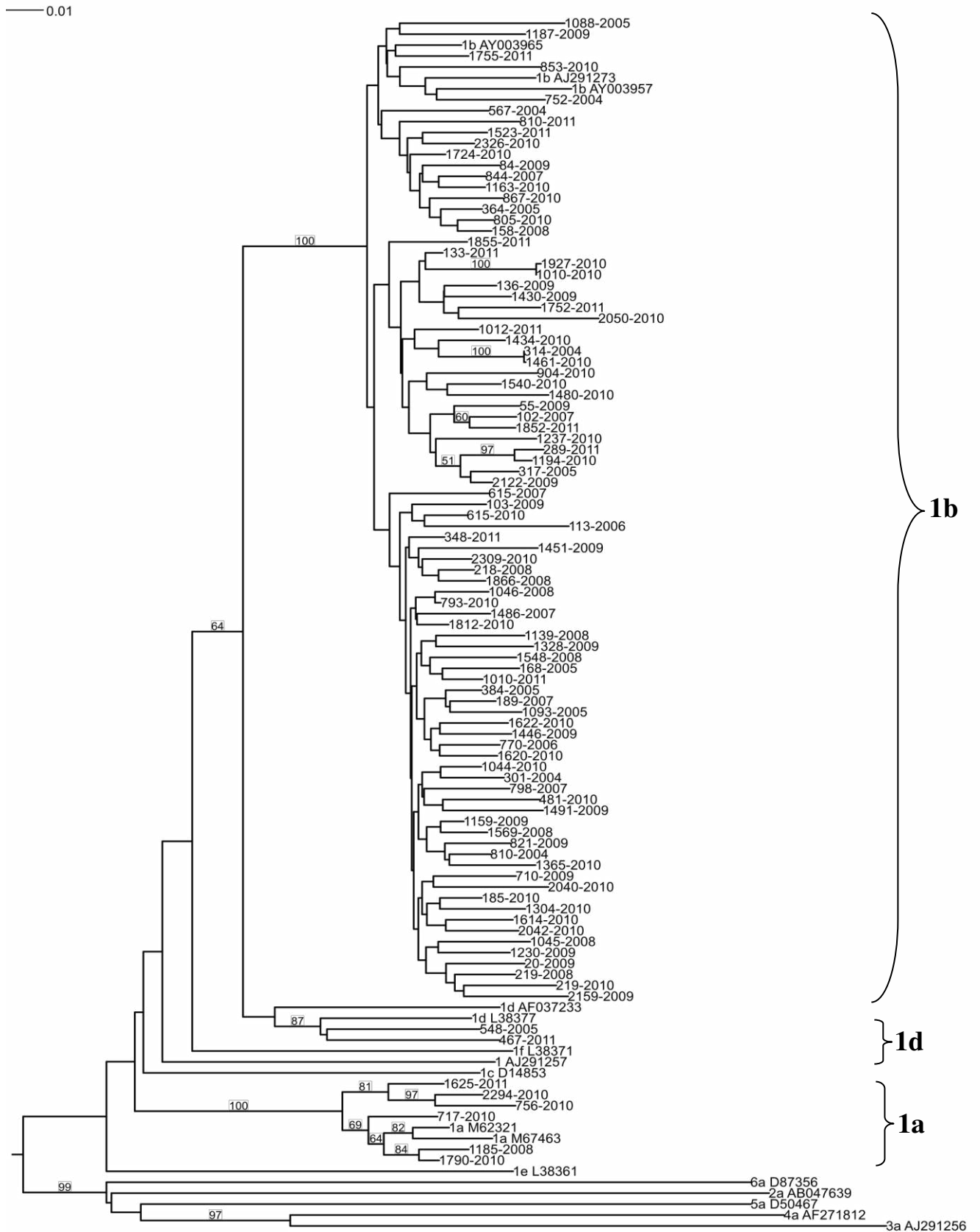


Figure 51: Analyse phylogénétique des séquences de la polymérase NS5B provenant des patients de l'étude ainsi que des souches de référence issues de la base de données GenBank. L'arbre phylogénétique a été construit avec Njplot. Les valeurs de bootstrap (>50%) sont présentées au niveau des nœuds de l'arbre.

Les séquences consensus ont été alignées avec la séquence de référence AF207764 de génotype 1b et traduites en AA. L'étude des profils mutationnels des séquences NS5B a été réalisée en considérant les positions des mutations en AA décrites comme pouvant entraîner une résistance aux inhibiteurs de la polymérase NS5B (aux positions présentées dans le **Tableau 9**). L'alignement des 95 séquences obtenues nous a permis de déterminer la prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs NS5B dans notre population. Parmi les 95 séquences analysées, 34 (35,8%) montraient des mutations connues pour diminuer la sensibilité aux IN et INN et concernaient 6 séquences de génotype 1a (6/6 ; 100%), 26 séquences de génotype 1b (26/87 ; 29,9%) et 2 séquences de génotype 1d (2/2 ; 100%) (**Tableau 9 et Figure 52**).

Positions NS5B	Mutations de résistance	Antiviraux à action directe	Mutations de résistance détectées	Prévalence des mutations de résistance détectées (%)		
				1a N=6	1b N=87	1d N=2
Inhibiteurs nucléos(t)idique (IN)						
L159	F	SOF				
S282	T	PSI-6130				
V321	I/A	PSI-352938 / SOF	I		1 (1,1%)	
Inhibiteurs non nucleosidiques (INN)						
C316	Y, N, F	HCV-796 / DSV/SOF	N		2 (2,3%)	
S365	T, S, A, L	HCV-796				
S368	A	A-837093				
M414	L, Q, T	A-782759 / DSV	L		1 (1,1%)	
A421	V	BMS-791325	V		8 (9,2%)	
M423	T, V, I, A	AG-021541	A		1 (1,1%)	2 (100%)
I424	V	BILB-1941	T V		5 (5,7%)	
M426	T	AG-021541				
C445	F	Tegobuvir GS-9190	F		1 (1,1%)	
Y448	H	A-782759 / DSV A-837093				
I482	S, T	AG-021541	T		2 (2,3%)	
V494	I, A	BILB-1941	A		1 (1,1%)	
P495	S, L, A, T	JTK-109				
P496	S, A	BILB-1941, JTK-109	A		1 (1,1%)	
V499	A	JTK-109	A	6 (100%)	9 (10,3%)	
A533	T	DSV				
G554	D/S	A-837093 / DSV				
Y555	C	A-837093				
S556	G	A-782759 / DSV	G		5 (5,7%)	
D559	G	A-837093/DSV				
Y561	H	DSV				
Combinaisons entre les mutations de résistance aux inhibiteurs de polymérase					(10/87 ; 11,5%)	
A421V + I424V					3 (3,4%)	
V499A + S556G					2 (2,3%)	
A421V + M423A					1 (1,1%)	
V494A + P496A					1 (1,1%)	
V321I + A421V					1 (1,1%)	
C316N + V499A					1 (1,1%)	
C316N + I424V + C445F					1 (1,1%)	

Tableau 9: Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs de polymérase NS5B dans la population étudiée

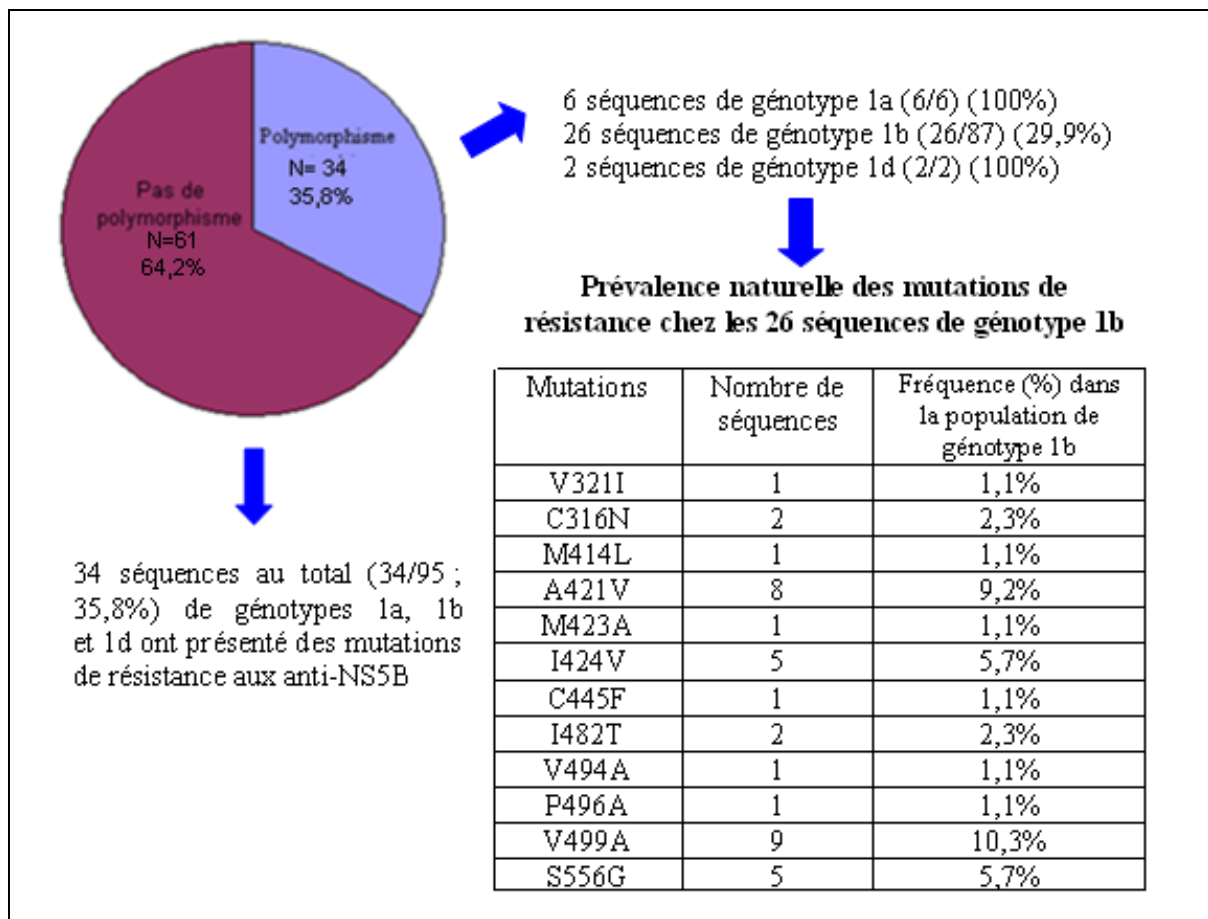


Figure 52: Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs de polymérase dans la population étudiée

En ce qui concerne la résistance aux IN de la polymérase NS5B, la mutation S282T conférant une diminution de sensibilité au SOF n'a pas été mise en évidence. De même les deux mutations L159F et V321A, identifiées comme des variants d'échappement au traitement par SOF, n'ont pas été retrouvées. Une seule séquence de génotype 1b (1/87 ; 1,1%) a présenté la mutation V321I qui entraîne un faible niveau de résistance.

Les six séquences de génotype 1a étudiées ont présenté la mutation V499A connue pour conférer une diminution de sensibilité aux INN.

Concernant le génotype 1b, deux souches (2/87 ; 2,3%) ont présenté la mutation C316N et une souche (1/87 ; 1,1%) la mutation M414L. Ces deux mutations sont connues pour conférer une résistance au DSV. La mutation A421V, responsable d'une diminution de sensibilité à l'analogue BMS-791225, a été retrouvée chez huit séquences (9,2%). La substitution M423A a été observée dans une séquence (1,1%). Cinq séquences (5/87 ; 5,7%) ont présenté la mutation I424V. La substitution de la cystéine « C » en phénylalanine « F » en position 445 a été décrite dans une seule séquence (1/87 ; 1,1%). Cette mutation est connue pour conférer

une résistance au tegobuvir GS-9190. La substitution I482T a été retrouvée dans deux séquences (2/87 ; 2,3%) et les substitutions V494A et P496A ont été observées chacune dans une seule séquence (1/87 ; 1,1%). Le changement de la valine « V » en alanine « A » en position 499 a été la mutation la plus fréquemment identifiée dans neuf souches sur 87 (10,3%). La mutation S556G, conférant une résistance au DSV, a été identifiée dans cinq échantillons (5/87 ; 5,7%) (**Tableau 9** et **Figure 52**).

Les deux souches de génotype 1d étudiées ont présenté la mutation M423T.

L'association de plusieurs variants viraux porteurs de mutations de résistance vis-à-vis des IN et INN n'a jamais été observée chez les sous-types 1a et 1d, cependant elle a été retrouvée dans neuf souches de génotype 1b (10/87 ; 11,5%). Trois (3/87 ; 3,4%) ont présenté la combinaison A421V + I424V, deux (2/87 ; 2,3%) l'association V499A + S556G. Les associations C316N + V499A, V321I + A421V, A421V + M423A et V494A + P496A ont été observées chacune dans un seul cas (1/87 ; 1,1%). Une seule souche (1/87 ; 1,1%) a présenté un mélange des trois substitutions C316N + T424V + C445F (**Tableau 9**).

4- Etude des séquences NS5A et prévalence des mutations de résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A

Une amplification par PCR a été obtenue pour 112/149 échantillons, soit 75,1%. 7 échantillons (6,2%) étaient de sous-type 1a et 105 (93,8%) de sous-type 1b. Tous les échantillons amplifiés ont pu être séquencés. Les figures ci-dessous montrent un exemple des produits de PCR interne obtenus pour la région étudiée chez les sous-types 1a (**Figure 53**) et 1b (**Figure 54**). Les fragments amplifiés font 818 et 666 pb, respectivement.

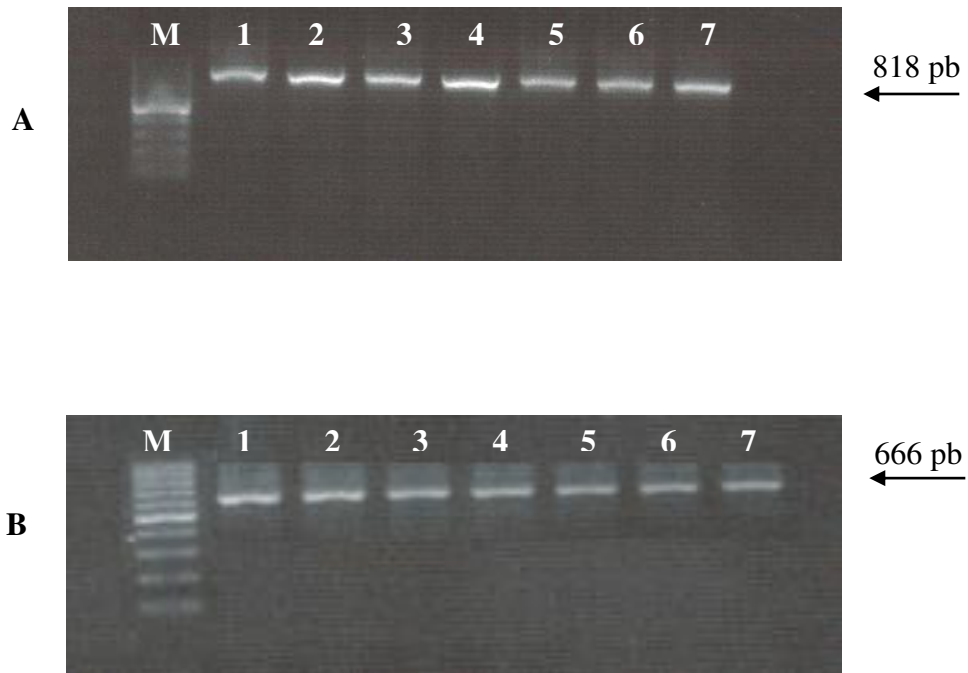


Figure 53: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (0,1% de bromure d'éthidium) des produits d'amplification par PCR interne de la région NS5A du génome du VHC de sous-type 1a avec les deux couples d'amorces (1a-NS5A-F1/1a-NS5A-SeqR et 1a-NS5A-SeqF/1a-NS5A-R0). M : marqueur du taille; pistes 1 à 7 : échantillons étudiés. (A) : avec le couple d'amorces 1a-NS5A-F1/1a-NS5A-SeqR; (B) : avec le couple d'amorces 1a-NS5A-SeqF/1a-NS5A-R0).

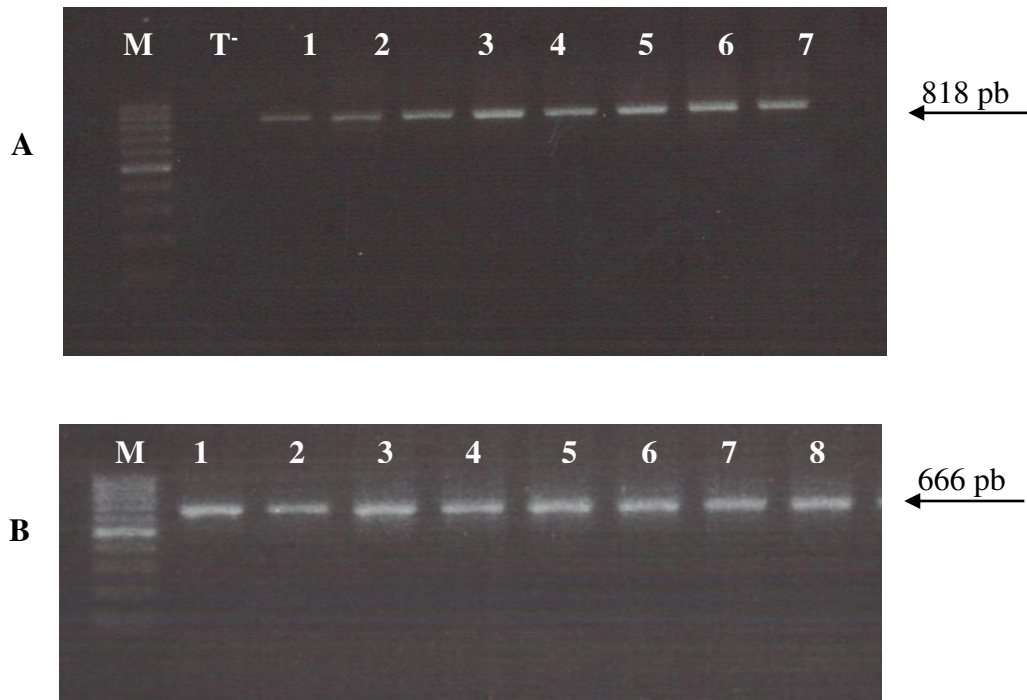


Figure 54: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (0,1% de bromure d'éthidium) des produits d'amplification par PCR interne de la région NS5A du génome du VHC de sous-type 1b avec les deux couples d'amorces (1b-NS5A-F1/1b-NS5A-SeqR et 1b-NS5A-SeqF/1b-NS5A-R0). M : marqueur du taille; pistes 1 à 8 : échantillons étudiés. (A) : avec le couple d'amorces 1b-NS5A-F1/1b-NS5A-SeqR ; (B) : avec le couple d'amorces 1b-NS5A-SeqF/1b-NS5A-R0.

Les séquences consensus de sous-type 1a issues des échantillons analysés ont été alignées avec la séquence de référence AF00969606 de sous-type 1a et les séquences de sous-type 1b avec la séquence de référence AY045702 de sous-type 1b ; elles ont été par la suite traduites en AA. L'étude des profils mutationnels des séquences NS5A a été réalisée en considérant les positions des mutations en AA décrites comme pouvant entraîner une résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A (positions 28, 30, 31, 32, 58 et 93). L'alignement des 112 séquences obtenues nous a permis de déterminer la prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs NS5A. Dix-huit séquences (18/112 ; 16,1%) étaient porteuses de mutations connues pour conférer une résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A (**Tableau 10** et **Figure 55**).

Seule la mutation M28V connue pour conférer un faible niveau de résistance au DCV et un niveau élevé de résistance à l'OBV a été détectée chez une séquence de génotype 1a (1/7 ; 14,3%).

En ce qui concerne le sous-type 1b, les mutations de résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A ont été retrouvées dans 17 séquences (17/105 ; 16,2%). Trois séquences

(3/105 ; 2,8%) ont présenté la mutation L31M et six séquences (6/105 ; 5,7%) la mutation Y93H. Ces deux mutations sont considérées comme des mutations majeures de résistance. Six séquences (6/105 ; 5,7%) ont présenté la mutation R30Q et quatre séquences la mutation P58S (4/105 ; 3,8%). Ces deux mutations ont été décrites comme étant des mutations secondaires augmentant la résistance des mutations majeures mais ne conférant pas une résistance par elles-mêmes (**Figure 55**).

Aucune souche parmi celles analysées n'a présenté la mutation P32L conférant un haut niveau de résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A.

L'association de plusieurs variants viraux porteurs de mutations de résistance n'a jamais été observée chez les sous-types 1a. Une association entre les variants R30Q + Y93H a été trouvée chez deux patients de sous-type 1b (2/105 ; 1,9%).

Residues NS5A		Mutations de résistance		Prévalence des mutations de résistance détectées (%)		Antiviraux à action directe
Génotypes		Génotypes		Génotypes		
1a	1b	1a	1b	1a	1b	
	L23		F			DCV
M28	L28	T/V	M/V	V (1/7; 14,3%)		DCV/OBV
Q30	R30	H/E/R/K	Q		Q (6/105; 5,7%)	DCV/OBV
L31	L31	M/V	F/M/V		M (3/105; 2,8%)	DCV/LDV/OBV
P32	P32	L	L			DCV
	P58		S		S (4/105; 3,8%)	DCV
Y93	Y93	C/H/N	C/H/N		H (6/105; 5,7%)	DCV/LDV/OBV

Tableau 10: Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs NS5A dans la population étudiée

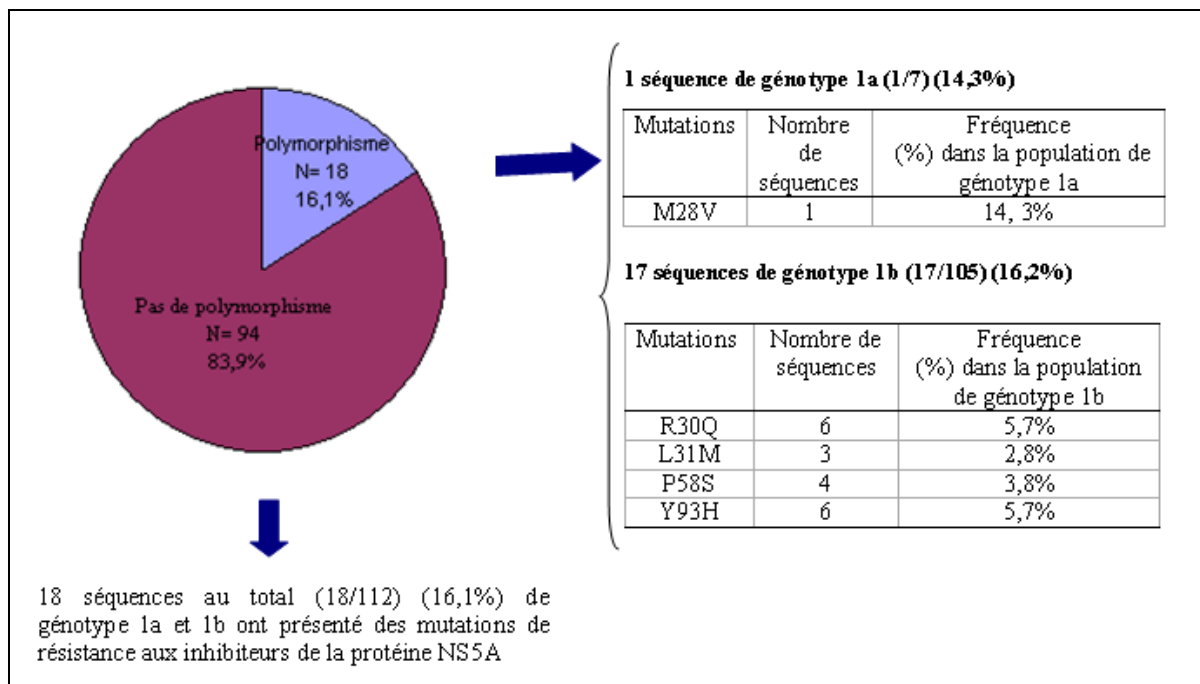


Figure 55: Prévalence naturelle des mutations de résistance aux inhibiteurs NS5A dans la population étudiée

5- Prévalence des combinaisons de mutations associées à la résistance aux IP, aux IN et INN de la polymérase NS5B et aux inhibiteurs de la protéine NS5A

Une amplification par PCR des trois régions NS3, NS5B et NS5A a été obtenue pour 94/149 échantillons, soit 63%. Seize échantillons (16/94 ; 17%) ont montré un mélange de variants associés à la résistance aux IP, IN et INN de la polymérase ou aux inhibiteurs de la protéine NS5A. Aucune souche n'a présenté de variants associés à la résistance vis-à-vis des trois classes d'AAD (**Tableau 11**).

Une association entre plusieurs variants de résistance aux IP et INN a été retrouvée chez cinq patients (5/94 ; 5,3%). Les mutations R155K + V499A ont été observées chez un seul patient porteur d'un VHC de génotype 1a (1/94 ; 1,1%). En ce qui concerne le génotype 1b, une souche (1/94 ; 1,1%) a présenté la combinaison V55A + M414L. Deux souches (2/94 ; 2,1%) ont présenté l'association Q80K + M423T. La combinaison entre les trois mutations de résistance T54S, V494A et P496A a été mise en évidence chez un seul patient (1,1%).

Deux souches (2/94 ; 2,1%) ont présenté une combinaison des mutations de résistance aux IP et aux inhibiteurs de la protéine NS5A. L'association T54S + R30Q a été observée chez un patient et l'association Q80K + L31M chez un autre.

Trois souches (3/94 ; 3,2%) ont présenté une association de variants résistants aux INN et aux inhibiteurs de la protéine NS5A. Dans 2 cas (2/94 ; 2,1%), la combinaison des mutations V499A + L31M a été observée. Une seule souche (1/94 ; 1,1%) a présenté un mélange de trois substitutions : A421V + R30Q + Y93H. Les mutations aux positions 30 et 93 sont connues pour conférer un haut niveau de résistance à l'OBV lorsqu'elles sont portées par le même génome.

Combinaison de mutations de résistance aux IP, IN et INN et aux inhibiteurs de la protéine NS5A	16/94 ; 17%
Mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase et de polymérase	5/94 ; 5,3%
R155K + V499A	1/94; 1,1%
V55A + M414L	1/94; 1,1%
Q80K + M423T	2/94; 2,1%
T54S + V494A + P496A	1/94; 1,1%
Mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase et inhibiteurs de la protéine NS5A	2/94 ; 2,1%
T54S + R30Q	1/94; 1,1%
Q80K + L31M	1/94; 1,1%
Mutations de résistance aux inhibiteurs de polymérase et inhibiteurs de la protéine NS5A	3/94 ; 3,2%
V499A + L31M	2/94; 2,1%
A421V + R30Q + Y93H	1/94; 1,1%

Tableau 11: Combinaison de mutations associées à la résistance aux IP, aux IN et INN de la polymérase NS5B et aux inhibiteurs de la protéine NS5A dans la population étudiée

6- Résultats et interprétation des données du pyroséquencage

Nous avons appliqué cette technique à 10 souches de sous-type 1b présentant des mutations de résistance aux IP détectées par la méthode de séquençage Sanger, afin de comparer les deux techniques pour la détection des sous-populations virales et en particulier de pouvoir identifier des variants minoritaires résistants qui pourraient augmenter les risques d'échec thérapeutique. L'amplification de la protéase NS3 avec les amorces spécifiques en vue du séquençage clonal par pyroséquencage a été possible avec les 10 souches testées. La **Figure 56** montre les deux amplicons de 384 et 489 pb obtenus avec les amorces G1FMu-

Mid/demiR-Mid et MarsR2-Mid/demiF-Mid. Une seule série de pyroséquençage a été réalisée avec les 10 échantillons.

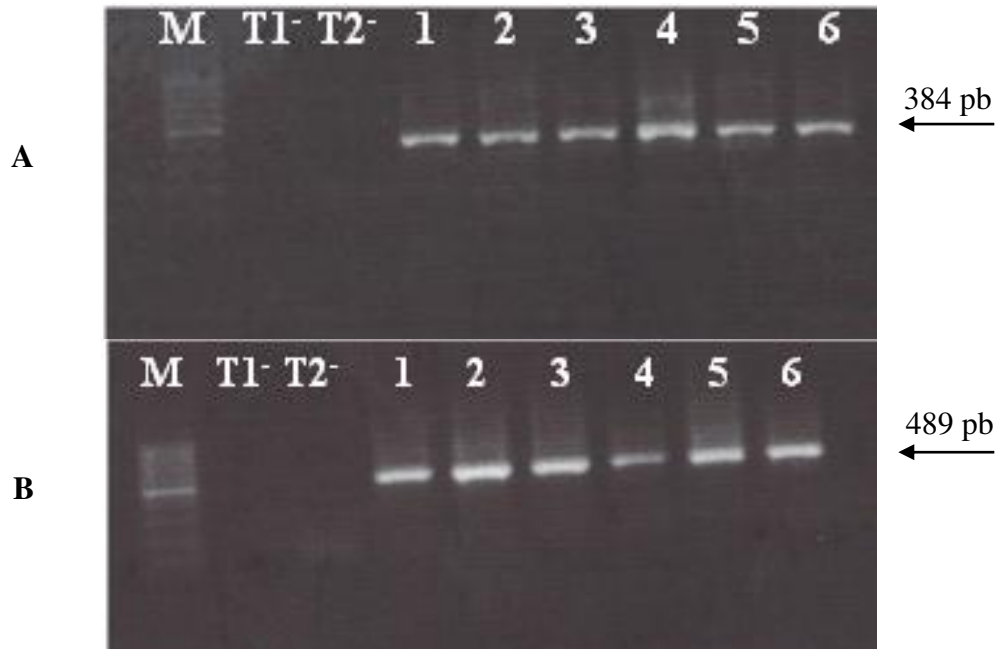


Figure 56: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (0,1% de bromure d'éthidium) des produits d'amplification par PCR interne de la région NS3 du génome du VHC de sous-type 1b avec les deux couples d'amorces (G1FMu-Mid/demiR-Mid) et (MarsR2-Mid/demiF-Mid). M : marqueur du taille; T1 : témoin négatif de la RT-PCR ; T2 : témoin négatif de la PCR interne ; pistes 1 à 6 : échantillons étudiés. (A) : amplicons obtenus avec le couple d'amorces (G1FMu-Mid/demiR-Mid); (B) : amplicons obtenus avec le couple d'amorces (MarsR2-Mid/demiF-Mid)

Le **Tableau 12** compare les résultats du séquençage par technique Sanger aux résultats obtenus par pyroséquençage sur les 10 échantillons testés. Nous avons considéré les mutations de résistance aux IP seulement si elles existaient sur les deux brins sens et anti-sens. Le nombre de séquences obtenues par échantillon (profondeur d'analyse) variait de 637 à 4789.

Les mutations détectées par séquençage Sanger sur 9 échantillons (T54S, V55A et Q80K) ont été retrouvées dans tous les cas par pyroséquençage avec des fréquences allant de 20,78% à 97,16%. Seule la mutation A156V identifiée par technique Sanger sur un échantillon n'a pas été mise en évidence par pyroséquençage. Le pyroséquençage a permis de mettre en évidence de nouvelles substitutions dans trois cas. Une souche a présenté les substitutions V36M, Q80K et R155K avec des fréquences comprises entre 0,63% et 22,76%, une souche a présenté la mutation Q80R avec une faible fréquence (0,87%), et enfin,

concernant la souche porteuse de la mutation A156V en Sanger, elle a présenté la mutation Q80K à un pourcentage faible (0,64%). Globalement, la mutation Q80K a été la mutation la plus fréquemment retrouvée en UDPS. Un seul échantillon a présenté une association de 4 mutations de résistance: V36M ; T54S, Q80K et R155K avec des fréquences de 0,63%, 20,78%, 2,59% et 22,76%, respectivement. Les mutations V36M, T54S et Q80K ont été détectées sur la même séquence correspondant à un amplicon.

Patients	Variants détectés par technique Sanger	Variants détectés par UDPS	Pourcentage des variants détectés par UDPS sur les deux brins (sens et anti-sens)	Nombre de lecture sur les deux brins (sens et anti-sens)
BM-0548-2005	Q80K	Q80K	96,23%	637
BM-0020-2009	T54S	T54S	37,55%	1899
BM-0710-2009	T54S	T54S	92,71%	2757
BM-0821-2009	V55A	V55A	97,14%	1155
BM-1491-2009	T54S	T54S	20,78%	1237
		Q80K	2,59%	1237
		R155K	22,76%	1237
		V36M	0,63%	1237
BM-0120-2010	Q80K	Q80K	97,16%	915
BM-2182-2010	Q80K	Q80K	86,54%	877
BM-0467-2011	Q80K	Q80K	85,83%	903
		Q80R	0,87%	903
BM-1012-2011	V55A	V55A	86,41%	4789
BM-0853-2010	A156V	Q80K	0,64%	1402

Tableau 12: Comparaison entre les résultats du séquençage par technique Sanger et le pyroséquençage chez les dix patients de génotype 1b

Discussion et conclusion

Dans ce travail, nous avons étudié la variabilité génétique de souches de VHC de génotype 1 issues de 149 patients tunisiens présentant une hépatite C, avec ou sans cirrhose, avec des niveaux de répllication virale variables et en dehors de tout traitement anti-VHC, dans les régions NS3, NS5B et NS5A en focalisant sur les positions pouvant héberger des mutations de résistance aux AAD. Actuellement, les AAD ne sont pas encore disponibles en Tunisie, mais la caractérisation de mutations de résistance préexistantes à l'introduction de nouveaux traitements reste indispensable pour l'optimisation de leur utilisation à venir et pour la définition éventuelle de nouvelles stratégies (Paolucci et al., 2013). Il s'agit ici d'une étude préliminaire à l'arrivée des IP, IN et INN ainsi que des inhibiteurs de la protéine NS5A en Tunisie, déterminant la prévalence naturelle des variants associés à la résistance à ces molécules au sein des souches circulantes chez des patients naïfs d'AAD.

Des études ont montré que des variants associés à la résistance préexistants dans le cadre du polymorphisme peuvent induire une diminution d'efficacité des associations d'AAD et réduire d'un facteur 0,03 à 0,5 les taux de RVS chez les patients infectés par le VHC de génotype 1 (Cento et al., 2015 ; Dietz et al., 2015). La prévalence naturelle des variants résistants est très variable et dépend de la molécule, du génotype et du sous-type du VHC ainsi que de la zone géographique investiguée. Dans les populations non traitées, la présence des variants résistants R155K, A156T/V et D168E associés à la résistance au IP ainsi que les substitutions L159F et S282T associées à la diminution de sensibilité aux IN est un événement rare. Il est démontré dans moins de 1% des cas par séquençage standard de population. Cependant, d'autres variants tels que V36M/L, T54A/S et Q80K/R conférant une résistance aux IP, C316Y/N, M414T et S556G conférant une résistance aux IN et INN ainsi que les mutations L31M, Q30R et Y93H associées à la diminution de sensibilité aux inhibiteurs de la protéine NS5A sont plutôt plus fréquemment observés chez les individus naïfs d'AAD (Cento et al., 2015). La plupart des études sont basées sur la technologie de séquençage Sanger qui est connue pour permettre la détection de variants dominants au dessus de 20%. Il est encore trop tôt pour évaluer la place des techniques NGS dans l'interprétation du polymorphisme des souches et de ses conséquences sur l'émergence de la résistance sous traitement.

Dans notre étude, 9,2% des patients infectés par le VHC de génotype 1 ont montré des substitutions en AA connues pour conférer une diminution de la sensibilité aux IP. Certaines

études ont décrit la prévalence naturelle de variants conférant une résistance aux IP chez des patients naïfs de traitement. Ainsi, Vicenti et al. ont rapporté une fréquence de 19,3% des substitutions provoquant une résistance aux IP chez 120 patients mono-infectés par le VHC de génotype 1 en Italie (Vicenti et al., 2012) cependant que Shindo et al. ont rapporté une prévalence de 13,4% de ces mutations chez 362 patients mono-infectés par le VHC de génotype 1b au Japon (Shindo et al., 2012). En revanche, Trimoulet et al. ont rapporté une fréquence de 7,9 % des mutations associées à la résistance aux IP chez des patients co-infectés VIH-VHC de génotype 1 en France (Trimoulet et al., 2011). Nos résultats sont très proches de cette dernière étude menée sur un effectif de 76 patients de génotype 1. Pour revenir à notre étude, la mutation R155K connue pour induire un haut niveau de résistance au SMV est présente sur une seule séquence de génotype 1a. Différents pourcentages des substitutions T54S, V55A et Q80K associées à des niveaux de résistance faibles ou modérés, allant de 0,8% à 3,2%, ont été relevés. Nous n'avons pas observé d'association de mutations parmi celles qui viennent d'être évoquées. La mutation Q80K est la plus fréquemment observée avec une fréquence de 3,2% chez le génotype 1b. Cette mutation se trouve généralement chez le génotype 1a avec une prévalence allant de 48,1% en Amérique du Nord, 19,4% en Amérique du Sud et 19,8% en Europe. Concernant le génotype 1b, cette mutation n'a pas été mise en évidence en Amérique du Sud et du Nord et elle a été retrouvée avec une faible fréquence de 0,3% en Europe (Lenz et al., 2014). Dans notre étude qui révèle un pourcentage 10 fois supérieur, on pourrait soulever l'hypothèse d'une spécificité géographique de l'origine des isolats. Cette mutation pourrait avoir un impact potentiel sur la RVS. La préexistence de cette substitution chez des patients porteurs d'un virus de génotype 1a réduit les taux de RVS lors d'un traitement par SMV et pegIFN α -RBV (RVS-12 : 46,7% versus 78,5%). La Q80K est associée à une diminution moins significative du taux de RVS chez les patients traités par l'association SOF/SMV. Dans l'étude COSMOS, une rechute virale a été observée chez les patients de génotype 1a présentant cette mutation avant traitement (Cento et al., 2015, Dietz et al., 2015). Selon différentes recommandations, on pourrait exclure les patients infectés par une souche 1a du traitement par SMV ou rechercher systématiquement cette mutation par séquençage avant initiation du traitement.

L'un des inconvénients du séquençage direct par technique Sanger est le manque de sensibilité. En effet, cette technique ne permet pas de détecter les variants minoritaires présents chez les sujets infectés. Ils doivent représenter au moins 20% de la population des virus circulants pour être mis en évidence. Ces variants minoritaires pourraient être à l'origine d'une résistance primaire vis-à-vis des IP anti-VHC. En effet, sous l'influence de la pression

de sélection exercée par le traitement, ces variants minoritaires peuvent croître rapidement pour devenir majoritaires induisant ainsi l'échec thérapeutique. Une nouvelle technologie très performante et de grande sensibilité appelée l'UDPS a été récemment développée. Cette technique réalise l'amplification et le pyroséquençage d'une grande quantité d'ADN permettant ainsi l'analyse simultanée de milliers de séquences d'environ 500 nucléotides amplifiées d'une manière clonale renforçant ainsi la probabilité de détecter des variants minoritaires < 0,5%. Nous avons appliqué cette technique à 10 échantillons de génotype 1b présentant des mutations de résistance aux IP avec la technique Sanger. Sur 9 échantillons, les mutations détectées par Sanger ont été confirmées par pyroséquençage ; un seul isolat a présenté la mutation A156V par Sanger alors qu'elle n'a pas été observée en UDPS ; par contre cette même souche présentait la Q80K avec une fréquence de 0,63%. En ce qui concerne spécifiquement cette souche, la première lecture des chromatogrammes, nous avait permis de noter qu'il y avait une double population en Sanger à la position 156 avec alanine « A » et valine « V » ; une seconde lecture n'a pas retrouvé cette double population mais uniquement l'alanine, l'UDPS nous ayant permis de mettre en évidence une erreur de lecture en Sanger. La même technologie nous a amené à identifier des substitutions sur des positions de résistance qui n'avaient pas été observées par Sanger ; le clonage inhérent à cette technique a indiqué que certains isolats étaient porteurs de plusieurs mutations sur le même génome.

Dans une deuxième partie de l'étude consacrée à la polymérase NS5B, nous avons évalué la prévalence naturelle des mutations de résistance aux IN et INN. En ce qui concerne les mutations de résistance aux IN, la mutation S282T n'a pas été mise en évidence. Nos résultats sont identiques aux résultats des essais de phase 3 de traitements par SOF, concernant plus de 1200 patients ; la mutation S282T n'a jamais été détectée avant traitement quel que soit le génotype du VHC, ce qui est probablement à mettre en relation avec la faible capacité répliquative de ces variants (Svarovskaia et al., 2013). Dans notre étude, une seule souche virale a présenté la substitution de résistance V321I. De même, Le Pogam et al. (2008) et Kuntzen et al. (2008) n'ont rapporté aucune substitution majeure chez un grand nombre de patients de génotype 1. Les variants conférant une résistance aux IN sont rares du fait de la nécessité de la stabilité conformationnelle de l'enzyme, tandis que ceux associés à la résistance aux INN semblent être très communs. Nos résultats ont montré une fréquence de 35,8% des substitutions impliquées dans la résistance aux INN. La substitution V499A était la mutation prédominante, présente dans 15 cas: 6 souches de génotype 1a (100%) et 9 de génotype 1b (10,3%). En dehors de V499A, différents pourcentages de substitutions aux positions connues pour conférer une résistance faible ou modérée aux INN ont été rapportés dans notre étude,

tels 2,3% pour C316N et 5,7% pour S556G. Dans l'étude d'Alves et al. la prévalence de la mutation C316N est de 36% chez 329 souches de génotype 1b issues de la base de données de Los Alamos et provenant des patients naïfs de traitement (Alves et al., 2013). Cette différence pourrait être liée à l'effectif des patients étudiés et à l'origine géographique des échantillons. Le Pogam et al. (2008) ont rapporté une fréquence de 21% des substitutions impliquées dans la diminution de sensibilité aux INN dans 91 échantillons, tandis que Legrand-Abravanel et al. (2009) ont retrouvé une fréquence de 17% des mutations de résistance aux INN chez 28 patients naïfs de traitement et infectés par le VHC de génotypes 1. Par contre, Kuntzen et al. (2008) ont rapporté une fréquence de seulement 2,8% des mutations chez 507 patients de génotype 1 mais il faut préciser que ces derniers auteurs n'ont pas investigué toutes les mutations qui avaient été analysées par les équipes précédemment citées. Certaines études ont évalué l'impact des mutations de résistance sur la RVS. Dans une étude russe menée sur des patients naïfs de traitement porteurs de souches de génotype 1b présentant la mutation L159F et traités par SOF/RBV pendant 16 semaines, le bilan montrait une nette différence de RVS-12 entre le groupe porteur de la mutation en position 159 et le groupe sauvage (25% versus 65%). Le taux de RVS-12 n'est pas affecté lorsque la durée du traitement est de 24 semaines (80% contre 74%, respectivement) (Zhdanov et al., 2014). Dans une étude internationale récente incluant 22 pays, l'analyse de plus de 7800 séquences NS5B de génotype 1 a indiqué que la mutation L159F se retrouve principalement chez le génotype 1b, avec une forte prévalence en Russie (34%), suivie par l'Espagne (32%) et une faible prévalence au Japon et à Taiwan (1% et 0%, respectivement) (Cento et al., 2015). Si on s'intéresse aux variants associés à la résistance aux INN, il n'y a pas actuellement de données suffisantes concernant leur impact sur la réponse au traitement. Quoi qu'il en soit, leur utilisation en association avec d'autres classes d'AAD (exemple du DSV associé au PTV et à l'OBV) diminue très probablement les effets négatifs de ce polymorphisme de résistance sur la RVS. Le rôle de ce polymorphisme naturel sur l'efficacité des INN, en particulier du DSV, doit être étudié.

Dans la dernière phase de l'étude, nous avons évalué la prévalence naturelle des variants associés à la résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A. Toutes les substitutions d'AA associées à la résistance sont situées dans la région N-terminale (Fridell et al., 2010 ; Gao et al., 2010). La majorité des mutations de résistance observées *in vivo* sont situées aux positions 28, 30, 31 et 93 pour le VHC de génotype 1a et aux positions 31 et 93 pour le génotype 1b (Fridell et al., 2013 ; Gao et al., 2013). Dans ce travail, 14,3% des patients de génotype 1a et 16,2 % des patients de génotype 1b ont présenté des mutations de résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A tels que DCV, LDV et OBV. Compte tenu du faible

nombre d'isolats de génotype 1a, il est impossible de faire une comparaison définitive entre les deux génotypes. Certaines études ont décrit la prévalence naturelle de substitutions conférant une résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A chez des patients naïfs de traitement ; ainsi en Italie, Paolucci et al. ont rapporté une fréquence de 12,5% et 53,3% des substitutions impliquées dans la résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A chez des patients infectés par le VHC de génotypes 1a et 1b, respectivement (Paolucci et al., 2013). Concernant le génotype 1b, la différence de prévalence observée avec celle de notre étude est probablement à mettre en relation avec le type de mutations analysées. Suzuki et al. ont rapporté une fréquence de 11,2% des mutations L31M/V et Y93H chez des patients infectés par le VHC de génotype 1b au Japon (Suzuki et al., 2012). Dans notre étude, si nous considérons les mutations de résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A chez le génotype 1b, nos résultats sont proches de ceux publiés par Suzuki et al. Les mutations de résistance primaire L31M, conférant une faible résistance au DCV (Fridell et al., 2011) et Y93H conférant une résistance de haut niveau au DCV (Fridell et al., 2011) et à l'OBV (Krishnan et al., 2015) ainsi qu'une résistance de très haut niveau au LDV (Paolucci et al., 2013) ont été observées chez trois (2,8%) et six séquences (5,7%), respectivement. Une étude précédente a montré que la prévalence de ces deux mutations clés associées à la résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A varie de 6 à 12% pour le génotype 1b (Poveda et al., 2014). De même Bartels et al. ont mis en évidence des prévalences de 6,2% et 3,7% pour ces mutations L31M et Y93H chez des patients infectés par le génotype 1b (Bartels et al., 2013). Si l'on focalise sur la mutation Y93H, une analyse menée sur plus de 3000 séquences NS5A de génotype 1 provenant de 14 pays différents, a montré une prévalence élevée de cette mutation en particulier chez le génotype 1b. La prévalence la plus élevée a été trouvée en Corée (15,3%), suivie par le Japon (13,9%) et par l'Espagne (13,6%). La mutation L31M, quant à elle, est plutôt observée chez les génotypes 2 (de 50 à 85%), mais elle ne semble pas altérer la réponse au DCV utilisé en combinaison avec pegIFN α -RBV (Cento et al., 2015). Bourlière et al. ont démontré dans une étude de traitement par LDV/SOF +/- RBV effectuée chez des patients cirrhotiques de génotype 1 non-répondeurs au traitement pegIFN α -RBV + IP, l'absence d'impact des variants associés à la résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A présent avant traitement sur la RVS. Le taux de RVS est de 98% chez les patients porteurs des variants résistants avant traitement versus 92% chez ceux n'en présentant pas (Bourlière et al., 2015). Une autre étude a confirmé les résultats de Bourlière et al. montrant qu'il n'y a pas de différence significative dans les taux de RVS entre des patients cirrhotiques porteurs du VHC de génotype 1 présentant ou non des variants résistants aux inhibiteurs de la protéine NS5A

avant traitement par SOF/LDV +/- RBV (98% versus 91%). Par contre, ces mêmes auteurs ont montré que le taux de RVS était plus faible chez les patients de génotype 1a prétraités présentant avant traitement des variants associés à un haut niveau de résistance (X 100) vis-à-vis du LDV (67%) comparé aux patients prétraités sans variant résistant (97%) ou présentant des mutations associées à un bas niveau de résistance (100%) (Sarrazin et al., 2015). Toujours dans notre étude, les substitutions R30Q (5,7%) et P58S (3,8%) ont été décrites qui sont connues comme étant des mutations de résistance secondaires augmentant le niveau de résistance associé aux mutations primaires mais ne conférant pas une résistance par elles-mêmes (Fridell et al., 2010). Aucune des séquences NS5A analysée pour les deux sous-types n'a montré de substitution à la position 32 connue pour conférer une résistance de haut niveau au DCV pour le génotype 1a et un niveau modéré de résistance pour le génotype 1b (Fridell et al., 2010). Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude de Bartels et al. (Bartels et al., 2013). La mutation primaire M28V, qui a été décrite comme induisant une résistance de bas niveau au DCV (Fridell et al., 2010) et de haut niveau à l'OBV (Krishnan et al., 2015) chez le génotype 1a a été observée sur une seule séquence analysée soit une prévalence de 14,3%.

Dans cette étude, nous n'avons pas retrouvé de souche virale porteuse des trois types de mutation associées à la diminution de sensibilité aux IP, aux IN et INN et aux inhibiteurs de la protéine NS5A. Par contre, une association entre des variants résistants diminuant la sensibilité à deux AAD a été observée chez un nombre très réduit de patients en utilisant le séquençage Sanger. Cette méthode de séquençage ne permet pas de savoir si les variants résistants observés sont portés par le même génome viral ou par des génomes différents. Seules des méthodes plus sensibles comme le clonage et le séquençage de nouvelle génération permettent de détecter les combinaisons de mutations de résistance aux AAD portées par les mêmes génomes viraux.

En conclusion, cette étude menée chez des patients tunisiens naïfs de traitement et infectés par le VHC de génotype 1, est une étude rétrospective permettant de décrire la prévalence naturelle des mutations identifiées comme responsables de la résistance aux AAD dans la population étudiée. La caractérisation de ces résistances naturelles dans une population est un préalable intéressant à l'introduction des nouvelles molécules. Cette stratégie doit permettre l'optimisation de l'utilisation des antiviraux, en réduisant les risques d'apparition de résistance dans les traitements établis. Notre travail a permis de mettre en évidence la présence de substitutions conférant une diminution de la sensibilité aux IP, aux IN et INN et aux inhibiteurs de la protéine NS5A. Des études cliniques *in situ* seront nécessaires pour évaluer l'impact des mutations de résistance sur la réponse au traitement. Des études

moléculaires telles que celle menée dans ce travail devraient permettre un meilleur choix des associations d'antiviraux de manière à minimiser le rôle des mutations de résistance à l'initiation des traitements sur la RVS.

Références bibliographiques

Afdhal N, Reddy KR, Nelson DR, Lawitz E, Gordon SC, Shiff E et al. Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **2014**, 370: 1483-1493.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* **2007**, 13: 2436-2441.

Alves R, Queiroz AT, Pessoa MG, da Salvia EF, Mazo DF, Carrilho EJ et al. The prevalence of resistance mutations to protease and polymerase inhibitors in hepatitis C virus sequences from the Los Alamos databank. *Journal of Viral Hepatitis* **2013**, 20: 414-421.

Amarapurkar D. Natural history of hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. **2000**, 15: 105-110.

Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* **2002**, 14: 6919-6928.

Appel N, Bartenchlager R. A novel function for a micro RNA: negative regulators can do positive for hepatitis C virus. *Hepatology* **2006**, 43: 612-615.

Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P et al. Essential role of domain III of non-structural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* **2008**, 4:1000035.

Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **2011**, 364: 1207-1217.

Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP et al. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* **1995**, 21: 639-644.

Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges AM, Dorrian JL, De Meyer S et al. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct acting antivirals were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment. *J Virol* **2013**, 87: 1544-1553.

Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* **2013**, 11: 482-496.

Bartenschlager R, Lohmann V, Wilkinson T, Koch JO. Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol* **1995**, 69: 7519-7528.

Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **2003**, 197: 633-642.

Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **2006**, 80: 6964-6972.

Blight K.J, Kolykhalov AA, Rice CM, 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **2000**, 290: 1972-1974.

Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RH, Foster GR et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6: 975-990.

Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratinier M, Targett-Adams P, Lavergne JP et al. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* **2006**, 281: 22236-22247.

Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* **2005**, 79: 11353-11365.

Bourlière M, Bronowicki JP, de Lidinghen V, Hézode C, Zoulim F, Mathurin P et al. Ledipasvir-sofosbuvir with or without ribavirin to treat patients with HCV genotype 1 infection and cirrhosis non-responsive to previous protease-inhibitor or therapy: a randomised, double-blind, phase 2 trial (SIRIUS). *Lancet Infect Dis* **2015**, 15: 397-404.

Bradley DW. Studies of non-A, non-B hepatitis and characterization of the hepatitis C virus in chimpanzees. *Curr Top Microbiol Immunol* **2000**, 242: 1-23.

Brass V, Berke JM, Montserret R, Blum HE, Penin F, Moradpour D. Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**, 105: 14545-14550.

Bressanelli S, Tomei L, Rey FA, De Francesco R. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J Virol* **2002**, 76: 3482-3492.

Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti I, Vitale RL, Mathieu M et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, 96: 13034-13039.

Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* **2003**, 38: 639-644.

Brochot E, Duverlie G, Castelain S, Morel V, Wychowski C, Dubuisson J. Effect of ribavirin on the hepatitis C virus (JFH-1) and its correlation with interferon sensitivity. *Antivir Ther* **2007**, 12: 805-813.

Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* **1995**, 15: 41-63.

Cannon NA, Donlin MJ, Mayes LM, Lyra AC, Di Bisceglie AM. Evidence for action of ribavirin through the hepatitis C virus RNA polymerase. *J Viral Hepat* **2009**, 16: 595-604.

Ceccherini-Silberstein F, Erba F, Gago F, Bertoli A, Forbici F, Bellocchi MC et al. Identification of the minimal conserved structure of HIV-1 protease in the presence and absence of drug pressure. *AIDS* **2004**, 18: 11-19.

Cento V, Chevaliez S, Perno CF. Resistance to direct-acting antiviral agents: clinical utility and significance. *Curr Opin HIV AIDS* **2015**, 10: 381-389.

Cento V, Mirabelli C, Salpini R, Diamonte S, Artese A, Costa G et al. HCV genotypes are differently prone to the development of resistance to linear and macrocyclic protease inhibitors. *PLoS One* **2012**, 7: e39652.

Chang MH, Gordon LA, Fung HB. Boceprevir: a protease inhibitor for the treatment of hepatitis C. *Clin Ther* **2012**, 34: 2021-2038.

Chen TM, Tung JN. Older age per se has negative effect on hepatitis C patients treated with peginterferon and ribavirin. *Am J Gastroenterol* **2009**, 104: 2117-2119.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **1989**, 4902: 359-362.

Chtioui H, Buclin T, Moradpour D. Nouveaux traitements de l'hépatite C : aspects pharmacologiques et potentiel d'interaction. *Rev Med Suisse* **2014**, 10: 1600-1606.

Conte D, Fraquelli M, Prati D, Colucci A, Minola E. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology* **2000**, 31: 751-755.

Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* **2000**, 6: 1375-1379.

Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Grandhi RT et al. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* **2002**, 76: 12548-12595.

De Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* **2005**, 436: 953-960.

Diaz O, Delers F, Maynard M, Dimignot S, Zoulim F, Chambaz J et al. Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J Gen Virol* **2006**, 10: 2983-2991.

Dierynck I, Thys K, Ghys A, Sullivan JC, Kieffer TL, Aerssens J et al. Deep-sequencing analysis of the gene encoding the hepatitis C virus nonstructural 3-4A protease confirms a low prevalence of telaprevir-resistant variants at baseline and the end of the REALIZE study. *J Infect Dis* **2014**, 210:1871-1880.

Dietz J, Susser S, Berkowski C, Perner D, Zeuzem S, Sarrazin C. Consideration of viral resistance for optimization of direct antiviral therapy of hepatitis C virus genotype 1-infected patients. *PLoS One* **2015**, 10: e0134395.

Di Maio VC, Cento V, Mirabelli C, Artese A, Costa G, Alcaro S et al. Hepatitis C virus genetic variability and the presence of NS5B resistance-associated mutations as natural polymorphisms in selected genotypes could affect the response to NS5B inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**, 58: 2781-2797.

Djebbi A, Mejri S, Thiers V, Triki H. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from Tunisian patients. *Eur J Epidemiol* **2004**, 19: 555-562.

Domingo E, Gomez J. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res* **2007**, 127: 131-150.

Dore GJ, Lawitz E, Hezode C, Shafran S, Ramji A, Tatum H et al. Daclatasvir combined with peginterferon alfa-2a and ribavirin for 12 or 16 weeks in patients with HCV genotype 2 or 3 infection: COMMAND GT2/3 study. *Hepatology* **2013**, 58: S570-S571.

Drummer HE, Maerz A, Pountourios P. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett* **2003**, 546: 385-390.

Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* **2007**, 13: 2406-2415.

EASL clinical practice guidelines. Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatology* **2011**, 55: 245-264.

Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral complex. *J virol* **2002**, 76: 5974-5984.

Eyre NS, Baumert TF, Berad MF. Closing the gap: the tight junction protein occluding and hepatitis C virus entry. *Hepatology* **2009**, 49: 1770-1772.

Failla C, Tomei L, De Francesco R. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* **1994**, 68: 3753-3760.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **1975**, 15: 767-770.

Feld JJ, Kowdley KV, Coakley E, Sigal S, Nelson DR, Crawford D et al. Treatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin. *N Engl J Med* **2014**, 370: 1594-1603.

Ferenci P, Bernstein D, Lalezari J, Cohen D, Luo Y, Cooper C et al. ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with or without ribavirin for HCV. *N Engl J Med* **2014**, 370: 1983-1992.

Forestier N, Reesink HW, Weegink CJ, McNair L, Kieffer TL, Chu HM. Antiviral activity of telaprevir (VX-950) and peginterferon alfa-2a in patients with hepatitis C. *Hepatology* **2007**, 46: 640-648.

Fournier C, Willems B. L'hépatite C chronique... est une maladie curable. Le Médecin du Québec **2012**, 47: 53-60.

Fraser CS, Doudna JA. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. Nat Rev Microbiol **2007**, 1: 29-38.

Fridell RA, Qiu D, Wang C, Valera L, Gao M. Resistance analysis of the HCV NS5A inhibitors BMS-790052, in the *in vitro* replicon system. Antimicrob Agents Chemother **2010**, 54: 364-3650.

Fridell RA, Wang C, Sun JH, O'Boyle DR, Nower P, Valera L et al. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus non-structural protein NS5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: *In vitro* and *in vivo* correlations. Hepatology **2011**, 54: 1924-1935.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy RK, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, Haussinger D. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med **2002**, 347: 975-982.

Fujimoto I, Takizawa T, Ohba Y, Nakanishi Y. Co-expression of Fas and Fas-ligand on the surface of influenza virus-infected cells. Cell Death Differ **1998**, 5: 426-431.

Gale M, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. Nature **2005**, 436: 9345.

Gale M, Korth MJ, Katze MG. Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein a potential mechanism of interferon resistance. Clin Diagn Virol **1998**, 10: 157-162.

Gallosi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. J Gastrointest Liver Dis **2007**, 16: 65-73.

Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Symonds WT et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. N Engl J Med **2013**, 368: 34-44.

Gao M. Antiviral activity and resistance of HCV NS5A replication complex inhibitors. Curr Opin Virol **2013**, 5:514–520.

Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. Nature **2010**, 465: 96-100.

Ghany Mg, Nelson DR, Strader BD, Thomas DL, Seef LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infections: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology **2011**, 54: 1433-1444.

Gorgi Y, Yalaoui S, Ben Nejma HL, Azzouz MM, Hsairi M, Ben Khelifa H et al. Detection of hepatitis C virus in the general population of Tunisia. Bull Soc Pathol Exot **1998**, 91: 177.

Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* **2006**, 16: 37-48.

Grange JD. Treatment of acute hepatitis C. *Gastroenterol Clin Biol* **2002**, 2:32-37.

Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW et al. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* **2000**, 181: 1528-1536.

Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol* **2011**, 55: 192-206.

Haqshenas G, Mackenzie JM, Dong X, Gowans EJ. Hepatitis C virus p7 protein is localized in the endoplasmic reticulum when it is encoded by a replication-competent genome. *J Gen Virol* **2007**, 88: 134-142.

Hernandez D, Zhou N, Ueland J, Monikowski A, McPhee F. Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors. *J Clin Virol* **2013**, 57: 13-18.

Hezode C, Asselah T, Reddy KR, Hassanein T, Berenguer M, Fleischer-Stepniewska K et al. Ombitasvir plus paritaprevir plus ritonavir with or without ribavirin in treatment-naïve and treatment-experienced patients with genotype 4 chronic hepatitis C virus infection (PEARL-I): a randomised, open-label trial. *Lancet* **2015**, 385: 2502-2509.

Hezode C, Hirschfield GM, Ghesquiere W, Sievert W, Rodriguez-Torres M, Shafran SD et al. Daclatasvir, an NS5A replication complex inhibitor, combined with peginterferon alfa-2a and ribavirin in treatment-naïve HCV-genotype 1 or 4 subjects: phase 2b COMMAND-1 SVR12 results. *Hepatology* **2012**, 56: 553A–554A.

Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus and mechanism of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol* **2008**, 23: 1473-1482.

Hoffmann RM, Diepolder HM, Zchoval R, Zwiebel FM, Jung MC, Scholz S et al. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* **1995**, 21: 632-638.

Hugle T, Fehrman F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* **2001**, 284: 70-81.

Ivashkina N, Wolk B, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Penin F et al. The hepatitis C virus RNA dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* **2002**, 76: 13088-13093.

Jackel-Cram C, Babiuk LA, Liu Q. Up-regulation of fatty acid synthase promoter by hepatitis C virus core protein: genotype-3a core has a stronger effect than genotype-1b core. *J Hepatol* **2007**, 6: 999-1008.

Jacobson I, Dore GJ, Foster GR, Fried MW, Radu M, Rafalskiy VV et al. Simeprevir (TMC435) with peginterferon/ribavirin for chronic HCV genotype-1 infection in treatment-naive patients: results from QUEST-1, a Phase III trial. *J Hepatol* **2013** (a), 58: S574–S574.

Jacobson I, Ghalib R, Rodriguez, Torres M, Younossi Z, Corregidor A et al. SVR results of a once daily regimen of simeprevir plus sofosbuvir with or without ribavirin in cirrhotic and non cirrhotic HCV genotype1 treatment naive and prior null responder patients: the COSMOS study. *Hepatology* **2013** (b), 58:1379A.

Jacobson I, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Browej NH et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **2011**, 364: 2405-2416.

Jeulin H, Kedzierewicz F, Grancher N, Venard V. Quel avenir pour la ribavirine en dehors de l'hépatite C? *Virologie* **2009**, 13: 83-92.

Jhaveri R, Qiang G, Diehl AM. Domain 3 of hepatitis C virus core protein is sufficient for intracellular lipid accumulation. *J Infect Dis* **2009**, 11: 1781-1788.

Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* **2007**, 81: 8374-8383.

Kaito M, Watanabes S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* **1994**, 7: 1755-1760.

Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Hagiwara H, Mita E, Kasahara A et al. Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* **1994**, 2: 296-302.

Kaplan DE, Sugimoto K, Newton K, Valigia ME, Ikeda F, Aytaman A et al. Discordant role of CD4 T-helper cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology* **2007**, 132: 654-666.

Kati W, Koev G, Irvin M, Beyer J, Liu Y, Krishnan P et al. In vitro activity and resistance profile of dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, 59: 1505-1511.

Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus C subgenomic replicon. *Gastroenterology* **2003**, 125: 1808-1817.

Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Miramoto J et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolates from a fulminant hepatitis patients. *J Med Virol* **2001**, 64: 334-339.

Klein KC, Dellos SR, Lingappa JR. Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in cell-free system. *J Virol* **2005**, 11: 6814-6826.

Koch JO, Bartenschlager R. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* **1999**, 73: 7138-7146.

Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus hepatitis C virus genome RNA. *J Viral* **1996**, 70: 3363-3371.

Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* **2000**, 74: 2046-2051.

Krekulova L, Rehak V, Riley LW. Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. *Folia Microbiol* **2006**, 51: 665-680.

Krishnan P, Tripathi R, Scnell G, ReishT T, Beyer J, Irvin M et al. Pooled analysis of resistance in patients treated with ombitasvir/ABT-450/r and dasabuvir with or without ribavirin in phase 2 and phase 3 clinical trials. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Boston, November 7-11 **2014**.

Krishanan P, Beyer J, Mistry N, Koev G, Reich T, DeGoey D et al. *In vitro* and *in vivo* antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, 59: 979-987.

Kuntzen T, Timm J, Bercial A, Lennon N, Berlin AM, Young SK et al. Naturally occurring dominant resistance mutations hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* **2008**, 48: 1769-1778.

Lam AM, Espiridu C, Bansal S, Micolochik Steuer HM, Zennou V, Otto MJ et al. Hepatitis C nucleotide inhibitors PSI-352938 and PSI-353661 exhibit a novel mechanism of resistance requiring multiple mutations within replicon RNA. *J Virol* **2011**, 85: 12334-12342.

Lam AM, Espiritu C, Bansal S, Micolochick Steuer HM, Niu C, Zennou V et al. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, 56: 3359-3368.

Lam AM, Frick DN. Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J Virol* **2006**, 80: 404-411.

Laperche S, Servant-Delmas A, Gallien O, Pillonel J. La surveillance de la diversité des virus VIH, VHB, et VHC chez les donneurs de sang français entre 2000 et 2010. *Bull Epidemiol Hebd* **2012**, 39-40: 447-452.

Larsen C, Chaix ML, Le Start Y, Velter A, Gervais A, Auperin I et al. Gaining greater insight into HCV emergence in HIV-infected men who have sex with men : the HEPAIG Study. *PLoS One* **2011**, 6: e29322.

Lavillette D, Pecheur EI, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbeau R et al. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J virol* **2007**, 81: 8752-8765.

Lawitz E, Forns X, Zeuzem S, Gane E, Bronowicki JP, Andreone P et al. Simeprevir (TMC435) with peginterferon/ribavirin for treatment of chronic HCV genotype 1 infection in patients who relapsed after previous interferon-based therapy: results from PROMISE, a Phase III trial. *Gastroenterology* **2013**, 144: S151–S151.

Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med* **2013** (a), 368: 1878-1887.

Lawitz E, Poordad FF, Pang PS, Hyland RH, Ding X, Mo H et al. Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naïve and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* **2014**, 383: 515–523.

Lawitz E, Rodriguez-Torres M, Muir AJ, Kieffer TL, Mc Nair L, Khunvichai A et al. Antiviral effects and safety of telaprevir peginterferon alfa-2a, and ribavirin for 28 days in hepatitis C patients. *J Hepatol* **2008**, 49: 163-169.

Lee SB, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M. The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2, and involves ICE-like proteases. *Virology* **1997**, 231: 81-88.

Lee SS, Ferenci P. Optimizing outcomes in patients with hepatitis C virus genotype 1 or 4." *Antivir Ther* **2008**, 13: 9-16.

Legrand-Abravanel F, Henquell C, Le Guillou-Guillemette H, Balan V, Mirand A, Dubois M et al. Naturally occurring substitutions conferring resistance to hepatitis C Virus polymerase inhibitors in treatment-naïve patients infected with genotype 1-5. *Antivir Ther* **2009**, 5: 723-730.

Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M, Knipe D, Howley P et al. **Hepatitis C viruses**. In *Fields Virology*. Fifth edition. Edited by Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins **2007**, 1253-1304.

Lenz O, Verbinnen T, Fevery B, Tambuyzer L, Vijgen L, Peeters M. Virology analyses of HCV isolates from genotype 1-infected patients treated with simeprevir plus peginterferon/ribavirin in phase IIb/III studies. *J Hepatol* **2014**, 60: S1-S598.

Le Pogam S, Sessaadri A, Kosaka A, Chiu S, Kang H, Hu S et al. Existence of hepatitis C virus NS5B variants naturally resistant to non-nucleoside, but not to nucleoside, polymerase inhibitors among untreated patients. *J Antimicrob Chemother* **2008**, 61: 1205-1216

Lindsay KL, Trépo C, Heintges, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC et al. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2a to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* **2001**, 34: 395-403.

Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* **1997**, 71: 8416-8428.

Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. replication of subgenomic hepatitis C virus C RNAs in hepatoma cell line. *Science* **1999**, 285: 110-113.

Lontok E, Harrington P, Howe A, Kieffer T, Lennerstrand J, Lenz O et al. Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology* **2015**, 5: 1623-1632.

Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM, 2006. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **2006**, 442: 831-835.

Lunel F, Musset L, Franjeul L, Cacoub P, Manns M, Perrin M et al. Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage. *Gastroenterology* **1994**, 106: 1291-1300.

Maillard E. Epidemiology, natural history and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Radiother* **2011**, 15: 3-6.

Malcolm BA, Liu R, Lahser F, Agrawal S, Belanger B, Butkiewicz N et al. SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, 50:1013-1020.

Manns M, Marcellin P, Poordad F, de Araujo ES, Buti M, Horsmans Y et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a or 2b plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **2014**, 384: 441-426.

Manns M, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman ML, Reindollar R et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **2001**, 358: 958-965.

Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* **1999**, 31:9-16.

Marcellin P, Pouteau M, Benhamou JP. Hepatitis C virus infection, alpha interferon therapy and thyroid dysfunction. *J Hepatol* **1995**, 22: 364-369.

Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* **1992**, 66: 3225-3229.

McHutchison J, Gordon S, Schiff E, Shiffman M, Lee W, Rustgi V et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* **1998**, 339: 1485-1492.

McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* **2000**, 7: 2-14.

McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **2002**, 21: 3980-3988.

McPhee F, Zhou N, Yang X, Hernandez D, Chiarella J, Kozal M. Effect of baseline NS5A polymorphisms on virologic response to the all-oral combination of daclatasvir + sofosbuvir ± ribavirin in patients with chronic HCV infection. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) London, United Kingdom April 9-13- The International Liver Congress **2014**.

Meertens L, Bertaux C, Dragic T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* **2006**, 80: 11571-11578.

Meffere C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau, Dubois F, Antona D, Lemasson JM et al. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus infections in France in 2004: social factors are important predictors after adjusting for known risk factors. *J Med Virol* **2010**, 82: 546-555.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **2015**, 61: 77-87.

Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Nat Acad Sci USA* **1990**, 87: 2057-2061.

Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Goset R, Blum HE et al. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **2004**, 78: 13278-13284.

Murray JM, Law MG, Gao Z, Kaldor JM. The impact of behavioural changes on the prevalence of human immunodeficiency virus and hepatitis C among injecting drug users. *Int J Epidemiol* **2003**, 32: 708-717.

Naggie S, Cooper C, Saag M, Workowski K, Ruane P, Towner WJ et al. Ledipasvir and Sofosbuvir for HCV in Patients Coinfected with HIV-1. *N Engl J Med* **2015**, 373: 705-713.

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: 869-877.

Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll-Keller F. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol* **2002**, 67: 152-161.

Netski DM, Mosbrugger T, Delpha E, Maertens G Ray SM, Hamilton RG et al. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* **2005**, 41: 667-675.

Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ et al. Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **1998**, 282: 103-107.

Nguyen H, Sankaran S, Dandekar S. Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology* **2006**, 1: 58-68.

Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood, mononuclear cells and liver. *Hepatology* **1999**, 29: 217-222.

Op De Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* **2001**, 82: 2589-2595.

Osinusi A, Meissner EG, Lee YJ, Bon D, Heytens L, Nelson A et al. Sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C genotype 1 in patients with unfavourable treatment characteristics: a randomized clinical trial. *JAMA* **2013**, 310: 804-811.

Paccagnini S, Principi N, Massironi E, Tanzi E, Romano L, Muggiasca et al. Perinatal transmission and manifestation of hepatitis C virus infection in a high risk population. *Pediatr Infect Dis J* **1995**, 14: 195-199.

Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virology Journal* **2013**, 10: 355.

Pauwels F, Mostmans W, Quiryneen LM, van der Helm L, Boutton CW, Rueff AS et al. Binding-site identification and genotypic profiling of hepatitis C virus polymerase inhibitor. *J Virol* **2007**, 81: 6909-6919.

Pawlotsky JM. Treatment failure resistance with direct acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* **2011**, 53: 1742-1751.

Pawlotsky JM. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J of Hepatol* **2013**, 59: 375-382.

Pawlotsky JM. New Hepatitis C therapies: The toolbox, strategies and challenges. *Gastroenterology* **2014**, 46: 1176-1192.

Payan C, Roudot-Thoraval F, Marcellin P, Bled N, Duverlie G, Fouchard-Hubert I et al. Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millennium : the Gemhep GenoCII Study. *J Viral Hepat* **2005**, 12: 405-413.

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Mouradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* **2004**, 1: 5-19.

Pillonel J, Legrand D, Sommen C, Laperche S. Surveillance épidémiologique des donneurs de sang et risque résiduel de transmission du VIH, de l'HTLV, du VHC et du VHB par transfusion en France entre 2008 et 2010. *BEH* **2012**, 39-40: 448-442.

Plaza Z, Soriano V, Vispo E, del Mar GM, Barreiro P, Selen E et al. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitors. *Antivir Ther* **2012**, 17: 921-926.

Pol S, Bourlière M, Lucier S, de Lédighen V, Zoulim F, Dorival-Mouly C et al. Safety and efficacy of the combination daclatasvir sofosbuvir in HCV genotype 1-mono-infected patients from the French Observational cohort ANRS CO22 . *J Hepatol* **2015**, 62: S258.

Pol S, Zylbergberg H. Formes cliniques et évolution de l'hépatite C. La revue du praticien **2000**, 50: 1083-1088.

Poordad F, McCone J, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **2011**, 364: 1195-1206.

Popescu CI, Dubuisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell* **2009**, 102: 63-74.

Poveda E, García F. Telaprevir resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **2013**, 31: 26-32.

Poveda E, Soriano V. Drug resistance testing in hepatitis C therapy. *Future Virol* **2012**, 7: 1-13.

Poveda E, Wyles DL, Mena A, Pedreira JD, Castro-Iglesias A, Cachay E. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. *Antivir Res* **2014**, 108:181–191.

Poynard T, Marcelin P, Lee S, Niederau C, Minuk GS, Ideo G et al. Randomised trial of interferon a2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon a2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* **1998**, 352: 1426-1432.

Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Topics Micro Immunol* **2000**, 242: 55-84.

Restellini S, Spahr L. Les tests non invasifs de fibrose vont-ils remplacer la biopsie hépatique? *Rev Med Suisse* **2012**, 8: 1411-1415.

Reynolds JE, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR, et al. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J* **1995**, 23: 6010-6020.

Rhoads J. Natural history and epidemiology of hepatitis C. *J Assoc Nurses AIDS Care* **2003**, 14:18-25.

Roberston B, Myers G, Howard C, Bertin T, Bukh J, Gaschen B et al. Classification, nomenclature and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* **1998**, 143: 2493-2503.

Roccaseca R, Ansuini H, Vitelli A, Meola A, Scarselli E, Acali S et al. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and modulated by a complex interplay between hypervariable region 1 and 2. *J Virol* **2003**, 77: 1856-1867.

Roingeard P, Hourieux C. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J Viral Hepat* **2008**, 15: 157-164.

Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A et al. Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology* **2002**, 35: 190-198.

Sanchez-Tapias JM. Nosocomial transmission of hepatitis C virus. *J hepatol* **1999**, 31: 107-112.

Sarrazin C, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES, Doehle B, Martin R, Zeuzem S et al. The prevalence and the effect of HCV NS5A resistance-associated variants in subjects with compensated cirrhosis treated with ledipasvir/sofosbuvir +/- RBV. *J Hepatol* **2015**, 62: S187-S931.

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **2002**, 21: 5017-5025.

Sherman KE, Sulkowski MS, Zoulim F, Alberti A, Wie LJ, Sullivan JC et al. Follow-up of SVR Durability and Viral Resistance in Patients with Chronic Hepatitis C Treated with Telaprevir-Based Regimens: Interim Analysis from the EXTEND Study. 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases San Francisco **2011**, Nov 6-9.

Shindo H, Maekawa S, Komase K, Suekiv R, Mirua M, Kadokura M et al. Characterization of naturally occurring protease inhibitor resistance mutations in genotypes 1b hepatitis C virus patients. *Hepatol Int* **2012**, 6: 482-490.

Shimizu YK, Feinstone SM, Kohora M, Purcell RH, Yoshikura. Hepatitis c virus: detection of intracellular virus particules by electron miscroscopy. *Hepatol* **1996**, 2: 258-290.

Simmonds P, Smith D, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* **1994**, 75: 1053-1061.

Slama H, MojaatN, Dahri R, Boukef K. Epidemiologic study of anti-HCV antibodies in Tunisian blood donors. *Rev Fr Transfus Hemobiol* **1991**, 34: 459-464.

Smith D, Bukh J, Kuiken C, Muerhoo AS, Rloe 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: 318-327.

Sofia MJ, Bao D, Chang W, Du J, Nagarathnam D, Rachakonda S et al. Discovery of a β -d-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J Med Chem* **2010**, 53: 7202-7218.

Sollner TH. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr Opin Cell Bio* **2004**, 16: 429-435.

Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel A H, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *Plos Pathog* **2007**, 3: e103.

Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Hassanein T, Jacobson I et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* **2014**, 370: 211-221.

Sulkowski MS, Shiffman ML, Afdhal NH, Reddy KR, McCone J, Lee WM et al. Hepatitis C virus treatment-related anemia is associated with with higher sustained virologic response rate. *Gastroenterology* **2010**, 139: 1602-1611.

Susser S, Welsch C, Wang Y, Zettler M, Dominques FS, Karey U et al. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus infected patients. *Hepatology* **2009**, 50: 1709-1718.

Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Seko Y, Kawamura Y et al. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J Clin Virol* **2012**, 54: 352–354.

Suzuki R, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T. Processing and functions of Hepatitis C virus proteins. *Intervirology* **1999**, 42: 145-152.

Svarovskaia ES, Dvory-Sobol H, Hebner C, Doehle B, Gontcharova V, Martin R et al. No resistance detected in four phase 3 clinical studies in HCV genotypes 1-6 of sofosbuvir + ribavirin with or without peginterferon. 64rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Washington, November 1-5 **2013**.

Tai CL, Chi WK, Chen DS, Hwang LH. The helicase activity associated with hepatitis C virus non-structural protein 3 (NS3). *J virol* **1996**, 70: 8477-8484.

Tam RC, Lau JY, Hong Z. Mechanisms of action of ribavirin in anti-viral therapies. *Antivir Chem Chemother* **2001**, 12: 261-272.

Targett-Adams P, Hope G, Boulant S, McLauchlan J. Maturation oh hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem* **2008**, 283: 16850-16859.

Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* **2004**, 279: 48576-48587.

Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **2005**, 435: 374-379.

Thomas HC, Torok ME, Forton DM, Taylor Robinson SD. Possible mechanisms of action and reasons for failure of antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* **1999**, 32: 152-159.

Triki H, Said N, Ben Salah A, Arrouji A, Ben Ahmed F, Bouguerra A et al. Seroeoidemiologu of hepatitis B, C and delta viruses in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **1997**, 91: 11-14.

Trimoulet P, Belzunce C, Faure M, Wittkop L, Reigadas S, Dupon M et al. Hepatitis C virus (HCV) protease variability and anti-HCV protease inhibitor resistance in HIV/HCV-coinfected patients. *HIV Med* **2011**, 12: 506-509.

Trimoulet P, Pinson P, Papuchon J, Foucher J, Vergniol J, Chermak F et al. Dynamic and rapid changes in viral quasispecies by UDPS in chronic hepatitis C patients receiving telaprevir-based therapy. *Antiviral Therapy* **2013**, 18: 723-727.

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: 357-367.

Troke PJ, Lewis M, Simpson P, Gore K, Hammound J, Craik C et al. Characterization of resistance to the non-nucleoside NS5B inhibitor Flibuvir in hepatitis C virus infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, 56: 1331-1341.

Vallet S, Viron F, Henquell C, Le Guillou-Guillemette H, Lagathu, Abravanel F et al. NS3 protease polymorphism and natural resistance to protease inhibitors in French patients infected with HCV genotypes 1-5. *Antiviral Therapy* **2011**, 16: 1093-1102.

Vandelli C, Renzo F, Romano L, Tisminetzky S, De Palma M, Stroffolini T et al. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol* **2004**, 99: 855-859.

Vermehren J, Sarrazin C. The role of resistance in HCV treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2012**, 26:487-503.

Vicenti I, Rosi A, Saladini F, Meini G, Pippi F, Rossetti B et al. Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. *J Antimicrob Chemother* **2012**, 67: 984-987.

Von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing anti body and T-cell response during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* **2007**, 132: 667-678.

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. *Nat Med* **2005**, 11: 791-796.

Welbourn S, Pause A. The hepatitis C virus NS2/3 protease. *Curr Issues Mol Biol* **2007**, 9: 63-69.

Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* **2000**, 74: 2293-2304.

WHO: World Health Organization. Global distribution of hepatitis C, 2001. *Weekly epidemiological record* **2002**, 77: 41-48.

Wyles DL, Ruane PJ, Sulkowski MS, Dieterich D, Luetkemeyer A, Morgan TR et al. Daclatasvir plus Sofosbuvir for HCV in Patients Coinfected with HIV-1. *N Engl J Med* **2015**, 373: 714-725.

Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. Proc Natl Acad Sci USA **1999**, 96: 2291-2295.

Yi M, Ma Y, Yates J, Lemon SM. Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. PLoS Pathog **2009**, 5: e1000403.

Younossi ZM, Stepanova M, Marcellin P, Afdhal N, Kowdley KV, Zeuzem S et al. Treatment with ledipasvir and sofosbuvir improves patient-reported outcomes: Results from the ION-1, -2, and -3 clinical trials. Hepatology **2015**, 61:1798-1808.

Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. N Engl J Med **2011**, 364:2417-2428.

Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, Muss S, Wedemeyer H et al. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. J Viral Hepat **2009**, 16: 75-90.

Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. N Engl J Med **2000**, 343: 1666-1672.

Zeuzem S, Jacobson IM, Baykal T, Marinho RT, Poordad F, Bourlière M et al. Retreatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin. N Engl J Med **2014**, 370: 1604-1614.

Zhdanov K, Isakov V, Kersey K, Zhu Y, Svarovskaia E, Massetto B et al. Sofosbuvir plus ribavirin for the treatment of russian patients with chronic HCV genotype 1 or 3 infection. 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study for the Liver, Brisbane-Australia, March 12-15, **2014**.

Documents utilisés de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé (ANSM-AbbVie)- Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) :

ANSM-AbbVie ; RCP Ombitasvir/paritaprèvir/ritonavir, Décembre 2014

ANSM-AbbVie ; RCP Dasabuvir, Décembre 2014

Sites web utilisés:

Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org>

Chemical Book: <http://www.chemicalbook.com>

ChemIDplus: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

L'AFEF : www.afef.asso.fr

RESEARCH

Open Access



Prevalence of hepatitis C virus (HCV) variants resistant to NS5A inhibitors in naïve patients infected with HCV genotype 1 in Tunisia

Jameleddine Aissa Larousse^{1,2,3*†}, Pascale Trimoulet^{2,3†}, Patricia Recordon Pinson^{2,3}, Brigitte Tauzin³, Mohamed Mssadak Azzouz⁴, Naby Ben Mami⁵, Imed Cheikh⁶, Henda Triki¹ and Hervé Fleury^{2,3}

Abstract

Background: Hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 5A (NS5A) inhibitors have been recently developed to inhibit NS5A activities and have been approved for the treatment of HCV infection. However the drawback of these direct acting antivirals (DAAs) is the emergence of resistance mutations. The prevalence of such mutations conferring resistance to HCV-NS5A inhibitors before treatment has not been investigated so far in the Tunisian population. The aim of this study was to detect HCV variants resistant to HCV-NS5A inhibitors in hepatitis C patients infected with HCV genotype 1 before any treatment with NS5A inhibitors.

Methods: Amplification and direct sequencing of the HCV NS5A region was carried out on 112 samples from 149 untreated patients.

Results: In genotype 1a strains, amino acid substitutions conferring resistance to NS5A inhibitors (M28V) were detected in 1/7 (14.2 %) HCV NS5A sequences analyzed. In genotype 1b, resistance mutations in the NS5A region (R30Q; L31M; P58S and Y93H) were observed in 17/105 (16.2 %) HCV NS5A sequences analyzed. R30Q and Y93H (n = 6; 5.7 %) predominated over P58S (n = 4; 3.8 %) and L31M (n = 3; 2.8 %).

Conclusions: Mutations conferring resistance to HCV NS5A inhibitors are frequent in treatment-naïve Tunisian patients infected with HCV genotype 1b. Their influence in the context of DAA therapies has not been fully investigated and should be taken into consideration.

Keywords: Hepatitis C virus, Non-structural protein 5A, Direct-acting antivirals, Resistance mutations

Background

Hepatitis C virus (HCV) infection is the major cause of chronic liver disease which can progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma over the course of 20–30 years [1]. Globally HCV has infected 180 million people, approximately 3 % of the world's population [2]. It is an enveloped positive-strand RNA virus and is the only member of the *Hepacivirus* genus of the *Flaviviridae* family [3]. Based on

phylogenetic analysis, HCV has been classified into six different genotypes and diverse subtypes [4].

Tunisia is one of the countries with low endemicity for HCV. The prevalence of HCV infection is less than 1 % [5, 6] with an average prevalence of 80 % of subtype 1b [7, 8]. The current standard therapy in Tunisia consists of pegylated alpha interferon (PEG-IFN α) combined with ribavirin (RBV), a nucleoside analogue, for 24–48 weeks [9]. This treatment is associated with a high long-term response rate in patients infected with HCV genotype 2 and 3, whereas a sustained virologic response (SVR) can be achieved only in 50 % of patients infected with HCV genotype 1 [10–12].

Recently, direct-acting antivirals (DAAs) that target specific viral proteins of the HCV life cycle, have been developed and some of them have already been approved

* Correspondence: jamell.larousse@gmail.com

†Equal contributors

¹LR11-IPT-09, Epidémiologie et diversité génétique des virus hépatiques et entériques humains, Institut Pasteur de Tunis, 13 Place Pasteur, 1002 Tunis Belvédère, Tunisia

²CNRS-UMR 5234, Microbiologie fondamentale et Pathogénicité, University of Bordeaux 2, Bordeaux, France

Full list of author information is available at the end of the article

in some countries for the treatment of HCV infection in combination with PEG-IFN α /RBV as well as in IFN-free regimens [13]. These molecules include a range of non-structural (NS) 3/NS4A protease, NS5B polymerase and NS5A inhibitors [14].

NS5A inhibitors target the domain I of NS5A protein and have been shown to block phosphorylation of NS5A, which is essential for viral RNA replication and inhibits the assembly and release of viral particles [15, 16]. These inhibitors have been tested in clinical trials. Data for first-generation NS5A inhibitors such as daclatasvir (DCV), ledipasvir (LDV) and ombitasvir (OBV) are available. The effectiveness of DCV has been studied in combination with PEG-IFN α /RBV among naïve patients. For a treatment lasting of 24 or 48 weeks, SVR rates were 59 and 58 % in patients with subtype 1a, 78 and 87 % in patients with subtype 1b, and 67 and 100 % in patients with HCV genotype 4, respectively [15]. In naïve patients, the combination of sofosbuvir (SOF)/LDV, administered for 12 weeks with or without RBV, has been associated with SVR rates of 95 % [17, 18]. Similar response rates were obtained with treatment durations of only 8 weeks in patients with a fibrosis score of F0-F1 [18]. In patients failing a first-line therapy with the association PEG-IFN α /RBV/first-generation protease inhibitors, SVR rates with SOF/LDV were 95 and 99 % after 12 and 24 weeks of treatment respectively [17]. OBV was evaluated in vivo in a 3-day monotherapy study in 12 HCV genotype 1-infected patients at 5, 25, 50 and 200 mg dosed once daily and showed significant efficiency [19].

The rapid replication rate of HCV and the low fidelity of its polymerase result in a sequence variation in the HCV population, leading to a quasi-species and the potential selection of drug-resistant mutations [14]. The efficacy of DAA is limited by the presence of these mutations resulting in amino acid substitutions within the targeted proteins which affect viral sensitivity to these compounds [14]. Monotherapy studies with NS5A inhibitors have revealed the rapid emergence of resistance mutations to these drugs [20]. In vitro or in vivo, five major positions of mutations in the NS5A HCV protein (28; 30; 31; 58 and 93) have been reported to be associated with different levels of resistance to NS5A inhibitors [14]. It has been demonstrated that HCV NS5A inhibitors should be used in combination regimens potent enough to prevent the emergence of resistance mutations [21].

Variants conferring resistance to NS5A inhibitors exist naturally within HCV quasispecies populations in the absence of any previous exposure to these drugs [16, 22–24] while they are frequently selected at failure with treatment including HCV NS5A inhibitors [21].

HCV NS5A inhibitors are not yet available in Tunisia, but it is very important to determine the natural prevalence of such substitutions conferring resistance to NS5A

inhibitors before their introduction in the country for more extensive treatment of HCV infection.

The aim of this study was to investigate the natural prevalence of mutations conferring resistance to NS5A inhibitors in clinical strains from treatment-naïve Tunisian patients infected with HCV genotype 1.

Results

Baseline characteristics of the patients

All patients were infected with HCV genotype 1 (1b: 142; 1a:7), all of them were naïve of anti-HCV treatment and none was co-infected with hepatitis B virus (HBV) or human immunodeficiency virus (HIV). Their median age was 56 years. Forty-five patients (30 %) out of 149 were male and 104 patients (70 %) were female. The median HCV load was 1,955,625 IU/ml [range 9140-16,800,000 IU/ml]. 49 % of patients had liver cirrhosis.

Prevalence of NS5A inhibitor resistance mutations

The NS5A gene was successfully sequenced in 112 out of 149 (75.1 %) samples that were amplified by nested PCR. Among the 112 NS5A sequences obtained, 7 sequences (6.2 %) were HCV genotype 1a and 105 (93.8 %) HCV genotype 1b.

Sequencing and alignments of the 112 NS5A sequences allowed the identification of amino acid substitutions implicated in resistance to HCV NS5A inhibitors (Table 1).

Amino acid substitutions conferring resistance to HCV NS5A inhibitors were detected in both subtypes 1a and 1b strains.

In subtype 1a strains, amino acid substitutions conferring resistance to HCV NS5A inhibitors were observed in 1 sequence out of 7 (14.2 %). This sequence showed the M28V substitution associated with very low-level resistance to DCV and displayed 58-fold resistance to OBV.

In genotype 1b strains, amino acid substitutions associated with resistance to HCV NS5A inhibitors were observed in 17/105 (16.2 %) sequences analyzed. Three sequences (3/105; 2.8 %) exhibited the substitution L31M and six sequences (6/105; 5.7 %) showed the Y93H variant. These mutations are considered as primary resistance mutations. The L31M substitution is known to confer 3-fold resistance to DCV and 2.09-fold resistance to LDV. The Y93H mutation is known to confer 24-fold resistance to DCV, 77-fold resistance to OBV and very high-level resistance to LDV yielding 1319-fold resistance. Six sequences (6/105; 5.7 %) exhibited the R30Q substitution and P58S was present in four sequences (4/105; 3.8 %). These two substitutions are known as secondary resistance mutations that increase the resistance of primary mutations but do not confer resistance by themselves.

Table 1 Amino acid substitutions in NS5A region of treatment-naïve patients infected with HCV genotypes 1a (n = 7) and 1b (n = 105)

NS5A residues		Resistance mutations		Prevalence of observed resistance mutations (%)		DAA
Genotypes		Genotypes		Genotypes		
1a	1b	1a	1b	1a	1b	
	L23		F			Daclatasvir
M28	L28	T/V	M/V	V (1/7; 14.2 %)		Daclatasvir Ombitasvir
Q30	R30	H/E/R/K	Q		Q (6/105; 5.7 %)	Daclatasvir Ombitasvir
L31	L31	M/V	F/M/V		M (3/105; 2.8 %)	Daclatasvir Ledipasvir Ombitasvir
P32	P32	L	L			Daclatasvir
	P58		S		S (4/105; 3.8 %)	Daclatasvir
Y93	Y93	C/H/N	C/H/N		H (6/105; 5.7 %)	Daclatasvir Ledipasvir Ombitasvir

Data interpreted according to Krishnan et al. [19] Paolucci et al. [24] and Fridell et al. [27]

None of the 112 NS5A sequences from either subtype contained the P32L mutation, which is known to be a primary resistant variant associated with high-level resistance to HCV NS5A inhibitors.

Combinations of viral variants in the NS5A region were rare. No combinations of viral variants were observed in genotype 1a. Among the 105 NS5A 1b sequences analyzed, only two sequences (2/105; 1.9 %) showed combinations of two resistant variants R30Q + Y93H. When present on the same genome, this combination is known to confer 284-fold resistance to OBV.

Discussion

In this study, the first in the Tunisian population, 149 treatment-naïve patients infected with HCV genotype 1 were evaluated to determine the natural prevalence of HCV variants resistant to NS5A inhibitors. The sequencing technology used was the Sanger method which is known to allow detection of dominant variant populations above 20 %. We cannot eliminate minor variant populations that might have been detected by ultra-deep pyro-sequencing, whose threshold for detecting minor variants is estimated to be fairly lower than the Sanger threshold.

Baseline identification of pre-existing mutations resistant to anti-HCV inhibitors in treatment-naïve patients is essential for defining new DAAs therapies [24]. Some studies have reported that all amino acid substitutions associated with resistance to HCV NS5A inhibitors are located in the N-terminal region of NS5A [25, 26]. Of note, some studies have shown that the majority of resistance mutations observed in vivo are at positions M28, Q30, L31 and Y93 for HCV genotype 1a and at positions L31 and Y93 for genotype 1b [27, 28].

In this work some resistance mutations conferring resistance to HCV NS5A inhibitors such as DCV, LDV and OBV were observed. One out of 7 (14.2 %) patients with subtype 1a and 17 out of 105 (16.2 %) with subtype 1b showed amino acid substitutions within the NS5A inhibitor resistance sites. In this study, the number of

patients infected with HCV genotype 1b was very large compared to the number of patients infected with HCV genotype 1a, which is due to the high 80 % prevalence of genotype 1b in Tunisia [6–8]. In view of the low number of 1a isolates studied, it is not possible to make a definitive comparison of the resistance mutation to NS5A inhibitors between both subtypes.

Some studies have described the natural prevalence of substitutions conferring resistance to HCV inhibitors in patients naïve to treatment with NS5A inhibitors. In Italy, Paolucci et al. reported a frequency of 12.5 % and 53.3 % of substitutions involved in resistance to HCV NS5A inhibitors in DAA treatment-naïve patients infected with genotype 1a and 1b, respectively [24]. Suzuki et al. reported 11.2 % of mutations L31M/V and Y93H conferring resistance to HCV NS5A inhibitors in treatment-naïve patients infected with HCV genotype 1b in Japan [23]. In the present study we considered all mutations conferring resistance to HCV NS5A inhibitors for genotype 1b and our results are close to those provided by Suzuki et al.

In subtype 1b strains, the primary resistance mutations L31M conferring low-level resistance to DCV [27] and Y93H conferring high-level resistance to DCV [27] and OBV [19] and very high-level resistance to LDV [24] were observed in three (2.8 %) and six sequences (5.7 %), respectively. A previous study demonstrated that the prevalence of these two key mutations associated with resistance to NS5A inhibitors ranges from 6 to 12 % among genotype 1b sequences [29]. The prevalence of these mutations may reduce the barrier of resistance and influence virologic response [29]. Bartels et al. found a prevalence of 6.2 % and 3.7 % of the resistant variants L31M and Y93H, respectively in patients infected with subtype 1b [30]. These results are close to those observed in the present study. Substitutions associated with resistance to NS5A inhibitors have been associated with low rates of virologic response in some DCV-based regimens [29]. However, Suzuki et al. demonstrated in a phase

II study that many patients with pre-existing resistance mutations to NS5A inhibitors were cured of their chronic HCV infection [31].

Moreover, other substitutions like R30Q (5.7 %) and P58S (3.8 %) were found. These variants are known as secondary resistance mutations that increase the resistance of primary mutations but do not confer resistance by themselves [25]. None of the 112 NS5A sequences analyzed for either subtype showed any substitution at position 32, which is known to confer high-level resistance to DCV for subtype 1a [25] and a moderate level of resistance for subtype 1b [25]. These results are similar to those in Bartels' study [30].

In subtype 1a, a primary resistance mutation in the NS5A region M28V conferring low-level resistance to DCV [25] and high-level resistance to OBV [19] was observed in one sequence (14.2 %). One study has demonstrated that DCV is characterized by a low genetic barrier of resistance, notably for genotype 1a in which the resistance to the drug can be acquired through a single mutation [29].

In conclusion, the present study in treatment-naïve Tunisian patients infected with HCV genotype 1b demonstrates a significant proportion of substitutions conferring resistance to HCV NS5A. Their influence in the context of DAAs therapies has not yet been fully investigated and should be taken into consideration. Further studies are needed to determine the impact of the NS5A baseline resistance mutations on the treatment outcome in clinical trials investigating combination therapies of NS5A inhibitors with other classes of DAAs, although it can be predicted that combination therapies would raise the resistance barrier and reduce the importance of natural substitutions at resistance positions to NS5A inhibitors.

Materials and methods

Patients

The current study included 149 Tunisian patients infected with HCV genotype 1 who were referred to the gastroenterology department in three Tunisian University Hospitals between 2009 and 2011: Habib Bougatfa University Hospital (Bizerte), La Rabta University Hospital (Tunis) and Mohamed Tahar Maamouri University Hospital (Nabeul). Plasma samples were collected from each patient after obtaining written informed consent.

NS5A amplification

Total RNA was extracted from 140 µl of plasma using the QIAamp viral RNA method (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. After reverse transcription (RT) using the SuperScript® III One-Step RT-PCR system with Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), a

nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) was performed with AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France).

HCV RNA was amplified as previously described using primers 1a-NS5A-F0 (5'-GACATCTGGGACTGGATATGYGA -3'; nt 6276–6298) and 1a-NS5A-R0 (5'-GTCCAGGWRTARGACATYGAGCA-3'; nt 7599–7621) for subtype 1a and 1b-NS5A-F0 (5'-GAYGTTTGGGAYTGGATATGCAC-3'; nt 6276–6298) and 1b-NS5A-R0 (5'-GTCCAYGWRTARGACATYGAGCA -3'; nt 7599–7621) for subtype 1b. The PCR product obtained was 1345 bp in size [24]. Briefly, the PCR products in the first PCR round were obtained by using the following conditions: 30 min at 50 °C for the RT followed by denaturation at 94 °C for 10 min and then 40 cycles of amplification. Each cycle consisted of denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 2 min. These steps were followed by an extension step at 68 °C for 10 min.

For the nested PCR, two overlapping fragments of DNA were amplified. For subtype 1a, the first fragment was amplified as previously described [24] using the primers 1a-NS5A-F1 (5'-GATATGYGAGGTGYTGAGCGA-3'; 6290–6310) and 1a-NS5A-SeqR (5'-AAGGAGTCCARRATCACCAC -3'; nt 7089–7108) and the second fragment was amplified using the primers 1a-NS5A-SeqF (5'-ARCTGTCYGCWCCATCTCTCAAGG-3'; nt 6955–6978) and 1a-NS5A-R0 the same primer used in the first PCR round.

For subtype 1b, the first fragment was amplified using the primers 1b-NS5A-F1 (5'-GATATGYACGGTGYTGAYTGA-3'; nt 6290–6310) and 1b-NS5A-SeqR (5'-AARGAGTCCARRATYACYAC -3'; nt 7089–7108) and the second fragment was amplified using the primers 1b-NS5A-SeqF (5'-ARCTGTCYGCWCCATCTCTCAAGG -3'; nt 6955–6978) and 1b-NS5A-R0 as previously described [24]. For both subtypes, the PCR products obtained were 818 bp and 666 bp in size for the first and second amplified fragments, respectively.

Two microliters from the first PCR reaction were used in the nested PCR. The amplification conditions were the same for both subtypes: initiation of denaturation at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 30 s, primer annealing at 56 °C for 30 s, and primer extension at 72 °C for 2 min, followed by a final extension of 10 min at 72 °C. The PCR amplification products were visualized on 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide under UV transilluminator after electrophoresis.

NS5A direct sequencing and sequence analysis

The nested PCR products were purified using the Microspin™ S-400 HR Columns, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions. DNA sequencing was performed using the Big Dye® Terminator

v 3.1 Cycle Sequencing Kit with a DXL 3500 DX sequencer (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). The same primers used in the two semi-nested PCR for the amplification of the NS5A region for both subtypes 1a and 1b were used for sequencing in this region.

Nucleotide sequences were aligned with reference sequences of different subtypes with SeqScape v 2.7 (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) and analyzed for the presence of previously identified mutations conferring resistance to NS5A inhibitors. GeneBank accession numbers for NS5A reference sequences are AF009606 for subtype 1a and AY045702 for genotype 1b. The threshold of nucleotide mixture detection during sequencing of samples is estimated to be around 20 %.

Mutations conferring resistance to HCV NS5A inhibitors

NS5A sequences were screened for amino acid substitutions conferring resistance to NS5A inhibitors. For genotype 1b, sequences were screened for variants L31F/M/V, P32L and Y93C/H/N, which act as primary resistance mutations and L23F, R30Q and P58S, which act as secondary resistance substitutions, thus enhancing the resistance of primary mutations but not conferring resistance by themselves. For subtype 1a, sequences were screened for substitutions M28T/V, Q30H/E/R/K, L31M/V, P32L and Y93C/H/N, which act as primary resistance mutations [19, 24, 25, 27].

Abbreviations

HCV: Hepatitis C Virus; NS: Non-Structural; DAAs: Direct-Acting Antivirals; PEG-IFN α : Pegylated alpha Interferon; RBV: Ribavirin; SVR: Sustained Virologic Response; DCV: Daclatasvir; LPV: Ledipasvir; OBV: Ombitasvir; SOF: Sofosbuvir; HBV: Hepatitis B Virus; HIV: Human immunodeficiency virus; RNA: Ribonucleic Acid; RT: Reverse Transcription; PCR: Polymerase Chain Reaction; NT: Nucleotide; DNA: Deoxyribonucleic Acid.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

JAL, PT, PRP, HT and HF participated in the study design, in the data analysis and in discussing and drafting the manuscript. JAL, PRP and BT carried out the experiments and participated in the sequence alignment. MMS, NBM and IC contributed to identification of the patients included in the study, provided serum samples from patients and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the patients who participated in this clinical study and are particularly grateful to Mr Ray Cooke for linguistic assistance. This study was supported by the CNRS-UMR 5234 (Microbiologie fondamentale et Pathogénicité) Bordeaux University and the Tunisian Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology (LR "Epidémiologie et diversité génétique des virus hépatiques et entériques humain, Institut Pasteur de Tunis" – Contract: LR11-IPT-09).

Author details

¹LR11-IPT-09, Epidémiologie et diversité génétique des virus hépatiques et entériques humains, Institut Pasteur de Tunis, 13 Place Pasteur, 1002 Tunis Belvédère, Tunisia. ²CNRS-UMR 5234, Microbiologie fondamentale et Pathogénicité, University of Bordeaux 2, Bordeaux, France. ³Virology Laboratory, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France. ⁴Department of Gastroenterology, Hospital of Tahar Maamouri, Nabeul, Tunisia. ⁵Department

of Gastroenterology B, La Rabta Hospital, Tunis, Tunisia. ⁶Department of Gastroenterology, Habib Bougatfa Hospital, Bizerte, Tunisia.

Received: 24 November 2014 Accepted: 29 May 2015

Published online: 06 June 2015

References

- Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 2004;24:3–8.
- Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG, et al. The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: A phylogenetic and phylogeographic analysis. *PLoS Med.* 2009;12:e1000198.
- Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:2057–61.
- Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C Virus 15 years on. *J Gen Virol.* 2004;85:3173–88.
- Triki H, Said N, Ben Salah A, Arrouji A, Ben Ahmed F, Bouguerra A, et al. Seroepidemiology of hepatitis B, C and delta viruses in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:11–4.
- Gorgi Y, Yalaoui S, Ben Nejma HL, Azzouz MM, Hsairi M, Ben Khelifa H, et al. Detection of hepatitis C virus in the general population of Tunisia. *Bull Soc Pathol Exot.* 1998;91:177.
- Djebbi A, Triki H, Bahri O, Cheikh I, Sadraoui A, Ben Ammar A, et al. Genotypes of hepatitis C virus circulating in Tunisia. *Epidemiol Infect.* 2003;130:501–5.
- Mejri S, Salah AB, Triki H, Alaya NB, Djebbi A, Dellagi K. Contrasting patterns of hepatitis C virus infection in two regions from Tunisia. *J Med Virol.* 2005;76:185–93.
- Bouzzargou N, Hassen E, Mahfoudh W, Gabbouji S, Schoerer E, Ben Yahia A, et al. NS5A_{NSDR-V3} region genetic variability of Tunisian HCV-1b strains: correlation with the response to the combined Interferon/Ribavirin therapy. *J Med Virol.* 2009;81:2021–8.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: A randomized trial. *Lancet.* 2001;358:958–65.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves Jr FL, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002;347:975–82.
- Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goester T, Marcellin P, Sanchez-Papias J, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with CHC genotypes 2 or 3. *J Hepatol.* 2004;40:97–103.
- Hunt D, Pockors P. What are the promising new therapies in the field of chronic hepatitis C after the first generation direct acting antivirals? *Curr Gastroenterol.* 2013;15:303.
- Halfon P, Sarrazin C. Future treatment of chronic hepatitis C with direct acting antivirals: Is resistance important? *Liver Int.* 2012;32:79–87.
- Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies: The toolbox, strategies and challenges. *Gastroenterology.* 2014;146:1176–92.
- Pawlotsky JM. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol.* 2013;59:375–82.
- Lawitz E, Poordad FF, Pang PS, Hyland RH, Ding X, Mo H, et al. Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naïve and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet.* 2014;383:515–23.
- Kowdley KV, Gordon SC, Reddy KR, Rossaro L, Bernstein DE, Lawitz E, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis. *N Engl J Med.* 2014;370:1879–88.
- Krishnan P, Beyer J, Mistry N, Koev G, Reisch T, DeGoey D, et al. In vitro antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:979–87.
- Lim JP, Gally AP. Hepatitis C NS5A protein: two drug targets within the same protein with different mechanisms of resistance. *Curr Opin Virol.* 2014;8:30–7.
- Nakamoto S, Kanda T, Wu S, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World J Gastroenterol.* 2014;11:2902–12.
- Plaza Z, Soriano V, Vispo E, del Mar GM, Barreiro P, Selen E, et al. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitors. *Antivir Ther.* 2012;17:921–6.

23. Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Seko Y, Kawamura Y, et al. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J Clin Virol.* 2012;54:352–4.
24. Paolucci S, Floria L, Mariana B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virol J.* 2013;10:355.
25. Fridell RA, Qiu D, Wang C, Valera L, Gao M. Resistance analysis of the HCV NS5A inhibitors BMS-790052, in the in vitro replicon system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:3641–50.
26. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature.* 2010;465:96–100.
27. Fridell RA, Wang C, Sun JH, O'Boyle II DR, Nower P, Valera L, et al. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein NS5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: In Vitro and in vivo correlations. *Hepatology.* 2011;54:1924–35.
28. Gao M. Antiviral activity and resistance of HCV NS5A replication complex inhibitors. *Curr Opin Virol.* 2013;5:514–20.
29. Poveda E, Wyles DL, Mena A, Pedreira JD, Castro-Iglesias A, Cachay E. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. *Antivir Res.* 2014;108:181–91.
30. Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges AM, Dorrian JL, De Meyer S, et al. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment. *J Virol.* 2013;87:1544–53.
31. Suzuki Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Chayman K, et al. Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *J Hepatol.* 2013;58:655–62.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Title: Genetic variability of NS3, NS5A and NS5B regions of hepatitis C virus in Tunisians naïve-patients.

ABSTRACT:

Introduction: Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of liver disease worldwide. This RNA virus is responsible for hepatitis C, which leads to the development of cirrhosis and liver cancer. According to the World Health Organization, HCV infects more than 170 million people worldwide, about 3% of the population. Chronic hepatitis C still know in Tunisia low cure rates for genotype 1, because the currently standard treatment available is combination therapy of pegylated interferon plus ribavirin. At present, the development of different molecules that specifically target HCV, called direct-acting antivirals (DAA) appears as a potential revolution in the treatment of HCV infection. These DAA include protease inhibitors (PI), nucleos(t)ide (NI) and non-nucleoside inhibitors (NNI) for NS5B polymerase and NS5A inhibitors. The viral quasispecies is formed by a complex mixture of viral variants including variants associated with variable degrees of resistance to DAA. These variants may therefore exist naturally in absence of drug pressure and may affect response to different treatments by DAA. Our objective was to determine the prevalence of variants associated with resistance in circulating Tunisian strains preamble to the introduction of these molecules in Tunisia.

Methods: Amplification and direct sequencing of NS3 protease, NS5B polymerase and NS5A region were performed in 149 Tunisian naïve patients infected with HCV genotype 1 (genotype 1b = 142; genotype 1a = 7) .

Results: Twelve sequences NS3 (12/131; 9.2%) showed mutations known to confer resistance to PI. One sequence (1/95; 1.1%) showed the V321I mutation known to confer resistance to NS5B-IN. Thirty four sequences (34/95; 35.8%) showed mutations known to reduce the sensitivity of NS5B-INN. One genotype 1a sequence (1/7; 14.3%) and 17 genotype 1b sequences (17/112; 16.2%) showed mutations known to confer resistance to NS5A inhibitors.

Conclusions: Our study highlighted the presence of substitutions conferring decreased susceptibility to DAA in naïve patients infected with HCV genotype 1. Field studies will be needed to evaluate the impact of these mutations on the treatment response.

Keywords: HCV ; DAA ; protease inhibitors (IP) ; nucleos(t)ide inhibitors (NI) ; non-nucleoside inhibitors (NNI) ; NS5A inhibitors ; variants associated with resistance.

RESUME :

Introduction : Le virus de l'hépatite C (VHC), est l'une des premières causes de pathologie hépatique dans le monde. Ce virus à ARN est responsable de l'hépatite C qui aboutit au développement de la cirrhose et du cancer du foie. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le VHC infecte actuellement plus de 170 millions de personnes dans le monde, soit 3% de la population. L'hépatite C chronique connaît toujours en Tunisie un taux de guérison faible pour le génotype 1 car le traitement standard actuellement disponible est la bithérapie interféron pégylé associé à la ribavirine. A l'heure actuelle, le développement de différentes molécules ciblant spécifiquement le VHC, appelées les antiviraux à action directe (AAD), apparaît comme une potentielle révolution dans le traitement de l'infection par le VHC. Ces AAD comprennent les inhibiteurs de protéase (IP), les inhibiteurs nucléos(t)idiques (IN) et les inhibiteurs non-nucléosidiques (INN) de la polymérase NS5B ainsi que les inhibiteurs de la protéine NS5A. La quasi-espèce virale est formée d'un mélange complexe de variants viraux parmi lesquels se trouvent des variants associés à des degrés variables à la résistance aux AAD. Ces variants peuvent donc exister naturellement en absence de toute pression médicamenteuse et sont susceptibles d'avoir un impact sur la réponse aux différents traitements par AAD. Notre objectif était de déterminer la prévalence des variants associés à la résistance dans les souches tunisiennes circulantes en préambule à l'introduction de ces molécules en Tunisie.

Méthodes : L'amplification et le séquençage direct de la protéase NS3, de la polymérase NS5B ainsi que la région NS5A ont été effectuées chez 149 patients tunisiens naïfs de traitement et infectés par le VHC de génotype 1 (génotype 1b = 142 ; génotype 1a = 7).

Résultats : Douze séquences NS3 (12/131 ; 9,2%) ont montré des mutations connues pour conférer une résistance aux IP. Une seule séquence (1/95 ; 1,1%) a montré la mutation V321I connue pour conférer une résistance aux IN-NS5B. Trente quatre séquences (34/95 ; 35,8%) ont montré des mutations connues pour diminuer la sensibilité des INN-NS5B. Une seule séquence de génotype 1a (1/7 ; 14,3%) et 17 séquences de génotype 1b (17/112 ; 16,2%) ont montré des mutations connues pour conférer une résistance aux inhibiteurs de la protéine NS5A.

Conclusions : Notre étude a permis de mettre en évidence la présence de substitutions conférant une diminution de la sensibilité aux AAD chez des patients tunisiens naïfs de tout traitement anti-VHC. Des études *in situ* seront nécessaires pour évaluer l'impact de ces mutations sur la réponse au traitement.

MOTS CLES : VHC ; AAD ; inhibiteurs de protéase (IP) ; inhibiteurs nucléos(t)idiques (IN) ; inhibiteurs non-nucléosidiques (INN) ; inhibiteurs de la protéine NS5A ; variants associés à la résistance.

Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité CNRS-UMR 5234-Université de Bordeaux
Laboratoire de Virologie-CHU de Bordeaux-France
Laboratoire de Virologie Clinique-Institut Pasteur de Tunis-Tunisie