

Université de Montréal

**Étude de la réponse immunitaire et de l'évolution de la  
quasiespèce du virus de l'hépatite C (VHC) durant la  
grossesse**

par  
Myriam Troesch

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en microbiologie et immunologie

Janvier 2006

© Myriam Troesch, 2006



W  
4  
U58  
2006  
v.099

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude de la réponse immunitaire et de l'évolution de la quasiespèce du virus de l'hépatite C  
(VHC) durant la grossesse

présentée par :  
Myriam Troesch

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. Diane Francoeur, président-rapporteur  
Dr. Hugo Soudeyns, directeur de recherche  
Dr. François Coutlée, membre du jury  
Dr. Stephen J. Polyak, examinateur externe  
Dre. Carolina Alfieri, représentante du doyen de la FES



## Résumé

Plusieurs femmes infectées par le virus de l'hépatite C (VHC) ont l'âge de porter un enfant et le risque de transmettre le virus à leur progéniture est d'environ 10%. Ayant des modes de transmission similaires, la coinfection par le VIH est fréquente et le risque de transmission mère-enfant augmente dans ce cas de plus de 4 fois.

La protéine F du VHC est codée dans un cadre de lecture alternatif qui chevauche la région de core. Une amplitude comparable des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques à la protéine F a été observée chez des patients infectés par le VHC seulement ou coinfectés, dont la plupart étaient des femmes enceintes. De plus, les patientes étant infectées par différents génotypes du VHC, les réponses immunitaires présentaient une réactivité antigénique croisée. Finalement, 3 nouveaux épitopes potentiels de CTL restreints par le HLA-A2 ont été identifiés. Ces indications ajoutées aux particularités de la protéine F indiquent qu'elle représente un candidat idéal en tant que composante d'un vaccin.

Nous avons ensuite examiné les variations de la pression sélective en effectuant une étude longitudinale de l'évolution des quasiespèces de la région HVR1 du VHC durant la grossesse. Tout d'abord, les patientes coinfectées par le VIH ont démontré un niveau d'AST et une charge virale VHC significativement plus élevés au 3<sup>e</sup> trimestre, ainsi qu'une évolution du nombre de variants HVR1 au cours de la grossesse significativement différente que chez les patientes mono-infectées. Les femmes coinfectées par le VIH étaient caractérisées par la persistance d'un variant HVR1 majoritaire et un ratio dN/dS plus faible par rapport aux patientes mono-infectées. Finalement, l'évolution de la quasiespèce entre 2 grossesses successives n'est pas corrélée avec la durée de l'intervalle intergénéral chez les patientes coinfectées. Ces résultats suggèrent que la coinfection par le VIH provoque une réduction de la pression immunitaire sur HVR1 durant la grossesse, et que cet effet est rétabli par le traitement HAART.

Finalement, nous avons caractérisé une nouvelle région hypervariable, dénommée HVR3, se situant entre HVR1 et HVR2 dans la glycoprotéine E2. Même si les valeurs des paramètres de la quasiespèce basée sur HVR3 ont tendance à être plus faibles, elles corrélaient avec celles de HVR1. Seules les patientes coinfectées par le VIH et traitées ont montré des valeurs significativement plus petites que chez les patientes mono-infectées. Comme pour HVR1, la coinfection par le VIH réduit la pression immunitaire spécifique à HVR3, qui a été rétablie par le traitement HAART. Finalement, les caractéristiques de la région HVR3 ont permis de la localiser à la surface de la glycoprotéine E2 et d'émettre des hypothèses quant à son rôle.

En conclusion, les patientes infectées par le VHC présentent des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques à la 11<sup>e</sup> protéine du VHC même au cours de la grossesse, et peuvent exercer une pression immunitaire sur les régions HVR1 et HVR3. Toutefois, la coinfection par le VIH et le traitement HAART doit être pris en compte car ils influencent le système immunitaire au cours de la grossesse.

**Mots-clés** : VHC, grossesse, protéine E, quasiespèces, HVR1, coinfection, HAART.

## Abstract

Many women infected with hepatitis C virus (HCV) are of childbearing age and the risk of transmission to their infant is approximately 10%. As the modes of transmission are the same, coinfection with human immunodeficiency virus (HIV) is frequent and in this case, the risk of mother-to-infant transmission of HCV increases by at least 4 times.

HCV F protein is encoded in an alternate reading frame overlapping the core protein region. F protein-specific humoral and cellular immune responses showed comparable magnitude in patients infected only with HCV and HIV-coinfected patients, most of whom were pregnant. Moreover, as these individuals were infected by different HCV genotypes, immune responses indicated an antigenic crossreactivity. Finally, 3 novel putative HLA-A2-restricted CTL epitopes have been identified. These results, together with other features of the F protein, indicate that it represent an attractive candidate as an HCV vaccine component.

We also examined the variations in host selective pressure by performing a longitudinal study of HCV quasispecies evolution during pregnancy. HIV-coinfected patients showed AST levels and HCV viral load significantly more elevated in the 3<sup>rd</sup> trimester, as well as a different pattern of evolution of the HVR1 variant numbers during pregnancy as compared with mono-infected patients. HIV-coinfected women were characterized by a persistence of a major HVR1 variant and a lower dN/dS ratio compared to mono-infected patients. Finally, quasispecies evolution between 2 consecutive pregnancies was not correlated with the birth interval in coinfecting women. These results suggest that HIV coinfection leads to reduced immune pressure on HVR1 during pregnancy, and that this effect is re-established by HAART treatment.

Lastly, we characterized a novel hypervariable region, termed HVR3, located between HVR1 and HVR2 in the E2 envelope glycoprotein. Even though HVR3 quasispecies parameters showed a tendency towards lower values, they were correlated

with those of HVR1. Only coinfecting and treated patients showed significant reduced values compared to mono-infected patients. As for HVR1, HIV coinfection leads to reduced immune pressure specific for HVR3, and that this effect is re-established by HAART treatment. Finally, characteristics of HVR3 region allowed us to localize it at the surface of E2 and to formulate hypothesis related to its putative role.

In conclusion, HCV infected patients demonstrate humoral and cellular immune responses specific for the 11<sup>th</sup> HCV protein even during pregnancy, as well as immune pressure directed against HVR1 and HVR3 regions. However, HIV coinfection and HAART treatment have to be taken in account, because they influence immune responses during pregnancy.

**Keywords :** HCV, pregnancy, F protein, quasispecies, HVR1, coinfection, HAART

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xi</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xvi</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. LE VIRUS DE L'HÉPATITE C</b> .....	<b>2</b>
1.1. Historique.....	2
1.2. Épidémiologie du VHC.....	4
1.3. Virologie du VHC.....	5
1.4. Organisation génétique du VHC .....	8
1.4.1. Les protéines structurales.....	10
1.4.2. Les protéines non-structurales .....	11
1.5. Transmission du VHC.....	13
1.6. Traitement de l'hépatite C .....	16
1.6.1. Thérapie antivirale actuelle .....	17
1.6.2. Thérapie antivirale de demain.....	19
<b>2. LA COINFECTION AVEC LE VIH-1</b> .....	<b>20</b>
2.1. Epidémiologie et transmission .....	20
2.2. L'impact du VIH sur l'infection par le VHC.....	21
2.2.1. Influence du VIH .....	21
2.2.2. Mécanismes de pathogenèse du VIH.....	22
2.2.3. Influence de la thérapie antirétrovirale combinée.....	23
2.3. L'impact du VHC sur l'infection par le VIH.....	25
2.3.1. Influence du VHC .....	25

2.3.2. Influence du traitement VHC.....	25
3. LE VHC ET LA GROSSESSE.....	26
3.1. La prévalence de l'infection par le VHC chez la femme enceinte .....	26
3.2. L'influence de l'hépatite C sur la grossesse .....	28
3.3. L'influence de la grossesse sur l'hépatite C .....	28
3.4. La transmission mère-enfant.....	29
3.4.1. Définition .....	29
3.4.2. Modalité de la transmission mère-enfant.....	30
3.4.3. Taux de transmission mère-enfant .....	31
3.4.4. Facteurs de risque de la transmission mère-enfant .....	31
3.5. Traitement durant la grossesse.....	35
4. LA PROTÉINE F.....	35
4.1. Historique.....	35
4.2. Mécanisme moléculaire de synthèse de la protéine F.....	37
4.3. Localisation subcellulaire de la protéine F .....	40
4.4. Rôle(s) biologique(s) de la protéine F .....	40
4.5. Réponses immunitaires contre la protéine F .....	41
5. LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU VHC.....	43
5.1. Nature de la quasiespèce.....	43
5.2. Les régions variables du génome.....	45
5.3. La région hypervariable 1 (HVR1).....	46
5.4. Méthodes d'études et paramètres des quasiespèces.....	48
5.5. La quasiespèce et l'esquive face au système immunitaire.....	49
5.5.1. Quasiespèce et réponse humorale .....	50
5.5.2. Quasiespèce et réponse cellulaire .....	51
5.6. La quasiespèce et l'hépatite C.....	54
5.6.1. L'infection aiguë.....	54
5.6.2. L'infection chronique.....	55

5.7. La quasiespèce et la réponse aux traitements .....	56
5.8. La quasiespèce et la coinfection par le VIH .....	58
6. OBJECTIFS .....	59
6.1. Article 1 .....	59
6.2. Article 2 .....	60
6.3. Article 3 .....	61
7. CONTRIBUTION PERSONNELLE AUX ARTICLES .....	61
<b>ARTICLE 1</b> .....	<b>63</b>
<b>ARTICLE 2</b> .....	<b>74</b>
<b>ARTICLE 3</b> .....	<b>116</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>163</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>181</b>

## Liste des tableaux

### ARTICLE 1

<b>Table 1.</b> Cytotoxic activity directed against F protein in patients infected with hepatitis C virus.....	65
<b>Table 2.</b> Conservation of potential HLA-A*0201-restricted epitopes located within F protein peptides F29-43, F37-51, and F101-115 between hepatitis C virus subtypes.....	71

### ARTICLE 2

<b>Table 1.</b> Clinical characteristics of study participants.....	110
---	-----

### ARTICLE 3

<b>Table 1.</b> Amino acid sequence variability in selected subsections of HCV E1 and E2 envelope glycoproteins. ....	158
<b>Table 2.</b> Estimate of selective pressure exerted on various subsections of the HCV E2 envelope glycoprotein.....	159



## Liste des figures

### INTRODUCTION

<b>Figure 1.</b> Prévalence mondiale du VHC. ....	4
<b>Figure 2.</b> Arbre phylogénétique des séquences complètes de chaque génotype du VHC. ....	6
<b>Figure 3.</b> Arbre phylogénétique de toutes les séquences NS5B disponibles du VHC. ....	8
<b>Figure 4.</b> Structure du génome du VHC. ....	9
<b>Figure 5.</b> Les différentes protéines produites dans un cadre de lecture alternatif. ....	39
<b>Figure 6.</b> Les régions variables dans le génome du VHC. ....	45
<b>Figure 7.</b> Résumé des propriétés structurales de HVR1 et des fonctions prédites des acides aminés. ....	47

### ARTICLE 1

<b>Figure 1.</b> Expression and production of recombinant hepatitis C virus F protein. ....	68
<b>Figure 2.</b> F protein-specific antibody responses in hepatitis C virus-infected subjects and patients co-infected with HIV-1. ....	69
<b>Figure 3.</b> Precursor frequencies of hepatitis C virus F protein-specific cytotoxic T lymphocytes in hepatitis C virus-infected subjects and patients co-infected with HIV-1. ....	70
<b>Figure 4.</b> MHC-F protein peptide interaction. ....	71

### ARTICLE 2

<b>Figure 1.</b> Aspartate aminotransferase levels and HCV viral load in study participants. ....	111
<b>Figure 2.</b> Longitudinal analysis of HCV quasispecies complexity in study participants. ....	112
<b>Figure 3.</b> Analysis of HCV quasispecies complexity and diversity during pregnancy in subjects infected with HCV or coinfecting with HCV and HIV-1. ....	113
<b>Figure 4.</b> Analysis of dN/dS ratio in HVR1 variants during pregnancy in subjects infected with HCV or coinfecting with HCV and HIV-1. ....	114

<b>Figure 5.</b> Phylogenetic analysis on consecutive pregnancies in women coinfectd with HCV and HIV-1.....	115
--	-----

### ARTICLE 3

<b>Figure 1.</b> Amino acid sequence diversity in HCV E1-E2 envelope glycoproteins.....	160
<b>Figure 2.</b> Physicochemical properties and antigenic characterization of HVR3. ....	161
<b>Figure 3.</b> Molecular modeling of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. ....	162

### DISCUSSION

<b>Figure supplémentaire 6.</b> Analyse du nombre des variants HVR1 au 2e, 3e trimestre et en postpartum chez les sujets étudiés. ....	175
<b>Figure supplémentaire 7.</b> Analyse du ratio dN/dS chez les sujets étudiés. ....	176

## Liste des abréviations

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ALT	alanine aminotransférase
ARN	acide ribonucléique
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CTL	« cytotoxic T lymphocyte »
ELISA	« enzyme-linked immunosorbent assay » ou méthode immuno-enzymatique
HA	hémagglutinine
HAART	« highly active antiretroviral therapy » ou multithérapie antirétrovirale
HLA	« human leukocyte antigen »
HVR1	« hypervariable region 1 »
HVR2	« hypervariable region 2 »
IFN	interféron
IFN $\gamma$	interféron gamma
IL	interleukine
IRES	« internal ribosomal entry site » ou site d'entrée interne du ribosome
ISDR	« IFN-sensitivity-determining region »
kDa	kilodalton
LDL	« low density lipoprotein »
5'NC	région 5' non-codante ou « 5' untranslated region »
3'NC	région 3' non-codante ou « 3' untranslated region »
PCR	« polymerase chain reaction »
PI	point isoélectrique
RT-PCR	« reverse transcriptase-polymerase chain reaction »
SR-BI	« scavenger receptor class B type I »
SVR	« sustained virological response » ou réponse virologique prolongée
TBEV	« tick borne encephalitis virus »
TCR	« T-cell receptor » ou récepteur des cellules T

UDI	utilisateurs de drogues injectables
VHA	virus de l'hépatite A
VHB	virus de l'hépatite B
VHC	virus de l'hépatite C
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

*“There is nothing like looking, if you want to  
find something. You certainly usually find  
something, if you look, but it is not always  
quite the something you were after”*

**J.R.R. Tolkien**

## Remerciements

J'aimerais remercier en premier lieu mes parents qui m'ont apporté leur soutien inébranlable tout au long de mes études. Malgré la séparation physique apportée par la grande bleue et mon choix de découvrir de nouvelles contrées, leurs innombrables coups de téléphone et leurs encouragements ont toujours été présents. Sans eux, jamais je n'aurais été si loin. Merci du plus profond de mon cœur.

Je ressens également une immense gratitude envers Pierre qui m'accompagne dans la vie depuis maintenant presque deux ans. Il m'a offert un soutien de tous les jours, qu'ils eussent été bons ou mauvais, avec une constance particulière à lui. Je souligne que son aide professionnelle a été grandement appréciée. Ne serait-ce que pour cette raison, il mérite d'avoir son nom dans cette thèse.

Je voudrais mentionner mes collègues de travail et non moins amies, Sandra et Sophie, pour leur collaboration non seulement aux travaux et aux délibérations scientifiques, mais également aux moments de relâchement et de fou rires propres à la fin de la semaine, ô combien appréciés.

De même, une pensée particulière me vient pour Martine, sans qui tout ce travail n'existerait pas. Elle nous permet à nous scientifiques de remettre de temps à autres les pieds sur terre et de réaliser que derrière les numéros se trouvent des êtres humains. Je suis infiniment reconnaissante pour sa bienveillance envers tous les membres de notre laboratoire et son accueil si chaleureux au sein de son laboratoire.

Finalement, un grand merci à mon directeur de recherche pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire et m'avoir montré ce qu'était le monde de la recherche.

# **Introduction**

# 1. Le virus de l'hépatite C

## 1.1. Historique

Durant la deuxième guerre mondiale et la période qui s'ensuivit, la demande de sang et de ses dérivés s'est accrue considérablement, justifiant un besoin de constituer des banques de sang, des services de transfusion ainsi que des services de laboratoire. Les premières hépatites post-transfusionnelles ont été signalées en 1943 par Beeson, qui a également mentionné qu'une expansion du nombre de transfusions pourrait mener à une accumulation considérable du nombre d'hépatites post-transfusionnelles (1). Les scientifiques des National Institutes of Health (2), suivis par d'autres experts dans le domaine, ont associé le risque d'hépatite post-transfusionnelle avec le sang commercial de donneurs payés, par rapport au sang de donneurs volontaires. Ainsi, à la fin de l'année 1975, la Food and Drug Administration (FDA) a mandaté un système de donneurs de sang exclusivement volontaires dans lequel les donneurs ne pouvaient pas recevoir de compensation monétaire pour leurs dons (3).

En 1965, Blumberg et al. ont décrit pour la première fois l'antigène Australia, détecté dans le sérum de nombreux hémophiles ayant reçu des transfusions (4). En 1970, certaines évidences ont corrélé la présence de l'antigène Australia (plus connu aujourd'hui sous le nom d'antigène de surface du virus de l'hépatite B, HBsAg) avec l'incidence des hépatites post-transfusionnelles (5). En 1972, l'exclusion des donneurs de sang HBsAg-positifs a permis de réduire de 25% le taux d'hépatite post-transfusionnelle, alors que l'élimination des donneurs rémunérés avait résulté en une réduction de 70% (6). Il fallu attendre 1975, avec le test de détection du HBsAg de troisième génération pour constater une nette diminution du taux d'hépatite post-transfusionnelle reliées au virus de l'hépatite B (7).



C'est en 1973 que l'agent étiologique de l'hépatite A a été détecté (8). Malgré la mise en place de tests spécifiques de dépistage du VHB et l'exclusion du virus de l'hépatite A comme cause des hépatites post-transfusionnelles, il restait évident qu'un nombre substantiel de cas continuait de se produire, dont 90% représentait des hépatites désignées non-A, non-B (HNANB). Fin 1979, début 1980, le taux de HNANB chez les patients transfusés s'est avéré aussi élevé que 10% (9). Suite à d'intenses recherches en vue d'identifier l'agent étiologique du HNANB au cours des années 70 et 80, M. Houghton et ses collaborateurs de la compagnie Chiron ont découvert le virus de l'hépatite C (VHC) en 1989 (10). Après sa caractérisation, les études préliminaires ont montré que le VHC était l'agent étiologique d'au moins 80 à 90% des hépatites post-transfusionnelles résiduelles (11). Il a fallu attendre 1990 et 1992 avec le test immunoenzymatique de première génération et de deuxième génération, respectivement, pour la détection d'anticorps anti-VHC, pour voir une diminution d'infection par le VHC associée à la transfusion. En 1996, le test de dépistage de troisième génération comprenant un nombre plus élevé d'épitopes a permis de réduire la fenêtre de séroconversion et ainsi détecter 1 à 2 donneurs séroconvertis par million d'unités dépistées (12, 13).

Aujourd'hui, suite à l'introduction des tests d'acides nucléiques, le risque estimé du VHC au Canada est de 0,35 par million de dons, ce qui est plus faible que celui trouvé dans d'autres pays, comme par exemple les Etats-Unis, avec 0,52 par million de dons (14). Ceci est probablement relié à une prévalence du VHC plus élevée. Le risque d'hépatite post-transfusionnelle s'est atténué de manière incroyable au cours des 40 dernières années grâce au développement de nouveaux tests de dépistage ainsi qu'à la vaccination préventive contre le virus de l'hépatite B effectuée dans les groupes à risque ainsi que dans la population générale.

## 1.2. Épidémiologie du VHC

Depuis son identification en 1989 (10), on a constaté que le VHC devenait un important problème social et économique, dû au fait qu'il constitue la principale cause de maladies hépatiques chroniques au monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la prévalence du VHC dans la population mondiale s'élève à 3%, avec quelques 170 millions individus porteurs chroniques qui sont à risque de développer une cirrhose et/ou un cancer du foie (15). Par comparaison, la prévalence du VHC est 4 fois plus élevée que celle du VIH. La distribution du VHC dans le monde est très variable : les pays industrialisés présentent des taux de prévalence en général inférieurs à 3%. Par contre, les taux de prévalence les plus élevés ont été attribués aux régions de l'Afrique et de l'Asie, avec dans certaines nations ou régions distinctes un taux à plus de 10%. En particulier, l'Égypte a rapporté le taux de prévalence le plus élevé (22%) dû probablement à une contamination d'aiguilles lors d'une campagne nationale de prévention de la schistosomiase (16, 17) (Fig.1).

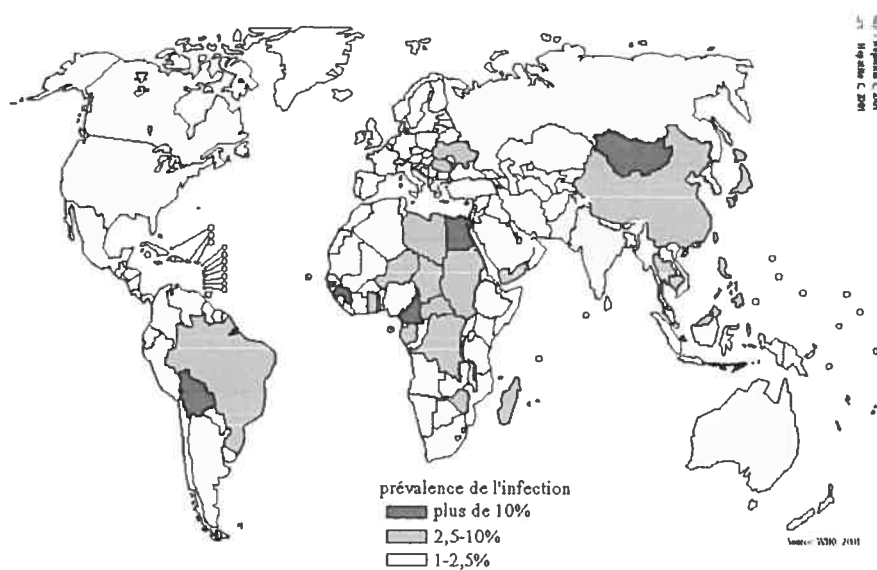


Figure 1. Prévalence mondiale du VHC (tiré de (15)).

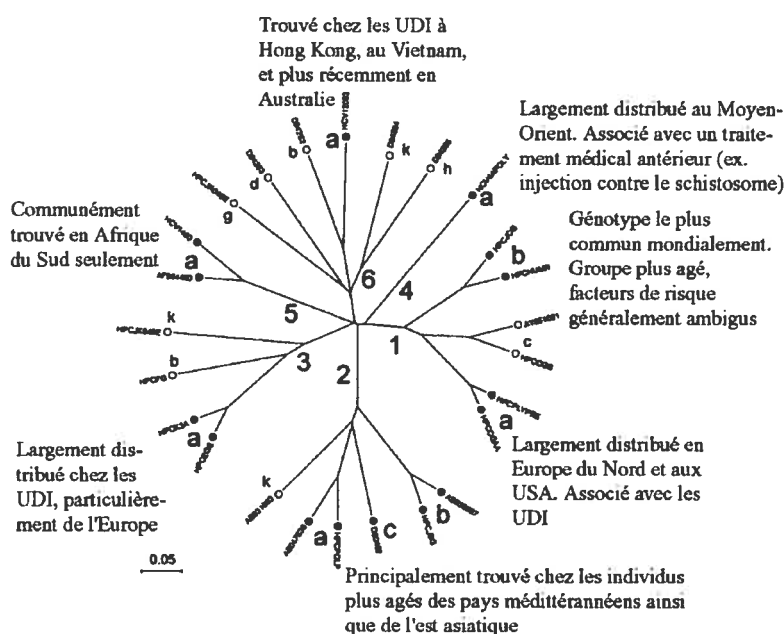
Au Canada, l'estimation de la prévalence du VHC dans la population générale est de 0,8% (18, 19), ce qui correspond à environ 250 000 personnes infectées. Environ 6 000 personnes sont infectées chaque année, la majorité étant des utilisateurs de drogues injectables (20). Le taux de séropositivité est de 0,96% chez les hommes et de 0,53% chez les femmes (18). A Montréal, le pourcentage d'utilisatrices de drogues injectables parmi ces femmes est de 18,5% (21). Malheureusement, seulement 30% des individus infectés sont conscients de leur état, le restant représentant souvent des porteurs chroniques asymptomatiques qui ne seront probablement jamais dépistés puisqu'ils ne sont pas nécessairement dans les groupes à risque.

### 1.3. Virologie du VHC

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre hépacivirus. Il s'agit d'un virus enveloppé, avec un génome à ARN simple brin, de polarité positive (22). Les particules virales possèdent un diamètre de 50 à 60 nm, qui se retrouvent dans le sérum soit sous forme libre, soit associées à des lipoprotéines ou des immunoglobulines (23). La nucléocapside est constituée de la protéine core entourant le génome, qui est elle-même drapée d'une enveloppe lipidique dérivée de la cellule-hôte où se fixent les glycoprotéines E1 et E2. Malheureusement, il manque des données quant à la structure exacte des particules ainsi que sur certaines étapes du cycle de vie du virus, car jusqu'à il y a encore quelques mois, aucun système de culture du VHC ne pouvait reproduire le cycle entier du virus. Récemment, 3 groupes indépendants ont simultanément rapporté le développement d'un puissant système de propagation du VHC *in vitro*, avec lequel de nombreuses questions pourront être répondues (24-26).

Le VHC montre une grande variabilité génétique. Ainsi, par des méthodes phylogénétiques, il a été classifié en 6 génotypes distincts (1 à 6). Chacun de ces groupes contient lui-même un nombre variable de « sous-types » génétiquement apparentés de

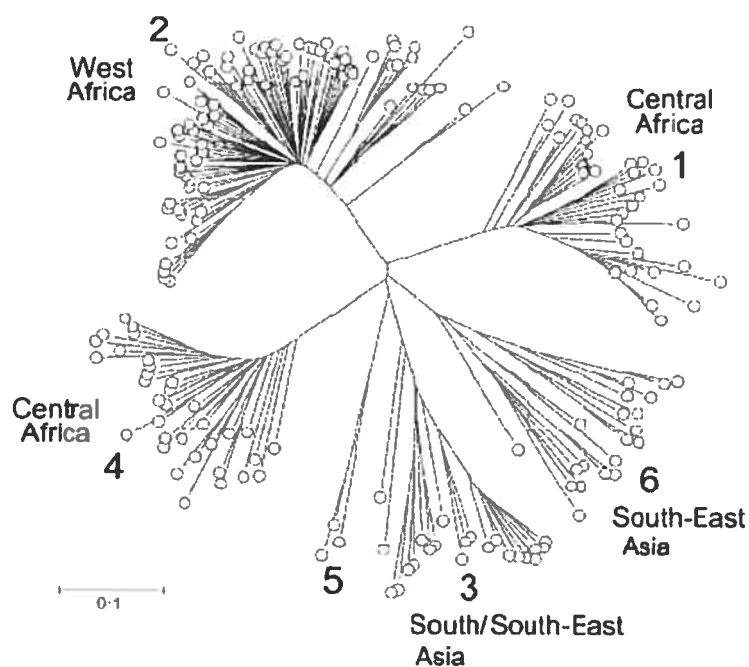
manière plus rapprochée (a, b, c, ...). Les génotypes diffèrent les uns des autres de 31 à 33% au niveau nucléotidique, alors que les sous-types diffèrent de 20 à 25% entre eux (Fig.2) (27, 28). Finalement, le virus se diversifie encore davantage au cours du temps dans l'organisme d'un individu infecté, formant ce que l'on appelle une quasiespèce (29) et qui sera décrit plus en détails ultérieurement dans cette thèse (voir chapitre 5. La diversité génétique du VHC).



**Figure 2.** Arbre phylogénétique des séquences complètes de chaque génotype du VHC. Les groupes à risque principaux identifiés pour chacun des génotypes ont été indiqués lorsque l'information était disponible (cercles remplis et textes les accompagnant). Ces génotypes sont devenus prévalents dans les pays industrialisés au cours du 20<sup>e</sup> siècle. L'échelle graphique représente le nombre de substitutions de nucléotides par site (tiré de (28)).

La détermination du génotype infectant l'individu ou génotypage s'effectue par hybridation de sonde (30), analyse des sites de restriction (31), ou par séquençage direct

(32) en général des régions conservées non-codante en 5' (5'NC ou 5'UTR) ou NS5B. Le génotypage est un processus permettant de donner des informations en ce qui concerne la voie de transmission ou l'origine du VHC dans les différentes régions du monde : par exemple, les génotypes 1a, 1b et 3a sont largement répartis, mettant en évidence une transmission par les transfusions de sang et le partage de seringues entre des UDI's durant les dernières 30 à 70 années, ce qui représente aujourd'hui la majorité des infections dans les pays de l'Ouest. La distribution des génotypes a suggéré un modèle très intéressant : le VHC est endémique en Afrique sub-saharienne et en Asie du sud et de l'est depuis un laps de temps considérable, et l'apparition de l'infection dans les pays de l'Ouest et les autres pays non-tropicaux représente une émergence relativement récente dans un nouveau groupe à risque pour l'infection (Fig.3) (33-37). De plus, certains génotypes semblent être associés à une certaine évolution de la maladie : le génotype 1 est associé à une probabilité de persistance plus élevée et provoquerait des maladies du foie plus sévères que les génotypes 2 ou 3 (38-41), alors que l'infection par le génotype 3 serait associée à une plus grande incidence de stéatose (42, 43). Finalement, les génotypes possèdent des différences de susceptibilité aux monothérapies avec l'interféron ou aux thérapies avec une combinaison d'interféron et ribavirine : 10 à 20% et 40 à 50% des individus infectés par le génotype 1 sous monothérapie ou thérapie de combinaison, respectivement, démontre une réponse virologique prolongée, alors que le taux de réponse chez les patients infectés par les génotypes 2 ou 3 est plus élevé, soit de 50 et de 70 à 80% respectivement (44, 45).

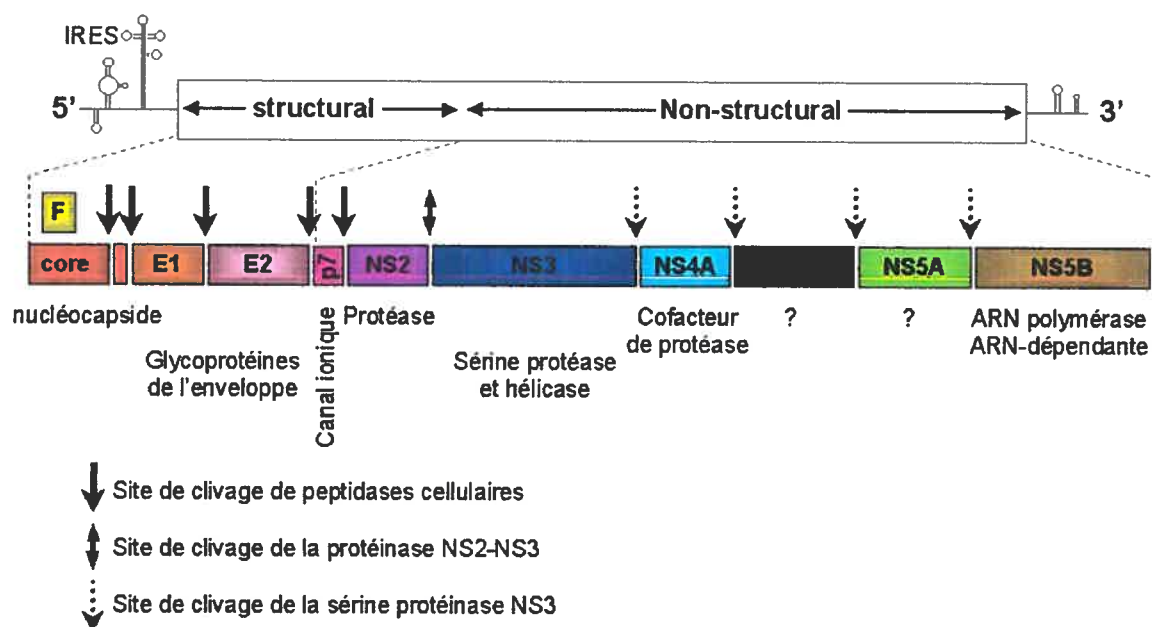


**Figure 3.** Arbre phylogénétique de toutes les séquences NS5B disponibles du VHC. Ces analyses de la région NS5B de toutes les séquences nucléotidiques disponibles publiquement dans la région de 8 276 à 8 615 (numéroté selon la séquence référence de H77, n° d'accès dans GenBank AF009606) démontrent que les variants du VHC tombent toujours dans 6 génotypes distincts, chacun de ces génotypes contenant de nombreux nouveaux variants découvert dans des régions à haute diversité de l'Afrique sub-saharienne et de l'Asie de Sud. L'échelle graphique représente le nombre de substitutions de nucléotides par site (tiré de (28)).

#### 1.4. Organisation génétique du VHC

Le génome du VHC est constitué d'un principal cadre de lecture d'environ 9 000 nucléotides (précisément 9 036 nucléotides pour H77 et M62321) entourés de régions non-codantes aux extrémités 5' et 3' (Fig.4). La région 5'NC est longue de 341 nucléotides et constitue une des régions les plus conservées du génome, probablement dû à ses deux rôles majeurs : elle contient des éléments en ARN impliqués dans la réplication du génome (46)

et possède une structure secondaire complexe (pseudo-nœuds et tige-boucles) qui présente un site d'entrée interne du ribosome (IRES) (47). Ce dernier permet la traduction de la polyprotéine par le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S (48) ainsi que des facteurs d'initiation aux 4 structures tige-boucles (49, 50). La région 3'NC est longue de 200 à 235 nucléotides et possède 3 parties distinctes (51) : la première, une région variable, n'a pas encore de rôle défini, mais ne semble pas nécessaire à la réplication; la deuxième, une étendue poly-U/UC est quant à elle essentielle à la réplication par ses interactions avec différentes protéines cellulaires (52). La dernière, la région X, est très conservée et structurée, est également essentielle à la réplication en interagissant spécifiquement avec l'ARN polymérase du VHC (53).



**Figure 4. Structure du génome du VHC.** Les sites de clivage des différentes enzymes protéolytiques sont indiqués avec différentes flèches.

Le génome possède un cadre de lecture principal codant pour une polyprotéine d'un peu plus de 3 000 acides aminés, clivée de manière post-traductionnelle par des protéases cellulaires et virales pour constituer 10 protéines virales. La partie N-terminale code pour 3 protéines structurales, et la partie C-terminale pour 7 protéines non-structurales (10). Il existe un cadre de lecture alternatif dans la région de la première protéine, core, qui code pour une 11<sup>ème</sup> protéine, nommée F ou ARFP, et qui sera décrite plus en détails ultérieurement dans cette thèse (voir chapitre 4. La protéine F).

#### **1.4.1. Les protéines structurales**

La protéine core passe par 2 processus de clivage par des protéases cellulaires avant de se trouver sous sa forme mature (54). Celle-ci semble être capable de se multimériser (55) et se s'associer avec les radeaux lipidiques de la membrane cellulaire (56) ainsi qu'avec la protéine E1 (57, 58) pour l'assemblage des virus. Outre son rôle structural, la protéine core semble jouer un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire et le développement de carcinomes hépatocellulaires, dans la modulation de divers promoteurs cellulaires et viraux, dans le contrôle de plusieurs voies de signalisation intracellulaires, dans l'altération du métabolisme lipidique ainsi que des réponses immunitaires de l'hôte (59-61).

Les 2 prochaines protéines sont les glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2, associées en hétérodimères (62) et exposées à la surface du virus. E1 et E2 sont vraisemblablement essentielles à l'entrée du virus dans la cellule, par l'attachement aux récepteurs cellulaires et l'induction de la fusion avec la membrane cellulaire (63). Il a été démontré que la glycoprotéine E2 s'attache aux cellules cibles grâce à la liaison avec des récepteurs cellulaires comme CD81 (64), le récepteur de LDL (65) ou le SR-B1 (66, 67). En outre, un rôle dans la modulation de la réponse à l'interféron a été proposé pour E2 (68), mais reste encore controversé. Finalement, E2 contient les régions les plus variables du génome du VHC, les régions hypervariables 1 et 2 ou HVR1 et HVR2, qui semblent être



impliquées dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte (voir chapitre 5. La diversité génétique du VHC).

#### **1.4.2. Les protéines non-structurales**

La protéine p7 est une petite protéine membranaire de 63 acides aminés dont le rôle a longtemps été inconnu. Sa fonction semble être essentielle dans le pouvoir d'infection du virus *in vivo* (69). De plus, sa similarité avec la viroporine M2 du virus de l'influenza A suggère une fonction de canal ionique formant des hexamères (70, 71). Finalement, une récente communication a indiqué que la protéine p7 semble être nécessaire pour le relargage de particules virales (72).

NS2 est une protéine membranaire qui ne semble pas être nécessaire à la réplication de l'ARN viral (73, 74). Sa seule fonction connue est sa participation dans le clivage protéolytique entre elle-même et NS3 (75). Il semblerait que la majeure partie de la séquence de NS2 soit essentielle pour la fonction de la protéinase NS2-NS3 dépendante du zinc (76).

NS3 possède 2 domaines avec des activités enzymatiques différentes. Le segment en N-terminal est caractérisé par l'activité sérine protéinase : tel que mentionné, elle appartient à la protéinase NS2-NS3 qui est responsable du clivage entre NS2 et NS3. Ce segment s'associe également avec le cofacteur NS4A, ce qui permet de stabiliser et activer le clivage des protéines non-structurales en aval (NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B). Le côté C-terminal est composé du domaine hélicase-NTPase et possède plusieurs fonctions, comme une activité NTPase stimulée par l'ARN, la liaison avec l'ARN, et le déroulement de l'ARN (77, 78). On a également démontré que NS3 interagissait avec NS5B (79), NS4B et NS5A via NS4A (80) au sein du complexe de réplication. En raison de son implication essentielle dans le cycle de vie du virus, NS3 reste une cible de choix pour le développement de thérapies antivirales (81).

Tel que déjà mentionné, NS4A joue un rôle de cofacteur avec NS3 pour son activité protéolytique.

Jusqu'à tout récemment, la fonction de NS4B était inconnue. Toutefois, il semblerait qu'elle induise une structure de membranes intracellulaires nommée réseau membranaire (« membranous web ») qui serait le lieu de l'assemblage du complexe de réplication du VHC constitué des protéines virales ainsi que de l'ARN viral (82, 83). Elle-même serait impliquée dans l'assemblage des composés du complexe de réplication (84, 85).

La fonction de NS5A n'est toujours pas connue. Il semblerait qu'elle soit impliquée dans la réplication du virus, puisque des mutations dans une région probable d'ancrage dans la membrane supprimaient la réplication (86). De plus, la modulation de la phosphorylation de NS5A par les protéines non-structurales NS3, NS4A et NS4B (87, 88) atteste du fait que NS5A est lui-même un composé du complexe de réplication du VHC. D'autres fonctions potentielles ont été attribuées à la protéine NS5A, incluant la régulation de la croissance cellulaire ainsi que des voies de signalisation intracellulaires (89). Finalement, un autre rôle proposé est son influence sur les réponses aux traitements avec l'interféron au travers d'une région désignée ISDR (« interferon sensitivity determining region ») (90-92).

Enfin, la protéine NS5B possède l'activité de polymérisation ARN-dépendante de l'ARN. Même si elle est pourvue de l'activité catalytique de la polymérisation de l'ARN viral, le complexe de réplication du VHC est également composé d'autres protéines structurales. La présence de cette protéine étant une particularité de l'infection par le VHC, elle représente une cible très spécifique pour le développement de thérapies. Sa structure cristallographique a été caractérisée (93), ce qui a aidé l'optimisation et le développement des médicaments. NS5B possède une structure typique de polymérase formant une main droite, avec les sites catalytiques dans la paume, entourés du pouce ainsi que des doigts. Ces derniers domaines encerclent le site actif, créant ainsi un canal servant à la liaison à

l'ARN. La protéine est ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique par sa partie hydrophobe en C-terminal (94). Finalement, elle possède également un site de liaison GTP situé entre le pouce et les doigts; il pourrait jouer un rôle de régulation allostérique permettant des interactions alternatives entre les deux domaines, ce qui mènerait à des changements conformationnels de l'enzyme nécessaires à une initiation efficace de la réplication (95).

## 1.5. Transmission du VHC

Il est essentiel de connaître les risques de transmission parce que cela permet de modifier certaines pratiques à risque ainsi que de déterminer les paramètres utilisés pour la planification de stratégies de dépistages.

### **Transfusion**

Outre la possibilité de retirer un don de sang volontairement et de manière anonyme, l'introduction des mesures de dépistage a permis de réduire progressivement le risque de transmission du VHC par les transfusions : système de donneurs volontaires non rémunérés, dépistage des donneurs ayant des transaminases anormales, tests d'anticorps anti-VHC de 1<sup>ère</sup> à la 3<sup>e</sup> génération, test d'acides nucléiques du VHC, et dépistage des donneurs avec des antécédents à risques par un questionnaire. Finalement, l'introduction d'étapes d'inactivation virale dans la fabrication des poches de plasma et des cryoprécipités a également contribué à la diminution du risque transfusionnel. Aujourd'hui donc, dans les pays industrialisés, la transfusion ne constitue plus qu'un facteur de risque minime d'infection par le VHC. Malgré cela, elle reste toujours une source majeure de transmission dans les pays en développement, soit dû à la rémunération des donneurs, soit dû au manque de dépistage adéquat du VHC.

### **Utilisation de drogues injectables**

L'utilisation de drogues injectables est le mode principale de transmission du VHC dans les pays développés. Au Canada par exemple, où ce problème existe depuis plus de 30 ans, la prévalence de l'infection par le VHC parmi les UDIs est d'environ 80% (19). Celle-ci peut s'élever à plus de 90% parmi les individus toxicomanes depuis au moins 6 ans (96, 97). Il semblerait que l'infection par le VHC apparaît très rapidement après le début de la toxicomanie, puisque la séroprévalence chez les individus toxicomanes depuis moins de 1 an était de 65% vers la fin des années 80 (98). De plus, des études plus récentes ont montré des taux d'incidence par année de 20 à 46% chez des jeunes UDIs (99, 100). Dans une analyse multivariée, les facteurs de risque associés à la transmission incluaient la durée de la toxicomanie, la fréquence des injections, le backloading (transfert de drogue d'une seringue à une autre comme méthode de mesure et de division des drogues), ainsi que le partage d'objets de préparation (coton, cooker, eau de rinçage,...) (101).

### **Hémodialyse et transplantation**

La prévalence de l'infection par le VHC dans les unités de dialyse varie d'un pays à un autre, ainsi que d'un centre de dialyse à un autre au sein d'une même région : elle varie de 10 à 50% (102-105). Les chiffres les plus élevés concernent les individus dialysés sur de plus longues périodes, par rapport aux patients dialysés à domicile. Quant à la transplantation d'organes, le risque de transmission du VHC d'un donneur infecté virémique à un receveur non infecté est malheureusement de 100% (106).

### **Transmission sexuelle**

Le VHC peut être détecté dans le sperme (107, 108) ainsi que dans les sécrétions vaginales (109), mais ces résultats restent controversés, soit dû à une contamination probable des échantillons avec du sang provenant de blessures, soit dû à la présence d'une quantité faible d'ARN viral (110). Néanmoins, il est clair que la transmission du VHC par voie sexuelle est beaucoup moins fréquente que par la voie sanguine. Par ailleurs, chez les individus infectés par le VIH, la prévalence de l'infection par le VHC est 12 fois plus

élevée chez les UDIs que chez les patients ayant contracté le VIH par la voie sexuelle (111). Il a été très difficile de déterminer la contribution exacte de la transmission sexuelle dans l'infection par le VHC, car les études ne pouvaient éliminer une transmission par voie intrafamiliale (partage de rasoirs ou de brosses à dents, blessures,...) ou par un facteur de risque partagé par les deux partenaires sexuels (toxicomanie,...). C'est pourquoi, on s'accorde à mentionner qu'il existe une transmission entre partenaires sexuels, sans parler de transmission sexuelle qui reste encore un phénomène extrêmement rare (112, 113).

### **Transmission verticale**

Le taux de transmission verticale, ou mère-enfant, se situe en moyenne à moins 10% (révisés dans (114-116)). Les facteurs qui augmentent ce taux de manière évidente sont une charge virale élevée du VHC ainsi que la coinfection avec le VIH. Une analyse plus détaillée de ce mode de transmission est présentée au chapitre 3 de cette thèse.

### **Autres modes de transmission**

La contamination nosocomiale est considérée comme un facteur important dans la transmission du VHC, particulièrement dans les pays qui ne pratiquent pas les mesures d'hygiène suffisantes (117), comme cela a été l'exemple avec l'Égypte (16, 17). La prévalence du VHC chez le personnel de santé est dans la plupart des études proche ou légèrement plus élevée que celle de la population générale, soit de 0,7% à 3,4% (118-123). Finalement, dû à certains comportements de l'homme l'exposant à du sang ou à des produits dérivés, il existe encore plusieurs autres modes de transmission du VHC, incluant des procédures cosmétiques ou religieuses, comme le tatouage, le « piercing », le rasage commercial, la scarification rituelle, la circoncision et l'acuponcture. Toutefois, non seulement peu de données ont été publiées sur ces modes de transmission du VHC, mais ces études sont aussi très controversées (124-130). Il existe encore un besoin de clarifier la ou les sources d'infection du VHC dans environ 10% des cas où aucun facteur de risque évident ne peut être identifié d'office (131). Malgré le fait que les modes de transmission décrits ci-dessus pourraient expliquer une petite proportion de ces infections, il semblerait

que les études ne soutiennent pas ces voies d'infection comme mécanismes prédominants de transmission du VHC dans ces cas épisodiques.

## **1.6. Traitement de l'hépatite C**

L'objectif de la thérapie est l'élimination du virus et la prévention de complications éventuelles de l'infection chronique par le VHC. Plus de 80% des patients infectés par le VHC développent une infection chronique (132, 133), dont environ 20% présentent une cirrhose 20 ou 30 années après la contamination (134, 135). Parmi ces patients cirrhotiques, 30% risquent de développer une décompensation du foie et 1 à 2% risquent de souffrir d'un carcinome hépatocellulaire (136).

L'efficacité du traitement est évaluée par la mesure de la charge virale du VHC. Les réponses à la thérapie sont classées en trois groupes : une réponse virologique prolongée (« sustained virological response » ou SVR), qui représente le but à atteindre, est définie par une perte de la détection de l'ARN viral durant le traitement, suivie de son absence soutenue durant au moins 6 mois. La probabilité d'atteindre une SVR peut être prédite après 3 mois de traitement : si la concentration de l'ARN viral n'a pas diminué d'au moins 2 log, la thérapie devrait être interrompue, car la possibilité d'une SVR n'est plus que de 3% ou moins (137, 138). Ces patients sont dit non-répondeurs (« non-responders »), pour qui de nouvelles stratégies de traitement doivent être envisagées. Le dernier groupe, « relapsers », représente des patients ayant atteint des niveaux de charge virale indétectable durant le traitement mais qui redeviennent détectables lorsque la thérapie est achevée. Un second traitement chez ces patients ayant rechuté entraîne parfois une SVR, mais généralement seulement lorsque des doses plus fortes ou une durée de traitement plus longue sont appliquées (139).

### 1.6.1. Thérapie antivirale actuelle

Tous les patients avec une hépatite C chronique sont des candidats potentiels pour la thérapie antivirale. Le traitement est recommandé pour les patients qui présentent des risques accrus de développer une cirrhose, défini par des niveaux plasmatiques d'ARN VHC plus élevés que 50UI/ml, des valeurs d'alanine aminotransférases durablement élevées, et une biopsie du foie montrant une fibrose portale ou une inflammation et une nécrose modérées (140). Certains patients ne peuvent toutefois pas être traités à cause de facteurs d'exclusion tels que des pathologies psychiatriques sévères, l'usage de drogues injectables, l'abus d'alcool, ou encore des facteurs de co-morbidité qui seraient aggravés par les agents thérapeutiques (140). Bien souvent, le coût des médicaments représente également un obstacle de taille pour le traitement.

Tout d'abord, la monothérapie à l'interféron alpha-2b, montrant une activité antivirale et immunomodulatrice, a été utilisée en administrant 3 injections par semaine durant 6 à 12 mois et a été associée à une SVR générale de 6 à 20% (141, 142). Vers la fin des années 1990, l'addition de la ribavirine, un analogue synthétique de la guanosine, à la monothérapie à l'IFN a augmenté la SVR à environ 30 à 40% (143, 144). Il faut mentionner que la monothérapie à la ribavirine ne présente pas d'effet bénéfique prolongé au niveau de la charge virale du VHC. Une importante amélioration dans la thérapie de l'hépatite C chronique a été apportée lors de l'introduction de l'interféron pégylé : l'addition d'une molécule de polyéthylène glycol a augmenté l'activité biologique de l'interféron et a prolongé sa demi-vie, ce qui a permis d'augmenter le taux de réponse prolongée. Actuellement, la thérapie standard pour traiter l'hépatite C chronique est la combinaison de l'interféron pégylé avec la ribavirin, qui entraîne un taux de SVR de 54 à 56% (137, 138, 145).

Les facteurs prédisant une faible réponse suite à une thérapie combinée incluent le génotype 1, une charge virale élevée, un poids corporel élevé ainsi qu'une importante

fibrose (137, 138). Par exemple, une SVR à l'interféron pégylé et à la ribavirine chez des patients infectés par le génotype 1 du VHC est observée dans 42 et 52% des cas, alors que le taux de SVR est de 76 à 84% chez des individus infectés par les génotypes 2 ou 3 (137, 138, 145). Chez les patients du génotype 1 présentant une charge virale VHC élevée, on observe une SVR dans 26 à 42% des cas, alors qu'avec une faible charge virale, le taux de SVR est de 52 à 56%. Un autre mécanisme de résistance au traitement impliquerait la variabilité au niveau de la quasiespèce du VHC, ce qui sera discuté ultérieurement (voir chapitre 5.7. La quasiespèce et la réponse aux traitements).

La plupart des patients avec une hépatite C aiguë sont asymptomatiques, ce qui limite les études sur le traitement précoce de cette infection. De plus, la taille des cohortes de patients est généralement réduite et la randomisation des patients est rarement effectuée. D'autre part, le laps de temps entre l'infection par le VHC et le début de la thérapie, les dosages des antiviraux, la durée du traitement, et le suivi sont relativement variables. Toutefois, les études ont montré d'excellentes SVR avec un traitement précoce, avec des taux allant de 80 à 100% (146-148). Bien que la plupart des études ont utilisé l'interféron, la forme pégylée est plus accommodante dans son utilisation et l'addition de la ribavirine amène un taux de réponse plus élevé sans aggravation importante des effets secondaires. Le traitement adéquat de l'infection aiguë du VHC est une combinaison de l'interféron pégylé et de la ribavirine durant 6 mois (149).

Malheureusement, de nombreux effets secondaires indésirables sont associés à l'interféron, incluant la fatigue, des symptômes grimpaux, la neutropénie ou la thrombocytopenie (140). Avec la ribavirine, l'effet le plus fréquent est l'anémie, qui est dépendante de la dose et réversible, et celui qui est le plus inquiétant est la tératogénicité (140). Une contraception efficace est donc fondamentale durant la thérapie ainsi qu'environ 6 mois après la fin du traitement.



### 1.6.2. Thérapie antivirale de demain

La meilleure thérapie disponible aujourd'hui est celle combinant l'interféron pégylé et la ribavirine. Pourtant, elle n'est efficace que pour la moitié des patients et elle est souvent mal tolérée. Il y a donc un réel besoin de développer de nouveaux traitements. Il existe 5 catégories d'agents thérapeutiques prometteurs ayant été étudiés dans des essais cliniques :

- Les interférons modifiés (l'interféron-alpha consensus, l'Albuferon) (150-153).
- Les alternatives à la ribavirine (le Levovirin, la Viramidine) (154-157).
- Les inhibiteurs spécifiques anti-VHC (des ribozymes, des oligonucléotides antisenses ou des siRNA ayant pour cible l'IRES, le BILN 2061 ou le VX-950 ayant pour cible la NS3 sérine protéase, des analogues nucléosides ou non-nucléosidiques ayant pour cible la NS5B polymérase de l'ARN ARN-dépendante) (81, 158-165).
- Les immunomodulateurs (l'Actilon ou CpG-10101, l'ANA245 ou Isatoribine, l'ANA975, des agonistes des Toll-like receptors 7 et 9,) (166, 167).
- Les vaccins thérapeutiques (des polypeptides recombinants du VHC, des ADN plasmidiques) (révisé dans (168)).

Malheureusement, aucun de ces agents thérapeutiques ne sera sur le marché avant plusieurs années, et l'interféron restera probablement le principal élément de toutes thérapies à venir.

## 2. La coinfection avec le VIH-1

### 2.1. Epidémiologie et transmission

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) fait partie de la famille des *Retroviridae* et appartient au genre lentivirus. On estime le nombre de personnes vivant avec le VIH-1 à 40,3 millions aujourd'hui (décembre 2005), avec près de 5 millions de personnes nouvellement infectées en 2005. Malheureusement, le syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA a déjà tué plus de 25 millions de personnes depuis la découverte du VIH en 1983 (169-171).

Le VIH et le VHC sont tous deux des virus à ARN qui partagent certaines des mêmes voies de transmission (contact avec le sang ou les produits dérivés, relations sexuelles, transmission de la mère à l'enfant). Toutefois, le VHC est approximativement dix fois plus infectieux que le VIH lors d'exposition percutanée à de petits volumes de sang : le risque de transmission par exposition accidentelle avec une aiguille a été estimé à 1,5%-3% pour le VHC (172), comparé à 0,3% pour le VIH (173). Par conséquent, l'incidence de l'infection par le VHC chez les UDIs (174) ou chez les hémophiles est plus élevée (175). Par contre, le VIH est plus facilement acquis que le VHC par transmission sexuelle ou par la voie mère-enfant : l'estimation du risque de transmission du VIH lors d'une seule relation hétérosexuelle ou homosexuelle est de 1-5%, par rapport à 0,1-0,3% pour le VHC (176, 177). Le taux de transmission verticale du VIH peut atteindre 20 à 30% chez un enfant né d'une mère infectée par le VIH ne prenant aucun traitement antirétroviral (178), alors que le VHC est transmis dans moins de 10% des cas à l'enfant né d'une mère infectée par le VHC (voir chapitre 3. le VHC et la grossesse) (114).

Dû à cette différence du taux de transmission du VIH et du VHC selon les populations à risque, les taux de coinfection par le VIH et le VHC varient sensiblement. En Europe et aux États-Unis, il est estimé que 30 à 45% des personnes infectées par le VIH

sont coinfectées par le VHC (179-183). Chez les sujets qui ont acquis le VIH par utilisation de drogues injectables, la prévalence de l'infection par le VHC est de 50-90%, alors que le taux de coinfection est généralement bien inférieur à 20% chez les individus hétérosexuels ou homosexuels positifs pour le VIH (181, 182, 184).

## **2.2. L'impact du VIH sur l'infection par le VHC**

### **2.2.1. Influence du VIH**

La coinfection par le VIH et le VHC est généralement associée avec un niveau d'ARN viral du VHC plus élevé dans le sérum (185-187) et le foie (188-190) que ce qu'on retrouve chez les personnes infectées seulement par le VHC. En moyenne, le titre est 10 fois plus élevé. Certains investigateurs ont également observé une corrélation négative entre la charge virale du VHC et le décompte CD4 (189, 191-195).

L'infection par le VIH chez les individus infectés par le VHC est également caractérisée par un risque accru et une accélération de la progression des maladies du foie associées au VHC (187, 189, 196-199). En particulier, la cirrhose se manifeste chez 15% des patients positifs pour le VIH en comparaison à seulement 3% des patients négatifs pour le VIH (200). Le temps estimé entre l'acquisition de l'infection par le VHC et la cirrhose est respectivement de 7 et 23 ans chez ces deux groupes de sujets. Ceci pourrait s'expliquer par une progression plus rapide de la fibrose. En effet, le laps de temps requis pour le développement de la fibrose est également réduit chez les patients coinfectés par le VIH (201, 202). Finalement, un risque plus grand et un développement plus rapide de carcinomes hépatocellulaires sont également observés. Les patients coinfectés par le VIH et le VHC ont présenté un cancer du foie avant l'âge de 40 ans dans 45% des cas (203). A l'extrême, dans une étude plus récente, l'intervalle moyen entre l'exposition au VHC et le développement d'un carcinome hépatocellulaire a été estimé à environ de 10 ans (204), alors qu'il est d'environ 30 ans chez les patients mono-infectés (205). De même, le risque

de mortalité causé par les maladies du foie, incluant le cancer du foie, est supérieur : chez les hémophiles infectés par le VIH, il est de 6,5% après 25 ans suivant l'exposition au VHC, alors qu'il est de 1,2% chez les individus seulement infecté par le VHC (206). Dans une méta-analyse, le risque relatif à une décompensation du foie chez les patients coinfectés par rapport aux patients mono-infectés est de 6,14 (197).

### **2.2.2. Mécanismes de pathogenèse du VIH**

Les mécanismes pouvant expliquer l'accélération de la progression de l'hépatite C chez les patients infectés par le VIH sont encore mal compris. Il est toutefois possible d'impliquer l'altération de l'immunité cellulaire qui permettrait une meilleure réplication du VHC, ce qui entraînerait une augmentation de la charge virale VHC. En effet, une réduction prononcée des réponses CD4 et CD8 spécifiques au VHC a été observée chez les patients coinfectés, associée à une profonde détérioration des fonctions immunologiques cellulaires (207).

Il est également plausible que le VIH infecte préférentiellement les lymphocytes CD4 spécifiques au VHC; cette infection pourrait fortement réduire les réponses immunitaires cellulaires durant l'hépatite C aiguë et contribuer à la persistance du virus. En effet, la clairance du VHC se produit chez seulement 5 à 10% des patients coinfectés par le VIH et le VHC, par rapport à 15 à 30% chez les patients seulement infectés par le VHC (208, 209). La coinfection par le VIH a également montré une importante altération de la réponse spécifique au VHC vers une production de cytokines pro-inflammatoires de type 1 (210). Finalement, l'accélération de l'évolution de l'hépatite C peut également provenir de l'effet cytotoxique direct du VIH sur les cellules du foie : outre les lymphocytes CD4 du sang périphériques, le VIH peut infecter les cellules de Kupffer, les cellules mononucléaires intrahépatiques (211), et peut provoquer l'apoptose des hépatocytes par la signalisation via CXCR4 sans infection de la cellule (212).

### 2.2.3. Influence de la thérapie antirétrovirale combinée

En plus des effets de la coinfection par le VIH, il faut ajouter ceux des thérapies qu'utilise la majorité des patients infectés par le VIH dans les pays industrialisés. La HAART ou « highly active antiretroviral therapy » (multithérapie antirétrovirale) est par définition le traitement par une combinaison de plusieurs médicaments antirétroviraux très efficaces, visant à réduire la charge virale du VIH et à rétablir des réponses immunitaires efficaces contre certains pathogènes opportunistes. Les effets réels de la HAART sur le développement de l'hépatite C restent encore controversés. Certains chercheurs n'ont observé aucun changement dans les niveaux plasmatiques d'ARN du VHC durant les 6 premiers mois du traitement (213). Toutefois, la plupart ont détecté une augmentation de l'ARN sérique durant les 3 premiers mois, suivie d'une réduction progressive pouvant revenir à des valeurs basales (183, 214-218). De plus, une éradication du VHC a été rapportée chez un patient recevant la thérapie (219). Malheureusement, une augmentation prolongée de l'ARN plasmatique du VHC a également été détecté, mais elle semble être limitée aux personnes affichant des comptes CD4 initiaux faibles ( $<350$  cellules par  $\text{mm}^3$ ) (220).

L'augmentation transitoire de l'ARN sérique du VHC pourrait être expliquée par le syndrome de la reconstitution immunitaire associée avec la lyse par les lymphocytes cytotoxiques des hépatocytes infectés, aboutissant à une augmentation des transaminases et de la charge virale du VHC (215, 221). De plus, des études ont rapporté une corrélation entre l'augmentation des alanines aminotransférases et celle des comptes CD4 chez des patients développant une hépatotoxicité sévère (222, 223). Finalement, l'hépatotoxicité associée aux antirétroviraux eux-mêmes pourrait être responsable des dommages causés aux cellules hépatiques ainsi que de l'augmentation du relargage de l'ARN dans la circulation sanguine (216, 222).

L'hépatotoxicité de la HAART est une complication communément observée chez les patients coinfectés par le VIH et VHC : elle est caractérisée par une augmentation du taux de cytolysse hépatocellulaire ainsi que d'un niveau de transaminases sériques élevé. En moyenne, cet effet néfaste se produit dans 6 à 30% des cas (177), alors qu'une hépatotoxicité sévère (définie par une augmentation du niveau des transaminases au-delà de 5 fois la limite normale supérieure) aboutissant à une interruption de la thérapie a été observée dans moins de 10% des cas (183, 224, 225). De nos jours, il existe 3 classes d'agents antirétroviraux qui sont combinés pour le traitement de l'infection par le VIH : les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse ou NRTIs, les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse ou NNRTIs, ainsi que les inhibiteurs de la protéase ou PIs.

La toxicité des NRTIs est associée à l'inhibition de l'ADN polymérase gamma de la mitochondrie dont les fonctions sont ainsi altérées. Il en résulte des pathologies allant de l'hépatotoxicité et de la stéatose hépatique jusqu'à une acidose lactique (226). Cette dernière a été décrite chez des patients traités par la zidovudine, la didanosine ou la stavudine (227-229). Les NNRTIs quant à eux engendrent des réactions d'hypersensibilité apparaissant généralement au début de la thérapie. Ces pathologies peuvent accompagner tous les NNRTIs, mais sont particulièrement apparents avec la névirapine ou l'efavirenz (225). Les causes de cette toxicité ne sont pas encore connues. Finalement, les PIs sont métabolisés dans le foie par des enzymes liées au cytochrome P-450. Ils peuvent altérer la cinétique d'autres médicaments en agissant comme inhibiteurs de la P-450 ou activateurs d'autres enzymes hépatiques, et ainsi engendrent l'hépatotoxicité en augmentant le taux plasmatique des autres médicaments (230, 231).

## **2.3. L'impact du VHC sur l'infection par le VIH**

### **2.3.1. Influence du VHC**

Encore là, l'impact de l'infection par le VHC sur l'évolution de la maladie associée au VIH est très controversé. Toutefois, il semblerait que le VHC entraîne un risque accru de progression vers le SIDA chez les individus coinfectés (232, 233). De plus, l'infection par le VHC semble réduire le rétablissement des comptes CD4 après l'initiation de la HAART par au moins 50 CD4 par mm<sup>3</sup> (179, 234). Par ailleurs, d'autres auteurs n'ont montré qu'une augmentation des niveaux sériques de transaminases (235, 236).

Malgré certaines controverses, l'influence du VHC doit être pris en compte chez les patients infectés par le VIH, ne serait-ce que pour les complications engendrées par le traitement HAART.

### **2.3.2. Influence du traitement VHC**

Que ce soit dans le cas de la monothérapie à l'interféron ou de la combinaison de l'interféron et de la ribavirine, les taux de réponses ont été plus faibles chez les personnes coinfectées par le VIH et le VHC. En moyenne, le taux de réponse persistante du VHC observé se situait entre 13% et 40% après la fin du traitement combiné (237-239). L'introduction des interférons pégylés a permis d'augmenter l'efficacité des réponses non seulement chez les patients infectés par le VHC seulement, mais également chez les coinfectés par le VIH et le VHC (137, 145, 240, 241): les patient infectés par le génotype 1 recevant la combinaison de cette nouvelle forme d'interféron et de la ribavirine ont montré un taux de réponses persistantes après le traitement de 29%, alors que les réponses persistantes dans le contexte d'infection par les génotypes 2 et 3 ont été supérieures, avec une moyenne de 62% (242).

Malheureusement, des effets toxiques ont souvent provoqué un arrêt du traitement dû à une interaction néfaste entre les médicaments : une augmentation de la fréquence de la cytotoxicité mitochondriale a été détectée chez des patients traités par la ribavirine et la didanosine (243, 244). Par contre, aucune inhibition significative de la zidovudine ou de la stavudine n'a été provoquée par la ribavirine (245). Les patients coinfectés et traités avec des thérapies combinant la ribavirine avec certains antirétroviraux contre le VIH devraient donc être surveillés de manière plus minutieuse.

### **3. Le VHC et la grossesse**

Après l'introduction du dépistage de l'infection par le VHC en 1990, la transmission verticale (mère-enfant) est devenue la source majeure d'infection des enfants. Aux Etats-Unis, 2,3 à 4,5% des femmes ayant atteint l'âge de porter un enfant sont infectées par le VHC. Au vu de l'évolution préoccupante de la maladie et de l'efficacité insuffisante des traitements actuels, il est essentiel de mieux comprendre l'influence de l'infection par le VHC chez la femme enceinte ainsi que les conséquences de la transmission à sa progéniture.

#### **3.1. La prévalence de l'infection par le VHC chez la femme enceinte**

De nombreuses études ont estimé la prévalence de l'infection par le VHC au cours de la grossesse en extrapolant les données observées lors d'évaluation du risque de la transmission maternofoetale. Selon le lieu d'étude, la taille de l'effectif, les tests de dépistage utilisés, ou encore le groupe de patientes caractérisés par des facteurs de risques différents, la prévalence d'anticorps anti-VHC détectables chez la femme enceinte varie énormément, mais semble suivre celle trouvée dans la population générale et donc se situe



en moyenne à 1% dans les études examinant au moins 3 000 sujets (révisé dans (246)). Au Canada, une étude portant sur des femmes en âge de procréer, mais qui n'étaient pas enceintes, a révélé une prévalence de 0,58% (21). La seule enquête sur l'ensemble d'une population de femmes enceintes au Canada a été faite en Colombie-Britannique, en 1994, et a signalé un taux de séroprévalence de 0,9% (21).

Le dépistage systématique en vue de déceler l'infection par le VHC n'est pas recommandé actuellement, tout du moins en ce qui concerne les directives du Canada, étant donné qu'il n'y a aucune indication de traitement ou de modalité d'accouchement pouvant diminuer le risque de transmission verticale et que le rapport coût-efficacité d'une telle opération n'est pas favorable (21, 247). Toutefois, il serait offert de manière sélective aux femmes enceintes ayant certains facteurs de risque d'infection par le VHC (246, 248, 249) tels que :

- La séropositivité pour le VIH.
- L'utilisation actuelle ou antérieure de drogues injectables.
- Des partenaires sexuels actuels ou antérieurs connus comme utilisateurs de drogues injectables.
- Le séjour dans ou la provenance d'une région endémique.
- Des antécédents de transfusion de sang ou produits dérivés ou transplantation d'organe avant 1992.
- L'hémodialyse actuelle ou antérieure.
- Des antécédents de « body piercing » ou de tatouage.
- Un passé de femme incarcéré ou un partenaire sexuel incarcéré.
- Un niveau sérique d'aminotransférases élevé.

Certains autres critères plus larges peuvent également être pris en compte : un test positif pour une infection par le virus de l'hépatite B, des partenaires sexuels à risque pour des hépatites, des antécédents de maladies sexuellement transmissibles.

Malgré ce dépistage sélectif, il existe encore des risques d'omettre quelques femmes avec une hépatite C chronique. Idéalement, le dépistage devrait être proposé à toutes les femmes le désirant. De plus, ceci permettrait de découvrir des cas d'hépatites chroniques en absence de facteurs de risque, ce qui conduirait les personnes infectées à faire des

changements importantes et rapides de style de vie (alcool, médication, maintien d'un poids santé) ainsi que d'envisager des traitements adéquats après la grossesse.

### **3.2. L'influence de l'hépatite C sur la grossesse**

L'hépatite C chronique ne semble pas avoir d'effet néfaste sur la grossesse, l'accouchement et la période néonatale : il n'y pas de risque accru de mortalité maternelle, de complications obstétriques comme le diabète gestationnel ou l'hypertension, de prématurité, d'accouchement d'un mort-né, de malformations congénitale, de souffrance fœtale, ou de poids anormal à la naissance (250-254). En bref, le VHC ne constitue pas une contre-indication à la grossesse, mais un counseling extensif avec des experts dans le domaine sur les conséquences à long terme est à souhaiter.

### **3.3. L'influence de la grossesse sur l'hépatite C**

Les études sur l'influence de la grossesse sur l'hépatite C sont très peu nombreuses et affichent des effectifs minimaux, mais montrent toutefois des résultats concordants. Dans le cas de femmes présentant des transaminases élevées, une diminution ou une normalisation du niveau sérique de l'alanine aminotransférase (ALT) est observé au troisième trimestre de grossesse, avec un retour aux valeurs prégestationnelles dans les 3 à 6 premiers mois suivant l'accouchement (250, 255-257). D'autres études ont révélé une augmentation de l'ARN viral durant le deuxième et le troisième trimestre, avec à nouveau dans ce cas une diminution significative des valeurs virémiques après l'accouchement (258, 259). Toutefois, ces constatations sont encore controversées, d'autres études démontrant que la charge virale est variable durant la grossesse (256, 260). C'est pourquoi, s'il s'agit d'un facteur de risque de transmission mère-enfant du VHC (voir ci-dessous), il est nécessaire d'effectuer la mesure au troisième trimestre étant donné que les autres mesures ne reflèteraient ni ne prédiraient la concentration d'ARN viral au moment de l'accouchement.

L'étude cas-contrôles de Fontaine et al. est la seule ayant observé l'évolution des lésions histopathologiques hépatiques chez les femmes enceintes (261). Ils ont étudié 12 femmes infectées par le VHC qui ont eu une grossesse entre deux biopsies, la deuxième ayant été pratiquée en moyenne 1,6 ans après l'accouchement et 4,3 ans après la première biopsie. Une augmentation significative de l'incidence nécroinflammatoire de Knodell a été observée à la deuxième biopsie chez ces 12 femmes, ce qui n'a pas été constaté chez 12 femmes infectées par le VHC sans grossesse. Ces résultats suggèrent que la grossesse aggraverait les lésions histopathologiques hépatiques. Toutefois, seules des lésions très minimales ont été révélées sur des biopsies réalisées après l'accouchement dans une autre enquête (250).

Ces changements durant la grossesse chez la femme infectée par le VHC pourraient être expliqués par la modulation de l'activité du système immunitaire. La diminution des ALT pourrait être attribuée à la relâche d'interféron endogène à partir du placenta (250), mais ceci n'expliquerait pas l'augmentation de la charge virale. Une deuxième hypothèse, proposée par Conté et al. (257), est centrée sur la sécrétion de cytokines provenant de l'unité foeto-placentaire (262), avec comme conséquence possible une mutation des réponses cellulaires en réponses humorales durant la grossesse. Finalement, l'observation d'une diminution du niveau d'enzymes hépatiques chez des femmes infectées par le VHC traitées avec des œstrogènes (263) a suggéré l'hypothèse d'une immunomodulation due à la relâche d'œstrogène durant le troisième trimestre.

### **3.4. La transmission mère-enfant**

#### **3.4.1. Définition**

Beaucoup d'enfants naissant de mères infectées par le VHC montrent des tests sérologiques anti-VHC positifs. Or, il est établi que les anticorps peuvent être acquis de la mère par transfert transplacentaire passif et peuvent persister et donc être détectables durant

les 12 à 15 premiers mois de vie de l'enfant. Dans le cas où la mère présente une charge virale élevée lors de l'accouchement (264) ou si elle est coïnfectée par le VIH (265), la durée de persistance de ces anticorps chez le nouveau-né s'en trouve prolongée, et ce jusqu'à 18 mois (264-266). De plus, la présence d'anticorps peut être également un indice d'une infection passée. Ainsi, le test adéquat est la détection de l'ARN viral dans le sérum par PCR. Toutefois, l'ARN viral peut apparaître plus tardivement (après plusieurs semaines de vie) et même fluctuer jusqu'à devenir indétectable de manière transitoire. C'est pourquoi, le critère recommandé par la conférence de consensus du NIH pour établir un diagnostic positif d'infection par le VHC chez le nouveau-né est de détecter l'ARN viral à deux occasions dans un intervalle de 3 à 4 mois après que l'enfant ait atteint l'âge de 2 mois, et/ou de détecter des anticorps anti-VHC après que l'enfant ait atteint l'âge de 18 mois (21, 246, 267).

L'analyse des quasiespèces par séquençage des variants viraux chez la mère et l'enfant (voir chapitre 5.4 Méthodes d'études et paramètres des quasiespèces) peut permettre d'identifier la souche infectant les deux individus et de confirmer la transmission verticale, mais il ne s'agit pas d'un test couramment utilisé par les laboratoires de diagnostique.

### **3.4.2. Modalité de la transmission mère-enfant**

La question de l'infection *in utero* ou intrapartum reste encore controversé. L'ARN du VHC a pu occasionnellement être détecté dans le liquide amniotique lors de procédures d'amniocentèse et donc appuie la possibilité d'une infection *in utero* (268, 269). Toutefois, la contamination par le sang maternel lors de la ponction ne peut pas être exclue. La transmission *in utero* est également soutenue par la découverte de l'ARN viral dans le sérum du nouveau-né dès sa naissance (270-272). Pourtant, l'effet potentiel d'une césarienne élective dans la diminution de la transmission verticale atteste d'une infection lors de l'accouchement ou avoisinant cet événement (273, 274). L'effet protecteur d'une

césarienne électorve n'a toutefois pas été confirmé par d'autres études, laissant donc dans la controverse cet argument suggérant une infection du VHC intrapartum (275). Finalement, une étude sur la transmission verticale du VHC chez un seul de 2 jumeaux monozygotiques, prouvant donc un environnement intra-utérin identique, a démontré une infection intrapartum (276). En définitive, il est important de souligner qu'il pourrait y avoir plus d'un mode d'infection du VHC chez différents patients.

### **3.4.3. Taux de transmission mère-enfant**

Il est extrêmement difficile de déterminer le taux exact de transmission mère-enfant du VHC. Une multitude d'études se sont attelées à cette tâche, et il est difficile de toutes les énumérer (révisé dans (114-116)). Les causes de ce problème sont les effectifs réduits de certaines cohortes, le mauvais suivi ou diagnostique des nouveau-nés, les méthodologies de diagnostique obsolètes, et/ou la sélection de populations maternelles avec des facteurs de risque particuliers, comme la coinfection par le VIH ou une charge virale élevée du VHC. Ceci a amené des estimés du taux de transmission mère-enfant allant de 0% à 90%! Une revue concise d'un nombre considérable d'études a rapporté une transmission globale du VHC de moins de 10% dans la plupart des populations sans sélection pour le statut VIH, avec une augmentation dans de nombreuses études incluant les mères coinfectées par le VIH (114). La transmission est largement restreinte aux enfants nés de femmes montrant une virémie détectable durant la grossesse ou pendant l'accouchement (114).

### **3.4.4. Facteurs de risque de la transmission mère-enfant**

#### **3.4.4.1. Niveau de charge virale VHC**

Il existe une corrélation entre le niveau de virémie VHC de la mère et l'incidence de la transmission à l'enfant. En effet, des charges virales statistiquement plus élevées sont associées à un taux de transmission plus élevé (264, 270, 274, 277-287). Toutefois, certaines études n'ont pas révélé de telles différences (266, 288-295). La discordance dans

ce cas est probablement due au manque de précision de la collecte d'échantillon sanguin, allant du troisième trimestre jusqu'après l'accouchement ou encore sans indication précise. La plupart des études n'ont observé de transmission mère-enfant du VHC qu'en présence de charges virales au-delà de  $10^5$  copies par ml (seuil de transmission).

#### **3.4.4.2. Coinfection avec le VIH**

La coinfection avec le VIH a depuis longtemps été associée à un taux plus élevé de transmission verticale. La plupart des études ont estimé que le risque de transmission verticale augmentait de plus de 4 fois si la mère est coinfected par le VIH (révisé dans (114-116)). La transmission à l'enfant est plus fréquente lorsque l'infection par le VIH est à un stade avancé ou lorsque le niveau de virémie VIH est élevé (274, 281). La coinfection par le VIH engendre une immunosuppression qui favoriserait la réplication du VHC. L'augmentation du taux de transmission pourrait être expliquée en partie par des niveaux plus élevés de la charge virale VHC. En effet, Sabatino et al. ont constaté une charge virale 10 fois plus élevée chez les femmes coinfectedes par le VIH et le VHC par rapport aux femmes uniquement infectées par le VHC (296). Cette hypothèse est confirmée par le fait qu'aucune des femmes coinfectedes par le VIH et le VHC et prenant un traitement antirétroviral n'a transmis le VHC à leurs enfants (266, 297). Il n'est donc pas encore prouvé que le VIH est un facteur de risque indépendant pour la transmission mère-enfant ou s'il augmente le taux de transmission simplement parce qu'il provoque l'élévation de la charge virale VHC chez la femme coinfectede.

#### **3.4.4.3. Génotype du VHC**

Aucune association du génotype du VHC avec un taux de transmission mère-enfant plus élevé n'a été confirmée à ce jour (264, 278, 280, 287, 291). Une seule étude a déterminé que les génotypes 1b et 3a étaient associés plus souvent à la transmission que les génotypes 1a ou 2 (298). Toutefois, la majorité des femmes étudiée dans cette cohorte étaient coinfectedes avec le VIH. Ces résultats doivent donc être interprétés avec prudence.

#### **3.4.4.4. Utilisation de drogues injectables**

Certaines études ont rapporté un taux de transmission mère-enfant 2 fois supérieur chez les femmes infectées par le VHC et utilisatrices de drogues injectables (292, 293, 296). Toutefois, cette association n'était pas évidente dans d'autres enquêtes (264, 267, 277).

#### **3.4.4.5. Facteurs liés à l'accouchement**

La littérature n'indique aucune différence significative dans le taux de transmission verticale entre un accouchement vaginal et une césarienne (264, 265, 281, 287, 292, 299). Toutefois, certaines études ont suggéré un risque de transmission plus élevé lors d'accouchements vaginaux (267, 293, 297, 300, 301). Gibb et al. ont montré une diminution de transmission lorsqu'une césarienne élective a été utilisée pour l'accouchement avant la rupture des membranes par rapport à une césarienne d'urgence (273). De plus, aucune transmission n'a été observée chez les femmes accouchant par césarienne élective dans l'étude de Mast et al. (274). Tel que déjà mentionné, ces résultats n'ont pas été confirmé par d'autres chercheurs qui disposaient d'une cohorte suffisamment grande pour détecter une réduction de la transmission du VHC (275). Finalement, une association entre la durée de la rupture des membranes avant l'accouchement et la transmission du VHC a été observée (264, 274, 275): pour chaque heure d'augmentation du laps de temps entre la rupture des membranes et l'accouchement, le risque de transmission du VHC augmente d'environ 3%, avec une moyenne de 4,5 heures (275) et de plus de 6 heures chez les femmes ayant transmis le VHC à leurs enfants (274).

La controverse dans le mode d'accouchement viendrait du petit nombre de certains types d'accouchement, en particulier la césarienne élective, ou encore du fait que beaucoup de participants de ces études étaient coïnfectés par le VIH ou étaient caractérisés par une charge virale élevée, 2 facteurs pouvant augmenter le risque de transmission du VHC. C'est

pourquoi, dans certains cas spécifiques, un accouchement par césarienne pourrait être recommandé (301, 302). Le risque accru de transmission durant un accouchement vaginal détecté dans certains cas pourrait être relié à l'exposition à du sang contaminé par le VHC lorsque l'enfant passe à travers la filière génitale. Toutefois, l'exposition à du sang peut parfois être plus importante lors d'une césarienne. Il est évident que d'éventuels essais cliniques randomisés sont nécessaires pour trancher la question du mode d'accouchement. Pour l'instant, la césarienne n'est pas conseillée chez les femmes enceintes infectées par le VHC, à moins d'indications obstétriques d'usage.

#### **3.4.4.6. Allaitement**

Le virus de l'hépatite C peut être détecté dans le lait maternel et le colostrum mais à des niveaux relativement faibles (303, 304). Néanmoins, l'allaitement n'est généralement pas considéré comme un facteur de risque de transmission mère-enfant du VHC (257, 264, 265, 280, 287, 299, 303, 305, 306). Bien que les questions de durée et d'allaitement maternel exclusif n'ont pas été adressées. Selon les lignes directives du NIH, l'allaitement ne devrait pas être contre-indiqué tant que les mamelons ne présentent aucune blessure. Le lait doit être jeté et l'allaitement suspendu en présence de crevasse ou gerçures et de sang. Les conclusions de la conférence de consensus française sont néanmoins plus prudentes (307).

#### **3.4.4.7. Facteurs divers**

D'autres facteurs de risque pouvant augmenter le taux de transmission verticale ont également été mentionnés par certaines études, mais doivent encore être confirmés. La présence d'anti-C100 (le C100 est un antigène recombinant utilisé dans le test immunoenzymatique de première génération pour la détection d'anticorps anti-VHC, contenant les acides aminés 1569 à 1931 de la région NS3/NS4) en immunoblot est corrélée à une augmentation du risque de transmission (291). Par ailleurs, des facteurs immunogénétiques tel que la présence de l'allèle HLA-DQB10301 (308) ou HLA-DR13



(309) chez l'enfant semblent jouer un rôle dans la protection contre l'infection, peut-être en modulant les réponses immunitaires dirigées contre le VHC.

### **3.5. Traitement durant la grossesse**

La ribavirine est connue pour sa tératogénicité (310), et donc entraîne une contre-indication formelle pendant la grossesse. L'administration de ribavirine doit être arrêtée 4 mois avant la procréation chez la femme, et 7 mois avant chez l'homme, en raison de la toxicité observée chez l'animal lors de la spermatogenèse. L'allaitement est contre-indiqué pendant le traitement. L'interféron est lui aussi généralement contre-indiqué durant la grossesse, parce qu'il possède des propriétés anti-prolifératives ainsi que neurotoxiques et est potentiellement nocif pour le développement du fœtus (311-313). Pourtant, aucune complication néfaste n'a été observée lors d'administrations anecdotiques (314-318). On a tout de même constaté un retard de croissance intra-utérin dans 22% des cas, et un accouchement prématuré dans 15% des cas (319). Il pourrait être envisageable de l'utiliser chez des femmes enceintes à un stade avancé de maladie hépatique (21) ou lors d'une infection aiguë (318), mais seulement dans le contexte d'un protocole de recherche clinique bien contrôlé.

## **4. La protéine F**

### **4.1. Historique**

La protéine de la nucléocapside (core) se situe du côté N-terminal de la protéine et sa maturation passe par 2 processus de protéolyse : le premier produit une protéine de 191 acides aminés d'une masse moléculaire de 23 kDa (p23), qui est une seconde fois clivée du

côté C-terminal pour générer une protéine mature de 173 à 182 acides aminés d'environ 21 kDa (p21) (320).

Outre ces deux formes de core, une troisième de 16-17 kDa (p16 ou p17) a été décrite *in vitro* dans des expériences de traduction, ainsi que *in vivo* dans des cellules mammifères (321-323). p21 et p16/p17 ont montré une séquence en acides aminés identiques en N-terminal, et la délétion partielle du côté C-terminal de core n'a pas affecté l'expression de p16/p17. Cette nouvelle protéine p16/p17 a donc tout d'abord été considérée comme provenant d'un troisième événement de clivage protéolytique, et aurait donc représenté une forme tronquée en C-terminal de core ou p21.

La région codant pour la protéine core est spécialement conservée au niveau de sa séquence nucléotidique (324, 325). De plus, Walewski a effectué des analyses comparatives de séquences du VHC issues de GenBank et a démontré dans la protéine core un agrégat de points montrant une conservation inhabituelle du nucléotide en 3<sup>e</sup> position du codon (326). Ceci suggère l'existence d'un cadre de lecture alternatif. Cette hypothèse a effectivement été confirmée de manière expérimentale avec l'introduction de mutations non-sens (STOP) dans le cadre de lecture +1 qui réduisent la taille de la protéine p16/17 mais sans changement pour p21 (327). Ces expériences démontrent donc que la protéine p16 est dérivée d'un cadre de lecture chevauchant celui de core en +1.

La dénomination définitive de cette nouvelle protéine synthétisée par le VHC n'a pas encore été déterminée. Elle a été appelée ARFP (pour « alternative reading frame protein »), F (pour « frameshift »), DFC<sub>HCV</sub> (pour « double frameshifted core »), ou encore core+1 ORF. Par soucis de clarté, nous la désignerons comme étant la protéine F dans le restant de ce document, comme cela a été le cas dans le premier article énoncé. Il faut néanmoins mentionner que Branch et al. ont proposé que toutes les protéines contenant les acides aminés codés dans le cadre de lecture +1 de core soient nommées ARFP, suivi d'une barre oblique précédant des abréviations pour désigner spécifiquement les différentes protéines : ARFP/F (Fig.5A), ARFP/DF (Fig.5B), et ARFP/S (Fig.5D) (328).

## 4.2. Mécanisme moléculaire de synthèse de la protéine F

Le mécanisme moléculaire responsable du changement de cadre lecture en +1 qui induit la synthèse de la protéine F reste encore à déterminer. Celui qui a montré le plus d'intérêt et d'appui expérimental implique le déphasage (ou « frameshift ») ribosomal. Un séquençage radioactif a démontré que les séquences de core et de la protéine F divergent vers ou au codon 11, où se trouve une séquence riche en adénines (codons 8 à 14). En outre, la fusion d'un tag HA après le premier codon de core a démontré que la production de la protéine F nécessitait le codon d'initiation AUG de core et se terminait dans le nouveau cadre de lecture +1(329). En résumé, la synthèse de la protéine F commencerait au codon d'initiation AUG de core, puis le ribosome « glisserait » sur la séquence riche en A, provoquant un déphasage en -2/+1 vers ou au codon 11 et terminerait au codon STOP en +1 (Fig.5A) (327, 329-333). Selon les souches du VHC, le cadre de lecture ouvert en +1 peut encoder une protéine de 126 à 162 acides aminés. Le génotype 1a, quant à lui, produirait toujours une protéine de 162 acides aminés (329, 334).

Outre le déphasage -2/+1, le ribosome peut également effectuer un déphasage -1/+2 (Fig.5C) *in vitro* (327) et *in vivo* (331), ce qui a été démontré au moyen de fusions avec un gène rapporteur de la luciférase. La protéine en découlant aurait une masse de seulement 1,5 kDa, ce qui expliquerait la difficulté de sa détection. Comme pour le déphasage -2/+1, le déphasage -1/+2 serait dû à la présence de la séquence de « glissement » riche en A (codon 8-14) (331). Toutefois, étant donné le nombre de codons STOP présent dans ce cadre de lecture, le déphasage ribosomal -1 chez le VHC ne s'effectuerait sans doute pas dans le but de synthétiser une protéine, mais plutôt de manière à réguler et contrôler l'expression de core ou de la protéine F (327).

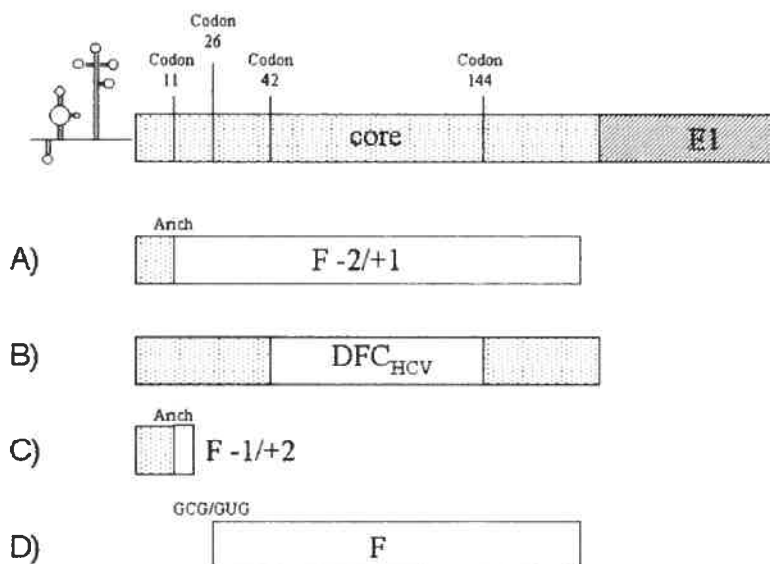
Toujours synthétisée par le mécanisme de déphasage ribosomal, une autre forme alternative de la protéine core a été observée *in vitro* et *in vivo* avec le génotype 1b (335, 336). Par des analyses de spectrométrie de masse et de séquençage, Boulant et al. ont

déterminé que cette protéine résultait d'un déphasage +1 au codon 42, suivi dans une certaine proportion des cas par un autre déphasage -1 au codon 144 pour revenir au cadre de lecture normal 0 de core (Fig.5B). C'est pourquoi cette protéine a été nommée DFC<sub>HCV</sub> (« double frameshifted core ») (335). Toutefois, il est important de mentionner que la protéine résultant d'un seul déphasage en +1 vers ou au codon 11 et finissant dans ce cadre de lecture +1, a été détecté durant l'étude, ce qui n'exclue pas la présence de ces 2 formes de protéines alternatives. De plus, toutes deux possèdent une large région commune codée par le cadre de lecture +1 (328, 335).

Le déphasage ribosomal est un mécanisme déjà observé chez d'autres virus comme les rétrovirus (337, 338), les coronavirus (339) ainsi que chez les astrovirus (340). En ce qui concerne le déphasage ribosomal -1, deux motifs semblent être importants : le premier est une séquence heptamérique de glissement XXXYYYYZ (X=base, Y=A ou U, Z=non G) (341) et le deuxième est une structure secondaire d'ARN en aval, une épingle à cheveux ou plus fréquemment un pseudonoeud (342, 343). Le mécanisme utilisé pour le déphasage ribosomal +1 pourrait également impliquer les mêmes particularités. La séquence riche en A est relativement bien conservée parmi les souches du VHC, malgré quelques différences. La séquence continue de 10 A exactement ne peut donc être essentielle, comme cela a été proposé (331, 333, 344). De plus, dans le cas du déphasage -1, certains virus n'utilisent pas précisément la séquence heptamérique décrite ci-dessus (345-347). Enfin, la séquence d'ARN en aval du signal de déphasage semble avoir le potentiel de former une structure secondaire (tige-boucle, double tige-boucle ou pseudonoeud), pouvant participer au mécanisme de déphasage ribosomal (325, 331, 348).

La présence d'un site d'initiation interne dans le cadre de lecture +1 est un autre mécanisme pouvant également expliquer le changement apparent de cadre de lecture et l'expression de la protéine F. Par un système utilisant la luciférase fusionnée à la séquence de la protéine core, Vassilaki et Mavromara ont détecté une protéine plus petite que la séquence prédite pour la F, et dont la synthèse n'avait pas été affectée malgré la mutation

de la séquence riche en A ou même du codon d'initiation AUG de la protéine core (344). Par des études mutationnelles, ils ont suggéré que la synthèse de cette protéine était occasionnée par une initiation interne dans le cadre de lecture +1, probablement aux codons AUG 86 ou 88. De manière similaire, Baril et Brakier-Gingras ont proposé que la protéine F n'était pas synthétisée par un mécanisme utilisant le déphasage, mais résulterait bien d'une initiation directe à un codon non-AUG (GUG ou même GCG) situé au codon 26 (+1) (Fig.5D) (349). Dans le cas de l'initiation au codon GCG, un constat sans précédent, la présence de l'IRES est essentielle, compatible avec une éventuelle régulation de l'expression de la protéine F au niveau traductionnel (349).



**Figure 5. Les différentes protéines produites dans un cadre de lecture alternatif.** A) protéine F, B) DFC<sub>HCV</sub>, C) protéine produite avec un déphasage ribosomal en -2/+1, D) protéine produite avec un site d'initiation interne. Le cadre de lecture 0 de core est décrit en pointillé clair et le cadre de lecture alternatif +1 ou -1 est indiqué en blanc.

### **4.3. Localisation subcellulaire de la protéine F**

La localisation subcellulaire de la protéine F est encore controversée. D'une part, Lo et al. ont détecté la protéine F majoritairement dans le noyau des cellules CV-1, avec un enrichissement apparent dans le nucléole (322). Ye et al. ont également décelé une coloration nucléaire, mais seulement chez certains hépatocytes provenant de la périphérie d'un hépatocarcinome (350). Il pourrait toutefois s'agir d'une contamination par la protéine core, dont la synthèse n'a pas été inhibée dans le système utilisé. En effet, core et ses différentes formes de maturation ont été observées dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau et le nucléole (320, 351, 352), ce qui pourrait expliquer ces résultats. De plus, la protéine F ne possède pas de signal de localisation nucléaire connu (326). Par immunofluorescence, Roussel et al. ont principalement localisé la protéine F dans le cytoplasme des cellules HepG2, et dans certains cas, sa distribution était périnucléaire (330). Ces résultats sont soutenus par Xu et al. qui ont observé une coloration ponctuée périnucléaire dans les cellules Huh7 (353). Des expériences de fractionnement membranaire ont également confirmé l'association de la protéine F avec le réticulum endoplasmique lisse et rugueux, tout comme core et NS5B (54, 354, 355).

### **4.4. Rôle(s) biologique(s) de la protéine F**

La protéine F est fortement basique, avec un PI d'environ 12 (329). Elle ne montre aucune homologie de séquence avec une protéine de fonction connue et il n'y a aucune preuve qu'elle fasse partie du virion. De plus, elle est très instable, dû à sa rapide dégradation par la voie du protéasome-ubiquitine. De ce fait, sa demi-vie en cellules de mammifères est d'environ 10 minutes (330, 353, 356). En outre, l'efficacité de la synthèse de la protéine F et donc du déphasage dans les cellules eukaryotiques est de moins de 2% par rapport à celle de core (329, 331, 335). Ceci suggère que la protéine F est nécessaire seulement en de petite quantité dans le cycle viral du VHC et donc favoriserait un rôle de

protéine régulatrice (333, 353). Etant donné que l'absence de la protéine F n'empêche pas la réplication des réplicons subgénomiques du VHC, elle ne semble pas essentielle à la réplication virale (73, 74, 357, 358). De manière intéressante, Xu et al. ont mentionné qu'il existait un cadre de lecture +1 chevauchant celui de core du virus GB-B (GBV-B), le *Flaviviridae* le plus apparenté au VHC (329). La présence d'un analogue à la protéine F suggère la préservation du phénomène de protéine chevauchante au cours du temps dans cette famille de virus, ce qui suggère que la protéine F possède une fonction importante.

Il est tentant de postuler que la protéine F puisse interférer avec les fonctions de core, ou encore que certaines propriétés fonctionnelles attribuées à core soient en fait dues à la protéine F, puisque toutes deux sont apparemment exprimées simultanément. La protéine core, outre son rôle apparent dans l'assemblage des particules virales, joue un rôle essentiel dans la pathogenèse du VHC (59, 359). Plus précisément, core active ou inhibe l'apoptose (360, 361), module des voies de signalisation de cellules hôtes (362, 363), affaiblit les réponses immunitaires de l'hôte (364), affecte le métabolisme lipidique (351, 365) et détient un potentiel oncogène (366). Basu et al. ont donc testé certaines de ces propriétés, plus précisément le rôle de la protéine F dans la modulation transcriptionnelle des promoteurs cellulaires c-myc, hTERT, p53 et p21. Ils ont déterminé qu'elle n'altérait pas significativement l'activité promotrice de c-myc, ni de hTERT, ni de p53, mais qu'elle inhibait l'expression de p21 (332). De plus, la protéine F n'inhibe pas l'apoptose médiée par TNF $\alpha$  dans les cellules HepG2, et n'active pas la croissance de fibroblastes d'embryon de rat. En conclusion, ces résultats suggèrent que la protéine F ne partage pas les rôles fonctionnels de la protéine core, à l'exception possiblement de la modulation du gène p21.

#### **4.5. Réponses immunitaires contre la protéine F**

L'existence de la protéine F a tout d'abord été montrée dans des études *in vitro* utilisant des cellules eukaryotiques transfectées. Pour déterminer si cette protéine était effectivement exprimée durant une infection naturelle du VHC, plusieurs groupes ont tenté

de détecter des anticorps ou des cellules spécifiques à la protéine F chez des patients infectés par le VHC. Pour ce faire, des peptides synthétiques dérivés de la séquence avec le déphasage +1 de la protéine F ont été développés en fonction de présumés critères d'immunodominance (326, 335). La réactivité de sérum de patients infectés par le VHC contre ces peptides synthétiques a été démontrée par ELISA et immunobuvardage. De manière à tester la pleine longueur de la protéine F, des constructions provoquant le déphasage +1 ont été utilisées afin de la synthétiser *in vitro*. A nouveau, des échantillons de sérums VHC ont réagi contre ces protéines complètes, la fréquence des réponses se situant entre 41,6% et plus de 80% des patients (327, 329, 333, 336, 350, 367). Etant donné que les 10 premiers acides aminés de la protéine F sont identiques à ceux de core (si on en croit le modèle de Xu et al.), la réactivité d'une protéine synthétique avec une délétion des 10 premiers codons a également été étudiée. Les mêmes expériences ont effectivement révélé une réactivité, mais plus faible, probablement dû au fait de la courte demi-vie de la protéine F (353) ainsi que de la faible efficacité du déphasage (329). Ces résultats indiquent donc clairement que des antigènes codés par le cadre de lecture +1 sont exprimés durant l'infection chronique par le VHC et stimulent des réponses humorales chez certains patients. De manière intéressante, les sérum provenant de patients infectés par différents génotypes du VHC (1a, 1b, 2, 3, et 4) font montre de réactivité croisée avec ces peptides ou protéines complètes (329, 333, 336, 367). Malgré le fait que la variabilité des séquences de la protéine F parmi les souches du VHC semble plus forte que core (368), qui est elle-même parmi les gènes les mieux conservés du génome du VHC, cette réactivité croisée indique que d'une part, l'expression de la protéine F n'est pas limitée au génotype 1, et que d'autre part, elle est détectable parmi les différents génotypes. Finalement, la présence des anticorps anti-F ne corrèle ni avec la charge virale sérique du VHC, ni avec le génotype, ni avec le stade de la pathologie hépatique, ni avec le statut clinique (chronique ou résolu) (333, 336, 367).

Outre notre groupe (voir chapitre 6.1. Article 1 (367)), seuls Bain et al. ont analysé les réponses cellulaires contre la protéine F (336). Ces derniers ont utilisé un polypeptide



synthétique de 99 acides aminés dérivé d'une séquence du génotype 1b, et qui représente la partie centrale partagée par tous les modèles d'expression de la protéine F basés sur le déphasage ribosomal +1. Ils ont également testé 4 peptides dérivés de la même séquence qui sont restreint par des CMH de classe I (HLA-A2 et HLA-B7). Malgré des réponses prolifératives difficilement détectables, 20% des patients testés ont présenté des lymphocytes spécifiques capable de produire de l'IFN $\gamma$ , de IL-10, ou les deux. Ces cellules ont à nouveau été détectées chez des patients infectés par différents génotypes du VHC, suggérant également une réactivité croisée au niveau des peptides présentés par le CMH de classe I.

Les réponses humorales et cellulaires ont non seulement montré que la protéine F est effectivement produite durant une infection naturelle par le VHC, mais également que le système immunitaire de l'hôte est capable d'engendrer des réponses significatives contre cet antigène.

La protéine F représente donc la 11<sup>ième</sup> protéine synthétisée par le VHC. Le déphasage ribosomal est un moyen pour le virus d'augmenter le potentiel codant de son génome. Mais de ce fait, ces protéines « cryptiques » élargissent également la surveillance immunitaire en augmentant la variété des peptides viraux pouvant être présentés par les CMH de classe I (369).

## **5. La diversité génétique du VHC**

### **5.1. Nature de la quasispèce**

Le VHC est en constante évolution durant toute la durée de l'infection et génère une grande diversité dans la population de ses variants (370). Ce phénomène est favorisé par la production abondante de virions, de l'ordre de  $10^{12}$  virions par jour chez les adultes infectés

(371), ainsi que par le taux de mutations élevé induit par la ARN-polymérase ARN-dépendante. En effet, cette polymérase travaille avec une fréquence d'erreur moyennant  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  par nucléotide copié (372, 373). De plus, étant donné qu'elle ne possède pas d'activité de correction exonucléase 3'-5', les substitutions incorporées dans l'ARN ne peuvent être corrigées. Lorsque ces mutations ne sont pas nuisibles pour le virus, elles lui confèrent un avantage ou un désavantage sélectif dépendants de l'environnement dans lequel il se trouve (374, 375). La conséquence de la variabilité génétique élevée du VHC est l'existence dans un individu non pas d'une population homogène de génomes identiques, mais d'un mélange de variants génétiquement distants mais toutefois relativement apparentés, plus communément appelé « quasiespèce » (29).

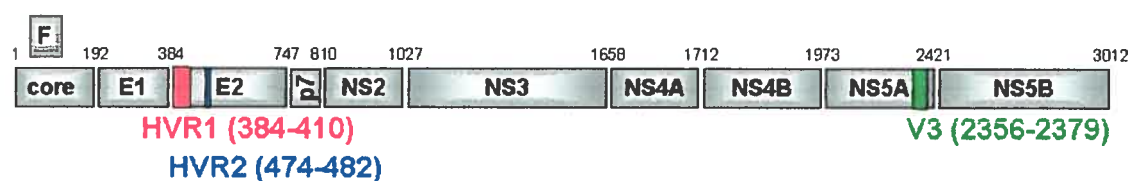
Une quasiespèce comprend un génome dit « majeur », qui est relativement prédominant dans la population, ainsi qu'une multitude de génomes « mineurs », qui représentent la proportion variable de la population. La distribution des variants de la quasiespèce à un temps donné représenterait la population la mieux adaptée à son environnement (376). Toutefois, la population entière est sous l'influence de la pression de sélection de l'hôte et donc elle représente une distribution transitoire pouvant subir des changements dans un laps de temps très court (377, 378).

La variabilité d'une quasiespèce est contrôlée par deux forces qui s'opposent : la première est limitante et implique la conservation des structures secondaires en ARN ainsi que celle des fonctions des protéines dont dépend le bon déroulement du cycle biologique du virus. La deuxième force quant à elle, accentue la variabilité par un processus continu de sélection induit par les réponses immunitaires de l'hôte, incluant les réponses humorales et cellulaires.

L'extrême variabilité des quasiespèces ainsi que leur adaptation à leur environnement ont diverses implications biologiques, dont : a) le développement de mutants échappant au système immunitaire ou à la vaccination; b) le développement de résistance aux agents antiviraux; c) le changement du tropisme cellulaire (376, 379).

## 5.2. Les régions variables du génome

Le génome entier du VHC est continuellement sujet aux mutations mais certaines régions sont exposées à une pression de sélection particulièrement forte : il s'agit de deux régions dans la glycoprotéine de l'enveloppe E2, nommées régions hypervariables 1 et 2 (ou HVR1 et HVR2) (380, 381), ainsi que d'une région en C-terminal de NS5A, nommée V3 (382) (Fig.6). V3 comprend les acides aminés 2 356 à 2 379 de la polyprotéine du VHC (suivant la séquence AF009606 (383)) et semble être impliquée dans la résistance à l'interféron, puisque le nombre de mutations trouvé dans cette région est corrélé avec l'efficacité du traitement (384-386). La région HVR2, de 9 acides aminés (codons 474 à 482), semble également être impliquée dans la réponse aux traitements mais ceci est controversé (387, 388). Cependant, la fonction primaire de HVR2 serait l'attachement du VHC à la cellule via la reconnaissance de la molécule de surface CD81 (389, 390).



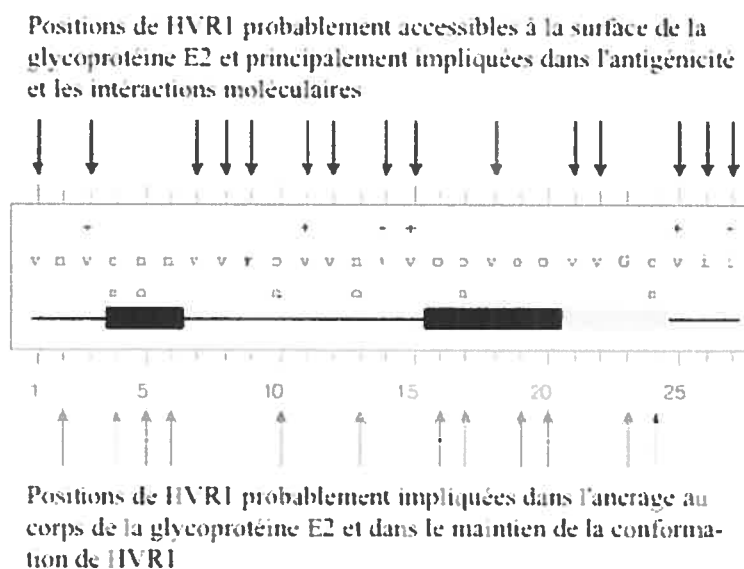
**Figure 6. Les régions variables dans le génome du VHC.** La région hypervariable 1 (HVR1), la région hypervariable 2 (HVR2) et la région variable 3 (V3). Les numéros entre parenthèses indiquent le premier et le dernier résidu constituant ces régions, selon la séquence référence de H77, n° d'accès dans GenBank AF009606.

### 5.3. La région hypervariable 1 (HVR1)

La région la plus variable du génome du VHC demeure HVR1. Elle est constituée de 27 acides aminés situés aux codons 384 à 410 de la polyprotéine du VHC, en N-terminal de la glycoprotéine de l'enveloppe E2. Le rôle de HVR1 est encore inconnu. Toutefois, certains travaux ont montré qu'elle serait impliquée dans le processus d'attachement ou d'entrée du virus dans la cellule, par son interaction avec des récepteurs cellulaires (67, 391-393). En outre, une étude utilisant un clone du VHC dépourvu de HVR1 a montré que ce virus incomplet était infectieux mais fortement atténué chez les chimpanzées, ce qui soutient le rôle de cette région dans l'entrée du virus dans la cellule (394). Le premier récepteur potentiel du VHC à être identifié est CD81 (64). Toutefois, ce récepteur interagirait non pas avec HVR1, mais avec des régions de la glycoprotéine E2 appelées « CD81-binding regions », et qui comprennent HVR2 (389, 395). C'est plutôt le « scavenger receptor class B type I » (SR-BI) qui lierait la glycoprotéine E2 via HVR1 (66, 67). Bartosch et al. ont avancé une hypothèse intéressante : CD81 pourrait permettre dans un premier temps l'attachement du VHC à la cellule, et dans un deuxième temps, permettre l'interaction avec un récepteur cellulaire d'entrée, parmi lesquels SR-BI serait le candidat le plus convaincant (67).

Tout en étant la région la plus variable du génome du VHC, une analyse plus poussée des acides aminés de HVR1 a démontré une certaine conservation (391) : en effet, les propriétés physico-chimiques des résidus à chaque position, ainsi que la conformation et l'antigénicité de HVR1, sont hautement conservés parmi les différents génotypes. En effet, les résidus basiques y sont fréquents par rapport aux protéines communes, alors que les résidus acides y sont rares. Ceci suggère que les HVR1 chargés positivement sont sélectionnées de manière préférentielle. De plus, non seulement la conformation globale mais aussi le nombre et la position des résidus basiques sur la séquence de HVR1 sont conservés, suggérant qu'ils jouent un rôle important dans la fonction de HVR1. En outre, il

est possible que ces résidus basiques soient impliqués dans les interactions avec des groupements chargés négativement trouvés dans les protéines, les phospholipides ou les glycosaminoglycans présents à la surface des cellules ou dans les LDL, ce qui constitue une autre indication de l'implication de HVR1 dans l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule cible (Fig.7).



**Figure 7. Résumé des propriétés structurales de HVR1 et des fonctions prédites des acides aminés.** Le profil consensus d'hydropathie a été établi à partir de 1 382 séquences de HVR1 de différents génotypes : o, n, i et v représentent les positions hydrophobes, neutres, hydrophiles et variables respectivement; G est un résidu Gly conservé. Les boîtes noires indiquent les régions principales d'ancrage, et la boîte grise indique un potentiel coude. Les signes + indiquent des positions souvent occupées par des résidus basiques (tiré de (391)).

Mis à part cet aspect de conservation physico-chimique, le degré de variabilité particulièrement élevé de la région HVR1 a permis de s'en servir comme d'un outil pour

identifier les souches virales infectant les individus, mais également pour étudier les quasiespèces et leurs implications biologiques (396).

#### **5.4. Méthodes d'études et paramètres des quasiespèces**

La charge virale du VHC détectée dans les échantillons de patients est souvent très basse, ce qui pose problème pour l'étude et la caractérisation des quasiespèces. Néanmoins, l'utilisation de la RT-PCR permet d'obtenir des quantités suffisantes de cDNA à partir d'ARN extrait de plasma ou de sérum.

Le séquençage et l'analyse d'un certain nombre de clones moléculaires amplifiés à partir du pool de virus plasmatique est une méthode laborieuse (396). Toutefois, il s'agit de la méthodologie la plus appropriée pour l'étude des paramètres des quasiespèces. En effet, les autres méthodes plus simples et plus rapides, comme le polymorphisme de conformation simple brin (« single-stranded conformation polymorphism ») (397), l'électrophorèse sur gel avec gradient de température (« temperature-gradient gel electrophoresis ») (398) ou l'analyse de retardement sur gel (« gel-shift analysis ») (399), qui sont basées sur la migration différentielle de produits d'ADN amplifiés contenant des mutations, permettent de déterminer le nombre de variants présents dans la quasiespèce, mais pas d'identifier la séquence en acides aminés de chacun des variants. Certains paramètres, particulièrement la distance génétique, ou encore les études longitudinales sur des variants spécifiques sont donc impossibles à expérimenter.

Les paramètres généralement décrits lors d'une analyse des quasiespèces comprennent des observations sur la nature globale de la population de variants, ainsi que sur la nature des mutations apparaissant chez chacun des variants viraux. Dans le premier cas, la complexité donne une indication du nombre de variants viraux différents présents à un temps donné dans une quasiespèce. La complexité peut être représentée de manière graphique, ce qui permet en outre d'observer l'évolution de la représentation de chacun des

variants durant une étude longitudinale. Elle peut aussi être représentée par une analyse numérique en calculant l'entropie de Shannon ( $S_n = -\sum(p_i \ln p_i) / \ln N$ , où  $p_i$  est la fréquence de chaque variant de la quasiespèce et  $N$  est le nombre total de séquences analysées) (400-402), indiquant la variabilité d'une population de quasiespèce. La connaissance des mutations dans les différents variants viraux permet de calculer non seulement la diversité génétique, qui par définition est la mesure de la quantité de différences dans la composition génétique dans un échantillon de variants, mais aussi le ratio dN/dS (403), comparant la fréquence de substitutions de nucléotides synonymes (silencieuses) par site synonyme dS et les substitutions de nucléotides non-synonymes (changement d'acides aminés) par site non-synonyme dN. Ce ratio est essentiel dans les analyses, car il permet de donner des informations quant au processus de sélection immunitaire : dN représente l'esquive des variants viraux en réponse à la pression immunitaire et dS décrit la dérive génétique naturelle, qui est fonction de la grande capacité répliquative et du taux élevé de mutation du VHC. Ainsi donc, un ratio dN/dS plus grand que 1 suggère la présence d'une pression de sélection immunitaire exercée sur les variants qui composent la quasiespèce.

## 5.5. La quasiespèce et l'esquive face au système immunitaire

Le fait que le VHC réussisse à établir une chronicité dans la plupart des cas d'infection met en évidence l'incapacité de l'hôte à développer des réponses immunitaires efficaces contre ce virus. La stratégie dont se sert le VHC pour établir une infection persistante implique entre autre sa variabilité génétique, qui lui permet d'échapper à la surveillance du système immunitaire. Paradoxalement, l'apparition constante de nouveaux variants serait due à la pression sélective exercée par les réponses humorales et cellulaires de l'hôte, tel que mentionné auparavant.

### 5.5.1. Quasiespèce et réponse humorale

Un des mécanismes les plus efficaces que le système immunitaire utilise pour éviter l'infection virale est la production d'anticorps neutralisants. Par définition, les anticorps neutralisants gênent l'attachement aux récepteurs cellulaires et l'entrée dans la cellule cible, et ainsi diffèrent des autres anticorps par leur capacité d'empêcher l'infection virale. La présence de ces anticorps chez des patients infectés de manière chronique par le VHC a été mise en évidence chez le chimpanzé (404) ainsi que par des expériences *in vitro* (405, 406).

Une cible majeure des anticorps neutralisants se trouve être la région HVR1, fort probablement dû à son rôle et à sa position dans la configuration de la particule virale. Weiner et al. ont utilisé des peptides synthétiques correspondant aux séquences de HVR1 afin de détecter l'apparition d'anticorps dirigés contre des épitopes linéaires de HVR1 (399). Zibert et al. ont également démontré que les sérums de patients infectés par le VHC ont la capacité d'empêcher l'attachement du VHC à des cellules *in vitro* et que l'activité neutralisante implique la région HVR1 dans la plupart des cas (407). Farci et al. ont quant à eux produit un sérum hyperimmun de lapin immunisé avec un peptide synthétique correspondant à une séquence prédominante de HVR1 provenant de la souche H77; ils l'ont ensuite utilisé pour la neutralisation *in vitro* du VHC, ce qui a eu pour effet de protéger un chimpanzé d'une infection par un virus homologue (404). Enfin, Zhou et al. ont produit des anticorps monoclonaux obtenus par immunisation de souris avec des peptides synthétiques de la région HVR1, anticorps qui ont inhibé *in vitro* l'adsorption du VHC à des cellules susceptibles (408, 409).

Malgré l'apparente réactivité croisée des anticorps neutralisants décrite par certains (410-413), leur efficacité dans la prévention de l'infection est limitée par la variabilité de la séquence en acides aminés de HVR1. Des épitopes de HVR1 détectés par Weiner et al. ont subi des mutations au cours du temps qui ont empêché leur reconnaissance par les anticorps provenant d'échantillons antérieurs (399). Un second chimpanzé infecté par la souche H77



neutralisée par le sérum hyperimmun de lapin a quant à lui développé une hépatite aiguë suivie d'une infection chronique, contrairement au premier chimpanzé (404). L'analyse de la composition de la quasiespèce de cet animal a démontré une similarité avec des variants mineurs et non plus avec la séquence prédominante de H77. Une expérience similaire a montré que seule la neutralisation avec du plasma de patient prélevé au moment même où a été dérivée la souche H77 permettait d'éviter l'infection du chimpanzé (414). De même, une seconde inoculation de chimpanzés convalescents avec des souches homologues ou hétérologues du VHC a entraîné la réapparition de la virémie (415). Ces expériences attestent de l'émergence de nouveaux variants et démontrent que les anticorps neutralisants sont restreints à certains variants particuliers et sont donc inefficaces contre d'autres variants pouvant être simultanément présents dans la quasiespèce.

Le contrôle du processus de sélection des nouveaux variants par la pression du système immunitaire humorale a été initialement proposé par Kumar et al., qui ont montré la conservation plusieurs années durant des séquences de HVR1 chez un patient agammaglobulinémique infecté par le VHC (416). De même, les patients atteints d'immunodéficiência commune variable montrent un taux de mutation dans HVR1 nettement inférieur à celui de patients contrôles (417). De plus, une diminution significative de la diversité de HVR1 a été observée chez des patients coinfectés par le virus de l'immunodéficiência humaine ayant des décomptes CD4 inférieurs à 50 cellules par microlitre (418, 419). Ceci suggère que la variation génétique du VHC est réduite en absence de pression sélective par le système immunitaire humoral. D'autres auteurs ont également mis en évidence la solide corrélation entre la variabilité de la région HVR1 et la présence et/ou l'efficacité des réponses immunitaires humorales (399, 413, 420-429).

### **5.5.2. Quasiespèce et réponse cellulaire**

La pression sélective exercée par la réponse immunitaire à médiation cellulaire influence également la variabilité de la quasiespèce. L'observation de mutants esquivant la

réponse cellulaire de l'hôte a tout d'abord été effectuée chez le chimpanzé, du fait de la connaissance exacte de la nature de l'inoculum viral. Malgré la présence dans le foie de CTL spécifiques à un épitope de NS3, ceux-ci n'étaient plus aptes à reconnaître cet épitope à partir de la 16<sup>e</sup> semaine post-inoculation, moment de l'apparition d'une mutation d'échappement (430). D'autres études ont observé le même phénomène sur plusieurs épitopes restreints par le CMH de classe I, indiquant que de telles mutations pouvaient se produire dans plusieurs régions du génome du VHC (431, 432). Chez le chimpanzé, la plupart des mutations apparues durant la phase aiguë de l'infection peuvent se maintenir plusieurs années durant (433). De plus, ces mutations sont souvent restreintes aux régions encodant des épitopes CTL, ce qui se traduit par un ratio dN/dS dans ces régions montrant des valeurs supérieures à celles dans les régions flanquantes.

Chez l'homme, l'étude des mutations permettant au VHC d'esquiver la réponse immunitaire cellulaire a été problématique pour des raisons pratiques : la phase aiguë de l'infection par le VHC est souvent asymptomatique, ce qui rend difficiles les études précoces ; de plus, la séquence génomique de l'inoculum est souvent inconnue, rendant délicate l'interprétation des séquences obtenues après l'infection. La disponibilité de séquences du VHC déposées dans des bases de données a permis de contrecarrer certains de ces problèmes et de révéler l'apparition de certaines mutations au sein d'épitopes restreint par le CMH de classe I durant l'infection chez l'humain (434). Malgré une reconnaissance largement observée chez les patients HLA-A2-positifs durant l'infection aiguë (435), un épitope restreint par HLA-A2 dans la protéine NS3 a été sujet à des mutations qui ont conduit à la perte de réactivité des CTL contre ce déterminant au cours de l'infection chronique. Tester et al. ont également observé des mutations dans un épitope de NS3 chez un patient infecté par le VHC qui n'a pas clairé le virus et dont la réponse immunitaire était caractérisée par un manque de cellules CD4 spécifiques au VHC et par une réponse CTL puissante (436). Récemment, un nouvel épitope de la protéine NS3 a été étudié par Guglietta et al. et ce depuis les premières réponses immunitaires cellulaires du patient jusqu'au développement d'une infection chronique : ils ont ainsi démontré la présence

d'une robuste réponse CD8 spécifique à cet épitope, l'élimination des variants arborant la séquence d'origine de cet épitope, ainsi que la sélection d'une population virale ayant subi des changements de résidus dans l'épitope qui diminuent profondément sa reconnaissance par les cellules T (437). Finalement, d'autres auteurs ont étudié de multiples épitopes CTL dans le génome du VHC et ont également constaté l'apparition de mutations esquivant les réponses immunitaires cellulaires (438, 439). De plus, une robuste association entre l'expression de différents allèles HLA étudiés et la présence de mutations dans les épitopes présentés par ces allèles a été rapportée, ce qui donne une indication supplémentaire quant au rôle que joue la pression exercée par les cellules CD8 dans l'évolution des populations virales (438-440).

Un épitope restreint par le CMH de class II peut également être sujet aux mutations, comme l'ont démontré Wang et al. (441). Ces derniers ont également observé que certaines de ces mutations étaient accompagnées d'un changement de profil au niveau de la sécrétion de cytokines, allant d'une réponse de type Th1 à une réponse de type Th2 (442).

Quant à la région HVR1, plusieurs peptides synthétiques qui en sont dérivés (mimotopes) contiendraient des épitopes capables de stimuler les cellules CD8 à produire de l'IFN $\gamma$  (443) et les cellules CD4 à proliférer (444). Des réponses de cellules CD4 ont également été observées contre des panels de peptides dérivés de HVR1 (445, 446). De manière intéressante, plusieurs épitopes restreints par le HLA-DR4 sont situés dans la partie C-terminale de HVR1. Un constat similaire avait été fait en ce qui concerne les épitopes de cellules B, qui se situent dans la partie 3' plutôt conservée de HVR1 (413, 447-449). Finalement, Tsai et al. ont également détecté l'émergence de variants de HVR1 pouvant agir comme des antagonistes de l'activité cytotoxique des cellules CD8 chez des patients infectés de manière chronique (450). En outre, le même phénomène a été rapporté chez les cellules CD4 spécifiques à la région HVR1 (451, 452).

La mutation des épitopes peut contribuer à l'esquive du système immunitaire de plusieurs façons (révisé dans (453)). Le processus de dégradation par le protéasome peut être altéré, causant la destruction de l'épitope avant son transport dans le réticulum endoplasmique et son interaction avec le CMH (432, 454). Il peut également se produire une perte de présentation du CMH à la surface de la cellule, causée par le changement de résidus importants pour l'ancrage dans la niche peptidique du CMH (438-440). Finalement, certaines mutations peuvent diminuer ou empêcher la reconnaissance de l'épitope par le TCR (434), et même antagoniser les réponses à l'épitope sauvage (450-452).

En résumé, la région HVR1 contient des épitopes reconnus par la réponse immunitaire humorale, ainsi que par les cellules T auxiliaires CD4 et cytotoxiques CD8. De plus, la variabilité particulièrement forte de HVR1 contribue à l'échappement du système immunitaire par le VHC, soit en évitant la reconnaissance avant l'attachement et l'entrée du virus, soit en empêchant la reconnaissance par les cellules T au moyen des différents mécanismes mentionnés ci-dessus.

## **5.6. La quasiespèce et l'hépatite C**

### **5.6.1. L'infection aiguë**

La variabilité de la quasiespèce étant un moyen pour le VHC d'éviter au moins en partie les réponses immunitaires de l'hôte, des études ont cherché à associer l'évolution de la quasiespèce avec le développement de la maladie suite à une infection primaire par le VHC. Dans une importante étude, Farci et al. ont rapporté une diminution de la diversité génétique de la quasiespèce en parallèle avec la séroconversion chez un groupe de patients souffrant d'hépatite aiguë suivie d'une clairance du virus, alors que d'autres sujets ayant développé une hépatite chronique démontraient plutôt une diversité génétique croissante (455). Cette étude suggère que l'on peut prédire si l'infection aiguë sera clairée ou si elle deviendra chronique en se basant sur l'évolution de la quasiespèce, particulièrement dans la

région HVR1. Chen et al. ont constaté que le ratio dN/dS de la région HVR1 augmentait graduellement chez les patients présentant une virémie persistante, alors qu'il restait bas chez les patients dont la virémie était indétectable (456). De même, plusieurs groupes ont associé la clairance du VHC en infection aiguë avec une faible complexité et une entropie de Shannon réduite de la quasiespèce basée sur HVR1, ainsi qu'avec un ratio dN/dS plus bas compatible avec la survenue d'une pression immunitaire réduite (426, 457).

Ce patron est également observé dans l'hépatite fulminante : une quasiespèce homogène et un nombre de résidus sélectionnés plus faibles que chez les patients progressant rapidement (458, 459). Ceci suggère la présence d'un variant viral dominant particulièrement virulent, ce qui a été confirmé lors d'une expérience de transmission à un chimpanzé (458).

### **5.6.2. L'infection chronique**

Les études sur une éventuelle corrélation entre le degré de variabilité des quasiespèces de la région HVR1 et l'évolution d'une hépatite chronique restent encore controversées. Alors que certains groupes ont observé un taux de substitutions dans HVR1 plus élevé dans une infection chronique par rapport à une infection en phase aiguë (456, 460), d'autres ont rapporté le contraire (461, 462).

Une corrélation entre l'hétérogénéité de la quasiespèce et la durée estimée de l'infection a été observée (463), alors que d'autres études n'ont pas confirmé cette corrélation (464, 465).

De semblables contradictions ont été mises en évidence en ce qui concerne la relation entre la variabilité des quasiespèces et la pathologie hépatique : certains auteurs ont déterminé que la diversité génétique était corrélée avec la progression de la maladie hépatique, allant de l'hépatite aiguë à l'hépatite chronique avec ou sans cirrhose ou carcinome hépatocellulaire (460, 464). D'autres ont rapporté une corrélation avec

l'élévation des aminotransférases présentes dans le sérum au cours de la maladie hépatique (465, 466). En revanche, d'autres chercheurs n'ont observé aucune corrélation entre l'hétérogénéité des quasiespèces et la sévérité des dommages hépatiques (463, 467, 468). Ceci est particulièrement frappant dans le cas de l'étude de Lopez-Labrador et al., qui porte sur une large cohorte de patients présentant des diagnostics cliniques très précis, allant d'une hépatite bénigne, modérée ou sévère, à une cirrhose compensée ou décompensée, ou à un carcinome hépatocellulaire (469). Il n'y a pas d'explication nette aux contradictions entre ces travaux. Toutefois, les méthodes utilisées pour l'étude des quasiespèces, l'hétérogénéité des groupes de patients étudiés, ou encore la prise de traitement antiviraux ont pu contribuer à la controverse.

## **5.7. La quasiespèce et la réponse aux traitements**

Encore aujourd'hui, malheureusement beaucoup de patients ne répondent pas aux traitements antiviraux (470). La compréhension des causes de cette résistance est donc un important fait à élucider. Une corrélation entre une réponse positive aux traitements et la variabilité du VHC au niveau génotypique a déjà été observée. En effet, les patients infectés par les génotypes 1 et 4 répondent beaucoup moins favorablement à la thérapie à l'interféron, en comparaison aux patients infectés par les génotypes 2 ou 3 (471).

La variabilité au niveau de la quasiespèce a également été mise en cause dans la résistance aux traitements. Plus spécifiquement, une région dans la protéine NS5A, dénommée ISDR ou « IFN-sensitivity-determining region » (472) a été associée avec la sensibilité au traitement avec l'IFN. En effet, elle était conservée chez les patients résistants à la thérapie alors qu'elle subissait de nombreuses mutations chez les patients répondant à la thérapie (90, 473-475). Toutefois, certaines études n'ont pas confirmé cette association (384, 385, 401, 476-483). Deux autres régions se situant dans la partie C-terminale de NS5A ont également été proposées comme étant potentiellement responsables de la résistance à l'interféron (384-386, 481, 483-485). D'autre part, une autre région de la

glycoprotéine E2, le « PKR-eIF2a phosphorylation homology domain » ou PePHD, a également fait l'objet d'études (68). Néanmoins, son action dans la résistance aux thérapies reste inexpliquée (486), particulièrement au vu de son hétérogénéité très limitée et du manque de corrélation avec la réponse à l'interféron (487-489).

La région la plus étudiée dans le but d'établir une corrélation entre la variabilité de la quasiespèce et la réponse aux thérapies antivirales est HVR1. Tout d'abord, la période avant la thérapie a fait l'objet d'investigations : en effet, plusieurs études ont observé une corrélation entre un faible degré de diversité génétique de HVR1 avant le début de la thérapie à l'interféron et une réponse favorable au traitement (463, 464, 490-498). Malheureusement, à nouveau d'autres études n'ont pas confirmé cette corrélation (469, 499-503), ou seulement partiellement comme Polyak et al., qui ont constaté que seule la diversité et non pas la complexité génétique est un véritable indicateur de la réponse aux traitements (504). La composition de la quasiespèce montre un certain nombre de changements durant le traitement, suggérant la présence d'une pression sélective exercée par les antiviraux (505-508). Tout d'abord, le taux de mutation de HVR1 est plus élevé chez les patients traités que chez les contrôles non traités (401, 480, 498). Les patients qui répondent à la thérapie montrent des changements dans la région HVR1 qui sont plus significatifs (402, 498), dont une complexité et un ratio dN/dS plus élevés (482), alors que les patients en échec de traitement montrent peu de changements majeurs à ce niveau. Une étude détaillée des quasiespèces durant le traitement à l'interféron (498), comprenant une stratification des patients en 5 groupes selon leur réponse au traitement, a permis de préciser cette observation : chez les patients montrant une réponse thérapeutique prolongée (« sustained responders »), une diminution du nombre de variants viraux et de la diversité génétique, aboutissant à une population plus homogène, a été constatée durant les 2 premières semaines du traitement. Au contraire, aucun changement significatif de la quasiespèce n'a été démontré chez les patients ayant rechuté après la fin du traitement (« relapsers »), malgré une diminution de la charge virale VHC. Ceci indique que des changements dans la composition de la quasiespèce peuvent permettre de différencier les

patients capables d'éliminer le virus de ceux qui vont rechuter peu après la fin du traitement. De plus, il a été suggéré que la réduction de la diversité génétique, en particulier de celle de la région HVR1, pourrait résulter d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire plus efficace, ce qui laisserait envisager une élimination plus rapide des variants viraux susceptibles à l'interféron (509). Chez les patients ne répondant pas au traitement ou ayant rechuté avant la fin du traitement, l'évolution de la quasiespèce reste stable, suggérant la présence de variants préexistants qui seraient mieux adaptés à l'environnement de l'hôte, et donc plus résistants à la thérapie (510).

Finalement, des analyses ont confirmé que les changements observés dans la région HVR1 au cours de traitement combiné sont essentiellement dus à l'interféron et non pas à la ribavirine (511, 512). Ceci suggère que la ribavirine ne possède pas d'effet direct sur la région HVR1, mais pourrait déclencher une réponse favorable à l'IFN en modulant la réponse immunitaire contre le VHC (513).

## **5.8. La quasiespèce et la coinfection par le VIH**

Tel que mentionné, la prévalence de l'infection par le VHC chez les sujets porteurs du VIH est d'approximativement 30 à 50%, et augmente de manière dramatique dans certains groupes étudiés (514, 515). L'analyse de la quasiespèce basée sur la région HVR1 a montré que la coinfection avec le VIH ne semble changer ni la complexité (516, 517) ni la diversité (418) de la population de variants. Mao et al. ont étudié la pression immunitaire en analysant le ratio dN/dS : ils ont observé une diminution du ratio dN/dS après la séroconversion au VIH chez un groupe de patients infectés par le VHC, bien qu'il ne s'agisse que d'une tendance (518). Par contre, une diminution significative du ratio dN/dS a été démontrée chez des patients coinfectés progressant rapidement dans la maladie associée au VIH, suggérant une pression immunitaire réduite chez ces patients. L'infection par le VIH est caractérisée par une diminution progressive du décompte CD4 et celle-ci a été corrélée avec une diminution de la diversité (418) et du nombre de substitutions non-



synonymes dans la région HVR1 (519, 520), avec toutefois une controverse quant à la diversité (521). De tels résultats ont également été rapportés chez l'enfant coinfecté (419). Cette corrélation suggère à nouveau la présence de réponses immunitaires moins efficaces n'exerçant qu'une faible pression sélective sur la quasiespèce, résultant en une population de variants plus homogène.

Bon nombre de patients coinfectés sont également traités au moyen de différents agents antirétroviraux destinés à limiter la réplication virale du VIH. Babik et al. ont émis l'hypothèse que la thérapie antirétrovirale combinée pouvait causer l'augmentation de la diversité du VHC à travers la reconstitution immunitaire et l'augmentation de la pression sélective (520). Bien que n'ayant aucun effet à court terme, la diversité de la quasiespèce basée sur HVR1 augmente effectivement lors d'un traitement prolongé. De plus, l'entropie, le nombre de clones, la distance génétique ainsi que le ratio dN/dS ont affiché des valeurs plus élevées chez les patients traités par la HAART que chez les patients non traités (520, 522). Finalement, il n'y a que très peu d'information sur l'influence de la thérapie anti-VHC chez les patients coinfectés par le VHC et le VIH en ce qui a trait l'évolution des quasiespèces : malgré cela, on a constaté que la complexité de la région HVR1 analysée avant le traitement ne semble pas prédire la réponse au traitement à l'interféron-alpha et à la ribavirine chez les personnes coinfectées (516, 517), contrairement à ce qui a été suggéré chez les patients uniquement infectés par le VHC.

## **6. Objectifs**

### **6.1. Article 1**

La protéine F ou ARFP a été caractérisée tout d'abord par sa capacité d'engendrer une réponse immunitaire humorale chez les patients infectés par le VHC. En effet, de

manière à confirmer sa présence dans une infection naturelle, les sérum de patients infectés ont été testé sur des peptides synthétiques dérivés de la séquences caractérisée par le changement de cadre de lecture en +1, ou sur des protéines . Avant la publication de l'étude de Bain et al. (336), qui, il faut le préciser, s'est produite lors du processus de rédaction de notre étude, la plupart des enquêtes n'avait décrit essentiellement que les réponses humorales. C'est pourquoi, nous avons pris en charge la détermination des réponses des cellules CD8 cytotoxiques spécifiques à la protéine F ou ARFP par des tests de cytotoxicité.

Comme décrit auparavant, la prévalence de l'infection par le VHC chez les individus infectés par le VIH est d'environ 30%, et peut s'élever à plus de 90% chez les UDI. La coinfection avec le VIH est caractérisée par une altération du système immunitaire spécifique au VHC, qui peut être plus ou moins bien rétablie par la thérapie antirétrovirale. Il est donc également nécessaire de déterminer l'influence de la coinfection avec le VIH sur les réponses immunitaires spécifiques à la protéine F ou ARFP.

Finalement, nous avons également cherché à déterminer si certains peptides dérivés de la séquence provenant du changement de cadre de lecture en +1 pouvaient être présentés par le CMH de classe I HLA-A\*0201 *in vitro*, ce qui permettrait de caractériser d'éventuels épitopes de cellules cytotoxiques restreints par le HLA-A\*0201.

## 6.2. Article 2

L'évolution des quasiespèces est dirigée par la pression sélective du système immunitaire. Or le système immunitaire, tout du moins spécifiquement celui du VHC, semblerait être influencé par la grossesse, étant donné que le niveau des alanines aminotransférases diminue et la charge virale du VHC augmente au cours de la fin de la grossesse. Les études précédentes ayant essentiellement été conduites dans une population générale d'individus infectés par le VHC, soit lors de l'infection aiguë, soit durant

l'infection chronique, nous avons proposé pour la première fois de déterminer l'influence de la grossesse sur l'évolution des quasiespèces.

De la même manière, pour les raisons qui viennent d'être citées ci-dessus (voir chapitre 6.1. Article 1), nous avons observé l'influence de la coinfection par le VIH sur l'évolution de la quasiespèce. De plus, les patientes enceintes infectées par le VIH entreprennent dans une grande majorité des cas une thérapie antirétrovirale de manière à diminuer la charge virale VIH, non seulement pour leur propre bien, mais en particulier dans le but de diminuer le risque de transmission du VIH à leur progéniture. C'est pourquoi nous avons également évalué l'influence de la thérapie antirétrovirale anti-VIH sur l'évolution des quasiespèces du VHC.

### **6.3. Article 3**

Dans le but de répondre aux questions de l'article 2, le séquençage de nombreux variants du VHC contenant une région constituée de la fin et du début des glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2, et englobant les régions hypervariables 1 (HVR1) et 2 (HVR2), a été effectué. Lors des analyses d'entropie (variabilité) dans la quasiespèce VHC de chaque patiente, une région d'une variabilité significative, mais tout de même inférieure à celle de HVR1, a été observée dans plus de la moitié des individus de notre cohorte. Cette nouvelle région hautement variable dans la glycoprotéine de l'enveloppe E2 a été caractérisée plus spécifiquement, en évaluant ses particularités physico-chimiques, ainsi qu'en évaluant la pression sélective exercée sur cette région.

## **7. Contribution personnelle aux articles**

Dans le premier article, j'ai contribué aux tests de relâche du  $^{51}\text{Cr}$  (Limiting dilution assays) qui ont permis de détecter et quantifier la fréquence des lymphocytes T

cytotoxiques spécifiques à la protéine F, ainsi qu'aux tests de liaison au CMH de classe I des cellules T2 (T2 binding assay) qui ont permis de déterminer les épitopes potentiels dérivés de la protéine F et restreints par le CMH de classe I.

Dans les articles 2 et 3, j'ai effectué les étapes de clonage des variants du VHC, avec une aide momentanée de M<sup>elle</sup> Isabelle Meunier. J'ai également contribué à toutes les analyses bioinformatiques suivant le séquençage des variants du VHC. Dans l'article 3, le model 3D de la glycoprotéine de l'enveloppe E2 du VHC a été dessiné par M. Pascal Lapierre.

# **Article 1**

# Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1

64

Myriam Troesch<sup>a,d</sup>, Emilie Jalbert<sup>a,c,d</sup>, Sophie Canobio<sup>a,d</sup>,  
M. Rachid Boulassel<sup>g</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>g</sup>, Nicole F. Bernard<sup>g</sup>,  
Julie Bruneau<sup>h</sup>, Normand Lapointe<sup>b,e</sup>, Marc Boucher<sup>b,f</sup>  
and Hugo Soudeyns<sup>a,d,e</sup>

**Background:** Hepatitis C virus (HCV) F protein is encoded in an alternate reading frame overlapping the core protein region. Its precise sequence, biological function and mode of expression are currently unclear. This study was conducted to examine the prevalence and characteristics of host humoral and cell-mediated immune responses directed against F protein in patients co-infected with HCV and HIV-1.

**Methods:** Mutations were introduced to allow the expression of HCV-1a F protein in the absence of core. This recombinant and a truncated form lacking the first 11 amino acid residues shared with core were expressed in *Escherichia coli*, and their amino acid sequences were verified by mass spectrometry. Vaccinia-F protein recombinants were used to test F protein-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity. The binding of F protein-derived peptides to HLA-A\*0201 was studied to identify putative CTL epitopes.

**Results:** Sera from 23 of 39 patients infected with various HCV genotypes recognized the truncated form, including 13 of 25 subjects co-infected with HIV-1, indicative of antigenic crossreactivity and consistent with the conservation of F protein coding sequences between HCV genotypes. Crossreactive F protein-specific CTL precursors were detected in nine of 11 HCV-infected subjects, including seven of nine patients co-infected with HCV and HIV-1. Finally, three novel putative HLA-A\*0201-restricted CTL epitopes were identified.

**Conclusion:** These results indicate that patients co-infected with HCV and HIV-1 can mount immunoglobulin and CTL responses directed against HCV F protein that are fully comparable in scope and magnitude with those observed in individuals infected with HCV alone.

© 2005 Lippincott Williams & Wilkins

*AIDS* 2005, 19:775–784

**Keywords:** alternate reading frame protein, co-infection, crossreactivity, cytotoxic T lymphocytes, hepatitis C

---

From <sup>a</sup>Unité d'Immunopathologie Virale, the <sup>b</sup>Centre Maternel et Infantile sur le SIDA, and Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada, the <sup>c</sup>Program in Infectious Diseases, Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA, the <sup>d</sup>Departments of Microbiology and Immunology, <sup>e</sup>Pediatrics, and <sup>f</sup>Obstetrics and Gynecology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, the <sup>g</sup>McGill University Health Center, Montreal, Quebec, Canada, and the <sup>h</sup>CHUM, Hôpital Saint-Luc, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Hugo Soudeyns, Unité d'Immunopathologie Virale, Centre de Recherche, l'Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, room 6735, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada.

Tel: +1 514 345 4931 (ext. 3907); fax: +1 514 345 4794; e-mail: [REDACTED]

ISSN 0269-9370 © 2005 Lippincott Williams & Wilkins

## Introduction

Cell-mediated immune responses composed of CD4 T helper and CD8 cytotoxic T lymphocytes (CTL) constitute the main mechanisms by which hepatitis C virus (HCV) replication can be controlled in the host, although innate immunity, including natural killer cells, interferons, and chemokines are also involved in protective responses [1–7]. As a result of overlapping transmission routes and target populations, a large proportion of chronic HCV carriers are also infected with HIV-1, which markedly worsens the prognosis of HCV disease in adults [8,9]. The pathology of HCV–HIV co-infection is complex but results at least partly from the inhibition of HCV-specific humoral and cell-mediated immunity by HIV-1 [10–12]. Cryptic epitopes generated from the translation of viral or cellular gene products using alternate reading frames are known to elicit such responses, and were recently shown to represent an important source of tumour-specific antigens in certain forms of human cancer [13,14]. Various RNA and DNA viruses of bacteria, plants and animals use overlapping open reading frames to compensate for size limitations imposed on viral genomes or to regulate viral protein expression. Likewise, HCV encodes an alternative 144–162 amino acid, 17 000 M<sub>r</sub> polypeptide termed F protein or alternative reading frame protein from the 5' moiety of the core gene [15–17]. The function and biological significance of F protein are unclear [15–19]. It is expressed in transfected cells [20] and can be recognized by sera and T cells isolated from HCV-infected patients, suggesting that it is produced *in vivo* [16,17,21,22]. Here we explore the prevalence and characteristics of host immune responses directed against F protein in patients co-infected with HCV and HIV-1.

## Materials and methods

### Study subjects and clinical parameters

For studies of humoral immune responses, 39 female patients were selected among the participants of the

Centre Maternel et Infantile sur le SIDA mother–child cohort (Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Canada). The mean age was  $29.6 \pm 5.75$  years (range 20.1–41.3). HCV65 infection was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and recombinant immunoblot assays, in accordance with clinical practice and diagnostic algorithms used in the province of Quebec. The mean HCV-RNA level (COBAS AmpliCor HCV Monitor assay version 2.0; Roche Diagnostics, Montreal, Canada) was  $5.37 \log \text{ IU/ml}$  plasma (range 2.78–7.09). HCV genotyping was performed by sequence analysis of the 5' non-coding region [23]. Co-infection with HIV-1 was confirmed by ELISA and non-quantitative polymerase chain reaction (PCR) in 25 of the 39 subjects. In co-infected patients, the mean CD4 cell count, measured using flow cytometry, was  $509 \pm 243 \text{ cells/mm}^3$  (range 33–1287), and the mean HIV-1 viral load (Versant HIV RNA version 3.0 assay; Bayer, Pittsburgh, PA, USA) was  $2.81 \log \text{ RNA copies/ml}$  plasma (range 1.70–4.73). Nineteen of the 25 subjects were treated with antiretroviral therapy, including single agent ( $n = 3$ ), double combination therapy ( $n = 6$ ), and triple combination therapy ( $n = 11$ ). The reported HIV risk categories included injection drug use ( $n = 22$ ), probable heterosexual transmission ( $n = 7$ ), as well as surgical procedures or transfusions performed in an HIV-endemic region ( $n = 3$ ). For studies of cell-mediated immunity, patients were selected from among participants in the St Luc intravenous drug user cohort (CHUM, Hôpital St-Luc, Montreal, Canada) ( $n = 7$ ; HND, HTM, and PSL codes) or from the Centre Maternel et Infantile sur le SIDA cohort ( $n = 4$ ; TVC codes). The clinical characteristics of subjects in this second study group are summarized in Table 1. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were assayed on a Synchron LX20 system (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). None of the subjects in either group had been treated with anti-HCV therapy at the time of the study. Full informed consent was obtained from all study participants. Counseling and appropriate medical treatment were provided. This research protocol was approved

**Table 1. Cytotoxic activity directed against F protein in patients infected with hepatitis C virus.**

Subjects	Age	Sex	HIV	CD4 cell count (cells/ $\mu\text{l}$ )	HIV load (log copies/ml)	HCV load (log IU/ml)	HCV genotype	ALT (U/ml)	AST (U/ml)	CTLp Fmut8 (1/x)	95% CI (1/x)	CTLp NNRd (1/x)	95% CI (1/x)
HND 013	40.0	M	+	480	4.46	7.39	3a	306	135	3671	1523–8848	9311	2395–37 298
HND 025	43.9	M	+	580	5.39	6.69	3a	60	53	9702	4027–23 372	12 188	4559–32 587
HTM 316	45.3	M	+	771	4.08	6.39	1a	76	60	7697	3846–15 404	6122	3291–11 389
HTM 319	43.7	M	+	364	2.00	7.33	1a	223	158	nd	nd	nd	nd
HTM 322	47.0	M	+	344	< 1.70	7.26	2a	45	43	13 772	5565–32 131	6612	3300–13 246
HTM 325	44.9	M	+	604	1.72	6.55	3a	127	137	nd	nd	3667	2306–5833
PSL 019	43.9	M	+	370	4.79	7.28	1a	22	37	8278	4127–16 604	nd	nd
TVC13	20.1	F	+	598	4.69	7.37	1a	65	66	238	132–430	nt	nt
TVC25	31.9	F	+	561	2.35	6.82	1a	18	24	221	124–392	nt	nt
TVC29	24.2	F	–	nt	nt	4.61	1a	47	20	177	84–369	nt	nt
TVC57	23.4	F	–	nt	nt	6.56	1a	30	25	1422	894–2260	1608	983–2631

ALT, Alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CI, confidence interval; CTL, cytotoxic T lymphocyte; HCV, hepatitis C virus; nd, none detected; nt, not tested.

CTL precursor frequencies and 95% CI were derived as described in the Materials and methods section.

by the Ethics Review Board of the Montreal Chest Institute, CHUM Hôpital Saint-Luc, and Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Canada, where patients were enrolled and the study was conducted.

### Hepatitis C virus F protein gene cloning and mutagenesis

Viral genomic RNA was isolated from 500  $\mu$ l serum obtained from a subject (TVC33) infected with HCV-1a, and was reverse transcribed and amplified using the QIAamp procedure (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) with primers HCV 1a 1-16 (5'-GCC AGC CCC CTG ATG G-3') and HCV 988-970 (5'-GCC TCG TAC ACA ATA CTC G-3') (Alpha DNA, Montreal, Canada). Reverse transcription (RT)-PCR conditions were 50°C/30 min, 95°C/15 min denaturation, 40 cycles of 94°C/30 s, 55°C/1 min, and 72°C/1 min, followed by a 72°C/10 min extension cycle, in a T3 thermal cycler (Biometra, Goettingen, Germany). The amplicon was cloned into the *Sf*I site of pCRScript Amp SK+ (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA; pCore1a33). Core sequences were then modified by mutagenesis to force-shift translation into the (+2) reading frame, and lock translation by introducing three silent mutations within the frameshift-associated slippery-like sequence (Fmut8). This was done by first inserting the *Aat*II-*Not*I fragment from pCore1a33 into the pSC11ss vaccinia transfer vector [24] cleaved with *S*tul and *Not*I (pSC11ssF16). pCore1a33 was reamplified using primers Fmut S Sal (5'-GAC CGT CGA CCA TGA GCA CGA ATC CTA AAC CTC AGA GGA AGA CCC CAA ACG TAA-3') and Fmut AS Kpn (5'-AAG GGT ACC CGG GCT GAG CCC AGG TCC TGC CCT CGG G-3'). PCR conditions were 94°C/3 min, 25 cycles of 94°C/30 s, 60-72°C/1 min, and 72°C/1 min, followed by 72°C/15 min extension in a TGradient thermal cycler (Biometra). The amplicon was then cut with *S*alI and *K*pnI, and was shuffled into pSC11ssF16 to form pSC11ssFmut8. A truncated form of the F protein lacking the 11 first N-terminal amino acids shared with core (Fmut8 $\Delta$ 11) was similarly generated using primers HCV1a Sal I (5'-TCA AGT CGA CCC AAA CGT AAC ACC AAC CG-3') and pCRS1 (5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG C-3'). PCR conditions were 25 cycles of 94°C/30 s, 53°C/1 min, and 72°C/1 min, followed by 72°C/15 min extension. Finally, Fmut8 and Fmut8 $\Delta$ 11 were also subcloned into *S*alI-*Not*I-digested pET-30c and pET-30b, respectively (Novagen, Madison, WI, USA), for inducible, N-terminal His-tagged expression in *Escherichia coli*. The structure of all constructs was verified by automated DNA sequencing.

### Production of recombinant F protein

pET-30cFmut8 and pET-30bFmut8 $\Delta$ 11 were expressed in *E. coli* BL21 cells, and F protein was purified under denaturing conditions on Ni-NTA His-Bind resin (Novagen), followed by preparative polyacrylamide gel

electrophoresis using a Mini Prep cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The Fmut8 $\Delta$ 11 gene product was used to raise rabbit antiserum with no crossreactivity against core protein. For mass spectrometry (MS), Coomassie-stained protein gel bands were rehydrated and trypsinized. Extracted peptides were then eluted from a nanoscale C18 reverse-phase high-pressure liquid chromatography capillary column, and were subjected to electrospray ionization followed by MS using an LCQ DECA ion-trap mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Protein identity was assessed by sequence comparison with protein or translated nucleotide databases with the use of the SEQUEST program [25].

### F protein enzyme-linked immunosorbent assay

Antigen (2  $\mu$ g/ml Ni-NTA-purified Fmut8 $\Delta$ 11) was incubated overnight at 4°C in flat-bottomed 96-well polystyrene plates in 100  $\mu$ l 0.1 M sodium bicarbonate pH 8.6. Plates were blocked for 2 h/4°C with 200  $\mu$ l per well of 5 mg/ml bovine serum albumin in 100 mM sodium bicarbonate pH 8.6, and were washed six times with 10 mM tris base, 150 mM sodium chloride, 0.05% Tween-20 pH 7.4 (1 $\times$  TBST). Dilutions of the patient's sera (1/50 to 1/6400 in 100  $\mu$ l 1 $\times$  TBST) were then added and incubated for 2 h at room temperature with gentle shaking. Wells were washed six times with 1 $\times$  TBST and 100  $\mu$ l/well of alkaline phosphatase-coupled anti-human IgG antibody (1/3000; Sigma, Saint Louis, MO, USA) or anti-rabbit antibody (1/1000; Biosys, Compiegne, France) was added in 1 $\times$  TBST + 5 mg/ml bovine serum albumin. After 1 h incubation at room temperature with gentle agitation, wells were washed six times, and antibody binding was revealed with 50 mM sodium bicarbonate, 1 mM magnesium chloride, and 1 mg/ml p-nitrophenyl-phosphate. After 90 min, optical density was measured at 410 nm in a MR7000 spectrophotometer (Dynatec, Chantilly, VA, USA). Rabbit antisera raised against Fmut8 $\Delta$ 11 or purified core protein (kindly provided by D. Leclerc, Centre de Recherche du CHUL, Quebec, Canada) were used as positive and negative controls.

### Preparation of recombinant Vaccinia virus

CV1 cells, maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Burlington, Canada), were infected with the Western Reserve strain of Vaccinia virus, and were then transfected with pSC11ssFmut8 using calcium chloride precipitation. Progeny virus was extracted by three freeze-thaw cycles, treatment with 0.25 mg/ml trypsin (Worthington, Lakewood, NJ, USA) and sonication, followed by three rounds of plaque selection on HuTK-143B cells incubated in 2% w/v low melting point agarose (Invitrogen) supplemented with 2 $\times$  DMEM, 0.05 mg/ml neutral red, 80  $\mu$ M bromodeoxyuridine, and 400  $\mu$ M 5'-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal) [24]. The identity and



structure of plaque-purified *Vaccinia* recombinants were verified by PCR and automated DNA sequencing.

### Cytotoxic T lymphocyte assays

To serve as targets in cellular cytotoxicity assays, autologous B-lymphoblastoid cell lines were derived from each of the study subjects by incubating patient peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated on a Ficoll gradient (Amersham Biosciences, Mississauga, Canada) with supernatant from the B95-8 Epstein-Barr virus-infected cell line in the presence of 1  $\mu$ M cyclosporine A (Sandoz, Vienna, Austria) [26]. For limiting dilution analysis, serial dilutions (500 cells per well–seven cells per well) of patient PBMC were replica-plated onto wells containing 200 000 irradiated (3000 rads) allogeneic feeders cells, and were cultivated for 21 days in RPMI media supplemented with 10% FBS, 1  $\mu$ g/ml phytohemagglutinin (Sigma) and 80 units/ml recombinant IL-2 (Hoffman-La Roche, Nutley, NJ, USA; obtained through the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagents Programme). Autologous B-lymphoblastoid cell lines, infected at a multiplicity of infection of 10 with specific *Vaccinia* recombinants, were labeled with  $^{51}\text{Cr}$ -sodium chromate (Amersham Biosciences) and the cytotoxic activity of cultured effectors was tested after a standard 5 h incubation [27]. Wild-type *Vaccinia* Western Reserve and *vaccinia* SC59 NNRd expressing amino acid residues 364–1618 (E2, p7, NS2, and NS3) of HCV-1a (obtained from M. Houghton, Chiron Corporation, Emeryville, CA, USA) [28] were used as controls in these experiments. Percentage specific lysis was defined as  $100 \times (\text{test release} - \text{spontaneous release}) / (\text{total release} - \text{spontaneous release})$ , with the significance threshold set at 2.67 standard deviations above negative control values. CTL precursor frequencies and 95% confidence intervals were computed using software kindly provided by Dr Spyros Kalams (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA).

### Peptide binding assay

Thirty-seven overlapping peptides (15 amino acid residues with 10 residue overlaps) derived from F protein and five additional 15-mer peptides corresponding to alternative N-terminal frameshift products of the core protein sequence were synthesized using Fmoc chemistry (SynPep, Dublin, CA, USA) based on the sequence of HCV-1a F protein (GenBank accession no. M62321) [29], and were resuspended in 25% w/v dimethyl sulphoxide in 1  $\times$  Hank's balanced salts solution. Peptides were diluted to 30, 100, and 200  $\mu$ g/ml final concentration in DMEM supplemented with 3% w/v FBS, and were incubated with 100 000 serum-depleted (3% FBS for 24 h) T2 cells [30] for 16 h at 37°C in 5% carbon dioxide. T2 cells were then stained (30 min at room temperature) for MHC class I molecules using fluorescein isothiocyanate-conjugated W6/32 monoclonal antibody (Sigma) and were analysed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson

Immunocytometry Systems, La Jolla, CA, USA) with live gating based on forward and side scatter.

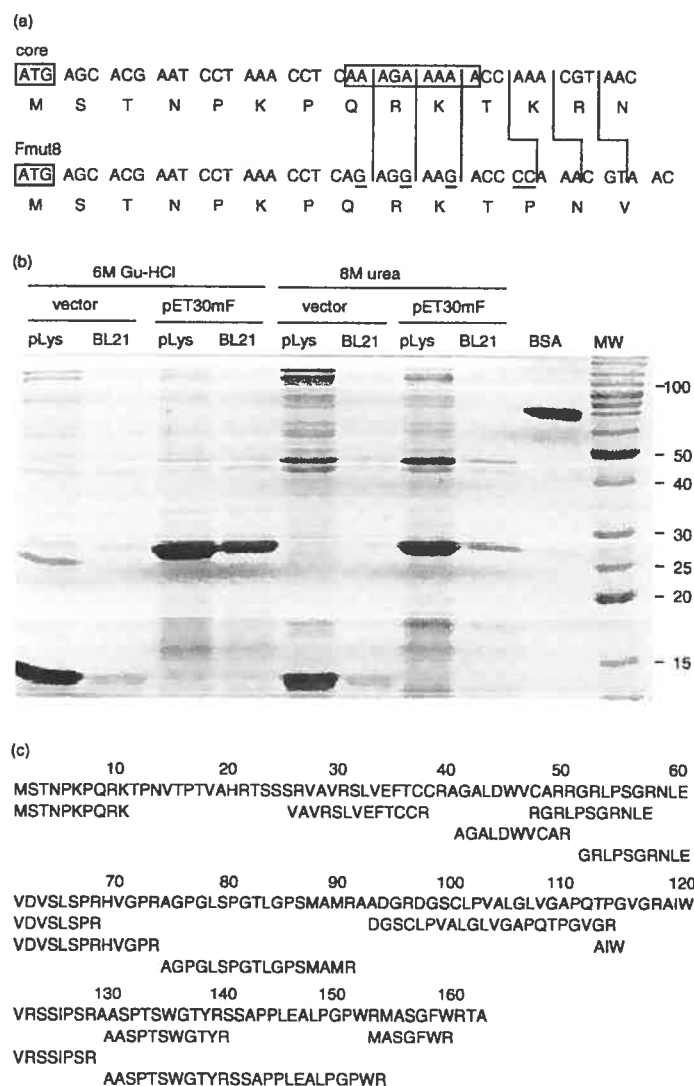
## Results

### F protein-specific humoral immune responses

Five synonymous nucleotide substitutions were introduced in the putative frameshift-associated slippery-like sequence to force the expression of HCV-1a F protein in the absence of core gene product (Fig. 1a). This recombinant protein (Fig. 1b) and a truncated form lacking the first 11 amino acid residues shared with core (data not shown) were expressed in *E. coli* and purified by nickel chelation chromatography. Because multiple translational recoding events were reported to occur when F protein was produced in different expression systems [16,31,32], the amino acid sequences of Fmut8 and Fmut8 $\Delta$ 11 were confirmed using MS, with peptide coverage of 87.0 and 68.2% by amino acid count for Fmut8 and Fmut8 $\Delta$ 11, respectively (Fig. 1c and data not shown). Purified Fmut8 $\Delta$ 11 was used in ELISA to measure reactivity against F protein in sera derived from 39 patients infected with various HCV subtypes, including HCV-1a ( $n = 20$ ), HCV-1b ( $n = 9$ ), HCV-3a ( $n = 7$ ), HCV-4a ( $n = 1$ ), HCV-4c ( $n = 1$ ), and HCV-5a ( $n = 1$ ). Of these patients, 25 were also co-infected with HIV-1. Levels of ALT and AST were significantly higher in co-infected patients than in patients infected with HCV alone ( $P = 0.0464$  and  $P = 0.00542$ , respectively, Student's *t* test). The plasma HCV load was also larger in co-infected subjects, but this difference was not statistically significant ( $P = 0.0778$ , Student's *t* test).

Overall, serum samples from 23 of 39 HCV-infected patients (59.0%) had positive reactivity to Fmut8 $\Delta$ 11 at dilutions of 1 : 400 or greater (Fig. 2a). These include 10 of 20 patients (50.0%) infected with HCV-1a, seven of nine patients (77.8%) infected with HCV-1b, four of seven patients (57.1%) infected with HCV-3a, two of two patients (100%) infected with HCV-4a or 4c, and none of one patient (0.0%) infected with HCV-5a. Humoral responses directed against F protein were only detected in HCV-infected subjects (Fig. 2a and data not shown). Plasma HCV viral load, ALT and AST levels were not significantly different in subjects with detectable versus undetectable anti-F antibody responses ( $P = 0.137$ , 0.112, and 0.105, respectively, Student's *t* test). Furthermore, there was no correlation in linear regression analysis between titres of anti-F antisera and HCV viral load, ALT, or AST ( $r^2 = 0.124$ , 0.134, and 0.125, respectively).

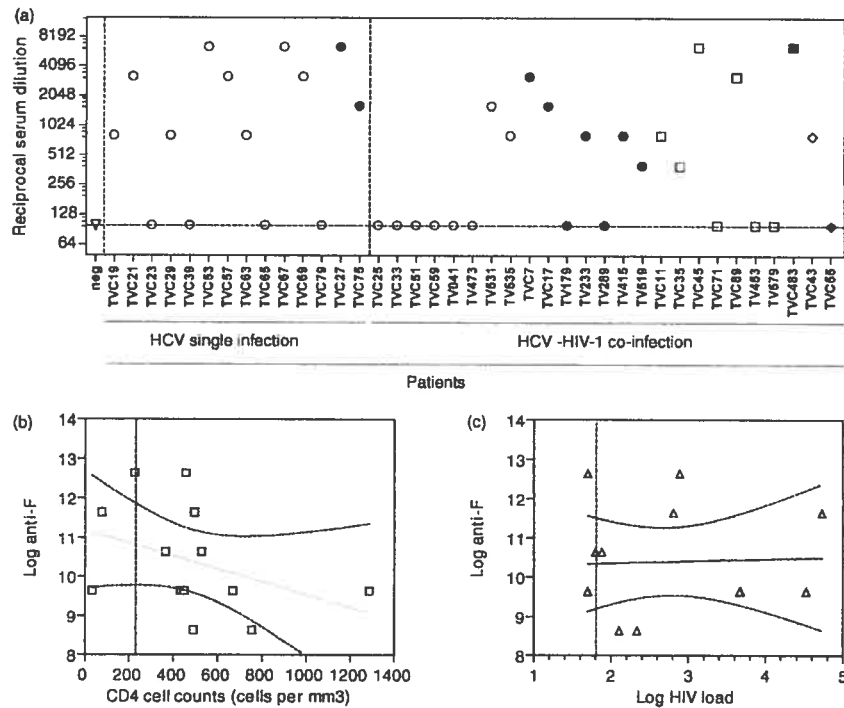
The proportion of patients co-infected with HCV and HIV-1 who displayed detectable antibody responses to F protein (13 of 25 subjects; 52.0%) was not significantly different from that observed in subjects infected with HCV alone (10 of 14 subjects; 71.4%) ( $P = 0.317$ , Fisher's



**Fig. 1. Expression and production of recombinant hepatitis C virus F protein.** (a) Structure of the Fmut8 F protein expression cassette. Initiation sites and putative A-rich ribosomal frameshift sequences are boxed. Site-specific mutations introduced to switch and lock the translational reading frame are underlined. (b) Purification of recombinant hepatitis C virus (HCV) F protein by nickel chelation chromatography. pLys or BL21 competent *Escherichia coli* cells (Novagen) were transformed with empty pET-30c (vector) or with pET-30cFmut8. Extraction was either with 6 M guanidium hydrochloride or 8 M urea. (c) Identification of Fmut8 by mass spectrometry. Individual peptide matches are displayed under the full-length Fmut8 sequence.

exact test), and was similar to that reported in a recent survey of HCV-infected subjects [22]. When analysis was restricted to patients with detectable anti-F antibody responses, ELISA titres were not significantly different in co-infected patients ( $n = 13$ ) than those measured in subjects infected with HCV alone ( $n = 10$ ) ( $P = 0.170$ , Mann-Whitney U test) (Fig. 2a). F protein-specific antibody responses were detected in co-infected patients with CD4 cell counts ranging from 33 cells/mm<sup>3</sup> to 1287 cells/mm<sup>3</sup> (Fig. 2c). However, there was no

significant correlation between the anti-F antibody titre and CD4 cell counts ( $r^2 = 0.146$ ) (Fig. 2b), although the correlation coefficient improved ( $r^2 = 0.205$ ) and bordered statistical significance when subjects with CD4 cell counts less than 200 cells/mm<sup>3</sup> were excluded from the analysis (data not shown). There was no significant correlation between the anti-F antibody titre and HIV-1 viral load ( $r^2 = 0.00172$ ) (Fig. 2c). Finally, crossreactive HCV subtype recognition of F protein was observed in sera from co-infected patients (Fig. 2a). ELISA results



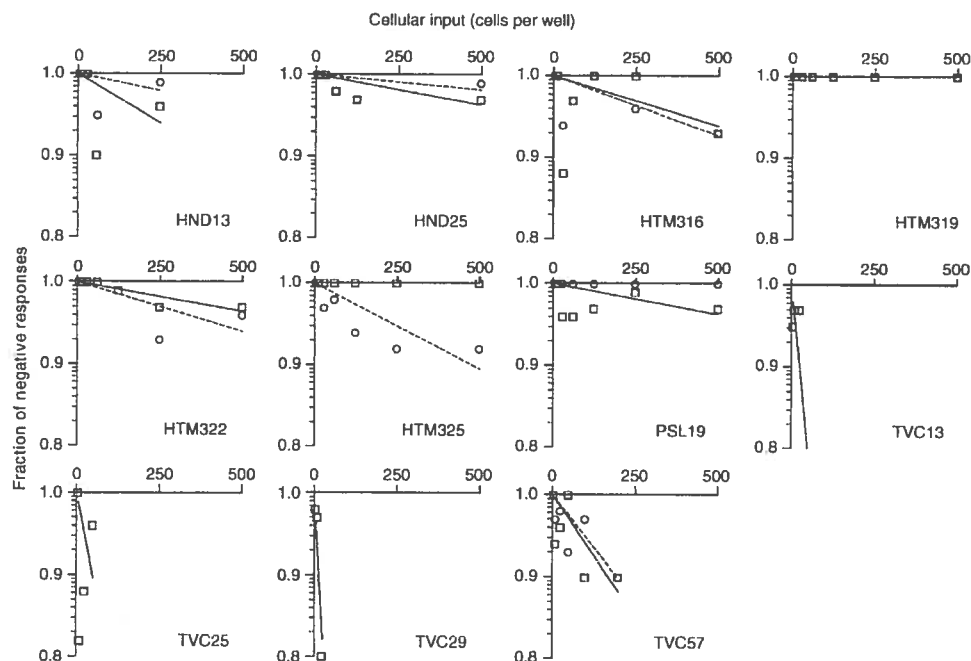
**Fig. 2. F protein-specific antibody responses in hepatitis C virus-infected subjects and patients co-infected with HIV-1.** (a) Ig responses were detected using Fmut8 $\Delta$ 11 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described in the Materials and methods section. The hepatitis C virus (HCV) genotype was determined as previously described [23]. Open triangle, uninfected subject; open circles, HCV-1a; closed circles, HCV-1b; open squares, HCV-3a; closed squares, HCV-4a; open diamonds, HCV-4c; closed diamonds, HCV-5a. The hatched line corresponds to the detection threshold. (b) Lack of correlation between levels of F protein-specific antibody and CD4 T-cell counts ( $r^2 = 0.1459$ ;  $P = 0.198$ ). Hatched lines indicate the 95% confidence intervals. The vertical hatched line corresponds to 200 CD4 T cells/mm<sup>3</sup>. (c) Lack of correlation between levels of F protein-specific antibody and log HIV-1 viral load ( $r^2 = 0.00172$ ;  $P = 0.893$ ). Hatched lines indicate the 95% confidence intervals. The vertical hatched line corresponds to the detection threshold (50 copies HIV-1 RNA/ml).

were corroborated by Western blot (data not shown). Overall, these data indicate that co-infected patients can mount immunoglobulin responses against HCV F protein, and that these responses are crossreactive between HCV subtypes.

#### F protein-specific cytotoxic T-lymphocyte activity

T-cell microcultures were derived from PBMC samples obtained from 11 HCV-infected patients, including nine subjects co-infected with HCV and HIV-1. *Vaccinia-Fmut8* recombinant virus was generated and used in <sup>51</sup>Cr-release limiting dilution analysis to test F protein-specific CTL activity (Table 1; Fig. 3). Overall, CTL precursors were detected in nine of 11 HCV-infected subjects (81.8%), with precursor frequencies ranging from 1/177 to 1/13372 T cells. These include patients infected with HCV-1a ( $n = 6$ ), HCV-2a ( $n = 1$ ) and HCV-3a ( $n = 2$ ), indicative of the crossreactive recognition of F protein by CTL between HCV subtypes. Although others have reported the production of IFN- $\gamma$  and IL-10 after the in-vitro

stimulation of T cells with F protein-derived peptides [21], our results represent the first direct evidence of cell-mediated cytotoxic activity directed against HCV F protein in HCV-infected individuals. CTL precursors were also detected in seven of nine patients (77.8%) co-infected with HIV-1 (mean CD4 T-cell counts: 519 cells/ $\mu$ l; mean HIV-1 viral load: 3.46 log RNA copies/ml; Table 1). CTL precursors that recognized other HCV proteins (residues 364–1618, i.e. E2, p7, NS2, NS3, but not core or F protein) were also observed in six of eight subjects (75%), with precursor frequencies between 1/1608 and 1/12188, not significantly different from those observed with F protein ( $P = 0.529$ , Mann-Whitney U test). Patient HTM319 did not exhibit cytotoxic activity against either of the targets tested, whereas patients HTM325 and PSL19 had discordant responses to F protein and p364-1618 (Table 1; Fig. 3). Finally, there was no correlation between F protein-specific CTL precursor frequencies and patient CD4 cell counts, HIV-1 or HCV viral loads, although such comparisons would be unreliable given the limited number of subjects tested.

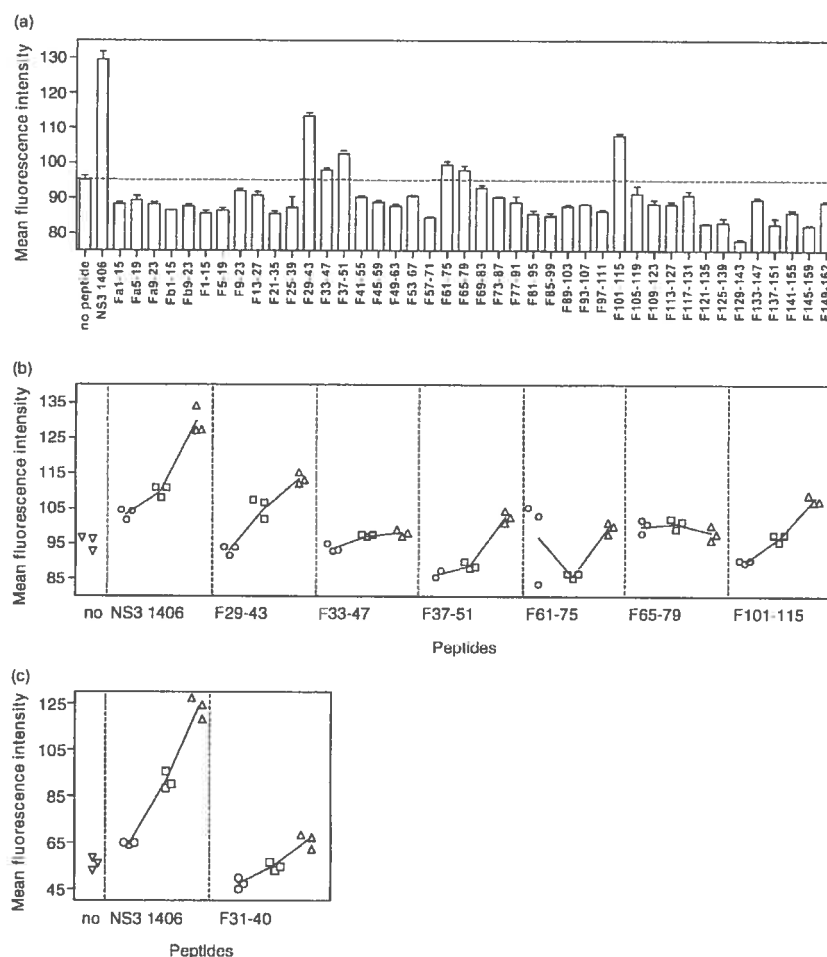


**Fig. 3. Precursor frequencies of hepatitis C virus F protein-specific cytotoxic T lymphocytes in hepatitis C virus-infected subjects and patients co-infected with HIV-1.** Cytotoxic T-lymphocyte activity was detected in standard  $^{51}\text{Cr}$ -release assays using autologous B lymphoblastoid cell lines and *Vaccinia* recombinants expressing either hepatitis C virus (HCV)-1a F protein or HCV-1a p364-1618. Limiting dilution analysis was performed as described in the Materials and methods section. Solid lines and open squares, F protein-specific activity; dashed lines and open circles, p364-1618.

### Analysis of F protein peptide binding

Forty-two overlapping 15-mer peptides corresponding to the HCV-1a F protein sequence were tested for interaction with HLA-A\*0201 molecules using the T2 peptide binding assay [30]. The HCV-1 NS3 1406-1415 peptide (KLVALGINAV), a well-characterized HLA-A\*0201 restricted T-cell epitope [33], was used as a positive control. Mean fluorescence intensity after class I MHC staining by the W6/32 monoclonal antibody was used as the readout. Whereas the efficacy of individual F protein-derived peptides to promote HLA-A\*0201 expression at the cell surface varied considerably, six 15-mers stood out as high binders in initial screening experiments (F29-43, F33-47, F37-51, F61-75, F65-79, and F101-115) (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Fig. 4a). Of those, only peptides F29-43 (VRSLVEFTCCRAGAL), F37-51 (CCRAGALDWVCARRE), and F101-115 (PVALGLAGAPQTPGV) clearly mediated a dose-dependent increase in MHC class I expression at the surface of T2 cells (Fig. 4b). Peak fluorescence obtained with peptides F29-43, F37-51, and F101-115, respectively, reached 87.6, 79.2, and 83.2% of the levels obtained with NS3 1406-1415 (Fig. 4b). The presence of HLA-A\*0201-restricted epitopes within peptides F29-43 (VRSLVEFTCCRAGAL) had been predicted in advance based on an analysis of HCV-1a sequences (GenBank accession no. M62321) using the BIMAS web tool

([http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/)), with a predicted MHC-peptide dissociation time of 20.4 s. Consistent with this, exposure of T2 cells to peptide F31-40 (SLVEFTCCRA) clearly resulted in a dose-dependent increase in cell-surface expression of MHC class I (Fig. 4c). Searches of HCV-1a sequences based using BIMAS also uncovered another potential HLA-A\*0201-restricted epitope within peptide F101-115 (PVALGLAGAPQTPGV) (predicted dissociation time of 7.45 s). Within our panel, SLVEFTCCRA and ALGLAGAPQT are only represented in single peptides (i.e. F29-43 and F101-115, respectively). SLVEFTCCRA lies within a region of F protein that is the most conserved between HCV subtypes (Table 2), suggesting that it could display antigenic crossreactivity. In addition, both HLA-A\*0201 anchor residues (P2 and P9) are fully conserved across all HCV genotypes examined (Table 2 and data not shown). ALGLAGPQT resides within a section of F protein that is highly variable between genotypes, and this variability also extends to anchor residues. This suggests that it could be HCV-1 subtype specific and that it might not be equally recognized in individuals infected with other HCV strains. Use of the SYFPEITHI algorithm (<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com>) revealed other high-scoring potential HLA-A\*0201-restricted epitopes, including CRAGALDWV, located within peptides F33-47 and F37-51. In this case, the absence of a clear



**Fig. 4. MHC-F protein peptide interaction.** The binding of peptides derived from the F protein sequence to HLA-A\*0201 was tested using the T2 binding assay, as described in the Materials and methods section. (a) Testing of the F protein overlapping peptide panel (200 µg/ml). The hatched line represents the threshold level corresponding to the no peptide control. (b) Dose-response analysis with selected candidate peptides. Open circles, 30 µg/ml; open squares, 100 µg/ml; open triangles, 200 µg/ml. (c) Dose-response analysis with minimal epitope peptide (SLVEFTCCRA). Open circles, 30 µg/ml; open squares, 100 µg/ml; open triangles, 200 µg/ml.

**Table 2. Conservation of potential HLA-A\*0201-restricted epitopes located within F protein peptides F29-43, F37-51, and F101-115 between hepatitis C virus subtypes.**

HCV subtype	F29-43	F37-51	F101-115
1a (M62321)	<b>SLVEFTCCRA</b>	<b>CRAGALDWV</b>	<b>ALGLAGAPQT</b>
2a (D00944)	<b>SLAEYTCRA</b>	<b>CRAGAPGW</b>	<b>VPVPLGAPMT</b>
3a (D17763)	<b>SLVEYTCRA</b>	<b>CRAGAHDWV</b>	<b>APVHPGAQMT</b>
4a (Y11604)	<b>SLAEFTCCRA</b>	<b>CRAGAPDWV</b>	<b>ALDRLGAQMI</b>
5a (Y13184)	<b>SLVEFTCCRA</b>	<b>CRAGALNWV</b>	<b>ALGLIGAPMT</b>
6a (Y12083)	<b>SLAEFTCCRA</b>	<b>CRARAPGWV</b>	<b>APGHTGAPMT</b>

HCV, Hepatitis C virus. GenBank accession numbers are shown between brackets. Conserved HLA-A\*0201 anchor residues are in bold.

dose-response with F33-47 compared with F37-51 (Fig. 4b) could be caused by differential peptide processing by T2 cells.

## Discussion

Taken as a whole, these results indicate that: (i) At the level of humoral immune responses, there is antigenic crossreactivity among F proteins derived from distinct HCV subtypes, consistent with the high degree of intersubtype conservation of F protein amino acid

sequences. Although most of the subjects studied had reasonably high CD4 cell counts, significant titres of anti-F antibodies were observed in two patients with less than 200 CD4 T cells/mm<sup>3</sup>. (ii) F protein-specific cell-mediated immunity can be readily detected in the large majority of, but not all, subjects co-infected with HCV and HIV-1. These responses were crossreactive between HCV subtypes. (iii) Several peptide sequences derived from HCV-1a F protein were capable of binding HLA-A\*0201 in cell culture and could therefore correspond to novel HLA-A\*0201-restricted CTL epitopes. These differ from those previously reported, with SLVEFTC-CRA and CRAGALDWV positioned upstream relative to the sequence corresponding to the 99 amino acid synthetic peptide used by Bain *et al.* [21].

Because F protein sequences are constrained by the presence of RNA secondary structures and overlapping core sequences, their level of intersubtype conservation is on the same level as that observed with core [34]. CTL epitopes encoded within this region could thus be less susceptible to escape mutation than other segments of the HCV genome, notably E1, E2, and NS3 [35]. This property could be particularly important given the fact that viral escape mutations are believed to contribute to HCV persistence in the host [36]. Also, because F protein coding sequences are located directly downstream from the translational initiation site, and because its production is presumably independent of viral and host proteases (it is not part of the HCV polyprotein *per se*), it is likely to be one of the first HCV gene products to be expressed after infection of the host cell. This is of significance because immunodominance and epitope hierarchy are influenced not only by the levels of expression of a given viral protein but also by the timing of its expression [37]. Finally, unlike core, F protein has so far not been shown to participate in molecular or cellular pathogenesis [19]. For these reasons, F protein represents an attractive candidate as a component in the development of HCV vaccines, and its immunogenic properties should be investigated further, especially given the fact that vaccination could become an important public health instrument to prevent the acquisition of HCV in patients infected with HIV-1.

## Acknowledgements

M.T. and E.J. contributed equally to this work. The authors wish to thank Silvie Valois, Martine Caty, Pascal Lapierre and Ampha Khammy for expert technical assistance, Ross Tomaino (Taplin Biological Mass Spectrometry Facility, Boston, MA, USA) for protein sequence analysis, and Naglaa Shoukry for critical reading of the manuscript. H.S. is a Junior-II Scientist of le Fonds de la Recherche en Santé du Québec. M.T. is the recipient of a scholarship from la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine.

*Sponsorship:* This research was supported by the Canadian Network for Vaccines and Immunotherapeutics, by Valorisation-Recherche Québec, by the FRSQ-SIDA-MI Network, and by grant N°28-PG-51355 from the Elizabeth Glases Pediatric AIDS Foundation.

## References

1. Battegay M, Fikes J, Di Bisceglie AM, Wentworth PA, Sette A, Celis E, *et al.* Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus-encoded peptides binding to HLA-A2.1 molecules. *J Virol* 1995; **69**:2462-2470.
2. Rehermann B, Chang KM, McHutchison JG, Kokka R, Houghton M, Chisari FV. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 1996; **98**:1432-1440.
3. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, *et al.* Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; **10**:439-449.
4. Lechner F, Wong DKH, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, *et al.* Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; **191**:1499-1512.
5. Rehermann B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis* 2000; **20**:127-141.
6. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, *et al.* HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; **305**:872-874.
7. Laurence J. Potential roles for chemokine receptor CCR5 in the pathobiology of hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2002; **122**:2069-2080.
8. Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Stoll M, Manns MP, Schmidt RE. Hepatitis B and C in HIV-infected patients. Prevalence and prognostic value. *J Hepatol* 1997; **27**: 18-24.
9. Sulkowski MS, Mast EE, Seef LB, Thomas DL. Hepatitis C virus infection as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2000; **30** (Suppl. 1):S77-S84.
10. Cribier B, Rey D, Schmitt C, Lang JM, Kirn A, Stoll-Keller F. High hepatitis C viraemia and impaired antibody response in patients coinfecting with HIV. *AIDS* 1995; **9**:1131-1136.
11. George SL, Gebhardt J, Klinzman D, Foster MB, Patrick KD, Schmidt WN, *et al.* Hepatitis C virus viremia in HIV-infected individuals with negative HCV antibody tests. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; **31**:154-162.
12. Lauer GM, Nguyen TN, Day CL, Robbins GK, Flynn T, McGowan K, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1-hepatitis C virus coinfection: intraindividual comparison of cellular immune responses against two persistent viruses. *J Virol* 2002; **76**:2817-2826.
13. Elliott T, Bodmer H, Townsend A. Recognition of out-of-frame major histocompatibility complex class I-restricted epitopes *in vivo*. *Eur J Immunol* 1996; **26**:1175-1179.
14. Ronsin C, Chung-Scott V, Poullion I, Aknouche N, Gaudin C, Triebel F. A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes *in situ*. *J Immunol* 1999; **163**:483-490.
15. Smith DB, Simmonds P. Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *J Mol Evol* 1997; **45**:238-246.
16. Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan A, *et al.* Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 2001; **20**:3840-3848.
17. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 2001; **7**:710-721.

18. Cristina J, Lopez F, Moratorio G, Lopez L, Vasquez S, Garcia-Aguirre L, Chunga A. **Hepatitis C virus F protein sequence reveals a lack of functional constraints and a variable pattern of amino acid substitution.** *J Gen Virol* 2004; **86**:115-120.
19. Basu A, Steele R, Ray R, Ray RB. **Functional properties of a 16 kDa protein translated from an open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus.** *J Gen Virol* 2004; **85**:2299-2306.
20. Lo SY, Selby M, Tong M, Ou JH. **Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino-acid substitution.** *Virology* 1994; **199**:124-131.
21. Bain C, Parroche P, Lavergne JP, Duverger B, Vieux C, Dubois V, et al. **Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection.** *J Virol* 2004; **78**:10460-10469.
22. Komurian-Pradel F, Rajoharison A, Berland JL, Khouri V, Perret M, van Roosmalen M, et al. **Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection.** *Hepatology* 2004; **40**:900-909.
23. Murphy D, Willems B, Delage G. **Use of the 5' noncoding region for genotyping hepatitis C virus.** *J Infect Dis* 1994; **169**:473-475.
24. Chakrabarti S, Brechling K, Moss B. **Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques.** *Mol Cell Biol* 1985; **5**:3403-3409.
25. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. **An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database.** *J Am Soc Mass Spectrom* 1994; **5**:976-989.
26. Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, et al. **Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8+ T cell clones during primary infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:9848-9853.
27. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. **Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and by drugs.** *Immunology* 1968; **14**:181-196.
28. Koziel MJ, Dudley D, Aidhal N, Grakoui A, Rice CM, Choo QL, et al. **HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release.** *J Clin Invest* 1995; **96**:2311-2321.
29. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. **Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis.** *Science* 1989; **244**:359-362.
30. Crumpacker DB, Alexander J, Cresswell P, Engelhard VH. **Role of endogenous peptides in murine allogeneic cytotoxic T cell responses assessed using transfectants of the antigen-processing mutant 174xCEM.T2.** *J Immunol* 1992; **148**:3004-3011.
31. Choi J, Xu Z, Ou JH. **Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting.** *Mol Cell Biol* 2003; **23**:1489-1497.
32. Boulant S, Becchi M, Penin F, Lavergne JP. **Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b.** *J Biol Chem* 2003; **278**:45785-45792.
33. He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, et al. **Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:5692-5697.
34. Walewski JL, Gutierrez JA, Branch-Elliman W, Stump DD, Keller TR, Rodriguez A, et al. **Mutation master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions.** *RNA* 2002; **8**:557-571.
35. Wang H, Bian T, Merrill SJ, Eckels DD. **Sequence variation in the gene encoding the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus: evidence for immune selection.** *J Mol Evol* 2002; **54**:465-473.
36. Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K, Muchmore E, Hughes AL, et al. **Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**:2755-2759.
37. Yewdell JW, Del Val M. **Immunodominance in TCD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models.** *Immunity* 2004; **21**:149-153.

## **Article 2**



**MATERNAL IMMUNITY DRIVES HEPATITIS C VIRUS (HCV)  
QUASISPECIES EVOLUTION DURING PREGNANCY.**

Myriam Troesch<sup>1,3</sup>, Isabelle Meunier<sup>1,3</sup>, Normand Lapointe<sup>2,4</sup>, Marc Boucher<sup>2,5</sup>,  
Hugo Soudeyns<sup>1,3,4\*</sup>.

<sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale and <sup>2</sup>Centre maternel et infantile sur le SIDA,  
Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine; Departments of <sup>3</sup>Microbiology  
& Immunology, <sup>4</sup>Pediatrics, and <sup>5</sup>Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine,  
Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

\*To whom correspondence and requests for reprints should be addressed at :  
Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-  
Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, room 6735, Montréal (Québec), H3T 1C5,  
Canada.

Tel.: (514) 345-4931 ext. 3907.

Fax: (514) 345-4794.

e-mail: [REDACTED]

Running title: HCV quasispeciation during pregnancy.

Word count: 4,440 words (excluding references); 6,447 words (including references).

Word count (abstract): 200 words.

Key words: Hepatitis C; HCV; HIV-1; pregnancy; coinfection; antiretroviral therapy.

**ABSTRACT**

To study the influence of HIV-1 infection on the clinical course of hepatitis C during pregnancy, HCV quasispecies composition was characterized longitudinally in a group of 17 pregnant women infected with HCV, including 13 coinfecting with HIV-1. Median AST and HCV RNA levels were higher in coinfecting subjects throughout pregnancy, with 3<sup>rd</sup> trimester HCV RNA levels significantly higher than those observed in subjects infected with HCV alone. Quasispecies complexity based on numbers of HVR1 variants or Shannon entropy was higher in treated-responders (n=11) than in untreated-nonresponders (n=6) or subjects infected with HCV alone (n=4) at all time points examined. Finally, analysis of non-synonymous nucleic acid substitutions at non-synonymous sites and synonymous substitutions at synonymous sites (dN/dS) revealed that intrahost selective pressure was consistently larger in treated-responders than in HCV-only subjects, and always higher in HCV-only than in untreated-nonresponders. Overall, these results indicate that: a) coinfection with HIV-1 leads to reduced immune pressure on HVR1; b) this immunosuppressive effect is overturned by antiretroviral treatment; and c) pathological events observed in HCV-infected women in late pregnancy are immune-mediated. This study will lead to a better understanding of therapeutic and immune factors that influence viral evolution and the clinical outcome of hepatitis C during pregnancy.

## **INTRODUCTION**

Infection with hepatitis C virus (HCV) is the leading cause of chronic viral hepatitis, with >2.7 million cases in the United States and close to 125 million worldwide (1, 2). There is no vaccine to prevent HCV infection and antiviral regimens are of limited efficacy (3, 4). HCV is most often transmitted by exposure to contaminated body fluids (2), and can also be passed from mother to child during pregnancy or *intra partum* (5-8). Following infection, a chronic carrier state is established in the large majority of subjects. In adults and children, long-term persistent HCV infection is associated with the development of hepatic inflammation and fibrosis and can lead to cirrhosis, hepatocellular carcinoma and end-stage liver disease (9, 10). Mechanisms involved in the generation of hepatic injury are poorly understood but are thought to involve viral and immune-mediated cytopathology (11). Due to overlapping transmission routes and target populations, a large proportion of subjects infected with HCV are also carriers of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) (12). Co-infection worsens the prognosis of HCV disease in children and adults (12-14). Most importantly, studies have shown that the rate of vertical HCV transmission is markedly increased in the presence of maternal coinfection with HIV-1 (15-17).

Information on the natural course of HCV infection during pregnancy is currently scarce. Interestingly, levels of alanine aminotransferase (ALT), which

testify to the extent of ongoing hepatic damage, were shown to decline in the last trimester of pregnancy in absence of corresponding decline in circulating HCV viral load (8, 18). Exacerbations of chronic hepatitis C are also commonly noted during the *postpartum* period (19, 20). This led to the suggestion that immune modulation associated with pregnancy might influence the course of HCV-associated disease (21, 22).

HCV is an enveloped virus that belongs to the *Flaviviridae* family, and has a 9,400 kb single-stranded, + sense RNA genome (23, 24). HCV isolates display extensive genetic variability and are classified into 6 subtypes and multiple subgroups (25). Like other RNA viruses, HCV exists in its host not as a single molecular entity but rather as a quasispecies of closely related variants (26-28). HCV quasispecies complexity and evolution are principally shaped by selective pressures exerted by virus-specific immunity, potentially contributing to the maintenance of chronic viral persistence (29-32). Indeed, temporal variations in the diversity and distribution of HCV quasispecies are associated with the transition between acute and chronic HCV infection (33), the long-term outcome of HCV-associated disease (34), the response to IFN treatment (35-37), and the immunologic status of children with perinatally-acquired HCV infection (14, 38-42). Consistent with the fact that HIV-1 infection induces broad immunodeficiency, HCV quasispecies diversity was also shown to vary as a result of HIV-1 seroconversion (43, 44), as a function of CD4+ T cell counts

(45, 46), and upon re-emergence of HCV-specific immunity following suppression of HIV-1 replication by antiretroviral therapy in adults coinfecting with HCV and HIV-1 (47). In order to gain insight into the evolution of HCV disease during pregnancy and to better understand the influence of HIV-1 coinfection and antiretroviral treatment, the nucleotide sequence of the HCV E2 envelope gene hypervariable region 1 (HVR1) was analyzed longitudinally in a group of women infected with HCV, including subjects coinfecting with HIV-1.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Clinical parameters**

The study group consisted of 17 pregnant women infected with HCV, including 13 subjects who were also coinfecting with HIV-1. Of those, 4 were followed throughout two consecutive pregnancies, for a total of 21 independent pregnancies examined (Table 1). Serial measurements of circulating levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) (pregestational; 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> trimesters; postpartum) were carried out in all study subjects to assess hepatic inflammation. A progressive reduction in median ALT levels was observed throughout pregnancy, with 1<sup>st</sup> trimester (37 U/I) > 2<sup>nd</sup> trimester (37 U/I) > 3<sup>rd</sup> trimester (30 U/I) (Figure 1A). However, the difference between the 1<sup>st</sup> and the 3<sup>rd</sup> trimester was not statistically significant ( $p=0.492$ , Wilcoxon signed rank test). Likewise, median AST levels had a trend to decline until the 3<sup>rd</sup> trimester (data not shown). In contrast, median levels

of HCV RNA in plasma increased between the 1<sup>st</sup> and the 3<sup>rd</sup> trimester ( $1.44 \times 10^6$  and  $2.05 \times 10^6$  IU/ml, respectively), without reaching statistical significance (Figure 1A). Overall, these findings were consistent with what is known of the natural history of HCV infection in pregnancy (8, 18).

Median HCV RNA levels were generally higher in coinfecting subjects throughout pregnancy, with median 3<sup>rd</sup> trimester level ( $2.69 \times 10^6$  IU/ml) significantly higher than that observed in subjects infected with HCV alone ( $3.67 \times 10^5$  IU/ml;  $p=0.0283$ , Mann-Whitney U test) (Figure 1B). Median AST levels were also found to be more elevated in coinfecting subjects as compared with subjects infected with HCV alone, though the difference did not reach statistical significance (data not shown). In coinfecting subjects, HIV-1 viral load significantly declined during pregnancy, with a median viral load of 1.71 log HIV RNA copies/ml plasma in the 3<sup>rd</sup> trimester compared to 3.23 log HIV RNA copies/ml plasma in the 1<sup>st</sup> trimester ( $p=0.0156$ , Wilcoxon signed rank test) (data not shown). In addition, 3<sup>rd</sup> trimester HIV-1 viral loads of  $<2.70$  log HIV RNA copies/ml and of  $<1.70$  log HIV RNA copies/ml were achieved in 70.6% (12 of 17) and 47.1% (8 of 17) of pregnancies, respectively (data not shown). Reduction in HIV-1 viral load was strongly associated with the use of antiretroviral treatment to prevent mother-to-child transmission of HIV-1: 4 of 5 women who did not achieve an HIV-1 viral load  $<2.70$  log RNA copies/ml during the 3<sup>rd</sup> trimester of pregnancy were either untreated or were treated

with a single antiretroviral agent (OR=44, 95% CI 2.192-883.3;  $p=0.0099$ ) (Table 1). In coinfecting subjects, mean CD4<sup>+</sup> T lymphocyte count at study entry, measured using flow cytometry, was 544 cells/mm<sup>3</sup> (range=144-1287 cells/mm<sup>3</sup>, 95% CI 390-697.1) and mean CD8<sup>+</sup> T cell count was 731 cells/mm<sup>3</sup> (range=504-1166 cells/mm<sup>3</sup>, 95% CI 593.1-867.3). These values did not significantly change between the pregestational and postpartum periods, irrespective of antiretroviral treatment (Table 1 and data not shown).

### **Complexity of HCV quasispecies**

To better characterize the evolution of HCV disease during pregnancy and the influence of coinfection with HIV-1, longitudinal sequence analysis of HVR1 (amino acid residues 384-410 according the HCV-1a reference sequence, GenBank accession n° M62321) was undertaken using serial serum samples obtained from all study subjects. An overall total of 1,337 clones of HVR1 and flanking regions representing 1,101 non redundant sequences were obtained, corresponding to a mean of 63.7 cDNA clones per pregnancy (range=17-96 clones) and a mean number of 18.8 sequences per time point. Nucleic acid sequences were aligned and the number of different variants in HVR1 (quasispecies complexity; variant spectrum) was calculated for each subject at each time point (pregestational; 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> trimesters; post-partum) (Figure 2). Overall, quasispecies complexity based on the number of HVR1 variants increased progressively from the pregestational period, peaked in the 2<sup>nd</sup>



trimester, declined in the 3<sup>rd</sup> trimester, and rebounded postpartum (Figure 3A), but none of these observed differences was statistically significant ( $F_{(4,66)}=0.57$ ,  $p=0.68$ , one-way ANOVA test). When comparing coinfecting subjects and subjects infected with HCV alone, the two-way ANOVA test did not show any significant difference between the two groups of patients nor between timepoints ( $F_{(1,62)}=1.53$ ,  $p=0.22$  and  $F_{(4,62)}=0.18$ ,  $p=0.95$  respectively). However, remarkable differences were revealed when pregnancies were stratified as: a) subject infected with HCV only ( $n=4$ ); b) subject coinfecting with HCV and HIV-1, treated with and responding to antiretroviral therapy with a 3<sup>rd</sup> trimester HIV-1 viral load  $<2.70$  log RNA copies/ml (treated-responders,  $n=11$ ); or c) subject coinfecting with HCV and HIV-1, and either not treated or not achieving an HIV-1 viral load  $<2.70$  log RNA copies/ml during the 3<sup>rd</sup> trimester of pregnancy (untreated-nonresponders,  $n=6$ ) (Figure 3B). While no statistical significant difference was seen between timepoints ( $F_{(4,57)}=0.547$ ,  $p=0.702$ ), the number of HVR1 variants was significantly different among the studied groups ( $F_{(2,57)}=11.899$ ,  $p<0.001$ ). Bonferroni post-hoc analysis for multiple comparisons showed that number of variants observed in treated-responders was higher than what was observed in subjects untreated-nonresponders in the 2<sup>nd</sup> trimester (mean  $10.6 \pm 1.0$  vs  $5.6 \pm 1.3$ ,  $p<0.05$ ) as well as postpartum (mean  $10.4 \pm 1.0$  vs  $4.8 \pm 1.4$ ,  $p<0.01$ ) (Figure 3B).

Next, Shannon entropy was computed as a representation of the frequency distribution of variants at each time point. When the entire study group was considered, mean entropy of the variant distribution increased progressively to peak in the 2<sup>nd</sup> trimester, decreased in the 3<sup>rd</sup>, and rebounded postpartum (Figure 3C). None of the differences observed were statistically significant ( $F_{(4,66)}=0.47$ ,  $p=0.76$ , one-way ANOVA test). When pregnancies were stratified between HCV-only, treated-responders, and untreated-nonresponders, the two-way ANOVA test indicated that there was no significant difference between timepoints ( $F_{(4,57)}=0.49$ ,  $p=0.74$ ), but the Shannon entropy was significantly different among the stratified groups ( $F_{(2,57)}=12.07$ ,  $p<0.001$ ). The Bonferroni post hoc analysis revealed that the values of Shannon entropy computed in treated-responders were higher than that in untreated-nonresponders in the 2<sup>nd</sup> trimester and postpartum (mean  $0.64 \pm 0.07$  vs  $0.34 \pm 0.08$  and mean  $0.68 \pm 0.07$  vs  $0.36 \pm 0.09$  respectively,  $p<0.05$ ), as well as in the 3<sup>rd</sup> trimester (mean  $0.54 \pm 0.06$  vs  $0.26 \pm 0.08$ ,  $p<0.05$ ) (Figure 3D). Overall, analysis of quasispecies complexity using Shannon entropy (Figures 3C and 3D) was consistent with that obtained by examining the variant spectrum (Figures 3A and 3B). These results suggest that the 3<sup>rd</sup> trimester decline and postpartum rebound in quasispecies complexity were immune-related, as they became more significant when untreated subjects and patients with HIV-1 viral load  $>2.70$  log RNA copies/ml were stratified separately.

### **Diversity of HCV quasispecies**

The genetic diversity of HVR1 sequences and its longitudinal variation throughout pregnancy were then examined at the amino acid level using the  $p$  distance, which represents the mean number of pairwise amino acid differences in a given subset of sequences (50). Overall, mean genetic distances progressively decreased between the pregestational and postpartum period, though none of these differences were significant ( $F_{(4,61)}=0.51$ ,  $p=0.73$ , one-way ANOVA test) (Figure 3E). When pregnancies were stratified as above, the two-way ANOVA analysis revealed that the genetic distance was not significantly different between timepoints ( $F_{(4,53)}=0.24$ ,  $p=0.92$ ). As for the other parameters, the difference of genetic distance between stratified groups of patients were significant ( $F_{(2,53)}=3.45$ ,  $p=0.039$ ). Nevertheless, after the Bonferroni post hoc test for multiple comparisons, no particular difference was statistically significant (Figure 3F). Even if it is to a lesser extent, these results are in concordance with those obtained when quasispecies complexity was examined at the nucleic acid level (variant spectrum and Shannon entropy), and indicate that the differences noted between strata in terms of variant composition are also faithfully reflected in the relative breadth of HVR1 amino acid sequence diversity at each time point.

### **Analysis of intrahost selective pressure**

The HVR1 region is thought to be largely exposed at the surface of the E2 protein and its amino acid sequence is known to be subjected to selective pressure exerted by host HCV-specific immune responses (29-32). The existence, extent, and significance of intrahost selective pressure were assessed in our study group. This was done by computing the mean number of nonsynonymous (amino acid replacement) nucleic acid substitutions per nonsynonymous site (dN), the mean number of synonymous (silent) nucleic acid substitution per synonymous site (dS), and the dN/dS ratio at each time point before, during and after pregnancy. A dN/dS ratio  $> 1$  is indicative of the occurrence of positive selection for amino acid replacement. As expected, the mean dN/dS ratio computed within HVR1 (nucleotide positions 1491-1571) was significantly greater than that computed within flanking regions of E1 and E2 envelope genes (nucleotide positions 1296-1490 and 1572-1865) (1.54 +/- 1.01 and 0.32 +/- 0.16, respectively;  $p < 0.0001$ , Mann-Whitney U test). When the whole study group was considered, the median dN/dS ratio was always  $> 1$  throughout pregnancy, indicative of positive selection, and decreased progressively between the pregestational period and the 3<sup>rd</sup> trimester with a rebound at postpartum, though the differences were not statistically significant ( $p = 0.83$ , Kruskal-Wallis test) (Figure 4A). Stratification of pregnancies according to the HCV-only, treated-responder, and untreated-nonresponder criteria revealed that the dN/dS ratio was significantly different between these

three groups ( $F_{(2,52)}=4.97$ ,  $p=0.01$ , two-way ANOVA). More particularly, the ratio had a trend to higher values in HCV-only subjects than in untreated-nonresponders, and was significantly higher in treated-responders than in untreated-nonresponders in the 2<sup>nd</sup> trimester ( $p<0.05$ ) (Figure 4B). Taken together, these results indicate that HIV coinfection leads to reduced immune pressure on HVR1 (dN/dS is lower in untreated-nonresponders than HCV-only), and that this effect is reversed following antiretroviral treatment (dN/dS is highest in treated-responders). The fact that treated-responders consistently exhibited the highest dN/dS ratio as compared with either of the other strata could be related to recent induction and/or intensification of antiretroviral treatment that took place in 9 of the 11 pregnancies (81.8%) that were stratified within the treated-responder subgroup. Indeed, introduction of antiretroviral treatment and suppression of HIV-1 replication in subjects coinfecting with HCV and HIV-1 are thought to lead to re-emergence of HCV-specific immune responses and modulation of HCV quasispecies evolution (47, 54, 55).

### **Successive pregnancies**

Four of the 13 subjects coinfecting with HCV and HIV-1 in our study group (TV075, TV179, TV233, and TVC55) were followed throughout two consecutive pregnancies, offering the opportunity to observe HCV quasispecies evolution over various lengths of inter pregnancy interval (IPI). HVR1 nucleic acid

sequence diversification was assessed by phylogenetic analysis using the neighbor-joining method, based on a distance matrix assembled using the Kimura two-parameter model. In the case of TV075 and TV179, low quasispecies complexity and minimal HVR1 sequence diversification between pregnancies were observed (Figure 5). There was also extensive intermingling of variants isolated from both pregnancies, in spite of IPIs of 3241 days and 1113 days, respectively. In the case of TV179, 3 different HVR1 variants were found to be conserved between the two pregnancies, even though they were brought to term more than 3 years apart (Figure 5). Such apparent lack of diversification is consistent with relaxed intrahost selective pressure, possibly related to HIV-induced immunosuppression. In both of these subjects, patterns of HVR1 diversification were not visibly affected by introduction of antiretroviral treatment in the second pregnancy, though reduction of HIV-1 viral load  $<2.70$  log RNA copies/ml was not achieved in the case TV179 (Figure 5; Table 1).

The picture observed in subjects TV075 and TV179 is in striking contrast to that seen in TV233 and TVC55. In both of these subjects, high quasispecies complexity is observed in the initial pregnancy and maintained in the second. In the case of TV233, extensive diversification is seen, and none of the variants from the first pregnancy are found in the second one (IPI=779 days) (Figure 5). This is in spite of the fact that both pregnancies of subject TV233 were stratified as untreated-nonresponders. HVR1 diversification between

pregnancies is even more pronounced in the case of TVC55, though 5 distinct HVR1 variants are maintained across the IPI (567 days). Taken together, these results suggest that: a) high level complexity of the variant spectrum based on HVR1 is not necessarily restored by initiation of antiretroviral treatment in subjects coinfecting with HCV and HIV-1; b) extensive diversification of the HCV quasispecies based on HVR1 can take place in the presence of incomplete suppression of HIV-1 replication; and c) the level of diversification of HVR1 observed between consecutive pregnancies is incompatible with linear genetic drift during the IPI.

Key (characteristic) pathological events (decrease of AST and ALT levels; increase in HCV viral load) are observed during the 3<sup>rd</sup> trimester of pregnancy (8, 18). Likewise, significant rebound (resurgence) of transaminase levels and marked worsening of liver histopathology were both reported to take place the postpartum period (19-22). However, the actual mechanism(s) responsible for these pregnancy-specific manifestations of hepatitis C are unclear. Here we performed a longitudinal analysis of HCV quasispeciation during pregnancy. Using two different analytical approaches, modulations of the complexity of the variant spectrum were observed in pregnant women infected with HCV, with a reduction in quasispecies complexity in the 3<sup>rd</sup> trimester and a rebound in postpartum. Results of analysis of amino acid sequence diversity were consistent with these data. Finally, lowest levels of intrahost selective pressure

were likewise observed in the 3<sup>rd</sup> trimester. Because changes in quasispecies dynamics and selective pressure are largely driven by host immune responses, our results provide, for the first time, convincing albeit indirect evidence that the pathological events observed in HCV-infected women during late pregnancy are immune-mediated. Both humoral and cell-mediated immune responses are known to target HVR1 determinants (31, 56, 57), and the involvement of these two arms of antigen-specific immunity in HCV-related pathology during pregnancy will need to be directly tested. This study will lead to a better understanding of therapeutic and immune factors that influence the dynamics of HCV viral populations and the natural history of hepatitis C during and after pregnancy.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study subjects and clinical parameters**

Study subjects (n=17) were selected among participants to the Centre maternel et infantile sur le SIDA mother-child cohort (CHU mère-enfant Sainte-Justine, Montreal, Canada). Mean age at study entry was 27.9 years (range=22.2-40.7 years). In all cases, HCV infection was confirmed by ELISA and recombinant immunoblot assays, in accordance with clinical practice and diagnostic algorithms used in the Province of Quebec. Co-infection with HIV-1 was confirmed by ELISA and non-quantitative PCR in 13 of these 17 subjects, of whom four (TV075, TV179, TV233, and TVC55) were followed throughout



two consecutive pregnancies. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte counts were measured by flow cytometry. ALT and AST levels were measured on a Synchron LX20 system (Beckman Coulter, Palo Alto, California). Normal ALT and AST levels were 5-34 U/l and 11-43 U/l, respectively. Plasma HCV RNA levels were quantified using the COBAS Amplicor HCV Monitor assay version 2.0 (Roche Diagnostics, Montreal, Canada). Plasma HIV-1 RNA levels were measured using the Quantiplex HIV RNA assay (Bayer, Pittsburgh, Pennsylvania), with a detection threshold of 2.70 log (500) HIV RNA copies/ml plasma (version 2.0) or 1.70 log (50) HIV RNA copies/ml plasma (version 3.0). HCV genotyping was performed by sequence analysis of the 5' non-coding region and NS5B, as described (48). At the time of the study, all coinfecting patients were treated with antiretroviral agents for the purpose of preventing mother-to-child transmission of HIV-1, with the exception of subjects TV075 and TV179 in their initial pregnancy. First, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy were defined as 1-12, 13-28, and 29-41 weeks of gestation, respectively. Gestational age, estimated date of fertilization (EDF), and expected date of confinement (EDC) were calculated based on the self-reported date of the first day of the last normal menstrual period (LMP), when available (n=9), or from fetal biometry obtained through ultrasound examination performed before 20 weeks of gestational age (n=12). Inter-pregnancy interval (IPI) was calculated as the time from delivery to the first day of the LMP of the subsequent pregnancy (53).

### **RNA extraction, amplification and cDNA cloning**

Serum was extracted from whole blood by centrifugation and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until usage. HCV RNA was extracted from 280  $\mu\text{l}$  serum and cDNA was synthesized using the QIAamp OneStep method (QIAGEN, Mississauga, Canada). A portion of the E1 and E2 genes from HCV genotype 1 (nucleotide positions 1278-1889) was amplified by RT-PCR. The nucleotide sequence of HCV-1a (GenBank accession n<sup>o</sup> M62321) was used as reference (23). Amplification was carried out using primers E2/NS1a (5'-ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG GAT AT-3') and E2/NS1b (5'-CAC CAC CAC GGG GCT GGG AGT GAA GCA AT-3') (33). In the case of patient TVC55, primers E2/NS5aBIS (5'-GGC ATG GGA CAT GAT GAT GA-3') and E2/NS1b were used (nucleotide positions 1295-1889). In the case of subjects infected with HCV genotype 3, primers E2/NS3a (5'-TGT ACC CAG GCC ATC TTT CA-3') and E2/NS1b or E2/NS3b (5'-ATC AGT AGT GCC TAC GAC CA-3') were used (nucleotide positions 1262-1890 or 1262-1902, respectively), with the nucleotide sequence of HCV-3a serving as reference (GenBank accession n<sup>o</sup> D17763). Reverse transcription was performed at  $50^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The PCR reaction consisted of 40 cycles of denaturing at  $94^{\circ}\text{C}$  for 50 sec, annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min. PCR products were purified from agarose gels using the GFX system (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey). Amplicons were cloned between the *EcoR* I sites of pCR2.1-TOPO and

were transformed into *E. coli* TOP10-competent cells (Invitrogen, Carlsbad, California). Plasmid DNA from transformants was extracted and purified with the Perfectprep Plasmid 96 Vac Direct Bind System (Eppendorf, Hamburg, Germany). Unidirectional sequencing of recombinants was performed on a Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems, Foster City, California) using dye terminator chemistry.

### **Sequence analysis**

Chromatograms were edited manually with Chromas version 1.45 (Technelysium, Southport, Australia). Sequences were aligned using Clustal X version 1.81 (49). A mean of 18.8 cDNA clones of HVR1 and flanking regions were analyzed per time point, for an overall total of 1,337 clones representing 1,101 non redundant sequences. All genetic sequence information was submitted to GenBank (accession numbers pending). Mean genetic distance, defined as the mean of all pairwise *p* distance comparisons (*i.e.* the number of amino acid differences divided by the total number of amino acid sites compared), and its standard deviation were calculated using MEGA version 2.1 (50). The number of nonsynonymous (amino acid replacement) nucleotide substitutions per nonsynonymous site (dN), the number of synonymous (silent) nucleotide substitution per synonymous site (dS), and the dN/dS ratio were computed according to the Nei-Gojobori method with the Jukes-Cantor correction (51). Normalized Shannon entropy (*Sn*) was used to account for the

frequency of each different variants in the quasispecies and was defined as:  $S_n = -\sum(p_i \ln p_i) / \ln N$ , where  $p_i$  represents the frequency of each individual variant in the quasispecies and  $N$  is the total number of sequences analyzed. To assess diversification of viral variants, phylogenetic reconstructions were built using the neighbour-joining method and the Kimura two-parameter model, as implemented in MEGA version 2.1 (50, 52). A default transition/transversion ratio of 2 was used and 1000 bootstrap re-samplings were performed to gauge the robustness of the tree topology.

### **Statistical analysis**

Standardized data collection assessed previous and current treatment with antiretroviral agents. Categorical variables were examined using Fisher's exact test. Clinical parameters were evaluated by nonparametric Mann-Whitney U test or Wilcoxon signed rank test for paired samples, because of the non-normal distribution of data (Normality tested with Shapiro-Wilk analysis). Complexity and diversity parameters were compared using analysis of variance with Bonferroni post-hoc tests for multiple comparisons. Likewise, dN/dS ratios were evaluated by analysis of variance either by nonparametric Kruskal-Wallis test or by two factors ANOVA. Statistical analyses were performed with the SPSS (SPSS version 11.0, Chicago, IL.) and GraphPad softwares (GraphPad Prism V. 4, GraphPad Software, San Diego, California).

### **Declaration of ethical approval**

This study was carried out according to the guidelines of the Ethics Review Board of CHU mère-enfant Sainte-Justine, where the study was conducted. Informed consent was sought and obtained from all study participants. Counseling and appropriate medical care and follow-up were provided to all patients and their children.

### **REFERENCES**

1. Alter, M.J., D. Kruszon-Moran, O.V. Nainan, G.M. McQuillan, F. Gao, L.A. Moyer, R.A. Kaslow, and H.S. Margolis. 1999. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N. Engl. J. Med.* 341:556-562.
2. Shepard, C.W., L. Finelli, and M.J. Alter. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect. Dis.* 5:558-567.
3. Manns, M.P., J.G. McHutchison, S.C. Gordon, V.K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z.D. Goodman, K. Koury, M. Ling, and J.K. Albrecht. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet.* 358:958-965.
4. Fried, M.W., M.L. Shiffman, K.R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F.L. Goncales, D. Haussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman, and J. Yu. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 347:975-982.

5. Weintrub, P.S., G. Veereman-Wauters, M.J. Cowan, and M.M. Thaler. 1991. Hepatitis C virus infection in infants whose mothers took street drugs intravenously. *J. Pediatr.* 119:869-874.
6. Wesjtal, R., A. Widell, A.S. Mansson, S. Hermodsson, and G. Nokrans. 1992. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Ann. Intern. Med.* 117:887-890.
7. Zanetti, A.R., E. Tanzi, S. Paccagnini, N. Principi, G. Pizzocolo, M.L. Caccamo, E. D'Amico, G. Cambie, L. Vecchi, and the Lombardy Study Group on Vertical HCV Transmission. 1995. Mother-to-infant transmission of hepatitis C. Lombardy study group on vertical HCV transmission. *Lancet.* 345:289-291.
8. Conte, D., M. Fraquelli, D. Prati, A. Colucci, and E. Minola. 2000. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology.* 31:751-755.
9. Chang, K.M., B. Rehermann, and F.V. Chisari. 1997. Immunopathology of hepatitis C. *Springer Semin. Immunopathol.* 19:57-68.
10. Badizadegan, K., M.M. Jonas, M.J. Ott, S.P. Nelson, and A.R. Perez-Atayde. 1998. Histopathology of the liver in children with chronic hepatitis C viral infection. *Hepatology.* 28:1416-1423.

11. Cerny, A., and F.V. Chisari. 1999. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology*. 30:595-601.
12. Spengler, U., and J.K. Rockstroh. 1998. Hepatitis C in the patient with human immunodeficiency virus infection. *J. Hepatol*. 29:1023-1030.
13. Papaevangelou, V., H. Pollack, G. Rochford, R. Kokka, Z. Hou, D. Chernoff, B. Hanna, K. Krasinsky, and W. Borkowsky. 1998. Increased transmission of vertical hepatitis C virus (HCV) infection to human immunodeficiency virus (HIV)-infected infants of HIV- and HCV-coinfected women. *J. Infect. Dis*. 178:1047-1052.
14. Canobio, S., C. Guilbert, M. Troesch, J. Samson, M. Lemay, V.A. Pelletier, A.C. Bernard-Bonnin, R. Kozielski, N. Lapointe, S.R. Martin, and H. Soudeyngs. 2004. Differing patterns of liver disease progression and hepatitis C virus (HCV) quasispecies evolution in children vertically coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus type 1. *J. Clin. Microbiol*. 42:4365-4369.
15. Tovo, P.A., E. Palomba, G. Ferraris, N. Principi, E. Ruga, P. Dallacasa, and A. Maccabruni. 1997. Increased risk of maternal-infant hepatitis C virus transmission for women coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Infect. Dis*. 25:1121-1124.
16. Thomas, S.L., M.L. Newell, C.S. Peckham, A.E. Ades, and A.J. Hall. 1998. A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission: risks of

- transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. *Int. J. Epidemiol.* 27:108-117.
17. Mast, E.E., L.Y. Hwang, D.S.Y. Seto, F.S. Nolte, O.V. Nainan, H. Wurtzel, and M.J. Alter. 2005. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J. Infect. Dis.* 192:1880-1889.
  18. Gervais, A., Y. Bacq, J. Bernuau, Martinot, M., Auperin, A., Boyer, N., Kilani, A., Erlinger, S., Valla, D., and Marcellin, P. 2000. Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 32:293-299.
  19. Fontaine, H., B. Nalpas, F. Carnot, C. Brechot, and S. Pol. 2000. Effect of pregnancy on chronic hepatitis C: a case-control study. *Lancet.* 356:1328-1329.
  20. Oketani, M., T. Shibatou, K. Yamashita, T. Arima, and T. Arima. 2002. Postpartum acute exacerbation of chronic hepatitis C with complete response to interferon- $\alpha$ . *J. Gastroenterol.* 37:658-662.
  21. Jabeen, T., B. Cannon, J. Hogan, M. Crowley, C. Devereux, L. Fanning, E. Kenny-Walsh, F. Shanahan, and M.J. Whelton. 2000. Pregnancy and pregnancy outcome in hepatitis C type 1b. *Q. J. Med.* 93:597-601.
  22. Vento, S., M.S. Longhi, F. Cainelli, and E. Concia. 2001. Effect of pregnancy on chronic hepatitis C. *Lancet.* 357:389-390.



23. Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis. *Science*. 244:359-362.
24. Choo, Q.L., K.H. Richman, J.H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, A. Medina-Selby, P.J. Barr, xxx. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 88:2451-2455.
25. Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feistone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J.M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, T. Shin-I, L.J. Stuyver, H.J. Thiel, S. Viazov, A.J. Weiner, and A. Widell. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 42:962-973.
26. Bukh, J., R.H. Miller, and R.H. Purcell. 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Sem. Liv. Dis.* 15:41-63.
27. Martell, M., J.I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia, and J. Gomez. 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* 66:3225-3229.
28. Steinhauser, D.A., and J.J. Holland 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:409-433.

29. Farci, P., J. Bukh, and R.H. Purcell. 1997. The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Sem. Immunopathol.* 19:5-26.
30. Lechner, F., D.K.H. Wong, P.R. Dunbar, R. Chapman, R.T. Chung, P. Dohrenwend, G. Robbins, R. Phillips, P. Klenerman, and B.D. Walker. 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* 191:1499-1512.
31. Weiner, A.J., H.M. Geysen, C. Christopherson, J.E. Hall, T.J. Mason, G. Saracco, F. Bonino, K. Crawford, C.D. Marion, K.A. Crawford, M. Brunetto, P.J. Barr, T. Miyamura, J. McHutchinson, and M. Houghton. 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89:3468-3472.
32. Ray, S.C., L. Fanning, X.H. Wang, D.M. Netski, E. Kenny-Walsh, and D.L. Thomas. 2005. Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* 201:1753-1759.
33. Farci, P., A. Shimoda, A. Coiana, G. Diaz, G. Peddis, J.G. Melpolder, A. Strazzer, D.Y. Chien, S.J. Munoz, A. Balestrieri, R.H. Purcell, and H.J. Alter. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science.* 288:339-344.

34. Hayashi, J., N. Furusyo, I. Ariyama, Y. Sawayama, Y. Etoh, and S. Kashiwagi. 2000. A relationship between the evolution of hepatitis C virus variants, liver damage, and hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus viremia. *J. Infect. Dis.* 181:1523-1527.
35. Farci, P., R. Strazzera, H.J. Alter, S. Farci, D. Degioannis, A. Coiana, G. Peddis, F. Usai, G. Serra, L. Chessa, G. Diaz, A. Balestrieri, and R.H. Purcell. 2002. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99:3081-3086.
36. Chambers, T.J., X. Fan, D.A. Droll, E. Hembrador, T. Slater, M.W. Nickells, L.B. Dustin, and A.M. DiBisceglie. 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.
37. Polyak, S.J., S. McArdle, S.L. Liu, D.G. Sullivan, M. Chung, W.T. Hofgartner, R.L. Carithers, B.J. McMahon, J.I. Mullins, L. Corey, and D.R. Gretch. 1998. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J. Virol.* 72:4288-4296.
38. Gaud, U., B. Langer, T. Petropoulou, H.C. Tomas, and P. Karayiannis. 2003. Changes in hypervariable region 1 of the envelope 2 glycoprotein

- of hepatitis C virus in children and adults with humoral immune defects. *J. Med. Virol.* 69:350-356.
39. Manzin, A., L. Solforosi, M. Debiaggi, F. Zara, E. Tanzi, L. Romano, A.R. Zanetti, and M. Clementi. 2000. Dominant role of host selective pressure in driving hepatitis C virus evolution in perinatal infection. *J. Virol.* 74:4327-4334.
  40. Murakami, J., M. Okamoto, H. Miyata, I. Nagata, K. Shiraki, and S. Hino. 2000. Evolution in the hypervariable region of hepatitis C virus in infants after vertical transmission. *Pediatr. Res.* 48:450-456.
  41. Rapicetta, M., C. Argentini, E. Spada, S. Dettori, M.P. Riccardi, and M. Toti. 2000. Molecular evolution of HCV genotype 2c persistent infection following mother-to-infant transmission. *Arch. Virol.* 145:965-977.
  42. Sitia, G., D. Cella, M.S. De Mitri, R. Novati, C.U. Foppa, K. Perackis, C. Bianchi, A. Lazzarin, and G. Morsica. 2001. Evolution of the E2 region of hepatitis C virus in an infant infected by mother-to-infant transmission. *J. Med. Virol.* 64:476-481.
  43. Sherman, K.E., C. Andreatta, J. O'Brien, A. Gutierrez, and R. Harris. 1996. Hepatitis C in human immunodeficiency virus-coinfected patients: increased variability in the hypervariable envelope coding domain. *Hepatology.* 23:688-694.
  44. Mao, Q., S.C. Ray, O. Laeyendecker, J.R. Ticehurst, S.A. Strathdee, D. Vlahov, and D.L. Thomas. 2001. Human immunodeficiency virus

- seroconversion and evolution of hepatitis C virus quasispecies. *J. Virol.* 75:3259-3267.
45. Roque-Afonso, A.M., M. Robain, D. Simoneau, P. Rodriguez-Mathieu, M. Gigou, L. Meyer, and E. Dussaix. 2002. Influence of CD4 cell counts on the genetic heterogeneity of hepatitis C virus in patients coinfecting with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 185:728-733.
  46. Toyoda, H., Y. Fukuda, Y. Koyama, J. Takamatsu, H. Saito, and T. Hayakawa. 1997. Effect of immunosuppression on composition of quasispecies population of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C coinfecting with human immunodeficiency virus. *J. Hepatol.* 26:975-982.
  47. Babik, J.M., and M. Holodniy. 2003. Impact of highly active antiretroviral therapy and immunologic status on hepatitis C virus quasispecies diversity in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus-coinfecting patients. *J. Virol.* 77:1940-1950.
  48. Bernier, L., B. Willems, G. Delage, and D.G. Murphy. 1996. Identification of numerous hepatitis C virus genotypes in Montreal, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 34:2815-2818.
  49. Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 24:4876-4882.

50. Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. 17:1244-1245.
51. Nei, M., and T. Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3:418-426.
52. Leitner, T., D. Escanilla, C. Franzen, M. Uhlen, and J. Albert. 1996. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:10864-10869.
53. Nguyen, R.H.N., and A. Wilcox. 2005. Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms. *J. Epidemiol. Community Health*. 59:1019-1021.
54. Puoti, M., C. Torti, D. Ripamonti, F. Castelli, S. Zaltron, B. Zanini, A. Spinetti, V. Putzolu, S. Casari, L. Tomasoni, E. Quiros-Roldan, M. Favret, L. Berchich, P. Grigolato, F. Callea, G. Carosi, and the HIV-HCV Co-Infection Study Group. 2003. Severe hepatotoxicity during combination antiretroviral treatment: incidence, liver histology, and outcome. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 32:259-267.
55. John, M., J. Flexman, and M.A. French. 1998. Hepatitis C virus-associated hepatitis following treatment of HIV-infected patients with HIV protease inhibitors: an immune restoration disease? *AIDS* 12:2289-2293.

56. Shirai, M., T. Arichi, M. Chen, T. Masaki, M. Nishioka, K. Ikeda, H. Takahashi, N. Enomoto, T. Saito, M.E. Major, T. Nakazawa, T. Akatsuka, S.M. Feinstone, and J.A. Berzofsky. 1999. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J. Immunol.* 162:568-576.
57. Dutoit, V., D. Ciuffreda, D. Comte, J.J. Gonvers, and G. Pantaleo. 2005. Differences in HCV-specific T cell responses between chronic HCV infection and HIV/HCV co-infection. *Eur. J. Immunol.* 35:3493-3504.

### **LEGENDS TO FIGURES**

**Figure 1. Alanine aminotransferase levels, HCV viral load and HIV viral load in study participants.** A. ALT levels and HCV viral loads were measured as described under Materials and Methods. Error bars represent interquartile range. Open squares: HCV viral load. Open triangles: ALT levels. B. HCV viral load was determined by quantitative PCR as described under Materials and Methods. Error bars represent interquartile range. Open bars: subjects infected with HCV only. Hatched bars: subjects coinfecting with HCV and HIV-1. Asterisks indicate significant differences at the  $p < 0.05$  level.

**Figure 2. Longitudinal analysis of HCV quasispecies complexity in study participants.** HCV hypervariable region 1 (HVR1) and flanking regions were amplified, subcloned, and their nucleic acid sequence was determined as described under Materials and Methods. Each color represents one identical HVR1 variant in inpatient but not in interpatient analysis. Closed circles: subjects infected with HCV only. Closed diamonds: subjects coinfecting with HCV and HIV-1 untreated. Closed squares: subjects coinfecting with HCV and HIV-1 and treated with antiretroviral therapy. Red arrows indicate introduction of antiretroviral therapy during pregnancy.

**Figure 3. Analysis of HCV quasispecies complexity and diversity during pregnancy in subjects infected with HCV or coinfecting with HCV and**



**HIV-1.** HCV hypervariable region 1 (HVR1) and flanking regions were amplified, subcloned, and their nucleic acid sequence was determined as described under Materials and Methods. A. Mean numbers of HVR1 variants per time point in the entire study group. B. Mean numbers of HVR1 variants per time point with study group stratified as HCV-only (open bars), treated-responders (horizontal hatch), and untreated-nonresponders (diagonal hatch). C. Shannon entropy of the variant distribution in the entire study group. D. Shannon entropy of the variant distribution with study group stratified as HCV-only (open bars), treated-responders (horizontal hatch), and untreated-nonresponders (diagonal hatch). E. Mean genetic (p) distance per time point in the entire study group. F. Mean genetic (p) distance per time point with study group stratified as HCV-only (open bars), treated-responders (horizontal hatch), and untreated-nonresponders (diagonal hatch). Error bars represent standard error of the mean. Asterisks indicate significant differences at the  $p < 0.05$  level.

**Figure 4. Analysis of dN/dS ratio in HVR1 variants during pregnancy in subjects infected with HCV or coinfecting with HCV and HIV-1.** A. dN/dS ratio in HVR1 variants per time point in each studied patient. B. dN/dS ratio in HVR1 variants per time point with study group stratified as HCV-only (open triangles), treated-responders (open circles), and untreated-nonresponders (open squares). Asterisks indicate significant differences at the  $p < 0.05$  level.

**Figure 5. Phylogenetic analysis on consecutive pregnancies in women coinfecting with HCV and HIV-1.** HVR1 variants within each timepoint (A=Trim.1, B=Trim.2, C=Trim.3, D=postpartum, E=pregestational) were computed to assess sequence diversification, with a reference sequence TV356 (GenBank accession n° AY385797) A. Subjects treated with antiretroviral therapy during the 2<sup>nd</sup> but not the 1<sup>st</sup> pregnancy. B. Subjects treated with antiretroviral therapy during both pregnancies. Inter pregnancy intervals (IPI) were 3241 days (A1), 1113 days (A2), 779 days (B1), and 567 days (B2). Variants from the 1<sup>st</sup> pregnancy are indicated with open circles, from the 2<sup>nd</sup> pregnancy with open triangles, shared in both pregnancies with open squares.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Martine Caty, Silvie Valois, and Ampha Khammy for expert technical assistance; Marc-André Rodrigue and Julie Lacaille for automated DNA sequencing; and Donald G. Murphy and Edgard Delvin for determination of HCV viral load and transaminase levels in study subjects. Supported by grants from the CIHR-Health Canada Research Initiative on Hepatitis C (grant n° EOP-41537), CANFAR-Canadian Foundation for AIDS Research (grant n° 013515), and The Elizabeth Glaser Pediatric AIDS Foundation (grant n° 28-PG-51355). M.T. was the recipient of a scholarship from Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine. H.S. is a Junior-II Scientist of le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

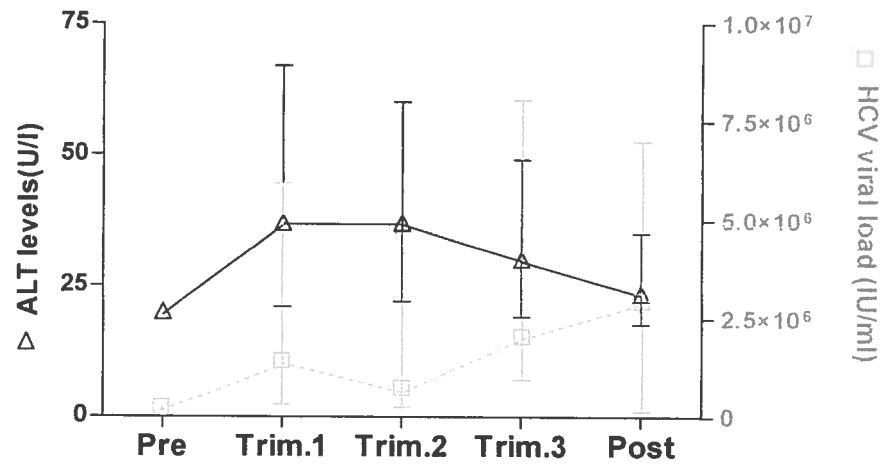
**TABLE 1.** Clinical characteristics of study participants.

Subjects	Age (yrs) <sup>1</sup>	HIV	HCV genotype	CD4 count (cells/ $\mu$ l) <sup>2</sup>	CD8 count (cells/ $\mu$ l) <sup>2</sup>	MTCT of HCV	MTCT of HIV-1	Antiretroviral treatment (n° of agents)
TVC57	23.2	-	1a	na	na	no	na	na
TVC67	24.0	-	1a	na	na	no	na	na
TVC75	40.7	-	1b	na	na	no	na	na
TVC79	23.6	-	1a	na	na	yes	na	na
TV075a <sup>3</sup>	23.8	+	1a	569	431	no	no	none
TV075b	34.4	+	1a	704	672	yes	no	AZT/3TC
TV179a	22.6	+	1b	443	640	no	no	none <sup>4</sup>
TV179b	26.7	+	1b	204	258	no	no	AZT <sup>4</sup>
TV233a	22.8	+	1b	694	1102	no	no	AZT <sup>4</sup>
TV233b	25.5	+	1b	564	1166	no	no	AZT/3TC/SQV <sup>4</sup>
TV289	33.2	+	1b	457	721	no	no	AZT <sup>4</sup>
TV453	28.4	+	3a	198	540	no	no	AZT/3TC
TV519	24.0	+	1b	858	946	no	no	d4T/3TC
TV531	24.0	+	1a	416	800	no	no	AZT/3TC
TVC17	25.6	+	1a	144	504	no	no	AZT/3TC/NFV
TVC33	35.0	+	1a	820	780	no	no	AZT/3TC/NFV
TVC45	36.7	+	3a	434	574	no	no	AZT/3TC/NVP
TVC55a	31.2	+	1a	377	611	yes	no	AZT/3TC/NFV
TVC55b	34.2	+	1a	528	816	no	no	AZT/3TC/NFV
TVC59	22.2	+	1a	nt	nt	no	no	AZT/3TC/ABC
TVC73	32.9	+	3a	1287	1122	no	no	d4T/3TC/NVP

HCV genotype, CD4 and CD8 T lymphocyte counts were determined as described under Materials and Methods. <sup>1</sup>Calculated at the time point closest to the beginning of pregnancy, determined as described under Materials and Methods. <sup>2</sup>Measured at the time point closest to the beginning of pregnancy. <sup>3</sup>a or b in patient identifier denotes first and second pregnancy, respectively. <sup>4</sup>Subjects who did not achieve an HIV-1 viral load < 2.70 log (500) RNA copies/ml plasma in the 3<sup>d</sup> trimester of gestation. AZT: zidovudine; 3TC: lamivudine; SQV: saquinavir; d4T: stavudine; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapine; ABC: abacavir. na: not applicable. nt: not tested.

Figure 1

A



B

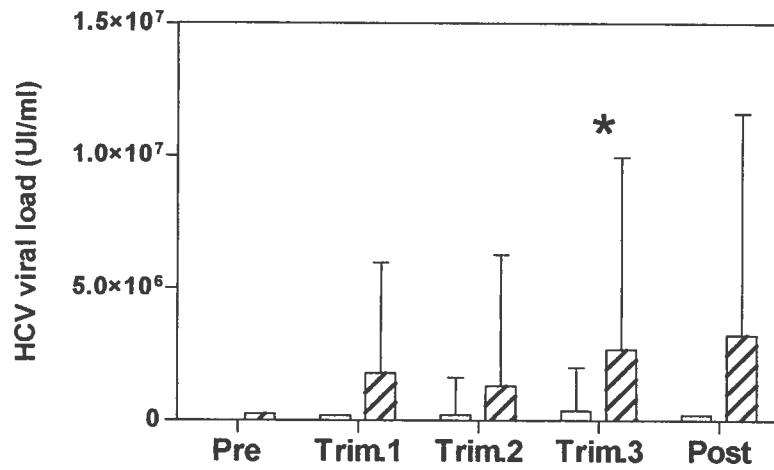


Figure 2

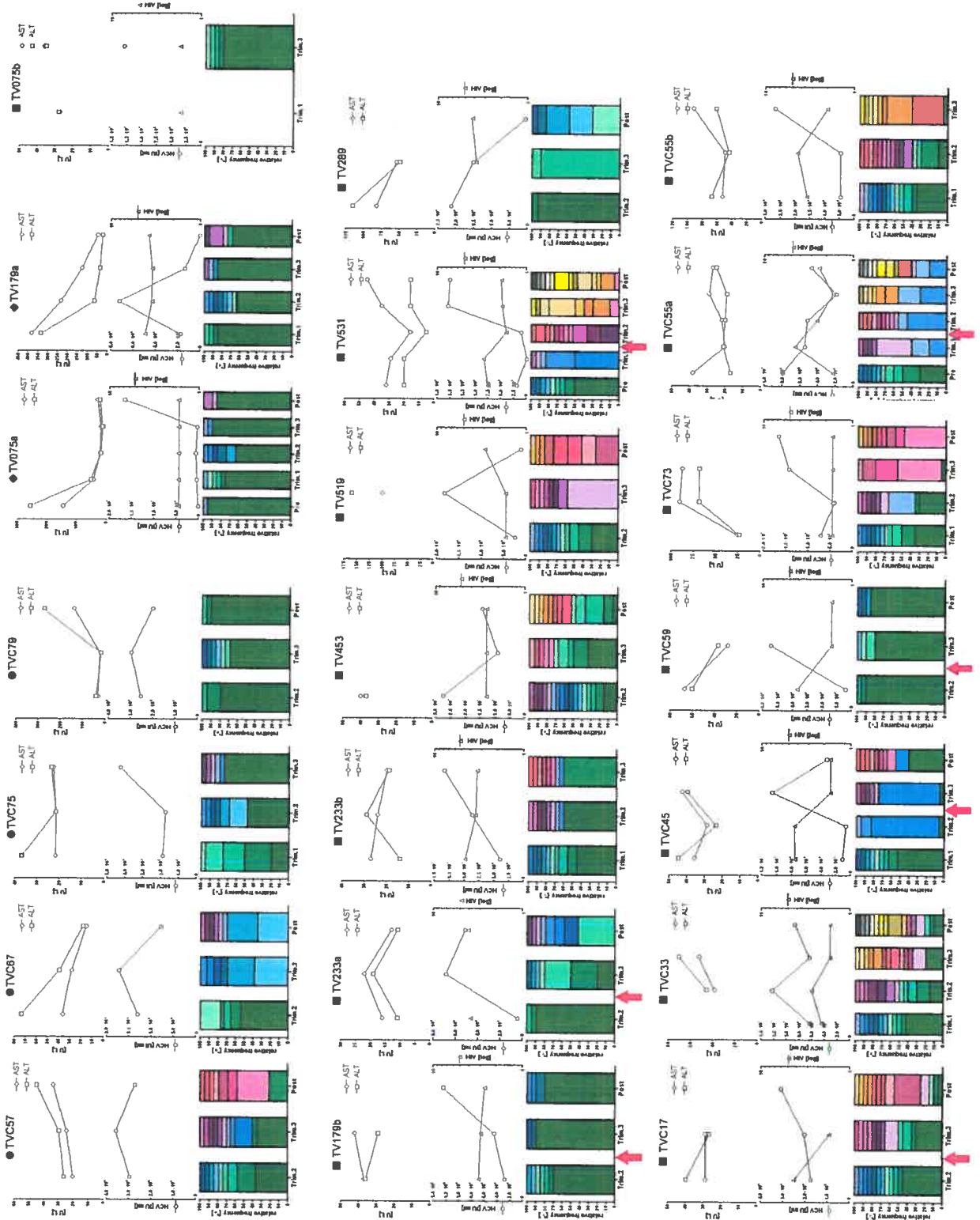


Figure 3

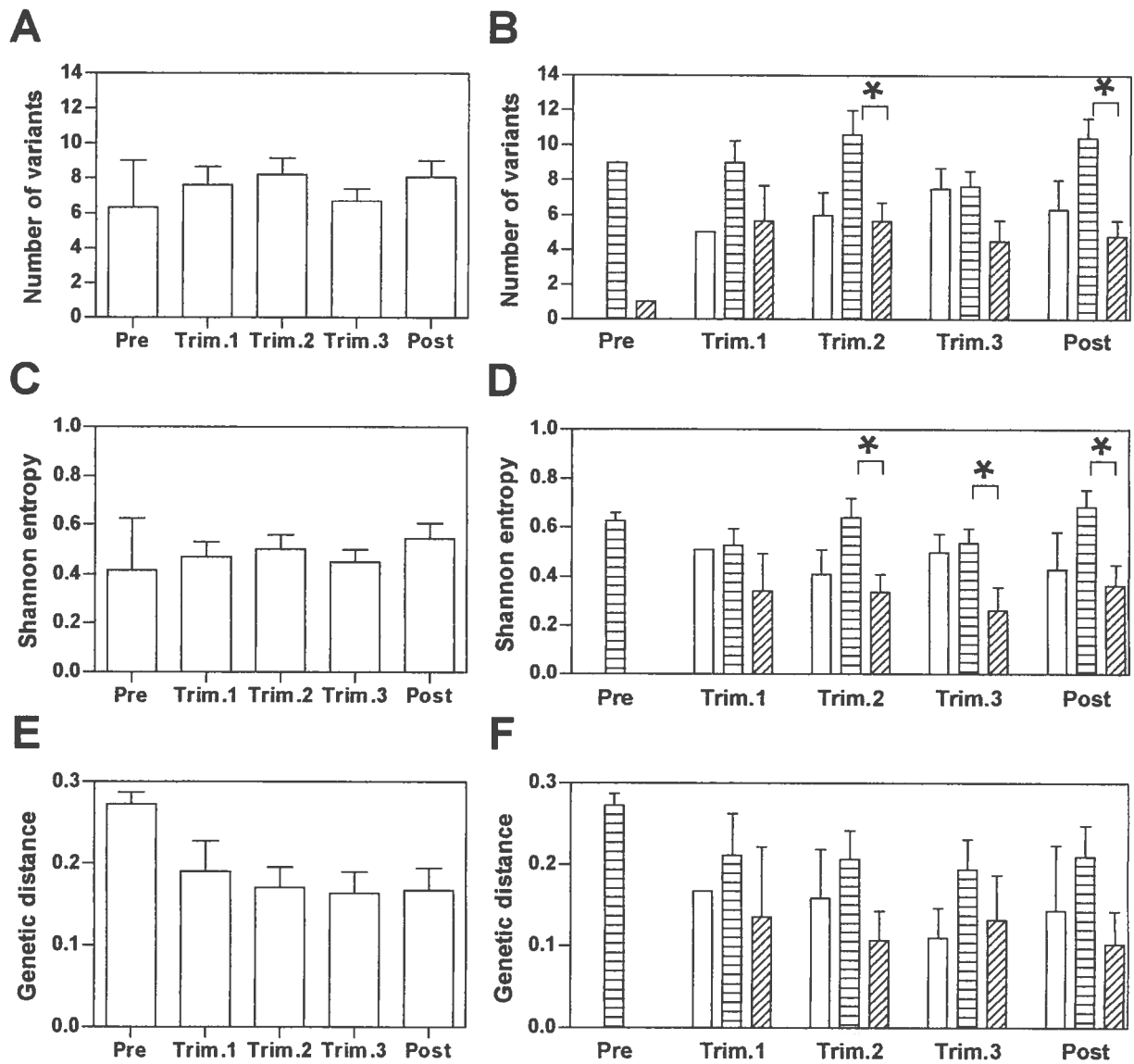
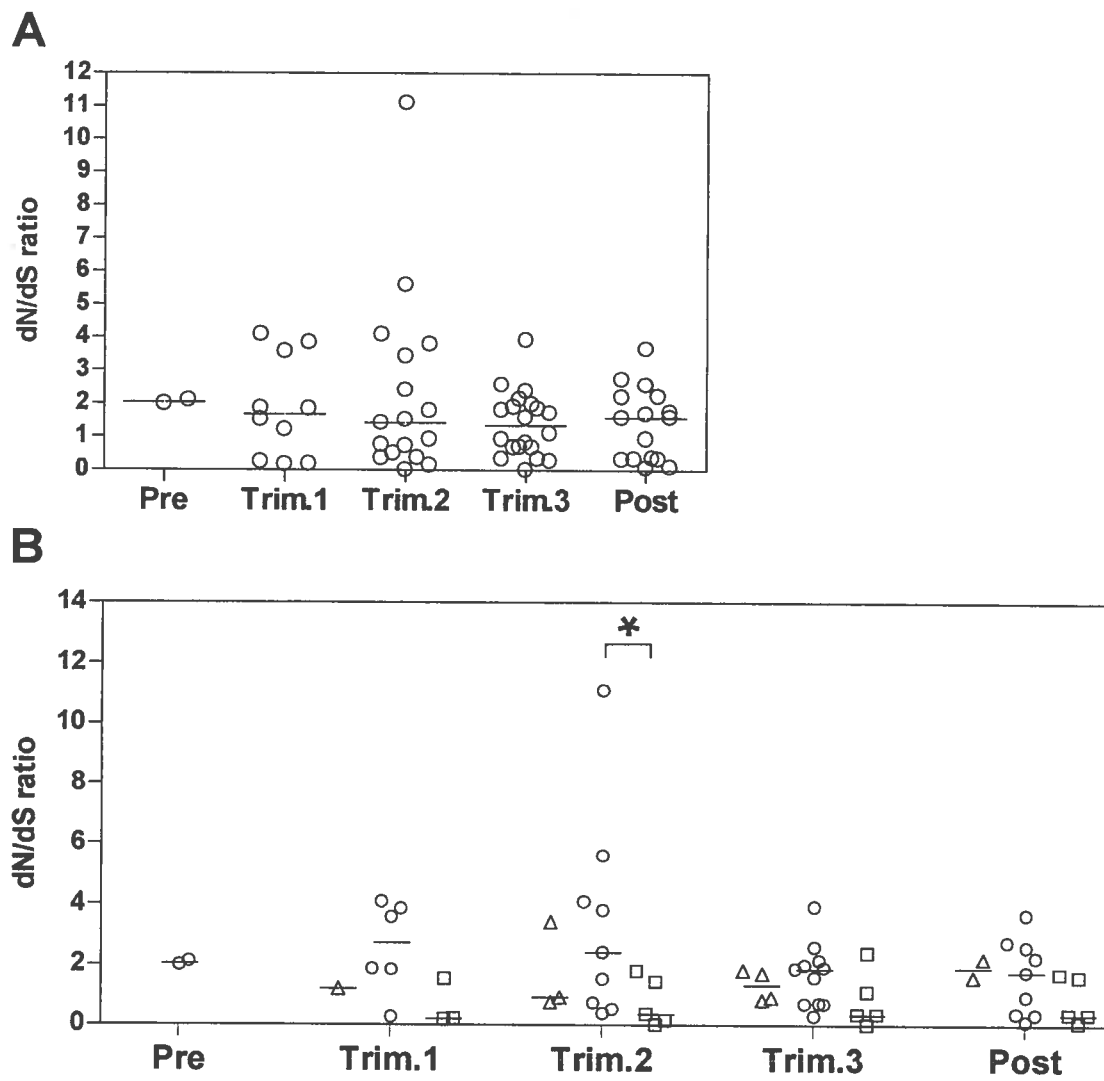


Figure 4







## **Article 3**

**STUDY OF A NOVEL HYPERVARIABLE REGION IN HEPATITIS C VIRUS  
(HCV) E2 ENVELOPE GLYCOPROTEIN**

Myriam Troesch<sup>1,4</sup>, Isabelle Meunier<sup>1,4,§</sup>, Pascal Lapierre<sup>2,5</sup>, Normand Lapointe<sup>3,6</sup>, Fernando Alvarez<sup>2,6</sup>, Marc Boucher<sup>3,7</sup>, and Hugo Soudeyns<sup>1,4,6\*</sup>. <sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale, <sup>2</sup>Service de gastroentérologie, hépatologie et nutrition, and <sup>3</sup>Centre maternel et infantile sur le SIDA, Centre de recherche du CHU mère-enfant Sainte-Justine; Departments of <sup>4</sup>Microbiology and Immunology, <sup>5</sup>Biomedical Sciences, <sup>6</sup>Pediatrics, and <sup>7</sup>Gynecology and Obstetrics, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. <sup>§</sup>Present address: INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada.

\*To whom correspondence should be addressed at: Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU mère-enfant Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, room 6735, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada. Tel.: (514) 345-4931 ext. 3907. Fax: (514) 345-4794. e-mail: [REDACTED]

**Running title:** New variable region in HCV E2.

**Word count:** 5,323 words (excluding references); 7,433 words (including references).

**Word count (abstract):** 148 words.

**Key words:** Hepatitis C virus; quasispecies; envelope; positive selection; molecular modeling.

**ABSTRACT**

A large share of hepatitis C virus amino acid sequence variation is concentrated within two hypervariable regions located at the N-terminus of the E2 envelope glycoprotein (HVR1 and HVR2). Interhost and intrahost comparison of 391 E2 sequences derived from 17 subjects infected with HCV using amino acid entropy revealed clustering of amino acid variability at a third site (residues 431-466), which was termed HVR3. Genetic distance analysis supported the division of HVR3 into three subdomains (HVR3a, HVR3b, and HVR3c). Study of synonymous and nonsynonymous nucleic acid substitutions confirmed that HVR3a and HVR3c were subjected to strong intrahost selective pressure. Physicochemical and antigenicity predictions, conservation of key residues, and molecular modeling were concordant with one another, and further validated the proposed organisation of HVR3. Taken together, these results suggest a role for HVR3 in cell surface receptor binding and viral entry akin to that proposed for HVR1 and HVR2.

## INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is an enveloped RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family (Choo et al., 1989, 1991). Despite the fact that some infected individuals are able to clear the virus, more than 80% become chronically infected and may develop liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Saito et al., 1990; Alter et al., 1992; Bach et al., 1992). Hepatitis C is a leading cause of liver transplantation and represents a continuing public health concern. There is currently no vaccine to prevent HCV infection.

As a result of common modes of transmission, the global prevalence of HCV infection among human immunodeficiency virus type (HIV-1)-infected subjects ranges between 30 and 50%, with rates of coinfection as high as 90% in intravenous drug users and almost 100% in patients with haemophilia (Dieterich, 1999; Dodig and Tavill, 2001). Several studies have shown that coinfection with HCV and HIV-1 adversely affects liver fibrosis, HCV viral load, and progression of HCV disease (Soriano, 1999; Bonacini and Puoti, 2000; Benhamou et al., 2001).

The high genetic variability of HCV contributes to the chronicity of hepatitis C. Based on nucleotide sequence analysis, HCV was classified into 6 genotypes and a series of subtypes (Simmonds et al., 1993, 2005). Moreover, in individual subjects, HCV is present as a dynamic population of distinct but closely related variants designated quasispecies (Martell et al., 1992; Bukh et al., 1995). HCV quasispecies evolution is influenced mainly by: a) the high production rate of viral particles; b) the lack of error correction mechanisms by viral RNA-dependent RNA polymerase; and c) selective pressure exerted by host immune

responses. The HCV E2 viral envelope glycoprotein is a preferred target for humoral (Weiner et al., 1992; Kato et al., 1993) and cell-mediated immune responses (Shirai et al., 1999). Not surprisingly, a large share of HCV sequence variation is concentrated within the hypervariable regions of E2, including hypervariable region 1 (HVR1), a sequence of 27 amino acids located at the N-terminus of the protein (Weiner et al., 1991; Kato et al., 1992). The conservation of overall conformation and positively charged amino acid residues at specific positions of HVR1 are consistent with a role in target cell recognition and virus attachment (Penin et al., 2001). HVR1 exhibits the highest degree of intersequence variability in the HCV genome and constitute a practical model for the study of quasispeciation and host selective pressure. Quasispecies dynamics based on HVR1 are indicative of outcomes such as spontaneous viral clearance (Farci et al., 2000; Chen and Wang, 2005), response to interferon treatment (Farci et al., 2002; Gaudy et al., 2003; Abbate et al., 2004), and HCV-associated liver histopathology (Honda et al., 1994; Gonzalez-Peralta et al., 1996). The second hypervariable region of E2, HVR2, consists of 9 amino acids located downstream of HVR1 (Kato et al., 1992). In this case, structure predictions are consistent with a potential involvement in cell surface receptor binding (Yagnik et al., 2000). Here, we report on the identification of an additional highly variable region in HCV glycoprotein E2, which we termed HVR3. Quasispecies diversity was studied in order to determine whether HVR3 was potentially subjected to selective pressure exerted by host HCV specific immunity, and the physicochemical and structural

characteristics of this region were evaluated to gain insights into its possible functional roles.



## **MATERIALS AND METHODS**

**Patients and clinical parameters.** Study subjects (n=17) were selected among participants to the Centre maternel et infantile sur le SIDA mother-child cohort (CHU mère-enfant Sainte-Justine, Montreal, Canada) and were previously enrolled in a study of immune responses and HCV quasispecies evolution during pregnancy (Troesch et al., unpublished). This research protocol was approved by the Ethics Review Board of CHU mère-enfant Sainte-Justine, Montreal, Canada, where the study was conducted. All patients and their children were provided with medical care and counseling required by their condition. Mean age at study entry was 27.9 years (range=22.2-40.7 years). Four of the subjects were infected with HCV only and 13 were coinfecting with HCV and HIV-1, as determined using standard diagnostic algorithms routinely applied in the Province of Quebec. At the time of the study, all coinfecting patients were treated with combination antiretroviral therapy for the purpose of preventing mother-to-child transmission of HIV-1, with the exception of subjects TV075 and TV179. In coinfecting subjects, mean CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte counts, measured by flow cytometry, were 544 cells per mm<sup>3</sup> (range=144-1287 cells per mm<sup>3</sup>) and 731 cells per mm<sup>3</sup> (range=431-1122 cells per mm<sup>3</sup>), respectively. Serum was extracted from whole blood by centrifugation and kept at -80°C until used. HCV genotyping was performed by sequence analysis of the 5' non-coding region and NS5B, as described (Murphy et al., 1994).

**RNA extraction, RT-PCR, cDNA cloning and sequencing.** RNA was extracted from 280  $\mu$ l serum according to the QIAamp Viral RNA protocol and cDNA was synthesized using the OneStep RT-PCR method (QIAGEN, Mississauga, Canada). A portion of the E1 and E2 genes from HCV genotype 1 (nucleotide positions 1278-1889) was amplified by RT-PCR, with the nucleotide sequence of HCV-1a used as reference (GenBank accession no. M62321). Amplification was carried out using primers E2/NS1a (5'-ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG GAT AT-3') and E2/NS1b (5'-CAC CAC CAC GGG GCT GGG AGT GAA GCA AT-3') (Farci et al., 2000). In the case of patient TVC55, primers E2/NS5aBIS (5'-GGC ATG GGA CAT GAT GAT GA-3') and E2/NS1b were used (nucleotide positions 1295-1889). In the case of subjects infected with HCV genotype 3, primers E2/NS3a (5'-TGT ACC CAG GCC ATC TTT CA-3') and E2/NS1b or E2/NS3b (5'-ATC AGT AGT GCC TAC GAC CA-3') were used (nucleotide positions 1262-1890 or 1262-1902, respectively), with the nucleotide sequence of HCV-3a serving as reference (GenBank accession no. D17763). Reverse transcription was performed at 50°C for 30 min. The PCR reaction consisted of 40 cycles of denaturing at 94°C for 50 sec, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. PCR products were purified from agarose gels using the GFX system (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey). Amplicons were cloned between the twin *EcoR* I sites of pCR2.1-TOPO and were transformed into *E. coli* TOP10-competent cells (Invitrogen, Carlsbad, California). Plasmid DNA from transformants was extracted and purified with the Perfectprep Plasmid 96 Vac Direct Bind System (Eppendorf, Hamburg, Germany). Unidirectional sequencing of recombinants was

performed on a Genetic Analyser 3100 (Applied Biosystems, Foster City, California) using dye terminator chemistry.

**Sequence analysis.** Chromatograms were edited manually (Chromas version 1.45, Technelysium, Southport, Australia). All nucleotide sequences were submitted to GenBank (accession numbers pending). Sequence alignments were visualized, compared, and edited using ClustalX version 1.81 (Thompson et al., 1997). Variability at each amino acid position was calculated as the entropy, defined as  $-\sum P(s_i)\log P(s_i)$ , where  $P(s_i)$  is the probability of a given amino acid (s) appearing at a given position (i). Entropy was computed and consensus amino acid sequence was determined using the Entropy-ONE webtool (<http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/ENTROPY>) (Korber et al., 1994). Mean genetic distance, defined as the mean of all pairwise  $p$  distance comparisons (number of amino acid differences divided by the total number of amino acid sites compared), and its standard deviation were calculated using MEGA version 2.1 (Kumar et al., 2001). The number of nonsynonymous (amino acid replacement) nucleotide substitutions per nonsynonymous site (dN), the number of synonymous (silent) nucleotide substitution per synonymous site (dS), and the dN/dS ratio were computed according to the Nei-Gojobori method with the Jukes-Cantor correction (Nei and Gojobori, 1986). The significance of positive selection was determined using analysis of variance (Z-test), as implemented in MEGA 2.1 (Kumar et al., 2001).

**Molecular modeling of HCV E2 glycoprotein.** The model of E2 was generated essentially as described by Yagnik and coworkers (Yagnik et al., 2000). Briefly, secondary structure predictions were used to align HCV E2 with the sequence of the E envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus (TBEV). The alignment generated was used to model the E2 protein using the structure of the TBEV E protein (PDB code 1SVB; Rey et al., 1995) and the MODELLER program (Sali and Blundell, 1993). Energy minimization of the resulting model was then performed using 100 steps of the Steepest Descents algorithm with the Consistent Valence Force Field (CVFF) (Dauber-Osguthorpe et al., 1988). The protein structure was analyzed with the Swiss PDB Viewer 3.7 program (Guex and Peitsch, 1997), and the final images were rendered using POVRAY version 3.5.

## **RESULTS**

### **Identification and characterization of HVR3**

HCV E1 and E2 envelope gene sequences were amplified starting with serum samples obtained from 17 pregnant women infected with HCV, including 14 who were co-infected with HCV and HIV-1. Nine patients were infected with HCV genotype 1a, 5 with HCV genotype 1b, and 3 with HCV genotype 3a. Four women were studied throughout two consecutive pregnancies. A total of 1,337 nucleic acid sequences (570-576 nucleotides) were obtained, including 1,101 that were non-redundant, representing a mean of 78.7 sequences per patient (range=52-147). Nucleotide sequences were edited and translated, spanning amino acid positions 319-508 of the HCV-1a reference sequence (GenBank accession no. M62321), and corresponding to the 65 C-terminal amino acid residues of E1 and the 125 N-terminal amino acid residues of E2 (E1/128-E2/125).

First, for the purposes of estimating amino acid sequence diversity, a dataset comprised of all 391 non-redundant E1-E2 sequences derived from third trimester samples from all patients was assembled, representing a mean of 23 sequences per patient (range=17-38). Therefore, this dataset simultaneously sampled roughly equivalent contributions from both intrahost and interhost E1-E2 amino acid sequence diversity. Amino acid sequences were aligned, and the entropy or variability at each amino acid position of the alignment was determined (Figure 1). The entropy profile revealed that amino acid variability was not uniformly distributed across the amplified E1-E2 segments, with visually discernible

clusters of amino acid sequence diversity. The first cluster (amino acid positions 384-410) was well-defined and corresponded to the 27 amino acids of HVR1 (Weiner et al., 1991), while a second cluster, further downstream (amino acid positions 474-482) corresponded to HVR2 (Kato et al., 1992). Interestingly, a third cluster of amino acid variability was readily delineated, spanning amino acid positions 431-466, in between HVR1 and HVR2 (Figure 1). For the purpose of the present study, we termed this region HVR3. Based on empirical judgment, HVR3 was further subdivided into two regions of roughly equal size, which were termed HVR3a (amino acid positions 431-449) and HVR3b (amino acid positions 450-466). The overall entropy profile was not affected by removal from the alignment of all HCV-3a sequences (n=58; subjects TV453, TVC45, and TVC73) and/or all sequences from patient TV531 (n=17), who respectively exhibited a 1 and 2 amino acid insertion between positions 476 and 477 (data not shown). Likewise, comparable amino acid entropy profiles were obtained when analysis was performed with a) additional subsamples from the complete 1,337 sequence dataset (Troesch et al., unpublished); or b) a set of 158 full-length genomic HCV sequences comprising all known HCV subtypes (data not shown) (<http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/>; Kuiken et al., 2005).

To test relative amino acid sequence variability, genetic distances were estimated within each of these domains and subdomains (Table 1). As expected, highest variability was observed at the positions corresponding to HVR1 and HVR2. Mean genetic distance was lower in HVR3 (431-466) than in HVR1 or HVR2, but higher than that obtained when the

complete E1/128-E2/125 segment was analyzed (Table 1). Within HVR3, the HVR3b subdomain was comparatively more genetically variable than HVR3a or than the whole of HVR3. Additional truncation of the HVR3b subdomain into HVR3c (amino acid positions 456-466) circumscribed a region of high sequence diversity, with a mean genetic distance of  $0.430 \pm 0.064$  (Figure 1). These values represented 84.5% and 79.5% of the mean genetic distances measured within HVR1 and HVR2, respectively, and 170% of the mean variability observed in the complete E1/128-E2/125 region (Table 1). Again, none of these estimates was adversely affected by exclusion of all HCV-3a sequences and/or sequences from patient TV531, and all were comparable to those obtained using sets of HCV sequences retrieved from the Los Alamos database (data not shown) (Kuiken et al., 2005).

### **Intrahost selective pressure**

Next, the presence and extent of intrahost selective pressure exerted on HCV E2 sequences were examined within gene segments encoding the HVR1, HVR2, HVR3, HVR3a, HVR3b, and HVR3c subdomains, which showed the highest amino acid variability when initial interhost comparisons were performed (Table 1). To do this, datasets comprised of nucleic acid sequences derived from longitudinal samples obtained from each patient throughout the three trimesters of pregnancy were assembled. The ratio of the mean number of non-synonymous substitutions per non-synonymous site over the mean number of synonymous substitutions per synonymous site (dN/dS) was then computed within the above-mentioned E1-E2 subdomains, with a dN/dS ratio  $> 1$  taken as an index of positive

selection for specific amino acid residues (Nei and Gojobori, 1986; Kumar et al., 2005). As expected, median dN/dS ratio for HVR1 (2.391) was higher than that of all other subregions analyzed ( $p=0.0002$ , Kruskal Wallis test) (Table 2). Thirteen of 17 HCV-infected subjects tested (76.5%) had a dN/dS ratio  $> 1$  in HVR1, with 10 of 17 cases (58.8%) exhibiting statistically significant positive selection in analysis of variance ( $p<0.10$ , Z test). These two proportions were significantly higher than those observed in the 5 other subregions examined ( $p<0.02$  and  $p<0.01$ , respectively, Fisher's exact test), and are consistent with the established role of HVR1 as one of the principal foci of intrahost immune selective pressure (Weiner et al., 1991; Kato et al., 1992; Farci et al., 2000, 2002; Canobio et al., 2004).

Within the E1-E2 region examined, HVR3a (residues 431-449) was the second most highly selected subdomain after HVR1. Indeed, the median dN/dS ratio was significantly higher in HVR3a (median=0.719) than in HVR3 (median=0.461) ( $p=0.0395$ , Mann-Whitney U test) and HVR3b (median=0.204) ( $p=0.0072$ ), and was higher in HVR3a than in HVR2 (median=0.227) and HVR3c (median=0.246), trending towards a statistical significance in both cases ( $p=0.0608$  and  $p=0.0649$ , respectively) (Table 2). In 6 of 17 subjects (35.3%), the dN/dS ratio was greater than 1 in HVR3a, a significantly higher proportion than that observed in HVR3 ( $p=0.0427$ , Fisher's exact test) and HVR3b ( $p=0.0427$ ), and higher than that observed in HVR2 and HVR3c though not significantly so ( $p=0.112$  and  $p=0.219$ , respectively) (Table 2). In addition, 2 of 17 subjects (11.8%) exhibited significant positive



selection in HVR3a (TV233 and TVC17) (Table 2). However, that particular proportion was not significantly greater than that observed with HVR2 ( $p=0.500$ , Fisher's exact test), HVR3 ( $p=0.240$ ), HVR3b ( $p=0.240$ ), and HVR3c ( $p=0.500$ ). The least selected subregion was HVR3b, with a median dN/dS ratio of 0.204, significantly lower than that computed in HVR3 ( $p=0.0096$ , Mann-Whitney U test). There were no other significant differences between HVR2, HVR3, HVR3b, and HVR3c in terms of a) median dN/dS ratio ( $p=0.196$ , Kruskal-Wallis test); b) proportion of subjects with a dN/dS ratio  $> 1$  ( $p>0.301$ , Fisher's exact test); or c) proportion of subjects exhibiting significant positive selection as determined by analysis of variance ( $p>0.500$ , Fisher's exact test). Overall, this observed hierarchy in subdomain selection provides experimental support for the amino acid entropy and genetic distance-based clustering strategy initially used to define HVR3, HVR3a, HVR3b, and HVR3c (see above, Figure 1, and Table 1).

Interestingly, linear regression analysis revealed a statistically significant relationship between the dN/dS ratios computed in HVR1 and those in HVR3 ( $r^2=0.467$ ,  $p=0.0025$ ) and HVR3a ( $r^2=0.360$ ,  $p=0.0105$ ). Similar relationships were noted between the dN/dS ratios computed in HVR3 and those in HVR3a ( $r^2=0.665$ ,  $p<0.0001$ ) and HVR3c ( $r^2=0.292$ ,  $p=0.0252$ ), which was not entirely unexpected since these segments constitute nested subregions (Figure 1). However, there were no such significant relationships observed that involved either HVR2 or HVR3b. These results suggest that the selective forces that shape the amino acid sequences of HVR1, HVR3a, and HVR3c act in a similar and/or

synchronous manner on all three subregions, lending additional credence to the clustering approach initially used to define the various HVR3 subdomains. In contrast, the selective forces that drive genetic diversification in HVR2 and HVR3b would appear to function according to different rules.

### **Influence of HCV subtype and coinfection with HIV-1**

Three subjects in our study group (TV453, TVC45, and TCV73) were infected with HCV-3a, a subtype that not only displays marked amino acid sequence dissimilarity as compared with HCV-1a and HCV-1b, but also exhibits variant biological properties in terms of pathogenesis and of resistance to interferon treatment (Pawlotsky, 2000; Rubbia-Brandt et al., 2001). For these reasons, intrahost selective pressure was examined separately in these subjects. Within HVR1, 2 of 3 subjects (66.6%) with HCV-3a infection displayed a dN/dS ratio  $> 1$ , and 1 of 3 (33.3%) exhibited significant positive selection as determined by analysis of variance (Table 2). These proportions were not different from those seen in subjects infected with HCV-1a or HCV-1b, and no strong differences were seen in these regards with respect to other E2 subdomains. In addition, a number of studies have reported that infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) influenced HCV quasispecies distribution and reduced host selective pressure exerted on HVR1 in coinfecting subjects (Sherman et al., 1996; Mao et al., 2001; Canobio et al., 2004). Because of this, intrahost selective pressure was examined separately in HCV/HIV-1 coinfecting patients (n=14) and patients infected solely with HCV (n=4). Overall, there was no

significant difference in the proportion of coinfecting subjects exhibiting either a dN/dS ratio  $> 1$  or significant positive selection for all E2 subdomains analyzed ( $p > 0.235$ , Fisher's exact test). Finally, the mean dN/dS ratio was not significantly higher in subjects infected only with HCV than in coinfecting patients for any of the E2 subdomains analyzed ( $p > 0.117$ , Mann-Whitney U test).

### **Physicochemical properties and predicted antigenicity of HVR3**

Because HVR3, and in particular HVR3a, stood out as HCV E2 envelope glycoprotein subregions subjected to relatively high intrahost selective pressure, details of their physicochemical properties and predicted antigenicity profiles were further investigated. This analysis was based on an HVR3 consensus sequence of 36 amino acid residues (DSLNTGFLAGLFYYHKFNSSGCPERLASCRPITDFA) derived from the 391 non-redundant third trimester E1-E2 sequences (see above and Table 1). According to the Kyte and Doolittle method, which evaluate the hydrophilicity and hydrophobicity of a protein along its amino acid sequence, HVR3 displays a rather hydrophilic center located within the C-terminal portion of HVR3a, while its flanks (i.e. N-terminal HVR3a, HVR3b) are generally hydrophobic (Figure 2A) (Kyte and Doolittle, 1982). The Parker index, which integrates hydrophilicity, atomic flexibility, and HPLC retention components, remains one of the most extensively validated *in silico* predictors of protein antigenicity (Parker et al., 1986; Penin et al., 2001). Computing of this index over the HVR3 consensus sequence revealed two salient peaks of antigenicity, both located within the C-terminal part of

HVR3a and both overlapping regions of relatively high hydrophilicity highlighted in the Kyte-Doolittle plot (Figure 2B). These regions also overlapped with segments predicted to be highly surface-exposed by the Janin accessibility method (Figure 2C) (Janin, 1979). Overall, combination of these prediction algorithms suggests that the main antigenic portion of HVR3 lies within HVR3a, and positions HVR3a at the surface of E2, where it should be accessible and recognizable by antibodies. These observations further validate the HVR3a, HVR3b, and HVR3c subdomain organization initially proposed on the basis of amino acid sequence entropy and genetic distance.

Detailed examination of the amino acid sequence composition of HVR3a revealed a domain comprised of relatively conserved hydrophobic residues surrounded by relatively hydrophilic or neutral amino acids (Figure 2D). Thus, in spite of the relative amino acid sequence variability observed within this region, its overall hydropathic character appears highly conserved, both in interhost and intrahost comparisons (Figure 2D). In particular, amino acid positions 437, 438, 441, 442 in the center, and 447 were always held by hydrophobic residues, with a fully invariant glycine at position 436. Positions 439 and 440 were occupied by either hydrophobic or neutral amino acids. Position 448 was always hydrophilic, consisting of an asparagine in the majority of cases. Positions 432 and 434 were either hydrophilic or neutral. Finally, 6 positions were particularly variable, containing any of the 3 classes of residues (Figure 2D). Overall, positions of highest amino acid sequence variability within HVR3a overlapped those of predicted antigenic sites

(Figure 2B). Finally, the presence of charged residues in HVR3a was investigated. Positively charged residues were mainly found C-terminal from the hydrophobic center (positions 445 and 446 in 81.0% and 93.3% of sequences, respectively), and to a lesser extent at position 444 (7.44%). Position 434 exhibited both positively and negatively-charged residues, with a preference for basic amino acids (28.0% versus 10.0%). Interestingly, the first position of HVR3a (residue 431) was almost always occupied by a basic residue. Fully consistent profiles were observed when analysis was performed using a set of 158 full-length genomic HCV sequences from the Los Alamos HCV sequence database (data not shown) (Kuiken et al., 2005). The conservation of hydrophobic amino acids and charged residues suggests that the overall conformation of HVR3a is likewise conserved among HCV variants comprised within the quasispecies.

### **Molecular modeling of HVR3**

The TBEV E protein, which is distantly related to HCV envelope glycoproteins, remains the closest available crystal structure amenable to three-dimensional modelling of E2 (Rey et al., 1995). Work using this model has led to the formulation of several testable hypotheses regarding E1-E2 structure, higher-order organization, immunogenicity, and function (Yagnik et al., 2000; Slater-Handshy et al., 2004; Heo et al., 2004). This model was reconstructed by incorporating the consensus amino acid sequence of HVR3 derived from alignment of the 391 non-redundant third trimester E1-E2 sequences described above. Confirming antigenicity and accessibility predictions, HVR3 was found to be very largely

exposed at the surface of E2, with a potential contact surface of approximately  $800 \text{ \AA}^2$  and 50% of HVR3 amino acids having more than 30% of their total surface exposed (Figure 3). In fact, the only amino acid residues that appear to be entirely buried within the structure are phenylalanine 437 and leucine 438 (0% exposure), which are primarily hidden underneath cysteine 503 and glycine 504, while alanine 439 and glycine 440 have  $< 5\%$  exposure. In this three-dimensional model, HVR3 is strikingly distant from HVR1, which is situated at the opposite end of E2 and largely positioned on the other face of the protein. This structural arrangement would make direct interactions between these two domains improbable, at least in the context of monomeric envelope structures. In contrast, and most interestingly, HVR3c lies in close spatial proximity with HVR2: the apex of HVR2 (GSG tripeptide) and the center of HVR3c (RPL tripeptide) are separated by an estimated distance of  $27 \text{ \AA}$ , while the closest point-to-point distance between HVR2 and HVR3 is only  $9 \text{ \AA}$ .

## **DISCUSSION**

HCV E1 and E2 envelope glycoproteins are of particular interest because of their central implication in the initial steps of viral infection and because they constitute important targets for the host's immune responses. Significant clustering of interhost genetic diversity exists outside of already-described E2 hypervariable regions HVR1 and HVR2. In addition to HVR1 and HVR2, amino acid sequence variability was particularly striking within HVR3 as a whole (amino acid positions 431-466) and HVR3c (amino acid positions 456-466). Evidence was also that these newly-described envelope subdomains were subjected to differential levels of intrahost selective pressure. Indeed, positive selection, as expressed by the mean dN/dS ratio, was highest in  $\text{HVR1} > \text{HVR3a} > \text{HVR3c} > \text{HVR3} > \text{HVR2} > \text{HVR3b}$ . In fact, the dN/dS ratio was higher in HVR3a than HVR2 in 13 of 17 (76.5%) of the patients examined in the present study (Table 2). Interhost genetic diversity and intrahost selection pressure were not strictly dependent on HCV genotype: these parameters were essentially indistinguishable in subjects infected with HCV-1a, HCV-1b, or HCV-3a, even though the limited number of subjects examined per stratum may have obscured the detection of subtle differences in this regard. Interestingly, interhost and intrahost genetic variability were not focalized on identical E2 subdomains, with the exception of HVR1, which was both highly diversified and subjected to robust positive selection. Furthermore, significant correlation between the dN/dS ratios observed in HVR1, HVR3a, and HVR3c, but not HVR3b and HVR2, is potentially reflective of functional differences between respective subdomains (see below).

Intrahost selective pressure can be exerted at least in part by host HCV-specific immune responses, and humoral immunity is an important component of this response. Indeed, neutralizing monoclonal antibodies 1/39, 2/69a, 7/16b and 11/20, that block the binding of HCV-like particles to human CD81 and inhibit infection of Huh-7.5 hepatoma cells by HIV pseudotyped particles bearing native HCV E1 and E2, bind within a 15 amino acids region of glycoprotein E2 (amino acid residues 432 to 447) which maps precisely to HVR3a (Flint et al., 1999; Owsianka et al., 2001; Hsu et al., 2003). In addition, we cannot exclude that cell-mediated immune responses, in particular class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL), also play a role in exerting selective pressure on particular HVR3 segments. Multiple CTL epitopes were recently described in E2, including within hypervariable regions (Tester et al., 2005; Dutoit et al., 2005). Moreover, positive selection associated with CTL escape was observed in acute and chronic HCV infection (Timm et al., 2004; Cox et al., 2005) and could serve to explain interhost and intrahost amino acid sequence variability at positions occupied by hydrophobic residues (i.e. amino acid positions 437 and 438) that were predicted to be largely buried within E2 based on molecular modeling (Figure 3).

HIV infection induces a decline in the CD4<sup>+</sup> T cell compartment and, as a consequence, can result in suppression of HCV-specific immune responses in coinfecting hosts (Lauer et al., 2002). Consistent with this principle, several groups of investigators have shown that



coinfection of HCV<sup>+</sup> subjects with HIV-1 led to a modulation of HCV quasispecies evolution and to reduced intrahost selective pressure on HVR1 (Mao et al., 2001; Canobio et al., 2004). However, in the present study, a significant reduction in host selective pressure exerted on E2 was not observed in coinfecting subjects, as compared with patients infected with HCV alone. This can be explained by the fact that a) mean CD4<sup>+</sup> T cell counts in study participants were  $> 500 \text{ cell/mm}^3$ , therefore not consistent with substantial immunodeficiency; and b) eleven of 13 coinfecting subjects were treated with antiretroviral therapy during the course of the study, including 10 who were treated with combinations of antiretroviral agents, which can lead to a rapid restoration of CD4<sup>+</sup> T cell counts and functional immunocompetence (Autran et al., 1997). Indeed, the two lowermost dN/dS ratios observed in HVR1 during the course of the study were observed in TV075 and TV179, two coinfecting subjects who were not initially treated with antiretrovirals.

In summary, data was presented herein that supports the existence in HCV E2 of a third hypervariable region located between HVR1 and HVR2. Concordance between results of the amino acid entropy-based clustering approach (Figure 1), intrahost selective pressure data (Table 2), hydropathicity, antigenicity, and accessibility predictions (Figure 2), and three-dimensional molecular modelling (Figure 3) provides compelling evidence in support of the proposed HVR3 subdomain model. Taken together, these data strongly suggest that: a) at least sizable portions of HVR3, including the C-terminal part of HVR3a, are being exposed at the surface of E2; b) HVR3, including HVR3a, can be targeted by host humoral

immune responses, consistent with monoclonal antibody binding; and c) HVR3 may play a role in the process of binding with host cell receptors and entry of the virus into host cells, consistent with antibody neutralization experiments. In this regard, while amino acid sequence variation observed in HVR3a was extensive in some cases, the basic organization and physicochemical characteristics of residues at key positions in HVR3a were generally well-conserved (Figure 2D). In particular, further analysis showed that the hydrophobic profile at the center of HVR3a was conserved among genotypes (data not shown), suggestive of functional constraints on variation potentially related to conformational conservation of the E2 glycoprotein, viral fitness and/or specific subdomain function. Likewise, the conserved positive charges localized within the rather hydrophilic environment at the edge of the hydrophobic center of HVR3a represents a feature conserved across genotypes that suggests a functional role of this region, for instance in E2 dimerization or other protein-protein interaction. Amino acid residues proximal to HVR2 have been implicated in binding of E2 to the CD81 cell surface molecule, an interaction that has strong potential relevance for viral entry of HCV in the host cell and the pathogenesis of hepatitis C (Pileri et al., 1998; Hsu et al., 2003). Molecular modeling (Figure 3) revealed that HVR3c and, to a certain extent, HVR3a and HVR3b, were probably closely clustered in the E2 envelope glycoprotein structure, suggestive of a potential role in binding of putative HCV cell surface receptors, including CD81, and/or scavenger receptor class B type I (SR-BI) (Scarselli et al., 2002), and/or heparan sulfate (Barth et al., 2003). Alternatively, a region corresponding to HVR3a was recently reported

to contain a fusion peptide-like domain (amino acid positions 436-443; GWLAGLFY) homologous to that found in TBEV, dengue virus and other flaviviruses, which would have bipartite functions in binding CD81 and mediating fusion of the viral and host cell membranes (Drummer et al., 2005). It is tempting to speculate that neighbouring HVR3b, which shows marked amino acid sequence diversity in interhost comparisons but appears subjected to little if any intrahost selection, could be functionally involved in pH-dependent conformational changes in E2, leading to exposure of this putative fusion peptide. However, resolution of these issues will have to await direct experimentation.

In view of the results presented herein, we strongly feel that the issue of amino acid sequence variation in HCV E2 envelope glycoprotein is unsettled and needs to be revisited. In addition, because of the high levels of interhost sequence variability observed outside of HVR1, cross-sectional studies based on comparisons of selective pressure in HVR1 and so-called invariant flanking regions should be interpreted with caution. A fuller understanding of the structure-function relationships in HCV envelope glycoproteins will contribute to the design of HCV entry inhibitors and the development of immunogens to prevent and/or treat hepatitis C.

**REFERENCES**

Abbate, I., Lo Iacono, O., Di Stefano, R., Cappiello, G., Girardi, E., Longo, R., Ferraro, D., Antonucci, G., Di Marco, V., Solmone, M., Craxi, A., Ippolito, G., Capobianchi, M.R., 2004. HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated- or standard-interferon and ribavirin. *J Hepatol* 40, 831-836.

Alter, M.J., Margolis, H.S., Krawczynski, K., Judson, F.N., Mares, A., Alexander, W.J., Hu, P.Y., Gerber, M.A., Sampliner, R.E., Meeks, E.L., Beach, M.J., 1992. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 327: 1899-1905.

Autran, B., Carcelain, G., Li, T.S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debre, P., Leibowitch, J., 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4<sup>+</sup> T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277: 112-116.

Bach, N., Thung, S.N., Schaffner, F., 1992. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology* 15, 572-577.

Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H.E.,

Baumert, T.F., 2003. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278: 41003-41012.

Benhamou, Y., Di Martino, V., Bochet, M., Colombet, G., Thibault, V., Liou, A., Katlama, C., Poynard, T., 2001. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus- and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. *Hepatology* 34, 283-287.

Bonacini, M., Puoti, M., 2000. Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection: diagnosis, natural history, meta-analysis of sexual and vertical transmission, and therapeutic issues. *Arch Intern Med* 160, 3365-3373.

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

Canobio, S., Guilbert, C., Troesch, M., Samson, J., Lemay, M., Pelletier, V.A., Bernard-Bonnin, A.C., Kozielski, R., Lapointe, N., Martin, S.R., Soudeyns, H., 2004. Differing patterns of liver disease progression and hepatitis C virus (HCV) quasispecies evolution in children vertically coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 42: 4365-4369.

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

Choo, Q.L., 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.

Choo, Q.L., Richman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R., Barr, P.J., Weininger, A.J., Bradley, D.W., Kuo, G., Houghton, M., 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2451-2455.

Cox, A.L., Mosbrugger, T., Mao, Q., Liu, Z., Wang, X.H., Yang, H.C., Sidney, J., Sette, A., Pardoll, D., Thomas, D.L., Ray, S.C., 2005. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 201: 1741-1752.

Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V.A., Osguthorpe, D.J., Wolff, J., Genest, M., Hagler, A.T., 1988. Structure and energetics of ligand binding to proteins: *Escherichia coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins* 4: 31-47.

Dieterich, D.T., 1999. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: clinical issues in coinfection. *Am J Med* 107, 79S-84S.

Dodig, M., Tavill, A.S., 2001. Hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfections. *J Clin Gastroenterol* 33, 367-374.

Drummer, H., Maerz, A., Pombourios, P., 2005. Structural and functional role of a fusion-peptide like sequence in hepatitis C virus glycoprotein E2. Abstracts of the 12<sup>th</sup> International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, p. 26.

Dutoit, V., Ciuffreda, D., Comte, D., Gonvers, J.J., Pantaleo, G., 2005. Differences in HCV-specific T cell responses between chronic HCV infection and HIV/HCV co-infection. *Eur J Immunol* 35: 3493-3504.

Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J.C., Strazzera, A., Chien, D.Y., Munoz, S.J., Balestrieri, A., Purcell, R.H., Alter, H.J., 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288, 339-344.

Farci, P., Strazzera, R., Alter, H.J., Farci, S., Degioannis, D., Coiana, A., Peddis, G., Usai, F., Serra, G., Chessa, L., Diaz, G., Balestrieri, A., Purcell, R.H., 2002. Early changes in

hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 3081-3086.

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.

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.

Gonzalez-Peralta, R.P., Qian, K., She, J.Y., Davis, G.L., Ohno, T., Mizokami, M., Lau, J.Y., 1996. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 49, 242-247.

Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.

Heo, T.H., Chang, J.H., Lee, J.W., Fong, S.K.H., Dubuisson, J., Kang, C.Y., 2004. Incomplete humoral immunity against hepatitis C virus is linked with distinct recognition of putative multiple receptors by E2 envelope glycoproteins. *J Immunol* 173: 446-455.



Honda, M., Kaneko, S., Sakai, A., Unoura, M., Murakami, S., Kobayashi, K., 1994. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* 20, 1144-1151.

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 viral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7271-7276.

Janin, J., 1979. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* 277: 491-492.

Kato, N., Ootsuyama, Y., Tanaka, T., Nakagawa, M., Nakazawa, T., Muraiso, K., Ohkoshi, S., Hijikata, M., Shimotohno, K., 1992. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Res* 22, 107-123.

Kato, N., Sekiya, H., Ootsuyama, Y., Nakazawa, T., Hijikata, M., Ohkoshi, S., Shimotohno, K., 1993. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 67, 3923-3930.

Korber, B.T.M., Kunstman, K.J., Patterson, B.K., Furtado, M., McEvilly, M.M., Levy, R., Wolinsky, S.M., 1994. Genetic differences between blood- and brain-derived viral

sequences from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: evidence of conserved elements in the V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences. *J Virol* 68: 7467-7481.

Kuiken, C., Yusim, K., Boykin, L., Richardson, R., 2005. The Los Alamos HCV Sequence Database. *Bioinformatics* 21: 379-384.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244-1245.

Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132.

Lauer, G.M., Nguyen, T.N., Day, C.L., Robbins, G.K., Flynn, T., McGowan, K., Rosenberg, E.S., Lucas, M., Klenerman, P., Chung, R.T. Walker, B.D., 2002. Human immunodeficiency virus type 1-hepatitis C virus coinfection: intraindividual comparison of cellular immune responses against two persistent viruses. *J Virol* 76: 2817-2826.

Mao, Q., Ray, S.C., Laeyendecker, O., Ticehurst, J.R., Strathdee, S.A., Vlahov, D., Thomas, D.L., 2001. Human immunodeficiency virus seroconversion and evolution of the hepatitis C virus quasispecies. *J Virol* 75: 3259-3267.

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

Murphy, D., Willems, B., Delage, G., 1994. Use of the 5' noncoding region for genotyping hepatitis C virus. *J Infect Dis* 169, 473-475.

Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3, 418-426.

Owsianka, A., Clayton, R.F., Loomis-Price, L.D., McKeating, J.A., Patel, A.H., 2001. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Virol* 82: 1877-1883.

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.

Pawlotsky, J.M., 2000. Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* 32: 889-896.

Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P.O., Deleage, 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.

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

Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S.C., 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375: 291-298.

Rubbia-Brandt, L., Leandro, G., Spahr, L., Giostra, E., Quadri, R., Male, P.J., Negro, F., 2001. Liver steatosis in chronic hepatitis C: a morphological sign suggesting infection with HCV genotype 3. *Histopathology* 39: 119-124.

Saito, I., Miyamura, T., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Koi, S., Onji, M., Ohta, Y., Choo, Q.L., Moughton, M., Kuo, G., 1990. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 6547-6549.

Sali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779-815.

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.

Sherman, K.E., Andreatta, C., O'Brien, J., Gutierrez, A., Harris, R., 1996. Hepatitis C in human immunodeficiency virus-coinfected patients: increased variability in the hypervariable envelope coding domain. *Hepatology* 23: 688-694.

Shirai, M., Arichi, T., Chen, M., Masaki, T., Nishioka, M., Ikeda, K., Takahashi, H., Enomoto, N., Saito, T., Major, M. E., Nakazawa, T., Akatsuka, T., Feinstone, S.M., Berzofsky, J.A., 1999. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J Immunol* 162, 568-576.

Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.A., Chan, S.W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P.L., Kolberg, J., Urdea, M.S., 1993. Classification of hepatitis C virus into six major

genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74, 2391-2399.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feistone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D.G., Okamoto, H., Pawlotsky, J.M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L.J., Thiel, H.J., Viazov, S., Weiner, A.J., Widell, A., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.

Slater-Handshy, T., Droll, D.A., Di Bisceglie, A.M., Chambers, T.J., 2004. HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. *Virology* 319: 36-48.

Soriano, V., Rodriguez-Rosado, R., Garcia-Samaniego, J., 1999. Management of chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS* 13, 539-546.

Tester, I., Smyk-Pearson, S., Wang, P., Wertheimer, A., Yao, E., Lewinsohn, D.M., Tavis, J.E., Rosen, H.R., 2005. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med* 201, 1725-1731.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.

Timm, J., Lauer, G.M., Kavanagh, D.G., Sheridan, I., Kim, A.Y., Lucas, M., Pillay, T., Ouchi, K., Reyor, L.L., Zur Wiesch, J.S., Gandhi, R.T., Chung, R.T., Bhardwaj, N., Klenerman, P., Walker, B.D., Allen, T.M., 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 200: 1593-1604.

Weiner, A.J., Brauer, M.J., Rosenblatt, J., Richman, K.H., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q.L., Houghton, M., 1991. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180, 842-848.

Weiner, A.J., Geysen, H.M., Christopherson, C., Hall, J.E., Mason, T.J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C.D., Crawford, K.A., Brunetto, M., Barr, P.J., Miyamura, T., McHutchinson, J., Houghton, M., 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3468-3472.

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.



### **FIGURE LEGENDS**

#### **Figure 1. Amino acid sequence diversity in HCV E1-E2 envelope glycoproteins.**

Variability at each amino acid position was computed using a dataset comprised of all 391 non-redundant E1-E2 sequences derived from third trimester samples from all study subjects and the Entropy-ONE web tool (Korber et al., 1994), as described under Materials and Methods. Boundaries of HVR1 and HVR2 were set in accordance with previous reports (Weiner et al., 1991; Kato et al., 1992).

#### **Figure 2. Physicochemical properties and antigenic characterization of HVR3.**

Physicochemical profiles of the consensus HVR3 amino acid sequence derived from third trimester samples were computed using the NPSA webware (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>). A. Hydrophobicity plot (Kyte and Doolittle, 1982). B. Antigenicity index (Parker et al., 1986). C. Accessibility profile (Janin, 1979). D. Repertoire of amino acid residues at each position of HVR3a. Boxed residues appeared in >10% of E1-E2 sequences analyzed; amino acid positions correspond to the M62321 reference sequence (Choo et al., 1998).

#### **Figure 3. Molecular modeling of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein.**

A. Schematic representation of the E2 protein of HCV with hypervariable regions highlighted. B and C. Surface of the E2 protein based on tick-borne encephalitis virus E protein crystal structure (front and reverse side shown) (Rey et al., 1995; Yagnik et al., 2000). Blue: hypervariable region 1 (HVR1); Red: hypervariable region 2 (HVR2); Orange:

hypervariable region 3c (HVR3c); Orange and pink: hypervariable region 3b (HVR3b);  
Orange, pink and green: hypervariable region 3 (HVR3).

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Martine Caty, Silvie Valois, and Ampha Khammy for expert technical assistance, Marc-André Rodrigue and Julie Lacaille for automated DNA sequencing, and James Arthos and Elizabeth Bonney for useful discussions and advice. Supported by grants from the CIHR-Health Canada Research Initiative on Hepatitis C (grant n° EOP-41537), CANFAR-Canadian Foundation for AIDS Research (grant n° 013515), and The Elizabeth Glaser Pediatric AIDS Foundation (grant n° 28-PG-51355). M.T. was the recipient of a scholarship from Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine. H.S. is a Junior-II Scientist of le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

**TABLE 1.** Amino acid sequence variability in selected subsections of HCV E1 and E2 envelope glycoproteins.

Sequence identification	Amino acid position <sup>1</sup>	Mean genetic distance <sup>2</sup>	Standard error <sup>3</sup>
E1/128-E2/125	319-508	0.253	0.020
HVR1	384-410	0.509	0.049
HVR2	474-482	0.541	0.044
HVR3	431-466	0.315	0.042
HVR3a	431-449	0.305	0.056
HVR3b	450-466	0.326	0.061
HVR3c	456-466	0.430	0.064

Nucleic acid sequences were obtained, edited, translated, and analyzed as described under Materials and Methods. <sup>1</sup>Amino acid positions correspond to the M62321 reference sequence (Choo et al., 1989). <sup>2</sup>Mean genetic distance was calculated as mean of pairwise *p* distances. <sup>3</sup>Standard error of the mean was computed by bootstrapping (500 replicates) (Kumar et al., 2001).

**TABLE 2.** Estimate of selective pressure exerted on various subsections of the HCV E2 envelope glycoprotein.

Subject	HIV coinfection	HCV genotype	dN/dS								
			HVR1 <sup>1</sup> (384-410)	HVR2 (474-482)	HVR3 (431-466)	HVR3a (431-449)	HVR3b (450-466)	HVR3c (456-466)			
TVC57	-	1a	2.614*§	0.090	0.812	1.177*	0.424	2.812*§			
TVC67	-	1a	1.482*	0.163	0.607	0.634	0.498	0.246			
TVC75	-	1b	1.181*	0.227	0.282	0.395	0.163	0.151			
TVC79	-	1a	3.826*§	0.000	0.513	1.542*	0.174	0.119			
TV075 <sup>2</sup>	+	1a	0.081	0.024	0.110	0.041	0.340	0.766			
TV179 <sup>2</sup>	+	1b	0.136	7.317*§	0.202	0.164	0.204	0.163			
TV233 <sup>2</sup>	+	1b	2.743*§	0.175	0.685	3.825*§	0.096	0.180			
TV289	+	1b	2.391*§	nc	0.461	0.431	1.549*	1.283*			
TV453	+	3a	0.428	0.166	0.037	0.023	0.052	0.037			
TV519	+	1b	4.263*§	nc	0.552	1.062*	0.044	0.204			
TV531	+	1a	1.860*§	0.253	0.391	0.955	0.233	0.521			
TVC17	+	1a	3.975*§	2.191*	1.182*	4.674*§	0.320	1.592*			
TVC33	+	1a	3.054*§	0.515	0.558	1.036*	0.289	0.210			
TVC45	+	3a	1.040*	0.858	0.626	0.904	0.227	0.345			
TVC55 <sup>2</sup>	+	1a	2.724*§	0.965	0.363	0.693	0.173	0.283			
TVC59	+	1a	0.592	0.248	0.165	0.139	0.185	0.220			
TVC73	+	3a	3.131*§	0.065	0.383	0.719	0.088	0.314			
Total median			2.391	0.227	0.461	0.719	0.204	0.246			

Nucleic acid sequencing, HCV genotyping, and calculation of the dN/dS ratio were performed as described under Materials and Methods. <sup>1</sup>Amino acid positions correspond to the M62321 reference sequence (Choo et al., 1989). <sup>2</sup>Analysis performed on two consecutive pregnancies. \*Denotes dN>dS. §Denotes significant positive selection as determined by analysis of variance ( $p < 0.10$ , Z-test) (Kumar et al., 2001). nc: not computed due to absence of synonymous substitutions in that particular sequence subset.

Figure 1

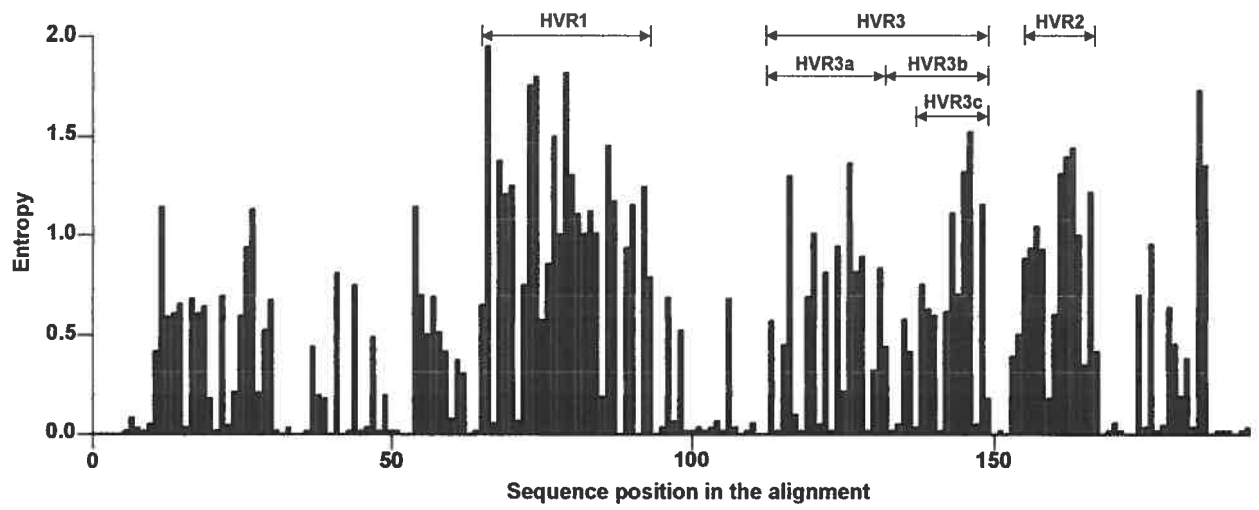
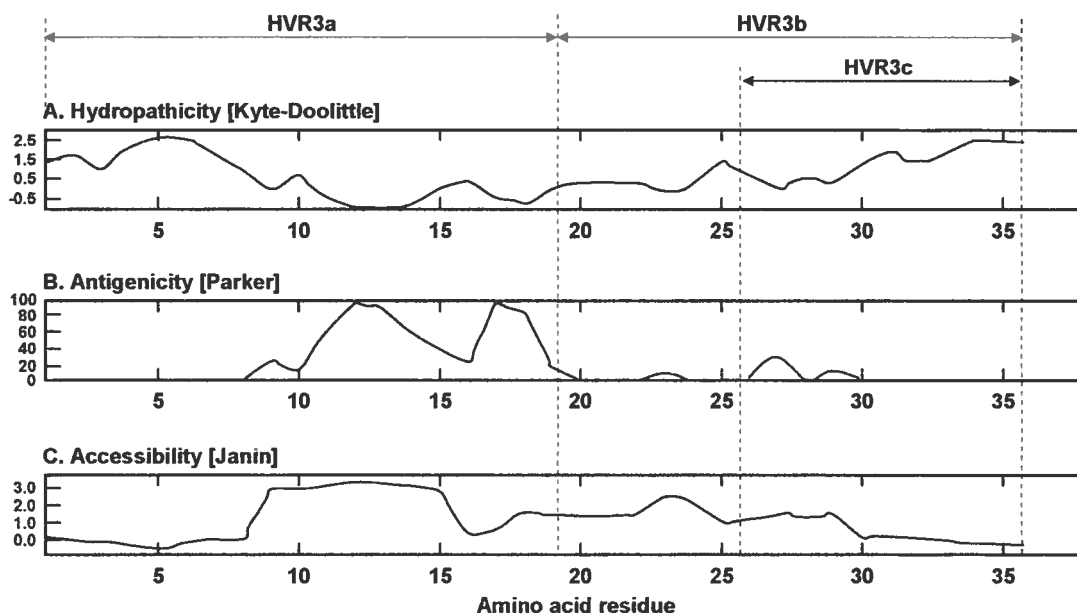
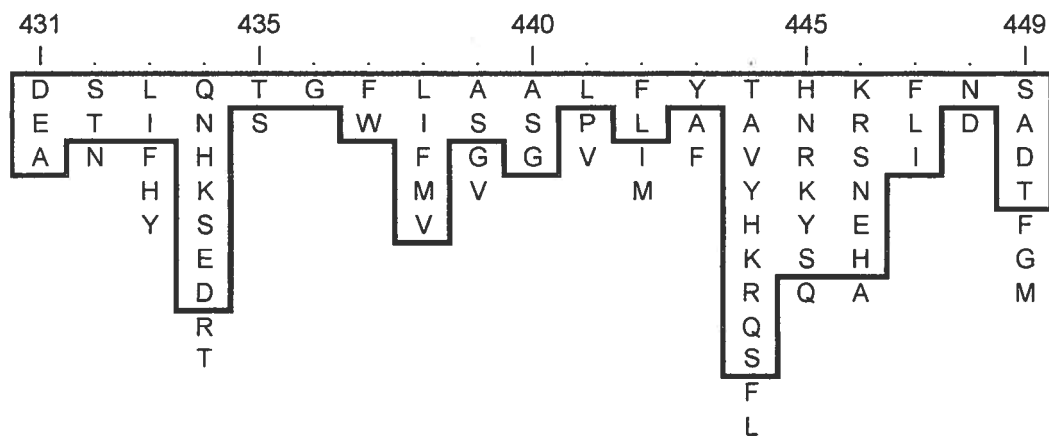


Figure 2

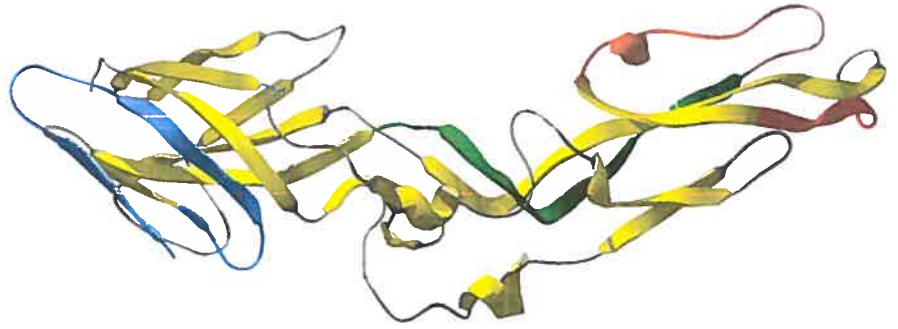


D. Amino acid residues at each position of HVR3a.

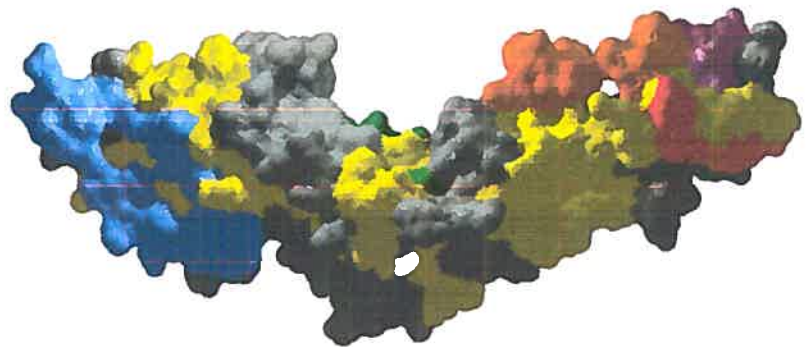


**Figure 3**

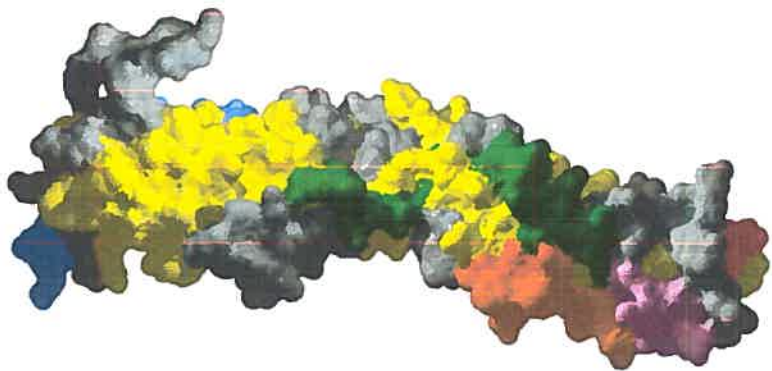
**A.**



**B.**



**C.**





## **Discussion**

## Article 1

Notre étude a démontré que les patients infectés par le VHC déclenchent des réponses immunitaires spécifiques à la protéine F du VHC, non seulement humorales mais également cellulaires. Nous avons observé que 59% des patients infectés par le VHC présentaient des anticorps spécifiques à la protéine F (Fig.2a). Ceci correspond aux pourcentages déjà constatés par d'autres groupes (329, 336, 350). Pourtant, les tests ont été effectués avec la forme tronquée de la protéine F, où les 11 premiers acides aminés partagés avec core ne sont pas présents. Or, certains auteurs ont détectés seulement 25% (333) ou encore de très faibles réponses par immunoprécipitation (327) avec une forme tronquée similaire, ce qui est nettement en deçà de nos données. Il pourrait s'agir d'un problème de sensibilité de leur test, ou encore de représentation différente des génotypes testés. De plus, les différentes techniques utilisées pour produire la protéine F tronquée ont possiblement développé des structures diverses de repliement, ce qui aurait pu avoir pour effet de changer certains épitopes et donc expliquerait les discordances observées au sein des différentes études.

81,8% de nos patients infectés par le VHC possèdent des cellules cytotoxiques spécifiques à la protéine F (Table 1). Cela constitue un moyen important de défense contre un virus. Bain et al. (336) ont également détecté des cellules spécifiques à leur protéine DFC<sub>HCV</sub>, mais leur fonction était de produire de l'IFN $\gamma$  et/ou IL-10, et seulement 20% de spécificité a été observée. Les tests CTL que nous avons utilisé pour détecter les cellules spécifiques à la protéine F sont connus pour être particulièrement sensibles. De plus, le polypeptide utilisé par Bain et al. (336) ne contient que 99 acides aminés du cadre de lecture +1, alors que la protéine dépourvue des 11 premiers résidus que nous avons produite est d'une longueur de 151 acides aminés. Ceci suggère donc que certains épitopes pourraient être contenus dans les régions non utilisées du polypeptide en N-terminal ou en C-terminal, ce qui expliquerait le pourcentage moins élevé de réponses. Par ailleurs, cette

hypothèse est soutenue par l'identification de deux peptides restreints par HLA-A2 prédits par des logiciels sur le web, qui se situent en amont du polypeptide de Bain et al.. De plus, le peptide F31-40 SLEFTCCRA a clairement démontré sa capacité à se lier au CMH de classe I de manière dose-dépendante lors d'exposition aux cellules T2 (Fig.4c).

Comme déjà mentionné à plusieurs reprises, la coinfection doit être prise en compte dans les études, étant donné la prévalence non négligeable du VIH parmi les patients infectés par le VHC. L'étude de ce groupe de patients constitue par ailleurs la particularité de notre étude qui en a fait son caractère exceptionnel. Il a été démontré que les patients coinfectés avaient un taux de progression plus élevé vers les différentes pathologies du foie liées au VHC (197, 201, 523), ainsi qu'une charge virale du VHC plus élevée (185, 188, 190), et que ces effets pourraient être causés par une déficience du système immunitaire, qui est une conséquence de l'infection par le VIH (voir chapitre 2.2.2. Mécanismes de pathogenèse du VIH). En effet, de nombreuses études ont montré que les réponses cellulaires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques au VHC étaient moins fréquentes dans le sang périphérique d'individus coinfectés (192, 207). Or, dans notre étude, les patients coinfectés par le VIH et le VHC ont tout de même montré des réponses immunitaires non seulement cellulaires, mais aussi humorales contre la protéine F : 77.8% et 52% respectivement des patients coinfectés par le VIH possédaient des cellules CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ainsi que des anticorps spécifiques à la protéine F (Table 1 et Fig.2a). Ces pourcentages étaient plus faibles par rapport aux patients infectés seulement par le VHC, même si dans le premier cas, la différence n'était pas significative et que dans le deuxième cas, le nombre d'individus testés était trop faible pour effectuer une comparaison valide. Malgré la coinfection par le VIH, les patients de notre cohorte étaient aptes à établir des réponses cellulaires spécifiques contre la protéine F. Ceci pourrait être dû à la reconstitution immunitaire suite à la thérapie HAART. De plus, dans la majorité des cas, la fréquence des CTL précurseurs pour plusieurs autres protéines (E2, p7, NS2 et NS3) était plus faible que pour la protéine F seule, même si le nombre de patients est faible (Table 1). Cette étude suggère donc de manière très intéressante que la protéine F engendre de plus fortes

réponses que plusieurs autres protéines réunies du VHC, et que les individus coinfectés ne semblent pas être handicapé par l'infection par le VIH et sont capables de générer des réponses immunitaires spécifiques à la protéine F au même titre que les patient infectés seulement par le VHC.

Une autre particularité de cette étude, et qui n'a pas été précisée pour des raisons de clarté, est le fait que des patientes enceintes ont été recrutées pour ces test. En effet, tous les patients dont la désignation commence par TV sont des femmes enceintes venant de la cohorte mère-enfant du CMIS (Centre Maternel et Infantile sur le SIDA) du CHU mère-enfant Sainte-Justine. Or aucune étude à ce jour n'a observé les réponses immunitaires cellulaires spécifiques au VHC durant la grossesse. Moi-même, j'ai entrepris durant une grande partie de mon doctorat de détecter les réponses immunitaires cellulaires, et plus précisément les cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices, chez ces patientes dont une majorité est coinfectée par le VIH (67,4%). Bien des méthodes ont été exploitées : tests CTL pour détecter la spécificité des antigènes, marquage aux tétramères CMH-peptides pour évaluer la fréquence des cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques au VHC, marquage intracellulaires des cytokines pour évaluer la fréquence des cellules CD8<sup>+</sup> effectrices, pré-stimulations spécifiques ou non pour amplifier les cellules à étudiées. Malheureusement, ces tests sur un nombre substantiels de patientes enceintes n'ont pas réussi à détecter de manière claire une réponse cellulaire contre le VHC, que ce soit contre des peptides immunodominants ou contre des cellules cibles infectées par des vaccinia exprimant différentes parties de la polyprotéine du VHC. Des études ont démontré que la fréquence des cellules CD8<sup>+</sup> étaient faibles dans le sang périphérique, une particularité de la chronicité probablement en partie dû à la compartimentalisation dans le foie, ainsi qu'à l'esquive face au système immunitaire (524-528). De plus, la fonction des cellules CD8 semble également être altérée (529-531), dû à la suppression du système immunitaire par des protéines virales (364) ou par des cellules régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (532-535). De l'avis général, les réponses cellulaires spécifiques au VHC sont donc difficilement détectables dans le sang périphérique, particulièrement chez les patients coinfectés par le VIH et le VHC. Malgré tout, des

réponses cellulaires substantielles contre la protéine F ont été observées, ce qui démontre à nouveau le caractère exceptionnel de cette protéine. Malheureusement, le nombre de patientes enceintes qui ont été testés pour leurs réponses cytotoxiques est trop faible pour comparer les individus coinfectés par le VIH de celles qui sont infectées seulement par le VHC (patientes TVX, Table 1). Les réponses humorales anti-F quant à elles n'ont montré aucune différence significative en terme de titre chez les patientes enceintes coinfectées par le VIH et celles qui sont infectées seulement par le VHC (Fig.2a). Ceci suggère que l'infection par le VIH n'a pas d'effet immunomodulateur quant à la réponse immunitaire humorale spécifique à la protéine F. Par contre, au sein du groupe de patientes coinfectées par le VIH, le titre des anticorps anti-F est quasiment corrélé avec le compte CD4 (Fig.2b). Or, tel que mentionné dans l'introduction, la coinfection par le VIH des individus atteints du VHC est caractérisée par un risque accru et une accélération de la progression des maladies du foie; de plus, l'évolution du VIH est caractérisée par une diminution des comptes CD4. Ceci suggère donc que les femmes enceintes coinfectées par le VIH et dont les comptes CD4 sont faibles, pourraient être plus susceptibles aux pathologies du foie et donc montrer des titres d'anticorps anti-F élevés. Il s'agit par ailleurs d'une constatation déjà émise par deux auteurs qui ont observé une prévalence des anti-F plus élevée chez les patients atteints de carcinomes hépatocellulaires (328, 536).

Finalement, malgré son taux de traduction faible par rapport à core (329, 331, 335), la protéine F parvient donc à générer des réponses immunitaires non seulement humorales, mais également cellulaires. Ceci démontre que la quantité de production n'est pas nécessairement la clé : en effet, la protéine F est caractérisée par une dégradation rapide par la voie du protéasome (330, 353, 356). De plus, le fait qu'elle se trouve immédiatement en aval du site d'initiation de la traduction, et que son expression ne dépend d'aucun recrutement d'enzyme protéolytique, a pour effet qu'elle est probablement la première protéine produite après l'infection d'une cellule par le VHC (Ceci cependant devra être confirmé de manière directe). Par conséquent, un tel phénomène permettrait une exposition rapide au système immunitaire de l'hôte. De manière intéressante, le délai d'activation des

réponses immunitaire a un grand impact sur leur amplitude (537), comme le reflète la réponse majoritaire contre la phosphoprotéine pp65 dans l'infection à CMV (538). De plus, les cellules CD8<sup>+</sup> peuvent être dirigées de manière prédominante sur un nombre restreint d'épitopes immunodominants, pouvant parfois constituer plus de 90% de la réponse (537). Par conséquent, la protéine F semble constituer un candidat idéal en tant que composant pour le développement d'un vaccin. Il semble que la conservation de la séquence en acides aminés de la protéine a conduit à la réactivité croisée des réponses humorales et cellulaire chez différents génotypes du VHC, ce qui ajoute encore un élément favorable au développement d'un vaccin puisque ce dernier pourrait toucher une grande population d'individus infectés par le VHC en prévenant l'infection par divers sous-types viraux. Finalement, les réponses immunitaires ayant été détectées chez les patients coinfectés par le VIH, la vaccination pourrait être envisagée autant chez ces individus que chez les patients seulement infectés par le VHC et donc prévenir l'infection à VHC chez les sujets positifs pour le VIH.

## Article 2

Notre étude sur l'évolution de la quasi-espèce du VHC au cours de la grossesse est intéressante sur plusieurs points de vue : l'analyse longitudinale a permis un excellent suivi des patientes au cours de la grossesse. De plus, le nombre de patientes participant est tout à fait comparable aux études antérieures (258, 261). Le caractère exceptionnel de l'étude se situe sur deux niveaux : tout d'abord, le nombre de clones incorporé dans les analyses, qui s'élève à 1 337. Ce nombre met nos travaux sur un pied d'égalité avec les meilleures études dans le domaine au niveau de la capacité analytique. À ce chiffre s'ajoutent les multiples clones séquencés qui ont dû être exclus pour différentes raisons (déchiffrement difficile, séquences trop courtes, reprises de séquençage, etc...). La deuxième particularité de cette étude est à nouveau la même que celle du premier article sur la protéine F, c'est-à-dire l'intégration de la coinfection comme facteur de variabilité.

Les données cliniques sur les patientes enceintes ont montré des résultats intéressants (Fig.1) : comme certains auteurs l'ont observé (250, 257-259), nous avons constaté une diminution du niveau des enzymes hépatiques et une augmentation de la charge virale au cours de la grossesse. Néanmoins, les différences entre les trimestres n'étaient pas significatives. Il faut mentionner que des fluctuations semblent être fréquentes comme cela a été déjà observé en dehors de la grossesse (258, 539). Par ailleurs, au troisième trimestre de grossesse, les patientes coinfectées par le VIH ont affiché des valeurs plus élevées que les femmes mono-infectées en ce qui concerne le niveau d'ALT, d'AST ainsi que la charge virale du VHC, avec une différence significative au troisième trimestre de grossesse pour ce dernier paramètre (Fig.1). Ces différences pourraient être expliquées par la libération des enzymes hépatiques et de l'ARN viral dans la circulation suite à : a) une augmentation de la lyse par les CTL des hépatocytes infectés par le VHC suivant un changement de traitement antirétroviral qui entraîne une reconstitution immunitaire (215,

222); b) une augmentation de l'hépatotoxicité des agents antirétroviraux suite à un changement des composés du traitement (216, 222).

Une autre différence entre les patientes enceintes coinfectedées par le VIH et celles qui sont infectées par seulement le VHC a été observée (Figure supplémentaire 6) : l'évolution au cours de la grossesse du nombre de variants HVR1 est significativement différente entre ces groupes de patientes, sans pour autant montrer une différence significative du paramètre au troisième trimestre (test de Huynh-Feldt,  $p=0,047$ ). Plus explicitement, le nombre de variants a tendance à augmenter chez les femmes mono-infectées, alors que cette tendance est vers la diminution chez les femmes coinfectedées au troisième trimestre. Ceci indique que l'influence sur la région HVR1 est différente entre ces deux groupes de patientes. Toutefois, la pression sélective reste semblable, étant donné qu'il n'y a pas eu de même constat lors de l'analyse du ratio dN/dS de la région HVR1.

La grande majorité des patientes enceintes a indiqué un ratio dN/dS dans la région HVR1 plus élevé que celui dans les régions flanquantes, ce qui suggère que même au cours de la grossesse, cette région est sous une pression sélective supérieure à celle des séquences adjacentes (Figure supplémentaire 7). Il est important de mentionner ce fait, car il s'agit de la première étude indiquant que les réponses immunitaires agissent sur le VHC au cours de la grossesse. Par ailleurs, la pression sélective sur HVR1 semblait être constante tout au long de la grossesse, puisqu'il n'y a aucune différence significative entre les ratios dN/dS avant et après, ainsi qu'au trois trimestres de la grossesse dans aucun des groupes de patientes étudiées. Toutefois, une tendance à la diminution est observée au troisième trimestre.

La seule exception d'un ratio dN/dS de HVR1 inférieur à celui des régions flanquantes a été observé dans le groupe de patientes coinfectedées par le VIH et non traitées par des antirétroviraux (Figure supplémentaire 7). Ceci indique que HVR1 n'est pas la cible prédominante de la pression de sélection par rapport aux autres régions du génome, comme c'est le cas pour les autres patientes. Par ailleurs, le ratio dN/dS de HVR1 chez ces mêmes



patientes est nettement plus petit que celui observé chez les patientes infectées seulement par le VHC (Figure supplémentaire 7). Ceci suggère que la coinfection par le VIH diminue nettement la pression sélective exercée sur HVR1 du moins en absence de traitement. De plus, la valeur du ratio dN/dS s'est révélée bien inférieure à 1, ce qui démontre l'absence de pression immunitaire sur HVR1. Il semblerait donc que chez les patientes coinfectées par le VIH, les mutations trouvées dans HVR1 reflèteraient surtout la dérive génétique. La complexité de la quasiespèce basée sur HVR1 a également montré une nette diminution chez les patientes coinfectées par le VIH non traitées, avec la persistance d'un variant majoritaire tout au long de la grossesse (Fig.2). Ce variant prédominant représente le virus le mieux adapté à son environnement. Sa présence majoritaire dénote une réplication continue sans évidence de pression sélective. De plus, le fait de le retrouver tout au long de la grossesse indique que l'environnement durant ces 9 mois et même au-delà demeure stable et donc semblerait exempt de pression immunitaire. Nos résultats sont donc conformes au modèle selon lequel le VIH altère la quasiespèce du VHC à travers l'impact de l'immunosuppression (418, 518, 521).

La thérapie antirétrovirale combinée est utilisée chez les patientes enceintes infectées par le VIH pour diminuer la charge virale dans le but de réduire le risque de transmission mère-enfant du VIH. Mais il semble que ce traitement soit également bénéfique pour les patientes coinfectées par le VIH et le VHC. En effet, la complexité de la quasiespèce du VHC augmente chez les femmes traitées pour atteindre un profil similaire à celui trouvé chez les patientes infectées seulement par le VHC (Fig.2). Le même constat a été observé pour le ratio dN/dS de HVR1, ainsi que pour l'entropie de Shannon et la distance génétique, paramètres qui retrouvent tous des valeurs similaires à celles des patientes mono-infectées. Ceci suggère que la pression de sélection est de même ampleur dans ces deux groupes d'individus pour ce qui est de la région HVR1. L'effet positif du traitement HAART sur la quasiespèce du VHC vient probablement de la reconstitution immunitaire qui en résulte (221, 520, 522). De plus, contrairement à ce que Babik et al. ont déterminé (520), l'effet du traitement est très rapidement visible chez nos patientes

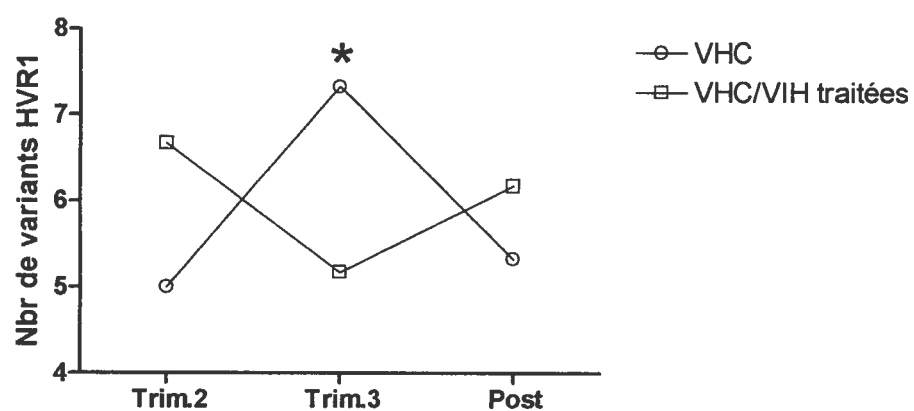
enceintes, puisque dans la plupart des cas, l'échantillon suivant le début de la prise de la thérapie montre déjà un changement dans la complexité de la quasiespèce basée sur HVR1 (Fig.2). Ceci démontre que la population des variants du VHC s'adapte rapidement au nouvel environnement, comme cela a été observé après un traitement anti-VHC (498) ou après des transplantations du foie (378, 540), dû probablement au taux élevé de réplication du VHC. De manière intéressante, les régions flanquantes n'ont montré aucune influence significative de la coinfection par le VIH ni de la thérapie HAART, ce qui démontre à nouveau que la région HVR1 est soumise de façon prédominante à la pression exercée par le système immunitaire (Figure supplémentaire 7).

L'étude des arbres phylogénétiques basés sur les séquences de HVR1 de patientes ayant connus deux grossesses successives a également conduit à des constatations intéressantes. Tout d'abord, chez les patientes qui ont traversé leur première grossesse sans traitement, la quasiespèce n'a pas vraiment évolué, même au cours de la deuxième grossesse sous thérapie HAART. De plus, alors que les patientes coinfectées et traitées de notre cohorte ont montré en moyenne un ratio dN/dS de HVR1 supérieur à 1, nos deux sujets coinfectés n'ont pas montré le même effet malgré la prise de traitement HAART au cours de leur deuxième grossesse. Les mêmes tendances ont pu être observée en ce qui concerne la distance génétique et l'entropie de Shannon. Ces résultats semblent nous indiquer que, une fois que les paramètres de la quasiespèce de HVR1 ont atteint des valeurs faibles, il est difficile dans certains cas de les rétablir. En d'autres termes, le rétablissement de la pression du système immunitaire sur la région HVR1 ne s'obtient pas de manière systématique chez toutes les patientes. Le deuxième constat résultant de nos études phylogénétiques porte sur le manque de corrélation entre le degré de diversification de la quasiespèce et la durée de l'intervalle intergénéral (i.e. la période de temps entre la fin d'une grossesse et le début d'une autre) chez les patientes coinfectées par le VIH. Ceci indique donc que l'évolution de la quasiespèce basée sur HVR1 ne dépend pas seulement de la dérive génétique due au taux élevé de réplication du VHC, mais également de la pression sélective du système immunitaire qui est particulière à chaque patiente enceinte.

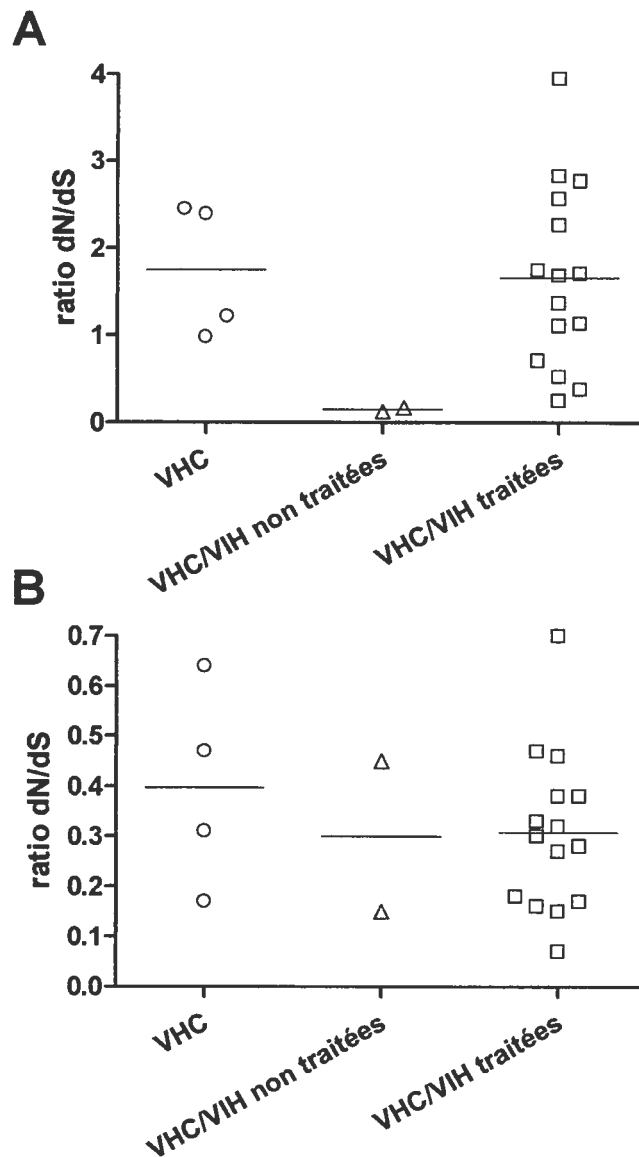
Notre étude de quasispéciation a donc permis de montrer que le système immunitaire de la femme enceinte est également capable d'exercer une pression sélective sur les populations virales, et que chaque individu témoigne d'une pression particulière ; celle-ci peut être influencée par la coinfection avec le VIH ainsi que le traitement HAART, qui semblent modifier certains facteurs, particulièrement au troisième trimestre. Si le traitement anti-VHC est un jour envisagé durant la grossesse, l'étude de la quasispèce pourra contribuer à prédire la réponse (voir chapitre 5.7. La quasispèce et la réponse aux traitements).

Une des limites de notre étude touche le nombre de patientes coinfectées par le VIH ne subissant aucun traitement. C'est un fait que 2 patientes ne suffisent pas pour déterminer des différences statistiques, mais les données sur le ratio dN/dS ainsi que sur la complexité de HVR1 montrent de telles différences qu'il ne peut s'agir de simples coïncidences. Par ailleurs, il est difficile voire impossible de nos jours de recruter dans des cohortes des patientes positives pour le VIH et non traitées; d'un point de vue scientifique et statistique, c'est un manque, mais du point de vue humain, ce manque se transforme en réussite en terme de réduction du taux de transmission verticale du VIH. Dans une autre mesure, le nombre de patientes simplement infectées par le VHC (n=4) représente également une limite, dans le sens où les analyses ne peuvent détecter que de fortes différences. Toutefois, il n'est pas rare de voir un effectif restreint dans la littérature relevant des quasispèces, (455) (498) (520). Il faut mentionner que des données supplémentaires seront ajoutées prochainement après une étude complémentaire. D'autre part, la méthodologie utilisée implique un travail de longue haleine, ce qui limite son application en clinique dans le but d'apporter un pronostic de réponse aux traitements anti-VHC. Finalement, des conclusions sur la pression du système immunitaire ont été établies sur la base de l'évolution des mutations dans la région HVR1. Il serait bon d'envisager d'étudier le système immunitaire lui-même pour confirmer son influence sur les quasispèces : la présence d'anticorps spécifiques à HVR1 dans le sérum peut être détectée par

immunoprécipitation, et les mutants de HVR1 échappant à la réponse immunitaire humorale peuvent être décelés.



**Figure supplémentaire 6. . Analyse du nombre des variants HVR1 au 2e, 3e trimestre et en postpartum chez les sujets étudiés. Moyenne du nombre de variants HVR1. Cercles: patients infectés seulement par le VHC. Carrés: chez les patients coïnfectés par le VHC et le VIH, traités par la thérapie antirétrovirale. L'astérisque indique une différence significative avec un  $p < 0,05$ .**



**Figure supplémentaire 7. Analyse du ratio dN/dS chez les sujets étudiés.** A. Ratio dN/dS des variants de la région HVR1. B. Ratio dN/dS des régions flanquantes sans HVR1. Cercles: patients infectés seulement par le VHC. Triangles: patients coinfectés par le VHC et le VIH non traités. Carrés: patients coinfectés par le VHC et le VIH traités par la thérapie antirétrovirale.

## Article 3

Malgré le fait que la glycoprotéine E2 ait été la cible de nombreuses études, cette analyse est la première à rapporter l'identification d'une nouvelle région de variabilité non négligeable se situant entre HVR1 et HVR2. Même si la diversité la plus élevée se situe dans HVR1, HVR3, comme nous l'avons nommée, présente même une variabilité de séquence supérieure à celle de HVR2, d'où la légitimité de son appellation de région hypervariable (Fig.1).

Nos analyses physico-chimiques (Fig.2a, 2b, 2c), la détermination des structures secondaires ainsi que le modèle en trois dimensions de la protéine E du tick-borne encephalitis virus (TBEV) (Fig.3) ont permis d'établir qu'il s'agissait d'une région se présentant à la surface de la glycoprotéine E2. De ce fait, HVR3 est la cible du système immunitaire de l'hôte infecté. En effet, des anticorps neutralisants spécifiques aux régions comprises dans HVR3 ont déjà été observé par différents auteurs (395, 541, 542). De plus, les paramètres de quasispéciation ont indiqué que la région HVR3 était sous l'influence de la pression sélective du système immunitaire (Table 2) : même si seulement un petit nombre d'individus ont révélé des valeurs du ratio dN/dS supérieures à 1 (en particulier pour HVR3a), une corrélation entre les dN/dS de HVR1 et de HVR3 a été déterminée, ce qui suggère la présence d'un facteur influençant de la même manière ces deux régions hypervariables.

Les résultats sur le ratio dN/dS de la région HVR3 ont montré les mêmes influences de la coinfection par le VIH et du traitement HAART que celles observées sur la région HVR1 (Table 2). En effet, la moyenne du ratio dN/dS diminue nettement chez les patients coinfectés par le VIH par rapport à ceux qui sont infectés seulement par le VHC, suggérant la responsabilité de l'immunosuppression tel que mentionné précédemment. Le ratio est toutefois rétabli chez les patients coinfectés et recevant un traitement HAART. A nouveau, la thérapie anti-VIH semble avoir un effet bénéfique également sur la région HVR3, dû

sans doute à la reconstitution immunitaire. Tel qu'attendu, le ratio dN/dS de HVR3 est significativement inférieur à celui de HVR1. Il pourrait s'agir d'une différence d'exposition à la surface, où HVR1 serait davantage exhibé au système immunitaire humoral, ou encore d'une contrainte de conservation au niveau des acides aminés de HVR3 qui empêcherait ou réduirait l'incidence des mutations. Ceci confirme également que HVR1 est la principale cible de la pression sélective du système immunitaire.

Malgré une certaine variabilité des résidus dans la région HVR3a, les analyses sur le caractère hydrophatique ainsi que sur la structure secondaire de cette région ont indiqué une grande conservation de la conformation, comme c'est le cas pour HVR1, ce qui suggère un rôle important à maintenir (391) (Fig.2). Nous avons émis l'hypothèse que la région HVR3a est impliquée dans la liaison à un récepteur de cellule ou encore dans l'entrée du virus dans la cellule. En effet, les résidus acides conservés dans la partie C-terminale de la région HVR3a suggèrent une interaction protéinique. De plus, des anticorps neutralisants spécifiques à HVR3a inhibent la liaison et l'infection de cellules *in vitro*, de même que la mutation d'un résidu asparagine pouvant être glycosylé (543). Son rôle pourrait donc être de lier un des récepteurs du VHC, comme le CD81, le SR-BI ou le sulfate d'héparane. HVR3a pourrait également jouer le rôle de peptide de fusion comme l'a suggéré un auteur au dernier congrès sur le VHC, qui a identifié un motif se trouvant dans la glycopotéine E2 et localisé dans la région HVR3 (544).

Le modèle proposé de HVR3 divisé en sous-domaines est soutenu par nos analyses. L'approche en « clustering » basée sur l'entropie en acides aminés a permis de mettre en évidence HVR3a et HVR3b (Fig.1). L'estimation de la diversité génétique a exposé un 3<sup>e</sup> sous-domaine, HVR3c, caractérisé par une diversité génétique plus élevée que HVR3a ou HVR3b (Table 1). Finalement, les propriétés physico-chimiques (Fig.2), les données sur la pression sélective (Table 2), ainsi que le modèle 3D (Fig.3) ont souligné l'importance du sous-domaine HVR3a et ont également permis d'élaborer des hypothèses quant à son rôle.



Enfin, de même que dans le premier article, les patients infectés par le VHC proviennent de la cohorte mère-enfant du CMIS (Centre Maternel et Infantile sur le SIDA), CHU mère-enfant Sainte-Justine. Ceci démontre que la région HVR3 est sous pression sélective du système immunitaire non seulement chez les patients infectés par le VHC, mais également chez les individus qui sont coïnfectés par le VIH, ou chez les patientes présentant une grossesse. Comme dans le second article, le faible effectif des sujets simplement infectés par le VHC conduit à une certaine limitation des analyses, qui toutefois semble être acceptable.

## Conclusion générale

Ce travail de thèse a montré un caractère exceptionnel à bien des égards et a apporté une avancée importante dans la recherche sur le VHC.

Nous avons montré que la protéine F, qui constitue maintenant la 11<sup>ème</sup> protéine synthétisée par le VHC, pouvait engendrer des réponses immunitaires cellulaires, en particulier cytotoxiques, aussi bien chez les patients coinfectés par le VIH. Ces réponses immunitaires, ajoutées à ses autres propriétés ont ainsi amené la possibilité de développer un vaccin avec la protéine F comme composante.

Nous avons également présenté une nouvelle région hypervariable, nommée HVR3, se situant dans la glycoprotéine E2 entre HVR1 et HVR2. Tout comme HVR1, cette région est soumise à des pressions sélectives du système immunitaire. Sa caractérisation a permis d'émettre des hypothèses quant à son rôle.

La ligne directrice de cette thèse a été l'étude de la femme enceinte et de l'influence de la grossesse sur certaines variables particulières au VHC. Ainsi, nous avons démontré que des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques à la protéine F ont été détectées durant la grossesse. La pression sélective sur les régions HVR1 et HVR3 semble être influencée par la coinfection avec le VIH et le traitement HAART. Comme attendu, la pression du système immunitaire sur la région HVR1 est particulière à chaque individu, et ne corrèle pas avec le temps. Finalement, même si certaines données ont indiqué une certaine similarité, des différences particulièrement au troisième trimestre de la grossesse indiquent que les patientes coinfectées par le VIH ne doivent pas être considérées de la même manière que les femmes seulement infectées par le VHC. La connaissance de ces données au cours de la grossesse sera importante dans le cadre d'éventuels traitements anti-VHC appliqués à ces différents groupes de patientes.

## **Bibliographie**

1. Beeson, P. 1943. Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma. Report of seven cases. *JAMA* 121:1332-1334.
2. Walsh, J.H., R.H. Purcell, A.G. Morrow, R.M. Chanock, and P.J. Schmidt. 1970. Posttransfusion hepatitis after open-heart operations. Incidence after the administration of blood from commercial and volunteer donor populations. *Jama* 211:261-265.
3. Domen, R.E. 1995. Paid-versus-volunteer blood donation in the United States: a historical review. *Transfus Med Rev* 9:53-59.
4. Blumberg, B.S., H.J. Alter, and S. Visnich. 1965. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Jama* 191:541-546.
5. NIH conference, N. 1970. Viral hepatitis (edited transcript, Combined Clinical Staff Conference). *Ann Intern Med.* 257-269.
6. Alter, H.J., P.V. Holland, R.H. Purcell, J.J. Lander, S.M. Feinstone, A.G. Morrow, and P.J. Schmidt. 1972. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 77:691-699.
7. Hoofnagle, J.H. 1990. Posttransfusion hepatitis B. *Transfusion* 30:384-386.
8. Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian, and R.H. Purcell. 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-1028.
9. Aach, R.D., W. Szmuness, J.W. Mosley, F.B. Hollinger, R.A. Kahn, C.E. Stevens, V.M. Edwards, and J. Werch. 1981. Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A, non-B hepatitis in recipients: the transfusion-transmitted viruses study. *N Engl J Med* 304:989-994.
10. Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.
11. Alter, H.J. 1995. To C or not to C: these are the questions. *Blood* 85:1681-1695.
12. Courouce, A.M., N. Le Marrec, A. Girault, S. Ducamp, and N. Simon. 1994. Anti-hepatitis C virus (anti-HCV) seroconversion in patients undergoing hemodialysis: comparison of second- and third-generation anti-HCV assays. *Transfusion* 34:790-795.

13. Barrera, J.M., B. Francis, G. Ercilla, M. Nelles, D. Achord, J. Darner, and S.R. Lee. 1995. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang* 68:15-18.
14. Chiavetta, J.A., M. Escobar, A. Newman, Y. He, P. Driezen, S. Deeks, D.E. Hone, S.F. O'Brien, and G. Sher. 2003. Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T-cell lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990-2000. *Cmaj* 169:767-773.
15. WHO. 2002. Global prevalence of hepatitis A, B, and C. *Weekly Epidemiological Record* 77.
16. Frank, C., M.K. Mohamed, G.T. Strickland, D. Lavanchy, R.R. Arthur, L.S. Magder, T. El Khoby, Y. Abdel-Wahab, E.S. Aly Ohn, W. Anwar, and I. Sallam. 2000. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 355:887-891.
17. Ray, S.C., R.R. Arthur, A. Carella, J. Bukh, and D.L. Thomas. 2000. Genetic epidemiology of hepatitis C virus throughout egypt. *J Infect Dis* 182:698-707.
18. Zou, S., M. Tepper, and A. Giulivi. 2001. Hepatitis C in Canada. *Can Commun Dis Rep* 27S3.
19. Zou, S., L. Forrester, and A. Giulivi. 2003. Hepatitis C update. *Can J Public Health* 94:127-129.
20. Remis, R. 2004. Estimating the incidence and prevalence of hepatitis C infection in Canada, 2002. In *2nd Canadian Conference on Hepatitis C*, Vancouver, British Columbia.
21. Boucher, M., and A. Gruslin. 2000. Sur les soins de santé en reproduction pour les femmes vivant avec l'hépatite C. *Directives Cliniques de la SOGC* 96.
22. Choo, Q.L., K.H. Richman, J.H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, P.J. Barr, and et al. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2451-2455.
23. Thomssen, R., S. Bonk, and A. Thiele. 1993. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 182:329-334.
24. Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wolk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, T. Maruyama, R.O. Hynes, D.R. Burton, J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626.

25. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T.J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-796.
26. Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D.R. Burton, S.F. Wieland, S.L. Uprichard, T. Wakita, and F.V. Chisari. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9294-9299.
27. Simmonds, P., E.C. Holmes, T.A. Cha, S.W. Chan, F. McOmish, B. Irvine, E. Beall, P.L. Yap, J. Kolberg, and M.S. Urdea. 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74 ( Pt 11):2391-2399.
28. Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J.M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I.T. Shin, L.J. Stuyver, H.J. Thiel, S. Viazov, A.J. Weiner, and A. Widell. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962-973.
29. Martell, M., J.I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia, and J. Gomez. 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66:3225-3229.
30. Stuyver, L., R. Rossau, A. Wyseur, M. Duhamel, B. Vanderborcht, H. Van Heuverswyn, and G. Maertens. 1993. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 74 ( Pt 6):1093-1102.
31. McOmish, F., S.W. Chan, B.C. Dow, J. Gillon, W.D. Frame, R.J. Crawford, P.L. Yap, E.A. Follett, and P. Simmonds. 1993. Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion* 33:7-13.
32. Ross, R.S., S.O. Viazov, C.D. Holtzer, A. Beyou, A. Monnet, C. Mazure, and M. Roggendorf. 2000. Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. *J Clin Microbiol* 38:3581-3584.
33. Simmonds, P. 2001. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol* 82:693-712.

34. Pybus, O.G., M.A. Charleston, S. Gupta, A. Rambaut, E.C. Holmes, and P.H. Harvey. 2001. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 292:2323-2325.
35. Pybus, O.G., A.J. Drummond, T. Nakano, B.H. Robertson, and A. Rambaut. 2003. The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol* 20:381-387.
36. Cochrane, A., B. Searle, A. Hardie, R. Robertson, T. Delahooke, S. Cameron, R.S. Tedder, G.M. Dusheiko, X. De Lamballerie, and P. Simmonds. 2002. A genetic analysis of hepatitis C virus transmission between injection drug users. *J Infect Dis* 186:1212-1221.
37. Ndjomou, J., O.G. Pybus, and B. Matz. 2003. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon. *J Gen Virol* 84:2333-2341.
38. Yee, T.T., A. Griffioen, C.A. Sabin, G. Dusheiko, and C.A. Lee. 2000. The natural history of HCV in a cohort of haemophilic patients infected between 1961 and 1985. *Gut* 47:845-851.
39. Franchini, M., G. Rossetti, A. Tagliaferri, F. Capra, E. de Maria, C. Pattacini, G. Lippi, G. Lo Cascio, M. de Gironcoli, and G. Gandini. 2001. The natural history of chronic hepatitis C in a cohort of HIV-negative Italian patients with hereditary bleeding disorders. *Blood* 98:1836-1841.
40. Resti, M., P. Jara, L. Hierro, C. Azzari, R. Giacchino, G. Zuin, L. Zancan, S. Pedditzi, and F. Bortolotti. 2003. Clinical features and progression of perinatally acquired hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 70:373-377.
41. Mazzeo, C., F. Azzaroli, S. Giovanelli, A. Dormi, D. Festi, A. Colecchia, A. Miracolo, P. Natale, G. Nigro, A. Alberti, E. Roda, and G. Mazzella. 2003. Ten year incidence of HCV infection in northern Italy and frequency of spontaneous viral clearance. *Gut* 52:1030-1034.
42. Rubbia-Brandt, L., R. Quadri, K. Abid, E. Giostra, P.J. Male, G. Mentha, L. Spahr, J.P. Zarski, B. Borisch, A. Hadengue, and F. Negro. 2000. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 33:106-115.
43. Adinolfi, L.E., M. Gambardella, A. Andreana, M.F. Tripodi, R. Utili, and G. Ruggiero. 2001. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 33:1358-1364.

44. Pawlotsky, J.M. 2003. Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral Res* 59:1-11.
45. Zeuzem, S. 2004. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* 140:370-381.
46. Boyer, J.C., and A.L. Haenni. 1994. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 198:415-426.
47. Brown, E.A., H. Zhang, L.H. Ping, and S.M. Lemon. 1992. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 20:5041-5045.
48. Spahn, C.M., J.S. Kieft, R.A. Grassucci, P.A. Penczek, K. Zhou, J.A. Doudna, and J. Frank. 2001. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291:1959-1962.
49. Ji, H., C.S. Fraser, Y. Yu, J. Leary, and J.A. Doudna. 2004. Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16990-16995.
50. Otto, G.A., and J.D. Puglisi. 2004. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119:369-380.
51. Kolykhalov, A.A., S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70:3363-3371.
52. Gontarek, R.R., L.L. Gutshall, K.M. Herold, J. Tsai, G.M. Sathe, J. Mao, C. Prescott, and A.M. Del Vecchio. 1999. hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic Acids Res* 27:1457-1463.
53. Cheng, J.C., M.F. Chang, and S.C. Chang. 1999. Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J Virol* 73:7044-7049.
54. McLauchlan, J., M.K. Lemberg, G. Hope, and B. Martoglio. 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Embo J* 21:3980-3988.
55. Kunkel, M., M. Lorinczi, R. Rijnbrand, S.M. Lemon, and S.J. Watowich. 2001. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* 75:2119-2129.



56. Chazal, N., and D. Gerlier. 2003. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:226-237, table of contents.
57. Matsumoto, M., S.B. Hwang, K.S. Jeng, N. Zhu, and M.M. Lai. 1996. Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* 218:43-51.
58. Lo, S.Y., M.J. Selby, and J.H. Ou. 1996. Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol* 70:5177-5182.
59. McLauchlan, J. 2000. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 7:2-14.
60. Lai, M.M., and C.F. Ware. 2000. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 242:117-134.
61. Kato, N. 2001. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 55:133-159.
62. Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y.S. Hahn, C.M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 71:697-704.
63. Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197:633-642.
64. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.
65. Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G.B. Knight, and Q.X. Zhang. 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12766-12771.
66. Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21:5017-5025.
67. Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia, and F.L. Cosset. 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278:41624-41630.

68. Taylor, D.R., S.T. Shi, P.R. Romano, G.N. Barber, and M.M. Lai. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285:107-110.
69. Sakai, A., M.S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh. 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.
70. Griffin, S.D., L.P. Beales, D.S. Clarke, O. Worsfold, S.D. Evans, J. Jaeger, M.P. Harris, and D.J. Rowlands. 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.
71. Pavlovic, D., D.C. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R.A. Dwek, W.B. Fischer, and N. Zitzmann. 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.
72. Steinmann, E., G. Koutsoudakis, S. Kallis, F. Penin, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2005. Role of p7-protein for hepatitis C virus particle production. In *12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses*, Montréal, Canada. Oral 31.
73. Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.
74. Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice. 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290:1972-1974.
75. Pieroni, L., E. Santolini, C. Fipaldini, L. Pacini, G. Migliaccio, and N. La Monica. 1997. In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. *J Virol* 71:6373-6380.
76. Reed, K.E., and C.M. Rice. 2000. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 242:55-84.
77. Kim, D.W., Y. Gwack, J.H. Han, and J. Choe. 1995. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 215:160-166.
78. Tai, C.L., W.K. Chi, D.S. Chen, and L.H. Hwang. 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 70:8477-8484.

79. Ishido, S., T. Fujita, and H. Hotta. 1998. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 244:35-40.
80. Lin, C., J.W. Wu, K. Hsiao, and M.S. Su. 1997. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol* 71:6465-6471.
81. Lamarre, D., P.C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bos, D.R. Cameron, M. Cartier, M.G. Cordingley, A.M. Faucher, N. Goudreau, S.H. Kawai, G. Kukolj, L. Lagace, S.R. LaPlante, H. Narjes, M.A. Poupard, J. Rancourt, R.E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y.S. Tsantrizos, S.M. Weldon, C.L. Yong, and M. Llinas-Brunet. 2003. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426:186-189.
82. Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76:5974-5984.
83. Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77:5487-5492.
84. Elazar, M., P. Liu, C.M. Rice, and J.S. Glenn. 2004. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol* 78:11393-11400.
85. Einav, S., M. Elazar, T. Danieli, and J.S. Glenn. 2004. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* 78:11288-11295.
86. Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H.E. Blum, R. Bartenschlager, and D. Moradpour. 2004. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 279:40835-40843.
87. Koch, J.O., and R. Bartenschlager. 1999. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* 73:7138-7146.
88. Neddermann, P., A. Clementi, and R. De Francesco. 1999. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active

- NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J Virol* 73:9984-9991.
89. Polyak, S.J. 2003. Hepatitis C virus--cell interactions and their role in pathogenesis. *Clin Liver Dis* 7:67-88.
  90. Enomoto, N., I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, Y. Ogura, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato. 1996. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334:77-81.
  91. Pawlotsky, J.M. 2000. Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* 32:889-896.
  92. Katze, M.G., Y. He, and M. Gale, Jr. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2:675-687.
  93. Lesburg, C.A., M.B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A.F. Mannarino, and P.C. Weber. 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 6:937-943.
  94. Schmidt-Mende, J., E. Bieck, T. Hugle, F. Penin, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2001. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 276:44052-44063.
  95. Bressanelli, S., L. Tomei, F.A. Rey, and R. De Francesco. 2002. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J Virol* 76:3482-3492.
  96. Thomas, D.L., D. Vlahov, L. Solomon, S. Cohn, E. Taylor, R. Garfein, and K.E. Nelson. 1995. Correlates of hepatitis C virus infections among injection drug users. *Medicine (Baltimore)* 74:212-220.
  97. Diaz, T., D.C. Des Jarlais, D. Vlahov, T.E. Perlis, V. Edwards, S.R. Friedman, R. Rockwell, D. Hoover, I.T. Williams, and E.R. Monterroso. 2001. Factors associated with prevalent hepatitis C: differences among young adult injection drug users in lower and upper Manhattan, New York City. *Am J Public Health* 91:23-30.
  98. Garfein, R.S., D. Vlahov, N. Galai, M.C. Doherty, and K.E. Nelson. 1996. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Public Health* 86:655-661.

99. Miller, C.L., C. Johnston, P.M. Spittal, K. Li, N. Laliberte, J.S. Montaner, and M.T. Schechter. 2002. Opportunities for prevention: hepatitis C prevalence and incidence in a cohort of young injection drug users. *Hepatology* 36:737-742.
100. Des Jarlais, D.C., T. Diaz, T. Perlis, D. Vlahov, C. Maslow, M. Latka, R. Rockwell, V. Edwards, S.R. Friedman, E. Monterroso, I. Williams, and R.S. Garfein. 2003. Variability in the incidence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infection among young injecting drug users in New York City. *Am J Epidemiol* 157:467-471.
101. Thorpe, L.E., L.J. Ouellet, R. Hershow, S.L. Bailey, I.T. Williams, J. Williamson, E.R. Monterroso, and R.S. Garfein. 2002. Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment. *Am J Epidemiol* 155:645-653.
102. Allander, T., C. Medin, S.H. Jacobson, L. Grillner, and M.A. Persson. 1994. Hepatitis C transmission in a hemodialysis unit: molecular evidence for spread of virus among patients not sharing equipment. *J Med Virol* 43:415-419.
103. Forns, X., P. Fernandez-Llama, M. Pons, J. Costa, S. Ampurdanes, F.X. Lopez-Labrador, E. Olmedo, J. Lopez-Pedret, A. Darnell, L. Revert, J.M. Sanchez-Tapias, and J. Rodes. 1997. Incidence and risk factors of hepatitis C virus infection in a haemodialysis unit. *Nephrol Dial Transplant* 12:736-740.
104. Almroth, G., B. Ekermo, A.S. Mansson, G. Svensson, and A. Widell. 2002. Detection and prevention of hepatitis C in dialysis patients and renal transplant recipients. A long-term follow up (1989-January 1997). *J Intern Med* 251:119-128.
105. Savey, A., F. Simon, J. Izopet, A. Lepoutre, J. Fabry, and J.C. Desenclos. 2005. A large nosocomial outbreak of hepatitis C virus infections at a hemodialysis center. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26:752-760.
106. Pereira, B.J., E.L. Milford, R.L. Kirkman, S. Quan, K.R. Sayre, P.J. Johnson, J.C. Wilber, and A.S. Levey. 1992. Prevalence of hepatitis C virus RNA in organ donors positive for hepatitis C antibody and in the recipients of their organs. *N Engl J Med* 327:910-915.
107. Bourlet, T., R. Levy, A. Maertens, J.C. Tardy, F. Grattard, H. Cordonier, J.L. Laurent, J.F. Guerin, and B. Pozzetto. 2002. Detection and characterization of hepatitis C virus RNA in seminal plasma and spermatozoon fractions of semen from patients attempting medically assisted conception. *J Clin Microbiol* 40:3252-3255.
108. Pasquier, C., L. Bujan, M. Daudin, L. Righi, L. Berges, L. Thauvin, A. Berrebi, P. Massip, J. Puel, and J. Izopet. 2003. Intermittent detection of hepatitis C

- virus (HCV) in semen from men with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HCV. *J Med Virol* 69:344-349.
109. Manavi, M., T. Watkins-Riedel, E. Kucera, K. Czerwenka, and H. Hofmann. 1999. Evidence of hepatitis C virus in cervical smears. *J Infect* 38:60-61.
  110. Ackerman, Z., O. Paltiel, F. Glikberg, and E. Ackerman. 1998. Hepatitis C virus in various human body fluids: a systematic review. *Hepatol Res* 11:26-40.
  111. Saillour, F., F. Dabis, M. Dupon, D. Lacoste, P. Trimoulet, P. Rispal, E. Monlun, J.M. Ragnaud, P. Morlat, J.L. Pellegrin, H. Fleury, and P. Couzigou. 1996. Prevalence and determinants of antibodies to hepatitis C virus and markers for hepatitis B virus infection in patients with HIV infection in Aquitaine. Groupe d'Epidemiologie Clinique du SIDA en Aquitaine. *Bmj* 313:461-464.
  112. Terrault, N.A. 2002. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 36:S99-105.
  113. Vandelli, C., F. Renzo, L. Romano, S. Tisminetzky, M. De Palma, T. Stroffolini, E. Ventura, and A. Zanetti. 2004. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol* 99:855-859.
  114. Thomas, S.L., M.L. Newell, C.S. Peckham, A.E. Ades, and A.J. Hall. 1998. A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission: risks of transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. *Int J Epidemiol* 27:108-117.
  115. Alric, L., N. Costedoat, J.C. Piette, M. Duffaut, and P. Cacoub. 2002. [Hepatitis C and pregnancy]. *Rev Med Interne* 23:283-291.
  116. Yeung, L.T., S.M. King, and E.A. Roberts. 2001. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* 34:223-229.
  117. Serfaty, L. 1999. [Non-transfusional and non-intravenous drug addiction related transmission of hepatitis C virus]. *Presse Med* 28:1135-1140.
  118. Cooper, B.W., A. Krusell, R.C. Tilton, R. Goodwin, and R.E. Levitz. 1992. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 13:82-85.
  119. Thomas, D.L., S.H. Factor, G.D. Kelen, A.S. Washington, E. Taylor, Jr., and T.C. Quinn. 1993. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. The seroprevalence of and risk factors for hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Arch Intern Med* 153:1705-1712.

120. Polish, L.B., M.J. Tong, R.L. Co, P.J. Coleman, and M.J. Alter. 1993. Risk factors for hepatitis C virus infection among health care personnel in a community hospital. *Am J Infect Control* 21:196-200.
121. Lanphear, B.P., C.C. Linnemann, Jr., C.G. Cannon, M.M. DeRonde, L. Pender, and L.M. Kerley. 1994. Hepatitis C virus infection in healthcare workers: risk of exposure and infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 15:745-750.
122. Catalani, C., A. Biggeri, A. Gottard, M. Benvenuti, E. Frati, and C. Cecchini. 2004. Prevalence of HCV infection among health care workers in a hospital in central Italy. *Eur J Epidemiol* 19:73-77.
123. Montella, M., A. Crispo, M. Grimaldi, P. Ruffolo, D. Ronga, F. Izzo, and A.A. Mastro. 2005. An assessment of hepatitis C virus infection among health-care workers of the National Cancer Institute of Naples, Southern Italy. *Eur J Public Health* 15:467-469.
124. Tumminelli, F., P. Marcellin, S. Rizzo, S. Barbera, G. Corvino, P. Furia, J.P. Benhamou, and S. Erlinger. 1995. Shaving as potential source of hepatitis C virus infection. *Lancet* 345:658.
125. Mele, A., R. Corona, M.E. Tosti, F. Palumbo, A. Moiraghi, F. Novaco, C. Galanti, R. Bernacchia, and P. Ferraro. 1995. Beauty treatments and risk of parenterally transmitted hepatitis: results from the hepatitis surveillance system in Italy. *Scand J Infect Dis* 27:441-444.
126. Sun, D.X., F.G. Zhang, Y.Q. Geng, and D.S. Xi. 1996. Hepatitis C transmission by cosmetic tattooing in women. *Lancet* 347:541.
127. Murphy, E.L., S.M. Bryzman, S.A. Glynn, D.I. Ameti, R.A. Thomson, A.E. Williams, C.C. Nass, H.E. Ownby, G.B. Schreiber, F. Kong, K.R. Neal, and G.J. Nemo. 2000. Risk factors for hepatitis C virus infection in United States blood donors. NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). *Hepatology* 31:756-762.
128. Post, J.J., K.A. Dolan, L.R. Whybin, I.W. Carter, P.S. Haber, and A.R. Lloyd. 2001. Acute hepatitis C virus infection in an Australian prison inmate: tattooing as a possible transmission route. *Med J Aust* 174:183-184.
129. Habib, M., M.K. Mohamed, F. Abdel-Aziz, L.S. Magder, M. Abdel-Hamid, F. Gamil, S. Madkour, N.N. Mikhail, W. Anwar, G.T. Strickland, A.D. Fix, and I. Sallam. 2001. Hepatitis C virus infection in a community in the Nile Delta: risk factors for seropositivity. *Hepatology* 33:248-253.
130. Chandra, M., M.N. Khaja, N. Farees, C.D. Poduri, M.M. Hussain, M. Aejaaz Habeeb, and C.M. Habibullah. 2003. Prevalence, risk factors and genotype

- distribution of HCV and HBV infection in the tribal population: a community based study in south India. *Trop Gastroenterol* 24:193-195.
131. CDC. 1998. Recommendations and Reports. *MMWR* 47:1-39.
  132. Farci, P., H.J. Alter, D. Wong, R.H. Miller, J.W. Shih, B. Jett, and R.H. Purcell. 1991. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 325:98-104.
  133. Barrera, J.M., M. Bruguera, M.G. Ercilla, C. Gil, R. Celis, M.P. Gil, M. del Valle Onorato, J. Rodes, and A. Ordinas. 1995. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 21:639-644.
  134. Poynard, T., P. Bedossa, and P. Opolon. 1997. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 349:825-832.
  135. Datz, C., M. Cramp, T. Haas, O. Dietze, H. Nitschko, G. Froesner, N. Muss, F. Sandhofer, and W. Vogel. 1999. The natural course of hepatitis C virus infection 18 years after an epidemic outbreak of non-A, non-B hepatitis in a plasmapheresis centre. *Gut* 44:563-567.
  136. Fattovich, G., G. Giustina, F. Degos, F. Tremolada, G. Diodati, P. Almasio, F. Nevens, A. Solinas, D. Mura, J.T. Brouwer, H. Thomas, C. Njapoum, C. Casarin, P. Bonetti, P. Fuschi, J. Basho, A. Tocco, A. Bhalla, R. Galassini, F. Noventa, S.W. Schalm, and G. Realdi. 1997. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 112:463-472.
  137. Manns, M.P., J.G. McHutchison, S.C. Gordon, V.K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z.D. Goodman, K. Koury, M. Ling, and J.K. Albrecht. 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.
  138. Fried, M.W., M.L. Shiffman, K.R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F.L. Goncalves, Jr., D. Haussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman, and J. Yu. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347:975-982.
  139. Shiffman, M.L. 2002. Retreatment of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 36:S128-134.
  140. 2002. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C 2002 (June 10-12, 2002). *Gastroenterology* 123:2082-2099.



141. Di Bisceglie, A.M., P. Martin, C. Kassianides, M. Lisker-Melman, L. Murray, J. Waggoner, Z. Goodman, S.M. Banks, and J.H. Hoofnagle. 1989. Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 321:1506-1510.
142. Carithers, R.L., Jr., and S.S. Emerson. 1997. Therapy of hepatitis C: meta-analysis of interferon alfa-2b trials. *Hepatology* 26:83S-88S.
143. Poynard, T., P. Marcellin, S.S. Lee, C. Niederau, G.S. Minuk, G. Ideo, V. Bain, J. Heathcote, S. Zeuzem, C. Trepo, and J. Albrecht. 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 352:1426-1432.
144. McHutchison, J.G., S.C. Gordon, E.R. Schiff, M.L. Shiffman, W.M. Lee, V.K. Rustgi, Z.D. Goodman, M.H. Ling, S. Cort, and J.K. Albrecht. 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.
145. Hadziyannis, S.J., H. Sette, Jr., T.R. Morgan, V. Balan, M. Diago, P. Marcellin, G. Ramadori, H. Bodenheimer, Jr., D. Bernstein, M. Rizzetto, S. Zeuzem, P.J. Pockros, A. Lin, and A.M. Ackrill. 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.
146. Jaeckel, E., M. Cornberg, H. Wedemeyer, T. Santantonio, J. Mayer, M. Zankel, G. Pastore, M. Dietrich, C. Trautwein, and M.P. Manns. 2001. Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 345:1452-1457.
147. Gerlach, J.T., H.M. Diepolder, R. Zachoval, N.H. Gruener, M.C. Jung, A. Ulsenheimer, W.W. Schraut, C.A. Schirren, M. Waechtler, M. Backmund, and G.R. Pape. 2003. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 125:80-88.
148. Nomura, H., S. Sou, H. Tanimoto, T. Nagahama, Y. Kimura, J. Hayashi, H. Ishibashi, and S. Kashiwagi. 2004. Short-term interferon-alfa therapy for acute hepatitis C: a randomized controlled trial. *Hepatology* 39:1213-1219.
149. Kim, A.I., and S. Saab. 2005. Treatment of hepatitis C. *Am J Med* 118:808-815.
150. Osborn, B.L., H.S. Olsen, B. Nardelli, J.H. Murray, J.X. Zhou, A. Garcia, G. Moody, L.S. Zaritskaya, and C. Sung. 2002. Pharmacokinetic and

- pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 303:540-548.
151. Moskovitz, D.N., P. Manoharan, and E.J. Heathcote. 2003. High dose consensus interferon in nonresponders to interferon alpha-2b and ribavirin with chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol* 17:479-482.
  152. Masci, P., R.M. Bukowski, P.A. Patten, B.L. Osborn, and E.C. Borden. 2003. New and modified interferon alphas: preclinical and clinical data. *Curr Oncol Rep* 5:108-113.
  153. Sjogren, M.H., R. Sjogren, K. Holtzmuller, B. Winston, B. Butterfield, S. Drake, A. Watts, R. Howard, and M. Smith. 2005. Interferon alfacon-1 and ribavirin versus interferon alpha-2b and ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 50:727-732.
  154. Barnard, D. 2002. Viramidine (Ribapharm). *Curr Opin Investig Drugs* 3:1585-1589.
  155. Fang, C., P. Srivastava, and C.C. Lin. 2003. Effect of ribavirin, levovirin and viramidine on liver toxicological gene expression in rats. *J Appl Toxicol* 23:453-459.
  156. Lin, C.C., T. Luu, D. Lourenco, L.T. Yeh, and J.Y. Lau. 2003. Absorption, pharmacokinetics and excretion of levovirin in rats, dogs and cynomolgus monkeys. *J Antimicrob Chemother* 51:93-99.
  157. Wu, J.Z., G. Larson, H. Walker, J.H. Shim, and Z. Hong. 2005. Phosphorylation of ribavirin and viramidine by adenosine kinase and cytosolic 5'-nucleotidase II: Implications for ribavirin metabolism in erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2164-2171.
  158. Witherell, G.W. 2001. ISIS-14803 (Isis Pharmaceuticals). *Curr Opin Investig Drugs* 2:1523-1529.
  159. Randall, G., A. Grakoui, and C.M. Rice. 2003. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:235-240.
  160. Thibeault, D., C. Bousquet, R. Gingras, L. Lagace, R. Maurice, P.W. White, and D. Lamarre. 2004. Sensitivity of NS3 serine proteases from hepatitis C virus genotypes 2 and 3 to the inhibitor BILN 2061. *J Virol* 78:7352-7359.
  161. Hinrichsen, H., Y. Benhamou, H. Wedemeyer, M. Reiser, R.E. Sentjens, J.L. Calleja, X. Forns, A. Erhardt, J. Cronlein, R.L. Chaves, C.L. Yong, G. Nehmiz, and G.G. Steinmann. 2004. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a

- hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology* 127:1347-1355.
162. Lin, C., K. Lin, Y.P. Luong, B.G. Rao, Y.Y. Wei, D.L. Brennan, J.R. Fulghum, H.M. Hsiao, S. Ma, J.P. Maxwell, K.M. Cottrell, R.B. Perni, C.A. Gates, and A.D. Kwong. 2004. In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem* 279:17508-17514.
  163. Soler, M., J.G. McHutchison, T.J. Kwoh, F.A. Dorr, and J.M. Pawlotsky. 2004. Virological effects of ISIS 14803, an antisense oligonucleotide inhibitor of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES), on HCV IRES in chronic hepatitis C patients and examination of the potential role of primary and secondary HCV resistance in the outcome of treatment. *Antivir Ther* 9:953-968.
  164. Ryu, K.J., and S.W. Lee. 2004. Comparative analysis of intracellular trans-splicing ribozyme activity against hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J Microbiol* 42:361-364.
  165. Summa, V. 2005. VX-950 (Vertex/Mitsubishi). *Curr Opin Investig Drugs* 6:831-837.
  166. Horsmans, Y., T. Berg, J.P. Desager, T. Mueller, E. Schott, S.P. Fletcher, K.R. Steffy, L.A. Bauman, B.M. Kerr, and D.R. Averett. 2005. Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 42:724-731.
  167. De Francesco, R., and G. Migliaccio. 2005. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 436:953-960.
  168. Houghton, M., and S. Abrignani. 2005. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* 436:961-966.
  169. Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
  170. Popovic, M., M.G. Sarngadharan, E. Read, and R.C. Gallo. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
  171. WHO, UNAIDS. 2005. AIDS Epidemic Update.

172. Shiao, J., L. Guo, and M.L. McLaws. 2002. Estimation of the risk of bloodborne pathogens to health care workers after a needlestick injury in Taiwan. *Am J Infect Control* 30:15-20.
173. Cardo, D.M., D.H. Culver, C.A. Ciesielski, P.U. Srivastava, R. Marcus, D. Abiteboul, J. Heptonstall, G. Ippolito, F. Lot, P.S. McKibben, and D.M. Bell. 1997. A case-control study of HIV seroconversion in health care workers after percutaneous exposure. Centers for Disease Control and Prevention Needlestick Surveillance Group. *N Engl J Med* 337:1485-1490.
174. Villano, S.A., D. Vlahov, K.E. Nelson, C.M. Lyles, S. Cohn, and D.L. Thomas. 1997. Incidence and risk factors for hepatitis C among injection drug users in Baltimore, Maryland. *J Clin Microbiol* 35:3274-3277.
175. Schreiber, G.B., M.P. Busch, S.H. Kleinman, and J.J. Korelitz. 1996. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 334:1685-1690.
176. Eyster, M.E., H.J. Alter, L.M. Aledort, S. Quan, A. Hatzakis, and J.J. Goedert. 1991. Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med* 115:764-768.
177. Verucchi, G., L. Calza, R. Manfredi, and F. Chiodo. 2004. Human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfection: epidemiology, natural history, therapeutic options and clinical management. *Infection* 32:33-46.
178. Landesman, S.H., L.A. Kalish, D.N. Burns, H. Minkoff, H.E. Fox, C. Zorrilla, P. Garcia, M.G. Fowler, L. Mofenson, and R. Tuomala. 1996. Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to child. The Women and Infants Transmission Study. *N Engl J Med* 334:1617-1623.
179. Greub, G., B. Ledergerber, M. Battegay, P. Grob, L. Perrin, H. Furrer, P. Burgisser, P. Erb, K. Boggian, J.C. Piffaretti, B. Hirschel, P. Janin, P. Francioli, M. Flepp, and A. Telenti. 2000. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 356:1800-1805.
180. Waldrep, T.W., K.K. Summers, and P.A. Chiliade. 2000. Coinfection with HIV and HCV: more questions than answers? *Pharmacotherapy* 20:1499-1507.
181. Sulkowski, M.S., R.D. Moore, S.H. Mehta, R.E. Chaisson, and D.L. Thomas. 2002. Hepatitis C and progression of HIV disease. *Jama* 288:199-206.

182. Sherman, K.E., S.D. Rouster, R.T. Chung, and N. Rajicic. 2002. Hepatitis C Virus prevalence among patients infected with Human Immunodeficiency Virus: a cross-sectional analysis of the US adult AIDS Clinical Trials Group. *Clin Infect Dis* 34:831-837.
183. Soriano, V., M. Sulkowski, C. Bergin, A. Hatzakis, P. Cacoub, C. Katlama, A. Cargnel, S. Mauss, D. Dieterich, S. Moreno, C. Ferrari, T. Poynard, and J. Rockstroh. 2002. Care of patients with chronic hepatitis C and HIV co-infection: recommendations from the HIV-HCV International Panel. *Aids* 16:813-828.
184. Thomas, D.L. 2002. Hepatitis C and human immunodeficiency virus infection. *Hepatology* 36:S201-209.
185. Thomas, D.L., J. Astemborski, D. Vlahov, S.A. Strathdee, S.C. Ray, K.E. Nelson, N. Galai, K.R. Nolt, O. Laeyendecker, and J.A. Todd. 2000. Determinants of the quantity of hepatitis C virus RNA. *J Infect Dis* 181:844-851.
186. Goedert, J.J., A. Hatzakis, K.E. Sherman, and M.E. Eyster. 2001. Lack of association of hepatitis C virus load and genotype with risk of end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus coinfection. *J Infect Dis* 184:1202-1205.
187. Martinez-Sierra, C., A. Arizcorreta, F. Diaz, R. Roldan, L. Martin-Herrera, E. Perez-Guzman, and J.A. Giron-Gonzalez. 2003. Progression of chronic hepatitis C to liver fibrosis and cirrhosis in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 36:491-498.
188. Bonacini, M., S. Govindarajan, L.M. Blatt, P. Schmid, A. Conrad, and K.L. Lindsay. 1999. Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. *J Viral Hepat* 6:203-208.
189. Di Martino, V., P. Rufat, N. Boyer, P. Renard, F. Degos, M. Martinot-Peignoux, S. Matheron, V. Le Moing, F. Vachon, C. Degott, D. Valla, and P. Marcellin. 2001. The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. *Hepatology* 34:1193-1199.
190. Tedeschi, R., E. Pivetta, S. Zanussi, E. Bidoli, M. Ros, G. di Gennaro, G. Nasti, and P. De Paoli. 2003. Quantification of hepatitis C virus (HCV) in liver specimens and sera from patients with human immunodeficiency virus coinfection by using the Versant HCV RNA 3.0 (branched DNA-based) DNA assay. *J Clin Microbiol* 41:3046-3050.

191. Eyster, M.E., M.W. Fried, A.M. Di Bisceglie, and J.J. Goedert. 1994. Increasing hepatitis C virus RNA levels in hemophiliacs: relationship to human immunodeficiency virus infection and liver disease. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Blood* 84:1020-1023.
192. Valdez, H., D. Anthony, F. Farukhi, A. Patki, J. Salkowitz, P. Heeger, D.L. Peterson, A.B. Post, R. Asaad, and M.M. Lederman. 2000. Immune responses to hepatitis C and non-hepatitis C antigens in hepatitis C virus infected and HIV-1 coinfecting patients. *Aids* 14:2239-2246.
193. Daar, E.S., H. Lynn, S. Donfield, E. Gomperts, S.J. O'Brien, M.W. Hilgartner, W.K. Hoots, D. Chernoff, S. Arkin, W.Y. Wong, and C.A. Winkler. 2001. Hepatitis C virus load is associated with human immunodeficiency virus type 1 disease progression in hemophiliacs. *J Infect Dis* 183:589-595.
194. Daar, E.S., H. Lynn, S. Donfield, E. Gomperts, M.W. Hilgartner, W.K. Hoots, D. Chernoff, S. Arkin, W.Y. Wong, and C.A. Winkler. 2001. Relation between HIV-1 and hepatitis C viral load in patients with hemophilia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26:466-472.
195. Matthews-Greer, J.M., G.C. Caldito, S.D. Adley, R. Willis, A.C. Mire, R.M. Jamison, K.L. McRae, J.W. King, and W.L. Chang. 2001. Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:690-694.
196. Garcia-Samaniego, J., V. Soriano, J. Castilla, R. Bravo, A. Moreno, J. Carbo, A. Iniguez, J. Gonzalez, and F. Munoz. 1997. Influence of hepatitis C virus genotypes and HIV infection on histological severity of chronic hepatitis C. The Hepatitis/HIV Spanish Study Group. *Am J Gastroenterol* 92:1130-1134.
197. Graham, C.S., L.R. Baden, E. Yu, J.M. Mrus, J. Carnie, T. Heeren, and M.J. Koziel. 2001. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 33:562-569.
198. Poynard, T., P. Mathurin, C.L. Lai, D. Guyader, R. Poupon, M.H. Tainturier, R.P. Myers, M. Muntenau, V. Ratziu, M. Manns, A. Vogel, F. Capron, A. Chedid, and P. Bedossa. 2003. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 38:257-265.
199. Martin-Carbonero, L., Y. Benhamou, M. Puoti, J. Berenguer, J. Mallolas, C. Quereda, A. Arizcorreta, A. Gonzalez, J. Rockstroh, V. Asensi, P. Miralles, M. Laguno, L. Moreno, J.A. Giron, M. Vogel, J. Garcia-Samaniego, M. Nunez, M. Romero, S. Moreno, J.J. de la Cruz, and V. Soriano. 2004. Incidence and predictors of severe liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected

- patients with chronic hepatitis C: a European collaborative study. *Clin Infect Dis* 38:128-133.
200. Soto, B., A. Sanchez-Quijano, L. Rodrigo, J.A. del Olmo, M. Garcia-Bengochea, J. Hernandez-Quero, C. Rey, M.A. Abad, M. Rodriguez, M. Sales Gilabert, F. Gonzalez, P. Miron, A. Caruz, F. Relimpio, R. Torronteras, M. Leal, and E. Lissen. 1997. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol* 26:1-5.
  201. Benhamou, Y., M. Bochet, V. Di Martino, F. Charlotte, F. Azria, A. Coutellier, M. Vidaud, F. Bricaire, P. Opolon, C. Katlama, and T. Poynard. 1999. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology* 30:1054-1058.
  202. Mohsen, A.H., P.J. Easterbrook, C. Taylor, B. Portmann, R. Kulasegaram, S. Murad, M. Wiselka, and S. Norris. 2003. Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients. *Gut* 52:1035-1040.
  203. Garcia-Samaniego, J., M. Rodriguez, J. Berenguer, R. Rodriguez-Rosado, J. Carbo, V. Asensi, and V. Soriano. 2001. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 96:179-183.
  204. Bruno, R., P. Sacchi, C. Filice, M. Puoti, and G. Filice. 2002. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis: an emerging issue. *J Acquir Immune Defic Syndr* 30:535-536.
  205. Seeff, L.B. 1999. Natural history of hepatitis C. *Am J Med* 107:10S-15S.
  206. Darby, S.C., D.W. Ewart, P.L. Giangrande, R.J. Spooner, C.R. Rizza, G.M. Dusheiko, C.A. Lee, C.A. Ludlam, and F.E. Preston. 1997. Mortality from liver cancer and liver disease in haemophilic men and boys in UK given blood products contaminated with hepatitis C. UK Haemophilia Centre Directors' Organisation. *Lancet* 350:1425-1431.
  207. Lauer, G.M., T.N. Nguyen, C.L. Day, G.K. Robbins, T. Flynn, K. McGowan, E.S. Rosenberg, M. Lucas, P. Klenerman, R.T. Chung, and B.D. Walker. 2002. Human immunodeficiency virus type 1-hepatitis C virus coinfection: intraindividual comparison of cellular immune responses against two persistent viruses. *J Virol* 76:2817-2826.
  208. Thomas, D.L., J. Astemborski, R.M. Rai, F.A. Anania, M. Schaeffer, N. Galai, K. Nolt, K.E. Nelson, S.A. Strathdee, L. Johnson, O. Laeyendecker, J. Boitnott, L.E. Wilson, and D. Vlahov. 2000. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *Jama* 284:450-456.

209. Mehta, S.H., A. Cox, D.R. Hoover, X.H. Wang, Q. Mao, S. Ray, S.A. Strathdee, D. Vlahov, and D.L. Thomas. 2002. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 359:1478-1483.
210. Woitas, R.P., J.K. Rockstroh, I. Beier, G. Jung, B. Kochan, B. Matz, H.H. Brackmann, T. Sauerbruch, and U. Spengler. 1999. Antigen-specific cytokine response to hepatitis C virus core epitopes in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *Aids* 13:1313-1322.
211. Housset, C., E. Lamas, V. Courgnaud, O. Boucher, P.M. Girard, C. Marche, and C. Brechot. 1993. Presence of HIV-1 in human parenchymal and non-parenchymal liver cells in vivo. *J Hepatol* 19:252-258.
212. Vlahakis, S.R., A. Villasis-Keever, T.S. Gomez, G.D. Bren, and C.V. Paya. 2003. Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human hepatocytes via CXCR4. *J Infect Dis* 188:1455-1460.
213. Rockstroh, J.K., A. Theisen, R. Kaiser, T. Sauerbruch, and U. Spengler. 1998. Antiretroviral triple therapy decreases HIV viral load but does not alter hepatitis C virus (HCV) serum levels in HIV-HCV-co-infected haemophiliacs. *Aids* 12:829-830.
214. Zylberberg, H., G. Pialoux, F. Carnot, A. Landau, C. Brechot, and S. Pol. 1998. Rapidly evolving hepatitis C virus-related cirrhosis in a human immunodeficiency virus-infected patient receiving triple antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 27:1255-1258.
215. Rutschmann, O.T., F. Negro, B. Hirschel, A. Hadengue, D. Anwar, and L.H. Perrin. 1998. Impact of treatment with human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors on hepatitis C viremia in patients coinfecting with HIV. *J Infect Dis* 177:783-785.
216. Vento, S., T. Garofano, C. Renzini, F. Casali, T. Ferraro, and E. Concia. 1998. Enhancement of hepatitis C virus replication and liver damage in HIV-coinfected patients on antiretroviral combination therapy. *Aids* 12:116-117.
217. Ragni, M.V., and F.A. Bontempo. 1999. Increase in hepatitis C virus load in hemophiliacs during treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 180:2027-2029.
218. Perez-Olmeda, M., J. Garcia-Samaniego, and V. Soriano. 2000. Hepatitis C viraemia in HIV-HCV co-infected patients having immune restoration with highly active antiretroviral therapy. *Aids* 14:212.
219. Fialaire, P., C. Payan, D. Vitour, J.M. Chenebault, J. Loison, E. Pichard, and F. Lunel. 1999. Sustained disappearance of hepatitis C viremia in patients



- receiving protease inhibitor treatment for human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 180:574-575.
220. Chung, R.T., S.R. Evans, Y. Yang, D. Theodore, H. Valdez, R. Clark, C. Shikuma, T. Nevin, and K.E. Sherman. 2002. Immune recovery is associated with persistent rise in hepatitis C virus RNA, infrequent liver test flares, and is not impaired by hepatitis C virus in co-infected subjects. *Aids* 16:1915-1923.
221. Gavazzi, G., O. Bouchard, P. Leclercq, C. Morel-Baccard, A. Bosseray, N. Dutertre, M. Micoud, and P. Morand. 2000. Change in transaminases in hepatitis C virus- and HIV-coinfected patients after highly active antiretroviral therapy: differences between complete and partial virologic responders? *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1021-1023.
222. John, M., J. Flexman, and M.A. French. 1998. Hepatitis C virus-associated hepatitis following treatment of HIV-infected patients with HIV protease inhibitors: an immune restoration disease? *Aids* 12:2289-2293.
223. Puoti, M., C. Torti, D. Ripamonti, F. Castelli, S. Zaltron, B. Zanini, A. Spinetti, V. Putzolu, S. Casari, L. Tomasoni, E. Quiros-Roldan, M. Favret, L. Berchich, P. Grigolato, F. Callea, and G. Carosi. 2003. Severe hepatotoxicity during combination antiretroviral treatment: incidence, liver histology, and outcome. *J Acquir Immune Defic Syndr* 32:259-267.
224. Sulkowski, M.S., D.L. Thomas, R.E. Chaisson, and R.D. Moore. 2000. Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C or B virus infection. *Jama* 283:74-80.
225. Sulkowski, M.S., D.L. Thomas, S.H. Mehta, R.E. Chaisson, and R.D. Moore. 2002. Hepatotoxicity associated with nevirapine or efavirenz-containing antiretroviral therapy: role of hepatitis C and B infections. *Hepatology* 35:182-189.
226. Montessori, V., M. Harris, and J.S. Montaner. 2003. Hepatotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Semin Liver Dis* 23:167-172.
227. Sundar, K., M. Suarez, P.E. Banogon, and J.M. Shapiro. 1997. Zidovudine-induced fatal lactic acidosis and hepatic failure in patients with acquired immunodeficiency syndrome: report of two patients and review of the literature. *Crit Care Med* 25:1425-1430.
228. Bissuel, F., F. Bruneel, F. Habersetzer, D. Chassard, L. Cotte, M. Chevallier, J. Bernuau, J.C. Lucet, and C. Trepo. 1994. Fulminant hepatitis with severe lactate acidosis in HIV-infected patients on didanosine therapy. *J Intern Med* 235:367-371.

229. Lenzo, N.P., B.A. Garas, and M.A. French. 1997. Hepatic steatosis and lactic acidosis associated with stavudine treatment in an HIV patient: a case report. *Aids* 11:1294-1296.
230. Flexner, C. 1998. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med* 338:1281-1292.
231. Sulkowski, M.S. 2003. Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy containing HIV-1 protease inhibitors. *Semin Liver Dis* 23:183-194.
232. Piroth, L., M. Duong, C. Quantin, M. Abrahamowicz, R. Michardiere, L.S. Aho, M. Grappin, M. Buisson, A. Waldner, H. Portier, and P. Chavanet. 1998. Does hepatitis C virus co-infection accelerate clinical and immunological evolution of HIV-infected patients? *Aids* 12:381-388.
233. Lesens, O., M. Deschenes, M. Steben, G. Belanger, and C.M. Tsoukas. 1999. Hepatitis C virus is related to progressive liver disease in human immunodeficiency virus-positive hemophiliacs and should be treated as an opportunistic infection. *J Infect Dis* 179:1254-1258.
234. De Luca, A., R. Bugarini, A.C. Lepri, M. Puoti, E. Girardi, A. Antinori, A. Poggio, G. Pagano, G. Tositti, G. Cadeo, A. Macor, M. Toti, and A. D'Arminio Monforte. 2002. Coinfection with hepatitis viruses and outcome of initial antiretroviral regimens in previously naive HIV-infected subjects. *Arch Intern Med* 162:2125-2132.
235. Rancinan, C., D. Neau, M. Saves, S. Lawson-Ayayi, F. Bonnet, P. Mercie, M. Dupon, P. Couzigou, F. Dabis, and G. Chene. 2002. Is hepatitis C virus co-infection associated with survival in HIV-infected patients treated by combination antiretroviral therapy? *Aids* 16:1357-1362.
236. Tedaldi, E.M., R.K. Baker, A.C. Moorman, C.F. Alzola, J. Furhrer, R.E. McCabe, K.C. Wood, and S.D. Holmberg. 2003. Influence of coinfection with hepatitis C virus on morbidity and mortality due to human immunodeficiency virus infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 36:363-367.
237. Landau, A., D. Batisse, C. Piketty, J.P. Duong Van Huyen, F. Bloch, L. Belec, P. Bruneval, L. Weiss, R. Jian, and M.D. Kazatchkine. 2001. Long-term efficacy of combination therapy with interferon-alpha 2b and ribavirin for severe chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *Aids* 15:2149-2155.
238. Sauleda, S., A. Juarez, J.I. Esteban, C. Altisent, I. Ruiz, L. Puig, R. Esteban, and J. Guardia. 2001. Interferon and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus-infected patients with congenital coagulation disorders. *Hepatology* 34:1035-1040.

239. Nasti, G., G. Di Gennaro, M. Tavio, L. Cadorn, R.M. Tedeschi, R. Talamini, A. Carbone, and U. Tirelli. 2001. Chronic hepatitis C in HIV infection: feasibility and sustained efficacy of therapy with interferon alfa-2b and tribavirin. *Aids* 15:1783-1787.
240. Chung, R.T., J. Andersen, P. Volberding, G.K. Robbins, T. Liu, K.E. Sherman, M.G. Peters, M.J. Koziel, A.K. Bhan, B. Alston, D. Colquhoun, T. Nevin, G. Harb, and C. van der Horst. 2004. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. *N Engl J Med* 351:451-459.
241. Brau, N. 2005. Treatment of chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus-coinfected patients in the era of pegylated interferon and ribavirin. *Semin Liver Dis* 25:33-51.
242. Torriani, F.J., M. Rodriguez-Torres, J.K. Rockstroh, E. Lissen, J. Gonzalez-Garcia, A. Lazzarin, G. Carosi, J. Sasadeusz, C. Katlama, J. Montaner, H. Sette, Jr., S. Pisse, J. De Pamphilis, F. Duff, U.M. Schrenk, and D.T. Dieterich. 2004. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 351:438-450.
243. Salmon-Ceron, D., L. Chauvelot-Moachon, S. Abad, B. Silbermann, and P. Sogni. 2001. Mitochondrial toxic effects and ribavirin. *Lancet* 357:1803-1804.
244. Lafeuillade, A., G. Hittinger, and S. Chadapaud. 2001. Increased mitochondrial toxicity with ribavirin in HIV/HCV coinfection. *Lancet* 357:280-281.
245. Rodriguez-Torres, M., F.J. Torriani, V. Soriano, M.J. Borucki, E. Lissen, M. Sulkowski, D. Dieterich, K. Wang, J.M. Gries, P.G. Hoggard, and D. Back. 2005. Effect of ribavirin on intracellular and plasma pharmacokinetics of nucleoside reverse transcriptase inhibitors in patients with human immunodeficiency virus-hepatitis C virus coinfection: results of a randomized clinical study. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3997-4008.
246. Roberts, E.A., and L. Yeung. 2002. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 36:S106-113.
247. Plunkett, B.A., and W.A. Grobman. 2005. Routine hepatitis C virus screening in pregnancy: a cost-effectiveness analysis. *Am J Obstet Gynecol* 192:1153-1161.
248. Health Canada. 1999. Hepatitis C prevention and control: a public health consensus. *Can Commun Dis Rep* 25S2:1-22.

249. Leikin, E.L., J.F. Reinus, E. Schmell, and N. Tejani. 1994. Epidemiologic predictors of hepatitis C virus infection in pregnant women. *Obstet Gynecol* 84:529-534.
250. Floreani, A., D. Paternoster, F. Zappala, R. Cusinato, G. Bombi, P. Grella, and M. Chiaramonte. 1996. Hepatitis C virus infection in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 103:325-329.
251. Magriples, U. 1998. Hepatitis in pregnancy. *Semin Perinatol* 22:112-117.
252. Eriksen, N.L. 1999. Perinatal consequences of hepatitis C. *Clin Obstet Gynecol* 42:121-133; quiz 174-125.
253. Jabeen, T., B. Cannon, J. Hogan, M. Crowley, C. Devereux, L. Fanning, E. Kenny-Walsh, F. Shanahan, and M.J. Whelton. 2000. Pregnancy and pregnancy outcome in hepatitis C type 1b. *Qjm* 93:597-601.
254. Hillemanns, P., C. Dannecker, R. Kimmig, and U. Hasbargen. 2000. Obstetric risks and vertical transmission of hepatitis C virus infection in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79:543-547.
255. Grange, J.D., A. Abergel, X. Amiot, D. Chaslin-Ferbus, P. Aygaleq, B. Fouqueray, D. Valla, G. Bommelaer, and F. Bodin. 1995. [Interactions between chronic viral hepatitis C and pregnancy]. *Gastroenterol Clin Biol* 19:520-524.
256. Romero-Gomez, M., E. Suarez-Garcia, J. Casanovas, M.C. Nogales, J. Vargas, M.A. Otero, and M. Castro Fernandez. 1998. [Influence of pregnancy in chronic hepatitis C virus infection]. *Med Clin (Barc)* 111:641-644.
257. Conte, D., A. Colucci, E. Minola, M. Fraquelli, and D. Prati. 2001. Clinical course of pregnant women with chronic hepatitis C virus infection and risk of mother-to-child hepatitis C virus transmission. *Dig Liver Dis* 33:366-371.
258. Gervais, A., Y. Bacq, J. Bernuau, M. Martinot, A. Auperin, N. Boyer, A. Kilani, S. Erlinger, D. Valla, and P. Marcellin. 2000. Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 32:293-299.
259. Paternoster, D.M., C. Santarossa, P. Grella, G. Palu, V. Baldo, P. Boccagni, and A. Floreani. 2001. Viral load in HCV RNA-positive pregnant women. *Am J Gastroenterol* 96:2751-2754.
260. Lin, H.H., and J.H. Kao. 2000. Hepatitis C virus load during pregnancy and puerperium. *Bjog* 107:1503-1506.

261. Fontaine, H., B. Nalpas, F. Carnot, C. Brechot, and S. Pol. 2000. Effect of pregnancy on chronic hepatitis C: a case-control study. *Lancet* 356:1328-1329.
262. Wegmann, T.G., H. Lin, L. Guilbert, and T.R. Mosmann. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14:353-356.
263. Guattery, J.M., W.W. Faloon, and D.L. Biery. 1997. Effect of ethinyl estradiol on chronic active hepatitis. *Ann Intern Med* 126:88.
264. Spencer, J.D., N. Latt, P.J. Beeby, E. Collins, J.B. Saunders, G.W. McCaughan, and Y.E. Cossart. 1997. Transmission of hepatitis C virus to infants of human immunodeficiency virus-negative intravenous drug-using mothers: rate of infection and assessment of risk factors for transmission. *J Viral Hepat* 4:395-409.
265. Manzini, P., G. Saracco, A. Cerchier, C. Riva, A. Musso, E. Ricotti, E. Palomba, C. Scolfaro, G. Verme, F. Bonino, and et al. 1995. Human immunodeficiency virus infection as risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission; persistence of anti-hepatitis C virus in children is associated with the mother's anti-hepatitis C virus immunoblotting pattern. *Hepatology* 21:328-332.
266. Conte, D., M. Fraquelli, D. Prati, A. Colucci, and E. Minola. 2000. Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. *Hepatology* 31:751-755.
267. Tovo, P.A., E. Palomba, G. Ferraris, N. Principi, E. Ruga, P. Dallacasa, and A. Maccabruni. 1997. Increased risk of maternal-infant hepatitis C virus transmission for women coinfectd with human immunodeficiency virus type 1. Italian Study Group for HCV Infection in Children. *Clin Infect Dis* 25:1121-1124.
268. Delamare, C., B. Carbonne, N. Heim, N. Berkane, J.C. Petit, S. Uzan, and J.D. Grange. 1999. Detection of hepatitis C virus RNA (HCV RNA) in amniotic fluid: a prospective study. *J Hepatol* 31:416-420.
269. Minola, E., A. Maccabruni, I. Pacati, and M. Martinetti. 2001. Amniocentesis as a possible risk factor for mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* 33:1341-1342.
270. Giacchino, R., L. Tasso, A. Timitilli, E. Castagnola, E. Cristina, N. Sinelli, C. Gotta, G. Giambartolomei, P. Moscatelli, and A. Picciotto. 1998. Vertical transmission of hepatitis C virus infection: usefulness of viremia detection in

- HIV-seronegative hepatitis C virus-seropositive mothers. *J Pediatr* 132:167-169.
271. Azzari, C., M. Resti, F. Bortolotti, M. Moriondo, C. Crivellaro, P. Lionetti, and A. Vierucci. 1999. Serum levels of hepatitis C virus RNA in infants and children with chronic hepatitis C. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 29:314-317.
272. Mok, J., L. Pembrey, P.A. Tovo, and M.L. Newell. 2005. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 90:F156-160.
273. Gibb, D.M., R.L. Goodall, D.T. Dunn, M. Healy, P. Neave, M. Cafferkey, and K. Butler. 2000. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* 356:904-907.
274. Mast, E.E., L.Y. Hwang, D.S. Seto, F.S. Nolte, O.V. Nainan, H. Wurtzel, and M.J. Alter. 2005. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis* 192:1880-1889.
275. 2005. A significant sex--but not elective cesarean section--effect on mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 192:1872-1879.
276. Inui, A., T. Fujisawa, T. Sogo, H. Komatsu, A. Isozaki, and I. Sekine. 2002. Different outcomes of vertical transmission of hepatitis C virus in a twin pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol* 17:617-619.
277. Ohto, H., S. Terazawa, N. Sasaki, K. Hino, C. Ishiwata, M. Kako, N. Ujiie, C. Endo, A. Matsui, and et al. 1994. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 330:744-750.
278. Moriya, T., F. Sasaki, M. Mizui, N. Ohno, H. Mohri, S. Mishiro, and H. Yoshizawa. 1995. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants: its frequency and risk factors revisited. *Biomed Pharmacother* 49:59-64.
279. Matsubara, T., R. Sumazaki, and H. Takita. 1995. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a prospective study. *Eur J Pediatr* 154:973-978.
280. Zanetti, A.R., E. Tanzi, S. Paccagnini, N. Principi, G. Pizzocolo, M.L. Caccamo, E. D'Amico, G. Cambie, and L. Vecchi. 1995. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. Lombardy Study Group on Vertical HCV Transmission. *Lancet* 345:289-291.

281. Thomas, D.L., S.A. Villano, K.A. Riester, R. Hershow, L.M. Mofenson, S.H. Landesman, F.B. Hollinger, K. Davenny, L. Riley, C. Diaz, H.B. Tang, and T.C. Quinn. 1998. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* 177:1480-1488.
282. Okamoto, M., I. Nagata, J. Murakami, S. Kaji, T. Iitsuka, T. Hoshika, R. Matsuda, Y. Tazawa, K. Shiraki, and S. Hino. 2000. Prospective reevaluation of risk factors in mother-to-child transmission of hepatitis C virus: high virus load, vaginal delivery, and negative anti-NS4 antibody. *J Infect Dis* 182:1511-1514.
283. Ruiz-Extremera, A., J. Salmeron, C. Torres, P.M. De Rueda, F. Gimenez, C. Robles, and M.T. Miranda. 2000. Follow-up of transmission of hepatitis C to babies of human immunodeficiency virus-negative women: the role of breast-feeding in transmission. *Pediatr Infect Dis J* 19:511-516.
284. Ceci, O., M. Margiotta, F. Mareello, R. Francavilla, E. Lerardi, P. Loizzi, L. Impedovo, and A. Francavilla. 2001. High rate of spontaneous viral clearance in a cohort of vertically infected hepatitis C virus infants: what lies behind? *J Hepatol* 35:687-688.
285. Newell, M.L., and L. Pembrey. 2002. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *Drugs Today (Barc)* 38:321-337.
286. Ferrero, S., P. Lungaro, B.M. Bruzzone, C. Gotta, G. Bentivoglio, and N. Ragni. 2003. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a 10-year survey (1990-2000). *Acta Obstet Gynecol Scand* 82:229-234.
287. Syriopoulou, V., G. Nikolopoulou, G.L. Daikos, M. Theodoridou, I. Pavlopoulou, P. Nicolaidou, and N. Manolaki. 2005. Mother to child transmission of hepatitis C virus: rate of infection and risk factors. *Scand J Infect Dis* 37:350-353.
288. Pipan, C., S. Amici, G. Astori, G.P. Ceci, and G.A. Botta. 1996. Vertical transmission of hepatitis C virus in low-risk pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15:116-120.
289. Garland, S.M., S. Tabrizi, P. Robinson, C. Hughes, L. Markman, W. Devenish, and L. Kliman. 1998. Hepatitis C--role of perinatal transmission. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 38:424-427.
290. Papaevangelou, V., H. Pollack, G. Rochford, R. Kokka, Z. Hou, D. Chernoff, B. Hanna, K. Krasinski, and W. Borkowsky. 1998. Increased transmission of vertical hepatitis C virus (HCV) infection to human immunodeficiency virus

- (HIV)-infected infants of HIV- and HCV-coinfected women. *J Infect Dis* 178:1047-1052.
291. Mazza, C., A. Ravaggi, A. Rodella, D. Padula, M. Duse, M. Lomini, M. Puoti, A. Rossini, and E. Cariani. 1998. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus (HCV) infection. Study Group for Vertical Transmission. *J Med Virol* 54:12-19.
  292. Resti, M., C. Azzari, F. Mannelli, M. Moriondo, E. Novembre, M. de Martino, and A. Vierucci. 1998. Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. Tuscany Study Group on Hepatitis C Virus Infection. *Bmj* 317:437-441.
  293. Granovsky, M.O., H.L. Minkoff, B.H. Tess, D. Waters, A. Hatzakis, D.E. Devoid, S.H. Landesman, A. Rubinstein, A.M. Di Bisceglie, and J.J. Goedert. 1998. Hepatitis C virus infection in the mothers and infants cohort study. *Pediatrics* 102:355-359.
  294. La Torre, A., R. Biadaoli, T. Capobianco, M.G. Colao, M. Monti, F. Pulli, C.B. Visioli, A.L. Zignego, and F. Rubaltelli. 1998. Vertical transmission of HCV. *Acta Obstet Gynecol Scand* 77:889-892.
  295. Ketzinel-Gilad, M., S.L. Colodner, R. Hadary, E. Granot, D. Shouval, and E. Galun. 2000. Transient transmission of hepatitis C virus from mothers to newborns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:267-274.
  296. Sabatino, G., L.A. Ramenghi, M. di Marzio, and E. Pizzigallo. 1996. Vertical transmission of hepatitis C virus: an epidemiological study on 2,980 pregnant women in Italy. *Eur J Epidemiol* 12:443-447.
  297. Paccagnini, S., N. Principi, E. Massironi, E. Tanzi, L. Romano, M.L. Muggiasca, M.C. Ragni, and L. Salvaggio. 1995. Perinatal transmission and manifestation of hepatitis C virus infection in a high risk population. *Pediatr Infect Dis J* 14:195-199.
  298. Zuccotti, G.V., M.L. Ribero, M. Giovannini, M. Fasola, E. Riva, G. Portera, G. Biasucci, S. Decarlis, M.L. Profeta, and A. Tagger. 1995. Effect of hepatitis C genotype on mother-to-infant transmission of virus. *J Pediatr* 127:278-280.
  299. Fischler, B., G. Lindh, S. Lindgren, M. Forsgren, M. Von Sydow, P. Sangfelt, A. Alaeus, L. Harland, E. Enockson, and A. Nemeth. 1996. Vertical transmission of hepatitis C virus infection. *Scand J Infect Dis* 28:353-356.
  300. Lin, H.H., J.H. Kao, H.Y. Hsu, Y.H. Ni, S.H. Yeh, L.H. Hwang, M.H. Chang, S.C. Hwang, P.J. Chen, and D.S. Chen. 1994. Possible role of high-titer



- maternal viremia in perinatal transmission of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 169:638-641.
301. Steininger, C., M. Kundi, G. Jatzko, H. Kiss, A. Lischka, and H. Holzmann. 2003. Increased risk of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus by intrapartum infantile exposure to maternal blood. *J Infect Dis* 187:345-351.
  302. Schackman, B.R., K. Oneda, and S.J. Goldie. 2004. The cost-effectiveness of elective Cesarean delivery to prevent hepatitis C transmission in HIV-coinfected women. *Aids* 18:1827-1834.
  303. Lin, H.H., J.H. Kao, H.Y. Hsu, Y.H. Ni, M.H. Chang, S.C. Huang, L.H. Hwang, P.J. Chen, and D.S. Chen. 1995. Absence of infection in breast-fed infants born to hepatitis C virus-infected mothers. *J Pediatr* 126:589-591.
  304. Kumar, R.M., and S. Shahul. 1998. Role of breast-feeding in transmission of hepatitis C virus to infants of HCV-infected mothers. *J Hepatol* 29:191-197.
  305. Reinius, J.F., E.L. Leikin, H.J. Alter, L. Cheung, M. Shindo, B. Jett, S. Piazza, and J.W. Shih. 1992. Failure to detect vertical transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 117:881-886.
  306. Polywka, S., M. Schroter, H.H. Feucht, B. Zollner, and R. Laufs. 1999. Low risk of vertical transmission of hepatitis C virus by breast milk. *Clin Infect Dis* 29:1327-1329.
  307. 1997. [Hepatitis C: screening and treatment]. *Gastroenterol Clin Biol* 21:S202-211.
  308. Maccabruni, A., I. Pacati, E. Minola, M. Martinetti, and A. De Silvertri. 1999. Role of mother-child immunogenetic profiles in HCV vertical transmission. In *39th interscience conference of antimicrobial agents and chemotherapy*. Elsevier, Amsterdam. 48.
  309. Bosi, I., G. Ancora, W. Mantovani, R. Miniero, G. Verucchi, L. Attard, V. Venturi, I. Papa, F. Sandri, P. Dallacasa, and G.P. Salvioli. 2002. HLA DR13 and HCV vertical infection. *Pediatr Res* 51:746-749.
  310. Kilham, L., and V.H. Ferm. 1977. Congenital anomalies induced in hamster embryos with ribavirin. *Science* 195:413-414.
  311. Barlow, C.F., C.J. Priebe, J.B. Mulliken, P.D. Barnes, D. Mac Donald, J. Folkman, and R.A. Ezekowitz. 1998. Spastic diplegia as a complication of interferon Alfa-2a treatment of hemangiomas of infancy. *J Pediatr* 132:527-530.

312. Dubois, J., L. Hershon, L. Carmant, S. Belanger, J.M. Leclerc, and M. David. 1999. Toxicity profile of interferon alfa-2b in children: A prospective evaluation. *J Pediatr* 135:782-785.
313. Fritz, M., K. Vats, and R.K. Goyal. 2005. Neonatal lupus and IUGR following alpha-interferon therapy during pregnancy. *J Perinatol* 25:552-554.
314. Ruggiero, G., A. Andreana, and R. Zampino. 1996. Normal pregnancy under inadvertent alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 24:646.
315. Hiratsuka, M., H. Minakami, S. Koshizuka, and I. Sato. 2000. Administration of interferon-alpha during pregnancy: effects on fetus. *J Perinat Med* 28:372-376.
316. Trotter, J.F., and A.J. Zygmunt. 2001. Conception and pregnancy during interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 32:76-78.
317. Mishkin, D., and M. Deschenes. 2001. Conception soon after discontinuing interferon/ribavirin therapy: a successful outcome. *Am J Gastroenterol* 96:2285-2286.
318. Ozaslan, E., R. Yilmaz, H. Simsek, and G. Tatar. 2002. Interferon therapy for acute hepatitis C during pregnancy. *Ann Pharmacother* 36:1715-1718.
319. Ranger-Rogez, S., S. Alain, and F. Denis. 2002. [Hepatitis viruses: mother to child transmission]. *Pathol Biol (Paris)* 50:568-575.
320. Yasui, K., T. Wakita, K. Tsukiyama-Kohara, S.I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, D. Moradpour, J.R. Wands, and M. Kohara. 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 72:6048-6055.
321. Lo, S.Y., M. Selby, M. Tong, and J.H. Ou. 1994. Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. *Virology* 199:124-131.
322. Lo, S.Y., F. Masiarz, S.B. Hwang, M.M. Lai, and J.H. Ou. 1995. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 213:455-461.
323. Ray, R.B., L.M. Lagging, K. Meyer, and R. Ray. 1996. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 70:4438-4443.
324. Ina, Y., M. Mizokami, K. Ohba, and T. Gojobori. 1994. Reduction of synonymous substitutions in the core protein gene of hepatitis C virus. *J Mol Evol* 38:50-56.

325. Walewski, J.L., J.A. Gutierrez, W. Branch-Elliman, D.D. Stump, T.R. Keller, A. Rodriguez, G. Benson, and A.D. Branch. 2002. Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *Rna* 8:557-571.
326. Walewski, J.L., T.R. Keller, D.D. Stump, and A.D. Branch. 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *Rna* 7:710-721.
327. Varaklioti, A., N. Vassilaki, U. Georgopoulou, and P. Mavromara. 2002. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 277:17713-17721.
328. Branch, A.D., D.D. Stump, J.A. Gutierrez, F. Eng, and J.L. Walewski. 2005. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 25:105-117.
329. Xu, Z., J. Choi, T.S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, D. Chien, M.J. Selby, and J. Ou. 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J* 20:3840-3848.
330. Roussel, J., A. Pillez, C. Montpellier, G. Duverlie, A. Cahour, J. Dubuisson, and C. Wychowski. 2003. Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol* 84:1751-1759.
331. Choi, J., Z. Xu, and J.H. Ou. 2003. Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting. *Mol Cell Biol* 23:1489-1497.
332. Basu, A., R. Steele, R. Ray, and R.B. Ray. 2004. Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 85:2299-2306.
333. Komurian-Pradel, F., A. Rajoharison, J.L. Berland, V. Khouri, M. Perret, M. Van Roosmalen, S. Pol, F. Negro, and G. Paranhos-Baccala. 2004. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40:900-909.
334. Branch, A.D., F.J. Eng, and J.L. Walewski. 2005. Expression of HCV alternative reading frame proteins (ARFPs) in cell lines and their analysis with newly developed anti-ARFP monoclonal antibodies. *In 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses*, Montréal, Canada. Poster 153.

335. Boulant, S., M. Becchi, F. Penin, and J.P. Lavergne. 2003. Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem* 278:45785-45792.
336. Bain, C., P. Parroche, J.P. Lavergne, B. Duverger, C. Vieux, V. Dubois, F. Komurian-Pradel, C. Trepo, L. Gebuhrer, G. Paranhos-Baccala, F. Penin, and G. Inchauspe. 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* 78:10460-10469.
337. Jacks, T., and H.E. Varmus. 1985. Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science* 230:1237-1242.
338. Wilson, W., M. Braddock, S.E. Adams, P.D. Rathjen, S.M. Kingsman, and A.J. Kingsman. 1988. HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell* 55:1159-1169.
339. Brierley, I. 1995. Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J Gen Virol* 76 ( Pt 8):1885-1892.
340. Marczinke, B., A.J. Bloys, T.D. Brown, M.M. Willcocks, M.J. Carter, and I. Brierley. 1994. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J Virol* 68:5588-5595.
341. Jacks, T., H.D. Madhani, F.R. Masiarz, and H.E. Varmus. 1988. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell* 55:447-458.
342. Ten Dam, E.B., C.W. Pleij, and L. Bosch. 1990. RNA pseudoknots: translational frameshifting and readthrough on viral RNAs. *Virus Genes* 4:121-136.
343. Chamorro, M., N. Parkin, and H.E. Varmus. 1992. An RNA pseudoknot and an optimal heptameric shift site are required for highly efficient ribosomal frameshifting on a retroviral messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:713-717.
344. Vassilaki, N., and P. Mavromara. 2003. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem* 278:40503-40513.
345. Jacks, T., K. Townsley, H.E. Varmus, and J. Majors. 1987. Two efficient ribosomal frameshifting events are required for synthesis of mouse mammary tumor virus gag-related polyproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4298-4302.

346. Brierley, I., A.J. Jenner, and S.C. Inglis. 1992. Mutational analysis of the "slippery-sequence" component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal. *J Mol Biol* 227:463-479.
347. Gramstat, A., D. Prufer, and W. Rohde. 1994. The nucleic acid-binding zinc finger protein of potato virus M is translated by internal initiation as well as by ribosomal frameshifting involving a shifty stop codon and a novel mechanism of P-site slippage. *Nucleic Acids Res* 22:3911-3917.
348. Tuplin, A., J. Wood, D.J. Evans, A.H. Patel, and P. Simmonds. 2002. Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *Rna* 8:824-841.
349. Baril, M., and L. Brakier-Gingras. 2005. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res* 33:1474-1486.
350. Yeh, C.T., S.Y. Lo, D.I. Dai, J.H. Tang, C.M. Chu, and Y.F. Liaw. 2000. Amino acid substitutions in codons 9-11 of hepatitis C virus core protein lead to the synthesis of a short core protein product. *J Gastroenterol Hepatol* 15:182-191.
351. Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M.J. Chapman, T. Miyamura, and C. Brechot. 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1200-1205.
352. Falcon, V., N. Acosta-Rivero, G. Chinea, M.C. de la Rosa, I. Menendez, S. Duenas-Carrera, B. Gra, A. Rodriguez, V. Tsutsumi, M. Shibayama, J. Luna-Munoz, M.M. Miranda-Sanchez, J. Morales-Grillo, and J. Kouri. 2003. Nuclear localization of nucleocapsid-like particles and HCV core protein in hepatocytes of a chronically HCV-infected patient. *Biochem Biophys Res Commun* 310:54-58.
353. Xu, Z., J. Choi, W. Lu, and J.H. Ou. 2003. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* 77:1578-1583.
354. Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J.A. Hellings, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 277:8130-8139.
355. Shi, S.T., S.J. Polyak, H. Tu, D.R. Taylor, D.R. Gretch, and M.M. Lai. 2002. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 292:198-210.

356. Suzuki, R., K. Tamura, J. Li, K. Ishii, Y. Matsuura, T. Miyamura, and T. Suzuki. 2001. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 280:301-309.
357. Guo, J.T., V.V. Bichko, and C. Seeger. 2001. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 75:8516-8523.
358. Ikeda, M., M. Yi, K. Li, and S.M. Lemon. 2002. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 76:2997-3006.
359. Ray, R.B., and R. Ray. 2001. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 202:149-156.
360. Zhu, N., A. Khoshnan, R. Schneider, M. Matsumoto, G. Dennert, C. Ware, and M.M. Lai. 1998. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 72:3691-3697.
361. Marusawa, H., M. Hijikata, T. Chiba, and K. Shimotohno. 1999. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* 73:4713-4720.
362. Tsuchihara, K., M. Hijikata, K. Fukuda, T. Kuroki, N. Yamamoto, and K. Shimotohno. 1999. Hepatitis C virus core protein regulates cell growth and signal transduction pathway transmitting growth stimuli. *Virology* 258:100-107.
363. Hayashi, J., H. Aoki, K. Kajino, M. Moriyama, Y. Arakawa, and O. Hino. 2000. Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology* 32:958-961.
364. Large, M.K., D.J. Kittlesen, and Y.S. Hahn. 1999. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 162:931-938.
365. Moriya, K., H. Yotsuyanagi, Y. Shintani, H. Fujie, K. Ishibashi, Y. Matsuura, T. Miyamura, and K. Koike. 1997. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 78 ( Pt 7):1527-1531.
366. Chang, J., S.H. Yang, Y.G. Cho, S.B. Hwang, Y.S. Hahn, and Y.C. Sung. 1998. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 72:3060-3065.

367. Troesch, M., E. Jalbert, S. Canobio, M.R. Boulassel, J.P. Routy, N.F. Bernard, J. Bruneau, N. Lapointe, M. Boucher, and H. Soudeyns. 2005. Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *Aids* 19:775-784.
368. Ogata, S., M. Nagano-Fujii, Y. Ku, S. Yoon, and H. Hotta. 2002. Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift product, the F protein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma. *J Clin Microbiol* 40:3625-3630.
369. Malarkannan, S., T. Horng, P.P. Shih, S. Schwab, and N. Shastri. 1999. Presentation of out-of-frame peptide/MHC class I complexes by a novel translation initiation mechanism. *Immunity* 10:681-690.
370. Eigen, M. 1993. Viral quasispecies. *Sci Am* 269:42-49.
371. Neumann, A.U., N.P. Lam, H. Dahari, D.R. Gretch, T.E. Wiley, T.J. Layden, and A.S. Perelson. 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282:103-107.
372. Ogata, N., H.J. Alter, R.H. Miller, and R.H. Purcell. 1991. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3392-3396.
373. Domingo, E., C. Escarmis, N. Sevilla, A. Moya, S.F. Elena, J. Quer, I.S. Novella, and J.J. Holland. 1996. Basic concepts in RNA virus evolution. *Faseb J* 10:859-864.
374. Duarte, E.A., I.S. Novella, S.C. Weaver, E. Domingo, S. Wain-Hobson, D.K. Clarke, A. Moya, S.F. Elena, J.C. de la Torre, and J.J. Holland. 1994. RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect Agents Dis* 3:201-214.
375. Domingo, E. 1998. Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin Diagn Virol* 10:97-101.
376. Domingo, E., E. Martinez-Salas, F. Sobrino, J.C. de la Torre, A. Portela, J. Ortin, C. Lopez-Galindez, P. Perez-Brena, N. Villanueva, R. Najera, and et al. 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* 40:1-8.
377. Gerotto, M., D.G. Sullivan, S.J. Polyak, L. Chemello, L. Cavalletto, P. Pontisso, A. Alberti, and D.R. Gretch. 1999. Effect of retreatment with interferon alone or interferon plus ribavirin on hepatitis C virus quasispecies diversification in nonresponder patients with chronic hepatitis C. *J Virol* 73:7241-7247.

378. Feliu, A., E. Gay, M. Garcia-Retortillo, J.C. Saiz, and X. Forns. 2004. Evolution of hepatitis C virus quasispecies immediately following liver transplantation. *Liver Transpl* 10:1131-1139.
379. Domingo, E. 1989. RNA virus evolution and the control of viral disease. *Prog Drug Res* 33:93-133.
380. Weiner, A.J., M.J. Brauer, J. Rosenblatt, K.H. Richman, J. Tung, K. Crawford, F. Bonino, G. Saracco, Q.L. Choo, M. Houghton, and et al. 1991. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180:842-848.
381. Kato, N., Y. Ootsuyama, T. Tanaka, M. Nakagawa, T. Nakazawa, K. Muraiso, S. Ohkoshi, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 1992. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Res* 22:107-123.
382. Inchauspe, G., S. Zebedee, D.H. Lee, M. Sugitani, M. Nasoff, and A.M. Prince. 1991. Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10292-10296.
383. Kolykhalov, A.A., E.V. Agapov, K.J. Blight, K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1997. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 277:570-574.
384. Duverlie, G., H. Khorsi, S. Castelain, O. Jaillon, J. Izopet, F. Lunel, F. Eb, F. Penin, and C. Wychowski. 1998. Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity. *J Gen Virol* 79 ( Pt 6):1373-1381.
385. Nousbaum, J., S.J. Polyak, S.C. Ray, D.G. Sullivan, A.M. Larson, R.L. Carithers, Jr., and D.R. Gretch. 2000. Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J Virol* 74:9028-9038.
386. Veillon, P., C. Payan, C. Gaudy, A. Goudeau, and F. Lunel. 2004. [Mutation analysis of ISDR and V3 domains of hepatitis C virus NS5A region before interferon therapy with or without ribavirin]. *Pathol Biol (Paris)* 52:505-510.
387. Hofmann, W.P., C. Sarrazin, B. Kronenberger, B. Schonberger, K. Bruch, and S. Zeuzem. 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.



388. Hofmann, W.P., S. Zeuzem, and C. Sarrazin. 2005. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *J Clin Virol* 32:86-91.
389. Yagnik, A.T., A. Lahm, A. Meola, R.M. Roccasecca, B.B. Ercole, A. Nicosia, and A. Tramontano. 2000. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* 40:355-366.
390. Kronenberger, B., C. Sarrazin, W.P. Hofmann, M. von Wagner, E. Herrmann, C. Welsch, R. Elez, B. Ruster, A. Piiper, and S. Zeuzem. 2004. Mutations in the putative HCV-E2 CD81 binding regions and correlation with cell surface CD81 expression. *J Viral Hepat* 11:310-318.
391. Penin, F., C. Combet, G. Germanidis, P.O. Frainais, G. Deleage, and J.M. Pawlotsky. 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.
392. Basu, A., A. Beyene, K. Meyer, and R. Ray. 2004. The hypervariable region 1 of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus binds to glycosaminoglycans, but this binding does not lead to infection in a pseudotype system. *J Virol* 78:4478-4486.
393. Kurihara, C., Y. Tsuzuki, R. Hokari, H. Nakashima, N. Mataka, M. Kuroki, A. Kawaguchi, S. Nagao, T. Kondo, and S. Miura. 2004. A highly hydrophobic domain within hypervariable region 1 may be related to the entry of hepatitis C virus into cultured human hepatoma cells. *J Med Virol* 74:546-555.
394. Forns, X., R. Thimme, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, F.V. Chisari, and J. Bukh. 2000. Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13318-13323.
395. Flint, M., C. Maidens, L.D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Higginbottom, S. Levy, and J.A. McKeating. 1999. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 73:6235-6244.
396. Farci, P., and R.H. Purcell. 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 20:103-126.
397. Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2766-2770.

398. Lu, M., B. Funsch, M. Wiese, and M. Roggendorf. 1995. Analysis of hepatitis C virus quasispecies populations by temperature gradient gel electrophoresis. *J Gen Virol* 76 ( Pt 4):881-887.
399. Weiner, A.J., H.M. Geysen, C. Christopherson, J.E. Hall, T.J. Mason, G. Saracco, F. Bonino, K. Crawford, C.D. Marion, K.A. Crawford, and et al. 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3468-3472.
400. Wolinsky, S.M., B.T. Korber, A.U. Neumann, M. Daniels, K.J. Kunstman, A.J. Whetsell, M.R. Furtado, Y. Cao, D.D. Ho, and J.T. Safrit. 1996. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 272:537-542.
401. Pawlotsky, J.M., G. Germanidis, A.U. Neumann, M. Pellerin, P.O. Frainais, and D. Dhumeaux. 1998. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 72:2795-2805.
402. Abbate, I., O. Lo Iacono, R. Di Stefano, G. Cappiello, E. Girardi, R. Longo, D. Ferraro, G. Antonucci, V. Di Marco, M. Solmone, A. Craxi, G. Ippolito, and M.R. Capobianchi. 2004. HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated- or standard-interferon and ribavirin. *J Hepatol* 40:831-836.
403. Nei, M., and T. Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3:418-426.
404. Farci, P., A. Shimoda, D. Wong, T. Cabezon, D. De Gioannis, A. Strazzera, Y. Shimizu, M. Shapiro, H.J. Alter, and R.H. Purcell. 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15394-15399.
405. Shimizu, Y.K., M. Hijikata, A. Iwamoto, H.J. Alter, R.H. Purcell, and H. Yoshikura. 1994. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol* 68:1494-1500.
406. Shimizu, Y.K., H. Igarashi, T. Kiyohara, T. Cabezon, P. Farci, R.H. Purcell, and H. Yoshikura. 1996. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 223:409-412.

407. Zibert, A., E. Schreier, and M. Roggendorf. 1995. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* 208:653-661.
408. Zhou, Y.H., Y.K. Shimizu, and M. Esumi. 2000. Monoclonal antibodies to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus capture virus and inhibit virus adsorption to susceptible cells in vitro. *Virology* 269:276-283.
409. Zhou, Y.H., M. Takekoshi, F. Maeda, S. Ihara, and M. Esumi. 2002. Recombinant antibody Fab against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus blocks the virus adsorption to susceptible cells in vitro. *Antiviral Res* 56:51-59.
410. Esumi, M., M. Ahmed, Y.H. Zhou, H. Takahashi, and T. Shikata. 1998. Murine antibodies against E2 and hypervariable region 1 cross-reactively capture hepatitis C virus. *Virology* 251:158-164.
411. Hattori, M., K. Yoshioka, T. Aiyama, K. Iwata, Y. Terazawa, M. Ishigami, M. Yano, and S. Kakumu. 1998. Broadly reactive antibodies to hypervariable region 1 in hepatitis C virus-infected patient sera: relation to viral loads and response to interferon. *Hepatology* 27:1703-1710.
412. Zhou, Y.H., M. Moriyama, and M. Esumi. 1999. Multiple sequence-reactive antibodies induced by a single peptide immunization with hypervariable region 1 of hepatitis C virus. *Virology* 256:360-370.
413. Mondelli, M.U., A. Cerino, A. Lisa, S. Brambilla, L. Segagni, A. Cividini, M. Bissolati, G. Missale, G. Bellati, A. Meola, B. Bruniercole, A. Nicosia, G. Galfre, and E. Silini. 1999. Antibody responses to hepatitis C virus hypervariable region 1: evidence for cross-reactivity and immune-mediated sequence variation. *Hepatology* 30:537-545.
414. Farci, P., H.J. Alter, D.C. Wong, R.H. Miller, S. Govindarajan, R. Engle, M. Shapiro, and R.H. Purcell. 1994. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7792-7796.
415. Farci, P., H.J. Alter, S. Govindarajan, D.C. Wong, R. Engle, R.R. Lesniewski, I.K. Mushahwar, S.M. Desai, R.H. Miller, N. Ogata, and et al. 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258:135-140.
416. Kumar, U., J. Monjardino, and H.C. Thomas. 1994. Hypervariable region of hepatitis C virus envelope glycoprotein (E2/NS1) in an agammaglobulinemic patient. *Gastroenterology* 106:1072-1075.

417. Booth, J.C., U. Kumar, D. Webster, J. Monjardino, and H.C. Thomas. 1998. Comparison of the rate of sequence variation in the hypervariable region of E2/NS1 region of hepatitis C virus in normal and hypogammaglobulinemic patients. *Hepatology* 27:223-227.
418. Toyoda, H., Y. Fukuda, Y. Koyama, J. Takamatsu, H. Saito, and T. Hayakawa. 1997. Effect of immunosuppression on composition of quasispecies population of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C coinfecting with human immunodeficiency virus. *J Hepatol* 26:975-982.
419. Canobio, S., C.M. Guilbert, M. Troesch, J. Samson, M. Lemay, V.A. Pelletier, A.C. Bernard-Bonnin, R. Kozielski, N. Lapointe, S.R. Martin, and H. Soudeyans. 2004. Differing patterns of liver disease progression and hepatitis C virus (HCV) quasispecies evolution in children vertically coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 42:4365-4369.
420. Kato, N., H. Sekiya, Y. Ootsuyama, T. Nakazawa, M. Hijikata, S. Ohkoshi, and K. Shimotohno. 1993. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 67:3923-3930.
421. Taniguchi, S., H. Okamoto, M. Sakamoto, M. Kojima, F. Tsuda, T. Tanaka, E. Munekata, E.E. Muchmore, D.A. Peterson, and S. Mishiro. 1993. A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 195:297-301.
422. Choo, Q.L., G. Kuo, R. Ralston, A. Weiner, D. Chien, G. Van Nest, J. Han, K. Berger, K. Thudium, C. Kuo, and et al. 1994. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1294-1298.
423. van Doorn, L.J., I. Capriles, G. Maertens, R. DeLeys, K. Murray, T. Kos, H. Schellekens, and W. Quint. 1995. Sequence evolution of the hypervariable region in the putative envelope region E2/NS1 of hepatitis C virus is correlated with specific humoral immune responses. *J Virol* 69:773-778.
424. Odeberg, J., Z. Yun, A. Sonnerborg, K. Bjoro, M. Uhlen, and J. Lundeberg. 1997. Variation of hepatitis C virus hypervariable region 1 in immunocompromised patients. *J Infect Dis* 175:938-943.
425. Burioni, R., P. Plaisant, A. Manzin, D. Rosa, V. Delli Carri, F. Bugli, L. Solfrosi, S. Abrignani, P.E. Varaldo, G. Fadda, and M. Clementi. 1998. Dissection of human humoral immune response against hepatitis C virus E2 glycoprotein by repertoire cloning and generation of recombinant Fab fragments. *Hepatology* 28:810-814.

426. Ray, S.C., Y.M. Wang, O. Laeyendecker, J.R. Ticehurst, S.A. Villano, and D.L. Thomas. 1999. Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J Virol* 73:2938-2946.
427. Mondelli, M.U., A. Cerino, A. Meola, and A. Nicosia. 2003. Variability or conservation of hepatitis C virus hypervariable region 1? Implications for immune responses. *J Biosci* 28:305-310.
428. Fan, X., and A.M. Di Bisceglie. 2003. Diversification of hypervariable region 1 of hepatitis C virus after liver transplantation. *J Med Virol* 70:212-218.
429. Moreno Garcia, J., S. del Campo Terron, G. Moraleda Garcia, M. Garcia Gonzalez, E. de Vicente Lopez, J. Nuno Vazquez-Garza, J. Fortun Abete, P. Martin, and R. Barcena Marugan. 2003. Analysis of hepatitis C viral quasispecies in liver transplantation. *Transplant Proc* 35:1838-1840.
430. Weiner, A., A.L. Erickson, J. Kansopon, K. Crawford, E. Muchmore, A.L. Hughes, M. Houghton, and C.M. Walker. 1995. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2755-2759.
431. Grakoui, A., N.H. Shoukry, D.J. Woollard, J.H. Han, H.L. Hanson, J. Ghayeb, K.K. Murthy, C.M. Rice, and C.M. Walker. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302:659-662.
432. Kimura, Y., T. Gushima, S. Rawale, P. Kaumaya, and C.M. Walker. 2005. Escape mutations alter proteasome processing of major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 79:4870-4876.
433. Erickson, A.L., Y. Kimura, S. Igarashi, J. Eichelberger, M. Houghton, J. Sidney, D. McKinney, A. Sette, A.L. Hughes, and C.M. Walker. 2001. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 15:883-895.
434. Chang, K.M., B. Rehermann, J.G. McHutchison, C. Pasquinelli, S. Southwood, A. Sette, and F.V. Chisari. 1997. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J Clin Invest* 100:2376-2385.
435. Kantzanou, M., M. Lucas, E. Barnes, H. Komatsu, G. Dusheiko, S. Ward, G. Harcourt, and P. Klenerman. 2003. Viral escape and T cell exhaustion in hepatitis C virus infection analysed using Class I peptide tetramers. *Immunol Lett* 85:165-171.

436. **Tester, I., S. Smyk-Pearson, P. Wang, A. Wertheimer, E. Yao, D.M. Lewinsohn, J.E. Tavis, and H.R. Rosen. 2005. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med* 201:1725-1731.**
437. **Guglietta, S., A.R. Garbuglia, V. Pacciani, C. Scotta, M.P. Perrone, L. Laurenti, E. Spada, A. Mele, M.R. Capobianchi, G. Taliani, A. Folgori, A. Vitelli, L. Ruggeri, A. Nicosia, E. Piccolella, and P. Del Porto. 2005. Positive selection of cytotoxic T lymphocyte escape variants during acute hepatitis C virus infection. *Eur J Immunol* 35:2627-2637.**
438. **Cox, A.L., T. Mosbrugger, Q. Mao, Z. Liu, X.H. Wang, H.C. Yang, J. Sidney, A. Sette, D. Pardoll, D.L. Thomas, and S.C. Ray. 2005. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 201:1741-1752.**
439. **Ray, S.C., L. Fanning, X.H. Wang, D.M. Netski, E. Kenny-Walsh, and D.L. Thomas. 2005. Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J Exp Med* 201:1753-1759.**
440. **Timm, J., G.M. Lauer, D.G. Kavanagh, I. Sheridan, A.Y. Kim, M. Lucas, T. Pillay, K. Ouchi, L.L. Reyor, J.S. Zur Wiesch, R.T. Gandhi, R.T. Chung, N. Bhardwaj, P. Klenerman, B.D. Walker, and T.M. Allen. 2004. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* 200:1593-1604.**
441. **Wang, H., and D.D. Eckels. 1999. Mutations in immunodominant T cell epitopes derived from the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus have the potential for generating escape variants that may have important consequences for T cell recognition. *J Immunol* 162:4177-4183.**
442. **Wang, J.H., T.J. Layden, and D.D. Eckels. 2003. Modulation of the peripheral T-Cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: transition from a Th1 to a Th2 response. *Hum Immunol* 64:662-673.**
443. **Piazzolla, G., M. Nuzzaci, C. Tortorella, E. Panella, A. Natilla, D. Boscia, A. De Stradis, P. Piazzolla, and S. Antonaci. 2005. Immunogenic properties of a chimeric plant virus expressing a hepatitis C virus (HCV)-derived epitope: new prospects for an HCV vaccine. *J Clin Immunol* 25:142-152.**
444. **Frasca, L., C. Scotta, P. Del Porto, A. Nicosia, C. Pasquazzi, I. Versace, A.M. Masci, L. Racioppi, and E. Piccolella. 2003. Antibody-selected mimics of hepatitis C virus hypervariable region 1 activate both primary and memory Th lymphocytes. *Hepatology* 38:653-663.**
445. **Shirai, M., T. Arichi, M. Chen, T. Masaki, M. Nishioka, K. Ikeda, H. Takahashi, N. Enomoto, T. Saito, M.E. Major, T. Nakazawa, T. Akatsuka, S.M. Feinstone, and J.A. Berzofsky. 1999. T cell recognition of hypervariable**

- region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J Immunol* 162:568-576.
446. Del Porto, P., G. Puntoriero, C. Scotta, A. Nicosia, and E. Piccolella. 2000. High prevalence of hypervariable region 1-specific and -cross-reactive CD4(+) T cells in HCV-infected individuals responsive to IFN-alpha treatment. *Virology* 269:313-324.
447. Puntoriero, G., A. Meola, A. Lahm, S. Zucchelli, B.B. Ercole, R. Tafi, M. Pezzanera, M.U. Mondelli, R. Cortese, A. Tramontano, G. Galfre, and A. Nicosia. 1998. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *Embo J* 17:3521-3533.
448. Shang, D., W. Zhai, and J.P. Allain. 1999. Broadly cross-reactive, high-affinity antibody to hypervariable region 1 of the hepatitis C virus in rabbits. *Virology* 258:396-405.
449. Li, C., D. Candotti, and J.P. Allain. 2001. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for a conserved epitope within hepatitis C virus hypervariable region 1. *J Virol* 75:12412-12420.
450. Tsai, S.L., Y.M. Chen, M.H. Chen, C.Y. Huang, I.S. Sheen, C.T. Yeh, J.H. Huang, G.C. Kuo, and Y.F. Liaw. 1998. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 115:954-965.
451. Frasca, L., P. Del Porto, L. Tuosto, B. Marinari, C. Scotta, M. Carbonari, A. Nicosia, and E. Piccolella. 1999. Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells. *J Immunol* 163:650-658.
452. Scotta, C., L. Tuosto, A.M. Masci, L. Racioppi, E. Piccolella, and L. Frasca. 2005. Hypervariable region 1 variant acting as TCR antagonist affects hepatitis C virus-specific CD4+ T cell repertoire by favoring CD95-mediated apoptosis. *J Leukoc Biol* 78:372-382.
453. Bowen, D.G., and C.M. Walker. 2005. The origin of quasispecies: cause or consequence of chronic hepatitis C viral infection? *J Hepatol* 42:408-417.
454. Seifert, U., H. Liermann, V. Racanelli, A. Halenius, M. Wiese, H. Wedemeyer, T. Ruppert, K. Rispeter, P. Henklein, A. Sijts, H. Hengel, P.M. Kloetzel, and B. Rehermann. 2004. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* 114:250-259.

455. Farci, P., A. Shimoda, A. Coiana, G. Diaz, G. Peddis, J.C. Melpolder, A. Strazzer, D.Y. Chien, S.J. Munoz, A. Balestrieri, R.H. Purcell, and H.J. Alter. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288:339-344.
456. Chen, S., and Y.M. Wang. 2005. Multigene tracking of quasispecies in viral persistence and clearance of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 11:2874-2884.
457. Laskus, T., J. Wilkinson, J.F. Gallegos-Orozco, M. Radkowski, D.M. Adair, M. Nowicki, E. Operskalski, Z. Buskell, L.B. Seeff, H. Vargas, and J. Rakela. 2004. Analysis of hepatitis C virus quasispecies transmission and evolution in patients infected through blood transfusion. *Gastroenterology* 127:764-776.
458. Farci, P., S.J. Munoz, A. Shimoda, S. Govindarajan, D.C. Wong, A. Coiana, G. Peddis, R. Rubin, and R.H. Purcell. 1999. Experimental transmission of hepatitis C virus-associated fulminant hepatitis to a chimpanzee. *J Infect Dis* 179:1007-1011.
459. Sheridan, I., O.G. Pybus, E.C. Holmes, and P. Klenerman. 2004. High-resolution phylogenetic analysis of hepatitis C virus adaptation and its relationship to disease progression. *J Virol* 78:3447-3454.
460. Honda, M., S. Kaneko, A. Sakai, M. Unoura, S. Murakami, and K. Kobayashi. 1994. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* 20:1144-1151.
461. Fernandez, J., D. Taylor, D.R. Morhardt, K. Mihalik, M. Puig, C.M. Rice, S.M. Feinstone, and M.E. Major. 2004. Long-term persistence of infection in chimpanzees inoculated with an infectious hepatitis C virus clone is associated with a decrease in the viral amino acid substitution rate and low levels of heterogeneity. *J Virol* 78:9782-9789.
462. Higashi, K., K. Tsukiyama-Kohara, T. Tanaka, E. Tanaka, K. Kiyosawa, and M. Kohara. 2005. Characterization of hypervariable region in hepatitis C virus envelope protein during acute and chronic infection. *Arch Virol* 150:883-898.
463. Gonzalez-Peralta, R.P., K. Qian, J.Y. She, G.L. Davis, T. Ohno, M. Mizokami, and J.Y. Lau. 1996. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 49:242-247.
464. Koizumi, K., N. Enomoto, M. Kurosaki, T. Murakami, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato. 1995. Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment. *Hepatology* 22:30-35.



465. Yuki, N., N. Hayashi, T. Moribe, Y. Matsushita, T. Tabata, T. Inoue, Y. Kanazawa, K. Ohkawa, A. Kasahara, H. Fusamoto, and T. Kamada. 1997. Relation of disease activity during chronic hepatitis C infection to complexity of hypervariable region 1 quasispecies. *Hepatology* 25:439-444.
466. Hayashi, J., Y. Kishihara, K. Yamaji, N. Furusyo, T. Yamamoto, Y. Pae, Y. Etoh, H. Ikematsu, and S. Kashiwagi. 1997. Hepatitis C viral quasispecies and liver damage in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 25:697-701.
467. Naito, M., N. Hayashi, T. Moribe, H. Hagiwara, E. Mita, Y. Kanazawa, A. Kasahara, H. Fusamoto, and T. Kamada. 1995. Hepatitis C viral quasispecies in hepatitis C virus carriers with normal liver enzymes and patients with type C chronic liver disease. *Hepatology* 22:407-412.
468. Curran, R., C.L. Jameson, J.K. Craggs, A.M. Grabowska, B.J. Thomson, A. Robins, W.L. Irving, and J.K. Ball. 2002. Evolutionary trends of the first hypervariable region of the hepatitis C virus E2 protein in individuals with differing liver disease severity. *J Gen Virol* 83:11-23.
469. Lopez-Labrador, F.X., S. Ampurdanes, M. Gimenez-Barcons, M. Guilera, J. Costa, M.T. Jimenez de Anta, J.M. Sanchez-Tapias, J. Rodes, and J.C. Saiz. 1999. Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection [correction of interferon]. *Hepatology* 29:897-903.
470. Wietzke-Braun, P., V. Meier, K. Neubauer-Saile, S. Mihm, and G. Ramadori. 2005. Treatment of genotype 2 and 3 chronic hepatitis C virus-infected patients. *World J Gastroenterol* 11:6188-6192.
471. Davis, G.L., and J.Y. Lau. 1997. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology* 26:122S-127S.
472. Enomoto, N., I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato. 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.
473. Chayama, K., A. Tsubota, M. Kobayashi, K. Okamoto, M. Hashimoto, Y. Miyano, H. Koike, I. Koida, Y. Arase, S. Saitoh, Y. Suzuki, N. Murashima, K. Ikeda, and H. Kumada. 1997. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 25:745-749.

474. Kurosaki, M., N. Enomoto, T. Murakami, I. Sakuma, Y. Asahina, C. Yamamoto, T. Ikeda, S. Tozuka, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato. 1997. Analysis of genotypes and amino acid residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon-beta therapy. *Hepatology* 25:750-753.
475. Kobayashi, M., K. Watanabe, M. Ishigami, K. Murase, H. Ito, K. Ukai, M. Yano, K. Takagi, M. Hattori, S. Kakumu, and K. Yoshioka. 2002. Amino acid substitutions in the nonstructural region 5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and its relation to viral load and response to interferon. *Am J Gastroenterol* 97:988-998.
476. Khorsi, H., S. Castelain, A. Wyseur, J. Izopet, V. Canva, A. Rombout, D. Capron, J.P. Capron, F. Lunel, L. Stuyver, and G. Duverlie. 1997. Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209-2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon-alfa therapy in French patients. *J Hepatol* 27:72-77.
477. Zeuzem, S., J.H. Lee, and W.K. Roth. 1997. Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* 25:740-744.
478. Hofgartner, W.T., S.J. Polyak, D.G. Sullivan, R.L. Carithers, Jr., and D.R. Gretch. 1997. Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus in North American patients infected with HCV genotype 1a or 1b. *J Med Virol* 53:118-126.
479. Odeberg, J., Z. Yun, A. Sonnerborg, O. Weiland, and J. Lundeberg. 1998. Variation in the hepatitis C virus NS5a region in relation to hypervariable region 1 heterogeneity during interferon treatment. *J Med Virol* 56:33-38.
480. Polyak, S.J., S. McArdle, S.L. Liu, D.G. Sullivan, M. Chung, W.T. Hofgartner, R.L. Carithers, Jr., B.J. McMahon, J.I. Mullins, L. Corey, and D.R. Gretch. 1998. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J Virol* 72:4288-4296.
481. Murphy, M.D., H.R. Rosen, G.I. Marousek, and S. Chou. 2002. Analysis of sequence configurations of the ISDR, PKR-binding domain, and V3 region as predictors of response to induction interferon-alpha and ribavirin therapy in chronic hepatitis C infection. *Dig Dis Sci* 47:1195-1205.
482. Abbate, I., G. Cappiello, O. Lo Iacono, R. Longo, D. Ferraro, G. Antonucci, V. Di Marco, R. Di Stefano, A. Craxi, M.C. Solmone, A. Spano, G. Ippolito, and M.R. Capobianchi. 2003. Heterogeneity of HVR-1 quasispecies is predictive of early but not sustained virological response in genotype 1b-infected patients

- undergoing combined treatment with PEG- or STD-IFN plus RBV. *J Biol Regul Homeost Agents* 17:162-165.
483. Vuillermoz, I., E. Khattab, E. Sablon, I. Ottevaere, D. Durantel, C. Vieux, C. Trepo, and F. Zoulim. 2004. Genetic variability of hepatitis C virus in chronically infected patients with viral breakthrough during interferon-ribavirin therapy. *J Med Virol* 74:41-53.
484. Puig-Basagoiti, F., X. Forns, I. Furcic, S. Ampurdanes, M. Gimenez-Barcons, S. Franco, J.M. Sanchez-Tapias, and J.C. Saiz. 2005. Dynamics of hepatitis C virus NS5A quasispecies during interferon and ribavirin therapy in responder and non-responder patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J Gen Virol* 86:1067-1075.
485. Layden-Almer, J.E., C. Kuiken, R.M. Ribeiro, K.J. Kunstman, A.S. Perelson, T.J. Layden, and S.M. Wolinsky. 2005. Hepatitis C virus genotype 1a NS5A pretreatment sequence variation and viral kinetics in African American and white patients. *J Infect Dis* 192:1078-1087.
486. Sarrazin, C., M. Bruckner, E. Herrmann, B. Ruster, K. Bruch, W.K. Roth, and S. Zeuzem. 2001. Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 289:150-163.
487. Sarrazin, C., I. Kornetzky, B. Ruster, J.H. Lee, B. Kronenberger, K. Bruch, W.K. Roth, and S. Zeuzem. 2000. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 31:1360-1370.
488. Chayama, K., F. Suzuki, A. Tsubota, M. Kobayashi, Y. Arase, S. Saitoh, Y. Suzuki, N. Murashima, K. Ikeda, N. Takahashi, M. Kinoshita, and H. Kumada. 2000. Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* 32:1138-1144.
489. Berg, T., A. Mas Marques, M. Hohne, B. Wiedenmann, U. Hopf, and E. Schreier. 2000. Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. *Hepatology* 32:1386-1395.
490. Kanazawa, Y., N. Hayashi, E. Mita, T. Li, H. Hagiwara, A. Kasahara, H. Fusamoto, and T. Kamada. 1994. Influence of viral quasispecies on effectiveness of interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 20:1121-1130.

491. Moribe, T., N. Hayashi, Y. Kanazawa, E. Mita, H. Fusamoto, M. Negi, T. Kaneshige, H. Igimi, T. Kamada, and K. Uchida. 1995. Hepatitis C viral complexity detected by single-strand conformation polymorphism and response to interferon therapy. *Gastroenterology* 108:789-795.
492. Yeh, B.I., K.H. Han, S.H. Oh, H.S. Kim, S.H. Hong, and Y.S. Kim. 1996. Nucleotide sequence variation in the hypervariable region of the hepatitis C virus in the sera of chronic hepatitis C patients undergoing controlled interferon-alpha therapy. *J Med Virol* 49:95-102.
493. Le Guen, B., G. Squadrito, B. Nalpas, P. Berthelot, S. Pol, and C. Brechot. 1997. Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 25:1250-1254.
494. Toyoda, H., T. Kumada, S. Nakano, I. Takeda, K. Sugiyama, T. Osada, S. Kiriya, Y. Sone, M. Kinoshita, and T. Hadama. 1997. Quasispecies nature of hepatitis C virus and response to alpha interferon: significance as a predictor of direct response to interferon. *J Hepatol* 26:6-13.
495. Pawlotsky, J.M., M. Pellerin, M. Bouvier, F. Roudot-Thoraval, G. Germanidis, A. Bastie, F. Darthuy, J. Remire, C.J. Soussy, and D. Dhumeaux. 1998. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 54:256-264.
496. Hino, K., Y. Yamaguchi, D. Fujiwara, Y. Katoh, M. Korenaga, M. Okazaki, M. Okuda, and K. Okita. 2000. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study. *J Viral Hepat* 7:36-42.
497. Yeh, B.I., K.H. Han, H.W. Lee, J.H. Sohn, W.S. Ryu, D.J. Yoon, J. Yoon, H.W. Kim, I.D. Kong, S.J. Chang, and J.W. Choi. 2002. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus type 1b infection. *J Med Virol* 66:481-487.
498. Farci, P., R. Strazzera, H.J. Alter, S. Farci, D. Degioannis, A. Coiana, G. Peddis, F. Usai, G. Serra, L. Chessa, G. Diaz, A. Balestrieri, and R.H. Purcell. 2002. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3081-3086.
499. Hagiwara, H., N. Hayashi, A. Kasahara, M. Oshita, K. Katayama, M. Kato, M. Masuzawa, H. Fusamoto, M. Sakurai, and T. Kamada. 1996. Treatment with recombinant interferon-alpha 2a for patients with chronic hepatitis C: predictive factors for biochemical and virologic response. Osaka Liver Disease Study Group. *Scand J Gastroenterol* 31:1021-1026.

500. Shindo, M., K. Hamada, S. Koya, K. Arai, Y. Sokawa, and T. Okuno. 1996. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology* 24:1018-1023.
501. Sandres, K., M. Dubois, C. Pasquier, J.L. Payen, L. Alric, M. Duffaut, J.P. Vinel, J.P. Pascal, J. Puel, and J. Izopet. 2000. Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J Virol* 74:661-668.
502. Squadrito, G., G. Raffa, T. Restuccia, T. Pollicino, S. Brancatelli, and G. Raimondo. 2002. Is investigation of hepatitis C virus NS5A gene heterogeneity a tool for predicting long-lasting response to interferon therapy in patients with HCV-1b chronic hepatitis? *J Viral Hepat* 9:360-369.
503. Gaudy, C., A. Moreau, P. Veillon, S. Temoin, F. Lunel, and A. Goudeau. 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.
504. Polyak, S.J., G. Faulkner, R.L. Carithers, Jr., L. Corey, and D.R. Gretch. 1997. Assessment of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by gel shift analysis: correlation with response to interferon therapy. *J Infect Dis* 175:1101-1107.
505. Okada, S., Y. Akahane, H. Suzuki, H. Okamoto, and S. Mishiro. 1992. The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* 16:619-624.
506. Mizokami, M., J.Y. Lau, K. Suzuki, T. Nakano, and T. Gojobori. 1994. Differential sensitivity of hepatitis C virus quasispecies to interferon-alpha therapy. *J Hepatol* 21:884-886.
507. Sakuma, I., N. Enomoto, M. Kurosaki, F. Marumo, and C. Sato. 1996. Selection of hepatitis C virus quasispecies during interferon treatment. *Arch Virol* 141:1921-1932.
508. Yun, Z.B., J. Odeberg, J. Lundeberg, O. Weiland, M. Uhlen, and A. Sonnerborg. 1996. Restriction of hepatitis C virus heterogeneity during prolonged interferon-alpha therapy in relation to changes in virus load. *J Infect Dis* 173:992-996.
509. Klenerman, P., F. Lechner, M. Kantzanou, A. Ciurea, H. Hengartner, and R. Zinkernagel. 2000. Viral escape and the failure of cellular immune responses. *Science* 289:2003.

510. Thelu, M.A., K. Brengel-Pesce, V. Leroy, V. Attuil, E. Drouet, J.M. Seigneurin, and J.P. Zarski. 2001. Influence of three successive antiviral treatments on viral heterogeneity in nonresponder chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 65:698-705.
511. Gonzalez-Peralta, R.P., W.Z. Liu, G.L. Davis, K.P. Qian, and J.Y. Lau. 1997. Modulation of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by interferon-alpha and ribavirin therapy. *J Viral Hepat* 4:99-106.
512. Lee, J.H., M. von Wagner, W.K. Roth, G. Teuber, C. Sarrazin, and S. Zeuzem. 1998. Effect of ribavirin on virus load and quasispecies distribution in patients infected with hepatitis C virus. *J Hepatol* 29:29-35.
513. Querenghi, F., Q. Yu, G. Billaud, G. Maertens, C. Trepo, and F. Zoulim. 2001. Evolution of hepatitis C virus genome in chronically infected patients receiving ribavirin monotherapy. *J Viral Hepat* 8:120-131.
514. Dieterich, D.T. 1999. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: clinical issues in coinfection. *Am J Med* 107:79S-84S.
515. Dodig, M., and A.S. Tavill. 2001. Hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfections. *J Clin Gastroenterol* 33:367-374.
516. Bagaglio, S., R. Bruno, S. Lodrini, M.S. De Mitri, P. Andreone, E. Loggi, L. Galli, A. Lazzarin, and G. Morsica. 2003. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus (HCV) in clinical strains of HIV positive and HIV negative patients chronically infected with HCV genotype 3a. *J Biol Regul Homeost Agents* 17:153-161.
517. Neau, D., A.C. Jouvencel, E. Legrand, P. Trimoulet, T. Galperine, I. Chitty, M. Ventura, B. Le Bail, P. Morlat, J.Y. Lacut, J.M. Ragnaud, M. Dupon, H. Fleury, and M.E. Lafon. 2003. Hepatitis C virus genetic variability in 52 human immunodeficiency virus-coinfected patients. *J Med Virol* 71:41-48.
518. Mao, Q., S.C. Ray, O. Laeyendecker, J.R. Ticehurst, S.A. Strathdee, D. Vlahov, and D.L. Thomas. 2001. Human immunodeficiency virus seroconversion and evolution of the hepatitis C virus quasispecies. *J Virol* 75:3259-3267.
519. Roque-Afonso, A.M., M. Robain, D. Simoneau, P. Rodriguez-Mathieu, M. Gigou, L. Meyer, and E. Dussaix. 2002. Influence of CD4 cell counts on the genetic heterogeneity of hepatitis C virus in patients coinfecting with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 185:728-733.
520. Babik, J.M., and M. Holodniy. 2003. Impact of highly active antiretroviral therapy and immunologic status on hepatitis C virus quasispecies diversity in

- human immunodeficiency virus/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Virol* 77:1940-1950.
521. Sherman, K.E., C. Andreatta, J. O'Brien, A. Gutierrez, and R. Harris. 1996. Hepatitis C in human immunodeficiency virus-coinfected patients: increased variability in the hypervariable envelope coding domain. *Hepatology* 23:688-694.
522. Polyak, S.J., D.G. Sullivan, M.A. Austin, J.Y. Dai, M.C. Shuhart, K.L. Lindsay, H.L. Bonkovsky, A.M. Di Bisceglie, W.M. Lee, C. Morishima, and D.R. Gretch. 2005. Comparison of amplification enzymes for Hepatitis C Virus quasispecies analysis. *Virol J* 2:41.
523. Benhamou, Y., V. Di Martino, M. Bochet, G. Colombet, V. Thibault, A. Liou, C. Katlama, and T. Poynard. 2001. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. *Hepatology* 34:283-287.
524. Koziel, M.J., D. Dudley, N. Afdhal, Q.L. Choo, M. Houghton, R. Ralston, and B.D. Walker. 1993. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol* 67:7522-7532.
525. Rehermann, B., K.M. Chang, J.G. McHutchison, R. Kokka, M. Houghton, and F.V. Chisari. 1996. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 98:1432-1440.
526. He, X.S., B. Rehermann, F.X. Lopez-Labrador, J. Boisvert, R. Cheung, J. Mumm, H. Wedemeyer, M. Berenguer, T.L. Wright, M.M. Davis, and H.B. Greenberg. 1999. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5692-5697.
527. Grabowska, A.M., F. Lechner, P. Klenerman, P.J. Tighe, S. Ryder, J.K. Ball, B.J. Thomson, W.L. Irving, and R.A. Robins. 2001. Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *Eur J Immunol* 31:2388-2394.
528. Zhu, F., and D.D. Eckels. 2002. Functionally distinct helper T-cell epitopes of HCV and their role in modulation of NS3-specific, CD8+/tetramer positive CTL. *Hum Immunol* 63:710-718.
529. Lechner, F., D.K. Wong, P.R. Dunbar, R. Chapman, R.T. Chung, P. Dohrenwend, G. Robbins, R. Phillips, P. Klenerman, and B.D. Walker. 2000.

- Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191:1499-1512.
530. Gruener, N.H., F. Lechner, M.C. Jung, H. Diepolder, T. Gerlach, G. Lauer, B. Walker, J. Sullivan, R. Phillips, G.R. Pape, and P. Klenerman. 2001. Sustained dysfunction of antiviral CD8<sup>+</sup> T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 75:5550-5558.
531. Wedemeyer, H., X.S. He, M. Nascimbeni, A.R. Davis, H.B. Greenberg, J.H. Hoofnagle, T.J. Liang, H. Alter, and B. Rehermann. 2002. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 169:3447-3458.
532. Sugimoto, K., F. Ikeda, J. Stadanlick, F.A. Nunes, H.J. Alter, and K.M. Chang. 2003. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 38:1437-1448.
533. Cabrera, R., Z. Tu, Y. Xu, R.J. Firpi, H.R. Rosen, C. Liu, and D.R. Nelson. 2004. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40:1062-1071.
534. Rushbrook, S.M., S.M. Ward, E. Unitt, S.L. Vowler, M. Lucas, P. Klenerman, and G.J. Alexander. 2005. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 79:7852-7859.
535. Boettler, T., H.C. Spangenberg, C. Neumann-Haefelin, E. Panther, S. Urbani, C. Ferrari, H.E. Blum, F. von Weizsacker, and R. Thimme. 2005. T cells with a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 79:7860-7867.
536. Miladi, A., J.P. Lavergne, C. Hezode, D. Dhumeaux, F. Penin, and J.M. Pawlotsky. 2004. Prevalence of anti-HCV F (frameshift) protein antibodies in patients with various forms of HCV infection and the putative physiological role of F protein. In *11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses*, Heidelberg, Germany. Poster 257.
537. Yewdell, J.W., and M. Del Val. 2004. Immunodominance in TCD8<sup>+</sup> responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity* 21:149-153.
538. Kern, F., T. Bunde, N. Faulhaber, F. Kiecker, E. Khatamzas, I.M. Rudawski, A. Pruss, J.W. Gratama, R. Volkmer-Engert, R. Ewert, P. Reinke, H.D. Volk, and L.J. Picker. 2002. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a



large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis* 185:1709-1716.

539. Nguyen, T.T., A. Sedghi-Vaziri, L.B. Wilkes, T. Mondala, P.J. Pockros, K.L. Lindsay, and J.G. McHutchison. 1996. Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepat* 3:75-78.
540. Hughes, M.G., Jr., C.K. Rudy, T.W. Chong, R.L. Smith, H.L. Evans, J.C. Iezzoni, R.G. Sawyer, and T.L. Pruett. 2004. E2 quasispecies specificity of hepatitis C virus association with allografts immediately after liver transplantation. *Liver Transpl* 10:208-216.
541. Owsianka, A., R.F. Clayton, L.D. Loomis-Price, J.A. McKeating, and A.H. Patel. 2001. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Gen Virol* 82:1877-1883.
542. Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7271-7276.
543. Goffard, A., N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F.L. Cosset, C. Montpellier, and J. Dubuisson. 2005. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* 79:8400-8409.
544. Drummer, H., A. Maerz, and P. Pountourios. 2005. Structural and functional role of a fusion-peptide like sequence in hepatitis C virus glycoprotein E2. *In 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses*, Montréal, Canada. Oral 34.

