UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Thèse présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline Sciences du Vivant

Domaine Aspects moléculaires et cellulaires

de la Biologie

Par Rémy MOENNE-LOCCOZ

Impact des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du virus de l'hépatite C sur la réponse au traitement antiviral interféron-α pégylé/ribavirine chez des patients atteints d'hépatite chronique C

Présentée et soutenue publiquement le 05 Octobre 2011

Membres du jury :

Rapporteur externe	**:**	**Prof. Patrice ANDRE, PU-PH, HDR, Inserm U851, Hospices Civils de Lyon, Lyon**
Rapporteur externe	**:**	**Prof. Marie-Edith LAFON, PU-PH, HDR, UMR-CNRS 5234, CHU de Bordeaux, Bordeaux**
Rapporteur interne	**:**	**Dr. Gilles PREVOST, MCU-PH, HDR, EA-4438 Médecine Translationnelle, Institut de Bactériologie, UdS, Strasbourg**
Examinateur	**:**	**Prof. Jean-Pol FRIPPIAT, PU, HDR, JE 2537 Développement et Immunogénétique, Université Henri Poincaré, Vandoeuvre-lès-Nancy**
Directeur de thèse	**:**	**Dr. Evelyne SCHVOERER, MCU-PH, HDR, Inserm U748, Institut de Virologie, CHU de Strasbourg, UdS, Strasbourg**

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le professeur Thomas Baumert pour m'avoir accueilli dans son laboratoire au cours de mon stage de master et de mes trois années de thèse. Je voudrais remercier le professeur Françoise Stoll-Keller pour son accompagnement durant mon doctorat. Je souhaiterais exprimer ma reconnaissance au professeur Jean-Pierre Gut pour sa bienveillance et son intérêt pour ces travaux.

Je voudrais également remercier le professeur Patrice André, le professeur Marie-Edith Lafon, le docteur Gilles Prévost et le professeur Jean-Pol Frippiat pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Evelyne, je voudrais te remercier pour tout ce que tu m'as appris durant ces trois années et demie que nous avons passées ensemble ainsi que pour ton soutien moral. Avec toute mon amitié.

Je souhaiterais aussi remercier Caroline, Anne-Claire et Aurélie pour leur implication et leur engagement dans le projet.

Je voudrais remercier John Murray pour son engagement dans le projet et les analyses statistiques.

Je souhaiterais remercier le professeur Michel Doffoël et le docteur François Habersetzer du CHU de Strasbourg, ainsi que monsieur Vincent Thibault (hôpital de la Pitié-Salpêtrière (Paris)), madame Anne-Marie Roque-Afonso (CHU de Villejuif), monsieur Yazid Baazia (CHU de Bobigny), madame Catherine Gaudy (CHU de Tours), madame Cécile Henquell (CHU de Clermont-Ferrand), madame Florence Abravanel (CHU de Toulouse), madame Pascale Trimoulet (CHU de Bordeaux) et madame Sophie Vallet (CHU de Brest) pour leur aide à l'inclusion des patients et à la collecte des souches virales.

Je souhaiterais remercier la Fondation Transplantation, le conseil régional d'Alsace, la société Abbott France et la société Roche Pharma pour leur soutien financier.

Je souhaiterais remercier tous les membres de l'unité Inserm U748 et en particulier : Marine pour la préparation des lignées cellulaires, Cathy pour ton écoute et tes conseils d'hygiène et

sécurité, Eric S. pour tes conseils techniques et enfin Céline, Laurent, Thomas, Julien, Valentin et Alexandre pour les moments de rigolade.

Je voudrais exprimer ici ma reconnaissance auprès des technicien(ne)s du secteur diagnostique pour l'aide technique apportée, et en particulier Anne, Sandrine, Stéphanie, Frédéric et Cathy.

Je souhaiterais également remercier Aurélien, Miko, Molusk, Etienne, Mitch, Ska, Charlène, Mano, Antoine, Tony pour leur amitié. Bien que je vous aie un peu délaissés au cours de ces trois années "chargées", je compte bien me rattraper les gars !

Je voudrais aussi remercier toute ma famille et en particulier mes parents qui m'ont soutenu tout au long des mes études. Avec toute mon affection.

Et bien sûr, Maeva, je souhaiterais te remercier pour ton soutien, ta compréhension et ta patience. Avec tout mon amour.

"Ce n'est pas la profession qui honore l'homme
mais c'est l'homme qui honore la profession"
Louis Pasteur (1822-1895)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS ……..……..... 1

SOMMAIRE ……..…... 4

INDEX DES ILLUSTRATIONS ……..…….. 6

LISTE DES ABREVIATIONS ……..……. 7

AVANT-PROPOS ……..…….. 9

INTODUCTION GENERALE …… 10

I. Découverte d'un virus responsable d'une hépatite non-A, non-B : le virus de l'hépatite C (VHC) …… 10

II. Caractéristiques cliniques du VHC …… 11

1). Prévalence de l'infection par le VHC …….. 11

a. Dans le monde ……. 11

b. En France ……. 13

2). Aspects cliniques et physiopathologie de l'infection par le VHC …… 13

a. Mode de transmission ……. 13

b. Manifestations cliniques de l'infection par le VHC ……. 15

c. Manifestations extra-hépatiques de l'infection par le VHC …….. 17

3). Traitement de l'infection chronique par le VHC ……..…… 17

a. Du premier traitement au traitement actuel de référence par IFN-α pégylé et ribavirine …….. 17

b. Mode d'action de l'interféron-α et de la ribavirine ……. 19

- Interféron-α ……. 19

- Ribavirine …….. 21

c. Traitements émergeants et en perspective ……. 22

BIOLOGIE DU VHC ……..…… 28

I. Propriétés intrinsèques du VHC …… 28

1). Classification et caractéristiques biophysiques du VHC …….. 28

2). Organisation génomique du VHC ……..…….... 29

a. Les régions non-codantes ……. 30

b. Les régions codant les protéines virales ……... 31

- La protéine C ou Core …….. 31

- La protéine ARFP ou F …….. 32

- Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 ……. 33

- La protéine p7 ……. 36

- La protéine NS2 …….. 36

- Les protéines NS3 et NS4A ……. 37

- La protéine NS4B ……. 37

- La protéine NS5A ……. 38

- *La protéine NS5B* *38*

II. Variabilité génétique du VHC 39

III. Entrée du VHC dans la cellule hôte : première étape cruciale du cycle viral 41

1). Facteurs d'entrée impliqués dans l'attachement et l'entrée virale 42

2). Processus d'entrée du VHC 48

MODELES D'ETUDE DU VHC 51

I. Les modèles *in vitro* 51

II. Les modèles animaux 56

VHC ET REPONSE AU TRAITEMENT ANTIVIRAL A BASE D'INTERFERON-α 59

I. Facteurs influençant la réponse au traitement par IFN-α pégylé et ribavirine 59

1). Facteurs d'hôte 59

2). Facteurs virologiques 59

II. Glycoprotéines d'enveloppe virale E1 et E2 dans la réponse au traitement 60

1). Interaction des glycoprotéines avec des facteurs cellulaires et réponse à l'IFN-α 60

2). Interaction des glycoprotéines avec les facteurs d'entrée et réponse au traitement 60

3). Implication des glycoprotéines dans la réponse immunitaire et réponse au traitement 61

4). Rôle des glycoprotéines dans le leucotropisme du VHC et réponse au traitement 62

5). Implication des autres protéines du VHC dans la réponse au traitement 63

OBJECTIFS DU PROJET 65

SYNTHESE DES TRAVAUX EXPOSES DANS L'ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION 67

ARTICLE : "Hepatitis C virus envelope glycoprotein signatures and resistance to antiviral treatment" *(en cours de soumission)* 71

DISCUSSION 104

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 107

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 110

ANNEXES 128

MATERIELS & METHODES 128

REVUE TECHNIQUE PUBLIEE 160

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES 168

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma de l'approche expérimentale de Choo *et al.* (1989) ayant abouti à l'isolement moléculaire et à l'identification du VHC ……..……..... 11

Figure 2 : Prévalence du VHC dans le monde en 2010 ……..…….. 12

Figure 3 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC ……..…….. 15

Figure 4 : Cinétique des marqueurs de l'infection VHC aiguë résolutive et de l'infection VHC aiguë qui évolue vers une infection chronique …….. 16

Figure 5 : Voie de signalisation de l'IFN-α ……. 20

Figure 6 : Représentation schématique d'un virion du VHC …….. 28

Figure 7 : Organisation génomique du VHC ……... 30

Figure 8 : Schéma de la région 5' non-codante du VHC ……...……. 31

Figure 9 : Cartographie fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC ……...……... 35

Figure 10 : Cycle viral du VHC au niveau de sa principale cible cellulaire : l'hépatocyte ……..…….. 42

Figure 11 : Schéma de CD81 : corécepteur cellulaire du VHC ……..…… 43

Figure 12 : Schéma de SR-BI : corécepteur cellulaire du VHC ……..…… 44

Figure 13 : Schéma de CLDN-1 : corécepteur cellulaire du VHC ……..…… 46

Figure 14 : Schéma d'OCLN : corécepteur cellulaire du VHC ……...……...……. 47

Figure 15 : Production des HCVpp comportant le gène rapporteur de la luciférase …….……. 54

Figure 16 : Tests de neutralisation des HCVpp mutées *versus* non-mutées par des sérums hétérologues pré-thérapeutiques issus de patients infectés par un VHC de génotype 1a ou 1b ……... 69

Figure 17 : Tests d'infection des HCVpp mutées *versus* non-mutées sur cellules Huh7.5 standards et sur cellules Huh7.5 surexprimant individuellement les différents corécepteurs cellulaires du VHC : CD81, SR-BI, CLDN-1 ou OCLN ……..……. 70

Tableau 1 : Variabilité génétique du VHC …….. 39

LISTE DES ABREVIATIONS

3'NC : Région 3' non-codante
5'NC : Région 5' non-codante
Ac : Anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ALAT : Transaminase - alanine amino transférase
Alb-uPA : *Albumin-urokinase-type plasminogen activator*
Apo : Apolipoprotéine
ARF : *Alternative reading frame*
ARN : Acide ribonucléique
ASAT : Transaminase - aspartate amino transférase
CHU : Centre hospitalier universitaire
CLDN : Claudine
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
cRVP : complète RVP
ECL1 : *Extracellular loop 1*
ECL2 : *Extracellular loop 2*
ELISA : *Enzyme linked immunosorbent assay*
Fc : Fragment constant d'un anticorps
GAG : Glycosaminoglycane
HCVcc : Clone infectieux du VHC en culture cellulaire
HCV-LP : Particule "*virus-like*" du VHC
HCVpp : Pseudoparticule rétrovirale du VHC
HDL : *High density lipoprotein*
HS : Heparan sulfate
HVR : *Hypervariable region*
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
INVS : Institut nationale de veille sanitaire
IRES : *Internal ribosome entry site*
ISDR : *Interferon sensitivity determining region*
ISG : *Interferon-stimulated gene*
IV : Intraveineuse
JFH-1 : *Japanese fulminant hepatitis-1*
LDL : *Low density lipoprotein*

LEL : *Large extracellular loop*
LVP : Lipo-viro-particule
mAc : Anticorps monoclonal
MEH : Manifestation extra-hépatique
NAc : Anticorps neutralisant
NANBH : Hépatite non-A, non-B
NCBI : *National center for biotechnology information*
NTP : Nucléotide triphosphate
OCLN : Occludine
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORF : *Open reading frame*
PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*
PBH : Ponction biopsie hépatique
PBMC : *Peripheral blood mononuclear cell*
PEG IFN-α : Interféron-α pégylé
PePHD : *PKR-eIF2α phosphorylation homology domain*
PKR : *Protein kinase RNA double stranded-dependent*
Protéine NS : Protéine non-structurale
RE : Réticulum endoplasmique
RT-PCR : *Reverse transcription - polymerase chain reaction*
RVP : Réponse virologique précoce
RVR : Réponse virologique rapide
RVS : Réponse virologique soutenue
SCID : *Severe combined immune deficiency*
sE2 : Glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC recombinante soluble
SEL : *Small extracellular loop*
SM : Signature moléculaire
SR-BI : *Scavenger receptor-class B type I*
UI : Unité internationale
VHA : Virus de l'hépatite A
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL : *Very low density lipoprotein*
wt : *wild-type*

AVANT-PROPOS

Dans le cas de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC), 75 à 85% des patients évoluent vers une infection persistante. La forme persistante de l'infection virale est responsable de la pathogénécité du VHC en raison du développement d'atteintes hépatiques, telles que la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Ces stades terminaux de la maladie associée à l'infection par le VHC représentent des indications majeures de transplantation de foie dans les pays industrialisés. En 2010, il a été estimé qu'environ 160 millions d'individus sont chroniquement infectés par le VHC dans le monde.

Aucun vaccin prophylactique n'est actuellement disponible. Le traitement antiviral de référence associe la combinaison interféron-α pégylé et ribavirine. Toutefois, il est très mal toléré sur le plan clinique, biologique et psychologique et n'est efficace que chez environ 50% des patients chroniquement infectés par un VHC de génotype 1, génotype le plus fréquent en Europe et en Amérique du Nord.

Depuis plusieurs années et dans le but d'améliorer le traitement anti-VHC et de développer des outils thérapeutiques spécifiques de certaines cibles virales, la recherche est active sur le cycle viral et les mécanismes par lesquels le VHC échappe au traitement antiviral de référence. En effet, les mécanismes d'échappement du VHC au traitement sont mal connus. Certains facteurs d'hôte tels que l'âge, le sexe, l'origine ethnique, les comorbidités ou encore des facteurs génétiques ont été mis en évidence pour leur corrélation avec la réponse à la bithérapie pégylée. Bien que des facteurs virologiques comme les niveaux de charge virale et la nature du génotype du VHC soient associés à la réponse au traitement, peu d'informations sont disponibles sur les caractéristiques moléculaires des protéines virales, en particulier les glycoprotéines d'enveloppe, en lien avec la résistance au traitement.

En raison du rôle important que jouent les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 dans le cycle viral et dans l'échappement aux réponses immunitaires de l'hôte, nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce projet à évaluer les caractéristiques moléculaires de ces glycoprotéines et leur lien potentiel avec la réponse au traitement antiviral de référence, tout d'abord par des approches de bio-informatique et ensuite par des tests fonctionnels.

Dans une première partie, ce manuscrit fait un état des lieux détaillé sur le sujet. Dans un second temps, il présente les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse et leurs implications. Les procédures expérimentales utilisées pour la réalisation du travail figurent en annexe.

INTRODUCTION GENERALE

I. Découverte d'un virus responsable d'une hépatite non-A, non-B : le virus de l'hépatite C (VHC)

Au début des années 70, des tests sérologiques spécifiques des virus de l'hépatite A (VHA) et B (VHB) ont été développés. En 1975, Feinstone *et al.* ont évalué une cohorte de 22 patients pour qui un diagnostic d'hépatite post-transfusionnelle était clairement établi. Les patients ont été testés avant et après transfusion sanguine pour le VHA, le VHB ainsi que pour d'autres agents viraux déjà connus à l'époque comme pouvant être responsables de dommages hépatiques (virus d'Epstein Barr et cytomégalovirus). Leurs résultats ont montré qu'aucun de ces virus n'étaient impliqués dans ces cas d'hépatite. En outre, la mise en cause d'un agent non-viral dans ce type d'hépatite a également été écartée. Ainsi, les auteurs en ont déduit qu'un probable nouvel agent viral inconnu pouvait être responsable de ces hépatites appelées "non-A, non-B" (NANBH) et que cet agent serait communément transmis dans le cadre de la transfusion sanguine (Feinstone *et al.*, 1975).

En 1978, Alter *et al.* réussirent à infecter des chimpanzés à partir de sérums en provenance de patients atteints d'une NANBH post-transfusionnelle. L'évidence biochimique et histologique du développement d'une hépatite était retrouvée chez tous les chimpanzés infectés. Comme la NANBH était transmise par des sérums de patients atteints aussi bien d'une hépatite aiguë que d'une hépatite chronique, une phase de portage chronique de l'agent responsable de la NANBH a alors été fortement suggérée (Alter *et al.*, 1978). Ainsi, bien que l'agent causal ne fût pas encore clairement identifié, les auteurs ont conclu que les NANBH étaient dues à un agent transmissible qui pouvait persister et rester infectieux durant une longue période.

Dans les années 80, une banque d'ADNc dérivée de sérums de chimpanzés atteints de NANBH a été construite par Choo *et al.* dans le bactériophage λgt11, lequel permettait une expression efficace des polypeptides codés par les ADNc (Choo *et al.*, 1989). Cette banque a ensuite été passée au crible avec des sérums de patients atteints de NANBH, ce qui a permis d'identifier un clone positif réactif aux anticorps de ces patients (clone 5-1-1). Les caractéristiques moléculaires de ce clone ont ensuite été étudiées (**figure 1**).

D'après les propriétés moléculaires du clone 5-1-1, c'est en 1989 après six ans de travail que Choo *et al.* ont enfin pu identifier pour la première fois l'agent viral responsable des NANBH (Choo *et al.*, 1989). Cet agent causal fut dès lors rebaptisé virus de l'hépatite C ou VHC.

Cette découverte a permis rapidement de prévenir la majorité des cas de transmission du VHC par transfusion sanguine. En effet, dès 1990, un premier test ELISA était disponible et a permis le dépistage systématique des donneurs dans la plupart des pays occidentaux. Ceci a permis de diminuer de plus de 70% l'incidence des hépatites dans le cadre de la transfusion sanguine pour arriver à un taux résiduel d'incidence de 1,5%, puis proche de 0% désormais. Les cas d'hépatite C post-transfusionnelle ont en effet été pratiquement éradiqués en 1992 avec l'arrivée d'un test ELISA de seconde génération, plus sensible (Alter & Houghton, 2000).

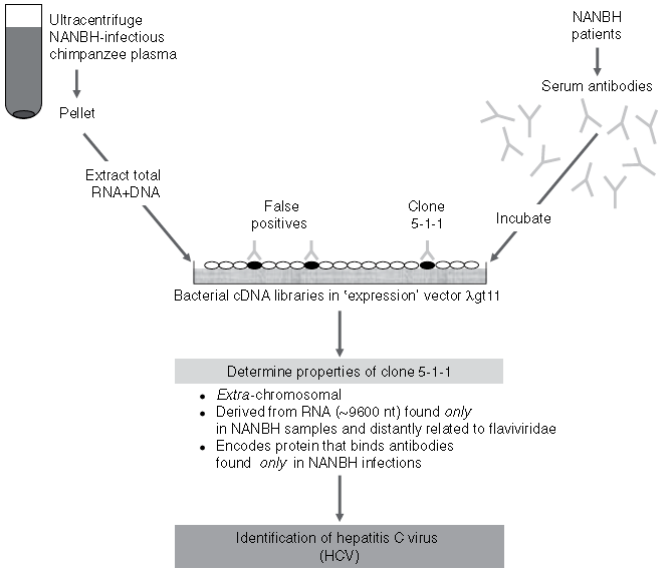


Figure 1. Schéma de l'approche expérimentale de Choo *et al.* (1989) ayant abouti à l'isolement moléculaire et à l'identification du VHC (d'après Houghton (Houghton, 2009)).

II. Caractéristiques cliniques du VHC

1). Prévalence de l'infection par le VHC

a. Dans le monde

Comme la plupart des infections aiguës par le VHC sont asymptomatiques, des données fiables sur l'incidence des nouveaux cas d'infection par le VHC sont difficiles à obtenir. Ainsi, comme la mesure de l'incidence ne produit que rarement des chiffres fiables, l'épidémiologie du VHC est souvent évaluée à partir de données de prévalence.

En 2010, à partir de données publiées, Lavanchy a estimé que la prévalence mondiale du VHC était de 2,35%, soit environ 160 millions d'individus chroniquement infectés risquant de développer une cirrhose suivie ou non d'un carcinome hépatocellulaire (Lavanchy, 2011). Ces estimations sont en accord avec les données fournies par l'OMS qui évalue à 130 - 170 millions les personnes aujourd'hui chroniquement infectées par le VHC à travers le monde. Bien que le VHC

soit endémique dans le monde entier, il existe de grandes disparités dans sa distribution géographique. Comme illustré dans la **figure 2**, les pays du continent américain (à l'exception de la Bolivie présentant un taux de prévalence de 4,7%), les pays d'Europe de l'Ouest et du Nord, la majorité des pays du Maghreb, les pays à l'extrême sud du continent africain, les pays d'Asie bordant le golfe du Bengale et l'Australie présentent des taux de prévalence relativement faibles (< 2%). Une grande disparité existe au sein des pays du Moyen-Orient qui affichent des taux de prévalence allant de < 1% jusqu'à > 10%. En effet, l'Egypte est un pays de forte endémicité atteignant un taux de prévalence du VHC de 14% (Lavanchy, 2011). La principale cause de ce taux élevé en Egypte remonte aux campagnes de traitement de masse de la bilharziose par administration parentérale d'antimoine. Ces campagnes ont été débutées dans les années 20 et arrêtées dans les années 80 (Frank *et al.*, 2000). Les procédures d'hygiène et de stérilisation du matériel entre chaque patient étaient souvent omises en raison d'un manque d'équipement et de contraintes de temps, ce qui a certainement engendré une vaste transmission de la maladie au sein de la population égyptienne. Les pays d'Europe de l'Est, d'Afrique Centrale et d'Asie sont globalement les plus touchés par le VHC et présentent des taux de prévalence de moyens à élevés. En effet, l'endémicité est globalement moyenne dans les pays d'Europe de l'Est, de l'Asie Centrale, Orientale et du Sud-Est avec des taux de prévalence variant entre 2 et 5% (à l'exception de l'Ouzbékistan et de la Mongolie atteignant des taux de prévalence élevés de 6,5% et 10,7%, respectivement). C'est l'Afrique Centrale qui regroupe le plus de pays à endémicité élevée dont une grande proportion affiche des taux de prévalence compris entre 5 et 10% et même au-delà. En effet le Cameroun et le Burundi atteignent des taux de prévalence de 13,8% et de 11,3%, respectivement (Lavanchy, 2011).

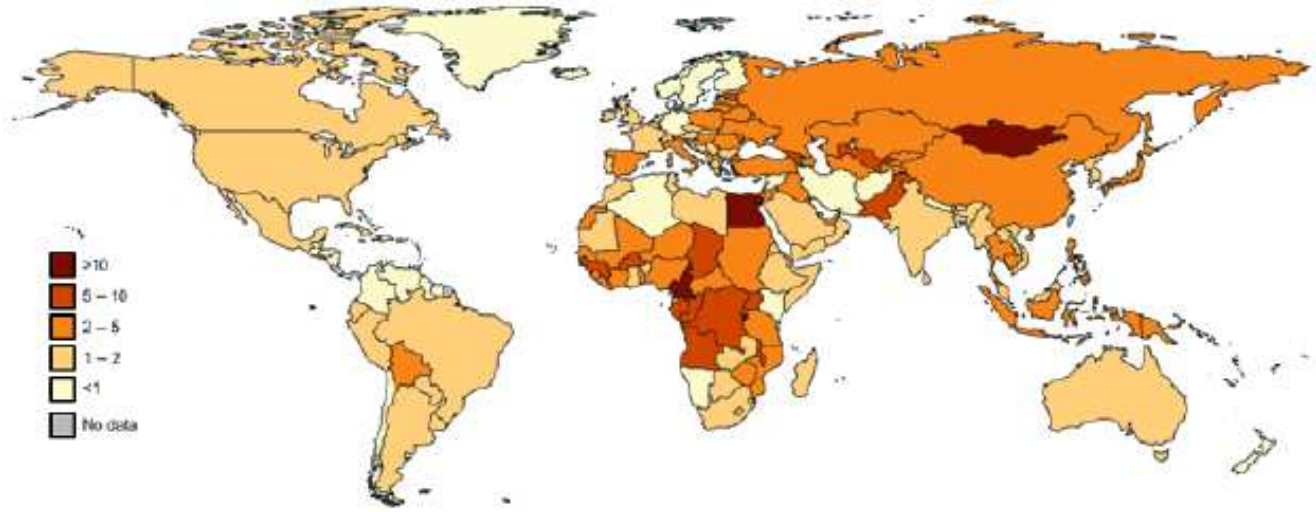


Figure 2. Prévalence du VHC dans le monde en 2010 (d'après Lavanchy (Lavanchy, 2011)).

b. En France

Une enquête de l'INVS incluant 14 416 sujets a été menée en 2004 afin d'évaluer la prévalence de l'infection par le VHC en France métropolitaine (INVS, 2007). Cette étude a permis d'estimer que le taux de prévalence d'anticorps anti-VHC dans la population française âgée de 18 à 80 ans était de 0,84%, soit environ 367 000 personnes porteuses d'anticorps anti-VHC. Parmi les personnes détectées séropositives dans l'étude, la prévalence de l'infection chronique par le VHC était estimée à 65%. Ainsi, le taux de prévalence de l'infection chronique au sein de la population française âgée de 18 à 80 ans a été estimé à 0,53%, soit environ 221 000 individus chroniquement infectés. Globalement, parmi les personnes diagnostiquées séropositives pour le VHC durant cette enquête, seulement 57,4% d'entre elles avaient connaissance de leur séropositivité.

L'étude a également montré que la séropositivité pour le VHC variait en fonction du sexe et de l'âge. En effet, la prévalence d'anticorps anti-VHC a été estimée chez les hommes et chez les femmes à 0,66% et 1,02%, respectivement. La prévalence d'anticorps anti-VHC la plus élevée était retrouvée chez les personnes âgées de 45 à 49 ans (2,28%) alors que la plus faible chez les personnes âgées de 18 à 24 ans (0,04%).

Toutefois, dans une étude plus récente de 2010, le taux de prévalence du VHC en France a été estimé à un niveau plus élevé que celui déterminé par l'étude de l'INVS en 2004. En effet, Lavanchy a estimé que le taux de prévalence en France était de 1,3% (Lavanchy, 2011).

Cette disparité dans les chiffres entre 2004 et 2010 pourrait en partie être due i). à la survenue de nouveaux cas chez les personnes résidentes en France, ii). la prise en compte ou non des personnes âgées de moins de 18 ans dans les estimations de prévalence et/ou iii). à une immigration accrue de personnes nées dans un pays où la prévalence du VHC est ≥ 2,5%, puisque selon l'INVS, ces personnes présentent un risque d'infection par le VHC plus élevé (INVS, 2007).

2). Aspects cliniques et physiopathologie de l'infection par le VHC

a. Mode de transmission

La transmission du VHC se fait essentiellement par voie parentérale. Avant l'apparition de tests sérologiques en 1990 permettant le dépistage systématique des donneurs de sang dans les pays développés, la cause majeure de transmission du VHC reposait sur les actes de transfusion sanguine. Aujourd'hui, les cas de transmission suite à des transfusions sont pratiquement éradiqués. De même, l'application d'un dépistage systématique chez des donneurs d'organes a également permis d'enrayer fortement les cas de transmission dans le cadre de la transplantation d'organes.

Cependant, dans les pays n'appliquant pas en routine ces tests de dépistage (notamment les pays en voie de développement), les actes de transfusion sanguine et de transplantation d'organes restent des sources importantes de transmission du VHC (CDC, 1998; Alter, 2007).

Ainsi, dans les pays développés, le facteur de risque actuellement le plus important est l'utilisation de drogues en intraveineuse (IV) liée au partage du matériel d'injection entre toxicomanes. D'après 98 études (publiées entre 1990 et 2000) mentionnant la prévalence du VHC dans quasiment tous les pays d'Europe, Roy *et al.* ont rapporté que le taux de prévalence d'anticorps anti-VHC au sein de la population européenne des utilisateurs de drogues en IV variait entre 30 et 98% (Roy *et al.*, 2002). En revanche, après exposition accidentelle au sang contaminé, l'incidence moyenne de la séroconversion anti-VHC chez les personnels de santé n'a été estimée qu'à 1,8% (Alter, 2007).

Contrairement aux pays développés, l'approvisionnement des pays émergeants en matériel médical stérile peut être faible voire inexistant. Dans le contexte des injections thérapeutiques, ce manque conduit à la réutilisation de matériel souillé exposant les individus à un risque de contamination. Par exemple, en Inde, la prévalence du VHC chez des personnes ayant reçu plusieurs injections thérapeutiques contre la leishmaniose viscérale est de 31,1%, ce qui est significativement plus élevé que la prévalence moyenne observée dans l'ensemble de la population indienne (Martins *et al.*, 2011).

Il a été documenté que les patients sous hémodialyse présentent de hauts taux de prévalence d'infection par le VHC. La transmission du virus dans ce contexte est généralement nosocomiale : mauvaise désinfection des appareils entre les patients, partage entre patients de matériel de dialyse (comme la fiole d'infusion) normalement à usage unique (Sy & Jamal, 2006).

Par ailleurs, le taux moyen de transmission verticale (de la mère à l'enfant) est approximativement de 5%. Les facteurs de risque pour ce type de transmission peuvent être une charge virale élevée chez la mère, un accouchement prolongé ou encore une co-infection VIH-VHC. En revanche, il semblerait que l'allaitement ne contribue pas significativement à la transmission du VHC (Martins *et al.*, 2011).

Le comportement sexuel pourrait aussi contribuer à la transmission du VHC. Dans ce contexte, les facteurs de risque peuvent inclure : des partenaires sexuel(le)s multiples, la présence d'autres maladies sexuellement transmissibles (trichomonase, VIH, syphilis et chlamydiose) ou la non-utilisation de préservatifs (Martins *et al.*, 2011).

Pour finir, plusieurs autres modèles de transmission existent tels que : tatouage, piercing, acupuncture, rituels de scarification ou encore circoncision (Martins *et al.*, 2011).

b. Manifestations cliniques de l'infection par le VHC

La primo-infection par le VHC va en premier lieu déclencher chez l'hôte une phase aiguë qui pourra se résoudre spontanément. Cependant dans la plupart des cas, l'hépatite C va évoluer vers une phase chronique pouvant à long terme conduire à des atteintes hépatiques graves comme la cirrhose suivie ou non d'un carcinome hépatocellulaire (**figure 3**).

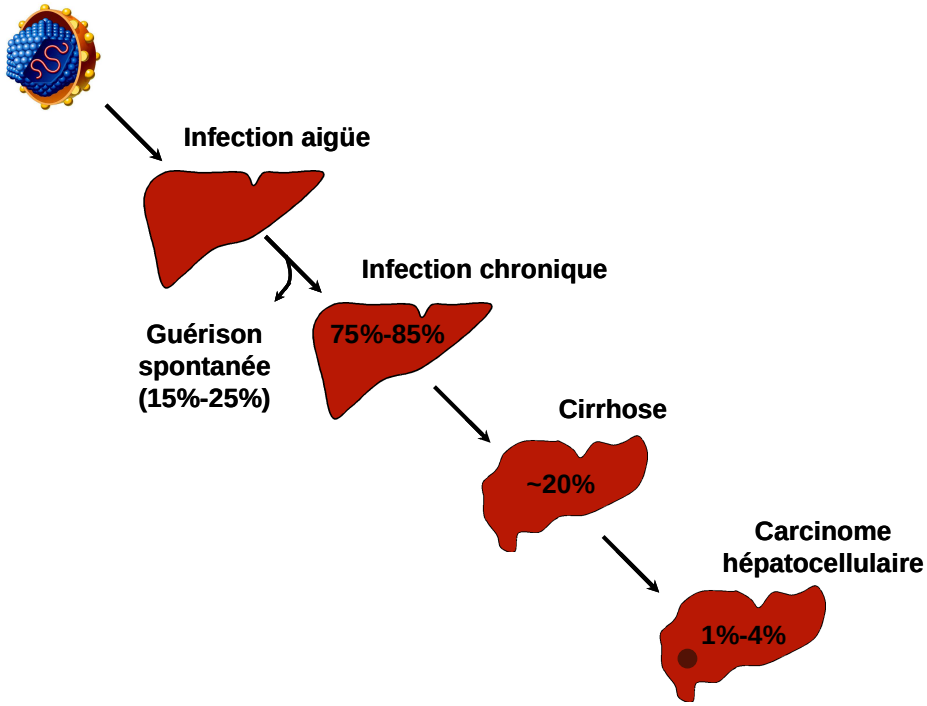


Figure 3. Histoire naturelle de l'infection par le VHC.

Lors d'une infection aiguë par le VHC, l'ARN viral peut être détecté dans le sérum de la plupart des patients entre 1 à 2 semaines après la primo-infection. Les niveaux d'ARN augmentent rapidement dans les toutes premières semaines suivant l'infection puis ensuite plus lentement, jusqu'à atteindre brièvement des niveaux compris entre 10^5 à 10^7 UI/mL juste avant le pic d'élévation des transaminases (ALAT) dans le sérum et le début des symptômes. La période d'incubation du virus est relativement courte puisque l'élévation des ALAT, indiquant une cytolyse hépatique, commence entre 2 et 8 semaines après la primo-infection (Hoofnagle, 2002) (**figure 4A**). Généralement, la plupart des individus sont asymptomatiques sur le plan clinique. Toutefois, selon l'OMS, environ 20% des personnes en phase aiguë de l'infection peuvent présenter des symptômes cliniques comme fièvre, fatigue, anorexie, nausée et/ou vomissements, douleurs abdominales et/ou articulaires, urines foncées, décoloration des fèces et ictère. L'hépatite C aiguë évolue très rarement vers une hépatite fulminante. Grâce au développement d'une réponse immunitaire efficace, l'hépatite aiguë est résolue chez 15 à 25% des individus infectés par le VHC. Chez ces personnes, la

clairance virale est généralement effective dans les 3 à 6 mois suivant la primo-infection. Le reste des patients évolue vers une hépatite C chronique, représentant la majorité des cas.

Une hépatite chronique C est définie par la persistance de l'ARN du VHC au moins 6 mois après la primo-infection. Le taux moyen de passage à la chronicité est de 75-85% mais peut varier en fonction de l'âge, du sexe, de l'origine ethnique et du statut immunitaire des individus.

Durant l'évolution de l'hépatite aiguë vers la chronicité, les niveaux d'ARN du VHC et d'ALAT peuvent fortement fluctuer et certains patients ont une période où l'ARN du VHC est indétectable et les niveaux d'ALAT sont normaux (**figure 4B**). Cette période est immédiatement suivie par une forte remontée de la charge virale ainsi qu'une élévation des ALAT. Ce motif de clairance suivi d'un rebond virologique est observé chez au moins un quart des patients qui développent une hépatite chronique. Cependant, il n'est détecté que chez les patients régulièrement suivis pour la quantification de leur virémie. Ainsi, la fréquence réelle de ce motif d'évolution pourrait être beaucoup plus élevée (Hoofnagle, 2002). La fluctuation de l'ARN du VHC ou le rebond virologique observés reflètent vraisemblablement l'échappement du VHC au système immunitaire permettant l'établissement de la chronicité de l'infection.

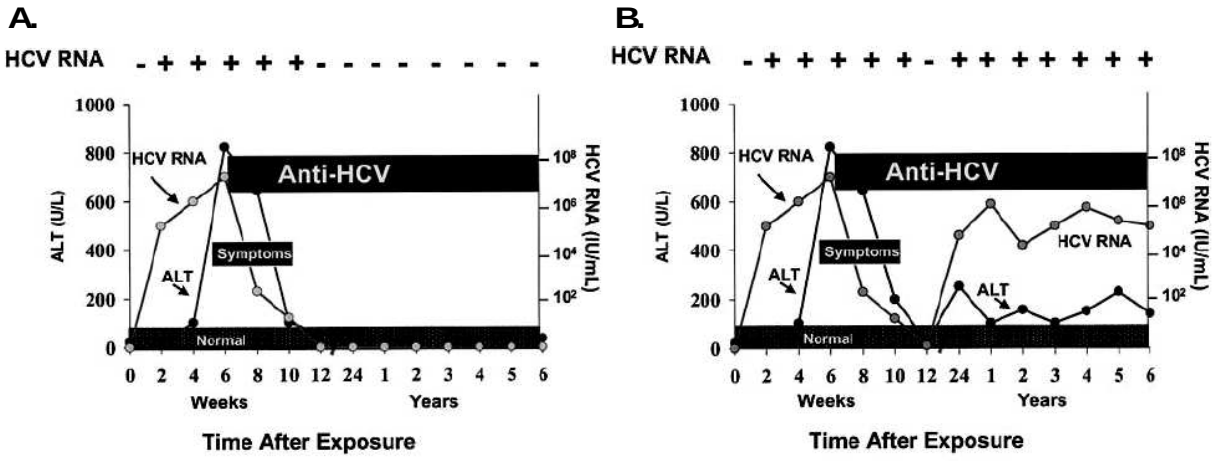


Figure 4. Cinétique des marqueurs de (**A**) l'infection VHC aiguë résolutive et, (**B**) l'infection VHC aiguë qui évolue vers une infection chronique (d'après Hoofnagle (Hoofnagle, 2002)).

Une fois que la chronicité de l'infection est établie, les niveaux d'ARN tendent à se stabiliser. La plupart des patients atteints d'hépatite chronique C ont peu ou pas de symptômes cliniques, le plus commun pouvant être une fatigue intermittente. Toutefois, des cas de douleurs à l'hypochondre droit, de nausée et d'anorexie sont parfois rapportés. La chronicité de l'infection va engendrer chez la plupart des patients des lésions nécro-inflammatoires hépatiques (Hoofnagle, 2002). Afin d'apprécier le degré de sévérité de l'atteinte hépatique, la référence est la ponction biopsie hépatique (PBH). L'analyse histologique de la biopsie permettra de définir le score METAVIR

associant un score d'activité (A0 à A3) et un score de fibrose (F0 à F4). Un score de fibrose F4 sera révélateur d'une cirrhose. A côté de la PBH, des tests non-invasifs sont de plus en plus utilisés (fibroscan, actitest-fibrotest).

Il a été estimé qu'environ 20% des patients chroniquement infectés par le VHC développent une cirrhose après 20 ans d'infection (Seeff, 2002). Chez les patients dont le diagnostic de cirrhose C est établi, l'incidence annuelle du développement d'un carcinome hépatocellulaire est de 1 à 4% (Zein, 2003).

c. Manifestations extra-hépatiques de l'infection par le VHC

Les manifestations extra-hépatiques (MEH) dans le contexte d'une infection VHC sont des phénomènes fréquents puisqu'il est estimé qu'entre 40 et 74% des patients infectés développeront au moins une MEH au cours de la maladie. Plusieurs MEH ont été rapportées dont la plus commune est la cryoglobulinémie mixte. D'autres MEH de gravités plus ou moins importantes ont été décrites comme par exemple : lymphome non-Hodgkinien, porphyrie, lichen plan, hypothyroïdie ou encore des manifestations rhumatologiques (Galossi *et al.*, 2007).

3). Traitement de l'infection chronique par le VHC

a. Du premier traitement au traitement actuel de référence par IFN-α pégylé et ribavirine

A la fin des années 80, il a été montré que l'interféron-α (IFN-α) était capable de réduire le niveau des transaminases dans le sérum (ASAT et ALAT, marqueurs biologiques de la cytolyse hépatique) ainsi que celui de la charge virale du VHC. Cette cytokine est devenue disponible au début des années 90 pour le traitement des patients chroniquement infectés par le VHC (Ramadori & Meier, 2001). Cependant, le taux de réponses biochimiques soutenues (normalisation du niveau des ALAT dans le sérum) et celui de réponses virologiques soutenues (RVS : ARN du VHC indétectable 6 mois après l'arrêt du traitement) étaient faibles chez les patients traités avec cette molécule. Le taux de RVS n'excédait pas 6 à 15% (Ramadori & Meier, 2001).

En 1998, l'IFN-α a été associé à la ribavirine (analogue nucléosidique de la guanosine) ce qui a permis d'augmenter le taux de réponses virologiques. En effet, dans une étude de Davis *et al.*, l'efficacité de la combinaison IFN-α et ribavirine par rapport à celle de l'IFN-α seul a été évaluée dans une cohorte de 345 patients chroniquement infectés et porteurs d'un VHC de génotype 1, 2 ou 3. Les résultats ont montré que le taux de RVS chez les patients traités par la bithérapie augmentait

à 49% alors qu'il restait faible (5%) chez les patients traités uniquement par IFN-α (Davis *et al.*, 1998).

Au début des années 2000, l'IFN-α pégylé (PEG IFN-α : molécule d'interféron stabilisée par couplage à du polyéthylène glycol) a été introduit dans la bithérapie anti-VHC à la place de l'IFN-α standard. A l'heure actuelle, cette bithérapie pégylée reste le traitement de référence administré chez les patients chroniquement infectés par le VHC.

La pégylation de l'IFN produit une molécule biologiquement active avec une demi-vie plus longue et donc limite le nombre d'injections à une par semaine, alors que le traitement par IFN-α standard nécessitait trois injections par semaine. De plus, il a été montré que l'association PEG IFN-α et ribavirine augmentait le taux de réponses virologiques à long terme par rapport à la bithérapie standard. Selon trois essais cliniques de référence, les taux de RVS chez les patients traités par PEG IFN-α/ribavirine sont de 42-52% pour le génotype 1 et 76-84% pour les génotypes 2 et 3 (Manns *et al.*, 2001; Fried *et al.*, 2002; Hadziyannis *et al.*, 2004).

Deux types de PEG IFN-α sont commercialisés : PEG IFN-α-2a et -2b. La posologie de la bithérapie pégylée est généralement de 180 µg/semaine de PEG IFN-α-2a ou de 1,5 µg/kg/semaine de PEG IFN-α-2b et de 800 à 1 400 mg/jour de ribavirine en fonction du génotype viral et du poids du patient. D'après des essais cliniques, les durées de traitement optimales sont ordinairement de 24 semaines pour les patients infectés par un VHC de génotype 2 ou 3 et de 48 semaines pour ceux porteurs d'un VHC de génotype 1, 4 et 6. Trop peu de données sont disponibles pour pouvoir prévoir la durée optimale de traitement des patients infectés par un VHC de génotype 5 (Ghany *et al.*, 2009).

Cependant, le traitement est de plus en plus administré "à la carte" en fonction notamment des réponses virologiques tôt après l'initiation du traitement. Par exemple, la réponse virologique rapide (RVR : ARN du VHC indétectable 4 semaines après l'initiation du traitement) est un excellent facteur prédictif d'une RVS. A l'inverse, l'échec du patient à développer une réponse virologique précoce (RVP : diminution de l'ARN du VHC ≥ 2 $\log_{10}$ UI/mL 12 semaines après le début du traitement, cRVP : ARN du VHC indétectable à la semaine 12) est un fort indicateur d'une absence ultérieure de RVS (Martinot-Peignoux *et al.*, 2009). Ainsi, la durée du traitement pourra être raccourcie en cas de RVR ou arrêtée en cas d'absence de RVP (Ghany *et al.*, 2009).

Le traitement peut être également affecté dans sa durée et sa posologie théoriques à cause de la tolérance du patient présentant des effets indésirables. En effet, le traitement par PEG IFN-α et ribavirine entraîne souvent de lourds effets secondaires pouvant conduire à diminuer le dosage voire interrompre prématurément le traitement.

Les effets secondaires les plus communs dus au PEG IFN-α incluent la fatigue, les douleurs musculaires et des troubles psychologiques (dépression, risque suicidaire, irritabilité, anxiété et

sommeil perturbé). Quant à la ribavirine, les effets secondaires les plus fréquents sont d'ordre biologique et regroupent l'hémolyse et l'anémie (Weigand *et al.*, 2007).

b. Mode d'action de l'interféron-α et de la ribavirine

- *Interféron-α*

L'IFN-α et -β sont des interférons de type I. Lors d'une infection virale, les interférons de type I sont naturellement induits lors de la réponse immunitaire innée de l'hôte. L'immunité innée est déclenchée par l'activation de détecteurs cellulaires qui vont reconnaître la présence des PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Dans le cas du VHC, les deux principaux détecteurs sont TLR3 (*toll-like receptor 3*) et RIG-I (*retinoic acid inducible gene-I*). La détection des PAMPs va conduire à l'activation des facteurs de transcription IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) et NF-κB (*nuclear factor-κB*) qui seront transloqués au noyau cellulaire où ils activeront la transcription du gène de l'IFN-β. L'IFN-β sécrété va agir de manière autocrine et paracrine pour stimuler le récepteur tyrosine kinase de l'interféron-α/β et ainsi activer la voie de signalisation Jak-STAT. L'activation de cette voie de signalisation va déboucher sur la transcription des ISGs (*interferon-stimulated genes*). Plus de 200 ISGs ont été identifiés parmi lesquels la PKR (*protein kinase RNAds-dependent*), la OAS (*2'-5'-oligoadenylate synthetase*) et la Mx1 (*myxovirus resistance 1*) ont des actions antivirales directes (Tai & Chung, 2009), permettant de minimiser la propagation du virus. Cependant, certaines protéines du VHC peuvent négativement moduler l'immunité innée en interférant avec le bon déroulement de la voie de signalisation de l'IFN ou en interagissant directement avec les produits des ISGs. Ceci sera discuté plus en détail pour les protéines virales impliquées dans la partie "*BIOLOGIE DU VHC*", section "*Organisation génomique du VHC*".

Dans le cas d'une infection VHC, cette voie de signalisation endogène de l'IFN de type I déclenchée au niveau des cellules permissives (principalement les hépatocytes) est la même que celle qui est empruntée par le PEG IFN-α exogène, administré lors du traitement anti-VHC (**figure 5**).

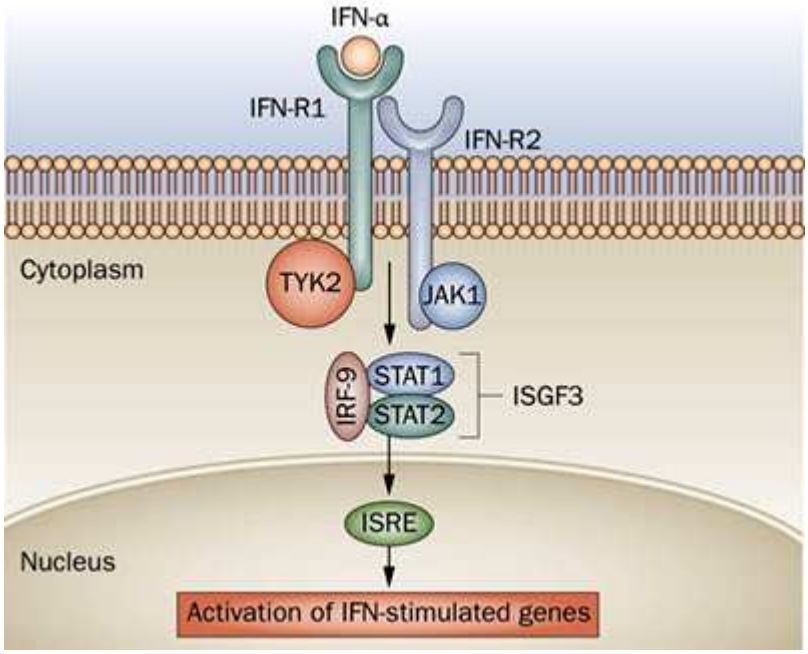


Figure 5. Voie de signalisation de l'IFN-α (d'après Aghemo *et al.* (Aghemo *et al.*, 2010)).

Outre son rôle crucial dans l'immunité innée, l'interféron de type I augmente la réponse immunitaire adaptative contre le VHC. Par exemple, il a été montré que l'interféron de type I stimule la prolifération des cellules T CD4+ mémoire, augmente la différenciation des cellules dendritiques et permet d'accroître l'expression du CMH de classe I à la surface des hépatocytes (Tai & Chung, 2009), nécessaire aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques pour la reconnaissance des cellules infectées.

L'interféron de type I exerce donc d'une part une activité antivirale directe, et d'autre part une activité antivirale indirecte via des mécanismes immunomodulateurs.

De plus, Le Bon *et al.* ont montré que l'IFN de type I pouvait stimuler la réponse immunitaire humorale. En effet, 10 jours après l'injection de gammaglobulines de poulet (GGP) à des souris B6, les auteurs ont mesuré les titres d'anticorps spécifiques des GGP dans le sérum par un test ELISA. Leurs résultats montraient que l'administration de GGP seule était faiblement immunogène. En revanche, en immunisant les souris par injection simultanée de GGP et d'IFN de type I, les titres d'anticorps anti-GGP augmentaient significativement dans le sérum des souris 10 jours après l'injection. L'augmentation était encore plus significative si les souris recevaient 1 à 2 injections supplémentaires d'IFN de type I après l'immunisation. Ils ont donc conclu que l'IFN de type I pouvait avoir une forte activité adjuvante et ainsi permettre d'accroître la réponse humorale primaire face à un antigène soluble (Le Bon *et al.*, 2001). Par un mécanisme similaire, il est possible d'envisager que le PEG IFN-α puisse stimuler l'immunité humorale chez les individus infectés par le VHC.

- *Ribavirine*

La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine synthétisé pour la première fois en 1972 (Witkowski *et al.*, 1972). Cette molécule correspondait au premier nucléoside synthétique qui montrait une activité antivirale à large spectre (Sidwell *et al.*, 1972).

Le rôle antiviral de la ribavirine reste encore aujourd'hui mal compris. Chez le patient traité, la ribavirine est administrée sous forme de nucléoside puis est convertie en ribavirine monophosphate (RMP), diphosphate (RDP) puis triphosphate (RTP) grâce à des kinases cellulaires. La RMP induit une réduction du pool intracellulaire de guanosine triphosphate (GTP) via sa capacité à inhiber l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH). En effet, la RMP entre en compétition avec le substrat naturel de cette enzyme, l'inosine monophosphate (IMP). L'IMPDH est cruciale pour la synthèse *de novo* de GTP qui est un précurseur essentiel pour la synthèse intracellulaire de l'ARN (Graci & Cameron, 2006). L'inhibition de l'IMPDH pourrait fortement contribuer à l'activité antivirale de la ribavirine. En effet, en réduisant les niveaux intracellulaires du concurrent GTP, la ribavirine pourrait être efficace en tant qu'inhibiteur de l'ARN polymérase ARN-dépendante virale ou en tant que mutagène létal.

La forme métabolique prédominante de la ribavirine au niveau intracellulaire est la RTP. En s'accumulant dans les cellules, il est possible que cet analogue nucléotidique puisse entrer efficacement en compétition avec les pools cellulaires de GTP et ainsi interagir avec l'ARN polymérase virale pour inhiber la synthèse de l'ARN lors de la réplication (Graci & Cameron, 2006).

Sur le modèle de l'ARN polymérase ARN-dépendante du poliovirus, Crotty *et al.* ont montré que la ribavirine peut être utilisée par l'ARN polymérase virale et qu'elle peut être incorporée dans l'ARN durant la réplication du virus (Crotty *et al.*, 2000). En outre, étant donné que la ribavirine mime de par sa structure les bases puriques, elle peut se lier aux bases pyrimidiques cytidine et uridine avec une efficacité équivalente (Graci & Cameron, 2006). De cette manière, la ribavirine est capable d'entraîner un défaut dans l'appariement des bases. Ce phénomène conduirait à une accumulation progressive de mutations dans le génome viral jusqu'à atteindre un taux d'erreurs qui serait létal pour le virus ("erreur catastrophe").

Une étude a porté sur l'hétérogénéité des quasi-espèces (mélange de variants viraux génétiquement apparentés) du VHC (région codant la polymérase virale NS5B) dans des lignées d'hépatome humain Huh7 hébergeant un réplicon subgénomique du VHC et cultivées en présence de ribavirine ou non. Les lignées cellulaires traitées par ribavirine montraient une augmentation significative de la fréquence des mutations dans NS5B du VHC. De même, la fréquence des mutations augmentait dans les quasi-espèces de patients chroniquement infectés par le VHC

lorsqu'ils étaient traités par ribavirine en monothérapie. Cependant, cet effet mutagène de la ribavirine n'était pas détecté chez les patients sous bithérapie pégylée de référence (Hofmann *et al.*, 2007). En revanche, une étude menée chez des patients traités pendant 24 semaines par ribavirine en monothérapie ou en bithérapie avec de l'IFN-α n'a montré aucune augmentation des taux de mutations du VHC (Chevaliez *et al.*, 2007). Toutefois, les auteurs n'avaient évalué l'accumulation des substitutions nucléotidiques que sur les 4 premières semaines de traitement. Lutchman *et al.* ont étudié la variation de NS5B du VHC au cours du traitement par ribavirine en monothérapie chez 31 patients infectés par un VHC de génotype 1. Une augmentation du taux de mutations sur NS5B était observée après la 4ème semaine de traitement mais pas après la semaine 24. Puisque le traitement par ribavirine était associé à une élévation du taux de mutations seulement transitoire, les auteurs ont conclu que l'activité mutagène de la ribavirine n'est pas le seul mode d'action de la molécule (Lutchman *et al.*, 2007).

Une autre hypothèse est que la ribavirine pourrait posséder une activité immunomodulatrice. En effet, une étude a analysé le profil d'expression des gènes dans les hépatocytes de patients infectés par un VHC de génotype 1 qui avaient été traités par une dose unique de PEG IFN-α avec ou sans ribavirine avant la biopsie hépatique. Il a été montré que l'adjonction de ribavirine augmentait les niveaux d'expression de plusieurs ISGs et diminuait l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'inhibition de l'IFN-α (Feld *et al.*, 2007). Ce travail a démontré que la ribavirine peut stimuler la réponse immunitaire innée médiée par l'IFN.

Les modes d'action de la ribavirine mentionnés ci-dessus ne sont pas mutuellement exclusifs. En effet, l'action antivirale de la ribavirine repose probablement sur une combinaison de ces mécanismes.

c. Traitements émergeants et en perspective

Ces dernières années, de gros progrès dans la compréhension du cycle viral du VHC ont été réalisés et ont permis de développer des agents antiviraux agissant directement sur le processus post-traductionnel ou la réplication du VHC en ciblant directement les protéines virales impliquées dans ces étapes du cycle. Ces agents constituent des pistes à poursuivre pour améliorer le traitement antiviral.

En effet, la protéase NS3/4A du VHC a été reconnue comme une cible importante dans le cadre de la thérapie anti-VHC en raison du rôle crucial qu'elle joue dans le clivage de la polyprotéine virale et de l'activité inhibitrice qu'elle exerce sur les protéines cellulaires requises pour l'immunité innée (voir plus bas partie "*BIOLOGIE DU VHC*", section "*Organisation génomique du VHC*").

De nombreuses anti-protéases sont actuellement en phases I à III d'essais cliniques. Les deux seules en phase III sont le Télaprévir et le Bocéprévir qui jusqu'à maintenant ont montré une forte activité antivirale lors de leur utilisation en combinaison avec la bithérapie pégylée de référence. Les essais cliniques ont montré que l'administration d'une trithérapie pégylée comportant l'une ou l'autre de ces anti-protéases aboutissait à une augmentation significative du taux de RVS chez des patients infectés par un VHC de génotype 1 (génotype qui répond le moins bien à la bithérapie pégylée standard) naïfs de tout traitement anti-VHC. Il est également intéressant de constater que des taux de RVS non-négligeables peuvent être obtenus chez des patients retraités par PEG IFN-α/ribavirine/anti-protéase, alors qu'ils étaient non-répondeurs à la bithérapie pégylée standard (Vermehren & Sarrazin, 2011).

Cependant, l'introduction des ces anti-protéases peut engendrer des effets secondaires additionnels à ceux causés par le PEG IFN-α et la ribavirine. Les plus importants sont l'anémie (pour le Télaprévir et le Bocéprévir) et les rashs cutanés (pour le Télaprévir) dont certaines formes très graves (Birerdinc & Younossi, 2010). En outre, malgré leur forte activité antivirale, ces anti-protéases montrent une faible barrière génétique à la résistance.

Une autre cible des agents antiviraux en voie de développement est l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5B du VHC qui permet la réplication virale. Toutefois, ces inhibiteurs ne sont actuellement qu'en phase I ou II d'essais cliniques. Deux types d'inhibiteurs de l'ARN polymérase peuvent être distingués : i). Inhibiteurs analogues nucléosidiques qui miment les substrats naturels de la polymérase (ribonucléotides) et qui sont intégrés dans l'ARN en cours d'élongation. Ces inhibiteurs vont agir comme des terminateurs de chaîne pour stopper la polymérisation de l'ARN en cours de synthèse. ii). Inhibiteurs analogues non-nucléosidiques s'attachant à différents sites allostériques de l'enzyme. L'attachement de ces inhibiteurs entraîne une modification conformationnelle de la protéine altérant la fonction enzymatique de la polymérase (Vermehren & Sarrazin, 2011).

Parmi les analogues nucléosidiques, le RG 7128 est le plus avancé dans son développement (phase II). Les plus récentes données indiquent que l'administration de cet analogue en combinaison avec la bithérapie pégylée aboutit à un fort taux de cRVP (> 80% contre seulement 49% pour les patients traités par la bithérapie pégylée standard) chez des patients infectés par un VHC de génotype 1 ou 4 et naïfs de tout traitement (Jensen *et al.*, 2010).

Parmi les inhibiteurs non-nucléosidiques, on retrouve par exemple l'ANA598 (phase II) qui a été testé en combinaison avec PEG IFN-α/ribavirine chez des patients infectés par un génotype 1 naïfs de traitement anti-VHC. Les essais cliniques ont récemment rapporté que 73% des patients traités à une dose de 200 mg de cet inhibiteur développent une cRVP (Lawitz *et al.*, 2010).

Une autre protéine virale intéressante à cibler par des agents antiviraux est la NS5A. Cette protéine virale intervient à plusieurs étapes clefs du cycle viral qui sont la réplication (joue un rôle de régulateur), l'assemblage et la libération des particules du VHC néoformées. Les inhibiteurs de la NS5A sont actuellement en phase I ou II d'essais cliniques. De récents résultats d'essais en phase II de l'inhibiteur de la NS5A BMS-790052 administré en combinaison avec la bithérapie pégylée ont montré que 83% des patients traités à des doses de 10 et 60 mg développaient une cRVP, alors que seulement 42% des patients traités par PEG IFN-α/ribavirine/placebo développaient une cRVP (Pol *et al.*, 2010).

Dans un futur proche, certaines de ces nouvelles molécules pourront être disponibles sur le marché afin de pouvoir augmenter les chances de succès de réponse au traitement antiviral chez un maximum de patients. Toutefois, ces molécules resteront associées avec la bithérapie pégylée standard, en tout cas dans les premiers temps. Dans ce contexte, un autre axe de recherche est actuellement en cours et correspond au développement de nouveaux IFNs. Une étude a récemment montré que le PEG IFN-λ (IFN de type III) a une activité antivirale aussi efficace que le PEG IFN-α mais qu'il est mieux toléré par les patients (Muir *et al.*, 2010).

Une autre piste intéressante pour améliorer le traitement anti-VHC serait de développer des inhibiteurs d'entrée. Ces agents antiviraux pourraient être conçus afin de cibler directement les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC qui jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance des corécepteurs cellulaires et donc dans la première étape du cycle viral qui est l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte. Alternativement, ces molécules pourraient cibler les corécepteurs cellulaires pour bloquer l'attachement et l'entrée du virus. Les caractéristiques des glycoprotéines E1 et E2 du VHC ainsi que les propriétés et l'implication des différents corécepteurs dans le processus d'attachement et d'entrée du virus seront discutées plus en détail dans la partie "*BIOLOGIE DU VHC*".

Comme les glycoprotéines E1 et E2 sont les cibles majeures de l'immunité adaptative de l'hôte, des anticorps neutralisants (NAc) anti-VHC pourraient représenter des outils thérapeutiques interférant avec le processus d'entrée virale. Cependant, en raison de la haute variabilité des glycoprotéines du VHC, le défi repose dans le développement d'Ac à activité neutralisante croisée efficace et ciblant des épitopes conservés parmi tous les génotypes du VHC afin d'éviter l'échappement du virus à ces Ac. Par exemple, quatre études ont montré la possibilité d'une telle approche :

a). Une région antigénique appelée AR3, a été récemment identifiée dans la glycoprotéine E2 du VHC. AR3 semble contenir des épitopes discontinus qui sont formés par au moins trois segments d'acides aminés aux positions 396-424, 436-447 et 523-540. Des Ac monoclonaux (mAc) recombinants humains spécifiques de cette région neutralisaient *in vitro* non seulement le

clone infectieux en culture cellulaire (HCVcc, JFH-1 génotype 2a) mais également diverses pseudoparticules rétrovirales du VHC (HCVpp) arborant les glycoprotéines d'enveloppe de différentes souches (génotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 4 et 5). Ces résultats montrent qu'AR3 est un site de neutralisation relativement bien conservé sur E2 du VHC. Ces Ac ont également été testés dans un modèle murin (*human liver-chimeric Alb-uPA/SCID*). L'injection de ces mAc AR3-spécifiques pouvait protéger ces souris contre l'infection par un VHC de génotype 1a issu du sérum d'un patient infecté, mais à de fortes concentrations (Law *et al.*, 2008).

b). L'anticorps monoclonal (mAc) de souris AP33 reconnaît un épitope linéaire s'étendant des résidus 413 à 420 de E2 du VHC. Cet mAc neutralisait efficacement des HCVpp portant les glycoprotéines du VHC de souches couvrant tous les génotypes (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4, 5 et 6) (Owsianka *et al.*, 2005; Tarr *et al.*, 2006). AP33 était également capable de neutraliser le clone infectieux JFH-1 (Tarr *et al.*, 2006). Ces résultats indiquent qu'AP33 cible un épitope de neutralisation sur E2 relativement bien conservé parmi tous les génotypes du VHC. Cependant, la linéarité de l'épitope reconnu par le mAc AP33 est controversée. En effet, avec le modèle HCVcc, une étude récente a isolé après plusieurs passages en culture cellulaire et en présence de mAc AP33 des mutants capables d'échapper à cet Ac. Deux mutations ponctuelles dans E2 ont été identifiées chez quasiment tous les mutants d'échappement aux positions 415 et 655, la première présente dans l'épitope linéaire suggéré et la seconde distante de cet épitope. Or, comme la mutation en position 655 participait au phénotype d'échappement à mAc AP33, les auteurs ont suggéré que l'épitope AP33 serait en fait discontinu et probablement conformationnel (Gal-Tanamy *et al.*, 2008).

c). Le HCV-Ab^{XTL}68 est un mAc humain qui s'attache à E2 du VHC, dont l'épitope est conformationnel et relativement bien conservé parmi les génotypes du VHC. Quatre acides aminés à l'extrémité C-terminale de HVR1 de E2 ainsi qu'un nombre inconnu d'acides aminés supplémentaires sur E2 constituent l'épitope reconnu par HCV-Ab^{XTL}68. Comme les patients subissant une transplantation hépatique pour hépatite chronique C en phase terminale sont presque tous réinfectés de façon précoce après la greffe, cet Ac a été testé pour évaluer son innocuité et son efficacité à prévenir la récurrence de l'infection chez des patients transplantés. Bien qu'aucune disparition de l'ARN du VHC n'ait été observée, tous les patients traités par l'Ac présentaient une diminution significative de leur charge virale immédiatement après la greffe (Schiano *et al.*, 2006). De plus, l'incidence des effets indésirables était plus élevée dans le groupe des patients recevant un placebo que dans celui des patients traités par HCV-Ab^{XTL}68.

d). Meunier *et al.* ont décrit la capacité de mAc dirigés contre la glycoprotéine E1 du VHC à pouvoir prévenir l'infection par le VHC. En effet, les auteurs ont identifié deux mAc humains (IGH505 and IGH526), dont les épitopes sont regroupés dans une région C-terminale de

l'ectodomaine de E1 (acides aminés 313 à 327), qui étaient capables de fortement neutraliser les HCVpp portant des glycoprotéines de génotypes 1a, 1b, 4a, 5a, 6a ainsi que des HCVpp portant E1 et E2 de génotype 2a bien qu'à un plus faible niveau. De plus, ces deux mAc étaient capables de fortement neutraliser des HCVcc portant des protéines structurales de génotype 1a ou 2a (Meunier *et al.*, 2008).

L'option alternative serait d'empêcher l'attachement et l'entrée du virus médiés par les glycoprotéines d'enveloppe, en ciblant directement les corécepteurs cellulaires impliqués dans cette étape. Le VHC interagit principalement avec quatre facteurs d'entrée qui sont tous requis pour une infection productive : CD81, SR-BI (*scavenger receptor* de type B et de classe I), CLDN-1 (Claudine-1) et OCLN (Occludine).

Outre leur potentiel à inhiber l'infection VHC *in vitro* (modèles HCVpp et HCVcc), des Ac anti-CD81 administrés en prophylaxie ont été capables de prévenir l'infection *in vivo* en utilisant le modèle murin *human liver-chimeric Alb-uPA/SCID* (Meuleman *et al.*, 2008).

De leur côté, des Ac anti-SR-BI peuvent inhiber l'infection VHC *in vitro* en utilisant le modèle HCVcc (Catanese *et al.*, 2007). L'ITX 5061 est une petite molécule ciblant SR-BI qui a récemment été développée. Syder *et al.* ont évalué l'impact de cette molécule sur l'entrée du VHC. Leurs résultats ont indiqué que l'ITX 5061 était capable d'inhiber l'infection *in vitro* d'hépatocytes primaires humains et/ou de lignées cellulaires d'hépatome par des HCVcc et des HCVpp de divers génotypes (Syder *et al.*, 2011). De plus, l'ITX 5061 a été évalué chez plus de 280 patients et montrait de bons profils de pharmacocinétique et d'innocuité. Ceci fait de cette molécule un bon candidat pour de futurs essais cliniques chez des patients infectés par le VHC.

Des anticorps monoclonaux anti-CLDN-1 peuvent inhiber efficacement le pouvoir infectieux des HCVcc (portant des protéines structurales de génotype 1b ou 2a) et des HCVpp portant les glycoprotéines de diverses souches de génotypes variables (génotypes 1 à 6). De plus, les Ac anti-CLDN-1 inhibaient fortement l'infectivité des HCVpp portant les glycoprotéines E1 et E2 de divers variants de quasi-espèces issus de patients chroniquement infectés par le VHC (Fofana *et al.*, 2010).

Enfin, OCLN peut aussi être considérée comme une cible potentielle pour inhiber l'entrée du VHC. Cependant, à notre connaissance, aucun Ac anti-OCLN inhibant l'infection VHC n'a à ce jour été décrit.

Bien sûr, le but ultime reste le développement d'un vaccin prophylactique contre le VHC. Un tel vaccin serait plus facile d'accès pour les patients des pays en voie de développement.

Depuis plusieurs années, la recherche sur des vaccins prophylactiques anti-VHC est active. Par exemple, des résultats encourageants ont été obtenus chez des chimpanzés qui recevaient un

vaccin prophylactique contenant des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (gpE1/gpE2) recombinantes et un adjuvant. Malgré l'absence d'immunité conduisant à une protection complète, la progression de l'infection vers la forme chronique (phase de l'infection responsable de la pathogénicité du VHC chez l'humain) était inhibée dans la majorité des cas. Les chimpanzés vaccinés avec des gpE1/gpE2 recombinantes étaient capables de produire des titres élevés d'Ac à activité neutralisante croisée contre des HCVpp portant les glycoprotéines d'enveloppe des divers génotypes du VHC (Houghton, 2011). Basé sur ces données encourageantes, un essai clinique de phase I a été mené récemment chez 60 sujets humains consentants pour évaluer la sécurité et l'immunogénicité du vaccin HCV E1E2/MF59C.1 (*Novartis® Vaccines and Diagnostics*). Ce vaccin contient les gpE1/gpE2 recombinantes dérivées d'une souche VHC de génotype 1a mélangées à l'adjuvant MF59C.1 du type "huile dans l'eau". Les résultats ont montré qu'il était bien toléré et immunogène. De fortes réponses des lymphocytes T "*helper*" (LTh) étaient obtenues chez les volontaires et s'accompagnaient de titres élevés d'Ac anti-gpE1/gpE2 similaires à ceux observés chez les chimpanzés vaccinés. De plus, des titres faibles mais significatifs d'Ac bloquant l'attachement de la gpE2 recombinante au corécepteur cellulaire CD81 étaient présents chez de nombreux sujets vaccinés (Frey *et al.*, 2010).

Le TG4040 (*Transgene®*) est un vaccin thérapeutique développé à partir d'un poxvirus recombinant exprimant les protéines non-structurales NS3, NS4A/B et NS5B d'un isolat prototypique du VHC de génotype 1b. Dans un essai clinique récent de phase I, ce vaccin était bien toléré, pouvait induire des réponses immunitaires cellulaires spécifiques au VHC et permettait de diminuer les niveaux de charge virale (Habersetzer *et al.*, 2011).

BIOLOGIE DU VHC

I. Propriétés intrinsèques du VHC

1). Classification et caractéristiques biophysiques du VHC

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae*. Cette famille est subdivisée en plusieurs genres : les *Flavivirus* le plus souvent responsables d'arboviroses (virus de la fièvre jaune (YFV), virus de la Dengue (DENV), virus du Nil occidental ou *West Nile Virus* (WNV)) ; les *Pestivirus* responsables de pathologies animales (virus de la peste porcine classique (VPPC), virus de la diarrhée virale bovine (BVDV)) et les *Hepacivirus* dont le VHC est le seul représentant.

Le VHC est un petit virus d'un diamètre de 55 à 65 nm (Kaito *et al.*, 1994) dont la particule virale est constituée de l'extérieur vers l'intérieur de trois structures : une enveloppe lipidique dérivée lors de la sécrétion des membranes du réticulum endoplasmique dans laquelle sont ancrées les deux glycoprotéines d'enveloppe virale E1 et E2, une capside icosaédrique formée par la polymérisation de la protéine de capside C ou Core, et un génome viral à ARN (**figure 6**).

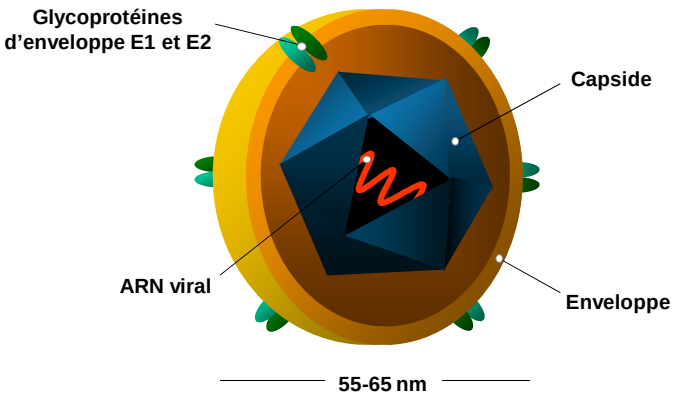


Figure 6. Représentation schématique d'un virion du VHC.

Plusieurs études ont montré que le VHC circule sous différentes formes dans le sang des patients infectés. En effet, les virions du VHC présentent une distribution hétérogène lorsqu'ils sont séparés sur gradient de sucrose par ultracentrifugation. Le VHC est trouvé dans différentes fractions du gradient dont les densités varient de 1,03 à 1,25 g/mL (André *et al.*, 2002). Cette variation de densité correspond à la présence de virions sous forme "libre" ou associés à des lipoprotéines de densité variable. Ainsi, on peut retrouver des particules virales associées aux lipoprotéines de faible densité (*low density liproteins* ou LDL) ou de très faible densité (*very low density lipoproteins* ou

VLDL). Des virions complexés à des immunoglobulines (Ig), entraînant une augmentation de la densité, peuvent également être retrouvés. Les virions associés aux lipoprotéines sont plus infectieux que les virions circulant sous forme “libre”. Les particules virales de faible densité, généralement associées aux LDL ou VLDL, sont plus infectieuses que les particules virales de haute densité associées à des Ig. Ce potentiel infectieux différentiel pourrait au moins en partie s’expliquer par le fait que les virions de faible densité semblent être libres d’Ig.

Une autre forme circulante du VHC a été décrite dans les fractions de faible densité et a été appelée lipo-viro-particule de faible densité (LVP). Ces LVPs infectieuses seraient en fait des nucléocapsides non-enveloppées qui ont une capacité d’attachement au fragmemt Fc des IgG. Ces LVPs sont des particules sphériques enrichies en triglycérides. Au minimum, elles contiennent de l’apolipoprotéine B (ApoB) et très probablement de l’ApoE, l’ARN du VHC et la protéine Core (André *et al.*, 2002). Le pouvoir infectieux des LVPs pourrait en fait être médiée à l’étape d’entrée par des protéines endogènes de l’hôte (apolipoprotéines et récepteurs des lipoprotéines) plutôt que par des composants viraux tels que les glycoprotéines d’enveloppe E1 et E2. Le récepteur aux LDL reconnaît les lipoprotéines par un attachement direct avec ApoB et ApoE. Ainsi, l’absence d’intervention de composants viraux dans le pouvoir infectieux des LVPs pourrait leur fournir un mécanisme d’échappement à la réponse immunitaire humorale de l’hôte.

2). Organisation génomique du VHC

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire de polarité positive d’environ 9,6 kb. Cet ARN génomique est constitué d’un cadre de lecture ouvert (*open reading frame* ou ORF) flanqué de régions non-codantes aux extrémités 5’ (5’NC ou *5’NTR*) et 3’ (3’NC ou *3’NTR*) fortement structurées et relativement bien conservées.

L’ORF code une polyprotéine précurseur d’environ 3 000 acides aminés. Cette polyprotéine est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) puis est co- et post-traductionnellement clivée en 10 protéines virales par des protéases cellulaires et virales (Moradpour *et al.*, 2007) (**figure 7**). Parmi ces protéines, on retrouve les protéines structurales (Core, E1, E2) clivées par des protéases cellulaires et les protéines non-structurales ou NS (p7 (ou NS1), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) clivées par des protéases cellulaires pour p7 et par les protéases virales pour toutes les autres protéines NS (Moradpour *et al.*, 2007).

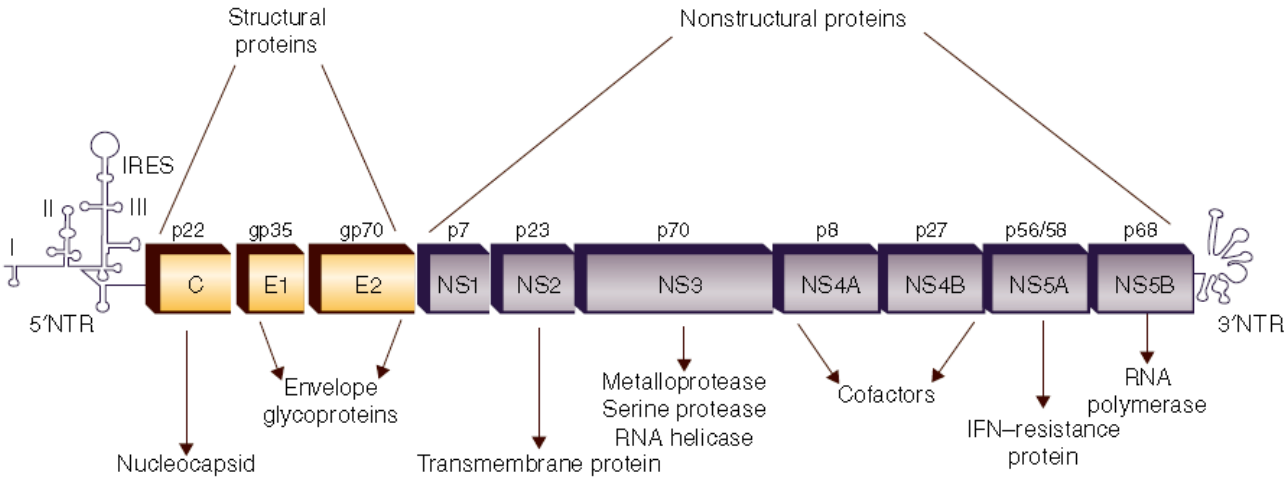


Figure 7. Organisation génomique du VHC (d'après Birerdinc and Younossi (Birerdinc & Younossi, 2010)).

a. Les régions non-codantes

La région 5'NC, très conservée et structurée, couvre une région de 341 nucléotides. Elle contient quatre domaines structurés distincts, numérotés I à IV. Les domaines II à IV ainsi qu'une trentaine de nucléotides de la phase codante comprenant le codon d'initiation de la traduction AUG constituent l'IRES (nucléotides 40 à 372, **figure 8**). L'IRES assure un rôle primordial dans l'initiation de la traduction de l'ARN du VHC coiffe-indépendante (Lukavsky, 2009).

Outre le rôle fondamental de la région 5'NC dans la traduction des protéines virales via l'IRES, elle intervient dans la réplication de l'ARN. En effet, une étude a montré que la quarantaine de nucléotides (comprenant le domaine I) en amont de l'IRES sont essentiels pour la réplication de l'ARN du VHC. La délétion de cette séquence dans la 5'NC entraînait une perte du potentiel réplicatif. Toutefois, une réplication efficace requiert également des séquences de l'IRES dont au moins le domaine II (Friebe *et al.*, 2001).

In vitro, il a été montré que le micro-ARN (miR-122), spécifiquement et abondamment exprimé dans le foie, facilitait la réplication du VHC en interagissant avec la région 5'NC (Jopling *et al.*, 2005). Une étude récente a montré *in vivo* que le *silencing* de miR-122 entraîne une forte diminution de la virémie chez des chimpanzés (Lanford *et al.*, 2010).

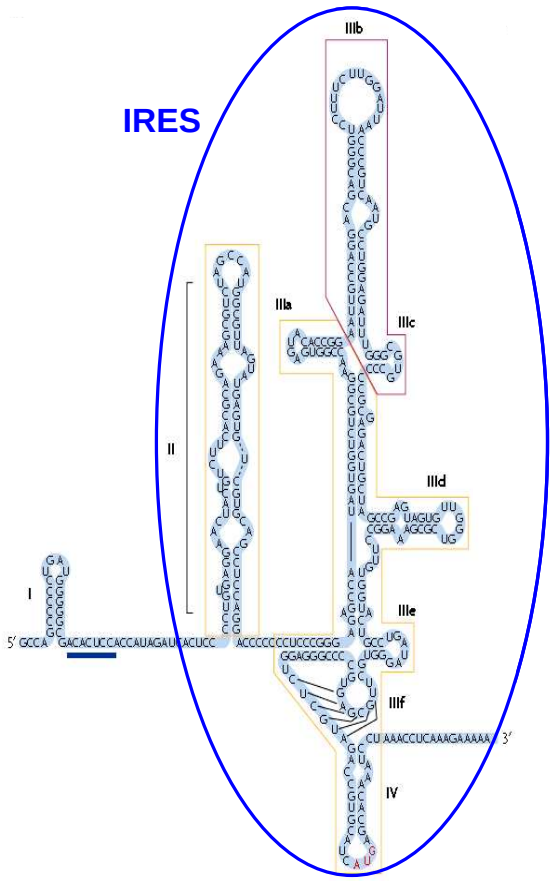


Figure 8. Schéma de la région 5' non-codante du VHC (d'après Fraser and Doudna (Fraser & Doudna, 2007)).

La région 3'NC se compose de trois parties : une courte séquence variable, une séquence interne poly-uracile/pyrimidine (poly (U/UC)) de taille variable et une séquence terminale hautement conservée de 98 nucléotides appelée région X. La présence de la région 3'NC est absolument requise pour la réplication de l'ARN viral *in vivo* (Schuster *et al.*, 2002). Il a été rapporté *in vitro* que la région X, formée de trois tiges-boucles (SLI à III), peut servir de matrice minimale pour l'initiation de la synthèse du brin d'ARN négatif (intermédiaire réplicatif) par l'ARN polymérase virale NS5B. La 3'NC du brin d'ARN négatif jouerait un rôle analogue pour la synthèse du brin d'ARN positif (Smith *et al.*, 2002).

b. Les régions codant les protéines virales

- *La protéine C ou Core*

La protéine C forme la nucléocapside virale entourant l'ARN génomique du VHC. Lors de sa maturation, elle est clivée du précurseur polyprotéique à la jonction Core-E1 par une signal peptidase (SP) cellulaire en une forme immature de 21 kDa contenant le peptide signal en C-terminal qui est enchâssé dans la membrane du RE. Un second clivage se produit au niveau du

peptide signal grâce à une signal peptide peptidase (SPP) présente au niveau de la membrane du RE, libérant ainsi une protéine C mature de 19 kDa (McLauchlan *et al.*, 2002).

La protéine C mature est constituée de deux domaines. Le domaine D1 en N-terminal, riche en acides aminés basiques, est impliqué dans la liaison avec l'ARN génomique permettant la formation de la nucléocapside. Le domaine D2 en C-terminal, de nature hydrophobe, est responsable de l'association de Core avec les gouttelettes lipidiques et avec la membrane du réticulum endoplasmique (RE). L'interaction de Core avec la membrane du RE est nécessaire pour le repliement et la stabilité de la protéine (Boulant *et al.*, 2005, 2006). Core joue un rôle important dans le recrutement des protéines NS et des complexes de réplication jusqu'aux membranes associées aux gouttelettes lipidiques : ce recrutement est crucial pour la production de virus infectieux (Miyanari *et al.*, 2007).

La surexpression de la protéine Core conduirait à l'induction de la protéine SOCS-3 (*suppressors of cytokine signaling-3*) qui inhibe la phosphorylation de STAT1 par Jak1, bloquant ainsi la voie de signalisation de l'IFN de type I. De plus, Core inhiberait directement STAT1 en s'attachant dans le domaine SH2 de STAT1, conduisant à la dégradation de STAT1 dans le protéasome. Pour finir, Core entraînerait la surexpression de la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui conduit à l'hypométhylation de STAT1 dont la forme hypométhylée s'attache à la protéine inhibitrice de STAT1 : PIAS1 (*protein inhibitor of activated STAT1*). Cet attachement conduisant à l'inhibition de STAT1 engendre alors un blocage de la voie de signalisation de l'IFN de type I est ainsi prévient la transcription des ISGs (Tai & Chung, 2009).

- *La protéine ARFP ou F*

La protéine ARFP (*alternative reading frame protein*) ou protéine F (*frameshift*) est une protéine de 17 kDa qui a été identifié par des approches *in vitro*. Au départ, on pensait que cette protéine était une simple forme tronquée de la protéine Core mais il a été montré que la synthèse de la protéine F est en fait issue d'un *frameshift* (décalage du cadre) ribosomal (Xu *et al.*, 2001). En effet, la protéine F est synthétisée à partir du codon d'initiation AUG de la séquence codant la polyprotéine suivi par un *frameshift* ribosomal -2/+1 durant le processus de traduction. Ainsi, cette protéine est codée par un cadre de lecture alternatif (*alternative reading frame ou ARF*) qui chevauche la séquence de l'ORF (*open reading frame*) codant la protéine Core (Xu *et al.*, 2001, 2003).

Après sa synthèse, la protéine ARFP s'associe au RE. Cette protéine à une demi-vie très courte (inférieure à 10 minutes) en raison de sa rapide dégradation par le protéasome (Xu *et al.*, 2003).

L'existence d'anticorps et de réponses des cellules T dirigés contre la protéine F a été démontrée chez des patients infectés par le VHC (Bain *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2008). Cette observation suggère que la protéine ARFP est synthétisée *in vivo*, durant une infection naturelle par le VHC.

Toutefois, bien qu'une étude ait montré que l'expression de la protéine Core réprimait celle de la protéine ARFP (Wolf *et al.*, 2008), le rôle exact de la protéine F dans le cycle viral du VHC n'est à l'heure actuelle pas connu.

- *Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2*

Lors de leur maturation, les glycoprotéines E1 et E2 sont clivées de la polyprotéine précurseur par une signal peptidase cellulaire au niveau de la membrane du RE (Penin *et al.*, 2004).

En référence à la souche VHC H77 de génotype 1a (numéro d'accession dans la banque de gènes du NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) : AF009606), E1 et E2 comportent 192 et 362 acides aminés, respectivement. Par ailleurs, les glycoprotéines E1 et E2 ont des poids moléculaires d'environ 31 kDa et 70 kDa, respectivement (Yagnik *et al.*, 2000).

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont des protéines transmembranaires de type I comportant toutes deux un ectodomaine N-terminal et un domaine transmembranaire C-terminal d'une trentaine d'acides aminés. Les domaines transmembranaires ont une double fonction : ils permettent d'une part l'ancrage des glycoprotéines dans la membrane du RE et d'autre part, jouent un rôle important dans la formation des hétérodimères E1/E2 (Penin *et al.*, 2004). En effet, E1 et E2 s'associent pour former des hétérodimères non-covalents à la surface des virions, qui sont enchâssés dans l'enveloppe virale dérivée du RE.

E1 et E2 sont exprimées à la surface de l'enveloppe du VHC et constituent les déterminants essentiels de la reconnaissance des corécepteurs. Ces glycoprotéines jouent donc un rôle primordial dans la première phase du cycle viral qui est l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte. En outre, l'exposition des glycoprotéines à la surface du virion en font une cible de choix pour le système immunitaire adaptatif. Un nombre important d'épitopes ciblés par les Ac et par la réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ a été décrit sur ces glycoprotéines (Brown *et al.*, 2007).

Les ectodomaines des glycoprotéines du VHC sont hautement glycosylés. Entre 4 et 5 sites de glycosylation potentiels dans E1 et jusqu'à 11 sites dans E2 peuvent être modifiés par N-glycosylation. Certains de ces N-glycanes jouent un rôle essentiel dans le repliement et/ou l'entrée du VHC. De plus, le haut niveau de glycosylation suggère que ces glycanes peuvent moduler l'immunogénicité des glycoprotéines du VHC et restreindre l'attachement de certains Ac à

leurs épitopes (Helle *et al.*, 2007). La N-glycosylation des protéines s'effectue lors de la modification post-traductionnelle et ne se réalise qu'au niveau d'un motif d'acides aminés bien particulier : motif N-x-S/T-x. Dans ce motif, N correspond à une asparagine, S à une sérine, T à une thréonine et x à n'importe quel acide aminé excepté une proline (Kornfeld & Kornfeld, 1985; Helle *et al.*, 2007).

La glycoprotéine E2 contient trois régions hypervariables, nommées HVR1, HVR2 et HVR3. La région HVR1, en zone N-terminale de la protéine, est constituée de 27 acides aminés. La région HVR2 est constituée de 9 acides aminés et la région HVR3, comprise entre les régions HVR1 et HVR2, se compose de 36 acides aminés (Troesch *et al.*, 2006).

Une étude récente a réévalué la région HVR3. Cette étude retrouvait cette région hypervariable nommée ici $HVR3^{P}$, mais les résultats concluaient qu'elle pouvait être restreinte à 17 acides aminés (Torres-Puente *et al.*, 2008). Toutefois, l'évaluation de HVR3 dans cette étude n'a été réalisée qu'à partir de souches VHC de génotype 1.

En dépit de sa forte variabilité, les propriétés physico-chimiques et la conformation de HVR1 sont hautement conservées et HVR1 comporte des résidus basiques à des positions spécifiques de sa séquence (Penin *et al.*, 2001). Ceci est cohérent avec le rôle fonctionnel de HVR1. En effet, HVR1 est la cible du système immunitaire et interagit avec les corécepteurs HS et SR-BI nécessaires à l'attachement et à l'entrée du virus, respectivement. Ainsi, HVR1 est soumise à des pressions de sélection positives et négatives, la poussant à muter pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte tout en conservant ses propriétés structurales requises pour son rôle fonctionnel dans l'entrée virale.

Outre HVR1 de E2 qui intervient dans la reconnaissance de corécepteurs cellulaires, d'autres régions de E2 sont impliquées dans la reconnaissance des corécepteurs. En effet, E2 contient un site conformationnel d'attachement au corécepteur CD81. Ce site de fixation est sudivisé en quatre sous-sites (CD81 *binding domain*-1, -2a, -2b et -3), dont un chevauche la région HVR2 (CD81 *binding domain*-1).

Une cartographie des glycoprotéines E1 et E2 mentionnant l'essentiel des régions et des sites d'intérêts fonctionnels est illustrée en **figure 9**. Les positions des acides aminés sont exprimées par rapport à la polyprotéine entière et en référence à la souche VHC H77-1a (numéro d'accession : AF009606).

Krey *et al.* ont récemment décrit la connectivité des 9 ponts disulfures de l'ectodomaine de E2. Sur la base de leurs résultats et d'autres données disponibles, ils ont suggéré que la protéine E2 pourrait présenter une structure tertiaire semblable à celle des protéines de fusion de classe II et que E1 pourrait être sa protéine chaperonne. En effet, la prédominance de feuillets β au sein de la

structure secondaire et la connectivité des ponts disulfures permettent le repliement de la chaîne polypeptidique de l'ectodomaine de E2 d'une façon similaire aux protéines de fusion de classe II.

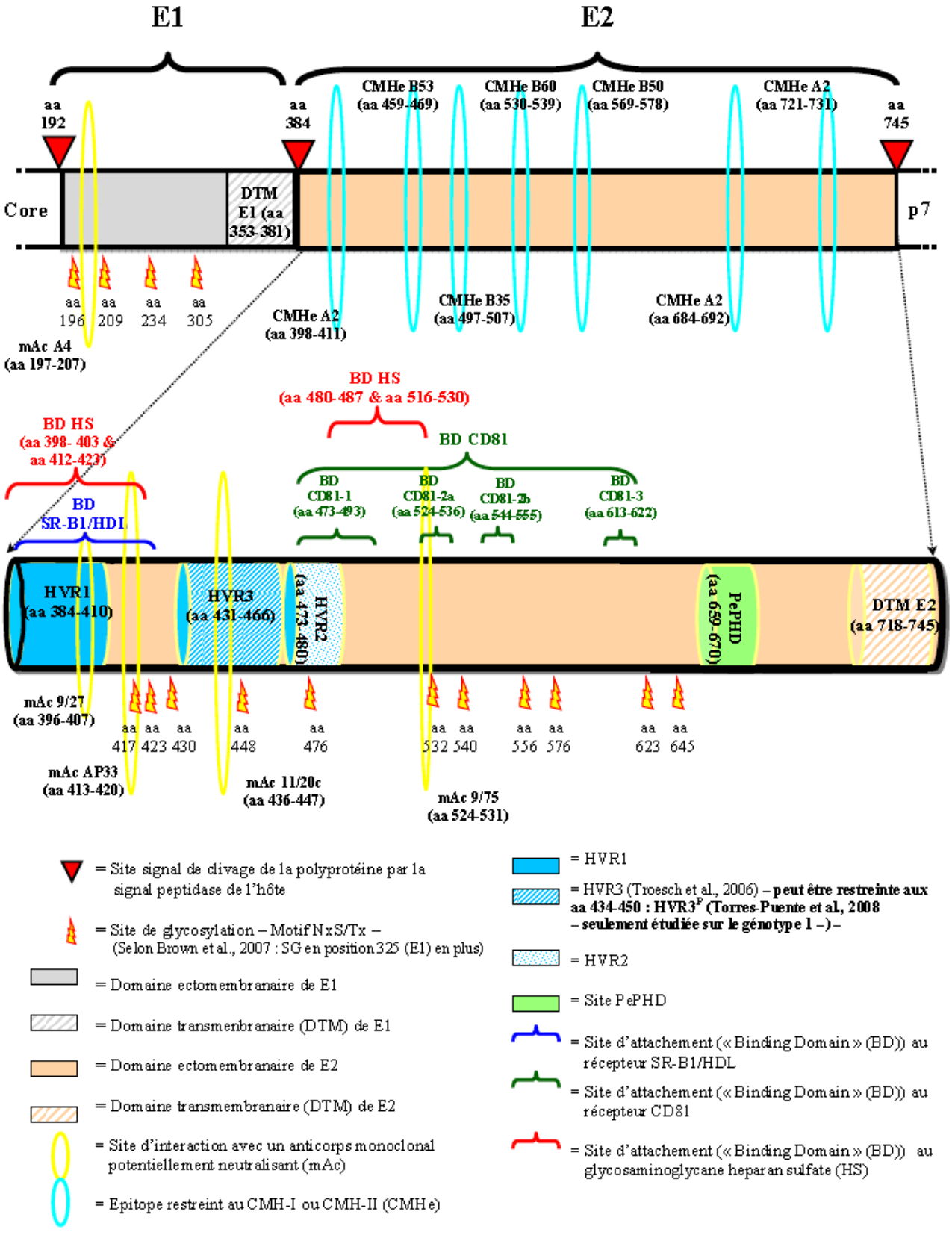


Figure 9. Cartographie fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC.

De façon semblable à ces protéines, l'ectodomaine de E2 présente trois domaines stucturaux distincts nommés DI, DII et DIII. Le modèle en trois dimensions développé par ces auteurs révèle la distribution des acides aminés de la protéine E2 dans les différents domaines, notamment la localisation des sites de fixation au récepteur CD81 à l'interface des domaines DI et DIII. En raison de son interaction avec le CD81, l'interface des domaines DI/DIII pourrait avoir un rôle important au cours du changement conformationnel fusogénique. Ce modèle tridimensionnel de E2 a également mis en évidence une région d'acides aminés hautement conservés qui pourrait correspondre à la boucle de fusion putative. Ainsi, la distribution des résidus cystéine générant la formation des ponts disulfures est un élément capital pour un repliement tridimensionnel correct (Krey *et al.*, 2010).

La glycoprotéine E2 contient en C-terminal un domaine appelé PePHD (*PKR-eIF2α phosphorylation homology domain*) qui interagirait directement avec la PKR cellulaire, pouvant ainsi réprimer son activité antivirale (Taylor *et al.*, 1999).

- *La protéine p7*

La protéine p7 est un petit polypeptide hydrophobe de 63 acides aminés (Griffin *et al.*, 2005). Comme Core, E1 et E2, la protéine p7 bien que généralement classée dans les protéines NS, est clivée du précurseur polyprotéique viral par une signal peptidase cellulaire. Cette protéine comporte deux domaines transmembranaires qui s'ancrent dans la membrane du RE et qui sont connectés par une boucle cytoplasmique (Sakai *et al.*, 2003).

La protéine p7 est essentielle pour la production de virions infectieux *in vivo* (Sakai *et al.*, 2003) et pourrait appartenir à la famille des viroporines, qui permettent d'augmenter la perméabilité membranaire. Il a été démontré que p7 forme un canal ionique dans des bicouches lipidiques artificielles, renforçant l'hypothèse qu'elle pourrait se rapprocher des viroporines (Griffin *et al.*, 2003; Pavlović *et al.*, 2003).

- *La protéine NS2*

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire de 21 à 23 kDa qui comporte en N-terminal 96 résidus amino-acides hautement hydrophobes, formant ainsi trois ou quatre domaines transmembranaires au sein du RE. La partie C-terminale de NS2 est localisée dans le cytoplasme. Avec le domaine N-terminal de NS3, la localisation de la région C-terminale de NS2 rend possible l'activité de l'autoprotéase NS2/3 Zn^{2+}-dépendante, permettant de séparer ces protéines l'une de l'autre à partir du précurseur polyprotéique. Il a été démontré que le clivage NS2/3 est essentiel

pour la réplication de l'ARN viral (Welbourn *et al.*, 2005). En outre, la protéine NS2 pourrait être impliquée dans l'assemblage et la libération du virus (Pietschmann *et al.*, 2006).

- *Les protéines NS3 et NS4A*

Les protéines NS3 et NS4A forment un complexe protéique essentiel pour le clivage de la polyprotéine et la réplication de l'ARN viral. NS3 est une protéine relativement hydrophobe de 69 kDa et NS4A est une petite protéine de 54 acides aminés.

Les 189 acides aminés N-terminaux de NS3 constituent le domaine sérine-protéase de la protéine qui s'associe avec le cofacteur NS4A. Cette association permet de stabiliser le domaine sérine-protéase de NS3 et de l'activer pour permettre le clivage de la polyprotéine aux sites NS4A/4B, NS4B/5A et NS5A/5B (Penin *et al.*, 2004). La partie N-terminale hydrophobe de NS4A forme un segment transmembranaire requis pour ancrer le complexe NS3/4A dans la membrane du RE (Wölk *et al.*, 2000; Penin *et al.*, 2004).

Les 442 acides aminés C-terminaux de NS3 forment un domaine hélicase/NTPase qui intervient dans la réplication de l'ARN viral. Ce domaine a probablement plusieurs fonctions: activité NTPase stimulée par l'ARN, capacité d'attachement à l'ARN, et intervention dans le déroulement des régions de l'ARN riches en structures secondaires. Ce phénomène de déroulement est couplé à l'hydrolyse de NTP qui fournit l'énergie nécessaire (Penin *et al.*, 2004). L'activité hélicase de la NS3 pourrait également permettre de dissocier la forme réplicative ARN double brin du VHC. De plus, le domaine hélicase de la protéine NS3 joue un rôle dans les étapes précoces de la morphogénèse des virions (Ma *et al.*, 2008).

La protéase NS3/4A abrogerait les fonctions effectrices de IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) et de RIG-I (*retinoic acid-inductible gene-I*) (Foy *et al.*, 2003, 2005). RIG-I est un des deux principaux détecteurs des PAMPs dans le cas d'une infection par le VHC et IRF3 participe à l'activation de la transcription du gène de l'IFN-β. L'inhibition des ces facteurs cellulaires empêcherait l'expression des gènes codant l'IFN-β. NS3/4A pourrait donc interférer dans les mécanismes de l'immunité innée de l'hôte.

- *La protéine NS4B*

La protéine NS4B est une protéine de 27 kDa intégralement associée à la membrane du RE qui contiendrait au moins quatre domaines transmembranaires (Lundin *et al.*, 2003). Cette protéine induit la formation d'un compartiment membranaire spécialisé, appelé "*membranous web*", qui est le siège de la réplication de l'ARN viral (Egger *et al.*, 2002).

- *La protéine NS5A*

La protéine NS5A est une phosphoprotéine de 56 à 58 kDa ancrée dans la membrane du RE. L'association à la membrane du RE est médiée par une hélice α amphipatique présente à l'extrémité N-terminale de NS5A. Après cette hélice α, NS5A contient trois domaines distincts numérotés I à III séparés par des séquences de faible complexité (*low complexity sequence* ou LCS) (Tellinghuisen *et al.*, 2004). La région N-terminale du domaine I contient quatre résidus cystéines, qui génèrent un motif d'attachement au zinc. Des mutations empêchant soit l'ancrage de NS5A dans la membrane du RE, soit l'attachement au zinc, sont létales pour la réplication de l'ARN viral (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Ceci souligne le rôle potentiel de NS5A dans la réplication de l'ARN.

Le domaine II de NS5A contient une région appelée ISDR (*interferon sensitivity determining region*) (Tellinghuisen *et al.*, 2004). L'ISDR est impliquée dans l'interaction avec la protéine cellulaire PKR induite en réponse à l'IFN (Gale *et al.*, 1998). L'interaction entre ISDR et PKR inhiberait l'activité antivirale de cette dernière.

Le domaine III est une des régions les moins conservées du génome du VHC (Tellinghuisen *et al.*, 2004). Appel *et al.* ont identifié ce domaine comme un déterminant important pour la formation des particules virales. En effet, les protéines Core et NS5A "colocalisent" au sein des gouttelettes lipidiques qui semblent être un site pour l'assemblage des particules du VHC. La délétion du domaine III de NS5A empêche cette colocalisation, la formation des particules virales infectieuses et conduit à une accumulation de Core au niveau des gouttelettes lipidiques (Appel *et al.*, 2008). Comme le domaine III de NS5A fait partie des régions les plus variables du génome viral, divers isolats du VHC peuvent montrer des différences dans leur niveau de production de virions et ainsi dans leur pathogénicité.

Une étude récente a montré que NS5A interagit avec l'apolipoprotéine cellulaire ApoE (Benga *et al.*, 2010). Cette interaction NS5A/ApoE était importante pour l'assemblage des particules virales et la libération des virions infectieux hors de la cellule hôte.

- *La protéine NS5B*

La protéine NS5B est l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC qui catalyse la réplication du génome viral. C'est une protéine de 68 kDa comportant un motif GDD conservé (résidus glycine – acide aspatique – acide aspartique) caractéristique des ARN polymérases virales ARN-dépendante et qui correspond au site catalytique de l'enzyme.

Les 21 acides aminés de la région C-terminale de NS5B forment un domaine transmembranaire α-hélicoïdal, qui est responsable de son ancrage dans la membrane du RE et de

son orientation cytoplasmique (Moradpour *et al.*, 2004). En outre, l'association de NS5B avec la membrane du RE est essentielle pour la réplication de l'ARN viral (Moradpour *et al.*, 2004). L'analyse tridimensionnelle de NS5B a révélé que cette protéine ressemble à une main droite qui comportent les domaines structuraux appelés "paume", "doigts" et "pouce" (Ago *et al.*, 1999; Bressanelli *et al.*, 2002). Cette structure est similaire à celle rencontrée chez d'autres polymérases (Joyce & Steitz, 1995).

II. Variabilité génétique du VHC

Le VHC est un virus présentant une haute variabilité génétique qui s'exprime à plusieurs niveaux : variabilité inter-génotypique (génotypes), variabilité intra-génotypique (sous-types) et variabilité intra-hôte (quasi-espèces). En effet, des analyses phylogénétiques de séquences de souches du VHC isolées dans différentes parties du monde ont conduit à l'identification de différents génotypes. Il existe six génotypes majeurs (numérotés 1 à 6) qui sont décomposés en de nombreux sous-types (identifiés par une lettre minuscule après le numéro du génotype : 1a, 1b, 2c, 3a, 4a,…) (Pawlotsky, 2003). Il est intéressant de noter qu'un septième génotype (génotype 7) aurait été retenu récemment à partir de l'étude du sérum de trois patients originaires d'Afrique Centrale (Murphy *et al.*, 2007; Gottwein *et al.*, 2009). Les différents génotypes et sous-types ne sont pas uniformément distribués au niveau mondial. Par exemple, les sous-types 1a et 1b sont les génotypes les plus communément rencontrés en Europe et aux Etats-Unis alors qu'en Afrique du Nord et au Moyen-Orient, c'est le génotype 4 qui prédomine (Zein, 2000).

De plus, au sein de l'hôte infecté, le VHC circule sous forme de quasi-espèces, c'est-à-dire sous forme d'une population hétérogène de variants viraux génétiquement proches mais distincts (Pawlotsky, 2003).

Une estimation des divergences nucléotidiques entre génotypes, sous-types, isolats au sein d'un même sous-type et variants de quasi-espèces est fournie dans le **tableau 1**.

Terme	Nomenclature	Gamme de variations nucléotidiques (%)
Génotype	*1 à 6*	**30% à 50%**
Sous-type	*a, b, c,…*	**15% à 30%**
Isolat		**5% à 15%**
Quasi-espèce		**1% à 5%**

Tableau 1. Variabilité génétique du VHC (d'après Hoofnagle (Hoofnagle, 2002)).

La haute variabilité du VHC est imputable en premier lieu à une production quotidienne très élevée de virions chez les patients infectés. Cette production a été estimée à environ 10^{12} virions/jour (Neumann *et al.*, 1998). En outre, cette forte production est associée à l'absence d'activité correctrice exonucléasique 3'→ 5' de l'ARN polymérase ARN-dépendante virale (NS5B) qui entraîne un taux d'erreurs d'environ 10^{-3} substitutions nucléotidiques/site/an (Ogata *et al.*, 1991). Enfin, les pressions immunitaires exercées par l'hôte influencent la variabilité virale.

La répartition des zones de haute variabilité sur le génome du VHC n'est pas homogène. Par exemple, la région 5'NC fait partie des régions du génome les plus conservées avec une homologie de séquence entre diverses souches du VHC estimée à plus de 90% (Bukh *et al.*, 1992). De même, le gène codant la protéine de capside Core présente une forte conservation parmi les génotypes 1 à 6 du VHC avec une similarité de séquence nucléotidique estimée entre 79,4% et 99% (Bukh *et al.*, 1994). A l'inverse, d'autres régions du VHC sont hautement variables. Parmi les régions les plus variables, la région variable V3 en position C-terminale de la protéine NS5A et certaines régions des glycoprotéines d'enveloppe virale ont été décrites (Pawlotsky, 2003).

Trois régions hypervariables (HVR1, HVR2 et HVR3) ont été mises en évidence dans la glycoprotéine d'enveloppe E2. HVR1 varie considérablement entre différentes souches du VHC. En effet, Simmonds a rapporté que des variants de sous-type 1b épidémiologiquement non-liés différaient en moyenne de 13,2 acides aminés sur HVR1 (constitué de 27 acides aminés) ce qui représente une divergence moyenne entre les séquences de 49%, alors qu'une divergence de seulement 9% était observée sur le reste du génome (Simmonds, 1999). De plus, après 17 ans d'infection, une divergence dans HVR1 supérieure à 36% a été observée entre des individus infectés par le même inoculum du VHC (Simmonds, 1999). Exposées à la surface du virion, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont des cibles privilégiées de la réponse immunitaire. Ainsi, la forte divergence observée dans HVR1 après plusieurs années d'infection chez ces patients originellement infectés par le même isolat viral, peut être attribuée à la pression exercée par le système immunitaire de l'hôte sur les quasi-espèces du VHC.

En évoluant rapidement, les quasi-espèces virales permettent le plus souvent d'assurer la persistance du virus en sélectionnant des variants adaptés à leur environnement, lequel change continuellement au cours d'une infection par le VHC. Cette adaptation implique des forces de sélection opposées qui sont d'une part, les contraintes structurales et fonctionnelles imposées pour assurer au virus le maintien de son potentiel infectieux (pressions de sélection négatives) et d'autre part, les pressions de sélection positives principalement liées aux réponses immunitaires humorale et cellulaire de l'hôte. L'administration d'un traitement antiviral fait partie des facteurs externes entraînant un changement environnemental pour les quasi-espèces du VHC (Pawlotsky, 2003).

III. Entrée du VHC dans la cellule hôte : première étape cruciale du cycle viral

Le VHC a un tropisme principalement hépatocytaire. En effet, la permissivité des hépatocytes au VHC a été démontrée *in vitro* et *in vivo*. Cependant, des travaux ont montré la sensibilité de plusieurs autres types cellulaires à l'infection par le VHC *in vitro*, avec une production virale toutefois discutée : *peripheral blood mononuclear cells* ou PBMCs (Caussin-Schwemling *et al.*, 2001), cellules dendritiques dérivées de monocytes sanguins (Navas *et al.*, 2002) ou encore cellules de Kupffer (Royer *et al.*, 2003).

La première étape du cycle viral du VHC correspond à l'attachement et à l'entrée des virions dans la cellule hôte via leur interaction avec les corécepteurs cellulaires. Cette étape sera développée en détail dans les sections qui suivent.

La dernière phase de l'entrée virale est la fusion pH-dépendante du virus avec les endosomes cellulaires, qui engendre la décapsidation du VHC et la libération de son génome à ARN de polarité positive (+) dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'ARN génomique va alors servir directement à la synthèse des protéines virales au sein du réticulum endoplasmique (RE). En parallèle, cet ARN+ va servir à la synthèse de brins d'ARN de polarité négative (ARN-, intermédiaires réplicatifs) grâce à l'ARN polymérase ARN-dépendante virale au niveau des complexes de réplication, localisés dans la membrane du RE. Ces ARN- vont à leur tour servir de matrice pour générer de nouveaux brins d'ARN+ génomiques. Les protéines structurales vont servir à l'assemblage de nouvelles particules virales qui suivront la voie de sécrétion cellulaire jusqu'à leur exportation hors de la cellule par un phénomène de bourgeonnement.

La **figure 10** illustre les différentes étapes du cycle viral du VHC dans sa principale cible cellulaire : l'hépatocyte.

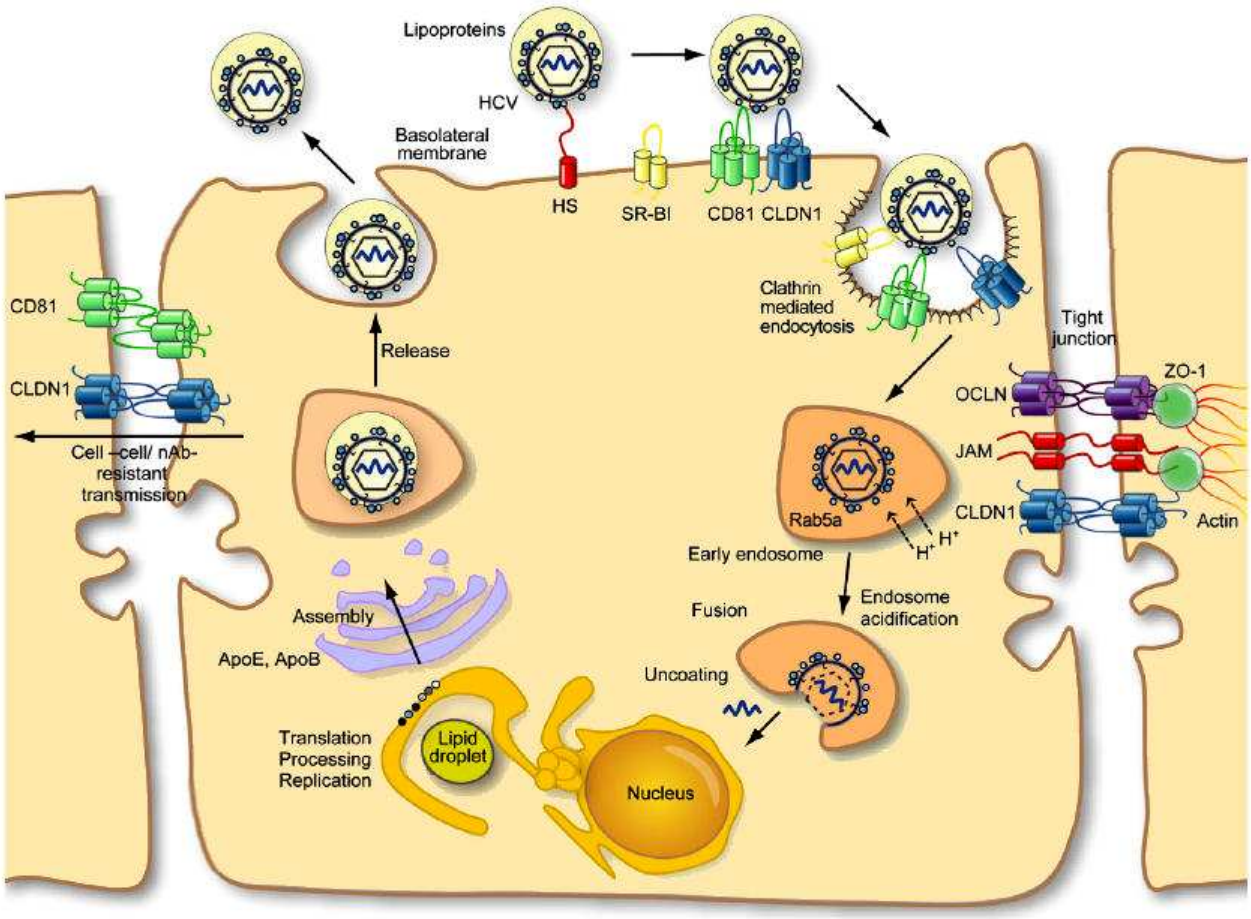


Figure 10. Cycle viral du VHC au niveau de sa principale cible cellulaire : l'hépatocyte (d'après Zeisel *et al.* (Zeisel *et al.*, 2011)).

1). Facteurs d'entrée impliqués dans l'attachement et l'entrée virale

L'attachement et l'entrée du VHC dans la cellule hôte sont complexes et se déroulent en plusieurs étapes. Par l'utilisation de différents modèles *in vitro*, plusieurs corécepteurs putatifs du VHC exprimés à la surface cellulaire ont pu être identifiés : la tétraspanine CD81 (Pileri *et al.*, 1998), SR-BI (ou *scavenger receptor*-BI) (Scarselli *et al.*, 2002), les glycosaminoglycanes (GAG) heparan sulfates (HS) (Barth *et al.*, 2003), Claudine-1 (CLDN-1) (Evans *et al.*, 2007) et plus récemment Occludine (OCLN) (Ploss *et al.*, 2009).

Les **glycosaminoglycanes (GAG)** représentent le premier site d'ancrage pour de nombreux virus infectant les cellules eucaryotes. La composition et la quantité des GAG varient en fonction du tissu, du type cellulaire et du stade de développement cellulaire. Dans le foie, ce sont des glycosaminoglycanes hautement sulfatés.

Les GAG hautement sulfatés hépatocytaires appelés **heparan sulfates (HS)** (Barth *et al.*, 2006) constituent le premier site d'attachement du VHC avec la cellule cible. En effet, il a été montré

in vitro, en utilisant une protéine recombinante soluble de E2 (sE2, sans domaine transmembranaire) et le modèle HCV-"*like particle*" présentant l'hétérodimère E1/E2 (HCV-LP), que la glycoprotéine E2 du VHC s'attachait spécifiquement aux molécules de HS exprimées à la surface cellulaire de lignées d'hépatome humain (Barth *et al.*, 2003). Une autre étude a montré que l'héparine (analogue de l'heparan sulfate) inhibait l'infection des HCVcc quand elle était administrée durant l'attachement du virus (Koutsoudakis *et al.*, 2006). Cette même étude montrait que le prétraitement des cellules avec de l'héparinase (enzyme dégradant l'heparan sulfate) réduisait fortement l'infection des HCVcc. Tout ceci suggère fortement que le HS interagit avec E2 du VHC au moment de l'étape d'attachement permettant d'initier l'infection des cellules cibles.

Le **CD81** est une protéine de surface cellulaire de 25 kDa (Barth *et al.*, 2006), membre de la famille des tétraspanines qui sont des glycoprotéines transmembranaires de type III. Ces glycoprotéines comportent quatre segments transmembranaires, produisant ainsi deux boucles extracellulaires (*small* (SEL) et *large* (LEL) *extracellular loops*) et de courtes régions intracellulaires (Martin *et al.*, 2005) (**figure 11**). La localisation tissulaire de CD81 est ubiquitaire excepté au niveau des cellules anucléées (Barth *et al.*, 2006). CD81 est le premier récepteur du VHC à avoir été identifié en utilisant une sE2 (Pileri *et al.*, 1998).

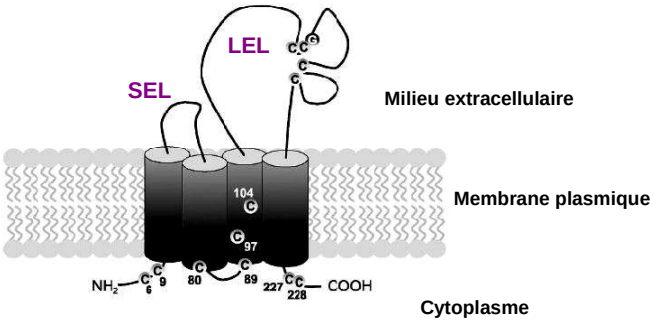


Figure 11. Schéma de CD81 : corécepteur cellulaire du VHC (d'après Delandre *et al.* (Delandre *et al.*, 2009)).

- SEL : *Small extracellular loop*
- LEL : *Large extracellular loop*

Des formes recombinantes solubles de CD81-LEL humain sont capables de s'attacher à la glycoprotéine E2 du VHC et ainsi d'inhiber son interaction avec le récepteur cellulaire CD81 (Flint *et al.*, 1999). De plus, des Ac anti-CD81 inhibent *in vitro* l'entrée du VHC dans les lignées d'hépatome, d'après les modèles HCVpp et HCVcc (Zhang *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005). Ces données ont démontré le rôle de CD81-LEL dans l'entrée du VHC. En outre, basé sur l'adjonction d'Ac anti-CD81 à différents intervalles de temps durant la phase précoce de l'infection, Koutsoudakis *et al.* ont prouvé en utilisant le système HCVcc que l'inhibition du VHC par les Ac anti-CD81 se produisait à une étape post-attachement (Koutsoudakis *et al.*, 2006).

En utilisant le modèle HCVpp, Owsianka *et al.* ont déterminé des résidus cruciaux pour l'attachement de E2 à CD81 : W420, Y527, W529, G530 et D535 (Owsianka *et al.*, 2006). Ces résidus sont conservés parmi tous les génotypes du VHC.

Toutefois, la distribution ubiquitaire de CD81 ne permet pas d'expliquer le tropisme du VHC principalement restreint aux hépatocytes, suggérant que CD81 joue un rôle de cofacteur et que d'autres molécules à la surface cellulaire sont impliquées dans le processus d'entrée virale.

En utilisant une sE2 pour identifier des protéines de surface impliquées dans l'entrée du VHC, Scarselli *et al.* ont caractérisé le ***scavenger receptor* de classe B et de type I (SR-BI ou Cla-1 chez l'Homme)** (Scarselli *et al.*, 2002). SR-BI est une protéine de 82 kDa qui comporte deux segments transmembranaires, générant ainsi une large boucle extracellulaire et deux courts domaines cytoplasmiques. Cette protéine contient 9 sites potentiels de N-glycosylation (Cocquerel *et al.*, 2006) (**figure 12**). SR-BI est hautement exprimé dans le foie, les tissus stéroïdogéniques (ovaires, glandes surrénales) (Krieger, 2001), et est aussi exprimé par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes (Yamada *et al.*, 2005), les lymphocytes B (Stamataki *et al.*, 2009).

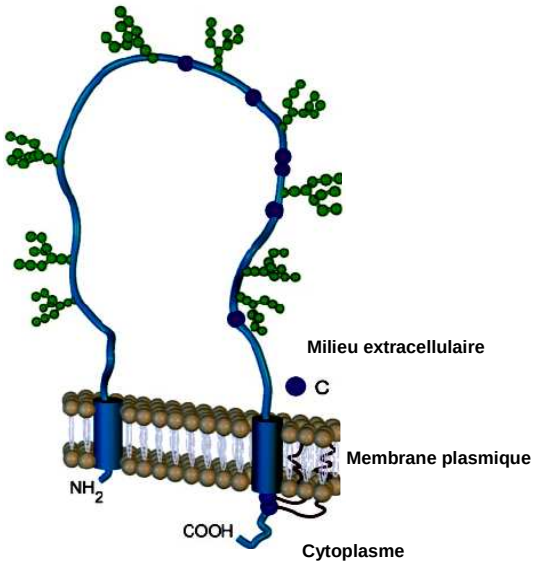


Figure 12. Schéma de SR-BI : corécepteur cellulaire du VHC (d'après Cocquerel *et al.* (Cocquerel *et al.*, 2006)).

La boucle extracellulaire de SR-BI contient 9 sites potentiels de N-glycosylation (en vert) et 6 résidus cystéine (en violet). De plus, SR-BI est palmitoylé au niveau de deux cystéines localisées à son extrémité C-terminale.

Le SR-BI peut se lier à plusieurs lipoprotéines telles que les HDL, VLDL, LDL, les formes acétylées et oxydées des LDL ainsi que les vésicules de phospholipides anioniques. La fonction primaire de SR-BI est de médier le transport des esters du cholestérol associés aux HDL par un mécanisme d'assimilation sélective. Dans ce type de mécanisme, la lipoprotéine HDL s'attache à SR-BI puis les esters du cholestérol sont délivrés à la membrane plasmique sans assimilation ni

dégradation de la particule HDL entière. En outre, SR-BI stimule le flux bidirectionnel du cholestérol libre entre les cellules et les lipoprotéines (Connelly & Williams, 2004).
Il a été montré que les ligands naturels de SR-BI modulent l'infection par le VHC. En effet, l'ajout de HDL humain lors de l'infection de lignées d'hépatome par des HCVpp engendrait une augmentation du pouvoir infectieux de ces HCVpp (Voisset *et al.*, 2005). A l'inverse, von Hahn *et al.* ont démontré que la forme oxydée des LDL était capable d'inhiber l'infection par les HCVpp et les HCVcc (von Hahn *et al.*, 2006).
En outre, HVR1 de E2 intervient dans l'interaction entre E2 et SR-BI et module l'effet positif des HDL sur l'entrée du VHC. En effet, la délétion de HVR1 aboutissait à l'abrogation de l'interaction de sE2 avec SR-BI (Scarselli *et al.*, 2002). De plus, en utilisant le modèle HCVpp, l'effet facilitateur des HDL sur l'entrée du VHC était aboli lorsque HVR1 était délétée (Voisset *et al.*, 2005; Bartosch *et al.*, 2005; Dreux *et al.*, 2007).

En raison de son rôle dans le transport du cholestérol, SR-BI est une protéine capable de modifier la composition lipidique de la membrane cellulaire. Ainsi, il est possible d'imaginer que l'effet facilitateur des HDL sur l'entrée du VHC soit la conséquence d'une modification de la membrane plasmique induite par SR-BI pour qu'il puisse remplir son rôle biologique après sa liaison avec le HDL, son ligand principal naturel. Cette modification pourrait faciliter une des étapes d'entrée du virus, comme par exemple la fusion membranaire. Alternativement, il a été proposé que le VHC puisse interagir avec SR-BI via les lipoprotéines, fournissant ainsi un mécanisme d'entrée de substitution en présence de NAc (Maillard *et al.*, 2006). Tout en conservant son potentiel infectieux, le VHC pourrait ainsi échapper à la réponse immunitaire humorale via un masquage des épitopes neutralisants par les lipoprotéines. Une autre étude a montré que l'infection des HCVcc en l'absence de lipoprotéines peut être inhibée par des Ac anti-SR-BI (Zeisel *et al.*, 2007a), suggérant une interaction directe entre les virions et le récepteur SR-BI.

En passant au crible une banque d'ADNc générée à partir de la lignée d'hépatome humain Huh7.5 hautement permissive à l'infection par le VHC, Evans *et al.* ont identifié une protéine additionnelle impliquée dans l'entrée du VHC : **Claudine-1 (ou CLDN-1)**. En effet, ils ont montré que l'expression de CLDN-1 rendait la lignée cellulaire rénale embryonnaire HEK 293T permissive à l'infection par les HCVpp et les HCVcc (Evans *et al.*, 2007).
CLDN-1 appartient à la grande famille des Claudines composée d'au moins 24 membres. Les Claudines sont des protéines transmembranaires de petite taille (entre 20 et 27 kDa) impliquées dans la formation des jonctions serrées (Van Itallie & Anderson, 2006). Ces protéines comportent quatre domaines transmembranaires produisant un segment médian intracellulaire, deux domaines extracellulaires (ECL1 et ECL2) et des segments intracellulaires N- et C-terminaux. Le segment

N-terminal est très court, constitué de 2 à 6 résidus. La boucle extracellulaire ECL1 des Claudines est caractérisée par la présence d'un motif W_{30}-GLW_{51}-C_{54}-C_{64} hautement conservé (**figure 13**). CLDN-1 est hautement exprimée dans le foie ainsi que par d'autres tissus épithéliaux (Furuse *et al.*, 1998).

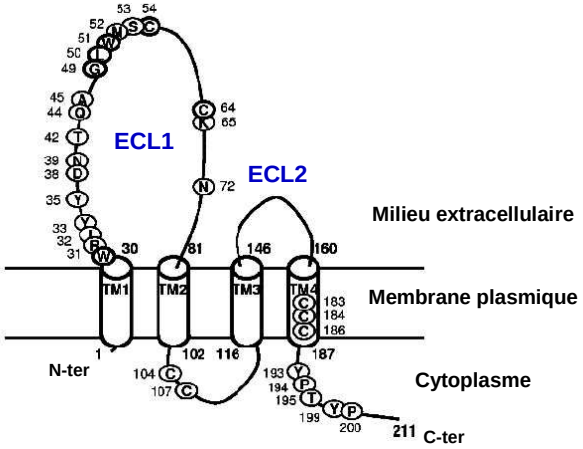


Figure 13. Schéma de CLDN-1 : corécepteur cellulaire du VHC (d'après Cukierman *et al.* (Cukierman *et al.*, 2009)).

- ECL1 : *Extracellular loop 1*
- ECL2 : *Extracellular loop 2*
- TM : *Transmembrane domain*

CLDN-1 est impliquée dans l'entrée du virus dans une étape suivant l'attachement (Evans *et al.*, 2007). Jusqu'à aujourd'hui, une interaction directe entre les glycoprotéines d'enveloppe E1/E2 et le récepteur CLDN-1 n'a pas été clairement démontrée. Toutefois, à partir du modèle HCVpp, il a été montré que les six résidus constituant le motif très conservé parmi toutes les Claudines (motif W_{30}-GLW_{51}-C_{54}-C_{64}) et les résidus I32, D38 et E48 dans la boucle ECL1 de CLDN-1 sont importants pour l'entrée du VHC (Evans *et al.*, 2007; Cukierman *et al.*, 2009).

CLDN-1 et CD81 "colocalisent" sur les surfaces apicale et basolatérale des hépatocytes (Reynolds *et al.*, 2008). En outre, Harris *et al.* ont démontré que CLDN-1 s'associe à CD81 pour former des complexes récepteurs CLDN-1/CD81 (Harris *et al.*, 2008).

Des mutations sur les résidus 32 et 48 (I32M et E48K) dans l'ECL1 de CLDN-1 peuvent rompre l'association CLDN-1/CD81 et sa fonction de récepteur, probablement en raison d'une altération conformationnelle d'ECL1. De plus, l'introduction inversée de ces mutations aux deux résidus d'ECL1 (M32I et K48E) dans le récepteur inactif CLDN-7 rend possible l'association avec CD81, ainsi que l'entrée virale (Harris *et al.*, 2010). En outre, la nature conservée de ces deux résidus (I32 et E48) sur ECL1 de CLDN-1 est importante pour l'entrée du VHC (Evans *et al.*, 2007). La formation des complexes CLDN-1/CD81 via des résidus conservés (notamment I32 et E48 sur ECL1) est essentielle pour promouvoir l'infection par le VHC (Harris *et al.*, 2010).

Pour finir, il a été montré que l'expression stable de deux autres membres de la famille des Claudines, CLDN-6 et CLDN-9 dans des cellules non-hépatiques (cellules HEK 293T), peuvent les rendre permissives à l'infection par des HCVpp (Zheng *et al.*, 2007; Meertens *et al.*, 2008). Il est

intéressant de noter que, contrairement à CLDN-1, CLDN-6 et CLDN-9 sont exprimées dans le foie mais aussi au niveau des PBMCs (Zheng *et al.*, 2007). Cette distribution de CLDN-6 et CLDN-9 dans des tissus non-hépatiques pourrait expliquer, au moins en partie, le mécanisme d'infection extra-hépatique du VHC et en l'occurrence son leucotropisme (Caussin-Schwemling *et al.*, 2001).

Plus récemment, une autre protéine des jonctions serrées, l'**Occludine (ou OCLN)**, a été identifiée comme autre facteur cellulaire essentiel pour l'entrée du VHC. Tout comme pour le mode de découverte de CLDN-1 en tant que cofacteur d'entrée du VHC, OCLN a été identifiée comme corécepteur additionnel en passant au crible une banque d'ADNc générée à partir de la lignée d'hépatome humain Huh7.5 hautement permissive à l'infection par le VHC. La lignée de carcinome rénal (786-O) naturellement résistante à l'infection par le VHC, exprime de hauts niveaux de CD81, SR-BI et CLDN-1 mais approximativement 17 fois moins l'OCLN que la lignée d'hépatome Huh7.5. La surexpression d'OCLN dans ces cellules rénales conduit à une très forte augmentation de leur infection par les HCVpp. De plus, la répression de l'expression d'OCLN entraîne l'inhibition de l'infection de la lignée d'hépatome Hep3B par des HCVpp et celle des cellules Huh7.5 par des HCVpp et des HCVcc (Ploss *et al.*, 2009).

OCLN est une protéine transmembranaire d'environ 60 kDa exclusivement localisée au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales. Cette protéine comprend quatre domaines transmembranaires générant un segment médian intracellulaire, deux boucles extracellulaires (ECL1 et ECL2) et deux domaines N- et C-terminaux cytoplasmiques, court en N-terminal et long en C-terminal (**figure 14**) (Tsukita *et al.*, 1999).

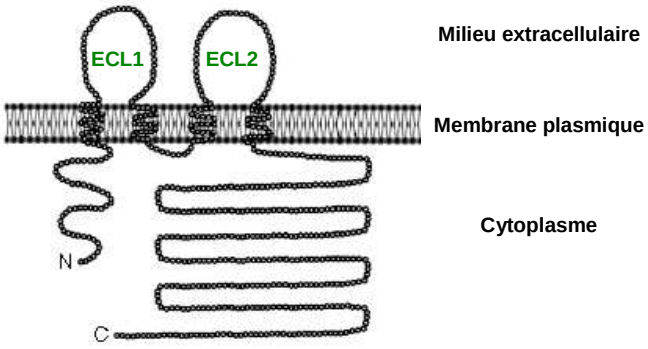


Figure 14. Schéma d'OCLN : corécepteur cellulaire du VHC (d'après Tsukita *et al.* (Tsukita *et al.*, 1999)).

- ECL1 : *Extracellular loop 1*
- ECL2 : *Extracellular loop 2*

L'intervention d'OCLN dans le mécanisme d'entrée du VHC se produirait à une étape suivant l'attachement. En effet, Benedicto *et al.* ont montré qu'OCLN serait impliquée dans l'étape de fusion du VHC avec la cellule hôte, médiée par les glycoprotéines d'enveloppe (Benedicto *et al.*, 2009). Dans une autre étude, ils ont montré qu'une interaction intracellulaire entre la glycoprotéine E2 et Occludine se produisait (Benedicto *et al.*, 2008). De même, Liu *et al.* ont montré qu'OCLN était requise dans l'entrée du VHC et que cette protéine co-précipitait avec E2

dans la lignée d'hépatome Huh7.5.1 infectée par des HCVcc. Avec le système d'immunoprécipitation qu'ils ont utilisé, les auteurs ont noté que la détection de cette interaction pouvait soit dériver d'un pool intracellulaire de complexes OCLN/E2 ou de complexes formés durant l'entrée virale (Liu *et al.*, 2009). D'après ces données, il est donc possible d'imaginer qu'une association OCLN/E2 puisse se produire dans le compartiment extracellulaire après l'attachement du VHC, probablement pour promouvoir la fusion membranaire du virus avec la cellule hôte.

2). Processus d'entrée du VHC

In vivo, le VHC interagit vraisemblablement avec les surfaces basolatérales des hépatocytes. Les glycosaminoglycanes HS correspondent aux premiers sites d'attachement du VHC (Barth *et al.*, 2003; Koutsoudakis *et al.*, 2006) avant d'interagir avec plusieurs facteurs d'entrée qui sont CD81 (Pileri *et al.*, 1998; Koutsoudakis *et al.*, 2006), SR-BI (Scarselli *et al.*, 2002; Voisset *et al.*, 2005), CLDN-1 (Evans *et al.*, 2007) et OCLN (Ploss *et al.*, 2009).
Tous ces facteurs sont requis pour une infection productive par le VHC, suggérant que l'entrée du virus pourrait être médiée par la formation de complexes entre les différents facteurs d'entrée du VHC au niveau de la membrane plasmique (Zeisel *et al.*, 2007a; Krieger *et al.*, 2010).

Des études de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) ont fourni la preuve que des complexes CLDN-1/CD81 se forment et jouent un rôle dans l'infection par le VHC (Harris *et al.*, 2008, 2010). En outre, la formation de complexes CLDN-1, -6, -9/CD81 est essentielle pour l'entrée virale (Krieger *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2010). Cependant, les connaissances sur d'autre(s) association(s) potentielle(s) entre co-facteurs d'entrée sont limitées. Par exemple, il a été montré que CLDN-1 localisée sur la membrane plasmique interagit avec OCLN mais cette association n'a pas montré de lien entre interaction CLDN-1/OCLN et infection du VHC (Harris *et al.*, 2010).

La séquence des événements menant de l'interaction du VHC avec les récepteurs cellulaires à l'internalisation virale suivie de la fusion membranaire reste encore aujourd'hui mal connue. Cependant, plusieurs études utilisant les modèles *in vitro* HCVpp et HCVcc ont montré que l'entrée du VHC dans les lignées d'hépatome et les hépatocytes primaires humains s'effectuait par endocytose médiée par la clathrine (Blanchard *et al.*, 2006; Codran *et al.*, 2006; Coller *et al.*, 2009). Durant la phase d'internalisation du VHC dans la lignée d'hépatome humain Huh7.5, il a été montré que le VHC "colocalisait" avec CD81 et CLDN-1 en dehors des jonctions cellulaires (Coller *et al.*, 2009). En outre, Schwarz *et al.* ont démontré que les niveaux d'expression de SR-BI et de CLDN-1

sont positivement modulés par le contact cellulaire de cellules d'hépatome portées à confluence. Ce contact cellulaire permet de favoriser l'internalisation des HCVcc. Alors que la surexpression de CLDN-1 dans des cellules non-confluentes ne permet pas de reproduire cet effet, celle de SR-BI augmente l'internalisation des HCVcc. Un rôle de SR-BI dans l'internalisation du VHC en fonction de son taux d'expression a donc été suggéré (Schwarz *et al.*, 2009).

Généralement, l'endocytose médiée par la clathrine transporte les virus entrants ainsi que leurs récepteurs vers les endosomes dits précoces et tardifs (Marsh & Helenius, 2006). En utilisant le modèle HCVpp, Meertens *et al.* ont montré que le VHC semblait être délivré uniquement aux endosomes précoces (Meertens *et al.*, 2006). Ceci est cohérent avec des données récentes montrant que le VHC et Rab5a (marqueur des endosomes précoces) "colocalisent" (Coller *et al.*, 2009).

L'acidification du pH au niveau des endosomes est un signal pour la fusion membranaire permettant la pénétration et la décapsidation du virus, suivies de la libération du génome viral dans la cellule hôte. La pénétration des virus enveloppés s'effectue par leur fusion avec la membrane cellulaire, qui est catalysée par des protéines de fusion enchâssées dans l'enveloppe virale (Smith & Helenius, 2004). A l'heure actuelle, les mécanismes de la fusion du VHC ne sont pas complètement compris. Toutefois, des études ont montré que l'entrée des HCVpp et des HCVcc était inhibée en présence d'inhibiteurs de l'acidification des endosomes tels que la concanamycine A, le chlorure d'ammonium, la bafilomycine A1 et la chloroquine (Hsu *et al.*, 2003; Blanchard *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent qu'un processus de fusion membranaire pH-dépendant est requis pour libérer l'ARN génomique du VHC dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Chez les virus, deux classes de protéines de fusion existent :

i). Les protéines de fusion de classe I comme l'hémagglutinine du virus de la grippe (genre *Influenzavirus*, famille *Orthomyxoviridae*) : ces protéines sont synthétisées sous forme de précurseur et leur clivage protéolytique génère un peptide de fusion N-terminal qui est enfoui dans le trimère pré-fusion. Après l'endocytose, l'acidification du pH provoque l'expulsion de ce peptide qui s'ancre alors dans la membrane cellulaire (Söllner, 2004).

ii). Les protéines de fusion de classe II comme le virus de la forêt de Semliki ou *Semliki Forest virus* (genre *Alphavirus*, famille *Togaviridae*) : dans leur forme pré-fusion, ces protéines sont repliées sous forme d'hétérodimère avec la protéine présente en amont dans la polyprotéine précurseur. Cette protéine agit comme une chaperonne de la protéine de fusion. Ces protéines de fusion contiennent trois domaines (DI à DIII), chacun adoptant des repliements en feuillets β. Au lieu d'un peptide de fusion N-terminal, les protéines de fusion de classe II comportent une boucle de fusion interne localisée au bout du domaine DII. La dissociation du dimère protéique (protéine

de fusion et sa chaperonne) à pH faible entraîne l'exposition de la boucle de fusion qui s'insère alors dans la membrane cellulaire (Söllner, 2004; Krey *et al.*, 2010).

Très récemment, Krey *et al.* ont suggéré que le repliement de la glycoprotéine E2 du VHC serait semblable à celui des protéines virales de fusion de classe II et que la glycoprotéine E1 serait sa chaperonne (Krey *et al.*, 2010) (voir plus haut, partie "*Organisation génomique du VHC*" section "*Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2*").

Ces données soulignent l'implication de E1 et E2 dans la fusion membranaire pH-dépendante. De plus, basée sur le système HCVcc, une étude a montré que la fusion du VHC était non seulement pH-dépendante mais qu'elle était également liée d'une part à la composition lipidique des membranes virale et cellulaire et d'autre part, à la glycoprotéine E2 (Haid *et al.*, 2009).

Pour étudier le rôle des facteurs viraux et cellulaires dans la fusion du VHC, des travaux ont utilisé des tests *in vitro* de fusion cellule "donneuse"/cellule "acceptrice", dans lesquels les cellules donneuses expriment à leur surface les glycoprotéines du VHC et les cellules acceptrices expriment les facteurs d'entrée du VHC. Ces tests de fusion sont pH-dépendants et montrent que la fusion du VHC est également dépendante des glycoprotéines E1 et E2 du VHC. En outre, ils ont permis de mettre en évidence l'implication de CD81 (Kobayashi *et al.*, 2006), de CLDN-1 (Evans *et al.*, 2007) et d'OCLN (Benedicto *et al.*, 2009) dans le processus de fusion.

Les virus peuvent utiliser le transfert de cellule à cellule pour infecter les cellules voisines (Marsh & Helenius, 2006), leur permettant ainsi d'échapper aux interactions potentielles avec les NAc circulant dans le milieu extracellulaire. Dans le cas du VHC, le transfert de cellule à cellule a été décrit impliquant au moins CD81 et CLDN-1 (Timpe *et al.*, 2008).

MODELES D'ETUDE DU VHC

Le premier modèle d'étude consistait à infecter des hépatocytes primaires avec du VHC natif dérivé du sérum de patients infectés. Cependant, le VHC natif ne se réplique que très faiblement en culture cellulaire et nécessite une technique de RT-PCR pour détecter l'infection virale. En outre, avec ce modèle, peu de moyens étaient disponibles pour étudier les différentes étapes du cycle viral. Ainsi, l'absence d'un système de culture cellulaire robuste a pendant longtemps été un frein pour l'étude et la compréhension du cycle viral du VHC.

Différents modèles *in vitro* ont été progressivement mis au point afin de permettre d'étudier efficacement les différentes étapes du cycle viral qui sont l'attachement, l'entrée, la réplication, l'assemblage et la libération des virions. Ces modèles incluent les glycoprotéines d'enveloppe recombinantes solubles (sE2), les "*virus-like*" particules du VHC (HCV-LP), les pseudoparticules rétrovirales du VHC (HCVpp), les réplicons subgénomiques et génomiques du VHC et, plus récemment, le modèle du clone infectieux du VHC en culture cellulaire (HCVcc). Ces différents systèmes d'étude *in vitro* seront décrits dans la première partie.

En parallèle, des modèles pour étudier le VHC *in vivo* ont été développés et ont progressivement évolué, allant du modèle chimpanzé jusqu'au modèle souris, plus accessible. Ces modèles seront également décrits dans la seconde partie.

I. Les modèles *in vitro*

En premier lieu, les caractéristiques fonctionnelles des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 ont été étudiées. Cependant, en raison de la présence de leur domaine transmembranaire respectif, ces glycoprotéines d'enveloppe avaient tendance à s'agréger entre elles en adoptant un repliement incorrect et également à être retenues dans la membrane du RE lorsqu'elles étaient exprimées *in vitro*. En effet, le domaine transmembranaire de ces protéines permet naturellement leur ancrage dans la membrane du RE, phénomène important pour que ces dernières puissent être présentes en fin de cycle à la surface de l'enveloppe virale des virions néoformés lors de leur sécrétion hors de la cellule hôte. En outre, ces domaines transmembranaires contiennent des séquences d'hétérodimérisation qui permettent la formation des complexes E1/E2 liés de manière non-covalente. Pour contourner ce problème, la solution était de tronquer le domaine transmembranaire. Cette approche a permis d'obtenir des protéines excrétées et correctement repliées (Michalak *et al.*, 1997).

L'utilisation de la **glycoprotéine d'enveloppe E2 recombinante soluble (sE2)** dont le domaine transmembranaire est délété, a permis d'identifier trois des principaux corécepteurs putatifs du VHC via leur interaction avec sE2. Les corécepteurs identifiés par ce système regroupent la tétraspanine CD81 (Pileri *et al.*, 1998), le SR-BI (Scarselli *et al.*, 2002) et les glycosaminoglycanes HS (Barth *et al.*, 2003).

Cependant, sE2 est uniquement exprimée sous forme de monomères. Or, les glycoprotéines d'enveloppe sont présentes à la surface des virions en tant qu'hétérodimères. Ainsi, la protéine recombinante sE2 a permis de mettre en évidence l'interaction E2/corécepteurs mais pas d'explorer en détail les mécanismes d'attachement et d'entrée médiés par les deux glycoprotéines d'enveloppe hétérodimérisées.

Les ***"virus-like"* particules du VHC (HCV-LP)** sont produites dans des cellules d'insectes en utilisant un vecteur baculoviral recombinant contenant les gènes exprimant les protéines structurales du VHC (protéine de capside Core et glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2). Dans les cellules d'insectes, les protéines structurales du VHC sont assemblées dans une particule enveloppée "*virus-like*" appelée HCV-LP. Cependant, les HCV-LP produites dans les cellules d'insectes ne sont pas sécrétées dans le milieu de culture cellulaire. Ainsi, la récupération des particules s'effectue par une étape de purification qui nécessite de lyser les cellules productrices. Les HCV-LP semblent encapsider de l'ARN du VHC issu de la transcription des gènes structuraux apportés par le vecteur. Cependant, comme l'ARN encapsidé est incomplet (uniquement les gènes codant les protéines structurales, aucune protéine non-structurale), les HCV-LP sont incapables de se répliquer. La caractérisation des HCV-LP a révélé que leurs propriétés biophysiques étaient similaires à celles des virions isolés dans le sérum de patients infectés (Baumert *et al.*, 1998).

De plus, il a été montré que les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 s'associent sous forme d'hétérodimères non-covalents au niveau des HCV-LP ce qui correspond à la conformation des glycoprotéines d'enveloppe des virions natifs (Baumert *et al.*, 1999; Wellnitz *et al.*, 2002). L'adoption d'une conformation native par E1 et E2 et le potentiel des HCV-LP à s'attacher et à entrer dans plusieurs types de cellules hépatiques humaines (incluant les hépatocytes primaires et plusieurs lignées d'hépatome) (Triyatni *et al.*, 2002) ainsi que dans les cellules dendritiques (Barth *et al.*, 2005), font des HCV-LP un modèle d'étude intéressant pour analyser la première étape du cycle viral du VHC qui est l'attachement et l'entrée du virus. De plus, il a été montré que les HCV-LP présentent des propriétés antigéniques semblables à celles du virus sauvage. Ainsi, elles ont été proposées i). comme un potentiel candidat vaccinal (Baumert *et al.*, 1999), et ii). comme un outil d'étude des mécanismes d'échappement du VHC aux NAc (Steinmann *et al.*, 2004).

Toutefois, l'absence de gène rapporteur dans ces particules entraîne l'utilisation de techniques contraignantes telles que la microscopie ou la cytométrie en flux, qui nécessitent toutes deux un immunomarquage préalable des HCV-LP.

Les **pseudoparticules du VHC (HCVpp)** sont des particules rétrovirales non-réplicatives renfermant un gène rapporteur et exprimant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC sous forme d'hétérodimères natifs fonctionnels. Pour produire des HCVpp, des cellules embryonnaires rénales humaines HEK 293T sont cotransfectées avec trois vecteurs d'expression différents. Le premier code les glycoprotéines E1 et E2 du VHC, le second exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* d'un rétrovirus (*Murine Leukemia Virus* (MLV) ou *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)), c'est-à-dire la matrice, la capside, la nucléocapside, la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase virales. Les protéines de la matrice, de la capside et de la nucléocapside vont permettre d'encapsider de l'ARN grâce à la reconnaissance d'un signal d'encapsidation ψ. En outre, elles vont permettre l'assemblage de la pseudoparticule et son bourgeonnement à la membrane plasmique des cellules HEK 293T. Le troisième vecteur code l'ARN qui va être encapsidé dans les pseudoparticules rétrovirales. Cet ARN contient un gène rapporteur (codant la GFP (*green fluorescent protein*) ou la luciférase) qui est encadré d'une part par un signal d'encapsidation ψ et d'autre part, par les séquences nécessaires à la transcription inverse et à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN génomique des cellules infectées, c'est-à-dire les séquences LTR (*long terminal repeat*), PBS (*primer binding site*) et PPT (*polypurine track*) (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). Une fois assemblées, les HCVpp sont sécrétées dans le surnageant de culture des cellules productrices (HEK 293T) et sont ensuite utilisées pour infecter des lignées d'hépatome humain ou des hépatocytes primaires. De cette façon, les cellules infectées vont intégrer de manière stable l'ADN proviral codant la GFP ou la luciférase grâce aux processus de transcription inverse et d'intégration médiés par les enzymes virales, et exprimer la GFP ou la luciférase. Le pouvoir infectieux des HCVpp sera alors évalué à partir de l'expression de la GPF ou de la luciférase, en déterminant le pourcentage de cellules GFP-positives par cytométrie en flux ou en quantifiant l'activité luciférase dans les cellules grâce à un luminomètre. Un schéma présentant le processus de production des HCVpp comportant le gène rapporteur de la luciférase est illustré en **figure 15**.

De part sa robustesse et sa flexibilité, le modèle d'étude HCVpp est considéré comme un outil de référence pour l'étude fonctionnelle des caractéristiques moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe en évaluant l'impact de ces caractéristiques sur l'étape d'attachement/d'entrée virale et/ou la sensibilité du VHC aux NAc.

En effet, les HCVpp sont capables d'infecter efficacement des lignées d'hépatome humain (comme les lignées Huh7) et les hépatocytes primaires humains (Bartosch *et al.*, 2003). En outre, les HCVpp ont été utilisées dans plusieurs études pour caractériser l'échappement ou la sensibilité du VHC à la neutralisation par des mAc ciblant E1 et E2 et par les Ac circulant dans le sérum de patients infectés (Bartosch *et al.*, 2003; von Hahn *et al.*, 2007; Pestka *et al.*, 2007). De plus, les HCVpp ont contribué à l'identification de deux autres récepteurs putatifs du VHC : CLDN-1 (Evans *et al.*, 2007) et OCLN (Ploss *et al.*, 2009).

Cependant, la principale limite de ce système est que les HCVpp sont des pseudovirus non-réplicatifs et que par conséquent, elles ne permettent pas l'étude du cycle viral complet. Cet outil est en effet restreint à l'étude de l'étape d'attachement/d'entrée du virus et des facteurs pouvant favoriser (exemple du HDL) ou interférer avec cet étape (exemple des NAc).

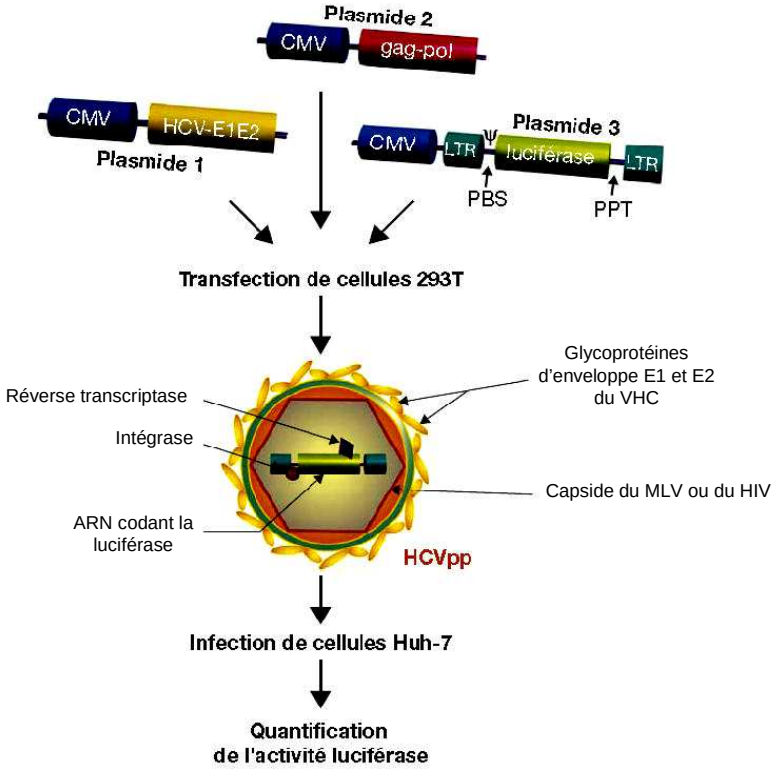


Figure 15. Production des HCVpp comportant le gène rapporteur de la luciférase (d'après Voisset & Dubuisson (Voisset & Dubuisson, 2004)).

Le développement des **réplicons subgénomiques du VHC** ont rendu possible l'étude de la réplication virale du VHC (Lohmann *et al.*, 1999). Ces réplicons subgénomiques sont des ARN réplicatifs autonomes bicistroniques contenant en 5' la région 5' non-codante du VHC (comprenant l'IRES) qui assure la traduction du gène de résistance à un antibiotique (néomycine) présent juste en aval, suivi de l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (VEMC) permettant la traduction des gènes non structuraux du VHC allant de NS2 ou NS3 jusqu'à NS5B. Enfin, l'extrémité 3' du

réplicon comporte la région 3' non-codante du VHC (Lohmann *et al.*, 1999). Une fois les lignées d'hépatome humain de type Huh7 transfectées, des clones cellulaires capables de supporter une réplication autonome des ARN subgénomiques sont isolés par sélection avec G418 (analogue de la néomycine).

Malgré des niveaux élevés de réplication des réplicons subgénomiques dans les cellules sélectionnées, le nombre de clones cellulaires résistants à G418 obtenu après sélection était très faible. L'explication de ce faible nombre de clones sélectionnés mais comportant un ARN hautement réplicatif a été fournie par l'analyse de ces ARN : des mutations adaptatives ont été mises en évidence au niveau de ces réplicons subgénomiques (Lohmann *et al.*, 2001). La plupart de ces mutations ont été identifiées dans les gènes NS3, NS4B et NS5A et étaient regroupées dans certaines régions de ces protéines (Bartenschlager, 2004).

Les réplicons subgénomiques du VHC sont des outils de choix pour étudier la réplication du VHC. Ces réplicons ont d'ailleurs été régulièrement utilisés pour tester l'efficacité de nouvelles molécules antivirales.

Les **réplicons génomiques du VHC** sont des réplicons conçus de la même façon que les subgénomiques excepté qu'ils comportent la totalité du génome du VHC (Core jusqu'à NS5B). Bien que ces ARN génomiques se répliquent efficacement dans les cellules Huh7 sous pression de sélection par G418, ils n'aboutissent pas à la production de particules virales infectieuses (Pietschmann *et al.*, 2002).

En 2001, un clone a été isolé chez un patient japonais qui présentait une hépatite fulminante suite à une infection par un VHC de génotype 2a (Kato *et al.*, 2001). Ce clone a été nommé JFH-1 (*japanese fulminant hepatitis-1*) et a été utilisé pour construire un réplicon subgénomique. Ensuite l'ARN subgénomique résultant a été testé en culture sur cellules Huh7, montrant une réplication efficace avec ou sans sélection par G418 (Kato *et al.*, 2003).

En 2005, trois équipes ont directement électroporé la lignée de cellules d'hépatome humain Huh7 et des dérivées de cette lignée (Huh7.5, Huh7.5.1) avec l'ARN génomique du clone JFH-1 (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Cette électroporation engendrait la production de particules virales infectieuses dans le surnageant puisqu'elles étaient capables d'infecter de nouvelles cellules d'hépatome humain naïves. Ainsi, le modèle du **clone du VHC infectieux en culture cellulaire (HCVcc)** était dès lors disponible.

Ce système a ensuite subi des améliorations par construction de chimères intra- et inter-génotypiques. Ces chimères ont été conçues en remplaçant les gènes Core à NS2 de JFH-1 par celles d'autres isolats du VHC de mêmes génotypes ou de génotypes différents (Pietschmann *et al.*, 2006). La mise au point de ces chimères a permis d'augmenter les niveaux de

production des HCVcc et d'étudier, par exemple, l'étape d'attachement/d'entrée du VHC dans ce modèle réplicatif avec des clones exprimant des glycoprotéines d'enveloppe de génotype non-2a. En outre, afin de faciliter la détection des cellules infectées et de quantifier les niveaux d'infection, des clones exprimant un gène rapporteur (luciférase) ont été développés (Koutsoudakis *et al.*, 2006).

Le récent développement de ce système permet désormais d'étudier le cycle viral complet du VHC.

Ce modèle a permis de confirmer et/ou de compléter des résultats qui avaient été préalablement obtenus en utilisant d'autres systèmes d'étude tels que : le rôle des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 dans l'entrée du virus mais aussi dans sa sécrétion (Wakita *et al.*, 2005), le tropisme préférentiel pour les cellules hépatiques (Zhong *et al.*, 2005), le rôle des différents récepteurs putatifs du VHC (Lindenbach *et al.*, 2005; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Zeisel *et al.*, 2007a; Evans *et al.*, 2007; Ploss *et al.*, 2009), et l'activité des NAc (Zeisel *et al.*, 2008). En outre, le modèle HCVcc a permis de progresser dans la compréhension de certaines étapes du cycle viral comme l'assemblage et la sécrétion des particules (Benga *et al.*, 2010), qui étaient mal connues avant le développement de ce système d'étude du VHC.

II. Les modèles animaux

L'étude du VHC *in vivo* a d'abord été pratiquée sur le chimpanzé commun (*Pan troglodytes*). Ce modèle d'étude *in vivo* est intéressant car il peut être infecté par du VHC natif en provenance du sérum de patients infectés. En outre, le grand intérêt de ce modèle d'étude du VHC *in vivo* est qu'il reproduit de manière quasi-identique l'infection et l'hépatite observées chez l'homme. En effet, l'infection aiguë chez le chimpanzé est caractérisée par une charge virale détectable quelques jours après la primo-infection pour atteindre un pic de virémie entre 10^5 et 10^7 copies/mL. En ce qui concerne les Ac anti-VHC, ils sont rarement détectés avant la semaine 8 suivant la primo-infection. De plus, l'infection aiguë par le VHC chez les chimpanzés entraîne le développement d'une hépatite, caractérisée par une élévation des enzymes hépatiques dans le sérum et l'apparition de lésions nécro-inflammatoires dans les biopsies hépatiques. Pour finir, certaines des infections aiguës chez les chimpanzés sont résolutives mais la plupart évolue vers une infection chronique. L'infection chronique chez les chimpanzés se caractérise notamment par une virémie persistante et une séropositivité au VHC (Bukh, 2004).

Toutefois, l'utilisation de ce modèle d'étude est limitée par plusieurs facteurs : a). les différences observées dans la maladie liée au VHC qui s'avère être moins sévère chez le chimpanzé que chez l'homme, b). le problème d'éthique puisque l'homme (*Homo sapiens*) et le chimpanzé

commun (*Pan troglodytes*) ne présentent qu'environ 2% de divergence génétique, c). la disponibilité et le prix élevé des animaux, d). la nécessité de les entretenir dans des infrastructures spécialisées, et e). la classification en 1988 du chimpanzé commun dans les espèces dites "vulnérables" puis depuis 1996 dans les espèces dites "en danger", autrement dit ce chimpanzé est confronté à un risque de plus en plus croissant d'extinction à l'état sauvage.

Pour ces raisons, le développement de nouveaux modèles animaux d'étude du VHC *in vivo* était nécessaire et de nombreux efforts ont été fournis dans ce domaine.

Bien que l'infection par le VHC ne puisse être propagée dans les tissus de souris même hautement immunodéficientes, la technologie transgénique et la possibilité de transplanter des souris avec des hépatocytes humains ont fait de cet animal un modèle intéressant pour l'étude du VHC *in vivo* (Barth *et al.*, 2008).

Un phénotype "hépatocyte-létal" a été découvert chez des souris transgéniques portant le transgène "*urokinase-type plasminogen activator*" sous le contrôle d'un promoteur de l'albumine (Alb-uPA). La reconstitution complète du foie de ces souris par une xénogreffe d'hépatocytes de rat s'est avérée possible. Ces données ont conduit au développement d'un petit modèle animal de type murin (Alb-uPA) xénogreffé avec des hépatocytes humains, supportant une infection par le VHB et le VHC. C'est en 2001 que Mercer *et al.* ont pour la première fois développé un modèle de souris chimère capable de développer efficacement une infection par le VHC. Ce modèle chimèrique murin a été obtenu en transplantant des hépatocytes humains dans des souris immunodéficientes SCID (*severe combined immune deficiency*) qui portaient le transgène Alb-uPA (souris SCID/Alb-uPA). Après inoculation du VHC en provenance de sérum de patients infectés, ces souris ont développé des infections virales prolongées accompagnées de fortes charges virales (Mercer *et al.*, 2001). Dans ce système, la mesure du taux d'albumine humaine qui est exclusivement produite par les hépatocytes humains, permet de s'assurer de la survie des hépatocytes et donc du maintien de la xénogreffe. Ces souris SCID/Alb-uPA transplantées avec des hépatocytes humains peuvent aussi bien être infectées par du VHC natif en provenance du sérum de patients infectés que par des HCVcc (Mercer *et al.*, 2001; Lindenbach *et al.*, 2006). En outre, le plasma issu de ces souris infectées peut être utilisé pour infecter de nouvelles souris naïves. Les souris SCID/Alb-uPA permettent également d'étudier aussi bien le rôle des Ac anti-récepteurs que celui des NAc dirigés contre l'enveloppe du VHC (Meuleman *et al.*, 2008; Law *et al.*, 2008). Ce modèle murin peut également être utilisé pour évaluer l'efficacité et l'innocuité *in vivo* de nouvelles molécules antivirales dirigées contre le VHC (Vanwolleghem *et al.*, 2007).

Pour finir, ce modèle murin présente plusieurs avantages par rapport au modèle primate qui sont : a). un prix nettement moins élevé, b). une manipulation plus facile, et c). une reproduction

plus rapide. Cependant, ce modèle nécessite un grand savoir-faire de la part de l'opérateur d'une part pour isoler les hépatocytes et d'autre part pour les transplanter, puisque cette étape requiert une intervention chirurgicale très minutieuse. En outre, une expertise spéciale est requise pour maintenir ces souris qui sont très fragiles en raison de leur immunodépression sévère. Mercer *et al.* ont estimé à 32,6% le taux de mortalité périnatale chez ces souris SCID/Alb-uPA (Mercer *et al.*, 2001).

VHC ET REPONSE AU TRAITEMENT ANTIVIRAL A BASE D'INTERFERON-α

I. Facteurs influençant la réponse au traitement par IFN-α pégylé et ribavirine

Des facteurs d'hôte et des facteurs viraux ont été corrélés à la réponse virologique (négativation de l'ARN du VHC sanguin) au traitement antiviral, mais l'échec thérapeutique n'est pas un phénomène bien compris.

1). Facteurs d'hôte

Les facteurs liés à l'hôte prédictifs de mauvaise réponse virologique incluent : stéatose, fibrose sévère, syndrome métabolique, résistance à l'insuline et diabète, origine africaine, obésité, sexe masculin, âge élevé. Des facteurs de susceptibilité génétique pourraient aussi être impliqués (Asselah *et al.*, 2009). En effet, le polymorphisme génétique en amont du gène humain IL28B a été récemment corrélé à la réponse au traitement (Ge *et al.*, 2009).
De plus, des facteurs de comorbidité tels que la co-infection VHC-VHB et/ou VIH, l'excès de consommation d'alcool et l'utilisation de drogues sont généralement associés à de faibles taux de réponses virologiques soutenues au traitement antiviral (Asselah *et al.*, 2010).

2). Facteurs virologiques

Les principaux facteurs virologiques liés à une mauvaise réponse virologique sont les suivants : VHC de génotype 1, virémie élevée avant traitement.
En effet, il a été démontré que virémie et génotype viral influencent la réponse au traitement. Une virémie du VHC peu élevée avant traitement (inférieure à un seuil proche de 5×10^5 à 8×10^5 UI/mL) est significativement corrélée à une réponse virologique soutenue (Mihm *et al.*, 2006; Backus *et al.*, 2007). De plus, il est admis que les divers génotypes du VHC sont corrélés à un pronostic variable dans l'évolution de la maladie sous traitement antiviral : une meilleure réponse au traitement par l'interféron-α a été observée chez des patients infectés par un VHC de génotype 2 ou 3 par rapport à des patients infectés par un VHC de génotype 1 (McHutchison *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2000).

Après le début du traitement, une réponse virologique rapide (RVR : ARN du VHC indétectable par un test PCR sensible (seuil de quantification entre 12 et 15 UI/mL) après 4 semaines de traitement) est un facteur prédictif de réponse virologique soutenue (RVS : ARN du VHC indétectable 6 mois après l'arrêt du traitement) (Martinot-Peignoux *et al.*, 2009).

En outre, le sous-type viral pourrait aussi jouer un rôle. En effet, dans une étude incluant 597 patients, Legrand-Abravanel *et al.* ont évalué l'influence du sous-type du VHC sur la réponse au traitement par PEG IFN-α/ribavirine. Ils ont conclu qu'au sein du génotype 1 (faisant partie avec le génotype 4 des génotypes les plus résistants à la bithérapie pégylée), le sous-type 1a était associé à une moins bonne réponse au traitement que le sous-type 1b (Legrand-Abravanel *et al.*, 2009).

Si le rôle des facteurs virologiques évoqués ci-dessus est admis, celui de certaines portions du génome viral, comme celles des glycoprotéines d'enveloppe, est controversé et peu étudié. Les analyses des séquences complètes des gènes E1 et E2 dans des cohortes de patients sont rares (Brown *et al.*, 2007), et le lien avec l'efficacité du traitement antiviral rarement abordé.

II. Glycoprotéines d'enveloppe virale E1 et E2 dans la réponse au traitement

Dans cette section seront examinés les arguments plaidant en faveur d'un rôle potentiel des glycoprotéines E1 et E2 dans l'efficacité du traitement antiviral par interféron-α et ribavirine.

1). Interaction des glycoprotéines avec des facteurs cellulaires et réponse à l'IFN-α

Un segment de E2 impliqué dans la liaison à des facteurs modulant l'action de l'interféron-α pourrait entrer en jeu dans la sensibilité du VHC au traitement: le PePHD ou *PKR-eIF2α phosphorylation homology domain* (Taylor *et al.*, 1999). En effet, une interaction entre la région PePHD de E2 et la PKR pourrait expliquer, au moins en partie, la différence de réponse au traitement entre génotypes viraux : les régions PePHD des génotypes les plus résistants (1a/1b) partagent plus d'homologies avec le site de phosphorylation de la PKR que les génotypes 2 et 3, ce qui favoriserait l'interaction des souches de VHC de génotype 1 avec la PKR et l'inefficacité thérapeutique (Wohnsland *et al.*, 2007).

2). Interaction des glycoprotéines avec les facteurs d'entrée et réponse au traitement

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC sont essentielles à la reconnaissance de différents corécepteurs du VHC sur les cellules permissives. Elles sont impliquées dans l'interaction

du virus avec le CD81, le SR-BI, l'Heparan Sulfate ou HS, les protéines des jonctions serrées Claudines-1, -6, -9 et l'Occudine.

Peu de données sont disponibles sur le lien entre les caractéristiques des segments d'enveloppe impliqués dans la reconnaissance des récepteurs et la réponse au traitement. Hofmann *et al.* (Hofmann *et al.*, 2003, 2005) n'ont pas observé de corrélation entre nombre de mutations sur les sites de E2 liant le CD81 et la réponse virologique au traitement par interféron-α chez des patients infectés par des VHC de génotype 1b et 3a. Cuevas *et al.* n'ont pas retenu de lien entre séquences d'enveloppe et réponse au traitement (Cuevas *et al.*, 2009). Il n'y a pas, à notre connaissance, de données sur l'efficacité du traitement en regard des interactions de E2 avec Claudine-1 ou l'Occludine.

Toutefois, allant dans le sens de notre hypothèse, un article a mis en évidence que des réseaux de covariance d'acides aminés étudiés sur le génome entier du VHC pourraient prédire la réponse au traitement antiviral chez les patients infectés par un VHC de génotype 1a ou 1b (Aurora *et al.*, 2009). Sur les 10 acides aminés (correspondant aux nœuds des réseaux) liés à un échec thérapeutique, 8 correspondaient à des résidus situés sur les glycoprotéines d'enveloppe virale. Ces données suggèrent que certains acides aminés de E1/E2 pourraient, en réseau avec d'autres acides aminés, jouer un rôle déterminant dans la stabilisation des complexes protéiques viraux et influencer ainsi la réponse au traitement antiviral. Des études cliniques complémentaires seront utiles pour vérifier ces tendances et pour caractériser les mécanismes impliqués dans la résistance au traitement.

Par ailleurs, une région hypervariable (HVR1) de E2 est non seulement impliquée dans la reconnaissance de récepteurs cellulaires du VHC (SR-BI, HS) et dans l'interaction du complexe VHC/lipoprotéines lors de l'entrée du virus dans la cellule (Bartosch *et al.*, 2005), mais constitue également une cible de la réponse immunitaire. Malgré des controverses liées à la variabilité des techniques d'étude, des travaux tendent à montrer qu'une plus faible hétérogénéité des variants viraux (ou quasi-espèces) étudiés dans HVR1 avant traitement est corrélée à une meilleure réponse au traitement antiviral par interféron-α (Chambers *et al.*, 2005; Wohnsland *et al.*, 2007).

3). Implication des glycoprotéines dans la réponse immunitaire et réponse au traitement

Les glycoprotéines E1 et E2 sont la cible des réponses immunitaires humorale et cellulaire. Des mutations de E1 ou de E2 dans des épitopes de neutralisation et des épitopes ciblés par les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ peuvent entraîner une perte de reconnaissance par des anticorps neutralisants ou un échappement aux lymphocytes T, respectivement (von Hahn *et al.*, 2007). Pour ce qui concerne l'immunité humorale, l'inefficacité de la réponse en anticorps est en particulier due

à l'apparition rapide de mutations du virus dans la région HVR1, mais aussi sur d'autres épitopes de E2 et de E1 (Zeisel *et al.*, 2007b). Ce taux élevé de mutations, classiquement rencontré pour les virus à génome constitué d'ARN, est dû à l'ARN polymérase ARN-dépendante virale dépourvue d'activité correctrice et à la pression immunitaire de l'hôte. Un patient est ainsi infecté par différentes sous-populations virales (quasi-espèces) qui peuvent muter rapidement lors de la progression de la maladie à VHC, en dehors de toute pression thérapeutique ou sous traitement. L'échappement à la réponse immunitaire pourrait aussi limiter l'efficacité du traitement antiviral chez les patients non-répondeurs.

Une étude utilisant des HCV-LP contenant les protéines d'enveloppe virale a montré que les patients présentant une réponse soutenue à l'interféron-α avaient des taux pré-thérapeutiques plus élevés d'anticorps anti-HCV-LP que les non-répondeurs (Baumert *et al.*, 2000). Mais la limite de cette étude était liée à l'utilisation d'une technique ELISA pour l'évaluation des anticorps, qui n'est pas un bon reflet de la réponse en anticorps neutralisants. Un travail plus récent mais utilisant aussi un test ELISA pour évaluer les anticorps E1 et E2 a montré un lien inversement proportionnel entre niveaux d'anticorps et charge virale ou degré de fibrose hépatique ; les taux pré-thérapeutiques d'anticorps anti-E1/E2 étaient plus élevés chez les patients bons répondeurs au traitement (Hamed *et al.*, 2008).

Par ailleurs, une étude a porté sur le lien entre région hypervariable HVR1 de E2 et réponse au traitement par interféron-α avec ou sans ribavirine : les variants HVR1 du groupe des patients non-répondeurs contenaient de façon constante un segment d'acides aminés non-antigénique qui n'était pas présent chez les variants HVR1 du groupe des répondeurs (Gaudy *et al.*, 2003). Cette étude portait sur 15 patients seulement et ne comportait pas d'analyse fonctionnelle.

Une autre publication n'a pas trouvé de lien entre neutralisation médiée par les anticorps et réponse au traitement par interféron-α, mais elle utilisait des constructions moléculaires hétérologues dans les tests de neutralisation (Boo *et al.*, 2007).

4). Rôle des glycoprotéines dans le leucotropisme du VHC et réponse au traitement

Les glycoprotéines d'enveloppe du VHC contribuent au tropisme cellulaire du virus, à sa capacité à se fixer et/ou à infecter non seulement les hépatocytes mais également des cellules non-hépatocytaires (Pöhlmann *et al.*, 2003). Les cellules mononucléées sanguines, les monocytes, les lymphocytes, les cellules dendritiques, les cellules hématopoïétiques sont faiblement permissives à l'infection par le VHC (Laskus *et al.*, 1998; Kanto *et al.*, 1999; Caussin-Schwemling *et al.*, 2001; Auffermann-Gretzinger *et al.*, 2001; Anthony *et al.*, 2004).

De plus, il a été montré que l'association du VHC aux lymphocytes B augmente le pouvoir infectieux du virus pour les cellules de type hépatocytaire par rapport au virus seul (Stamataki *et al.*, 2009). Ces sites extra-hépatiques de l'infection par le VHC pourraient favoriser la persistance du virus et modifier l'efficacité du traitement antiviral, en altérant la réponse immunitaire.

Plusieurs études ont observé un phénomène de compartimentation entre variants viraux leucocytaires et variants viraux plasmatiques en analysant les quasi-espèces virales (Maggi *et al.*, 1999; Roque Afonso *et al.*, 1999; Ducoulombier *et al.*, 2004; Schramm *et al.*, 2008). Une étude chez des patients co-infectés VHC-VIH a identifié des acides aminés spécifiques des PBMCs mettant en évidence des signatures moléculaires spécifiques de ce leucotropisme, en particulier dans la région HVR1 de E2 (Blackard *et al.*, 2007).

Un groupe s'est intéressé aux potentielles implications cliniques et thérapeutiques de la compartimentation du VHC (quasi-espèces virales analysées dans la région 5'NC) : il a été observé qu'une réponse virologique soutenue au traitement antiviral (interféron-α pégylé/ribavirine) était plus fréquente en cas de compartimentation des quasi-espèces virales entre plasma et cellules mononucléées sanguines (Di Liberto *et al.*, 2006).

5). Implication des autres protéines du VHC dans la réponse au traitement

En dehors des glycoprotéines d'enveloppe virale, d'autres régions du VHC correspondant à des protéines de structure ou à des protéines non-structurales ont également été analysées pour des liens possibles avec la réponse au traitement (Wohnsland *et al.*, 2007). Pour l'interféron-α, aucune corrélation significative n'a été retenue entre mutations de la région de la capside et de la protéine NS3 et la réponse au traitement (Enomoto *et al.*, 1995; Sarrazin *et al.*, 2005), tandis qu'un lien a été montré entre des mutations dans la région NS5A et la réponse (Enomoto *et al.*, 1995). Les effets de la protéase NS3/4A observés sur la réponse immunitaire innée analysée *in vitro* (action sur l'IRF3 – *interferon regulatory factor 3* ou sur RIG-I – *retinoic acid-inductible gene-I*) doivent être plus amplement étudiés en clinique (Foy *et al.*, 2003, 2005).

En outre, comme évoqué plus haut, des réseaux de covariance d'acides aminés sur plusieurs protéines virales, dont les glycoprotéines d'enveloppe, pourraient prédire l'efficacité du traitement antiviral chez les patients infectés par un VHC de génotype 1 (Aurora *et al.*, 2009). Enfin, les données portant sur le lien observé *in vitro* entre mutations sur les segments NS5A/B et la résistance à la ribavirine doivent être complétées par des études *in vivo* (Young *et al.*, 2003; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005).

En résumé, le pronostic de la réponse au traitement anti-VHC est multifactoriel et nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail aux facteurs liés aux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC.

OBJECTIFS DU PROJET

L'infection par le VHC évolue dans la majorité des cas vers une hépatite chronique dont les complications potentielles sont la cirrhose hépatique et le carcinome hépatocellulaire. Environ 160 millions d'individus sont chroniquement infectés par le VHC à travers le monde. Malheureusement, le traitement de référence actuel de l'hépatite chronique C par la combinaison interféron-α pégylé et ribavirine n'est efficace que dans environ 50% des cas d'infection par le VHC de génotype 1, génotype le plus fréquent en Europe et en Amérique du Nord. Même si des molécules antivirales spécifiques (exemple des anti-protéases NS3/4A) sont prometteuses, elles doivent à l'heure actuelle être associées à la bithérapie pégylée de référence.

Notre objectif a été d'étudier les caractéristiques des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 de souches du VHC de génotype 1 en fonction de la réponse ultérieure au traitement antiviral de référence. Notre étude multicentrique a porté sur des échantillons sanguins provenant du CHU de Strasbourg (M. Doffoël, F. Habersetzer) et d'autres CHU situés en région Île-de-France (Paris (V. Thibault), Villejuif (A-M. Roque-Afonso), Bobigny (Y. Baazia)) et en province (Tours (C. Gaudy), Clermont-Ferrand (C. Henquell), Toulouse (F. Abravanel), Bordeaux (P. Trimoulet), Brest (S. Vallet)). Cette collaboration nous a permis d'inclure dans notre étude 92 patients chroniquement infectés par un VHC de génotype 1 (sous-types 1a et 1b) et traités par interféron-α pégylé/ribavirine.

Nous avons entrepris ce projet avec l'objectif de mieux connaître les facteurs virologiques associés à l'échec du traitement antiviral de référence. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux caractéristiques moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe virale E1 et E2 en faisant l'hypothèse suivante : certains virus, plus infectieux à l'étape d'entrée dans les cellules cibles et/ou échappant à l'immunité de l'hôte, pourraient résister par ce biais au traitement anti-VHC.

Dans un premier temps, nous avons réalisé le séquençage nucléotidique des gènes entiers E1 et E2 sur les souches virales sériques pré-thérapeutiques pour tous les patients de la cohorte. Les séquences ont été classées en fonction du sous-type viral (1a ou 1b) et en fonction de la réponse virologique au traitement. Des techniques de bio-informatique ont été utilisées pour rechercher des signatures moléculaires liées à la réponse virologique au traitement, et des acides aminés covariants corrélés à l'efficacité du traitement.

Dans un second temps, nous avons réalisé des études fonctionnelles *in vitro* sur des souches VHC de référence dans lesquelles des signatures moléculaires en relation avec la réponse à la bithérapie pégylée, déterminées lors des analyses bio-informatiques préalables, ont été introduites.

En effet, l'absence de réponse au traitement pourrait être partiellement liée à l'interaction entre E1 et E2 et les corécepteurs cellulaires du VHC ainsi qu'à l'échappement aux anticorps neutralisants ciblant les glycoprotéines d'enveloppe : certains acides aminés pourraient intervenir dans la modulation de l'entrée virale et/ou l'échappement à la réponse immunitaire humorale. Pour évaluer ces hypothèses, le pouvoir infectieux et l'efficacité de neutralisation de pseudoparticules rétrovirales (HCVpp) exprimant les protéines E1/E2 de souches de référence du VHC (sous-type 1a ou 1b), ont été comparés à ceux de mutants dans lesquels des signatures moléculaires liées à la réponse au traitement ont été individuellement introduites. Enfin, certains patients (deux répondeurs (R ou RVS) et un non-répondeur (NR) porteurs d'une souche VHC de génotype 1a) ont été étudiés d'une façon plus approfondie pour leurs quasi-espèces virales sur les gènes E1/E2.

SYNTHESE DES TRAVAUX EXPOSES DANS L'ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION

Rappel de la question posée :

Les mécanismes liés au virus ou à l'hôte impliqués dans la réponse au traitement ne sont pas parfaitement connus. Certains facteurs liés à l'hôte sont admis comme le sexe, l'âge, les facteurs de comorbidités, les facteurs génétiques (Ge *et al.*, 2009). Parmi les facteurs virologiques, une virémie basse et la présence d'un virus de génotype 2 ou 3 sont des facteurs de bonne réponse au traitement. D'autres facteurs virologiques pourraient avoir un impact sur l'efficacité du traitement. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC sont essentielles à la reconnaissance des récepteurs du virus sur les cellules permissives et sont des cibles de la réponse immunitaire (Barth *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2007; Zeisel *et al.*, 2007a). Ainsi, notre hypothèse était que la grande variabilité des glycoprotéines virales E1 et E2 pourrait contribuer à la résistance au traitement par la sélection sous pression thérapeutique de souches présentant un pouvoir infectieux élevé et/ou échappant à la réponse immunitaire ciblant E1 et E2 (Gaudy *et al.*, 2003; von Hahn *et al.*, 2007; Hamed *et al.*, 2008).

Résultats obtenus (l'ensemble des travaux figure dans l'article qui sera soumis début 2012 à "Hepatology", ci-après) :

Une cohorte composée de 92 patients traités par interféron-α pégylé et ribavirine pour une hépatite chronique C et infectés par un VHC de génotype 1 (43 1a et 49 1b) a été constituée. Le groupe de patients VHC-1a se composait de 26 patients non-répondeurs (NR) au traitement et 17 patients répondeurs (R ou RVS, c'est-à-dire présentant une réponse virologique soutenue avec une charge virale indétectable (par un test PCR sensible) 6 mois après l'arrêt du traitement). Le groupe des patients VHC-1b comptait 24 NR et 25 RVS. A partir du sérum pré-thérapeutique de chacun de ces patients, le génome viral a été analysé sur un fragment couvrant la totalité des gènes E1 et E2 par séquençage. A partir de cette banque de séquences E1/E2, des analyses bio-informatiques ont permis de déterminer des signatures moléculaires ou SMs liées à la réponse ultérieure au traitement en fonction du sous-type viral.

Parmi les SMs que nous avons sélectionnées pour des tests fonctionnels, trois pour le VHC-1a et une pour le VHC-1b ont été individuellement explorées : 431A (SM NR dans E2), 642V (SM NR dans E2) et 219T (SM R dans E1) pour le VHC de génotype 1a ; 391V (SM NR dans E2) pour le VHC de génotype 1b.

En effet, nous avons évalué l'impact de ces SMs sur le pouvoir infectieux et/ou l'efficacité de neutralisation de souches de référence par des tests fonctionnels *in vitro* (HCVpp). Les HCVpp ayant servi à l'évaluation fonctionnelle des quatre SMs sélectionnées ont été construites sur le modèle du lentivirus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). La SM 431A a également été évaluée en utilisant des HCVpp construites sur le modèle du rétrovirus MLV (*Murine Leukemia Virus*). De façon intéressante, l'étude des SMs VHC-1a a montré des résultats en accord avec notre hypothèse initiale pour trois des quatre positions : comparées aux HCVpp non-mutées (dites sauvages ou wt), les HCVpp mutées portant la signature de non-réponse 431A (NR, E2) étaient moins bien neutralisées par des sérums hétérologues pré-thérapeutiques (e.g., titre de neutralisation moyen à 1/73 pour les HCVpp mutées *versus* 1/833 pour les HCVpp wt, en ce qui concerne les HCVpp construites sur le modèle du lentivirus HIV (**figure 16**)), montraient une augmentation dans leur pouvoir infectieux (augmentation moyenne de 25,6% ± 16,6% par rapport aux HCVpp wt, en ce qui concerne les HCVpp construites sur le modèle du lentivirus HIV (**figure 17A**)) et une dépendance augmentée aux corécepteurs cellulaires CD81 et SR-BI lors de l'entrée du VHC dans les cellules (**figure 17B**). Les HCVpp mutées portant la signature de non-réponse 642V (NR, E2) montraient une augmentation dans leur potentiel infectieux (augmentation moyenne de 54,2% ± 15,9% par rapport aux HCVpp wt (**figure 17A**)) et également une diminution de leur neutralisation par rapport aux HCVpp wt, bien que plus faiblement (titre de neutralisation moyen à 1/46 pour les HCVpp mutées *versus* 1/200 pour les HCVpp wt (**figure 16**)). Les HCVpp arborant la SM de réponse 219T (E1, R) montraient des niveaux d'infection plus faibles, comparées aux HCVpp non-mutées (diminution moyenne de 42,1% ± 8,5% par rapport aux HCVpp wt (**figure 17A**)). La SM 391V observée sur les souches VHC-1b n'a pas montré d'effet en tests fonctionnels (**figures 16 et 17A**).

Des réseaux minimaux d'acides aminés covariants sur E1/E2 corrélés à la réponse virologique au traitement ont été déterminés et permettent de séparer les patients R des NR, en fonction du sous-type viral (1a et 1b). Il est intéressant de noter que trois des quatre positions correspondant aux SMs évaluées en tests fonctionnels (219 et 431 pour les VHC-1a, et 391 pour le VHC-1b), apparaissent dans ces réseaux minimaux d'acides aminés.

Enfin, les quasi-espèces virales ont été étudiées chez trois patients infectés par un VHC-1a : deux patients R et un patient NR. Elles ont été analysées à la date pré-thérapeutique pour les deux patients R et à la date pré-thérapeutique et sous-pression thérapeutique (semaine 12) pour le patient NR. Pour le patient NR, les séquences des variants de quasi-espèces avant et sous traitement

montraient un maintien d'un A en position 431 et d'un V en position 642. Pour les patients R, les acides aminés étaient globalement assez homogènes au sein des quasi-espèces virales pré-thérapeutiques : 219T, 431E, 642A chez tous les variants pour le premier patient ; et 431D, 642A chez tous les variants du second patient.

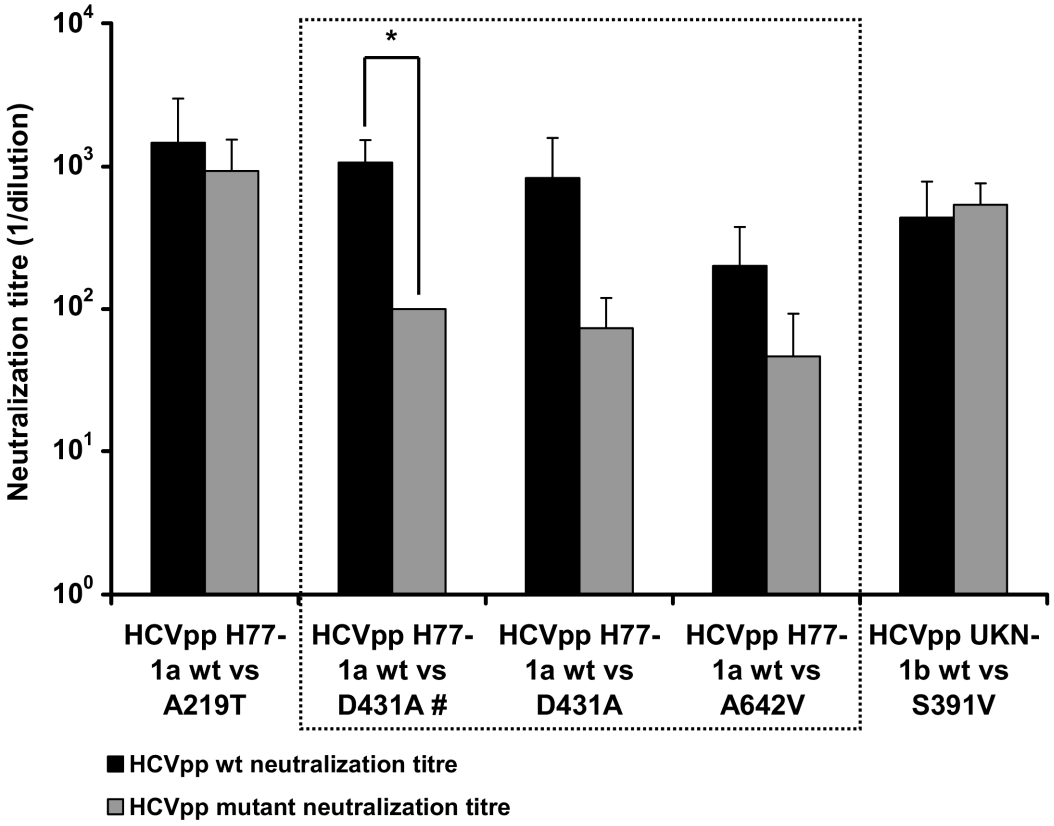


Figure 16. Tests de neutralisation des HCVpp mutées *versus* non-mutées par des sérums hétérologues pré-thérapeutiques issus de patients infectés par un VHC de génotype 1a ou 1b.

Les titres de neutralisation des HCVpp portant les signatures moléculaires 219T (R, 1a, E1), 431A (NR, 1a, E2), 642V (NR, 1a, E2) et 391V (NR, 1b, E2) sont montrés en comparaison de ceux de leurs wt respectifs (HCVpp non-mutées). **#** signifie que les HCVpp utilisées ont été construites sur le modèle du rétrovirus MLV, alors que l'absence de ce symbole indique que les HCVpp ont été construites sur le modèle du lentivirus HIV. Les moyennes des titres de neutralisation accompagnées de leurs écarts-type supérieurs issues de trois expériences indépendantes effectuées sur trois puits pour chaque cas sont montrées. ***** = différence significative.

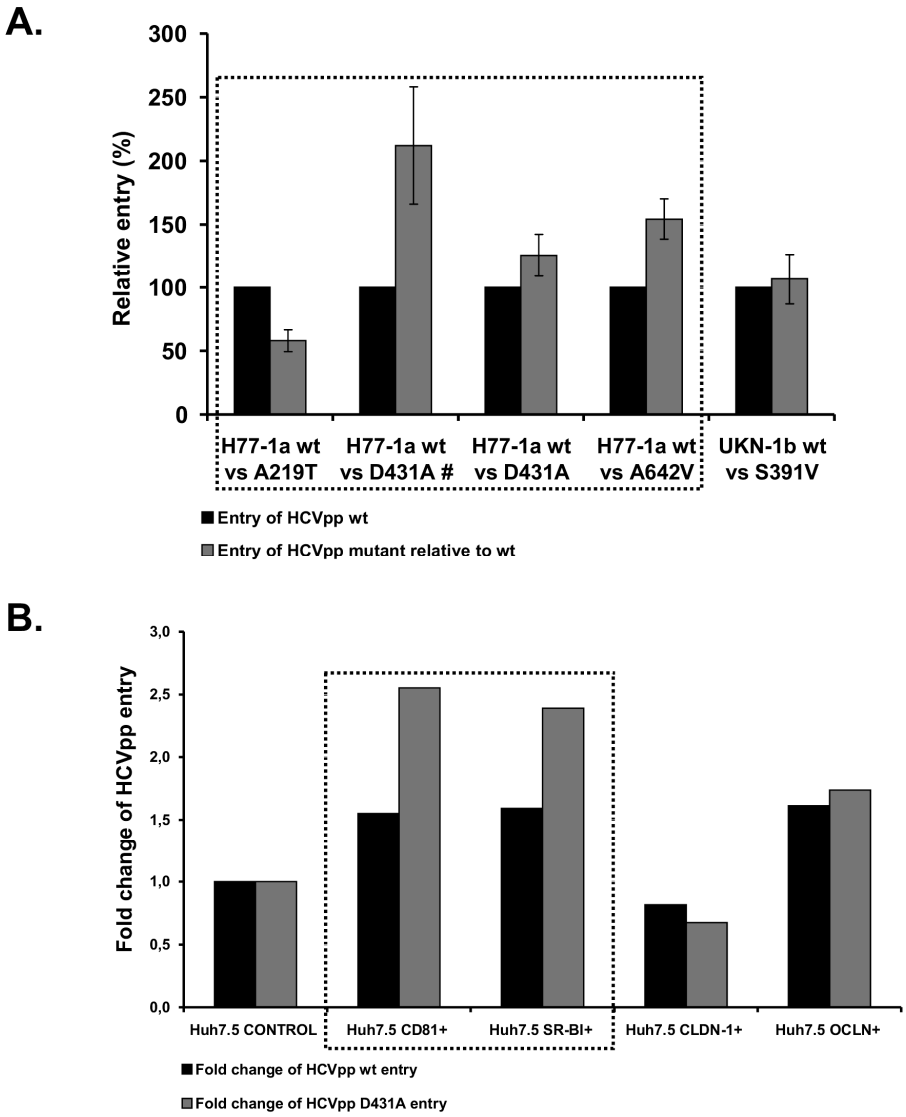


Figure 17. Tests d'infection des HCVpp mutées *versus* non-mutées sur cellules Huh7.5 standards et sur cellules Huh7.5 surexprimant individuellement les différents corécepteurs cellulaires du VHC : CD81, SR-BI, CLDN-1 ou OCLN.

(**A**). Les niveaux d'infection, sur cellules Huh7.5 standards, des HCVpp portant les signatures moléculaires 219T (R, 1a, E1), 431A (NR, 1a, E2), 642V (NR, 1a, E2) et 391V (NR, 1b, E2) sont montrés en comparaison de ceux de leurs wt respectifs (HCVpp non-mutées). **#** signifie que les HCVpp utilisées ont été construites sur le modèle du rétrovirus MLV, alors que l'absence de ce symbole indique que les HCVpp ont été construites sur le modèle du lentivirus HIV. Les niveaux d'infection des HCVpp wt sont normalisés à 100% et les niveaux d'infection des HCVpp mutées sont exprimés en pourcentage relatif au wt. Les moyennes des pouvoirs infectieux relatifs ± écarts-type dérivées d'au moins trois expériences indépendantes effectuées sur trois puits pour chaque cas sont montrées.

(**B**). Les résultats de l'infection différentielle, sur cellules Huh7.5 surexprimant individuellement les différents corécepteurs (CD81, SR-BI, CLDN-1 ou OCLN), entre les HCVpp portant la signature moléculaire 431A et les HCVpp non-mutées (wt) sont montrés. L'augmentation ou la diminution du pouvoir infectieux est exprimée en multiples de l'infection de base, laquelle est définie sur les cellules Huh7.5 CONTROL (le niveau d'infection de base équivaut ici à 1,0). Les médianes des pouvoirs infectieux dérivées de trois expériences indépendantes effectuées sur trois puits pour chaque cas sont représentées.

ARTICLE :

“Hepatitis C virus envelope glycoprotein signatures and resistance to antiviral treatment” ***(en cours de soumission)***

Manuscrit pour soumission à *Hepatology*

Hepatitis C virus envelope glycoprotein signatures and resistance to antiviral treatment

Rémy Moenne-Loccoz[1,2], Aurélie Velay[1,2], John M. Murray[3,4], Marine Turek[1,2], Mirjam B. Zeisel[1,2], Isabel Fofana[1,2], Samira Fafi-Kremer[1,2,5], Anne-Claire Erba[1,2], François Habersetzer[1,2,6], Michel Doffoël[1,2,6], Jean-Pierre Gut[1,2,5], Françoise Stoll-Keller[1,2,5], Thomas F. Baumert[1,2,6], Evelyne Schvoerer[1,2,5]

[1] Inserm, U748, F-67000 Strasbourg, France; [2] Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France; [3] School of Mathematics and Statistics, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia; [4] The Kirby Institute, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia; [5] Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67091 Strasbourg, France; [6] Pôle Hépato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

Key words

HCV, E1/E2 envelope glycoproteins, treatment failure, viral escape

Footnote page

Corresponding author

Abbreviations

HCV: Hepatitis C virus; R: Long-term responder patients to standard of care treatment; NR: Long-term nonresponder patients to standard of care treatment; PEG-IFN-α: Pegylated interferon-α; IFN: Interferon; HVR: Hypervariable region; AA: Amino acid; SVR: Sustained virological response; NR0: Null virological response; RVR: Rapid virological response; wt: wild-type.

Financial support

We are indebted to Fondation Transplantation (France), Region Alsace (France), Roche Pharma (French departments) for financial support of Rémy Moenne-Loccoz; Aurélie Velay received a fellowship from Region Lorraine (France).

Our research was also supported by Abbott Molecular (France), the *Association pour le Développement de la Recherche Biomédicale et de ses Applications* (ADERBA, Hindisheim, France) and Inserm (France).

Abstract

A major challenge for antiviral treatment of hepatitis C virus (HCV) infection is viral resistance, which is still incompletely understood. The high variability of HCV envelope glycoproteins may indirectly contribute to resistance by selection of strains with enhanced infectivity and/or escape from host immunity. Using a cohort of 92 patients infected with genotype 1 under pegylated interferon-alfa/ribavirin therapy (42 responders (R); 50 nonresponders (NR)) and a bioinformatical approach combined to functional analyses (HCV pseudoparticles - HCVpp) we assessed whether envelope glycoprotein sequences, molecular signatures and covariant amino acid networks were correlated with subsequent treatment response. Three out of the four E1/E2 molecular signatures selected for functional analyses were associated with HCVpp entry and neutralization as well as treatment response. The NR-related residues 431A and 642V led to a decrease in antibody-mediated HCVpp neutralization by pretreatment sera from heterologous patients as well as an increase in HCVpp entry into Huh7.5 cells. Noteworthy, HCVpp bearing the NR-related 431A displayed an increased CD81 and SR-BI usage for viral entry. In contrast, the R-related residue 219T decreased HCVpp entry. Minimal networks of amino acids in E1/E2, including three out of the four punctual positions, allowed to distinguish between NR and R. **Conclusion**: Our *in silico* and *in vitro* data highlight an association between HCV envelope glycoprotein sequences and treatment efficacy. Functional analyses using HCVpp demonstrate that NR-related 431A and 642V favour viral entry with concomitant escape from neutralizing antibodies while R-related 219T decreases entry. Moreover, our results suggest that virus-host interactions during viral entry may contribute to treatment failure.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a major public health burden with 170 million people infected worldwide. The majority of HCV-infected individuals will develop a persistent infection that can progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Although treatment for chronic hepatitis C has markedly improved in the past years, there continues to be a large unmet medical need in the area of hepatitis C prevention and therapy. The current treatment of chronic hepatitis C combining pegylated interferon-alfa (PEG-IFN-α) and ribavirin is efficient in only 50% of patients infected with HCV genotype 1, the most common genotype in Europe and North America. Thus, the improvement of anti-HCV treatment is a very active area of research (1). Recently, a new standard of care based on the triple combination of PEG-IFN-α, ribavirin and an HCV protease inhibitor has been approved for genotype 1 patients (2). However, treatment failure due to viral resistance still remains an important issue and a better knowledge concerning the mechanisms underlying resistance to current anti-HCV treatment is needed to further improve HCV therapy.

Both host-related and viral factors contributing to resistance have been reported (1,3,4). HCV genotype and HCV RNA load have both been associated with treatment outcome. Indeed better responses to IFN-α are observed in patients infected with HCV genotype 2 or 3 compared to genotype 1 (5,6) and high viraemia before treatment (> 5 x 10^5 – 8 x 10^5 IU/ml) has been linked to the absence of response to treatment for HCV genotype 1 (3,4). Moreover, a rapid virological response (HCV RNA < 50 IU/mL after 4 weeks of treatment) and early virological response (HCV RNA < 50 IU/mL at week 12) are predictive factors for sustained virological response (HCV RNA < 50 IU/mL 6 months after the end of treatment). Host-related factors linked to resistance to treatment include cirrhosis or cirrhosis with complications, high body weight, afro-american ethnicity, male

gender, older age, kidney dysfunction, diabetes and individual genetic background (upstream IL28B gene) (7,8).

The highly variable HCV envelope glycoproteins E1 and E2 plays a crucial role in recognition of viral cellular receptors, are targets of host-related immune reaction, and may thus have an indirect impact on anti-HCV treatment efficacy. E1 and E2 are involved in the interaction of HCV with several host factors including CD81, scavenger receptor BI (SR-BI), heparan sulfate (HS), claudin-1 (CLDN-1), -6, -9, and occludin (OCLN) (9–11). The hypervariable region 1 (HVR1) of E2 interacts with SR-BI and HS, is involved in the HCV/lipoprotein complex during viral entry into the host cell (12), and is also a target of host immunity. The variability of the quasispecies in HVR1 before treatment has been linked to IFN-response (13). Covariance networks in E1/E2 amino acids and in viral non-structural proteins have also been linked to antiviral treatment response in genotype 1a and 1b-infected patients (14). Mutations of E1 or E2 in neutralization epitopes or in epitopes targeted by CD4+ or CD8+ T lymphocytes can lead to escape from neutralizing antibodies or T lymphocytes, respectively (15). The difficulty in mounting an effective immune response against HCV envelope antigens may thus also contribute to treatment failure (16,17). Finally, the ability of HCV to also bind to and/or infect blood cells may have an indirect immuno-modulating impact on treatment response (18,19).

We therefore hypothesized that the high variability of HCV envelope glycoproteins may contribute to resistance to anti-HCV treatment by selection of strains with enhanced entry and/or escape from host immune responses. Consistently, we characterized the association of E1/E2 amino acid sequences with subsequent treatment efficacy within a cohort of 92 HCV-infected patients and we demonstrated for the first time the functional relevance of certain molecular signatures in E1/E2 using HCV pseudoparticles.

Materials and Methods

Patients. Serum samples were collected before treatment from 92 patients infected by HCV genotype 1 (1b, n= 49; 1a, n= 43) and followed in different French University hospitals (Strasbourg n= 44; Tours n= 7; Clermont-Ferrand n= 3; Bobigny n= 16; Villejuif n= 6; Toulouse n= 5; Paris (Hôpital Pitié-Salpêtrière) n= 5; Bordeaux n= 4; Brest n= 2) (Table 1). A declaration of HCV strains collection was provided in August 2008 by Inserm authorities to the "Comité de Protection des Personnes - CPP d'Alsace" (19/11/2008, DC-2008-829), in accordance to the ethical guidelines of Helsinki. Virological response was evaluated at weeks 4 and 12 after the start of treatment, 6 months after the end of treatment, and classified into four groups and subgroups: first either sustained virological response (SVR, i.e. R in the text) or non-SVR (NR); second two subgroups: NR0 (Null Virological Response, no diminution of HCV RNA load above 2 $\log_{10}$ IU/mL, the worst context), and RVR (Rapid Virological Response, HCV RNA undetectable (< 12-15 IU/mL) at week 4, the best context).

Reverse transcription (RT)-PCR and direct sequencing. HCV strains were investigated in the plasma collected at baseline (before treatment) for the 92 patients. HCV RNA was subjected (330 ng per reaction) to a reverse transcription (LongRange 2Step RT-PCR kit, Qiagen) with a gene specific primer A5387 (20), and cDNA was then amplified by the proofreading LongRange PCR enzyme Mix and published primers (21), generating amplicons including the E1/E2 genes. In case of inefficient amplification, PCR using SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen), Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) and published primers (22) was performed. For all the assays, risks of PCR contamination were excluded. Amplicons were directly sequenced for the

entire E1 and E2 genes on an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Bio-informatic analyses of HCV E1/E2 sequences. First, investigation of “Molecular Signatures”, i.e. amino acids (AA) linked to virological response to treatment, was performed using the VESPA program (http://hcv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html) by comparing patient (sub)groups according to treatment efficacy. The frequency and relative proportions of 1 residue at each position for the different patients (sub)groups were taken into account. An AA was retained in a first screening if it was over-represented in one group or subgroup (≥ 60% of the AA at this position), and appeared less frequently in the comparative patient group or subgroup (< 50%) (Table 2). The most relevant signatures which were explored for functional tests were those combining at least two frequency features, different distribution between subtypes (1a/1b), and differential predicted antigenicity (http://antheprot-pbil.ibcp.fr). Second, another approach was used because amino acids can interact with other residues within HCV envelope proteins, with a potential indirect impact of these interactions on treatment. This approach was developed in order to distinguish between NR and R patients. Pairs of covarying amino acid positions were calculated within each group under consideration according to the method of Aurora et al, and those pairs with an S value of at least 0.5 were retained (14). Since there are many combinations (14), we determined those that could achieve this according to certain optimality criteria, either containing the fewest number of pairs or that maximized the total correlation value (binary integer programming problem - manuscript under preparation, Matlab R2010b, MathWorks Inc.). Moreover, HCV quasispecies diversity in E1/E2 was assessed for three patients (one NR0 patient infected with HCV-1a, at baseline and week 12, and two SVR patients infected with HCV-1a at baseline, 10 clones per sampling point).

Cell lines. Human embryonic kidney cells (HEK 293T) and human hepatoma Huh7.5 cells have been cultured as described (22,23). Moreover, Huh7.5 cells overexpressing HCV entry factors were created by stable lentiviral gene transfer using the lentiviral self-inactivating vector pWPI-BSD (Addgene) transducing CD81, SR-BI, CLDN-1 or OCLN receptor gene as previously described (24).

Plasmids. For HCVpp production, plasmids derived from HCV-1a (H77-AAB67037) or HCV-1b (UKN-1b-AY734974) reference strains expressing HCV E1 and E2 genes were used as templates to introduce the identified molecular signatures by site directed mutagenesis using the QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) following the manufacturer's instructions (Table 3).

HCV pseudoparticle production, infection and neutralization. HCVpp were produced by transfection of HEK 293T cells as described previously (22,25), using the CMV-Gag-Pol HIV (Human Immunodeficiency Virus) packaging construct, a luciferase reporter plasmid and plasmids encoding HCV E1/E2 glycoproteins of reference strains (1a or 1b) containing or not a single molecular signature. Expression of HCV E1/E2 glycoproteins by the various HCV-1a and -1b strains was assessed in HEK 293T producer cell lysates by immunoblotting. The amounts of HCVpp in the supernatants were normalized by quantification of HIV p24 antigen (Innotest HIV Antigen mAb kit, Innogenetics). HCV entry and neutralization assays were performed on parental Huh7.5 cells or Huh7.5 cells individually overexpressing HCV entry factors (15,26). For antibody-mediated neutralization assays, HCVpp were pre-incubated with various patient cohort derived-HCV-positive heterologous sera, or HCV-negative control serum. The sera were chosen as following: from a patient infected by a HCV strain containing the molecular signature under investigation, same subtype, and showing a viral response corresponding to the

signature of interest (Table 3). HCVpp neutralization titres were defined as the last dilutions giving a specific neutralization above 50%. For position 431, analyses were also performed by using a MLV (Murine Leukaemia Virus) packaging construct (26).

Statistical analysis. When differences were observed in repeated *in vitro* tests (showing reproducible variations), a statistical analysis was performed on variance (post-hoc Fisher Least Significant Difference assays for infectivity, student test on logarithmic values for neutralization) and p mentioned when < 0.05.

Results

Punctual molecular signatures within HCV E1 and E2 associated with treatment outcome include amino acids 219T, 431A and 642V for genotype 1a and 391V for genotype 1b. The study included 92 patients infected with genotype 1 (43 genotype 1a, 49 genotype 1b) under PEG-IFN-α/ribavirin therapy, divided as follows according to virological response: 42 responders (R; 25 genotype 1b, 17 genotype 1a) and 50 nonresponders (NR; 24 genotype 1b, 26 genotype 1a). Figure 1 provides a representation of amino acid (AA) frequency on HCV E2 from residues 384 to 480 for HCV-1a strains and HCV-1b strains derived from these 92 patients. Variable and conserved regions appear on the graph, according to the size of amino acid symbols. The expected high variability of HVR1 can be observed for HCV 1a and 1b, while HVR2 is more variable within HCV 1b strains. After screening of amino acids preferentially expressed in one patient group over another, we retained for functional assays AA positions showing several relevant features. Thus we explored four AA positions in E1 and E2: (i) 219T, a threonine in E1 from genotype 1a that was associated with treatment response, (ii) 431A and 642V, an alanine and a valine in E2 of genotype 1a associated with nonresponse to treatment as well as (iii) 391V, a valine in E2 of genotype 1b associated to nonresponse to treatment due to its original distribution (valine in 57% NR0, in 0% SVR) even though rare in both subtypes (Table 2). E1/E2 amino acid sequences analyzed both before and under treatment pressure were available for 5 NR patients infected by HCV genotype 1a. Three out of five patients showed an alanine at position 431 before treatment, that was maintained under treatment pressure, combined with a valine at position 642 for 2/3 patients, that was also conserved under treatment.

Because HCV circulates as quasispecies in infected individuals, we aimed to better investigate the AA signatures at a quasispecies level in a few patients. For the null

virological responder (NR0) patient, sequences before and under treatment were well conserved with an alanine maintained at position 431 and a valine at position 642. AA were homogeneous within quasispecies before treatment for responder (R) patients: 219T, 431E, 642A in all the clones for the first patient, and 431D, 642A in all the clones for the second. These data suggest that the above mentioned AA signatures retained in HCV E1/E2 glycoproteins, genotype 1a, either related to treatment failure (431A, 642V) or to virological response (219T) display stable and expected distribution in exemplary quasispecies, reinforcing their potential role in treatment issue.

Interestingly, predicted antigenicity of HCV-1a 431 and 642 NR-related molecular signatures introduced in the H77 reference strain, analyzed by Antheprot 2000 software showed a lower antigenicity for both residues. Similar findings were obtained for NR-related molecular signature 391V while R-related molecular signature 219T demonstrated higher antigenicity (data not shown).

Covariance networks on E1/E2 separate patients according to virological response.

Because amino acids can interact with other residues within HCV envelope proteins, with a potential impact of these interactions on treatment, we calculated covarying AA pairs in E1/E2 for each genotype and for each group NR and R (14). Despite roughly similar number of individuals infected with 1a (n = 43) and 1b (n = 49), there were twice as many covarying pairs for 1a sequences (1095 vs 516, respectively). The 1a sequences also exhibited AA pairs with higher covariances than for 1b (maximum S value of 6.9 vs 2.8 respectively). We extracted the dominant aspects by determining optimal networks that either minimized the number of pairs used or that to a certain extent maximized the total covariance. Fewer pairs were required to separate 1a NR/R compared to 1b regardless of optimality criteria (5-7 pairs for 1a versus 6-9 pairs for 1b). Combining all pairs that appeared in these optimal networks produces the overall network for each genotype

displayed in Figure 2. Three out of the four positions retained from punctual comparisons for the functional signature investigation (219 and 431 for 1a, and 391 for 1b), also appear in these minimal networks separating NR from R. Taken together, these data argue in favour of an indirect influence of combined amino acid variations in HCV envelope glycoproteins on treatment outcome.

HCVpp entry influenced by molecular signature related to viral response. Since our analysis of punctual molecular signatures suggested that the variability of HCV envelope glycoproteins may contribute to resistance to anti-HCV treatment, we hypothesized that this process might involve selection of strains with enhanced infectivity and/or escape from host immune responses. Figure 3A shows entry into Huh7.5 cells of HCVpp bearing different amino acids at the investigated molecular signature positions as compared to wild type (wt, without signature) reference strain HCVpp of genotype 1a or 1b (means ± SD from several reproducible experiments). Interestingly, HCVpp entry was decreased to 57.9±8.5% of wt HCVpp when HCVpp contained R-related MS 219T whereas 125.6±16.6% and 154.2±15.9% HCVpp entry were observed for HCVpp displaying NR-related MS 431A or 642V, respectively. No modulations were observed with MS 391V (Figure 3A). Using MLV as a retroviral backbone for HCVpp produced a similar result for NR-linked 431A with entry increased to 212±46.1%.

As molecular signatures may modulate the interaction of HCV envelope glycoproteins with host entry factors, we next asked whether the molecular signatures may affect viral entry by different usage of cell entry factors CD81, SR-BI, CLDN-1 and OCLN. We thus studied viral entry of wt HCVpp and HCVpp displaying the individual molecular signatures in Huh7.5 cells stably overexpressing individually the four main cell entry factors. Overexpression of either CD81 or SR-BI increased entry of HCVpp bearing NR-related signature 431A by 2.6-fold median change (versus 1.6-fold for wt) and by 2.4-fold median

change (versus 1.6-fold for wt), respectively (Figure 3B). No specific increase was observed with any of the cell lines for HCVpp displaying the other signatures (data not shown). These data suggest that the increased entry of HCVpp containing NR-related molecular signature 431A might be in part due to a modulation of CD81 and SR-BI usage.

Neutralization assays of HCVpp showed an escape to neutralization for two NR-related MS. We next investigated the ability of chronic HCV patient-derived sera (pretreatment) to neutralize HCVpp bearing either wt E1/E2 glycoproteins or E1/E2 glycoproteins displaying the individual amino acids associated with treatment outcome. Sera came from six patients (three who were infected by HCV genotype 1a, three by HCV genotype 1b, see Table 3). Introduction of residue 431A into the H77-1a reference strain resulted in a decrease in antibody-mediated HCVpp neutralization by the pretreatment serum 1 (HS+1), with a mean neutralization titre of 1:73 for HCVpp bearing NR-related molecular signature 431A versus 1:833 for wt HCVpp (Figure 4). A decrease in neutralization of HCVpp bearing 431A signature was also observed using another serum (HS+2) (data not shown). With HCVpp using MLV backbone to evaluate the NR-related signature 431A, a similar result with HS+1 was observed, i.e. mean neutralization titre of 1:100 versus 1:1066 for wt ($p < 0.01$, figure 4).

For NR-related molecular signature 642V, a decrease in neutralization occurred with a mean titre of 1:46 versus 1:200 for wt HCVpp with HS+7 serum (Figure 4). No modulations were observed in antibody-mediated neutralization for response-related signature 219T (with HS+2) or for nonresponse-related signature 391V with HS+4 (Figure 4), as well as with HS+6 and HS+9 (data not shown).

Discussion

In this study, using a cohort of 92 chronic HCV patients infected with genotype 1a or 1b and undergoing PEG-IFN-α/ribavirin therapy, we (i) defined minimal networks in HCV envelope glycoproteins E1/E2 able to separate NR and R patients and (ii) for the first time in context of treatment we highlight the functional relevance of certain molecular signatures in E1/E2 for HCV entry and escape using HCVpp. We identified one response-related amino acid 219T (E1) and two nonresponse-related amino acids 431A (E2) and 642V (E2) for HCV genotype 1a as well as a nonresponse-related molecular signature 391V (E2) for HCV genotype 1b. Functional analyses performed with HCVpp demonstrated that the presence of either 431A or 642V increased HCVpp entry into Huh7.5 cells and favoured escape from neutralizing antibodies while the presence of 219T decreased HCVpp entry into Huh7.5 cells. Our study highlights one possible mechanism by which nonresponse related molecular signatures may contribute to enhanced HCVpp entry and escape from neutralizing antibodies. Indeed, differential usage of two HCV entry factors, CD81 and SR-BI, may in part explain the higher entry phenotype of HCVpp bearing the molecular signature 431A.

The position 431 is next to an N-glycosylation site at position 430 of E2 (27) and contributes to an immunogenic, highly conserved and conformational epitope comprised in the domain B of E2, which is recognized by the neutralizing human monoclonal antibody CBH-2. A single amino acid substitution at position 431 resulted in escape from CBH-2 mediated neutralization in a genotype 1a virus (28). Position 431 is also close to the disulfide bond Cys429-Cys552 involved in E2 folding (29) and located in the top β-sheet of E2 DI domain, exposed at the virion surface and containing most of CD81 binding determinants (29). The position 642 is located next to a glycosylation site (N645) as well as a disulfide bond Cys644-Cys607 playing a role in tertiary structure of the viral protein

(29). Moreover, position 642 is located in the part of E2 DIII domain exposed at the virion surface, which contains CD81 binding determinants (29). The mutation A642G inhibited the attachment of the conformational neutralizing antibody CBH-2 (28). At last, the position 219 (219-AIL-221 amino acids pattern) in E1 (HCV-1a) has been shown to be crucial for HCVpp and HCVcc (replicating HCV clone in cellular culture) entry (30).

Grove et al. described a single mutation (G451R, genotype 2a) in HCV envelope protein E2 that alters glycoprotein structure, subsequently modulates viral interaction with SR-BI and CD81 and increases sensitivity to neutralizing antibodies (31). Keck et al. have investigated HCVpp with HCV 1a glycoproteins isolated from a chronically infected patient. One viral variant displayed reduced binding affinities for all anti-HCV E2 monoclonal antibodies of the panel used and for CD81, reduced infectivity and two mutations in E2 (S501N and V506A) (32). Gal-Tanamy et al. used a cell culture-infectious chimeric HCV with the structural proteins of genotype 1a to identify envelope residues involved in the epitope recognized by a broadly neutralizing murine monoclonal antibody, AP33. Two amino acid substitutions in E2 (N415Y and E655G) were found to contribute to resistance to AP33 neutralization (33).

The crucial roles of HCV envelope glycoproteins in the viral life cycle and in escape to immune response suggest that they may play an indirect role in anti-HCV treatment efficacy. Potential evolutionary forces acting on HCV E1 and E2 proteins, due to immune pressure and to conservative constraints needed to maintain viral structures and functions, could favour the emergence of certain viral strains. By using a bio-informatical approach, we observed that minimal networks in E1/E2 could separate patients responding or not to antiviral therapy, and three out of the four positions corresponding to molecular signatures which were functionally investigated also appeared in these minimal networks. Aurora et al. analyzed amino acid covariance within the full viral coding region of pretreatment

sequences from 94 patients (14). Covarying amino acid positions were frequent and linked together within networks, differing between responder patients and nonresponders to treatment, with numerous positions among those of the amino acid covarying pairs located in E1 and E2. Genetic covariance may be indicative for functional interactions between the covarying residues by direct binding, compensatory allosteric changes, or intermolecular interactions with other cellular or viral components. The authors suggested that some hydrophobic interactions could contribute to failure to therapy by stabilizing viral protein complexes (14). Xu et al. performed comparative genetic analyses of HCV quasispecies in two patients showing viral breakthrough during antiviral therapy, with a distinct viral variant emerging at breakthrough. The genomic regions involved in the quasispecies variability were mainly located in E2, NS2 and NS5A. The authors hypothesized that HCV variants at the time of breakthrough corresponded to a resistant phenotype (34). For their part, Cuevas et al. hypothesized that the level of variability in a viral population could influence treatment outcome (35). Finally, we could assume that the global level of viral variability, some hot points in HCV proteins, and certain covarying amino acids in HCV envelope glycoproteins could have an impact on treatment efficacy.

In conclusion, we investigated whether HCV envelope proteins could influence response to standard treatment by PEG-IFN-α and ribavirin. Our original results obtained after HCV E1/E2 sequencing of 92 HCV-infected patients followed by *in vitro* functional tests are consistent, at least partially, with our initial hypothesis: certain molecular features in HCV envelope E1 and E2 glycoproteins can influence viral infectivity and/or escape to immune response. This could favour the selection of advantaged HCV strains under treatment pressure leading to failure of therapy by indirect mechanisms. Moreover, minimal networks in E1/E2 could separate patients responding or not to treatment. The elucidation of factors which are involved in response to treatment is important for the

understanding of the molecular mechanisms of resistance to standard of care treatment for chronic HCV infection. The contribution of HCV envelope glycoprotein to resistance argues in favour of further development of HCV entry inhibitors.

Acknowledgments

We acknowledge our collaborators for samples from other French university hospitals: F. Abravanel (Virology, CHU de Toulouse), Y. Baazia (Virology, Bobigny, Hôpital Avicenne), C. Gaudy (Virology, CHU de Tours), C. Henquell, (Virology, CHU de Clermont-Ferrand), A-M. Roque-Afonso (Virology, Villejuif, Hôpital Paul-Brousse), V. Thibault (Virology, Paris,Hôpital Pitié-Salpêtrière), P. Trimoulet (Virology, CHU de Bordeaux), S. Vallet (Virology, CHU de Brest). We also thank N. Meyer (Medical Informatics, CHU de Strasbourg).

Tables and figures

Table 1. Characteristics of patients and virological response to standard of care (SOC) treatment composed by alfa-IFN/ribavirin combination.

Baseline characteristics of patients within both long-term virological response main groups to SOC treatment			
Long-term response to SOC treatment [a]		**SVR (n = 42)**	**NR (n = 50)**
Duration of SOC treatment (months) [b]		9.9 [6.4, 13.4]	
Ethnic groups of patients	**Caucasian**	33 (78.6%)	40 (80.0%)
	African	7 (16.7%)	4 (8.0%)
	Asian	1 (2.4%)	2 (4.0%)
	Unknown	1 (2.4%)	4 (8.0%)
Gender	**Female**	20 (47.6%)	14 (28.0%)
	Male	22 (52.4%)	36 (62.0%)
Age (years) [b]		45.3 [32.3, 58.3]	50.9 [40.2, 61.6]
Mode of HCV transmission	**Blood transfusion**	22 (52.4%)	18 (36.0%)
	Intravenous drug use	12 (28.6%)	17 (34.0%)
	Tattoo/Piercing	3 (7.1%)	1 (2.0%)
	Manucure	1 (2.4%)	0 (0.0%)
	Unknown	4 (9.5%)	14 (28.0%)
Blood glucose levels	**Diabetes**	1 (2.4%)	2 (4.0%)
	Pre-diabetes	3 (7.1%)	2 (4.0%)
	Normal	38 (90.5%)	46 (92.0%)
Lipoprotein profile	**Altered**	11 (26.2%)	6 (12.0%)
	Normal	31 (73.8%)	44 (88.0%)
Metavir score [c]	**No or minimal fibrosis**	15 (35.7%)	3 (6.0%)
	Moderate to severe fibrosis	22 (52.4%)	25 (50.0%)
	Cirrhosis	5 (11.9%)	19 (38.0%)
	Unknown	0 (0.0%)	3 (6.0%)
Antiviral treatment naive patients	**No**	6 (14.3%)	25 (50.0%)
	Yes	36 (85.7%)	22 (44.0%)
	Unknown	0 (0.0%)	3 (6.0%)
HCV RNA (log_{10} IU/mL) [b]		5.62 [4.8, 6.5]	6.11 [5.57, 6.65]
ALT (fold change of ULN) [d]		2.05 (± 1.35)	2.65 (± 2.21)
HCV genotype	**Subtype 1a**	17 (40.5%)	26 (52.0%)
	Subtype 1b	25 (59.5%)	24 (48.0%)
Patients' virological response (sub)groups to SOC treatment within both subtype groups			
Main response groups [a]	**Response subgroups [e]**	**HCV subtype 1a (n = 43)**	**HCV subtype 1b (n = 49)**
SVR	**RVR [f]**	4 (9.3%)	13 (26.5%)
	non-RVR	10 (23.3%)	5 (10.2%)
NR	**NR0**	8 (18.6%)	7 (14.3%)
	PR	3 (7.0%)	3 (6.1%)
	Break	1 (2.3%)	1 (2.0%)
	Rel	13 (30.2%)	7 (14.3%)
	Undeterminated NR profile	1 (2.3%)	6 (12.3%)

[a] **SVR** which corresponds to patients who have achieved a sustained virological response (i.e., HCV RNA undetectable 6 months after the end of treatment), **NR** = nonresponder patients (i.e., non-SVR) ; [b] Expressed by mean value [Min value, Max value]; [c] No or minimal fibrosis corresponds to a Metavir score ≤ A1F1, moderate to severe fibrosis is characterized by a Metavir score where A ≥ 2 or F = 2 or 3 whatever A grade, and cirrhosis is defined by a Metavir score with F = 4 (with A = Activity, F = Fibrosis) ; [d] ALT (alanine transaminase) expressed by mean value (± SD), ULN = upper limit of normal ; [e] **RVR** corresponds to patients who developed a rapid virological response (i.e., HCV RNA undetectable after 4 weeks of treatment), **NR0** corresponds to null virological responders (i.e., no diminution of viral load ≥ 2 $\log_{10}$ IU/mL during the course of treatment), **PR** corresponds to partial responders (i.e., diminution of viral load ≥ 2 $\log_{10}$ IU/mL during the course of treatment without disappearance of HCV RNA), **Break** corresponds to patients with breakthrough (i.e., disappearance of HCV viral load during treatment followed by re-increase in HCV RNA while still under treatment), **Rel** corresponds to relapser patients (i.e., disappearance of HCV RNA during the course of treatment followed by re-increase in HCV RNA after treatment discontinuation) ; [f] for a few patients, HCV viral load was not measured at week 4: virological response at week 4 was undeterminated for 3 (7.0%) HCV-1a and 7 (14.3%) HCV-1b patients who subsequently developed SVR.

No specific feature was retained from the analysis of patients' bioclinical characteristics, next to those of HCV-infected French patients.

Table 2. Identification of molecular signatures according to virological response to treatment.

Molecular Signatures (MS) among HCV-1a infected patients				
Position [a] (HCV glycoprotein)	*Nature of AA residue at position of interest in E1/E2 [b]*	*Orientation of virological response*	*Relevant features [c] Response to treatment (NR ; SVR ; NR0 ; RVR)*	*Subtypes (1a ; 1b)*
219 (E1)	**T**	Response	65% SVR / 42% NR ; 75% RVR (versus 25% Alanine in RVR)	51% 1a ; 0% 1b
431 (HVR3-E2)	**A**	Nonresponse	61.5% NR / 47% SVR ; 75% NR0 (versus 25% Aspartic acid in NR0)	56% 1a ; 0% 1b
642 (E2)	**V**	Nonresponse	75% NR0 / 35% NR non-NR0 (versus Alanine 25% NR0 / 65% NR non-NR0)	42% 1a ; 2% 1b
Molecular Signatures (MS) among HCV-1b infected patients				
Position [a] (HCV glycoprotein)	*Nature of AA residue at position of interest in E1/E2 [b]*	*Orientation of virological response*	*Relevant features [c] Response to treatment (NR ; SVR ; NR0 ; RVR)*	*Subtypes (1a ; 1b)*
391 (HVR1-E2)	**V**	Nonresponse	0% SVR ; 57% NR0	5% 1a ; 14% 1b

Amino acid (AA) positions showing relevant features either in the distribution of R (i.e., SVR) versus NR and/or frequency in NR0 and RVR subgroups (see Materials & methods): R-related 219T (E1; 1a), NR-related 431A (HVR3-E2; 1a) and NR-related 642V (E2; 1a), NR-related 391V (HVR1-E2; 1b), with their frequency in (sub)groups. [a] Amino acid position in reference to H77 (accession no. AF009606) or HC-J4 (accession n° AF054247) reference strains respectively for HCV-1a and -1b molecular signatures ; [b] T = Threonine, A = Alanine, V = Valine ; [c] NR = nonresponder, SVR (i.e., R) = sustained virological responder, NR0 = null virological responder, RVR = rapid virological responder.

Table 3. HCV-1a/1b molecular constructs and HCV-positive sera used in neutralization assays.

Nature of AA in HCV-1a molecular constructs at MS positions			
ID molecular construct	MS positions		
	219	431	642
H77-1a wt	A	D	A
H77-1a A219T	**T ***	D	A
H77-1a D431A	A	**A ***	A
H77-1a A642V	A	D	**V ***

Nature of AA in HCV-1b molecular constructs at MS position	
ID molecular construct	MS position
	391
UKN-1b wt	S
UKN-1b S391V	**V ***

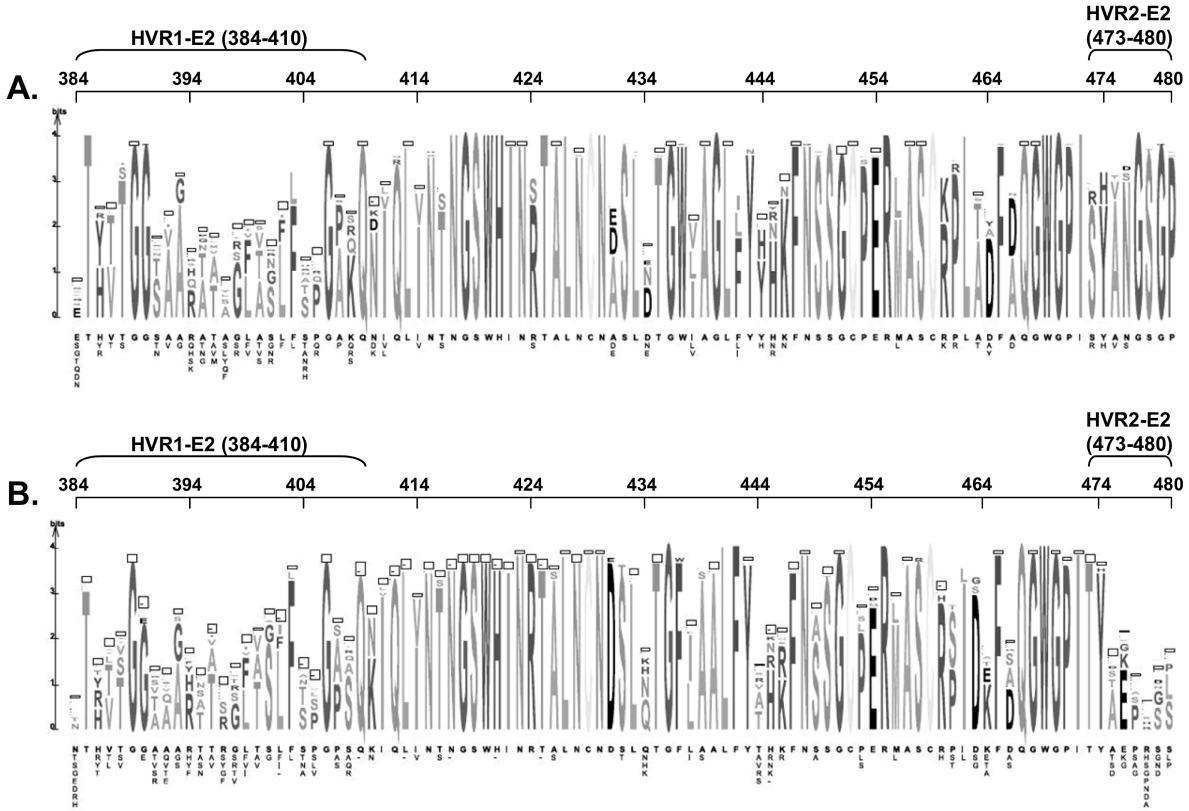
ID of HCV-positive patient serum	HCV strain subtype	Sampling time-point [a]	NR0 to treatment [b]	Molecular signatures [c]
HS+ 1	1a	PT	Yes	219T 431A 642V
HS+ 2	1a	PT	Yes	219T 431A
HS+ 4	1b	PT	Yes	391V
HS+ 6	1b	PT	Yes	391V
HS+ 7	1a	PT	Yes	431A 642V
HS+ 9	1b	PT	Yes	391V

Letters correspond to amino acids according to the international letter code, i.e., A = Alanine, D = Aspartic acid, S = Serine, T = Threonine and V = Valine. Amino acids in bold and marked with ***** referred to molecular signatures (MS) linked to treatment response defined by bio-informatics. [a] PT = pre-therapeutic sampling time-point, [b] NR0 : null virological responder, [c] Molecular signatures linked to treatment response.

431A signature was investigated by using sera HS+1 and HS+2, 219T with HS+2, 642V with HS+7 and 391V with HS+4, HS+6 and HS+9, according to availability of serum amount.

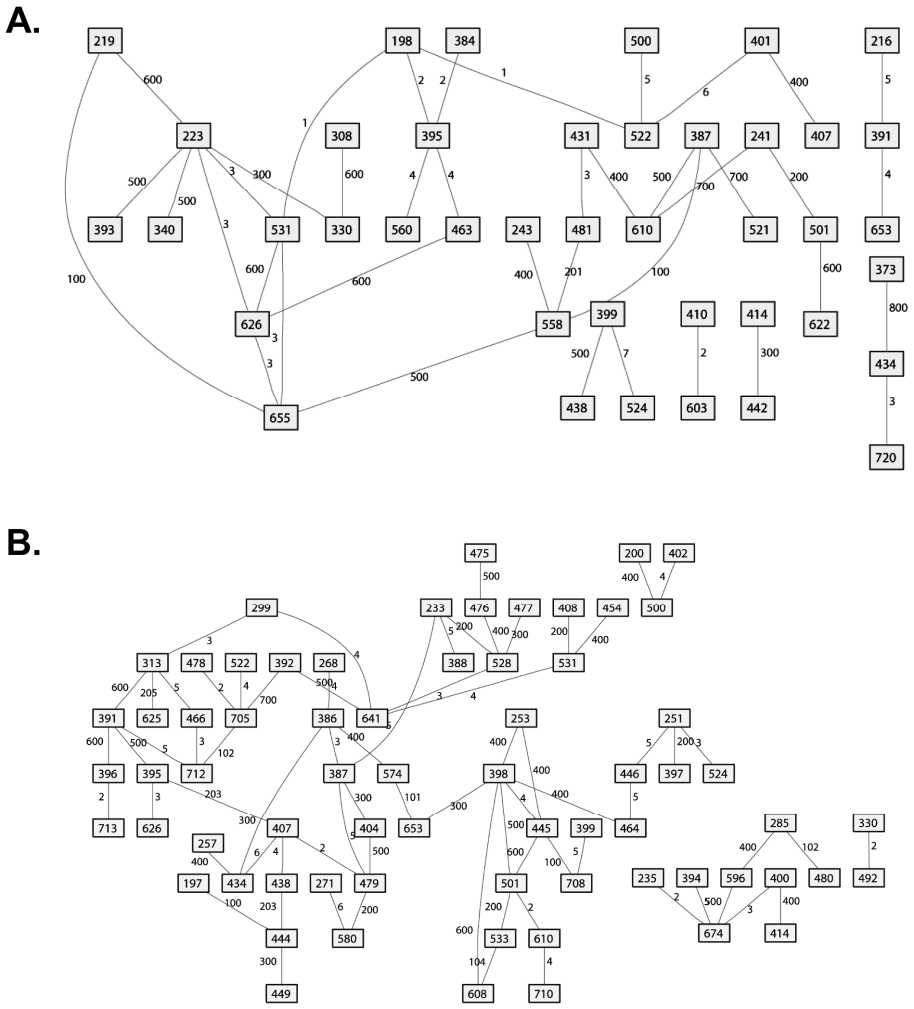
Numbers correspond to amino acid location in the whole HCV polyprotein as compared to H77 (accession no. AF009606) or HC-J4 (accession no. AF054247), for HCV-1a and -1b molecular signatures respectively.

Figure 1. Sequencing of HCV strains before treatment for 92 patients: amino acid frequency shows differential patterns between 1a and 1b genotype (on HVR1-HVR2 E2).



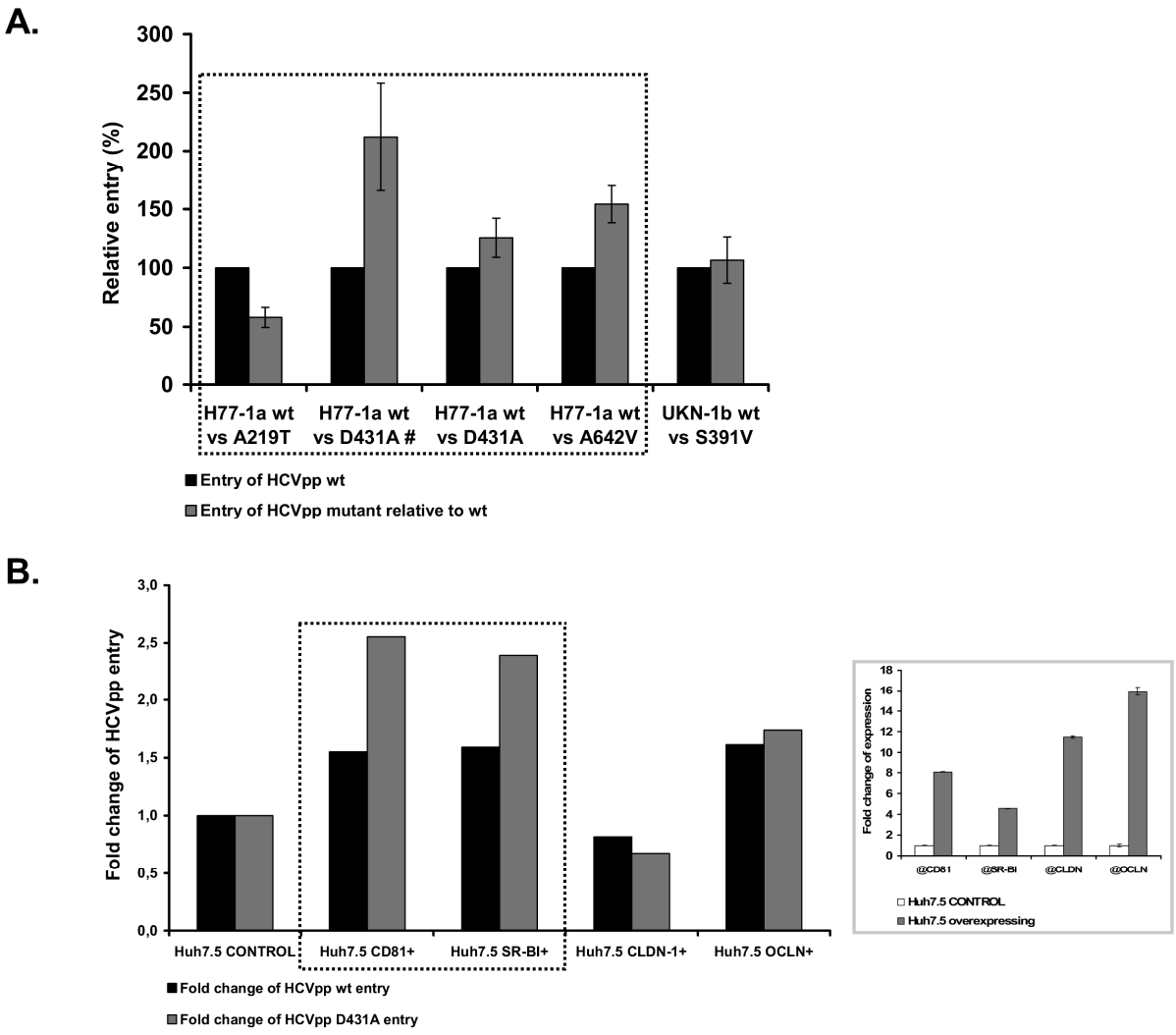
Amino acid frequency in HCV E2 between residues 384 and 480 of (**A**) HCV-1a strains (n = 43) and (**B**) HCV-1b strains (n = 49). The height of each letter indicates the relative frequency of each residue at each position (LogoBar v1.0 software). Numbers displayed on top of both profiles correspond to amino acid positions in the whole HCV polyprotein as compared to H77 (accession no. AF009606) or HC-J4 (accession no. AF054247), for HCV-1a and -1b strains respectively.

Figure 2. Covariance networks on E1/E2 separating patients according to virological response.



Covariant amino acid networks on E1/E2 separating patients according to virological response (**A.** subtype 1a, **B.** subtype 1b). The numbers next to each edge refer to the number of individuals separated by that pair, under the following numbering convention: the digits in the hundreds refers to the number of NR individuals separated by that pair, while the numbers in the units refers to the number of R (i.e. SVR) separated by that edge. For example an edge weight of 201 means that 2 NR and 1 R are separated by a single feature at that pair, a number 2 means that 2 R are separated, and a number 700 means that 7 NR are separated at that point.

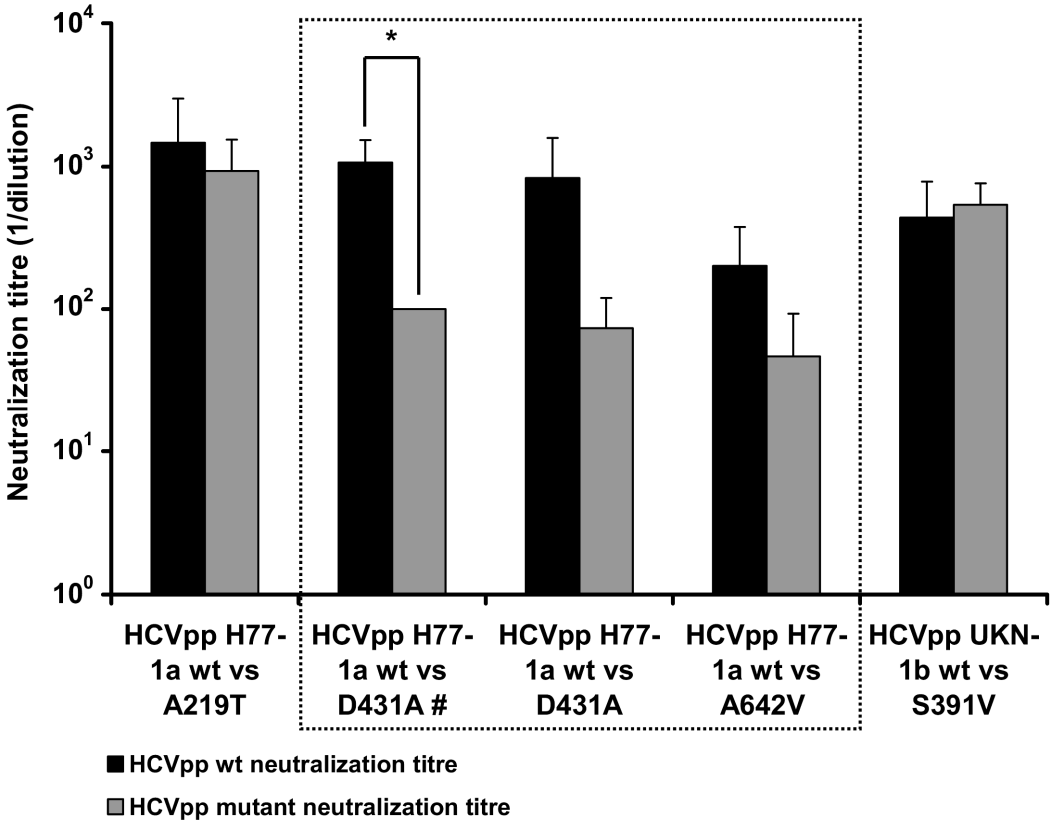
Figure 3. HCVpp bearing a molecular signature associated with nonresponse to treatment (431A or 642V) display increased entry into Huh7.5 cells, and differential entry level between HCVpp bearing signature 431A and wild-type HCVpp on Huh7.5 cell lines overexpressing HCV coreceptors CD81 and SR-BI.



(**A**) Entry of mutated HCVpp (bearing signature) compared to entry of wild-type (wt) HCVpp (without signature). Entry levels of wt HCVpp are represented as 100% and entry levels of mutated HCVpp are expressed in percentage relative to wt. Relative entry means ± SD for each infectivity comparison (H77-1a wt vs A219T, H77-1a wt vs D431A # – with # meaning that HCVpp were constructed on a MLV backbone additionally to HIV backbone –, H77-1a wt vs D431A, H77-1a wt vs A642V and UKN-1b wt vs S391V) are

derived from at least three independent experiments performed in triplicate. (**B**) Entry assays were performed on Huh7.5 cell lines individually overexpressing the different HCV coreceptors: CD81, SR-BI, CLDN-1 or OCLN. Results of differential entry in different cell lines between HCVpp bearing signature 431A (D431A) and HCVpp without signature (wt) are shown on the left graph. Results are represented as the medians derived from three independent experiments performed in triplicate in each case. Increase or decrease of entry is expressed in fold change of entry compared to Huh7.5 control cells (reference at 1,0 as the unit of fold change in entry). The right boxed graph represents the expression of coreceptors on each Huh7.5 cell lines individually overexpressing one coreceptor. For one Huh7.5 cell line overexpressing one coreceptor, level of coreceptor expression was obtained with flow cytometry analyses (FACS®) by performing immuno-labelling of cells with specific anti-receptor monoclonal antibody. Each result is expressed as mean ± SD of duplicate from one experiment. Increase of expression is shown in fold change compared to baseline levels on Huh7.5 control cells (reference at 1,0). Flow cytometric analyses demonstrated that the overexpression of either SR-BI, CD81, CLDN-1 or OCLN did not affect the stability or proportion of other HCV receptors at the cell surface (data not shown).

Figure 4. Comparison of neutralization titres between HCVpp with a signature and HCVpp without shows a decrease in neutralization for 431A and 642V-bearing constructs.



Neutralization assays using pre-treatment HCV-1a or -1b sera (Table 3) were performed. The neutralization titres for HCVpp H77-1a wt vs A219T (R-related) with HS+2, wt vs D431A # – with # meaning that HCVpp were constructed on a MLV backbone additionally to HIV backbone – (NR-related) with HS+1, wt vs D431A (NR-related) with HS+1, wt vs A642V (NR-related) with HS+7 and UKN-1b wt vs S391V (NR-related) with HS+4 appear on the graph. Means with upper SD neutralization titres from 3 independent experiments performed in triplicate are shown. * $p < 0.01$ (Student t test on logarithmic values).

References

1. Zeuzem S. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? Ann. Intern. Med. 2004;140:370-381.
2. Pawlotsky J-M. The results of Phase III clinical trials with telaprevir and boceprevir presented at the Liver Meeting 2010: a new standard of care for hepatitis C virus genotype 1 infection, but with issues still pending. Gastroenterology. 2011;140:746-754.
3. Mihm U, Herrmann E, Sarrazin C, Zeuzem S. Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. Aliment. Pharmacol. Ther. 2006;23:1043-1054.
4. Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, Mole LA. Predictors of response of US veterans to treatment for the hepatitis C virus. Hepatology. 2007;46:37-47.
5. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Davidian M, Wiley TE, Mika BP, et al. Differences in viral dynamics between genotypes 1 and 2 of hepatitis C virus. J. Infect. Dis. 2000;182:28-35.
6. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. Ann. Intern. Med. 2004;140:346-355.
7. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature. 2009;461:399-401.
8. Georgel P, Schuster C, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Berg T, Bahram S, et al. Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. Trends Mol Med. 2010;16:277-286.

9. Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. J. Biol. Chem. 2003;278:41003-41012.

10. Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, et al. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. J. Virol. 2007;81:12465-12471.

11. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. J. Virol. 2009;83:2011-2014.

12. Bartosch B, Verney G, Dreux M, Donot P, Morice Y, Penin F, et al. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. J. Virol. 2005;79:8217-8229.

13. Chambers TJ, Fan X, Droll DA, Hembrador E, Slater T, Nickells MW, et al. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. J. Virol. 2005;79:3071-3083.

14. Aurora R, Donlin MJ, Cannon NA, Tavis JE. Genome-wide hepatitis C virus amino acid covariance networks can predict response to antiviral therapy in humans. J. Clin. Invest. 2009;119:225-236.

15. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. Gastroenterology. 2007;132:667-678.

16. Baumert TF, Wellnitz S, Aono S, Satoi J, Herion D, Tilman Gerlach J, et al. Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. Hepatology. 2000;32:610-617.

17. Hamed MRB, Tarr AW, McClure CP, Ball JK, Hickling TP, Irving WL. Association of antibodies to hepatitis C virus glycoproteins 1 and 2 (anti-E1E2) with HCV disease. J. Viral Hepat. 2008;15:339-345.

18. Di Liberto G, Roque-Afonso A-M, Kara R, Ducoulombier D, Fallot G, Samuel D, et al. Clinical and therapeutic implications of hepatitis C virus compartmentalization. Gastroenterology. 2006;131:76-84.

19. Schramm F, Soulier E, Royer C, Weitten T, Fafi-Kremer S, Brignon N, et al. Frequent compartmentalization of hepatitis C virus with leukocyte-related amino acids in the setting of liver transplantation. J. Infect. Dis. 2008;198:1656-1666.

20. Rispeter K, Lu M, Lechner S, Zibert A, Roggendorf M. Cloning and characterization of a complete open reading frame of the hepatitis C virus genome in only two cDNA fragments. J. Gen. Virol. 1997;78 (Pt 11):2751-2759.

21. Sheehy P, Scallan M, Kenny-Walsh E, Shanahan F, Fanning LJ. A strategy for obtaining near full-length HCV cDNA clones (assemblicons) by assembly PCR. J. Virol. Methods. 2005;123:115-124.

22. Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, Bartosch B, Cosset F-L, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007;104:6025-6030.

23. Haberstroh A, Schnober EK, Zeisel MB, Carolla P, Barth H, Blum HE, et al. Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. Gastroenterology. 2008;135:1719-1728.e1.

24. Haid S, Windisch MP, Bartenschlager R, Pietschmann T. Mouse-specific residues of claudin-1 limit hepatitis C virus genotype 2a infection in a human hepatocyte cell line. J. Virol. 2010;84:964-975.

25. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F-L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. J. Exp. Med. 2003;197:633-642.

26. Fafi-Kremer S, Fofana I, Soulier E, Carolla P, Meuleman P, Leroux-Roels G, et al. Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. J. Exp. Med. 2010;207:2019-2031.

27. Helle F, Goffard A, Morel V, Duverlie G, McKeating J, Keck Z-Y, et al. The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. J. Virol. 2007;81:8101-8111.

28. Keck Z-Y, Olson O, Gal-Tanamy M, Xia J, Patel AH, Dreux M, et al. A point mutation leading to hepatitis C virus escape from neutralization by a monoclonal antibody to a conserved conformational epitope. J. Virol. 2008;82:6067-6072.

29. Krey T, d' Alayer J, Kikuti CM, Saulnier A, Damier-Piolle L, Petitpas I, et al. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. PLoS Pathog. 2010;6:e1000762.

30. Maurin G, Fresquet J, Granio O, Wychowski C, Cosset F-L, Lavillette D. Identification of interactions in the E1E2 heterodimer of hepatitis C virus important for cell entry. J. Biol. Chem. 2011;286:23865-23876.

31. Grove J, Nielsen S, Zhong J, Bassendine MF, Drummer HE, Balfe P, et al. Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. J. Virol. 2008;82:12020-12029.

32. Keck Z-yong, Li SH, Xia J, von Hahn T, Balfe P, McKeating JA, et al. Mutations in hepatitis C virus E2 located outside the CD81 binding sites lead to escape from broadly neutralizing antibodies but compromise virus infectivity. J. Virol. 2009;83:6149-6160.

33. Gal-Tanamy M, Keck Z-Y, Yi M, McKeating JA, Patel AH, Foung SKH, et al. In vitro selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008;105:19450-19455.

34. Xu Z, Fan X, Xu Y, Di Bisceglie AM. Comparative analysis of nearly full-length hepatitis C virus quasispecies from patients experiencing viral breakthrough during antiviral therapy: clustered mutations in three functional genes, E2, NS2, and NS5a. J. Virol. 2008;82:9417-9424.

35. Cuevas JM, Gonzalez M, Torres-Puente M, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, et al. The role of positive selection in hepatitis C virus. Infect. Genet. Evol. 2009;9:860-866.

DISCUSSION

Les patients inclus dans notre étude nous ont permis de définir des réseaux minimaux d'acides aminés covariants dans E1/E2 capables de séparer les patients non-répondeurs (NR) des patients répondeurs (R ou RVS) au traitement antiviral de référence à base d'interféron-α pégylé et de ribavirine. De même, ils nous ont permis de retenir pour les analyses fonctionnelles des signatures moléculaires (SMs) dans les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC corrélées à la réponse virologique au traitement antiviral. Ces SMs étaient les suivantes : 219T (R, génotype 1a, E1), 431A (NR, génotype 1a, E2), 642V (NR, génotype 1a, E2) et 391V (NR, génotype 1b, E2).

Les analyses fonctionnelles effectuées sur le modèle *in vitro* des HCVpp avaient pour but d'étudier l'entrée virale et la neutralisation du VHC médiée par les anticorps, dépendantes de ces quatre acides aminés. La présence du résidu 431A augmentait le pouvoir infectieux des HCVpp, favorisait leur échappement aux NAc circulant dans le sérum de patients et augmentait leur interaction avec certains des corécepteurs cellulaires du VHC, c'est-à-dire la tétraspanine CD81 et le SR-BI. Le résidu 642V pouvait également faciliter, bien qu'à un plus faible degré que le résidu 431A, l'échappement des HCVpp à la neutralisation et augmentait l'entrée des HCVpp dans les cellules Huh7.5. Quant au résidu 219T, sa présence entrainait une diminution du pouvoir infectieux des HCVpp sur cellules Huh7.5.

La position 431 est proche d'un site de N-glycosylation localisé à la position 430 de E2 (Helle *et al.*, 2007). La plupart des sites de N-glycosylation sur les glycoprotéines E1 et E2 est conservée et les glycanes jouent un rôle majeur dans le repliement des glycoprotéines, dans l'entrée cellulaire du VHC et peuvent moduler l'activité neutralisante des Ac anti-VHC (Helle *et al.*, 2007). L'anticorps monoclonal (mAc) humain CBH-2 neutralise le VHC en interagissant avec un domaine conformationnel et immunogène de E2 nommé domaine B, comportant plusieurs épitopes chevauchants. La position 431 fait partie des positions constituant l'épitope conformationnel reconnu par le mAc CBH-2. Une simple substitution au niveau de la position 431 entraine un échappement d'un VHC de génotype 1a à la neutralisation médiée par CBH-2 (Keck *et al.*, 2008). La position 431 est également proche du pont disulfure Cys_{429}-Cys_{552} impliqué dans le repliement de la glycoprotéine E2 (Krey *et al.*, 2010) et est localisée dans le feuillet β du domaine DI de E2, lequel est exposé à la surface du virion et contient la plupart des déterminants majeurs d'attachement au corécepteur CD81 (Krey *et al.*, 2010).

La position 642 est localisée à proximité d'un site de N-glycosylation de E2 en position 645 et du pont disulfure Cys_{644}-Cys_{607} jouant un rôle dans le repliement tridimensionnel de la glycoprotéine virale (Krey *et al.*, 2010). La position 642 est localisée dans la partie du domaine DIII de E2 exposée à la surface du virion qui comporte également des déterminants d'attachement au corécepteur CD81 (Krey *et al.*, 2010). En outre, la mutation A642G inhibe l'attachement du mAc neutralisant CHB-2 (Keck *et al.*, 2008).

Pour finir, la position 219 dans le motif d'acides aminés $_{219}AIL_{221}$ de E1 du VHC de génotype 1a semble être cruciale pour l'entrée des HCVpp et des HCVcc (Maurin *et al.*, 2011).

Certaines données de la littérature sont en faveur du rôle de certains acides aminés dans l'entrée et/ou la neutralisation du VHC. Grove *et al.* ont décrit que la mutation ponctuelle G451R dans la glycoprotéine E2 du clone infectieux en culture cellulaire JFH-1 (génotype 2a) altérait la structure de la glycoprotéine, entraînait des modulations dans l'interaction du virus avec les corécepteurs CD81 et SR-BI, et augmentait la sensibilité aux anticorps neutralisants (Grove *et al.*, 2008). Zhong *et al.* ont de leur côté observé que la même mutation augmentait le pouvoir infectieux des HCVcc (Zhong *et al.*, 2006).

Keck *et al.* ont étudié les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 d'un VHC de génotype 1a issues d'un patient chroniquement infecté (patient H), en les exprimant à la surface de HCVpp. Un variant viral particulier montrait des capacités d'attachement réduites pour tout un panel de mAc anti-E2 neutralisants et pour le corécepteur CD81. En outre, il avait un potentiel infectieux diminué. Ces modulations dans les capacités d'attachement aux NAc et à CD81 ainsi que dans les niveaux d'infection du variant ont été attribuées à la présence de deux mutations dans la glycoprotéine E2 : S501N et V506A (Keck *et al.*, 2009).

Pour finir, Gal-Tanamy *et al.* ont mis en culture un clone infectieux chimérique du VHC portant les protéines structurales d'un VHC de génotype 1a en présence du mAc de souris AP33, lequel comporte une large activité de neutralisation croisée envers divers génotypes du VHC. Après plusieurs passages du clone infectieux chimérique en présence du mAc AP33, des variants capables de résister à la neutralisation médiée par AP33 émergeaient. Le phénotype d'échappement a été attribué à l'apparition de deux mutations sur E2 : N415Y et E655G (Gal-Tanamy *et al.*, 2008).

Les rôles cruciaux des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC dans le cycle viral et dans l'échappement à la réponse immunitaire suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle indirect dans l'efficacité du traitement anti-VHC. Les pressions de sélection agissant sur les glycoprotéines d'enveloppe virale, principalement dues aux pressions immunitaires et aux contraintes de

conservation nécessaires pour maintenir les structures et les fonctions virales, pourraient favoriser l'émergence de certaines souches virales capables d'échapper au traitement antiviral.

De plus, en utilisant une approche bio-informatique, nous avons observé que des réseaux minimaux d'acides aminés covariants dans E1/E2 peuvent séparer les patients NR des patients R en fonction du sous-type viral, et que trois des quatre positions correspondant aux SMs qui ont été fonctionnellement caractérisées apparaissaient dans ces réseaux minimaux.
Aurora *et al.* ont analysé la covariance des acides aminés sur la phase codante entière (Core à NS5B) du VHC, à partir des séquences pré-thérapeutiques de 94 patients chroniquement infectés par un VHC de génotype 1a ou 1b et ayant bénéficié d'un traitement antiviral de référence. Des positions d'acides aminés covariants étaient fréquentes et corrélées entre elles au sein des réseaux. De plus, ces positions différaient entre patients R et patients NR au traitement antiviral. En outre, parmi les 10 "nœuds" des réseaux de covariance que les auteurs ont retenu comme fortement liés à l'échec thérapeutique, 8 correspondaient à des acides aminés présents sur les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. La covariance génétique peut être indicative a). d'interactions fonctionnelles entre résidus covariants avec une interaction directe entre ces résidus, b). de changements allostériques compensatoires, et/ou c). d'interactions intermoléculaires avec d'autres composants cellulaires ou viraux. Les auteurs ont suggéré que certaines interactions hydrophobes pouvaient contribuer à l'échec de la bithérapie pégylée en stabilisant les complexes protéiques viraux (Aurora *et al.*, 2009).

Xu *et al.* ont effectué des analyses génétiques comparatives entre les quasi-espèces du VHC circulant chez deux patients ayant développé un échappement virologique à la bithérapie pégylée, lequel s'accompagnait de l'émergence d'un variant viral différent de ceux majoritairement rencontrés lors de l'initiation du traitement antiviral. Les régions du génome du VHC impliquées dans la variabilité des quasi-espèces étaient principalement localisées au niveau des gènes codant les protéines E2, NS2 et NS5A. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les variants du VHC au moment de l'échappement virologique correspondaient à un phénotype viral de résistance au traitement (Xu *et al.*, 2008).

De leur côté, Cuevas *et al.* ont émis l'hypothèse que le niveau de variabilité dans une population virale pourrait influencer la finalité du traitement anti-VHC (Cuevas *et al.*, 2009).

Pour terminer, nous pouvons supposer que le niveau global de variabilité virale, certains "points chauds" (comme des SMs) et certains acides aminés covariants dans les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC pourraient de concert avoir un impact sur l'efficacité du traitement antiviral de référence.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre objectif principal au cours de cette étude était d'étudier les caractéristiques moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et leur lien indirect potentiel avec la réponse au traitement antiviral de référence, la combinaison interféron-α pégylé et ribavirine. Pour ce faire, une cohorte de 92 patients chroniquement infectés par un VHC de génotype 1, dont le statut final de réponse au traitement par PEG IFN-α et ribavirine était connu, a été constituée.

Notre approche expérimentale portait sur plusieurs points :

a). la détermination de signatures moléculaires (SMs) liées à l'efficacité du traitement (réponse à long terme (R ou RVS) et non-réponse (NR)) en fonction du sous-type viral (1a ou 1b) à partir des séquences E1/E2 des souches pré-thérapeutiques des patients de la cohorte,

b). à partir de l'ensemble des séquences pré-thérapeutiques E1/E2 de la cohorte entière, la recherche de réseaux minimaux d'acides aminés covariants pour chaque sous-type viral, qui pourrait séparer le groupe des RVS de celui des NR,

c). par une approche phylogénétique, l'évaluation du regroupement des variants E1/E2 circulants au sein des quasi-espèces virales chez deux patients RVS (à la date pré-thérapeutique) et chez un patient NR (aux dates pré-thérapeutique et sous pression thérapeutique) choisis à titre d'exemple, et pour qui les points suivants ont été examinés : la détermination de la diversité des variants circulants au sein d'une même quasi-espèce appréciée par la distance génétique les séparant les uns des autres, et enfin l'homogénéité des SMs préalablement définies et liées à la réponse virologique au traitement au sein des variants de quasi-espèces pré-thérapeutiques ainsi que l'éventuel maintien des SMs dans les variants de quasi-espèces sous pression thérapeutique,

d). par des tests fonctionnels *in vitro* (modèle HCVpp) utilisant des souches de référence du VHC, l'évaluation de l'impact de certaines caractéristiques moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe – c'est-à-dire des SMs liées à la réponse, introduites dans ces souches – sur le pouvoir infectieux et/ou la neutralisation médiée par les NAc circulant dans le sérum de patients.

Bien que des interférences directes de certaines protéines virales, comme les glycoprotéines E1 et E2, avec le traitement antiviral ont pu être décrites (voir pour revue, Wohnsland *et al.* (Wohnsland *et al.*, 2007)), nos approches avaient quant à elles pour but de caractériser des mécanismes indirects conduisant à une résistance ou une sensibilité accrue au traitement par l'intermédiaire de certaines caractéristiques moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC.

Par les approches utilisées, nous avons réussi à identifier des SMs sur E1/E2 rattachées à un sous-type viral particulier du génotype 1 et liées à l'issue du traitement antiviral de référence. Des

réseaux minimaux d'acides aminés covariants dans E1/E2 étaient capables de séparer les RVS des NR. En outre, l'évaluation des SMs par des tests fonctionnels a permis de confirmer notre hypothèse de base suggérant que l'importance des glycoprotéines E1 et E2 du VHC dans le cycle viral et dans les réponses immunitaires de l'hôte pourrait avantager certains virus rendus plus infectieux à l'étape d'entrée dans les cellules cibles et/ou échappant mieux à l'immunité de l'hôte, favorisant ainsi l'échec thérapeutique. En effet, sur les quatre SMs évaluées en tests fonctionnels (431A (génotype 1a, NR, E2), 642V (génotype 1a, NR, E2), 219T (génotype 1a, R, E1) et 391V (génotype 1b, NR, E2)), deux SMs liées à la non-réponse (431A et 642V) engendraient d'une part une augmentation dans le pouvoir infectieux et d'autre part une réduction dans le potentiel de neutralisation médiée par les Ac, pour les HCVpp portant ces SMs. Un autre SM liée cette fois à la réponse (219T) engendrait une diminution du pouvoir infectieux des HCVpp portant cette signature. La dernière SM liée à la non-réponse (391V) n'a montré aucune différence dans le pouvoir infectieux et la neutralisation entre les HCVpp portant cette signature et celles ne la portant pas.

Une des perspectives de ce projet pourrait porter sur l'introduction de combinaisons de SMs et ou de paires d'acides aminés covariants dans des HCVpp pour évaluer l'impact de ces combinaisons sur le pouvoir infectieux et la neutralisation médiée par les Ac. En effet, une position unique dans E1/E2 pourrait ne pas suffire pour favoriser le pourvoir infectieux et/ou l'échappement à la neutralisation. En revanche, plusieurs acides aminés en combinaison pourraient agir de concert pour avantager certains virus sur le plan structural et ainsi favoriser leur entrée dans les cellules cibles et/ou promouvoir leur échappement aux NAc circulants.

Une perspective supplémentaire à ce travail pourrait être d'évaluer l'impact des SMs étudiées en système HCVpp dans le système des clones infectieux en culture cellulaire (HCVcc) exprimant les protéines structurales du VHC de génotype 1a ou 1b, afin de confirmer nos résultats sur un autre modèle d'étude du VHC *in vitro*. En outre, l'évaluation de combinaisons de SMs/paires d'acides aminés covariants dans le système HCVcc pourrait également être réalisée. Ce système d'étude *in vitro* permet d'étudier le cycle viral complet du VHC. Etant donné l'importance des glycoprotéines E1 et E2 dans l'attachement/l'entrée virale mais aussi dans l'assemblage et la libération hors de la cellule des virions néoformés, cette approche pourrait permettre d'évaluer l'impact des caractéristiques moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe du VHC sur ces étapes finales du cycle viral.

Pour finir, les données que nous avons accumulées au cours de ces travaux de thèse supposent un rôle indirect des glycoprotéines d'enveloppe du VHC sur l'efficacité du traitement antiviral, au moins au niveau de leurs implications dans l'attachement/l'entrée du virus et l'échappement à la neutralisation médiée par les Ac. Ainsi, nos résultats plaident en faveur du

développement de nouvelles molécules antivirales en vue d'améliorer le succès de réponse au traitement actuel chez un maximum de patients, telles que des inhibiteurs d'entrée qui cibleraient préférentiellement les corécepteurs cellulaires du VHC et/ou les glycoprotéines d'enveloppe virale (Ac monoclonaux anti-récepteurs et/ou Ac monoclonaux anti-E1E2 à haute activité neutralisante croisée). Le développement de ces outils thérapeutiques tirera un bénéfice des résultats obtenus par nos travaux et par des groupes explorant les protéines de surface du VHC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aghemo, A., Rumi, M. G. & Colombo, M. (2010). Pegylated interferons alpha2a and alpha2b in the treatment of chronic hepatitis C. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 485-494.

Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K. & Miyano, M. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure* 7, 1417-1426.

Alter, H. J. & Houghton, M. (2000). Clinical Medical Research Award. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nat Med* 6, 1082-1086.

Alter, H. J., Purcell, R. H., Holland, P. V. & Popper, H. (1978). Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1, 459-463.

Alter, M. J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13, 2436-2441.

André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Bréchot, C., Paranhos-Baccalà, G. & Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76, 6919-6928.

Anthony, D. D., Yonkers, N. L., Post, A. B., Asaad, R., Heinzel, F. P., Lederman, M. M., Lehmann, P. V. & Valdez, H. (2004). Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol* 172, 4907-4916.

Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. & Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 4, e1000035.

Asselah, T., Bièche, I., Sabbagh, A., Bedossa, P., Moreau, R., Valla, D., Vidaud, M. & Marcellin, P. (2009). Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut* 58, 846-858.

Asselah, T., Estrabaud, E., Bieche, I., Lapalus, M., De Muynck, S., Vidaud, M., Saadoun, D., Soumelis, V. & Marcellin, P. (2010). Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver Int* 30, 1259-1269.

Auffermann-Gretzinger, S., Keeffe, E. B. & Levy, S. (2001). Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 97, 3171-3176.

Aurora, R., Donlin, M. J., Cannon, N. A. & Tavis, J. E. (2009). Genome-wide hepatitis C virus amino acid covariance networks can predict response to antiviral therapy in humans. *J Clin Invest* 119, 225-236.

Backus, L. I., Boothroyd, D. B., Phillips, B. R. & Mole, L. A. (2007). Predictors of response of US veterans to treatment for the hepatitis C virus. *Hepatology* 46, 37-47.

Bain, C., Parroche, P., Lavergne, J. P., Duverger, B., Vieux, C., Dubois, V., Komurian-Pradel, F., Trépo, C., Gebuhrer, L., & other authors. (2004). Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* 78, 10460-10469.

Bartenschlager, R. (2004). Unexpected host range of hepatitis C virus replicons. *Hepatology* 39, 835-838.

Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H., & other authors. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278, 41003-41012.

Barth, H., Ulsenheimer, A., Pape, G. R., Diepolder, H. M., Hoffmann, M., Neumann-Haefelin, C., Thimme, R., Henneke, P., Klein, R., & other authors. (2005). Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* 105, 3605-3614.

Barth, H., Liang, T. J. & Baumert, T. F. (2006). Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology* 44, 527-535.

Barth, H., Robinet, E., Liang, T. J. & Baumert, T. F. (2008). Mouse models for the study of HCV infection and virus-host interactions. *J Hepatol* 49, 134-142.

Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197, 633-642.

Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.-M., Lavillette, D. & Cosset, F.-L. (2005). An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* 79, 8217-8229.

Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T. & Liang, T. J. (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 72, 3827-3836.

Baumert, T. F., Vergalla, J., Satoi, J., Thomson, M., Lechmann, M., Herion, D., Greenberg, H. B., Ito, S. & Liang, T. J. (1999). Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 117, 1397-1407.

Baumert, T. F., Wellnitz, S., Aono, S., Satoi, J., Herion, D., Tilman Gerlach, J., Pape, G. R., Lau, J. Y., Hoofnagle, J. H., & other authors. (2000). Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 32, 610-617.

Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Barreiro, O., Maldonado-Rodríguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., López-Cabrera, M. & Majano, P. L. (2008). Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 48, 1044-1053.

Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernández, A., Aldabe, R., & other authors. (2009). The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* 83, 8012-8020.

Benga, W. J. A., Krieger, S. E., Dimitrova, M., Zeisel, M. B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., & other authors. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51, 43-53.

Birerdinc, A. & Younossi, Z. M. (2010). Emerging therapies for hepatitis C virus. *Expert Opin Emerg Drugs* 15, 535-544.

Blackard, J. T., Hiasa, Y., Smeaton, L., Jamieson, D. J., Rodriguez, I., Mayer, K. H. & Chung, R. T. (2007). Compartmentalization of hepatitis C virus (HCV) during HCV/HIV coinfection. *J Infect Dis* 195, 1765-1773.

Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80, 6964-6972.

Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F. & Tough, D. F. (2001). Type i interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461-470.

Boo, I., Fischer, A. E., Johnson, D., Chin, R., Giourouki, M., Bharadwaj, M., Bowden, S., Torresi, J. & Drummer, H. (2007). Neutralizing antibodies in patients with chronic hepatitis C infection treated with (Peg)-interferon/ribavirin. *J Clin Virol* 39, 288-294.

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

Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., Penin, F. & McLauchlan, J. (2006). Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 281, 22236-22247.

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

Brown, R. J. P., Tarr, A. W., McClure, C. P., Juttla, V. S., Tagiuri, N., Irving, W. L. & Ball, J. K. (2007). Cross-genotype characterization of genetic diversity and molecular adaptation in hepatitis C virus envelope glycoprotein genes. *J Gen Virol* 88, 458-469.

Bukh, J., Purcell, R. H. & Miller, R. H. (1992). Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4942-4946.

Bukh, J., Purcell, R. H. & Miller, R. H. (1994). Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8239-8243.

Bukh, J. (2004). A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 39, 1469-1475.

Catanese, M. T., Graziani, R., von Hahn, T., Moreau, M., Huby, T., Paonessa, G., Santini, C., Luzzago, A., Rice, C. M., & other authors. (2007). High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *J Virol* 81, 8063-8071.

Caussin-Schwemling, C., Schmitt, C. & Stoll-Keller, F. (2001). Study of the infection of human blood derived monocyte/macrophages with hepatitis C virus in vitro. *J Med Virol* 65, 14-22.

CDC. (1998). Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 47, 1-39.

Chambers, T. J., Fan, X., Droll, D. A., Hembrador, E., Slater, T., Nickells, M. W., Dustin, L. B. & Dibisceglie, A. M. (2005). Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 79, 3071-3083.

Chevaliez, S., Brillet, R., Lázaro, E., Hézode, C. & Pawlotsky, J.-M. (2007). Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. *J Virol* 81, 7732-7741.

Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.

Cocquerel, L., Voisset, C. & Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* 87, 1075-1084.

Codran, A., Royer, C., Jaeck, D., Bastien-Valle, M., Baumert, T. F., Kieny, M. P., Pereira, C. A. & Martin, J.-P. (2006). Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Gen Virol* 87, 2583-2593.

Coller, K. E., Berger, K. L., Heaton, N. S., Cooper, J. D., Yoon, R. & Randall, G. (2009). RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* 5, e1000702.

Connelly, M. A. & Williams, D. L. (2004). Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol* 15, 287-295.

Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y., Hong, Z., Andino, R. & Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 6, 1375-1379.

Cuevas, J. M., Gonzalez, M., Torres-Puente, M., Jiménez-Hernández, N., Bracho, M. A., García-Robles, I., González-Candelas, F. & Moya, A. (2009). The role of positive selection in hepatitis C virus. *Infect Genet Evol* 9, 860-866.

Cukierman, L., Meertens, L., Bertaux, C., Kajumo, F. & Dragic, T. (2009). Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts. *J Virol* 83, 5477-5484.

Davis, G. L., Esteban-Mur, R., Rustgi, V., Hoefs, J., Gordon, S. C., Trepo, C., Shiffman, M. L., Zeuzem, S., Craxi, A., & other authors. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339, 1493-1499.

Delandre, C., Penabaz, T. R., Passarelli, A. L., Chapes, S. K. & Clem, R. J. (2009). Mutation of juxtamembrane cysteines in the tetraspanin CD81 affects palmitoylation and alters interaction with other proteins at the cell surface. *Exp Cell Res* 315, 1953-1963.

Dreux, M., Boson, B., Ricard-Blum, S., Molle, J., Lavillette, D., Bartosch, B., Pécheur, E.-I. & Cosset, F.-L. (2007). The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 282, 32357-32369.

Ducoulombier, D., Roque-Afonso, A.-M., Di Liberto, G., Penin, F., Kara, R., Richard, Y., Dussaix, E. & Féray, C. (2004). Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* 39, 817-825.

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76, 5974-5984.

Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F. & Sato, C. (1995). Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 96, 224-230.

Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatziioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801-805.

Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 292, 767-770.

Feld, J. J., Nanda, S., Huang, Y., Chen, W., Cam, M., Pusek, S. N., Schweigler, L. M., Theodore, D., Zacks, S. L., & other authors. (2007). Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* 46, 1548-1563.

Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S. & McKeating, J. A. (1999). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 73, 6235-6244.

Fofana, I., Krieger, S. E., Grunert, F., Glauben, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C., & other authors. (2010). Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* 139, 953-964, 964.e1-4.

Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr, Ikeda, M., Lemon, S. M. & Gale, M., Jr. (2003). Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300, 1145-1148.

Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr, Loo, Y.-M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P. M., Yoneyama, M., Fujita, T., & other authors. (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2986-2991.

Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E. S., & other authors. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 355, 887-891.

Fraser, C. S. & Doudna, J. A. (2007). Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 5, 29-38.

Frey, S. E., Houghton, M., Coates, S., Abrignani, S., Chien, D., Rosa, D., Pileri, P., Ray, R., Di Bisceglie, A. M., & other authors. (2010). Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* 28, 6367-6373.

Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. & Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75, 12047-12057.

Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Gonçales, F. L., Jr, Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., & other authors. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347, 975-982.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141, 1539-1550.

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

Galossi, A., Guarisco, R., Bellis, L. & Puoti, C. (2007). Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointestin Liver Dis* 16, 65-73.

Gal-Tanamy, M., Keck, Z.-Y., Yi, M., McKeating, J. A., Patel, A. H., Foung, S. K. H. & Lemon, S. M. (2008). In vitro selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19450-19455.

Gao, D.-Y., Zhang, X.-X., Hou, G., Jin, G.-D., Deng, Q., Kong, X.-F., Zhang, D.-H., Ling, Y., Yu, D.-M., & other authors. (2008). Assessment of specific antibodies to F protein in serum samples from Chinese hepatitis C patients treated with interferon plus ribavarin. *J Clin Microbiol* 46, 3746-3751.

Gaudy, C., Moreau, A., Veillon, P., Temoin, S., Lunel, F. & Goudeau, A. (2003). Significance of pretreatment analysis of hepatitis C virus genotype 1b hypervariable region 1 sequences to predict antiviral outcome. *J Clin Microbiol* 41, 3615-3622.

Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., Heinzen, E. L., Qiu, P., Bertelsen, A. H., & other authors. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461, 399-401.

Ghany, M. G., Strader, D. B., Thomas, D. L. & Seeff, L. B. (2009). Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49, 1335-1374.

Gottwein, J. M., Scheel, T. K. H., Jensen, T. B., Lademann, J. B., Prentoe, J. C., Knudsen, M. L., Hoegh, A. M. & Bukh, J. (2009). Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* 49, 364-377.

Graci, J. D. & Cameron, C. E. (2006). Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* 16, 37-48.

Griffin, S., Clarke, D., McCormick, C., Rowlands, D. & Harris, M. (2005). Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *J Virol* 79, 15525-15536.

Griffin, S. D. C., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. G. & Rowlands, D. J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535, 34-38.

Grove, J., Nielsen, S., Zhong, J., Bassendine, M. F., Drummer, H. E., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2008). Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 82, 12020-12029.

Habersetzer, F., Honnet, G., Bain, C., Maynard-Muet, M., Leroy, V., Zarski, J.-P., Feray, C., Baumert, T. F., Bronowicki, J.-P., & other authors. (2011). A poxvirus vaccine is safe, induces T-cell responses, and decreases viral load in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 141, 890-899.e1-4.

Hadziyannis, S. J., Sette, H., Jr, Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H., Jr, Bernstein, D., & other authors. (2004). Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140, 346-355.

von Hahn, T., Lindenbach, B. D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2006). Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology* 43, 932-942.

von Hahn, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehermann, B., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2007). Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 132, 667-678.

Haid, S., Pietschmann, T. & Pécheur, E.-I. (2009). Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* 284, 17657-17667.

Hamed, M. R. B., Tarr, A. W., McClure, C. P., Ball, J. K., Hickling, T. P. & Irving, W. L. (2008). Association of antibodies to hepatitis C virus glycoproteins 1 and 2 (anti-E1E2) with HCV disease. *J Viral Hepat* 15, 339-345.

Harris, H. J., Farquhar, M. J., Mee, C. J., Davis, C., Reynolds, G. M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., & other authors. (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 82, 5007-5020.

Harris, H. J., Davis, C., Mullins, J. G. L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M. J., Mee, C. J., McCaffrey, K., Young, S., & other authors. (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 285, 21092-21102.

Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z.-Y., Foung, S., Penin, F., Dubuisson, J. & Voisset, C. (2007). The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol* 81, 8101-8111.

Hofmann, W. P., Sarrazin, C., Kronenberger, B., Schönberger, B., Bruch, K. & Zeuzem, S. (2003). Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients. *J Infect Dis* 187, 982-987.

Hofmann, W. P., Zeuzem, S. & Sarrazin, C. (2005). Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *J Clin Virol* 32, 86-91.

Hofmann, W. P., Polta, A., Herrmann, E., Mihm, U., Kronenberger, B., Sonntag, T., Lohmann, V., Schönberger, B., Zeuzem, S. & Sarrazin, C. (2007). Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* 132, 921-930.

Hoofnagle, J. H. (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36, S21-29.

Houghton, M. (2009). Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int* 29 Suppl 1, 82-88.

Houghton, M. (2011). Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunol Rev* 239, 99-108.

Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7271-7276.

INVS. (2007). Prévalence des hépatites B et C en France en 2004.

Van Itallie, C. M. & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68, 403-429.

Jensen, D. M., Wedemeyer, H., Herring Jr., R., Ferenci, P., Ma, M.-M., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Bzowej, N., Pockros, P., & other authors. (2010). High rates of early viral response, promising safety profile and lack of resistance-related breakthrough in HCV GT 1/4 patients treated with RG7128 plus PEGIFN alfa-2a (40 KD)/RBV: planned week 12 interim analysis from the PROPEL study. *Hepatology* 52, 360A.

Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577-1581.

Joyce, C. M. & Steitz, T. A. (1995). Polymerase structures and function: variations on a theme? *J Bacteriol* 177, 6321-6329.

Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S. & Kohara, M. (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75 (Pt 7), 1755-1760.

Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Tatsumi, T., Kuzushita, N., Ito, A., Sasaki, Y., Kasahara, A. & Hori, M. (1999). Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 162, 5584-5591.

Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T. & Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* 64, 334-339.

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

Keck, Z.-Y., Olson, O., Gal-Tanamy, M., Xia, J., Patel, A. H., Dreux, M., Cosset, F.-L., Lemon, S. M. & Foung, S. K. H. (2008). A point mutation leading to hepatitis C virus escape from neutralization by a monoclonal antibody to a conserved conformational epitope. *J Virol* 82, 6067-6072.

Keck, Z.-Y., Li, S. H., Xia, J., von Hahn, T., Balfe, P., McKeating, J. A., Witteveldt, J., Patel, A. H., Alter, H., & other authors. (2009). Mutations in hepatitis C virus E2 located outside the CD81 binding sites lead to escape from broadly neutralizing antibodies but compromise virus infectivity. *J Virol* 83, 6149-6160.

Kobayashi, M., Bennett, M. C., Bercot, T. & Singh, I. R. (2006). Functional analysis of hepatitis C virus envelope proteins, using a cell-cell fusion assay. *J Virol* 80, 1817-1825.

Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664.

Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80, 5308-5320.

Krey, T., d' Alayer, J., Kikuti, C. M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D. X., Tawar, R. G., Baron, B., & other authors. (2010). The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* 6, e1000762.

Krieger, M. (2001). Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 108, 793-797.

Krieger, S. E., Zeisel, M. B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H. J., Schnober, E. K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., & other authors. (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 51, 1144-1157.

Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Kauppinen, S. & Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198-201.

Laskus, T., Radkowski, M., Wang, L. F., Vargas, H. & Rakela, J. (1998). The presence of active hepatitis C virus replication in lymphoid tissue in patients coinfected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 178, 1189-1192.

Lavanchy, D. (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 17, 107-115.

Lawitz, E., Rodriguez-Torres, M., Rustgi, V. K., Hassanein, T., Rahimy, M. H., Crowley, C. A., Freddo, J. L., Muir, A. J. & McHutchison, J. G. (2010). Safety and antiviral activity of ANA598 in combination with pegylated interferon alfa-2a plus ribavirin in treatment-naive genotype-1 chronic HCV patients (abstract - AASLD 2010). *Hepatology* 52, 334A.

Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A. W., Stamataki, Z., Gastaminza, P., Chisari, F. V., Jones, I. M., & other authors. (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14, 25-27.

Legrand-Abravanel, F., Colson, P., Leguillou-Guillemette, H., Alric, L., Ravaux, I., Lunel-Fabiani, F., Bouviers-Alias, M., Trimoulet, P., Chaix, M. L., & other authors. (2009). Influence of the HCV subtype on the virological response to pegylated interferon and ribavirin therapy. *J Med Virol* 81, 2029-2035.

Di Liberto, G., Roque-Afonso, A.-M., Kara, R., Ducoulombier, D., Fallot, G., Samuel, D. & Feray, C. (2006). Clinical and therapeutic implications of hepatitis C virus compartmentalization. *Gastroenterology* 131, 76-84.

Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wölk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., & other authors. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623-626.

Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A. J., McKeating, J. A., Lanford, R. E., Feinstone, S. M., Major, M. E., & other authors. (2006). Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3805-3809.

Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B. & Wang, T. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83, 2011-2014.

Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.

Lohmann, V., Körner, F., Dobierzewska, A. & Bartenschlager, R. (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 75, 1437-1449.

Lukavsky, P. J. (2009). Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res* 139, 166-171.

Lundin, M., Monné, M., Widell, A., Von Heijne, G. & Persson, M. A. A. (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 77, 5428-5438.

Lutchman, G., Danehower, S., Song, B.-C., Liang, T. J., Hoofnagle, J. H., Thomson, M. & Ghany, M. G. (2007). Mutation rate of the hepatitis C virus NS5B in patients undergoing treatment with ribavirin monotherapy. *Gastroenterology* 132, 1757-1766.

Maggi, F., Fornai, C., Morrica, A., Vatteroni, M. L., Giorgi, M., Marchi, S., Ciccorossi, P., Bendinelli, M. & Pistello, M. (1999). Divergent evolution of hepatitis C virus in liver and peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Med Virol* 57, 57-63.

Maillard, P., Huby, T., Andréo, U., Moreau, M., Chapman, J. & Budkowska, A. (2006). The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J* 20, 735-737.

Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M. & Albrecht, J. K. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965.

Marsh, M. & Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. *Cell* 124, 729-740.

Martinot-Peignoux, M., Maylin, S., Moucari, R., Ripault, M.-P., Boyer, N., Cardoso, A.-C., Giuily, N., Castelnau, C., Pouteau, M., & other authors. (2009). Virological response at 4 weeks to predict outcome of hepatitis C treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther (Lond)* 14, 501-511.

Martins, T., Narciso-Schiavon, J. L. & Schiavon, L. de L. (2011). [Epidemiology of hepatitis C virus infection]. *Rev Assoc Med Bras* 57, 107-112.

Martin, F., Roth, D. M., Jans, D. A., Pouton, C. W., Partridge, L. J., Monk, P. N. & Moseley, G. W. (2005). Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology? *J Virol* 79, 10839-10851.

Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M. & Yi, M. (2008). NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* 82, 7624-7639.

Maurin, G., Fresquet, J., Granio, O., Wychowski, C., Cosset, F.-L. & Lavillette, D. (2011). Identification of interactions in the E1E2 heterodimer of hepatitis C virus important for cell entry. *J Biol Chem* 286, 23865-23876.

McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Schiff, E. R., Shiffman, M. L., Lee, W. M., Rustgi, V. K., Goodman, Z. D., Ling, M. H., Cort, S. & Albrecht, J. K. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339, 1485-1492.

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

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

Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F.-L. & Dragic, T. (2008). The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 82, 3555-3560.

Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., & other authors. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7, 927-933.

Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H. & Leroux-Roels, G. (2008). Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 48, 1761-1768.

Meunier, J.-C., Russell, R. S., Goossens, V., Priem, S., Walter, H., Depla, E., Union, A., Faulk, K. N., Bukh, J., & other authors. (2008). Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the e1 glycoprotein of hepatitis C virus. *J Virol* 82, 966-973.

Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997). Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* 78 (Pt 9), 2299-2306.

Mihm, U., Herrmann, E., Sarrazin, C. & Zeuzem, S. (2006). Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 23, 1043-1054.

Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9, 1089-1097.

Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lohmann, V. (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78, 13278-13284.

Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5, 453-463.

Muir, A. J., Shiffman, M. L., Zaman, A., Yoffe, B., de la Torre, A., Flamm, S., Gordon, S. C., Marotta, P., Vierling, J. M., & other authors. (2010). Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52, 822-832.

Murphy, D., Chamberland, J., Dandavino, R. & Sablon, E. (2007). A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. *Hepatology* 46, 623A.

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

Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J. & Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282, 103-107.

Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Davidian, M., Wiley, T. E., Mika, B. P., Perelson, A. S. & Layden, T. J. (2000). Differences in viral dynamics between genotypes 1 and 2 of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 182, 28-35.

Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H. & Purcell, R. H. (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3392-3396.

Owsianka, A., Tarr, A. W., Juttla, V. S., Lavillette, D., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Ball, J. K. & Patel, A. H. (2005). Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 79, 11095-11104.

Owsianka, A. M., Timms, J. M., Tarr, A. W., Brown, R. J. P., Hickling, T. P., Szwejk, A., Bienkowska-Szewczyk, K., Thomson, B. J., Patel, A. H. & Ball, J. K. (2006). Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol* 80, 8695-8704.

Pavlović, D., Neville, D. C. A., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B. & Zitzmann, N. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6104-6108.

Pawlotsky, J.-M. (2003). Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 7, 45-66.

Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P. O., Deléage, G. & Pawlotsky, J. M. (2001). Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol* 75, 5703-5710.

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D. & Pawlotsky, J.-M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39, 5-19.

Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Patel, A. H., Meisel, H., Baumert, J., & other authors. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6025-6030.

Pfeiffer, J. K. & Kirkegaard, K. (2005). Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J Virol* 79, 2346-2355.

Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. & Bartenschlager, R. (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 76, 4008-4021.

Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., & other authors. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7408-7413.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., & other authors. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938-941.

Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. & Rice, C. M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882-886.

Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R. W., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77, 4070-4080.

Pol, S., Everson, G., Ghalib, R., Rustgi, V., Martorell, C., Tatum, H. A., Lim, J., Hezode, C., Diva, U., & other authors. (2010). Once-daily NS5A inhibitor (BMS-790052) plus peginterferon-alpha-2a and ribavirin produces high rates of extended rapid virologic response in treatment-naive HCV-genotype 1 subjects: phase 2a trial. *J Hepatol* 52, S462.

Ramadori, G. & Meier, V. (2001). Hepatitis C virus infection: 10 years after the discovery of the virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13, 465-471.

Reynolds, G. M., Harris, H. J., Jennings, A., Hu, K., Grove, J., Lalor, P. F., Adams, D. H., Balfe, P., Hübscher, S. G. & McKeating, J. A. (2008). Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* 47, 418-427.

Roque Afonso, A. M., Jiang, J., Penin, F., Tareau, C., Samuel, D., Petit, M. A., Bismuth, H., Dussaix, E. & Féray, C. (1999). Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol* 73, 9213-9221.

Royer, C., Steffan, A.-M., Navas, M.-C., Fuchs, A., Jaeck, D. & Stoll-Keller, F. (2003). A study of susceptibility of primary human Kupffer cells to hepatitis C virus. *J Hepatol* 38, 250-256.

Roy, K., Hay, G., Andragetti, R., Taylor, A., Goldberg, D. & Wiessing, L. (2002). Monitoring hepatitis C virus infection among injecting drug users in the European Union: a review of the literature. *Epidemiol Infect* 129, 577-585.

Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11646-11651.

Sarrazin, C., Mihm, U., Herrmann, E., Welsch, C., Albrecht, M., Sarrazin, U., Traver, S., Lengauer, T. & Zeuzem, S. (2005). Clinical significance of in vitro replication-enhancing mutations of the hepatitis C virus (HCV) replicon in patients with chronic HCV infection. *J Infect Dis* 192, 1710-1719.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21, 5017-5025.

Schiano, T. D., Charlton, M., Younossi, Z., Galun, E., Pruett, T., Tur-Kaspa, R., Eren, R., Dagan, S., Graham, N., & other authors. (2006). Monoclonal antibody HCV-AbXTL68 in patients undergoing liver transplantation for HCV: results of a phase 2 randomized study. *Liver Transpl* 12, 1381-1389.

Schramm, F., Soulier, E., Royer, C., Weitten, T., Fafi-Kremer, S., Brignon, N., Meyer, N., Ellero, B., Woehl-Jaegle, M.-L., & other authors. (2008). Frequent compartmentalization of hepatitis C virus with leukocyte-related amino acids in the setting of liver transplantation. *J Infect Dis* 198, 1656-1666.

Schuster, C., Isel, C., Imbert, I., Ehresmann, C., Marquet, R. & Kieny, M. P. (2002). Secondary structure of the 3' terminus of hepatitis C virus minus-strand RNA. *J Virol* 76, 8058-8068.

Schwarz, A. K., Grove, J., Hu, K., Mee, C. J., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2009). Hepatoma cell density promotes claudin-1 and scavenger receptor BI expression and hepatitis C virus internalization. *J Virol* 83, 12407-12414.

Seeff, L. B. (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36, S35-46.

Sidwell, R. W., Huffman, J. H., Khare, G. P., Allen, L. B., Witkowski, J. T. & Robins, R. K. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177, 705-706.

Simmonds, P. (1999). Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 31 Suppl 1, 54-60.

Smith, A. E. & Helenius, A. (2004). How viruses enter animal cells. *Science* 304, 237-242.

Smith, R. M., Walton, C. M., Wu, C. H. & Wu, G. Y. (2002). Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J Virol* 76, 9563-9574.

Söllner, T. H. (2004). Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 16, 429-435.

Stamataki, Z., Shannon-Lowe, C., Shaw, J., Mutimer, D., Rickinson, A. B., Gordon, J., Adams, D. H., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2009). Hepatitis C virus association with peripheral blood B lymphocytes potentiates viral infection of liver-derived hepatoma cells. *Blood* 113, 585-593.

Steinmann, D., Barth, H., Gissler, B., Schürmann, P., Adah, M. I., Gerlach, J. T., Pape, G. R., Depla, E., Jacobs, D., & other authors. (2004). Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *J Virol* 78, 9030-9040.

Syder, A. J., Lee, H., Zeisel, M. B., Grove, J., Soulier, E., Macdonald, J., Chow, S., Chang, J., Baumert, T. F., & other authors. (2011). Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol* 54, 48-55.

Sy, T. & Jamal, M. M. (2006). Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 3, 41-46.

Tai, A. W. & Chung, R. T. (2009). Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol* 50, 412-420.

Tarr, A. W., Owsianka, A. M., Timms, J. M., McClure, C. P., Brown, R. J. P., Hickling, T. P., Pietschmann, T., Bartenschlager, R., Patel, A. H. & Ball, J. K. (2006). Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology* 43, 592-601.

Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N. & Lai, M. M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285, 107-110.

Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 279, 48576-48587.

Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435, 374-379.

Timpe, J. M., Stamataki, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G. L., & other authors. (2008). Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 47, 17-24.

Torres-Puente, M., Cuevas, J. M., Jiménez-Hernández, N., Bracho, M. A., García-Robles, I., Wrobel, B., Carnicer, F., del Olmo, J., Ortega, E., & other authors. (2008). Using evolutionary tools to refine the new hypervariable region 3 within the envelope 2 protein of hepatitis C virus. *Infect Genet Evol* 8, 74-82.

Triyatni, M., Saunier, B., Maruvada, P., Davis, A. R., Ulianich, L., Heller, T., Patel, A., Kohn, L. D. & Liang, T. J. (2002). Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J Virol* 76, 9335-9344.

Troesch, M., Meunier, I., Lapierre, P., Lapointe, N., Alvarez, F., Boucher, M. & Soudeyns, H. (2006). Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352, 357-367.

Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. (1999). Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 11, 628-633.

Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Libbrecht, L., Roskams, T., De Vos, R. & Leroux-Roels, G. (2007). Ultra-rapid cardiotoxicity of the hepatitis C virus protease inhibitor BILN 2061 in the urokinase-type plasminogen activator mouse. *Gastroenterology* 133, 1144-1155.

Vermehren, J. & Sarrazin, C. (2011). New HCV therapies on the horizon. *Clin Microbiol Infect* 17, 122-134.

Voisset, C. & Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell* 96, 413-420.

Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J. & Vu-Dac, N. (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* 280, 7793-7799.

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., & other authors. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11, 791-796.

Weigand, K., Stremmel, W. & Encke, J. (2007). Treatment of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13, 1897-1905.

Welbourn, S., Green, R., Gamache, I., Dandache, S., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Meerovitch, K. & Pause, A. (2005). Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. *J Biol Chem* 280, 29604-29611.

Wellnitz, S., Klumpp, B., Barth, H., Ito, S., Depla, E., Dubuisson, J., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2002). Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *J Virol* 76, 1181-1193.

Witkowski, J. T., Robins, R. K., Sidwell, R. W. & Simon, L. N. (1972). Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1- -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides. *J Med Chem* 15, 1150-1154.

Wohnsland, A., Hofmann, W. P. & Sarrazin, C. (2007). Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 20, 23-38.

Wolf, M., Dimitrova, M., Baumert, T. F. & Schuster, C. (2008). The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Res* 36, 3054-3064.

Wölk, B., Sansonno, D., Kräusslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 74, 2293-2304.

Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J. & Ou, J. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 20, 3840-3848.

Xu, Z., Choi, J., Lu, W. & Ou, J.-hsiung. (2003). Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* 77, 1578-1583.

Xu, Z., Fan, X., Xu, Y. & Di Bisceglie, A. M. (2008). Comparative analysis of nearly full-length hepatitis C virus quasispecies from patients experiencing viral breakthrough during antiviral therapy: clustered mutations in three functional genes, E2, NS2, and NS5a. *J Virol* 82, 9417-9424.

Yagnik, A. T., Lahm, A., Meola, A., Roccasecca, R. M., Ercole, B. B., Nicosia, A. & Tramontano, A. (2000). A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* 40, 355-366.

Yamada, E., Montoya, M., Schuettler, C. G., Hickling, T. P., Tarr, A. W., Vitelli, A., Dubuisson, J., Patel, A. H., Ball, J. K. & Borrow, P. (2005). Analysis of the binding of hepatitis C virus genotype 1a and 1b E2 glycoproteins to peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Gen Virol* 86, 2507-2512.

Young, K.-C., Lindsay, K. L., Lee, K.-J., Liu, W.-C., He, J.-W., Milstein, S. L. & Lai, M. M. C. (2003). Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* 38, 869-878.

Zein, N. N. (2000). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13, 223-235.

Zein, N. N. (2003). The epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Cleve Clin J Med* 70 Suppl 4, S2-6.

Zeisel, M. B., Koutsoudakis, G., Schnober, E. K., Haberstroh, A., Blum, H. E., Cosset, F.-L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoel, M., & other authors. (2007a). Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46, 1722-1731.

Zeisel, M. B., Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Barth, H., Stoll-Keller, F., Doffoel, M. & Baumert, T.-F. (2007b). Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13, 4824-4830.

Zeisel, M. B., Cosset, F.-L. & Baumert, T. F. (2008). Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 48, 299-307.

Zeisel, M. B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S. & Baumert, T. F. (2011). Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol* 54, 566-576.

Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 78, 1448-1455.

Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M. & Deng, H. (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81, 12465-12471.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. & Chisari, F. V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9294-9299.

Zhong, J., Gastaminza, P., Chung, J., Stamataki, Z., Isogawa, M., Cheng, G., McKeating, J. A. & Chisari, F. V. (2006). Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *J Virol* 80, 11082-11093.

ANNEXES

MATERIELS & METHODES

I. Constitution de la cohorte

Cette étude multicentrique repose sur une collecte de souches VHC circulant dans différentes régions de France, effectuée auprès des CHU de Strasbourg, Tours, Bordeaux, Toulouse, Clermont-Ferrand, Brest et trois centres en région Île-de-France : Bobigny (Hôpital Avicenne), Villejuif (Hôpital Paul-Brousse) et Paris (Hôpital Pitié-Salpêtrière). L'effectif de la cohorte avait été estimé à environ 100 patients chroniquement infectés par un VHC de génotype 1 et inclus avant le début d'un traitement antiviral de référence par PEG IFN-α et ribavirine. Cette évaluation a été réalisée en concertation avec des méthodologistes, qui ont estimé que le travail devait être effectué sur une cohorte de taille comparable à celle qu'avait utilisée Aurora *et al.*[§] (Aurora *et al.*, 2009).

Les critères d'inclusion pour chaque patient étaient les suivants :

- Adulte (âgé de 18 à 75 ans)
- Infection chronique par un VHC de génotype 1 (ARN VHC positif)
- Devant débuter un traitement de référence par PEG IFN-α et ribavirine

Les critères de non-inclusion pour chaque patient étaient les suivants :

- Co-infection VHC/VIH ou VHB
- Infection chronique par un VHC de génotype non-1
- Traitement par une combinaison antivirale autre que la bithérapie pégylée de référence
- Ayant subi une transplantation hépatique
- Femme enceinte

[§] *Les travaux d'Aurora et al. portaient sur la détermination de réseaux de covariance dans les séquences du génome entier de 94 souches VHC de génotype 1 (sous-types 1a et 1b) collectées avant l'initiation d'un traitement antiviral par bithérapie pégylée de référence chez des patients chroniquement infectés. En déterminant ces réseaux de covariance en fonction du sous-type et de la réponse virologique à long terme connue chez ces patients, les auteurs ont conclu que la détermination de tels réseaux pouvait constituer un outil de prédiction thérapeutique pour anticiper la réponse à long terme d'un patient qui subirait une bithérapie pégylée (Aurora et al., 2009).*

La réponse virologique au traitement a été évaluée en quantifiant l'ARN VHC sérique par qRT-PCR en temps réel. La technique utilisée et le seuil de détection de celle-ci étaient à chaque fois précisés. Idéalement, les virémies étaient mesurées sur des échantillons de sérum prélevés au moment des bilans prévus lors du suivi des patients traités : avant traitement (S0), à la semaine 4 (S4), à la semaine 12 (S12), à la semaine 24 (S24), à l'arrêt du traitement et 6 mois après l'arrêt. Les charges virales mesurées à ces différents points du suivi ont permis d'établir la cinétique de réponse virologique au traitement pour chaque patient.

Finalement, nous avons constitué une cohorte de 92 patients chroniquement mono-infectés par un VHC de génotype 1 (sous-types 1a et 1b) traités par bithérapie pégylée de référence. Pour tous ces patients, nous disposions de tous les sérums collectés à la date S0 (entre 6 mois et 0 jour avant l'initiation du traitement antiviral), ainsi que de sérums collectés aux dates S4 et/ou S12 sous traitement pour certains patients non-répondeurs (5 et 11 patients infectés par un VHC de sous-types 1a et 1b, respectivement). La répartition des 92 patients de notre cohorte en fonction du sous-type viral et de la réponse virologique à long-terme est illustrée dans le **tableau 1**.

Total des patients inclus dans la cohorte								
n = 92								
Distribution des patients dans les différents CHU français participant à l'étude								
Strasbourg	Tours	Bordeaux	Toulouse	Clermont-Ferrand	Brest	Bobigny	Villejuif	Paris
n = 44	**n = 7**	**n = 4**	**n = 5**	**n = 3**	**n = 2**	**n = 16**	**n = 6**	**n = 5**
Répartition des patients en fonction du sous-type viral et de la réponse virologique à long-terme au traitement antiviral								
Sous-type 1a					**Sous-type 1b**			
n = 43					**n = 49**			
RVS[a]		**non-RVS (NR)[b]**			**RVS[a]**		**non-RVS (NR)[b]**	
n = 17		**n = 26**			**n = 25**		**n = 24**	

Tableau 1. Distribution des patients de la cohorte en fonction du sous-type viral des souches VHC infectant les patients et de leurs réponses au traitement antiviral.
[a] RVS : réponse virologique soutenue (ARN du VHC indétectable 6 mois après l'arrêt du traitement par un test de qRT-PCR sensible) ; [b] non-RVS = NR, avec NR : non-réponse.

II. Extraction de l'ARN viral

L'ARN a été extrait à partir de l'échantillon primaire sérique, conservé au préalable à -80°C. L'extraction a été effectuée sur colonne de silice à l'aide de la trousse commerciale QIAmp Viral RNA Minikit (Qiagen), en suivant les recommandations du fabricant. La concentration des ARN totaux obtenus après extraction a été mesurée (en ng/µL) à l'aide d'un spectrophotomètre

(Nanodrop®). Les ARN étaient alors stockés à +4°C pendant une heure ou à -80°C pour une conservation de longue durée.

III. Amplification de l'ARN viral par *reverse transcription* (RT) - *polymerase chain reaction* (PCR)

Le fragment d'ARN que nous souhaitions cibler dans la réaction de RT-PCR s'étend sur une longueur de 5254 bases (fragment long ou FL), allant de la région 5'NC jusqu'au gène de la protéine non-structurale NS3 englobant ainsi les gènes E1 et E2 codant les glycoprotéines d'enveloppe. Pour obtenir le fragment FL, un protocole de RT-PCR a été développé et optimisé.

L'amplification d'un fragment d'une telle longueur reste toutefois délicate. Ainsi, un autre protocole de substitution pour les RT-PCR a été conçu pour cibler un fragment moins long de 1835 bases (fragment intermédiaire ou FI), allant de la partie 3'-terminale du gène de la protéine Core jusqu'à la fin de E2.

Le protocole destiné à obtenir le fragment FL (PFL) a toujours été utilisé de manière préférentielle pour amplifier l'ARN viral issu de chaque patient. En cas d'échec du PFL, le protocole destiné à obtenir le fragment FI (PFI) a alors été utilisé.

L'utilisation du PFI en cas d'échec du PFL et l'optimisation de l'ensemble de ces protocoles ont permis d'obtenir les produits amplifiés ciblés (gènes E1/E2) pour toutes les souches pré-thérapeutiques des 92 patients ainsi que pour les souches sous pression thérapeutique à S4 et/ou S12 pour les patients dont les sérums étaient disponibles (16 patients).

1). *Reverse transcription* ou RT

Quel que soit le protocole de RT utilisé, la quantité d'ARN total introduit dans une réaction était à chaque fois d'environ 330 ng.

a). Protocole PFL

Etant donné la longueur importante du fragment d'ARN à amplifier, la *reverse transcription* du fragment FL a nécessité une trousse commerciale adaptée à l'amplification de grands fragments d'ARN : LongRange 2Step RT-PCR Kit (Qiagen).

Procédure de la *reverse transcription* dans le protocole PFL avec la trousse commerciale LongRange 2Step RT-PCR Kit (Qiagen) :

Pour une réaction de RT, l'ARN est tout d'abord dénaturé à 65°C pendant 5 min puis est brièvement refroidi sur glace pendant 1-2 min. Il est ensuite ajouté à un mélange réactionnel comprenant : 4 µL d'une solution tampon (5x, contenant 25 mM de Mg^{2+}), 2 µL d'une solution de dNTPs (10 mM de chaque dNTP), 2 µL d'une amorce oligonucléotidique anti-sens***** (10 µM), 0,2 µL d'un inhibiteur des RNases (RNase I, 4 U/µL), 1 µL de LongRange reverse transcriptase (10 U/µL) et de l'eau PCR-grade (H_2O RNases-free) pour un volume final de 20 µL.

Le mélange réactionnel contenant la matrice d'ARN dénaturé est alors incubé à 50°C pendant 90 min pour la synthèse du brin d'ADN complémentaire (ADNc). Pour finir, une courte incubation à 85°C pendant 5 min est effectuée afin d'inactiver la reverse transcriptase et de stopper la réaction.

Les ADNc ainsi obtenus sont alors stockés à +4°C pendant une heure ou placés à -80°C pour une plus longue durée.

*** :** *L'amorce oligonucléotidique anti-sens (gene specific primer ou GSP) utilisée dans le protocole PFL correspond à l'amorce publiée A5387 (5' gatcctgcccacaatgaccac 3') (site d'amorçage sur le génome du VHC : acides nucléiques 5399 – 5379 dans le gène NS4A) (Rispeter et al., 1997).*

b). Protocole PFI

Le protocole PFI se constitue d'un mode opératoire qui diffère du précédent par la reverse transcriptase et les amorces utilisées. Le PFI utilise la trousse commerciale SuperScript II Reverse Transcriptase et des amorces aléatoires (ou *random primers*) (Invitrogen).

Procédure de la *reverse transcription* dans le protocole PFI avec la trousse commerciale SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) :

Pour une réaction de RT, l'ARN est tout d'abord dénaturé à 65°C pendant 5 min en présence de 4 µL de *random primers* (125 ng/µL), 1 µL d'une solution de dNTPs (10 mM de chaque dNTP) et de l'eau PCR-grade (H_2O nucléases-free) pour atteindre un volume de réaction intermédiaire de 13 µL.

Après un bref refroidissement sur glace (1-2 min), on ajoute à ce mélange préliminaire : 4 µL de solution tampon (5x, contenant 15 mM de $MgCl_2$), 2 µL de dithiothréitol (DTT, 0,1 M) et 1 µL de SuperScript II reverse transcriptase (200 U/µL). Le mélange réactionnel est ainsi fixé dans un volume final de 20 µL.

Le mélange réactionnel est alors incubé à 42°C pendant 50 min pour la synthèse des ADNc. Enfin, le mélange est porté à 70°C pendant 15 min pour inactiver la reverse transcriptase et stopper la réaction.

Les ADNc ainsi obtenus sont alors stockés à +4°C pendant une heure ou placés à -80°C pour une plus longue durée.

2). *Polymerase chain reaction* ou PCR

Quel que soit le protocole utilisé, l'ADNc obtenu était amplifié dans une première réaction de PCR (PCR1) en utilisant un premier couple d'amorces puis les produits issus de cette PCR étaient utilisés comme matrice dans une seconde PCR dite "nichée" (PCR2) en utilisant un second couple d'amorces internes aux premières. Les produits de PCR2 étaient ensuite déposés sur un gel d'agarose à 1% complémenté de 2 gouttes de bromure d'éthydium (BET) puis séparés par électrophorèse 1 h à 100V. Le BET est un intercalant de l'ADN excitable sous rayonnements UV permettant la détection de l'ADN après électrophorèse. Ainsi, après migration, l'amplification du fragment d'intérêt est validée sous lampe UV par la présence d'un signal au poids moléculaire attendu.

Au sein d'un protocole et pour une même matrice d'ADNc, plusieurs conditions de PCR ont été testées en cas d'échec(s), avant de changer de protocole. Dans ce cas de figure, l'expérimentation était recommencée depuis l'étape de RT, c'est-à-dire depuis l'extrait d'ARN.

La **figure 1** représente un schéma montrant les variations de conditions de PCR entreprises pour obtenir les produits amplifiés.

a). Protocole PFL

L'ADNc obtenu a été amplifié par deux PCRs successives (PCR1 et PCR2) en utilisant la trousse commerciale LongRange 2Step RT-PCR Kit (Qiagen). En cas d'échec sur ce premier *round* de PCRs, les "répétitions" de PCR1 et PCR2 (voir **figure 1**) ont été effectuées en utilisant une autre trousse commerciale: Phusion^{TM} High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes). Les procédures d'amplification du protocole PFL pour les PCR1 et PCR2 et pour les "répétitions" PCR1 et PCR2 sont mentionnées plus bas dans les plaquettes correspondantes.

En cas d'échec du protocole PFL, le protocole PFI était alors utilisé en substitution pour amplifier le fragment d'intérêt contenant les gènes E1 et E2.

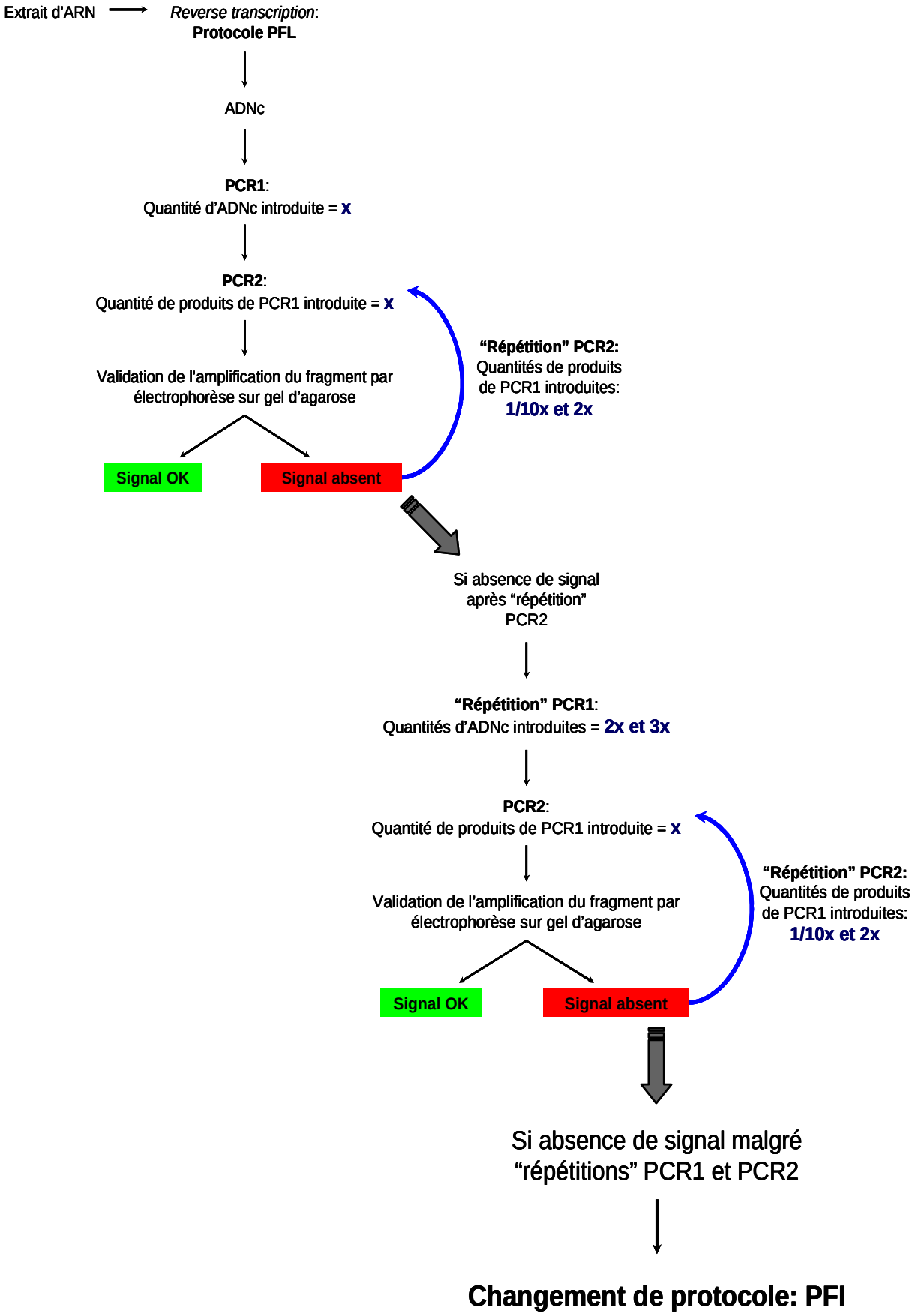


Figure 1. Représentation schématique des variations de conditions de PCR pour obtenir les produits amplifiés.

Procédure de l'amplification par PCR dans le protocole PFL avec la trousse commerciale LongRange 2Step RT-PCR Kit (Qiagen):

- **PCR1 :**

Pour un échantillon, le mélange réactionnel est préparé de la manière suivante : 2,5 µL de solution tampon (10x, contenant 25 mM de Mg^{2+}), 1,25 µL de dNTPs (10 mM de chaque dNTP), 1 µL d'amorce sens***** (10 µM), 1 µL d'amorce anti-sens***** (10 µM) et 0,2 µL d'ADN polymérases (*LongRange PCR Enzyme Mix*). A ce mélange réactionnel, on ajoute 2,5 µL de cDNA - quantité **x** soit **10% du volume final** - et de l'eau PCR-grade (H_2O nucléases-free) pour un volume final de 25 µL.

- **PCR2 :**

Pour la PCR "nichée", 2,5 µL de produits de PCR1 - quantité **x** soit **10% du volume final** - sont introduits au mélange réactionnel pour un volume final de 25 µL. Le mélange réactionnel de la PCR2 est identique à celui de la PCR1 excepté pour le couple d'amorces utilisé******.

Les mélanges réactionnels de la PCR1 et de la PCR2 sont placés dans un thermocycleur pour subir le programme d'amplification suivant :

93°C : 3 min
[93°C : 15 sec ; 48°C : 30 sec ; 68°C : 5 min] 10x
[93°C : 15 sec ; 50°C : 30 sec ; 68°C : 5 min] 10x
[93°C : 15 sec ; 55°C : 30 sec ; 68°C : 5 min] 10x
[93°C : 15 sec ; 60°C : 30 sec ; 68°C : 5 min] 10x

Après dépôt de la PCR2 sur gel d'agarose, si le signal pour le fragment d'intérêt est positif, la PCR2 est de nouveau effectuée dans un volume final de 50 µL. La procédure de cette PCR est la même que la PCR dans un volume de 25 µL, excepté que tous les volumes (réactifs et matrice) sont doublés. Ces produits nouvellement amplifiés sont stockés à +4°C pour quelques jours ou à -20°C pour une plus longue durée. Ces produits ainsi stockés au froid sont utilisés dans l'étape suivante : *"Purification des produits de PCR"*.

***** *et* ****** **:** *Les amorces utilisées dans la PCR1 du protocole PFL correspondent à des amorces publiées : amorce sens OBS1345 (5' ggcgacactccaccatrratc 3') (site d'amorçage sur le génome du VHC : acides nucléiques 18-38 dans la 5'NC) et amorce anti-sens OBS1AS (5' tgctvgtgacgacctccag 3') (site d'amorçage sur le génome du VHC : acides nucléiques 5316 - 5298 chevauchant le gène NS3 et NS4A) (Sheehy et al., 2005). Les amorces utilisées dans la PCR2 du protocole PFL correspondent aux amorces publiées : amorce sens OBS1 (5' ctcccctgtgaggaacta 3') (site d'amorçage sur le génome du VHC : acides nucléiques 40 – 57 dans la 5'NC) et amorce anti-sens OBS1ASI (5' gccgacatgcatgycatgatg 3') (site d'amorçage sur le génome du VHC : acides nucléiques 5293 - 5273 dans le gène NS3) (Sheehy et al., 2005).*

Procédure de l'amplification par PCR dans le protocole PFL avec la trousse commerciale Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) utilisée pour les "répétitions" PCR (1 et 2) :

- **"Répétitions" PCR1 :**

Pour un échantillon, le mélange réactionnel est préparé de la manière suivante : 4 µL de solution tampon HF (5x), 0,4 µL de dNTPs (10 mM de chaque dNTP), 1 µL d'amorce sens OBS1345 (10 µM), 1 µL d'amorce anti-sens OBS1AS (10 µM), 0,6 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO, 100%) et 0,2 µL d'ADN polymérase Phusion™ (2 U/µL). A ce mélange réactionnel, on ajoute 4 µL ou 6 µL de cDNA - quantités **2x** ou **3x**, respectivement - et de l'eau PCR-grade (H_2O nucléases-free) pour un volume final de 20 µL.

- **"Répétitions" PCR2 :**

Pour la PCR "nichée" : 2 µL, 0,2 µL ou 4 µL - quantités **x**, **1/10x** ou **2x**, respectivement - de produits de PCR1 sont introduits au mélange réactionnel pour un volume final de 20 µL. Le mélange réactionnel de la PCR2 est identique à celui de la PCR1 excepté pour le couple d'amorces utilisé. Les amorces utilisées dans la PCR2 sont l'amorce sens OBS1 et l'amorce anti-sens OBS1ASI.

Les mélanges réactionnels de la PCR1 et de la PCR2 sont placés dans un thermocycleur pour subir le programme d'amplification suivant :

98°C : 2 min
[98°C : 15 sec ; 50°C : 30 sec ; 72°C : 4 min 30 sec] 10x
[98°C : 15 sec ; 55°C : 30 sec ; 72°C : 4 min 30 sec] 10x
[98°C : 15 sec ; 60°C : 30 sec ; 72°C : 4 min 30 sec] 15x
72°C : 8 min

Après dépôt de la PCR2 sur gel d'agarose, si le signal pour le fragment d'intérêt est positif, la PCR2 est de nouveau effectuée dans un volume final de 50 µL. La procédure de cette PCR est la même que la PCR dans un volume de 20 µL, excepté que tous les volumes (réactifs et matrice) sont augmentés pour être ramenés à un volume final de 50 µL. Les quantités de PCR1 introduites doivent rester à **x**, **1/10x** ou **2x** et les mêmes concentrations finales de réactifs que celles obtenues dans un volume final de 20 µL doivent être obtenues. Ces produits nouvellement amplifiés sont stockés à +4°C pour quelques jours ou à -20°C pour une plus longue durée. Ces produits ainsi stockés au froid sont utilisés dans l'étape suivante : *"Purification des produits de PCR"*.

b). Protocole PFI

Le protocole de substitution en cas d'échec du protocole PFL était le protocole PFI. L'ADNc obtenu avec ce protocole était amplifié par deux PCRs successives (PCR1 et PCR2) et en cas d'échec de ce premier *round* de PCRs, des "répétitions" de PCR1 et PCR2 étaient effectuées (voir **figure 1**). Toutes les PCR effectuées dans ce protocole ont été réalisées en utilisant la trousse Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes).

Procédure de l'amplification par PCR dans le protocole PFI avec la trousse commerciale Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) :

- **PCR1 :**

Pour un échantillon, le mélange réactionnel est préparé de la manière suivante : 4 µL de solution tampon HF (5x), 0,4 µL de dNTPs (10 mM de chaque dNTP), 1 µL d'amorce sens***** (10 µM), 1 µL d'amorce anti-sens***** (10 µM), 0,6 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO, 100%) et 0,2 µL d'ADN polymérase Phusion™ (2 U/µL). A ce mélange réactionnel est ajouté 2 µL de cDNA – quantité **x** soit **10% du volume final** – et de l'eau PCR-grade (H_2O nucléases-free) pour un volume final de 20 µL.

- **PCR2 :**

Pour la PCR "nichée", 2 µL de produits de PCR1 - quantité **x** soit **10% du volume final** - sont introduits au mélange réactionnel pour un volume final de 20 µL. Le mélange réactionnel de la PCR2 est identique à celui de la PCR1 excepté pour le couple d'amorces utilisé******.

Les mélanges réactionnels de la PCR1 et de la PCR2 sont placés dans un thermocycleur pour subir le programme d'amplification suivant :

98°C : 2 min
[98°C : 15 sec ; 55°C : 30 sec ; 72°C : 2 min 30 sec] 35x
72°C : 8 min

Après dépôt de la PCR2 sur gel d'agarose, si le signal pour le fragment d'intérêt est positif, la PCR2 est de nouveau effectuée dans un volume final de 50 µL. La procédure de cette PCR est la même que celle de la PCR dans un volume de 20 µL, excepté que tous les volumes (réactifs et matrice) sont augmentés pour être ramenés à un volume final de 50 µL. La quantité de PCR1 introduite doit rester à **x** et les mêmes concentrations finales de réactifs que celles obtenues dans un volume final de 20 µL doivent être obtenues. Ces produits nouvellement amplifiés sont stockés à +4°C pour quelques jours ou à -20°C pour une plus longue durée. Ces produits ainsi stockés au froid sont utilisés dans l'étape suivante : *"Purification des produits de PCR"*.

***** *et* ****** *: Les amorces utilisées dans la PCR1 du protocole PFI sont l'amorce sens MLVExtS (5' cgtaggtcgcgtaayttgggtaa 3') (site d'amorçage sur le génome du VHC : acides nucléiques 681 - 703 dans le gène Core) et l'amorce anti-sens MLVExtAS (5' gtgcgcctcggctctggtgataaa 3') (site d'amorçage sur le génome du VHC : acides nucléiques 2909 - 2886 dans le gène NS2). Les amorces de PCR2 correspondent aux amorces publiées suivantes : amorce sens MLVE1E2S (5' tata****gatatc****atggggtacattccgctcgtc 3') (site d'amorçage sur le génome du VHC : acides nucléiques 741 - 761 dans le gène Core) et amorce anti-sens MLVE1E2AS (5' atat****gatatc****ttactcagcctgagctatcag 3') (site d'amorçage sur le génome du VHC : acides nucléiques 2576 - 2559 à l'extrémité 3' du gène E2) (Pestka et al., 2007). Sur les amorces de la PCR2 sont représentées* ***en gras*** *le motif d'acides nucléiques reconnu par l'enzyme de restriction EcoRV et en italique souligné un codon stop. Ces modifications sur les amorces de PCR2 sont essentielles pour la construction ultérieure du plasmide codant les gènes E1/E2 d'intérêt, nécessaires pour la génération des HCVpp (Pestka et al., 2007).*

Procédure de l'amplification par PCR dans le protocole PFI avec la trousse commerciale Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) utilisée pour les "répétitions" PCR (1 et 2) :

- **"Répétitions" PCR1 :**

Pour un échantillon, le mélange réactionnel est préparé de la manière suivante : 4 µL de solution tampon HF (5x), 0,4 µL de dNTPs (10 mM de chaque dNTP), 1 µL d'amorce sens MLVExtS (10 µM), 1 µL d'amorce anti-sens MLVExtAS (10 µM), 0,6 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO, 100%) et 0,2 µL d'ADN polymérase Phusion™ (2 U/µL). A ce mélange réactionnel est ajouté 4 µL ou 6 µL de cDNA - quantités **2x** ou **3x**, respectivement - et de l'eau PCR-grade (H_2O nucléases-free) pour un volume final de 20 µL.

- **"Répétitions" PCR2 :**

Pour la PCR "nichée" : 2 µL, 0,2 µL ou 4 µL - quantités **x**, **1/10x** ou **2x**, respectivement - de produits de PCR1 sont introduits au mélange réactionnel pour un volume final de 20 µL. Le mélange réactionnel de la PCR2 est identique à celui de la PCR1 excepté pour le couple d'amorces utilisé. Les amorces utilisées dans la PCR2 sont les amorces sens MLVE1E2S et anti-sens MLVE1E2AS.

Les mélanges réactionnels de la PCR1 et de la PCR2 sont placés dans un thermocycleur pour subir le programme d'amplification suivant :

98°C : 2 min
[98°C : 15 sec ; 55°C : 30 sec ; 72°C : 2 min 30 sec] 35x
72°C : 8 min

Après dépôt de la PCR2 sur gel d'agarose, si le signal pour le fragment d'intérêt est positif, la PCR2 est de nouveau effectuée dans un volume final de 50 µL. La procédure de cette PCR est la même que celle de la PCR dans un volume de 20 µL, excepté que tous les volumes (réactifs et matrice) sont augmentés pour être ramenés à un volume final de 50 µL. Les quantités de PCR1 introduites doivent rester à **x**, **1/10x** ou **2x** et les mêmes concentrations finales de réactifs que celles obtenues dans un volume final de 20 µL doivent être obtenues. Ces produits nouvellement amplifiés sont stockés à +4°C pour quelques jours ou à -20°C pour une plus longue durée. Ces produits ainsi stockés au froid sont utilisés dans l'étape suivante : *"Purification des produits de PCR"*.

Pour chaque réaction de RT-PCR et quel que soit le protocole utilisé, les risques de contamination ont été exclus en utilisant un contrôle négatif (H_20 nucléases-free). De même, la validité des expériences était appréciée par l'utilisation de contrôles positifs bien caractérisés. Les témoins positifs et négatifs étaient introduits du début à la fin du processus de RT-PCR pour pouvoir suivre le bon déroulement de toute la manipulation expérimentale.

3). Purification des produits de PCR

Les produits de PCR2 validés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% ont été ré-amplifiés dans un volume final de 50 µL. La totalité de ces produits a alors été déposée sur un gel LMP (*low melting point*) à 1% supplémenté de 2 gouttes de BET, migration 2 h à 80V. Le signal d'intérêt a ensuite été détecté sous lampe UV et la bande d'ADN découpée. L'ADN a ensuite était purifié grâce au kit commercial Wizard® SV Gel and PCR clean up system (Promega), en suivant les instructions du fabricant. L'ADN ainsi purifié a alors été quantifié au spectrophotomètre (Nanodrop®) puis conservé à -80°C, avant l'étape de séquençage.

IV. Séquençage des gènes E1 et E2

L'analyse des souches virales a été réalisée après séquençage direct des gènes E1 et E2 entiers. En premier lieu, des réactions de séquences ont été réalisées grâce à la trousse commerciale Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), en utilisant comme matrice les produits de PCR2 purifiés. Ces réactions ont ensuite été purifiées et injectées dans un séquenceur à capillaires : Applied Biosystems Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems).

Procédure pour les réactions de séquences avec la trousse commerciale Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) :

Pour une réaction de séquence, 30 ng de produits de PCR2 purifiés sont ajoutés à 1 µL de *Ready reaction premix* (2,5x, contenant une solution tampon, des dNTPs, des ddNTPs marqués par des fluorochromes et une ADN polymérase), 1,5 µL d'une solution tampon *ad hoc* (5x), 1 µL d'amorce oligonucléotidique***** (5 µM) et de l'eau PCR-grade (H_2O nucléases-free) pour un volume final de 10 µL.
Le mélange réactionnel est alors placé dans un thermocycleur pour y subir le programme d'amplification suivant :

96°C : 1 min, puis [96°C : 10 sec ; 50°C : 5 sec ; 60°C : 4 min] 25x

***** *: Pour une même matrice d'ADN purifié, 3 réactions de séquence utilisant 3 amorces différentes sont nécessaires pour couvrir la totalité des gènes E1 et E2. Les différentes amorces utilisées accompagnées de leurs séquences, leurs polarités, leurs positions d'amorçage sur le génome du VHC, le génotype ciblé (1a ou 1b) et le fragment de gène ciblé sur E1/E2 sont répertoriés dans le* ***tableau 2****.*

Amorce oligonucléotidique	Séquence (5'→ 3')	Polarité: Sens (+), Anti-sens (-)	Site d'amorçage sur le génome du VHC: acides nucléiques	Génotype ciblé	Fragment de gène ciblé
CF1	gacggcgtgaactatgcaacagg	+	819-841	1a/1b	E1
EAS	agggcbgtbckgttkatgtgcc	-	1621-1600	1a/1b	E1
ES1a/b	tgggatatgatgatgaactggtc	+	1299-1321	1a/1b	C-terminal de E1 / N-terminal de E2
AP33-1b	tyrtaaacaccaayggcagctg	+	1579-1600	1b	N-terminal de E2
P2SDeg	aaytggttcggttgtacmtggatg	+	1983-2006	1a/1b	C-terminal de E2
INVRR-1a	tgcccccactgattgcttccgca	+	2082-2103	1a	C-terminal de E2
INVRR-1b	tgcccccacggactgcttccgga	+	2082-2103	1b	C-terminal de E2

Tableau 2. Amorces oligonucléotidiques utilisées pour le séquençage entier des gènes E1 et E2 du VHC.

Plusieurs combinaisons de ces amorces ont été utilisées pour obtenir les séquences E1/E2 complètes des souches pré-thérapeutiques de tous les patients (n = 96) et des souches sous pression thérapeutique des patients pour qui elles étaient disponibles (n = 16).

V. Analyses des séquences par bio-informatique

1). Nettoyage et raboutage des séquences E1/E2

Les chromatogrammes bruts des différents fragments de séquence d'acides nucléiques de E1 et de E2 ont été visualisés, nettoyés et correctement raboutés grâce au logiciel informatique ChromasPro (version 1.41). Par l'intermédiaire du logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, version 4.0.2) (http://www.megasoftware.net) utilisant l'algorithme d'alignement ClustalW, les séquences E1/E2 complètes ont ensuite été alignées individuellement sur des séquences de référence (H77 (AF009606) et HC-J4 (AF054247), pour les génotypes 1a et 1b, respectivement). Les séquences d'intérêt E1/E2 ainsi vérifiées ont été enregistrées en acides nucléiques et en acides aminés sous format *fasta*.

Les patients ont tout d'abord été classés en fonction du génotype du VHC infectant : 1a ou 1b. En accord avec le génotype viral, les séquences E1/E2 vérifiées ont alors été alignées entre elles. Après alignement, elles ont été classées en (sous-)groupes en fonction de la réponse virologique des patients au traitement antiviral.

Dans un premier temps, nous avons distingué les patients ayant développé une réponse virologique soutenue (RVS) des patients non-répondeurs (NR) au traitement antiviral, ce qui a permis de concevoir les 2 principaux groupes de réponse au traitement. Puis, en vue d'affiner les analyses, les patients ont été subdivisés en 4 sous-groupes en fonction des particularités de réponse au sein du groupe des patients RVS et NR. En effet, parmi les patients RVS d'une part et les patients NR d'autre part, nous avons analysés :

- les patients ayant présenté une réponse virologique rapide ou RVR (caractérisés par une virémie indétectable à S4 sous traitement, excellent facteur prédictif de la RVS) des autres patients répondeurs : patients RVS-RVR et RVS-non-RVR.
- les patients répondeurs nuls ou NR0 (caractérisés par une absence de diminution de la charge virale ≥ 2 $\log_{10}$ UI/mL tout au long du traitement, le plus mauvais profil de réponse dans la classe des patients NR) des autres patients non-répondeurs : NR-NR0 et NR-non-NR0.

2). Recherche de signatures moléculaires (SMs)

La recherche de signatures moléculaires ou SMs, c'est-à-dire les acides aminés liés à la réponse virologique au traitement, a été effectuée grâce au programme VESPA (*Viral Epidemiology*

Signature Pattern Analysis) qui est disponible sur le site de la base de données américaine de séquences du VHC (http://hcv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html).

Nous avons en premier lieu comparé le groupe RVS *versus* NR. Dans une seconde approche, des comparaisons ont été entreprises au sein des 4 sous-groupes, c'est-à-dire RVS-RVR, RVS-non-RVR, NR-NR0 et NR-non-NR0.

Par une analyse critique, nous avons évalué la pertinence de chaque SM individuellement, en prenant en compte la fréquence et les proportions relatives d'un résidu amino-acide dans un groupe de patients par rapport à un autre. Pour qu'un acide aminé à une position donnée soit pris en considération en tant que SM, nos critères de sélection étaient les suivants :

- l'acide aminé devait être représenté dans 60% ou plus des séquences d'un groupe et/ou d'un sous-groupe
- l'acide aminé devait être moins fréquemment représenté (< 50%) dans les séquences de l'autre groupe et/ou de l'autre sous-groupe pris en comparaison

Une distribution distinctement différente d'un acide aminé à une position donnée entre les séquences des patients infectés par un génotype 1a et celles des patients infectés par un génotype 1b, a également été prise en considération pour la sélection des SMs.

Enfin, nous avons réservé les tests fonctionnels aux motifs qui montraient une différence (position mutée *versus* position originelle dans la souche de référence) d'après la prédiction antigénique par bio-informatique.

3). Prédiction de motifs antigéniques

La recherche de motifs antigéniques prédits a été effectuée en utilisant le logiciel Antheprot 2000 (version 6.0) (http://antheprot-pbil.ibcp.fr). Ce logiciel permet de prédire l'antigénicité de surface au niveau des différents motifs d'acides aminés constituant une séquence polypeptidique linéaire, grâce à une méthode développée par Parker *et al.* (Parker *et al.*, 1986). Le calcul du niveau d'antigénicité pour chaque résidu d'une séquence d'acides aminés est dérivé de 3 paramètres physico-chimiques qui sont : le temps de rétention sur chromatographie liquide haute performance (HPLC), l'hydrophilie et la flexibilité atomique de l'acide aminé considéré. Cette analyse a été essentiellement utilisée pour étudier l'impact virtuel des SMs retenues (voir plus haut) sur le motif antigénique correspondant.

4). Détermination de réseaux minimaux d'acides aminés covariants sur les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, corrélés à la réponse au traitement antiviral de référence

Cette approche *in silico* a été également entreprise car des acides aminés peuvent interagir avec d'autres résidus présents au sein des glycoprotéines d'enveloppe du VHC, avec un impact indirect potentiel de ces interactions sur la réponse au traitement antiviral. Ces analyses ont été menées en utilisant comme matrice les séquences d'acides aminés des souches pré-thérapeutiques des 92 patients de la cohorte séparées en fonction du génotype (1a et 1b), afin de distinguer en fonction du génotype du VHC les patients RVS des patients NR au traitement. Cette approche de détermination de réseaux minimaux d'acides aminés covariants sur E1 et E2 a été développée et les analyses réalisées par un statisticien collaborant à notre projet (John Murray, *School of Mathematics and Statistics & National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research, University of New South Wales, Sydney, Australia*).

Brièvement, les réseaux de paires d'acides aminés covariants ont été calculés au sein de chaque groupe en accord avec la méthode développée par Aurora *et al.*, et les paires qui présentaient une valeur S d'au moins 0,5 ont été retenues (Aurora *et al.*, 2009).

Pour identifier les paires covariantes, John Murray a calculé pour toutes les paires possibles dans les colonnes *i* et *j* (chaque colonne étant définie par l'ensemble des acides aminés présents à une position dans le groupe de séquences alignées et soumis à l'analyse de covariance), une valeur *S* (ou score *S*) en utilisant les paires observées (*obs*) et attendue (*att*). Pour cela, la formule suivante a été utilisée :

$$S = \frac{\sum_{1}^{L} (N_{obs} - N_{att})^2}{N_{val}}$$

où *L* est la liste de toutes les paires observées et N_{obs} est le nombre d'occurrences pour une paire de résidus (c'est-à-dire le nombre de fois où la paire apparaît). Pour cette paire, le nombre attendu (N_{att}) est donné par la formule intermédiaire suivante :

$$N_{att} = \frac{C_{xi} C_{yj}}{N_{val}}$$

où N_{val} est le nombre de séquences dans l'alignement qui ne contient pas de *gaps* (données manquantes), C_{xi} est le nombre observé de résidus *x* à la position *i* et C_{yj} est le nombre observé de résidus *y* à la position *j*.

Puisque dans cette approche, il y avait beaucoup de combinaisons, le statisticien a déterminé celles qui pouvaient atteindre ces paramètres de valeurs S sous certains critères d'optimisation, c'est-à-dire la sélection des réseaux contenant le moins de paires ou la sélection de réseaux qui maximisaient la valeur de corrélation totale toujours en gardant un petit nombre de paires. Ainsi, il a été estimé que ces réseaux minimaux pouvaient extraire les paires d'acides aminés covariants les plus importantes, et que ces paires pourraient refléter, directement ou indirectement, comment certains virus de patients échappent au traitement antiviral. Les calculs ont été effectués en utilisant le logiciel statistique Matlab R2010b (MathWorks Inc.).

VI. Clonage et séquençage pour l'analyse des quasi-espèces virales

Pour une analyse plus fine de la population virale circulant chez des patients de notre cohorte, nous avons sélectionné trois patients infectés par un génotype 1a, dont deux qui présentaient une RVS au traitement antiviral et un non-répondeur qui ne présentait aucune diminution ≥ 2 $\log_{10}$ UI/mL au cours du traitement (répondeur nul ou NR0). Nous avons alors étudié les quasi-espèces circulant dans le sérum collecté avant l'initiation du traitement (S0) des patients RVS et dans les sérums collectés à S0 et à S12 sous traitement pour le patient NR0.

Pour ces patients, les séquences directes des glycoprotéines E1 et E2 du VHC à tous ces points du temps avaient préalablement été obtenues à partir de produits de RT-PCR issus du protocole PFL (voir plus haut).

Pour l'étude des quasi-espèces, l'ARN a de nouveau été extrait à partir des sérums d'intérêt puis les gènes codant les glycoprotéines d'enveloppe ont été amplifiés en utilisant un protocole de RT-PCR ne ciblant que les gènes codant E1 et E2. Le clonage a alors été réalisé sur ces produits de RT-PCR purifiés, dont la concentration a préalablement été déterminée au Nanodrop®.

1). Clonage des produits de RT-PCR purifiés (étude de quasi-espèce) pour trois patients infectés par un VHC de génotype 1a

Principe de la méthode de clonage médiée par le vecteur pCRII-TOPO et les bactéries compétentes *E. Coli* TOP10 (Invitrogen) :

Le vecteur de clonage pCRII-TOPO (Invitrogen) est utilisé pour le clonage moléculaire. Ce vecteur utilise la topoisomérase I du virus de la vaccine, sans avoir recours à une ligase spécifique (Shuman, 1994). Cette enzyme a la possibilité de s'attacher en un site spécifique (5' CCCTT 3') et de cliver la liaison phosphodiester du brin d'ADN juste après T-3'. L'énergie issue du clivage est

récupérée pour former une liaison phophotyrosyl entre l'ADN clivé et une tyrosine de la topoisomérase I. Ceci va maintenir le plasmide linéarisé avec une extrémité T-3' sortante et le vecteur est dès lors appelé vecteur activé. Le vecteur contient un gène de sélection par l'ampicilline permettant uniquement la croissance des bactéries transformées. En outre, le gène *lacZα* permettant aux bactéries du type *E. Coli* TOP10 (Invitrogen) d'exprimer une β-galactosidase fonctionnelle pour métaboliser le S-Galactose (S-Gal) par α-complémentation, a été choisi et introduit dans le plasmide, car ce gène contient sur les deux brins d'ADN complémentaires un site 5' CCCTT 3'. La linéarisation du plasmide s'effectue à ce niveau par clivage du gène *lacZα*. L'étape dite de "*A-tailing*" que subissent les produits de PCR purifiés va permettre, lors de la ligation, l'intégration de l'insert de manière très spécifique grâce aux extrémités sortantes du vecteur. En effet, le résidu hydroxyl (-OH) des extrémités 5' de l'insert va attaquer la liaison phosphotyrosyl, libérant l'enzyme et permettant l'insertion du fragment d'intérêt grâce à la formation de nouvelles liaisons phosphodiester et la complémentarité des bases A-T. Pour être activé, le vecteur est linéarisé par clivage au niveau du gène *lacZα*. L'insertion des produits de PCR purifiés entraîne la recircularisation du plasmide mais engendre la rupture de la phase codante du gène *lacZα*, rendant les bactéries *E. Coli* TOP10 transformées par ce vecteur recombiné incapables d'exprimer une β-galactosidase fonctionnelle et ainsi de métaboliser le galactose lors de leur croissance sur milieu LB/S-Gal (Luria-Bertani/S-Galactose). Les colonies obtenues apparaîtront alors blanches. L'activation du vecteur pCRII-TOPO est un phénomène réversible et peut donc être inactivé (en d'autre terme recircularisé) grâce à la rupture des liaisons phosphotyrosyl (liant les extrémités T-3' sortantes du vecteur à la topoisomérase) par les résidus 5'-OH du vecteur. Le vecteur peut donc être recircularisé sans l'intervention des inserts. Dans ce cas de figure, le plasmide recircularisé sans insert comporte un gène *lacZα* fonctionnel et les bactéries transformées sont alors capables de métaboliser le galactose. Les colonies apparaîtront alors bleues/noires après culture. Cette discrimination des colonies par leur couleur permet d'identifier les clones comportant l'insert de ceux qui ne l'ont pas intégré (voir plus bas, section "*Etape de sélection des bactéries porteuses du plasmide recombinant*").

a). Etape de *"A-tailing"*

Une étape dite de "*A-tailing*" a préalablement été effectuée sur les produits de PCR purifiés afin de générer dans les amplicons des extrémités A-3' sortantes. Cette étape est nécessaire pour permettre la ligation des produits de PCR dans le vecteur de clonage pCRII-TOPO de type A/T.

Procédure de l'étape de *"A-tailing"* pré-clonage en utilisant la trousse commerciale *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) :

Pour cette étape et pour un échantillon, un mélange réactionnel est préparé de la manière suivante : 1 µL de solution tampon – Mg (10x), 0,5 µL d'une solution $MgCl_2$ (50 mM), 1 µL de dATP (2 mM) et 1 µL de l'enzyme *Taq* DNA polymerase (5 U/µL). A ce mélange est ajouté 6,5 µL de produits de PCR purifiés. La réaction de *"A-tailing"* s'effectue alors dans un thermocycleur porté à 72°C pendant 20 min.
Les produits de PCR *"A-tailés"* peuvent alors être stockés à +4°C pendant une heure ou à -20°C pour un plus longue durée.

b). Etape de ligation

Après la réaction de *"A-tailing"*, les produits de PCR ont été intégrés dans le vecteur pCRII-TOPO (Invitrogen) sans intervention d'une ligase spécifique. Pour chaque cas, la quantité de produits de PCR *"A-tailés"* introduite dans la réaction de ligation était de 33 à 35 ng.

Procédure de l'étape de ligation en utilisant la trousse commerciale TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) :

Pour cette étape et pour un échantillon, un mélange réactionnel est préparé de la manière suivante : 1 µL de solution saline, 33-35 ng de produits de PCR *"A-tailés"* et de l'eau stérile pour un volume intermédiaire de 5 µL. Un volume final de 6 µL est atteint par l'ajout de 1 µL de vecteur pCRII-TOPO (Invitrogen).
Le mélange réactionnel est ensuite doucement homogénéisé par refoulement de pipette et incubé une heure à température ambiante. Après la réaction de ligation, les produits sont stockés à +4°C pendant une heure ou à -20°C pour une plus longue durée.

c). Etape de transformation des bactéries compétentes

Cette étape de transformation permet d'introduire le vecteur d'ADN recombinant dans des bactéries dites "compétentes", c'est-à-dire ayant subi un processus de perméabilisation membranaire pour faciliter le transfert de matériel génétique. Les bactéries compétentes utilisées étaient celles fournies dans la trousse de clonage TOPO TA Cloning Kit et sont du type *E. Coli* TOP10 (Invitrogen).

Les bactéries compétentes ont tout d'abord été incubées sur glace pendant 10 min. La transformation proprement dite a été effectuée par un choc thermique (permettant l'ouverture des pores membranaires et l'entrée du plasmide) en portant les bactéries à 42°C pendant 30 sec. Immédiatement après, les bactéries ont été placées sur glace pendant 2 min entraînant la fermeture des pores au niveau des membranes bactériennes.

d). Etape d'ensemencement et de culture des bactéries transformées

Après l'étape de transformation, 250 µL de milieu SOC (*super optimal broth with catabolite repression*) ont été ajoutés aux bactéries qui ont ensuite été incubées pendant une heure à 37°C sous

agitation continue. Cette étape permet de régénérer les bactéries avant ensemencement sur milieu sélectif. La suspension bactérienne a ensuite été centrifugée à 8 000 rpm pendant 2 min et environ 150 µL de surnageant ont été retirés dans le but de concentrer les bactéries. Après remise en suspension des bactéries dans le surnageant restant, 100 µL de la suspension ont été étalés sur boîte de Pétri contenant un milieu LB/S-Gal gélosé (S-Gal/LB Agar Blend, Sigma Aldrich) supplémenté d'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/mL. Les boîtes ensemencées ont alors été incubées à 37°C pendant 16-18 heures.

e). Etape de sélection des bactéries porteuses du plasmide recombinant

Le milieu de culture des bactéries était composé de LB, d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, inducteur non métabolisable de l'opéron lactose), d'ampicilline (permettant seulement la croissance des bactéries transformées grâce au gène de résistance à l'ampicilline apportée en *trans* par le vecteur pCRII-TOPO) et de S-Gal qui est un substrat chromogène galactosidique métabolisé par les bactéries exprimant le gène fonctionnel de la β-galactosidase (β-gal). Lors de son clivage par la β-gal, ce galactoside produit un pigment bleu/noir. La β-gal peut être décomposée en deux peptides nommés LacZα (partie N-terminale de la β-gal) et LacZΩ (partie C-terminale de la β-gal) codés par le gène *lacZ* : ces deux peptides sont essentiels pour une β-gal fonctionnelle.

Or, la région du gène *lacZ* codant le peptide LacZα est délétée chez les bactéries *E. Coli* TOP10, mais ce gène peut être apporté en *trans* par le vecteur pCRII-TOPO si ce dernier n'a pas intégré l'insert et qu'il maintient donc la phase codante du gène *lacZα* (α-complémentation). Cette α-complémentation va alors permettre aux bactéries d'exprimer une β-gal fonctionnelle et ainsi de métaboliser le S-Gal.

Ainsi, si les bactéries ont été transformées avec un vecteur vide (sans insert), les bactéries apparaîtront noires/bleues sous l'effet du clivage du galactoside S-Gal par la β-gal.

A l'inverse, si les bactéries ont été transformées avec un vecteur recombiné (avec insert), la phase codante du gène *lacZα* porté par le vecteur sera rompue et donc les bactéries seront incapables de métaboliser le S-Gal. Ces bactéries apparaîtront alors blanches.

Seules les colonies blanches ont été sélectionnées pour l'étape suivante.

f). Etape d'amplification des clones et de vérification de l'intégration du fragment d'intérêt

Pour chaque cas, environ 30 colonies blanches ont été prélevées individuellement avec des cônes stériles puis transférées dans 5 mL de milieu LB supplémenté d'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/mL. Ces minicultures ont alors été incubées à 37°C sous agitation continue pendant 16-18 heures, permettant d'amplifier individuellement chaque clone bactérien.

Parallèlement à la réalisation des minicultures, une PCR de contrôle a été effectuée sur chaque clone bactérien afin de valider la présence de l'insert d'intérêt, en utilisant les amorces de la PCR nichée ayant généré les produits de RT-PCR utilisés pour le clonage et la trousse commerciale *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). Les produits de PCR ont alors été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% et la présence du fragment d'intérêt a été révélée sous lampe UV.

NB : *Pour chaque clone bactérien amplifié, des "stocks glycérol" ont été réalisés en ajoutant à 500 µL de chaque miniculture 100 µL de glycérol (agissant comme un cryoprotecteur). Ces "stocks glycérol" ont alors été stockés à -80°C.*

Procédure de l'étape de PCR de contrôle permettant de valider l'insertion du fragment d'intérêt dans le vecteur pCRII-TOPO en utilisant la trousse commerciale *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) :

Pour un échantillon, un mélange réactionnel est préparé de la manière suivante : 2,5 µL de solution tampon – Mg (10x), 0,75 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (10 mM de chaque dNTP), 1,25 µL d'amorce sens MLVE1E1S (10 µM), 1,25 µL d'amorce anti-sens MLVE1E2AS (10 µM), 0,25 µL d'enzyme *Taq* DNA Polymerase (5 U/µL) et de l'eau PCR-grade (H_2O nucléases-free) pour un volume final de 25 µL.
Avant le transfert de la colonie bactérienne dans la miniculture, le cône ayant servi à la récolte est brièvement plongé dans le mélange réactionnel de PCR. L'ADN plasmidique présent dans les bactéries ainsi déposées dans le mélange réactionnel servira de matrice à l'amplification du fragment ciblé.
Le mélange réactionnel de la PCR de contrôle est alors placé dans un thermocycleur pour subir le programme d'amplification suivant :

94°C : 6 min
[94°C : 45 sec ; 55°C : 30 sec ; 72°C : 2 min 30 sec] 25x
72°C : 10 min

NB: *La première étape à 94°C : 6 min permet à la fois de lyser les bactéries par chauffage à haute température et d'initier la dénaturation des brins d'ADN.*

g). Etape de purification des plasmides comportant le fragment d'intérêt

Pour chaque clone bactérien amplifié et validé par PCR de contrôle, le plasmide a été extrait est purifié à partir des minicultures par une technique du type *miniprep* en utilisant la trousse

commerciale Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), selon les instructions du fabricant. La quantité d'ADN plasmidique obtenue a alors été quantifiée au Nanodrop®.

2). Séquençage des plasmides purifiés

Les plasmides purifiés (10 clones pour chaque quasi-espèce étudiée) ont été séquencés sur E1/E2 en utilisant le même protocole que celui utilisé pour le séquençage direct des produits de RT-PCR purifiés (voir plus haut, partie *"Séquençage des gènes E1 et E2"*). La quantité de matrice introduite était de 500-600 ng/réaction.

3). Analyses bio-informatiques des quasi-espèces virales

Les séquences E1/E2 obtenues ont alors été nettoyées et raboutées comme décrit plus haut (voir partie *"Analyses des séquences par bio-informatique"*, section *"Nettoyage et raboutage des séquences E1/E2"*).

Les séquences E1/E2 ont été alignées entre elles (logiciel MEGA, version 4.0.2) et ont été analysées en examinant plus particulièrement les positions des signatures moléculaires déterminées à partir de l'analyse des séquences pré-thérapeutiques des 43 patients de la cohorte infectés par un génotype 1a. Cet aspect de l'analyse nous a permis d'évaluer i). l'homogénéité des SMs liées à la réponse au traitement pour les variants de quasi-espèces circulant dans le sérum S0 des deux patients RVS et ii). d'une part, l'homogénéité des SMs liées à la non-réponse au traitement pour les variants de quasi-espèces circulant dans le sérum S0 du patient NR0, et d'autre part l'éventuel maintien de ces SMs au sein des variants de quasi-espèces sous pression thérapeutique circulant dans le sérum S12 de ce patient.

De plus, un arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences d'acides nucléiques E1/E2 de tous les variants pour apprécier d'une part le regroupement dans l'arbre des variants issus d'une même quasi-espèce et d'autre part, la diversité des variants au sein d'une quasi-espèce évaluée par la distance génétique les séparant les uns des autres. Grâce au logiciel MEGA (version 4.0.2), l'arbre phylogénétique a été construit par la méthode du *neighbor-joining*, en utilisant le modèle *Kimura 2-parameter*. La robustesse des embranchements de l'arbre phylogénétique a été évaluée par la technique du bootstrap (1 000 réplicats). Les embranchements avec un pourcentage de bootstrap > 65% sont généralement considérés comme robustes.

4). Vérification de la fiabilité des quasi-espèces générées par RT-PCR/clonage

Comme mentionné plus haut, les souches des trois patients utilisés pour analyser les quasi-espèces virales circulantes dans le sérum S0 (pour les 2 patients RVS et le patient NR0) et dans le sérum S12 (pour le patient NR0), ont été initialement séquencées directement sur E1/E2 à partir de produits de PCR issus du protocole PFL.

Sur chacune des souches étudiées pour leur quasi-espèce, l'extraction de l'ARN viral a été refaite et les ARN ont subi une nouvelle RT-PCR pour amplifier les gènes des glycoprotéines d'enveloppe, en utilisant un protocole d'amplification ne ciblant que les gènes E1 et E2. Les séquences directes E1/E2 issues du protocole PFL et de celui ayant servi à générer les matrices de clonage ont été comparées entre elles, et il s'est avéré que les séquences E1/E2 pour une même souche amplifiée avec les deux protocoles comportaient des homologies de séquences d'acides nucléiques approchant 100%. Cette approche nous a permis d'une part d'obtenir des produits de PCR contenant uniquement les gènes E1/E2 à introduire dans le vecteur de clonage et d'autre part, d'exclure un biais technique lié à des incohérences dans l'hybridation des amorces qui auraient pu favoriser l'amplification préférentielle de certains variants. Une telle sélection peut en effet être favorisée par la nature des amorces et/ou des matrices, par des matrices partiellement dégradées et/ou par le microenvironnement de l'extrait d'ARN pouvant perturber l'hybridation des amorces. Pour ce dernier cas, l'utilisation d'une procédure d'extraction de l'ARN dite *"gold standard"* est requise pour minimiser les biais de sélection à ce niveau, et la trousse commerciale QIAmp Viral RNA Minikit (Qiagen) que nous avons utilisée respecte ce type de procédure.

En outre, une comparaison des séquences E1/E2 des variants de quasi-espèces avec les séquences directes des produits de RT-PCR ayant servi de matrice au clonage moléculaire a été effectuée. Comme les séquences directes (pré-clonage) et les séquences des variants de quasi-espèces (post-clonage) montraient de très fortes homologies de séquences approchant 100%, nous avons pu ainsi exclure un biais technique lié à la sélection d'une population de variants lors de l'étape de clonage dans les bactéries de type *E. Coli* (voir pour revue, Moenne-Loccoz *et al.* (Moenne-Loccoz *et al.*, 2011)).

VII. Tests fonctionnels pour l'évaluation de l'impact des signatures moléculaires sur E1/E2 liées à la réponse au traitement antiviral

Les tests fonctionnels ont été effectués en utilisant le modèle d'étude *in vitro* des pseudoparticules rétrovirales du VHC (HCVpp). L'impact des signatures moléculaires E1/E2 liées à la réponse au traitement antiviral de référence a été évalué par l'introduction des SMs identifiées

dans des HCVpp, puis en effectuant des tests d'infection et de neutralisation par des Ac circulant dans le sérum de patients infectés issus de la cohorte. Pour évaluer l'impact des SMs sur le pouvoir infectieux des HCVpp et leur neutralisation, les tests fonctionnels ont toujours été réalisés dans le but de comparer les HCVpp dites "sauvages" ou "wt" – ne comportant pas la SM étudiée – *versus* les HCVpp dites "mutées" – comportant la SM étudiée –.

Les différentes étapes pour réaliser ces tests fonctionnels sont décrites dans les sections qui suivent.

1). Lignées cellulaires utilisées

Pour générer les HCVpp, nous avons utilisé la lignée de cellules embryonnaires rénales humaines HEK 293T. Pour les tests d'infectivité/neutralisation médiés par les HCVpp, nous avons utilisé la lignée d'hépatome humain Huh7.5. Ces cellules ont été maintenues dans un incubateur affichant une température stable de 37°C en atmosphère à 5% de CO_2.

Le milieu de culture des cellules non-hépatiques HEK 293T se compose du milieu nutritif complet *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) à haute teneur en glucose (4,5 g/L) (Gibco), supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal (FBS, PAN Biotech GmbH) et de gentamycine à une concentration finale de 50 µg/mL (Gibco). Le sérum de veau fœtal a été préalablement traité par chauffage à 56°C pendant 30 min pour l'inactivation du complément.

Le milieu de culture des cellules hépatiques Huh7.5 est de composition similaire à celui des cellules HEK 293T, mais le milieu nutritif complet DMEM (4,5 g/L de glucose) est issu d'un autre fabricant (PAA laboratories GmbH). De plus, 5 mL d'acide aminés non-essentiels (100x) sont ajoutés à 500 mL de milieu (MEM non-essential amino acids, Gibco).

Des lignées d'hépatome humain Huh7.5 surexprimant l'un des principaux corécepteurs cellulaires du VHC ont également été utilisées pour des tests d'infection différentielle. Ces cellules sont cultivées dans le même milieu que celui utilisé pour les cellules Huh7.5 natives, mais supplémenté de blasticidine à une concentration finale de 10 µg/mL.

Ces lignées Huh7.5 particulières surexprimant chacune l'un des principaux corécepteurs cellulaires du VHC ont été fabriquées en utilisant la méthode décrite par Haid *et al.* (Haid *et al.*, 2010). Brièvement, ces lignées ont été créées par un transfert de gène dans des cellules Huh7.5 natives en les infectant avec le vecteur lentiviral pWPI-BSD (Addgene) transduisant de manière stable les gènes des corécepteurs cellulaires CD81, SR-BI, CLDN-1 ou OCLN et le gène de résistance à la blasticidine. L'infection de cellules Huh7.5 natives avec le vecteur lentiviral pWPI-BSD ne transduisant aucun corécepteur mais seulement le gène de résistance à la blasticidine a également été effectuée et les cellules résultantes ont servi de cellules contrôles lors des expériences. L'ajout

de blasticidine dans le milieu de culture permettait alors de sélectionner uniquement les cellules surexprimant l'un des corécepteurs cellulaires et le gène de résistance à la blasticidine. Après sélection, la surexpression des différents corécepteurs a été confirmée et quantifiée (en multiple d'expression par rapport aux cellules contrôles) par cytométrie en flux (analyses FACS®).

2). Plasmides utilisés pour la génération des HCVpp

Nous avons choisi d'utiliser des HCVpp construites sur le modèle du lentivirus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). Pour la production de chaque HCVpp, nous avons utilisé les plasmides suivants :

- Plasmide codant les gènes *gag* et *pol* du HIV (pgag/pol-HIV)
- Plasmide codant la luciférase, dont l'ARN transcrit sera encapsidé dans les HCVpp grâce à la présence du signal d'encapsidation ψ du HIV (pluc-HIV)
- Plasmide codant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 de génotype 1a ou 1b (pE1E2-1a ou -1b)

Les plasmides codant les glycoprotéines E1 et E2 que nous avons utilisés provenaient de deux souches de références : H77 (génotype 1a) et UKN-1b (génotype 1b). La souche H77 ayant servi à la construction du plasmide pE1E2-1a correspond à la souche H77 dont la séquence est disponible dans la banque de gènes du NCBI sous le numéro d'accession AAB67037, et comprenant les changements d'acides aminés suivants : R564C, V566A et G650E. Concernant la souche UKN-1b ayant servi à la construction du plasmide pE1E2-1b, elle correspond à la souche dont le numéro d'accession est AY734974 (UKN1b12.16), comportant les changements d'acides aminés suivants : I200M, R384Q, I580T et N641T.
Ces plasmides pE1E2-1a et -1b ont servi de matrice dans laquelle ont été introduite de façon séparée des SMs liées à la réponse au traitement que nous avions définies sur E1/E2 dans la première étape de notre travail (voir plus haut).

Les SMs ont été introduites par mutagénèse dirigée en utilisant la trousse commerciale QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) et en suivant les recommandations du fabricant.

Après obtention des plasmides mutés, ces derniers ont été séquencés sur E1/E2 (pour protocole, voire partie "*Clonage et séquençage pour l'analyse des quasi-espèces virales*", section

"Séquençage des plasmides purifiés") et en analysant les séquences obtenues, l'introduction des mutations attendues a été confirmée et celle de mutations aléatoires exclue.

Les constructions mutées ont alors été désignées X*Y pour les différencier des plasmides dits sauvages (wt, sans mutation), avec : * correspondant à la localisation du résidu amino-acide muté dans la polyprotéine entière du VHC en référence aux souches H77 (numéro d'accession AF009606) ou HC-J4 (numéro d'acession AF054247) pour les constructions moléculaires VHC-1a et VHC-1b, respectivement, ii). X qui correspond à l'acide aminé originel et, iii). Y qui est l'acide aminé muté.

NB : *Chaque plasmide contenait en plus du gène d'intérêt (gènes gag/pol-HIV, luc-HIV ou E1E2 sauvage ou muté) un gène de résistance à l'ampicilline. Pour obtenir des quantités suffisantes de plasmide qui sont nécessaires pour les étapes suivantes, nous avons amplifié des clones bactériens uniques contenant le plasmide d'intérêt (préalablement conservés à -80°C dans du glycérol) en les incubant à 37°C pendant 16-18 heures sous agitation continue, dans 100 mL de milieu LB supplémenté d'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/mL. Chaque plasmide d'intérêt a alors été extrait et purifié à partir des bouillons de culture par une technique de type maxiprep en utilisant la trousse commerciale QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen), selon les instructions du fabricant. L'intégrité des plasmides a alors été vérifiée par restriction enzymatique de contrôle (HindIII pour pgag/pol-HIV et pluc-HIV ; EcoRI pour pE1E2-1a et -1b wt ou muté). Pour finir, l'ADN plasmidique a été quantifié au Nanodrop®.*

3). Production des HCVpp

Afin de produire les HCVpp, les cellules HEK 293T ont tout d'abord été distribuées sur boîte de culture cellulaire stérile (diamètre 10 cm, une boîte pour chaque type de HCVpp) à raison de 2,5 x 10^6 cellules/boîte dans un volume final de 8 mL, puis elles ont été maintenues à 37°C et 5% de CO_2 pendant 24 heures jusqu'à adhérence et différenciation des cellules. Ces cellules ont ensuite été transfectées avec les trois plasmides nécessaires à la production des HCVpp (pgag/pol-HIV, pluc-HIV, pE1E2) en utilisant la trousse commerciale CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech). Cette trousse permet de transfecter de l'ADN exogène dans des cellules de mammifères en suivant la méthode de précipitation de l'ADN par le phosphate de calcium. Cette précipitation permet d'une part de protéger l'ADN des nucléases et d'augmenter le contact avec les cellules cibles. Le contact entre les cellules HEK 293T et le co-précipité va induire une endocytose et permettre l'internalisation de l'ADN exogène.

Procédure de l'étape de transfection des cellules HEK 293T en utilisant la trousse commerciale CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech) :

Pour une réaction de transfection :
Après 24 heures de culture, le milieu des cellules HEK 293T est remplacé par du milieu frais puis elles sont de nouveau incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 20 min à 3h avant la transfection. Dans un tube à hémolyse 5 mL stérile sont distribués 500 µL d'une solution de tampon salin HEPES (HBS, 2x).
En parallèle, dans un microtube 1,5 mL, le mélange réactionnel intermédiaire suivant est préparé : 8,1 µg de plasmide pgag/pol-HIV, 8,1 µg de plasmide pluc-HIV, 2,7 µg de plasmide pE1E2 et de l'eau stérile pour atteindre un volume intermédiaire de 438 µL. Pour atteindre un volume final de 500 µL, 62 µL d'une solution de $CaCl_2$ (2 M) sont ajoutés.
Ce mélange réactionnel intermédiaire est alors transféré par goutte-à-goutte dans le tube à hémolyse contenant le tampon HEPES tout en vortexant à vitesse minimum. Le mélange réactionnel final est incubé pendant 20 min à température ambiante pour que la co-précipitation ADN-phosphate de calcium s'effectue.
La totalité du mélange réactionnel est alors distribuée par goutte-à-goutte sur les cellules HEK 293T en prenant soin d'effectuer une distribution homogène. Pour que la transfection s'effectue, les cellules sont à nouveau incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 15-18 heures.

NB : *Le temps d'incubation pour la réaction de transfection ne doit pas excéder 18 heures, car la technique de transfection utilisant la précipitation de l'ADN par le phosphate de calcium acidifie le milieu de culture, ce qui peut donc être toxique pour les cellules.*

Après une incubation à 37°C et 5% de CO_2 pendant 15-18 heures nécessaires pour que la réaction de transfection s'effectue, le milieu de culture des cellules HEK 293T transfectées est retiré puis remplacé par 8 mL d'un milieu nutritif frais composé de DMEM à 4,5 g/L de glucose (Gibco) supplémenté de gentamycine à une concentration finale de 50 µg/mL (Gibco) et de 2,5% de sérum humain filtré séronégatif pour le VHC, le VHB et le VIH. Les cellules sont ensuite à nouveau incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 24 heures. Après cette période d'incubation, les HCVpp libérées dans le surnageant de culture sont récoltées et les cellules productrices récupérées et lavées avec du PBS (tampon phosphate salin).

Procédure de l'étape de récupération des HCVpp libérées dans le surnageant de culture des cellules HEK 293T transfectées :

Pour une boîte de culture contenant un type de HCVpp dans le surnagent de culture :
A l'aide d'une seringue 10 mL stérile, le surnageant de culture des cellules HEK 293T productrices est prélevé. Un filtre 0,45 µm est alors placé sur le gicleur de la seringue. Le surnageant est de cette manière filtré au dessus d'un tube à fond conique stérile 15 mL pour ne récupérer que la suspension de HCVpp (les débris cellulaires sont retenus dans le filtre).
Les suspensions de HCVpp sont alors aliquotées dans des microtubes stériles à hauteur de 500 µL à 1 mL/tube et stockées à -80°C pour une longue durée.

NB : *Les HCVpp fraîchement produites peuvent être également conservées à +4°C pour une durée n'excédant pas une semaine. En effet, les HCVpp sont des pseudovirus fragiles et se dégradent rapidement.*

En parallèle, les cellules productrices sont décollées de la boite de culture et resuspendues dans un tube à fond conique 15 mL avec quelques millilitres de PBS (tampon phosphate salin). Les cellules sont ensuite centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min. Le surnageant est alors retiré et les cellules sont de nouveau remises en suspension dans quelques millilitres de PBS frais pour être centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min. Ce procédé est répété deux fois pour un lavage correct des cellules afin d'éliminer les HCVpp résiduelles. Après ces lavages et retrait du surnagent, les culots cellulaires sont stockés à -20°C et serviront à l'étape ultérieure de contrôle d'expression des glycoprotéines E1 et E2 du VHC dans les cellules productrices HEK 293T par Western-Blotting.

Comme les HCVpp ainsi générées sont construites sur le modèle HIV, elles expriment la protéine de capside p24 du VIH. Avant d'effectuer les tests fonctionnels comparant les pouvoirs infectieux et les potentiels de neutralisation entre les HCVpp dites "wt" et les HCVpp dites

“mutées”, les quantités de ces HCVpp ont été normalisées par quantification de l’expression de l’antigène p24 du VIH dans les suspensions pseudovirales, en utilisant la trousse commerciale Innotest HIV Antigen mAb kit (Innogenetics) et en suivant les recommandations du fabricant.

4). Tests d’infection des HCVpp sur lignée d’hépatome humain Huh7.5

a). Tests d’infection brute des HCVpp

Pour réaliser les tests d’infection brute, les cellules Huh7.5 ont tout d’abord été distribuées sur plaque stérile de 96 puits à fond plat adaptée à la culture cellulaire, à raison de 1,5 x 10^4 cellules/puits dans un volume final de 200 µL. Les cellules ont été ensuite incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 24 heures.

Procédure de l’étape des tests d’infection brute des HCVpp sur cellules Huh7.5 :

Les HCVpp wt et mutées à comparer dans leur niveau d’infection brute, et dont les quantités ont été au préalable normalisées (d’après le dosage de l’antigène p24 du VIH), sont préchauffées à 37°C pendant 20-30 min. Pendant ce temps, le milieu de culture des cellules Huh7.5 incubées pendant 24 heures est retiré des puits. Après homogénisation des suspensions HCVpp, 25 µL de chaque sont distribuées sur les cellules Huh7.5 (3 puits pour chaque HCVpp).

L’infection des cellules Huh7.5 par les HCVpp est conduite par l’incubation des cellules inoculées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 3-4 heures. Ensuite, 200 µL/puits de milieu de culture Huh7.5 sont ajoutés et les cellules sont de nouveau incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 72 heures.

Après 72 heures d’incubation des cellules Huh7.5 infectées, le milieu de culture a été retiré et 100 µL de tampon de lyse Glo Lysis Buffer 1x (Promega) ont été distribués sur les cellules. Après une incubation de 10 min à température ambiante, les lysats cellulaires ont été homogénéisés par refoulement de pipette et 75 µL de lysats transférés dans une plaque de lecture à fond plat et opaque (blanc). Ces plaques sont alors introduites dans un luminomètre Mithras LB 940 Multimode reader (Berthold Technologies). Les niveaux d’infection des HCVpp ont été alors déterminés par l’analyse de l’activité luciférase (unités RLU) issue de l’expression du gène rapporteur de la luciférase transduit dans les cellules Huh7.5 infectées par les HCVpp. Lors du programme de lecture, l’appareil de mesure (luminomètre) injecte 25 µL de substrat de type luciférine (Bright-Glo™ Luciferase Assay System, Promega) déclenchant la réaction enzymatique, puis mesure l’activité luciférase pendant 10 sec.

Les résultats bruts obtenus et exprimés en unités RLU ont alors été analysés pour apprécier les éventuelles différences dans les niveaux d’infection des HCVpp wt versus ceux des HCVpp mutées. Pour confirmer les éventuelles tendances observées, elles devaient être reproduites dans au moins trois expériences indépendantes.

b). Tests d'infection différentielle des HCVpp

Pour réaliser les tests d'infection différentielle, les cellules Huh7.5 surexprimant de manière stable les corécepteurs CD81, SR-BI, CLDN-1 ou OCLN et exprimant également le gène de résistance à la blasticidine ont tout d'abord été distribuées sur plaque stérile de 96 puits à fond plat adaptée à la culture cellulaire, à raison de 1,5 x 10^4 cellules/puits dans un volume final de 200 µL. Les cellules Huh7.5 contrôles exprimant uniquement le gène de résistance à la blasticidine ont également été distribuées sur la plaque de la même manière. Les cellules ont été ensuite incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 24 heures. Ces cellules ont ensuite servi aux tests d'infection différentielle. Les procédures expérimentales allant de l'infection des cellules Huh7.5 par les HCVpp jusqu'à la lecture de l'activité luciférase étaient identiques à celles utilisées lors des tests d'infection brute (voir section précédente), avec le milieu de culture nutritif pour cellules Huh7.5 supplémenté de blasticidine à une concentration finale de 10 µg/mL.

Les résultats bruts obtenus et exprimés en unités RLU sur les types cellulaires surexprimant les différents corécepteurs ont été convertis en multiple d'infection par rapport au niveau d'infection de base obtenu sur les cellules Huh7.5 contrôles. Ces multiples d'infection ont alors été comparés entre HCVpp wt et mutées pour évaluer si la SM introduite induisait une augmentation de la dépendance à un ou plusieurs corécepteurs cellulaires du VHC. Pour confirmer les éventuelles tendances observées, elles devaient être reproduites dans au moins trois expériences indépendantes.

5). Tests de neutralisation des HCVpp sur lignée d'hépatome humain Huh7.5

Les tests de neutralisation des HCVpp ont été effectués à partir de sérums de patients de la cohorte. Les critères de sélection des sérums étaient les suivants :

- La souche circulant dans le sérum devait être de génotype identique à celui auquel la SM étudiée est rattachée
- La souche circulant dans le sérum devait contenir dans sa séquence E1/E2 la SM étudiée
- Le sérum utilisé devait avoir été collecté avant l'initiation du traitement antiviral (sérum S0)

Pour réaliser les tests de neutralisation, les cellules Huh7.5 ont tout d'abord été distribuées sur plaque stérile de 96 puits à fond plat adaptée à la culture cellulaire, à raison de 1,5 x 10^4 cellules/puits dans un volume final de 200 µL. Les cellules ont été ensuite incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 24 heures. Ces cellules ont ensuite servi aux tests de neutralisation.

Procédure de l'étape des tests de neutralisation des HCVpp par des sérums de patients séropositifs au VHC sur cellules Huh7.5 :

Pour un test de neutralisation :
En premier lieu, le sérum séropositif au VHC (VHC+) sélectionné est dilué en cascade de 1/5 jusqu'à 1/80 dans du milieu de culture Huh7.5. En parallèle, un sérum séronégatif au VHC (VHC-) bien caractérisé est dilué au 1/5 : ce sérum VHC- servira de contrôle de référence.
Les suspensions de HCVpp wt et mutées à tester pour leur potentiel à être neutralisées par le sérum de patient VHC+, et dont les quantités ont été au préalable normalisées (d'après le dosage de l'antigène p24 du VIH), sont distribuées dans des microtubes stériles 1,5 mL à hauteur de 95 µL/tube. Ensuite, à chaque suspension sont ajoutés :
- 5 µL de sérum VHC+ pur ou 5 µL des dilutions de sérum VHC+ au 1/5, 1/20, 1/40 ou 1/80 pour obtenir (pour les HCVpp wt et mutées) la gamme de dilution finale suivante : 1/20, 1/100, 1/400, 1/800 et 1/1 600
ou
- 5 µL de sérum VHC- dilué au 1/5, pour obtenir (pour les HCVpp wt et mutées) une dilution finale au 1/100
ou
- 5 µL de milieu Huh7.5 pour obtenir des suspensions HCVpp wt et mutées sans sérum

Les mélanges HCVpp + sérum sont alors incubés pendant 1 heure à 37°C en vortexant toutes les 15 min, pour permettre la formation des complexes NAc-HCVpp.
Le milieu de culture des Huh7.5 est alors retiré et, après homogénéisation, 25 µL de HCVpp + sérum sont distribués sur les cellules (3 puits pour chaque HCVpp + sérum). L'infection des cellules par les HCVpp non-complexées à des NAc est conduite par une incubation des cellules inoculées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 3-4 heures. Ensuite, 200 µL/puits de milieu de culture Huh7.5 sont ajoutés et les cellules sont de nouveau incubées à 37°C et 5% de CO_2 pendant 72 heures.

Après 72 heures d'incubation, la lecture de l'activité luciférase dans les cellules infectées est réalisée comme décrit plus haut dans la section *"Tests d'infection brute des HCVpp"*.

Les résultats bruts obtenus et exprimés en unités RLU ont alors été analysés pour apprécier les éventuelles différences dans les niveaux de neutralisation des HCVpp wt *versus* ceux des HCVpp mutées. Les niveaux de neutralisation pour chaque dilution de sérum VHC+ ont été exprimés en pourcentages de neutralisation spécifique ($\%_{NS}$) selon la formule suivante :

$\%_{NS}$ = 100 – [100 x (niveau d'infectivité des HCVpp en présence de sérum VHC+ (en unités RLU) : infectivité des HCVpp servant de contrôle de référence (en unités RLU)]

Les différences dans les potentiels de neutralisation entre HCVpp wt et mutées ont été appréciées par les différences dans les titres de neutralisation (TN) en présence d'un même sérum VHC+. Les TN étaient définies par les dernières dilutions de sérum donnant un $\%_{NS} \geq 50\%$. Pour confirmer les éventuelles tendances observées, elles devaient être reproduites dans au moins trois expériences indépendantes.

6). Analyse de l'expression des glycoprotéines E1 et E2 du VHC dans les cellules HEK 293T productrices des HCVpp

Les niveaux d'expression des glycoprotéines E1 et E2 du VHC dans les cellules HEK 293T productrices des HCVpp ont été appréciés par Western-Blotting. Les différentes étapes allant de l'extraction des protéines à la révélation de leur niveau d'expression dans les cellules HEK 293T sont détaillées plus bas.

a). Extraction des protéines totales exprimées dans les cellules HEK 293T

Les culots cellulaires HEK 293T récupérés lors de l'étape de récolte des HCVpp (voir plus haut) ont été lysés avec 150 µL de tampon de lyse Glo Lysis Buffer 1x (Promega). Après une incubation à température ambiante pendant 10 min, les lysats cellulaires ont été centrifugés à 2 500 rpm pendant 10 min afin de faire sédimenter les débris cellulaires au fond du tube. Le surnageant contenant les protéines cellulaires totales a alors été récupéré.

b). Quantification des protéines cellulaires totales

Les protéines cellulaires totales récupérées ont ensuite été quantifiées par un dosage protéique en utilisant la trousse commerciale RC DC Protein Assay Reagents Package (Bio-Rad).

Procédure de l'étape de dosage protéique en utilisant la trousse commerciale RC DC Protein Assay Reagents Package (Bio-Rad) :

Pour le dosage d'une suspension de protéines d'intérêt :
En premier lieu, une gamme d'une solution protéique de concentration connue est préparée et sert de référence pour le calcul de la concentration en protéine dans la suspension d'intérêt. Cette gamme est préparée à partir d'une solution de BSA à 10 mg/mL qui subit une dilution en cascade au 1/2 pour obtenir des solutions de BSA à 0,156 mg/mL, 0,313 mg/mL, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL et 5 mg/mL. Les dilutions sont conservées à -20°C.

Sur la première ligne d'une plaque 96 puits à fond plat transparent, chaque dilution de la gamme BSA est distribuée sur deux puits à raison de 5 µL/puits, de la dilution la moins concentrée à la plus concentrée. Sur la deuxième ligne est distribuée la suspension de protéines d'intérêt à raison de 5 µL/puits (sur 2 puits).
En parallèle, pour 20 puits, 10 µL de réactif S (Bio-Rad) sont mélangés à 500 µL de réactif A (Bio-Rad). Ensuite, 25 µL du mélange S+A sont ajoutés aux protéines déposées sur la plaque. Pour finir, 200 µL de réactif B (Bio-Rad) sont introduits dans les puits contenant les mélanges protéines+S+A et ces mélanges réactionnels sont incubés 10 min à température ambiante. Au cours de l'incubation, les réactifs permettent au contact des protéines de générer une coloration bleutée d'intensité plus ou moins importante, en fonction de la teneur en protéine.
L'intensité de coloration est alors mesurée à une longueur d'onde de 650 nm grâce à l'option de spectrophotométrie de l'appareil Mithras LB 940 Multimode reader (Berthold Technologies).

Grâce à la mesure des densités optiques (DO) de la gamme BSA qui correspondent à des concentrations protéiques connues, la DO mesurée pour la suspension des protéines d'intérêt peut alors être convertie en concentration protéique (en mg/mL).

c). Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) et transfert électrophorétique sur membrane de PVDF

Tout d'abord, pour chaque suspension, 30 µg de protéines cellulaires totales ont été reprises dans du tampon de charge pour protéine contenant du SDS (*sodium dodecyl sulfate*) puis ont été dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 min.

La totalité des protéines dénaturées dans le tampon de charge et 10 µL de marqueur de poids moléculaire Ladder All Blue (Bio-Rad) ont ensuite été introduits sur un gel SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) séparé en deux phases, un gel de concentration à 5% en polyacrylamide et un gel de séparation à 12% en polyacrylamide. Les protéines ainsi chargées ont alors été séparées par électrophorèse selon les conditions de temps et de voltage suivantes : 15-20 min à 80V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le gel de séparation suivie de 1h30-2h à 120V jusqu'à ce que le front de migration atteigne la base du gel de séparation.

Une fois la migration terminée, le gel de séparation a été découpé et placée en contact d'une membrane Hybond–P PVDF (*polyvinylidene difluoride*) (GE Healthcare) dans une cuve de transfert électrophorétique. Les protéines séparées ont alors été transférées sur la membrane de PVDF à 300 mA pendant 1h15.

d). Immunodétection et révélation des glycoprotéines E1 et E2

L'immunodétection a été effectuée par révélation des glycoprotéines E1 et E2 par des Ac primaires monoclonaux de souris spécifiques à E1 et E2. Les Ac primaires ont été ensuite révélés sur leur fragment Fc par des Ac secondaires monoclonaux anti-souris qui sont couplés à une enzyme phosphatase alcaline. Grâce à l'utilisation d'un substrat spécifique à cette enzyme et une excitation laser, la révélation des glycoprotéines a été effectuée par chimio-fluorescence.

Immunodétection des glycoprotéines E1 et E2 en présence des Ac primaires :

Avant incubation de la membrane PVDF en présence de l'Ac primaire, les sites aspécifiques de la membrane sont bloqués par incubation de cette dernière dans du tampon PBS-Tween supplémenté à 4% de lait écrémé. L'incubation est effectuée à +4°C sur agitateur balancelle pendant 16-18 heures.
Les bains d'anticorps primaires ciblant E1 et E2 sont préparés de la manière suivante :

- Le mAc 11-B7 de souris spécifique de la glycoprotéine E1 (concentration mère à 1,4 µg/µL) est dilué au 1/1 000 dans du tampon PBS-Tween supplémenté à 1% de lait écrémé.
- Le mAc AP33 de souris spécifique de la glycoprotéine E2 (concentration mère à 5 µg/µL) est dilué au 1/2 000 dans du tampon PBS-Tween supplémenté à 1% de lait écrémé.

Les poids moléculaires attendus des glycoprotéines E1 et E2 sont respectivement d'environ 31 kDa et 70 kDa, la membrane de PVDF est ainsi découpée en deux en suivant la marque du marqueur de poids moléculaire indiquant 50 kDa. La partie de la membrane contenant les protéines ayant un poids moléculaires > 50 kDa est incubée avec le bain d'anticoprs primaire AP33 alors que la partie de la membrane comportant les protéines de poids moléculaires < 50 kDa est incubée avec le bain d'Ac 11-B7. L'incubation est effectuée à température ambiante sur agitateur balancelle pendant 1h30-2h. Les deux parties de la membrane subissent ensuite trois lavages successifs dans du PBS-Tween. Chaque lavage est effectué à température ambiante sur agitateur balancelle pendant 10 min.

Immunodétection des glycoprotéines E1 et E2 en présence de l'Ac secondaire :

Après le dernier lavage dans du PBS-Tween, les deux parties de la membrane sont ensuite rassemblées et incubées à température ambiante sur agitateur balancelle pendant environ 1h dans un bain d'Ac secondaire préparé de la manière suivante : un mAc anti-souris couplé à une enzyme phosphatase alcaline qui reconnaît le fragment Fc des Ac de souris (anti-mouse IgG alkaline phosphatase linked whole antibody (from goat), GE Healthcare), est dilué au 1/10 000 dans du tampon PBS-Tween.

Les deux parties de la membrane subissent ensuite deux lavages successifs dans du PBS-Tween suivi d'un lavage dans du PBS. Chaque lavage est effectué à température ambiante sur agitateur balancelle pendant 10 min.

La membrane est alors transférée dans du PBS frais.

Révélation des glycoprotéines E1 et E2 sur le scanner de lecture Typhoon Trio high performance fluorescence scanner (GE Healthcare) :

Les deux parties de la membrane sont égouttées pour retirer l'excédent de PBS. Les surfaces entières de ces parties de la membrane sont mises en contact, face protéines, avec du substrat ECF™ (Enhanced Chemifluorescence, GE Healthcare).

Après 10 min d'incubation à température ambiante avec le substrat ECF™, les membranes sont égouttées pour retirer l'excédent de substrat et sont déposées face protéines sur la vitre du scanner Typhoon Trio high performance fluorescence scanner (GE Healthcare), qui va permettre après excitation laser de révéler les glycoprotéines E1 et E2 marquées.

Brièvement, l'enzyme phosphatase alcaline déphosphoryle le substrat ECF™ qui génère alors un produit fluorescent localisé au niveau du site catalytique de l'enzyme. Par une excitation laser, le produit émet alors une fluorescence permettant la révélation des glycoprotéines E1 et E2 spécifiquement marquées.

Références :

Aurora, R., Donlin, M. J., Cannon, N. A. & Tavis, J. E. (2009). Genome-wide hepatitis C virus amino acid covariance networks can predict response to antiviral therapy in humans. *J Clin Invest* 119, 225-236.

Haid, S., Windisch, M. P., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2010). Mouse-specific residues of claudin-1 limit hepatitis C virus genotype 2a infection in a human hepatocyte cell line. *J Virol* 84, 964-975.

Moenne-Loccoz, R., Velay, A., Habersetzer, F., Doffoël, M., Gut, J.-P., Baumert, T. F., Stoll-Keller, F. & Schvoerer, E. (2011). Analysis of hepatitis C variability by cloning and sequencing: Technical recommendations. *Curr Top Virol* 9, 35-41.

Parker, J. M., Guo, D. & Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25, 5425-5432.

Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Patel, A. H., Meisel, H., Baumert, J., & other authors. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6025-6030.

Rispeter, K., Lu, M., Lechner, S., Zibert, A. & Roggendorf, M. (1997). Cloning and characterization of a complete open reading frame of the hepatitis C virus genome in only two cDNA fragments. *J Gen Virol* 78 (Pt 11), 2751-2759.

Sheehy, P., Scallan, M., Kenny-Walsh, E., Shanahan, F. & Fanning, L. J. (2005). A strategy for obtaining near full-length HCV cDNA clones (assemblicons) by assembly PCR. *J Virol Methods* 123, 115-124.

Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269, 32678-32684.

REVUE TECHNIQUE PUBLIEE

Moenne-Loccoz, R., Velay, A., Habersetzer, F., Doffoël, M., Gut, J.-P., Baumert, T. F., Stoll-Keller, F. & Schvoerer, E. (2011). Analysis of hepatitis C variability by cloning and sequencing: Technical recommendations. *Curr Top Virol* 9, 35-41.

Current Topics in Virology

Mini-Review

Analysis of hepatitis C variability by cloning and sequencing: Technical recommendations

Rémy Moenne-Loccoz[1,2], Aurélie Velay[1,2], François Habersetzer[3], Michel Doffoël[3], Jean-Pierre Gut[1,2,4], Thomas F. Baumert[1,2,3,4], Françoise Stoll-Keller[1,2,4,*], and Evelyne Schvoerer[1,2,4]

[1]Unité Inserm U748, [2]Université de Strasbourg, [3]Pôle Hépato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, [4]Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67091 Strasbourg, France

ABSTRACT

Hepatitis C variability is a field of numerous investigations. Information drawn from these studies is useful for a better comprehension of hepatitis C virus-related disease and for development of new preventive or therapeutic tools. With this aim, a critical analysis of viral quasispecies obtained by cloning and sequencing needs to follow some recommendations. From extraction procedure of high quality with careful conservation of RNA extracts, results should be obtained by reliable RT-PCR systems with random and/or degenerated primers in order to avoid any possible selection bias. The recommendations are exposed and discussed in detail to obtain reliable experimental data for valid biological findings.

KEYWORDS: reverse transcription, polymerase chain reaction, cloning, bias, technical recommendations, quasispecies, hepatitis C virus

I. INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) contains a single-strand positive RNA genome and displays a high genetic diversity. The mean frequency of nucleotidic mutations is 1.4-1.9 x 10^{-3} substitutions/nucleotide/year, due to defect in repair activity of the RNA-dependent RNA polymerase. Virus isolates were classified into at least 6 different genetic groups differing from each other by about 30% at the nucleotide level. The regions of HCV genome with crucial functions (translation, replication) and with structural constraints (non-coding genome extremities) are rather conserved. The most variable regions correspond to envelope glycoproteins E1 and E2, especially hypervariable regions (HVR)-1, -2 and -3. The N-terminal 27 amino acids fragment of the envelope glycoprotein E2, HVR-1, is the most divergent among HCV isolates and contains epitopes which are recognized by antibodies produced by patients. HVR-1 variability is essentially due to strong host-related humoral pressure [1]. At the same time, chemico-physical properties and conformation of HVR-1 are quite conserved [2], consistently with its important role in HCV entry. This example of opposite forces between conservation of structures/functions in HCV virions and variations of certain regions under immunological and/or treatment-related pressure lead to a chronic phase of HCV infection in 80% of the cases, and to frequent anti-HCV treatment failures, respectively. The analysis of these opposite constraints and, for our topic, of viral variability, is indeed an interesting approach to understand

*Corresponding author: Pr Françoise Stoll-Keller, Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Stasbourg, F-67091 Strasbourg, France
francoise.stoll@unistra.fr

better the physiopathology of HCV infection, frequent failure of antiviral treatment and how to develop vaccination programs.

This short review will focus on technical recommendations to take into account for critical analysis of viral quasispecies by cloning and sequencing in this context. From careful preparation of RNA extracts, strong data should be obtained by reliable Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) systems with random and/or degenerated primers in order to avoid any possible selection bias and/or artefacts. Bio-informatical analyses should be performed with critical precautions. The recommendations to be followed will be exposed in detail to obtain strong experimental data able to draw strong biological hypotheses.

II. Technical approach of viral variability

HCV variability was first explored by direct sequencing, allowing investigators to collect and analyze numerous viral strains, to define types and subtypes and to mount efficient pre-treatment orientation of successive therapy by pegylated interferon and ribavirin. This method produces a consensus nucleotide sequence, without detailed information on the composition of viral variants evolving in infected patients.

Elsewhere, study of HCV variability can be approached by the analysis of viral quasispecies, defined by HCV variants slightly different but genetically linked and present at a certain time point. These investigations started a few years ago and were facilitated by automated sequencing. They give a good reflect of different variants distribution in a quasispecies for one patient, in one biological compartment, at a precise date of the evolution of viral infection and can be followed according to time [3, 4]. Two main technical approaches have been used in this context.

The preliminary studies in this field often were based on analysis of single-strand conformation polymorphisms (SSCPs) after migration of PCR products, giving a general overview of viral quasispecies content without detailed description of nucleotide composition [5, 6].

Afterwards, to describe the composition of quasispecies precisely, the majority of teams performed their investigations by sequencing a sufficient number of clones, i.e. 10 or even more variants up to 40 clones ideally, giving a reliable picture of viral variants molecular features [7, 8]. However, this elegant exploration of HCV according to various clinical prognostic, to different biological compartments and to chronological evolution of viral infection is quite complex and should take into account some technical precautions which will be developed in the following part of this manuscript.

III. Technical recommendations for viral RT-PCR-cloning and sequencing with the aim to explore quasispecies distribution

In order to obtain a reliable viral quasispecies by RT-PCR-cloning and sequencing, whatever the scientific question is, one has to examine the different factors able to lead to amplification of a quasispecies which could be a bad reflect of the mixture of interest genes, such as HCV variants infecting a patient.

A few variations in PCR reactions could favour either a subgroup of HCV variants or another subgroup. The selection can occur in case of preferential denaturation, differential primers hybridization or variable polymerase elongation. Another potential hypothesis for bias is linked to a possible selection either due to the HCV genomic matrix itself which can be partially altered or to the micro-environment in RNA extract, potentially disturbing primers annealing. Complex molecular interactions giving artefacts such as molecular chimeras can also disturb reliability of the analyses. As an evidence, enzyme fidelity has to be verified before its extensive use in PCR process. At last, a bias due to cloning selection has also to be eliminated.

The key points of technical bias/artefacts risks will be discussed.

III.a. Quality of primers used in (RT)-PCR

A PCR selection or non random PCR bias can occur if certain viral variants in a quasispecies are advantaged and, as a consequence, are artificially overestimated.

The selection of viruses can occur in case of preferential denaturation due to GC content (either

in genomic matrix or in primers), differential efficacy of primers hybridization (which can be reduced by the use of degenerated primers) or, elsewhere, variable polymerase elongation linked to secondary structures in genomic target [9, 10]. More generally, factors determining the impact of mismatches in primers annealing to genomic targets include primers length, nature and location of mismatches, hybridization temperature, presence of solvents, primers concentration and quantity of cationic ions [10].

An approach tending to improve the reliability of (RT)-PCR amplification consists of the best choice of specific primers. It is generally admitted that degenerated primers are more confident in large spectrum amplification. They are supposed to represent a good alternative in the balance between too high matching of the primers with certain targets subsequently advantaged and too high degree of variability in degenerated primers mix decreasing affinity of the molecular tools for different variants of viral quasispecies. However, *Polz and Cavanaugh* observed a PCR selection with degenerated primers. Indeed, by choosing a degenerated primers pair frequently used in characterization of bacterial 16S rDNA (27F/ 1492R), they obtained a preferential amplification of genes containing G or C compared to A or T within hybridization sites targeted by the primers at the degenerated positions. One explanation of this bias could be the stronger binding energy between G and C (due to triple hydrogen bound) than between A and T [9, 11]. This point has to be taken into account when designing degenerated primers.

Bracho et al. studied genetic variability first in E1 and E2 (HVR-1 et -2) and second in NS5A (ISDR - interferon sensitivity determining region, and variable region V3) in eight patients infected by HCV genotype 1. Each genetic fragment was amplified twice with two primers sets slightly different but both degenerated. After cloning and sequencing, genetic variability was explored and gave significantly different genetic distributions for all patients except one. The authors attributed this differential amplification to differences in degeneracy level existing between both primers sets. Finally, the two main conclusions drawn by the authors were as following: the viral variability observed by the way of PCR procedures has to be considered as a minimum level, and the viral sequences obtained after (RT)-PCR depend on the quality of the primers design [10].

In the same context, *Fan et al.* investigated HVR-1 variability of HCV by using four RT-PCR procedures and concluded that mismatches between primers used in RT steps and targeted matrix could lead to sequences selection [12].

As a summary of this part, when analyzing variability of viruses such as HCV showing a potential high level of genetic plasticity, random hexameric primers could represent the best choice for RT step. In any case, a cautious design of gene specific primers has to be performed, by comparison with numerous corresponding targeted sequences in international database, within a conserved segment of the genome of interest. However, in case of polymorphism(s) in the conserved site, partially degenerated primers could represent a good compensatory solution. Additionally, a second run of PCR amplification by using a second primers set can be informative and reinforce data reliability if reproducible variants distribution is observed.

III.b. Possible artefacts by molecular interactions during PCR amplification of multiple genes

Bias and artefacts in the amplification of a mixture of genes which are close one to the others have to be avoided. Indeed, non specific molecular interactions tend to occur during the last PCR amplification cycles.

Suzuki and Giovannoni compared mixtures of two different 16S rDNA according to various initial ratios (i.e., 1/4, 2/3, 3/2 and 4/1) after amplification with primers pair 27F-338R. After 35 PCR cycles, ratios of final products were always next to 1/1. One hypothesis consists of re-hybridization of PCR products during annealing step where temperature is under DNA melting point and which can occur when concentration of PCR products is high enough. During amplification of a genes mixture, re-hybridization happens faster for the most abundant PCR product and prevents primers annealing. This leads to an amplification rate which declines faster for the most abundant than for the rare PCR product in the last PCR cycles [11, 13].

Thus, artificial overestimation of certain genes could be diminished by decreasing the number of PCR cycles. In the same context, *Kurata et al.* also hypothesized that re-hybridization could occur, but, rather by formation of homoduplexes during transition from denaturation to hybridization [14]. This could be avoided by thermocyclers with a fast ramp rate able to perform quick transition steps.

Moreover, *Kanagawa* listed two distinct mechanisms of PCR artefacts both occurring late during PCR run: either formation of hetero-duplexes giving after cloning possible artificially corrected sequences, or production of molecular chimeras favoured by partially elongated primers or template-switching [11]. Finally, these artefacts give a wrong reflect of the initial genes mixture and could be also minimized by limiting the number of PCR cycles.

III.c. Crucial role of enzyme fidelity used in RT-PCR process

Typically, mean error rate by a *Taq* polymerase during PCR is estimated to vary between 2×10^{-4} and $< 1.2 \times 10^{-5}$ mutations/nucleotide/cycle according to PCR conditions and targeted templates [15]. Oppositely, DNA polymerases with proofreading activity exhibits a mean error rate globally estimated to 10^{-6}. This part insists on the interests of DNA polymerases with proofreading activity which are unanimously admitted by authors exploring gene variability by the mean of PCR.

In an investigation analyzing quasispecies distribution, *Mullan et al.* observed different results after PCR amplification of identical cDNA derived from three distinct HCV-positive sera, either by a *Taq* polymerase or by a *Pwo* polymerase with proofreading activity. After cloning and sequencing, their data collected in HVR-1 of E2 and NS5A ISDR showed a strong advantage for the proofreading enzyme. Considering only non-synonymous mutations, 10-19 and 0-11 polymorphisms were observed for *Taq* and for *Pwo*, respectively [16, 17]. In the same context, *Bracho et al.* obtained similar results with 8-12 non-synonymous mutations in two 500 bp-length regions of Vesicular Stomatitis Virus amplified by a *Taq* polymerase compared to the low rate observed with proofreading thermostable *Pfu* enzyme, i.e. 0-3 non-synonymous mutations [17, 18]. Importantly, in these two studies, *Taq*-derived clones globally showed an increased proportion of unique polymorphisms which argued in favour of punctual *Taq*-introduced mutations rather than real quasispecies variability.

Malet et al. tested four different proofreading DNA polymerases (*eLONGase* (Invitrogen), *Expand High Fidelity* (Roche), *Pfu* (Promega), *Pwo* (Roche)) and one reference *Taq* polymerase (Applied Biosystems) which were evaluated by performing cloning and sequencing on PCR products from 5'-UTR (untranslated region) belonging to a known HCV plasmid. The authors recovered errors rates in the range expected by the manufacturers with proofreading DNA polymerases producing between 3 and 10 times less errors compared to the rate obtained with the *Taq* polymerase [17, 19].

One way to decrease errors rates due to *Taq* polymerases consists of the use of equimolar concentrations of dNTPs and $MgCl_2$ co-factor. However, this procedure requires a very long PCR extension time and fidelity is under that obtained with proofreading enzymes, i.e., 10^{-5} versus 10^{-6} errors/site/cycle, respectively [15, 17, 20].

Concerning reverse transcriptases, they contain an intrinsic error rate and their ability to polymerize cDNA can be affected by primer-matrix mismatches. Nevertheless, the fidelity of reverse transcriptases is significantly higher than that of *Taq* polymerases and primer-matrix mismatches affect significantly less cDNA polymerization than polymerization during *Taq*-mediated amplification [17].

By using a DNA polymerase with proofreading activity (i.e., *Pfu*), *Domingo-Calap et al.* recently investigated reliability of RT-PCR-cloning procedure in the characterization of HCV E1 and E2 glycoproteins variability. In order to assess artefacts linked to RT-PCR process, RNA was obtained by *in vitro* transcription of one unique HCV molecular clone and then was reverse transcripted with random hexamers. The authors diluted cDNA at 1/10 and 1/5000 and amplified both dilutions with *Pfu* and degenerated primers. If mutations were introduced during PCR amplification, sequences derived from cDNA 1/5000 should have shown an increased error rate

compared to cDNA 1/10 because approximately 9 additional PCR cycles were applied to the 1/5000 dilution. No statistically significant difference was detected between both groups of sequences, indicating that for their experiments, most of mutations could occur during *in vitro* transcription and/or RT step. Importantly, the same RT-PCR-cloning process (without cDNA dilution) was performed on RNA from 18 patients infected by HCV genotype 3a. Since average intra-patient mutation frequency was approximately 15-fold higher than average frequency of RT-PCR-induced errors, the authors concluded that RT-PCR and subsequent cloning is reliable for the investigation of viral variability in their experimental conditions [21]. However, they insisted in possible RT-PCR artefacts – potentially linked to RNA secondary structures –, which preferentially occurred in HVR-2 of HCV E2 in their study for example. These particular RNA structures could have a negative impact on reverse transcriptase fidelity.

As a consequence, some recommendations can be suggested: an initial denaturing step should be done before any RT-PCR; moreover, a stable reverse transcriptase working at high temperatures between 42°C and 55°C should be preferred in order to allow a better RNA linearization during cDNA processing. Obviously, proofreading enzymes are a crucial need in good procedures devoted to exploration of genetic variability.

III.d. Bias risk during molecular cloning of RT-PCR products

After RT-PCR, the analysis of molecular clones obtained by individual insertion of PCR products in a plasmidic vector followed by transformation in a bacterial host (generally *E. Coli*), is a

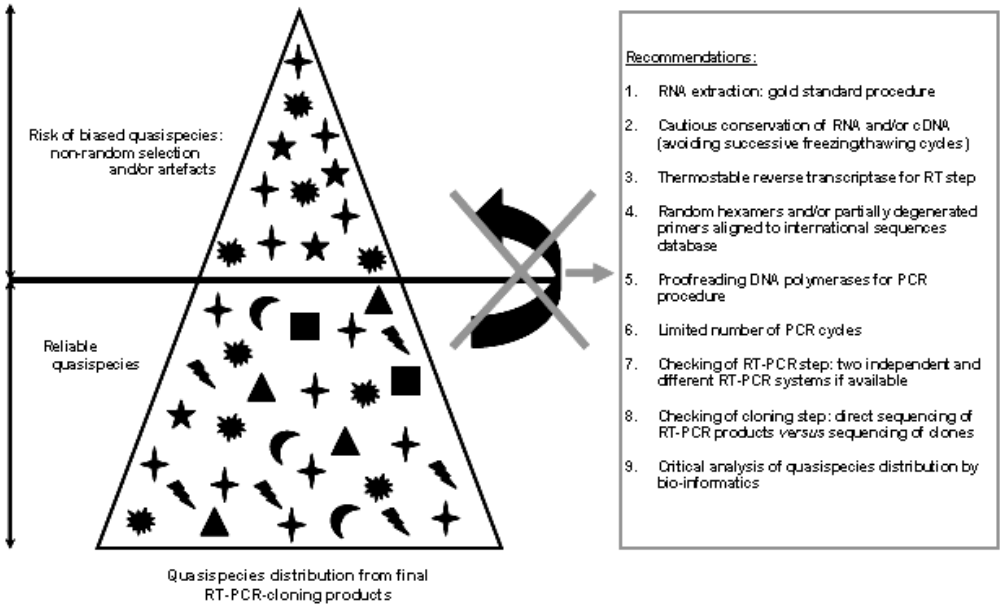


Figure 1. Schematic representation of recommendations to avoid bias during investigation of viral variability by RT-PCR-cloning procedure. Symbols within the big triangle correspond to quasispecies variants obtained by cloning after RT-PCR process. If selection bias occurs, certain variants which were advantaged during RT-PCR-cloning can be recovered, although they are not highly represented in the real quasispecies (black five-pointed star). Conversely, other variants can be artificially absent (e.g., black square). Recommendations aiming to avoid bias are listed in the right side of the figure.

standard procedure used in order to investigate genetic variability. *Drake et al.* reported that mutation rate during DNA replication in *E. Coli* was very low (5.4×10^{-10} mutations/base pair/replication) [22].

However, *Forns et al.* observed a cloning bias when transforming *E. Coli* with plasmids containing structural HCV genes (nucleotides 1-2646 of the ORF) amplified by RT-PCR from plasma viral RNA of patient H (strain H77, genotype 1a). Indeed, all the clones contained stop codons or frame-shift mutations giving defective constructs for the translation, maybe due to a potential toxicity of HCV proteins for *E. Coli* [23]. One way to diminish or eliminate this kind of selection is to change or modify either vector or insert, such as suggested *Forns et al.* in their publication.

Moreover, systematic direct sequencing of RT-PCR products should be performed and compared with sequences subsequently obtained after cloning, in order to verify the similarity between the two steps and to avoid any selection bias. In this way, the sequences have to be concordant with an identity approaching 100%.

IV. CONCLUSIONS

As conclusive recommendations, given the risk of possible selection bias and/or artefacts with RT-PCRs, technical features are important in this context and a few precautions have to be taken into account (see conclusive Figure 1).

All the experiments have to be performed after RNA extraction following gold standard procedures and conservation of RNA extracts and/or cDNA has to be cautious by avoiding successive freezing/thawing cycles. A systematic initial denaturing step of RNA template should be done before RT-PCR and a stable reverse transcriptase working at high temperatures should be preferred for cDNA processing. Random hexameric primers could represent the best choice for RT step and, more generally, careful design of gene specific primers has to be performed, by comparison with numerous corresponding targeted sequences within a conserved genomic region. In case of polymorphism(s), partially degenerated primers should be chosen. In this kind of molecular approach, the use of polymerases with proofreading activity has to be respected for PCR in order to avoid the production of inaccurate and misleading data. Moreover, only a limited number of PCR cycles should be performed in order to prevent non-specific molecular interactions occurring late during amplification run.

Ideally, concordant results obtained by two RT-PCR assays with two different RT-PCR systems using different primers sets on two distinct nucleic acid extracts should be checked before further, in-depth characterization of HCV quasispecies. This will eliminate risks of artificial selection due to either microenvironment of nucleic acid extract, to genomic matrix features, or to primers-mediated bias.

Additionally, a comparison should be done between sequences obtained after direct sequencing of PCR products and variants produced by cloning, in order to exclude a non-random selection of viral clones.

At last, when performing final analyses, viral variability observed by way of PCR procedures has to be considered as a minimum level, cautiously considering highly homogeneous variants clusters which are distinct from the global quasispecies distribution. Critical phylogenetic analyses have to be performed before further functional investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Fondation Transplantation (Saint-Apollinaire, France), Région Alsace (France), Abbott Molecular and Roche Pharma (French departments) for their support of Rémy Moenne-Loccoz (PhD student). Aurélie Velay received financial help from A.R.S. Lorraine (France) (one year fellowship for her Master 2 level).

REFERENCES

1. von Hahn, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehermann, B., Balfe, P., and McKeating, J. A. 2007, Gastroenterology, 132, 667-678.
2. Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J. M. 2004, Hepatology, 39, 5-19.

3. Pellerin, M., Lopez-Aguirre, Y., Penin, F., Dhumeaux, D., and Pawlotsky, J. M. 2004, J. Virol., 78, 4617-4627.
4. Roque-Afonso, A. M., Ducoulombier, D., Di Liberto, G., Kara, R., Gigou, M., Dussaix, E., Samuel, D., and Féray, C. 2005, J. Virol., 79, 6349-6357.
5. Asselah, T., Martinot, M., Cazals-Hatem, D., Boyer, N., Auperin, A., Le Breton, V., Erlinger, S., Degott, C., Valla, D., and Marcellin, P. 2002, J. Viral Hepat., 9, 29-35.
6. Neau, D., Jouvencel, A. C., Legrand, E., Trimoulet, P., Galperine, T., Chitty, I., Ventura, M., Le Bail, B., Morlat, P., Lacut, J. Y., Ragnaud, J. M., Dupon, M., Fleury, H., and Lafon, M. E. 2003, J. Med. Virol., 71, 41-48.
7. Torres-Puente, M., Bracho, M. A., Jiménez, N., García-Robles, I., Moya, A., and González-Candelas, F. 2003, J. Gen. Virol., 84, 2343-2350.
8. Gao, G., Stuver, S. O., Okayama, A., Tsubouchi, H., Mueller, N. E., and Tabor, E. 2005, J. Viral Hepat., 12, 46-50.
9. Polz, M. F. and Cavanaugh, C. M. 1998, Appl. Environ. Microbiol., 64, 3724-3730.
10. Bracho, M. A., García-Robles, I., Jiménez, N., Torres-Puente, M., Moya, A., and González-Candelas, F. 2004, Virol. J., 1, 13.
11. Kanagawa, T. 2003, J. Biosci. Bioeng., 96, 317-323.
12. Fan, X., Lyra, A. C., Tan, D., Xu, Y., and Di Bisceglie, A. M. 2001, Biochem. Biophys. Res. Commun., 284, 694-697.
13. Suzuki, M. T. and Giovannoni, S. J. 1996, Appl. Environ. Microbiol., 62, 625-630.
14. Kurata, S., Kanagawa, T., Magariyama, Y., Takatsu, K., Yamada, K., Yokomaku, T., and Kamagata, Y. 2004, Appl. Environ. Microbiol., 70, 7545-7549.
15. Eckert, K. A. and Kunkel, T. A. 1990, Nucleic Acids Res., 18, 3739-3744.
16. Mullan, B., Kenny-Walsh, E., Collins, J. K., Shanahan, F., and Fanning, L. J. 2001, Anal. Biochem., 289, 137-146.
17. Mullan, B., Sheehy, P., Shanahan, F., and Fanning, L. 2004, J. Viral Hepat., 11, 108-114.
18. Bracho, M. A., Moya, A., and Barrio, E. 1998, J. Gen. Virol., 79 (Pt 12), 2921-2928.
19. Malet, I., Belnard, M., Agut, H., and Cahour, A. 2003, J. Virol. Methods, 109, 161-170.
20. Kwiatowski, J., Skarecky, D., Hernandez, S., Pham, D., Quijas, F., and Ayala, F. J. 1991, Mol. Biol. Evol., 8, 884-887.
21. Domingo-Calap, P., Sentandreu, V., Bracho, M. A., González-Candelas, F., Moya, A., and Sanjuán, R. 2009, J. Virol. Methods, 161, 136-140.
22. Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J. F. 1998, Genetics, 148, 1667-1686.
23. Forns, X., Bukh, J., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13909-13914.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

Publications :

- Schramm F, **Moenne-Loccoz R**, Fafi-Kremer S, Soulier E, Royer C, Weitten T, Brignon N, Ellero B, Woehl-Jaegle ML, Meyer C, Wolf P, Doffoel M, Baumert TF, Gut JP, Stoll-Keller F, Schvoerer E. Study of hepatitis C virus leukotropism by characterization of viral quasispecies in the liver transplantation setting. Pathol. Biol. (Paris). *2008*, 56: 487-91.

- **Moenne-Loccoz R**, Razafinjatovo C, Habersetzer F, Ananna A, Doffoël M, Wolf P, Gut J-P, Baumert T, Stoll-Keller F, Schvoerer E. Tropism of hepatitis C virus for leukocytes – Importance of the analysis of viral E1 and E2 envelope glycoprotein genes by sequencing. Pathol. Biol. (Paris). *2010*, 58(2): 170-4.

- **Moenne-Loccoz R**, Velay A, Habersetzer F, Doffoël M, Gut JP, Baumert TF, Stoll-Keller F, Schvoerer E. Analysis of hepatitis C variability by cloning and sequencing: Technical recommendations. Curr. Top. Virol. *2011*, 9: 35-41.

Communications orales :

- **Moenne-Loccoz R**, Velay A, Murray JM, Habersetzer F, Carolla P, Doffoël M, Baumert TF, Gut JP, Stoll-Keller F, Schvoerer E. Signatures moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite C de génotype 1 et résistance au traitement antiviral. 30ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), *2-3 Décembre 2010*. Paris, France.

- **Moenne-Loccoz R**, Velay A, Murray JM, Turek M, Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, Erba AC, Habersetzer F, Doffoël M, Gut JP, Stoll-Keller F, Baumert TF, Schvoerer E. Influence des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite C de génotype 1 sur le traitement antiviral. 31ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), *1-2 Décembre 2011*. Paris, France.

Communications affichées :

- **Moenne-Loccoz R**, Razafinjatovo C, Fafi-Kremer S,, Habersetzer F, Ananna A, Doffoël M, Baumert TF, Gut JP, Stoll-Keller F, Schvoerer E. Observatoire des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du virus de l'hépatite C – Impact de ces glycoprotéines sur la réponse au traitement antiviral Interféron pégylé/ribavirine chez des patients atteints d'hépatite chronique C. XIèmes Journées Francophone de Virologie, *23-24 Avril 2009*. Paris, France.

- **Moenne-Loccoz R**, Razafinjatovo C, Fafi-Kremer S, Habersetzer F, Ananna A, Doffoël M, Baumert TF, Gut JP, Stoll-Keller F, Schvoerer E. Molecular signatures of hepatitis C virus envelope glycoproteins and response to antiviral treatment. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), *22-26 Avril 2009*. Copenhague, Danemark.

- **Moenne-Loccoz R**, Razafinjatovo C, Habersetzer F, Ananna A, Doffoël M, Baumert TF, Gut JP, Stoll-Keller F, Schvoerer E. Molecular signatures and predicted antigenic profiles of hepatitis C virus envelope glycoproteins and antiviral resistance. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, *3-7 Octobre 2009*. Nice, France.

- **Moenne-Loccoz R**, Razafinjatovo C, Habersetzer F, Ananna A, Doffoël M, Fafi-Kremer S, Gut JP, Baumert TF, Stoll-Keller Françoise, Schvoerer Evelyne. Molecular signatures and predicted antigen profiles of hepatitis C virus envelope glycoproteins according to response to antiviral treatment. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), *30 Octobre-3 Novembre 2009*. Boston, Massachusetts, USA.

- **Moenne-Loccoz R**, Velay A, Murray JM, Habersetzer F, Doffoël M, Fafi-Kremer S, Zeisel MB, Fofana I, Gut JP, Baumert TF, Stoll-Keller F, Schvoerer E, et le groupe de l'ANRS AC33-VHC. Hepatitis C virus envelope glycoproteins signatures and resistance to antiviral treatment. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), *30 Mars-3 Avril 2011*. Berlin, Allemagne.

- **Moenne-Loccoz R**, Velay A, Murray JM, Erba AC, Zeisel MB, Turek M, Fofana I, Fafi-Kremer S, Habersetzer F, Doffoël M, Gut JP, Stoll-Keller F, Baumert TF, Schvoerer E. Hepatitis C virus envelope glycoprotein signatures and resistance to antiviral treatment. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, *8-12 Septembre 2011*. Seattle, Washington, USA.

Résumé

Environ 160 millions de personnes sont chroniquement infectées par le virus de l'hépatite C (VHC) dans le monde. Le traitement antiviral de référence se compose de la combinaison interféron-α pégylé et ribavirine. Malheureusement, ce traitement n'est efficace que chez environ 50% des patients infectés par un VHC de génotype 1. Un enjeu majeur dans le domaine de la recherche sur le VHC est de mieux comprendre cette résistance virale au traitement. La haute variabilité des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC pourrait indirectement contribuer à la résistance par la sélection de souches avec un potentiel infectieux augmenté et/ou une capacité accrue à échapper à l'immunité de l'hôte. Nous avons évalué cette hypothèse par une approche bio-informatique combinée à des analyses fonctionnelles (pseudoparticules du VHC – système HCVpp). Les séquences des glycoprotéines d'enveloppe, des signatures moléculaires, des réseaux minimaux d'acides aminés covariants ont été corrélés avec la réponse au traitement antiviral. Trois des quatre signatures moléculaires définies sur E1/E2 et retenues pour les analyses fonctionnelles ont montré des résultats en accord avec l'hypothèse. Les résidus 431A et 642V corrélés à la non-réponse (NR) engendraient une diminution de la neutralisation des HCVpp médiée par les anticorps circulant dans du sérum pré-thérapeutique de patients, une augmentation 431A- ou 642V-dépendante de l'entrée des HCVpp, et une augmentation 431A-dépendante de l'interaction des HCVpp avec CD81 et SR-BI. Le résidu 219T lié à la réponse (R) diminuait le pouvoir infectieux des HCVpp. Les réseaux minimaux d'acides aminés covariants dans E1/E2 étaient capables de séparer les souches en relation avec la NR de celles liées à la R et comportaient trois des quatre signatures ponctuelles citées au-dessus. **Conclusion :** Nos études *in silico* et *in vitro* sont en faveur d'une contribution indirecte des glycoprotéines d'enveloppe du VHC dans l'efficacité du traitement. Les analyses fonctionnelles démontrent que les résidus 431A et 642V corrélés à la NR favorisent l'entrée des HCVpp associée à un échappement aux anticorps neutralisants alors que le résidu 219T lié à la R diminue l'entrée des HCVpp, suggérant que les interactions virus-hôte durant l'entrée virale peuvent être impliquées dans l'échec du traitement antiviral de référence.

Summary

About 160 millions of people are chronically infected by hepatitis C virus (HCV) worldwide. The standard of care treatment consists of pegylated interferon-α and ribavirin combination. Unfortunately, this treatment is efficient in only 50% of patients infected with HCV-genotype 1. A major challenge for antiviral treatment of HCV infection is viral resistance, which is incompletely understood. The high variability of HCV envelope glycoproteins may indirectly contribute to resistance by selection of strains with enhanced infectivity and/or escape from host immunity. This hypothesis was investigated with a bioinformatical approach combined to functional analyses (HCV pseudoparticle - HCVpp system). Envelope glycoprotein sequences, molecular signatures, covariant amino acid minimal networks were correlated with subsequent treatment response. Three out of the four E1/E2 molecular signatures retained for functional analyses showed relevant data. The nonresponse (NR)-related residues 431A and 642V provoked a decrease in antibody-mediated HCVpp neutralization by pre-treatment sera, a 431A or 642V-dependent increase of HCVpp entry, and a 431A-dependent increase of dependency to CD81 and SR-BI for HCVpp. The response (R)-related residue 219T decreased HCVpp infectivity. Minimal networks of covariant amino acids in E1/E2 could separate NR-related and R-related strains and included three out of the four punctual positions previously mentioned. **Conclusion:** Our *in silico* and *in vitro* investigations support an indirect contribution of HCV envelope glycoproteins to treatment efficacy. Functional analyses demonstrate that NR-related 431A and 642V favour HCVpp entry with concomitant escape from neutralizing antibodies while R-related 219T decreases HCVpp entry, suggesting that virus-host interactions during viral entry may be involved in the standard of care treatment failure.