UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

# AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

# LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

B.U.M GRENOBLE
D 115 079279 0

1er exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2004

N° 7051

# Recherche de facteurs pharmacologiques et virologiques de réponse à la ribavirine chez les patients traités pour une hépatite C chronique

## MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

## THESE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Grenoble
Et soutenue publiquement le 20 décembre 2004
Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par : **Sylvie LARRAT**
*[Données à caractère personnel]*

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

**Président :** Monsieur le Professeur E. Drouet

**Membres :** Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin
Monsieur le Professeur J.P. Zarski
Madame le Docteur F. Stanke-Labesque
Monsieur le Docteur C. Souvignet

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MEDECINE-PHARMACIE

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2004 N°

# Recherche de facteurs pharmacologiques et virologiques de réponse à la ribavirine chez les patients traités pour une hépatite C chronique

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

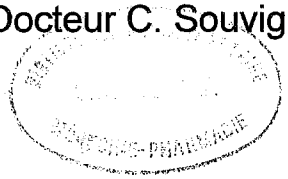
Présentée à la Faculté de Pharmacie de Grenoble
Et soutenue publiquement le 20 décembre 2004
Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par : **Sylvie LARRAT**
*[Données à caractère personnel]*

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

**Président :** Monsieur le Professeur E. Drouet

**Membres :** Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin
Monsieur le Professeur J.P. Zarski
Madame le Docteur F. Stanke-Labesque
Monsieur le Docteur C. Souvignet



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. le Professeur **P. DEMENGE**
Vice-Doyenne : Mme **A. VILLET**

## PROFESSEURS DE PHARMACIE

| | | |
|---|---|---|
| **BAKRI** | Abdelaziz | Pharmacie Galénique |
| **BENOIT-GUYOD** | Jean-Louis | (Emérite) |
| **BURMEISTER** | Wilhelm | Biophysique |
| **CALOP** | Jean | Pharmacie Clinique et Bio-Technique |
| **DANEL** | Vincent | Toxicologie |
| **DECOUT** | Jean-Luc | Chimie Bio-Inorganique |
| **DEMENGE** | Pierre | Physiologie / Pharmacologie |
| **DROUET** | Emmanuel | Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie |
| **FAVIER** | Alain | Biochimie / Biotechnologie |
| **GOULON** | Chantal | Biophysique |
| **GRILLOT** | Renée | Parasitologie |
| **LECLERC** | Gérard | Chimie Organique |
| **MARIOTTE** | Anne-Marie | Pharmacognosie |
| **PEYRIN** | Eric | Chimie Analytique |
| **RIBUOT** | Christophe | Physiologie / Pharmacologie |
| **ROUSSEL** | Anne-Marie | Biochimie |
| **SEIGLE-MURANDI** | Françoise | Botanique et Cryptogamie |
| **STEIMAN** | Régine | Biologie Cellulaire |
| **WOUESSIDJEWE** | Denis | Pharmacie Galénique |

## PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)

| | | |
|---|---|---|
| **CHAMPON** | Bernard | Pharmacie Clinique |

Mise à jour du 06/10/2004

# MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

| | | |
|---|---|---|
| **ALDEBERT** | Delphine | Parasitologie |
| **ALLENET** | Benoit | Pharmacie Clinique |
| **BARTOLI** | Marie-Hélène | Pharmacie Clinique et Biotechn. |
| **BOUMENDJEL** | Ahcène | Pharmacognosie |
| **CARON** | Cécile | Biologie Moléculaire |
| **CHOISNARD** | Luc | Pharmacotechnie et génie de la formulation |
| **DELETRAZ** | Martine | Droit Pharmaceutique Economie |
| **DEMEILLERS** | Christine | Biochimie |
| **DESIRE** | Jérôme | Chimie Bioorganique |
| **DIJOUX-FRANCA** | Marie-Geneviève | Pharmacognosie |
| **DURMORT-MEUNIER** | Claire | Virologie |
| **ESNAULT** | Danielle | Chimie Analytique |
| **FAURE** | Patrice | Biochimie |
| **FAURE-JOYEUX** | Marie | Physiologie-Pharmacologie |
| **FOUCAUD-GAMEN** | Jacqueline | Immunologie |
| **GEZE** | Annabelle | Pharmacotechnie Galénique |
| **GERMI** | Raphaële | Bactériologie |
| **GILLY** | Catherine | Chimie Thérapeutique |
| **GODIN-RIBUOT** | Diane | Physiologie – Pharmacologie |
| **GROSSET** | Catherine | Chimie Analytique |
| **GUIRAUD** | Pascale | Biologie Cellulaire et Génétique |
| **HININGER-FAVIER** | Isabelle | Biochimie |
| **KRIVOBOK** | Serge | Botanique – Cryptogamie |
| **MORAND** | Jean-Marc | Chimie Thérapeutique |
| **NICOLLE** | Edwige | Chimie Organique / Chimie Thérapeutique |
| **PINEL** | Claudine | Parasitologie |
| **RAVEL** | Anne | Chimie Analytique |
| **RAVELET** | Corinne | Chimie Analytique |
| **RICHARD** | Jean-Michel | |
| **RIONDEL** | Jacqueline | Physiologie - Pharmacologie |
| **SEVE** | Michel | Ens. Physique / Rech. Biochimie |
| **VANHAVERBEKE** | Cécile | Chimie Bio-Inorganique |
| **VILLEMAIN** | Danielle | Mathématiques / Informatique |
| **VILLET** | Annick | Chimie Analytique |

**PROFESSEUR AGREGE (PRAG)**

| | | |
|---|---|---|
| **ROUTABOUL** | Christel | Chimie Générale |

# Remerciements :

Je remercie Monsieur le Professeur E. Drouet de m'avoir accueillie et encadrée dans son laboratoire lors de ma 5ème année de pharmacie, de m'avoir conseillée de passer l'internat, et d'avoir été, par son enseignement, à l'origine de mon intérêt pour la virologie.

Je remercie Messieurs les Professeurs G. Bessard et J..M. Seigneurin de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs et d'avoir encadré le travail présenté ici.

Je remercie Monsieur le Professeur J.P. Zarski de m'avoir accueillie dans son service clinique et d'avoir relu mon travail à la lumière de ses grandes connaissances sur l'hépatite C.

Je remercie tout particulièrement Mme le Docteur F. Stanke-Labesque pour ses compétences en pharmacologie, et sa précieuse contribution à la rédaction de ce mémoire ainsi qu'à l'article issu de la partie pharmacologique de ce travail.

Je tiens à remercier Mme le Docteur N.Dutertre pour son encadrement en virologie, pour sa rigueur scientifique ainsi que pour le temps qu'elle m'a consacré.

Je remercie également Mme le Docteur A. Signori-Schmuck, pour son aide précieuse concernant les techniques de biologie moléculaire utilisées en virologie et sa relecture attentive du présent manuscrit.

Merci encore à Mr le Docteur C. Souvignet d'avoir eu l'idée originale de ce travail sur la ribavirine et de son soutien et son encadrement lors de mon stage clinique en hépato-gastroentérologie.

Je remercie Mme A. Plages pour avoir sélectionné les sérums de l'étude, m'avoir aidé à trouver de nombreux documents et informations concernant l'hépatite C, ainsi que pour ses nombreux conseils éclairés.

Je remercie enfin Samira Fafi-Kremer, Bénédicte Gratacap, Gwenaël Nadeau, Sylvie Arribert, Eliane Boujet, Anne-Marie Renard, Christel Roche, Nathalie Muller et Michel Gervasoni pour leurs judicieux conseils et leur bonne humeur qui m'a accompagnée pendant toute une partie de mon internat.

Merci également à ma petite sœur, Viviane, pour sa grande connaissance récente des acides aminés (cf. tableaux en annexe) et des structures protéiques.

Dernière dédicace à mes parents, Professeurs agrégés de lettres classiques, qui ont corrigé l'orthographe de ce document sans pour autant se désintéresser complètement du fond. En effet, bien que n'étant pas du tout dans le milieu médical, ils ont tout de même soulevé un problème très intéressant: « Sur le fond, nous ne sommes pas tout à fait d'accord avec le rôle que tu attribues aux codons de réplicons dans la transaminase de l'arbre phylogénétique ainsi que dans la transfection des capsides monophosphatées de la polymérase mutagène… » ; mais qu'ils se rassurent : ceci fera certainement l'objet d'une étude ultérieure…

# Sommaire :


Introduction 1

**Données bibliographiques** **4**

***I-Les modèles d'étude du VHC*** **5**
1-Les modèles animaux 5
2-Les virus apparentés 6
3-Les systèmes de culture cellulaire 6
4-Les réplicons sub-génomiques ou génomiques 8

***II-Le virus de l'hépatite C*** **10**
1-Son génome 10
2-Le cycle viral 17
3-Variabilité génomique du VHC 19

***III-Physiopathologie d'une hépatite C humaine*** **22**
1-Infection aiguë 22
2-Infection chronique 24
3-Cirrhose et carcinome hépatocellulaire 28

***IV-Les mécanismes immunitaires de persistance virale*** **29**
1-Réponse humorale 29
2-Réponse cellulaire 29

***V-Diagnostic et suivi biologique d'une hépatite virale C*** **31**
1-Diagnostic sérologique indirect 31
2-Diagnostic direct 33

***VI-Traitement d'une hépatite virale C*** **40**
1-Les indications de traitement 40
2-L'interféron 45
3-La ribavirine 49
4-Nouvelles perspectives thérapeutiques 58

**Objectifs de l'étude** **62**

***I-Etude pharmacologique*** **63**

***II-Etude virologique*** **63**

**Matériel et méthodes** 64

***I-Etude pharmacologique*** 65
1-Matériel et réactifs 65
2-La Chromatographie liquide haute pression (CLHP) 65
3-Extraction en phase solide (SPE) 66
4-Validation de la méthode (normes FDA) 67
5-Sélection des patients 69

***II-Etude virologique*** 70
1-Sélection des patients 70
2-Mesure de la charge virale 71
3-Extraction de l'ARN viral en vue du séquençage 71
4-Amplification par PCR en vue du séquençage 71
5-Le séquençage 74

**Résultats** 76

**I-Etude pharmacologique** 77
1-Phase de validation 77
2-Etude clinique 80

***II-Etude virologique*** 81

**Discussion** 87

**Conclusion** 94

**Bibliographie** 97

# Table des illustrations :


Figure 1 : Prévalence mondiale du virus de l'hépatite C 3

Figure 2 : Prévalence du virus de l'hépatite C dans différents pays 3

Figure 3 : Vue en coupe d'une représentation schématique de la structure en 3D du VHC 5

Figure.4 : Modèle murin d'infection HCV 6

Figure 5 : Différents systèmes de culture du VHC étudiés 7

Figure 6 : Comparaison du génome du VHC avec la structure d'un réplicon sub-génomique 9

Figure 7 : Génome du VHC et rôles supposés des différentes protéines codées 10

Figure 8 : Structure secondaire de l'IRES du VHC 11

Figure 9 : Mécanisme d'initiation de la traduction par l'IRES du VHC 12

Figure 10 : Alignement de séquences de polymérase du MMLV, du VIH et du VHC 15

Figure 11 : Modélisation de l'interaction entre la polymérase du VHC et l'ARN lors de la réplication du génome viral 16

Figure 12 : Principe de l'inhibition de la PKR par la région ISDR de NS5a 17

Figure.13 : Modèle hypothétique du cycle viral du VHC 18

Figure.14 : Arbre phylogénétique établi à partir d'une partie de NS5B 20

Figure.15 : Répartition géographique mondiale des génotypes et sous-types du VHC 21

Figure.16: Schéma de l'évolution d'une infection par le VHC 23

Figure 17 : Progression de la fibrose dans l'hépatite chronique C 25

Figure 18 : Evolution du processus de fibrose lors d'une hépatite virale C chronique 26

Figure 19 : Schéma de la fibrose hépatique lors d'une hépatite virale chronique C 27

Figure 20 : Antigènes des différentes générations de tests sérologiques 31

Figure 21 : Détection de l'ARN du VHC et des ac anti-VHC par les différentes générations de tests lors d'une infection aiguë par le VHC 32

Figure 22 : Relation entre l'ARN du VHC et le total HCV core Ag 37

Figure 23 : Profils obtenus avec la technique Inno-LiPA HCV II pour les différents types et sous types du VHC 38

Figure 24 : Modèle du CombOLISA microarray 39

Figure 25 : Evolution des traitements de l'hépatite C 40

Figure 26 : Avancées dans le traitement de l'hépatite C 42

Figure 27 : Taux sériques d'ALAT chez les patients non répondeurs à S24 de bithérapie et qui ont continué soit de la RBV seule soit un placebo pendant 48 semaines 44

Figure 28 : Action antivirale de l'interféron 46

Figure 29 : Structures de la guanosine et de la ribavirine 50
Figure 30 : Evolution des concentrations d'hémoglobine chez des patients traités par la bi-thérapie IFN-Ribavirine 53
Figure 31 : La ribavirine s'apparie de façon équivalente avec la cytosine et l'uracile 55
Figure 32 : Différents mécanismes d'action possibles de la ribavirine 56
Figure 33 : Schémas recommandés de traitement en fonction du génotype 58
Figure 34 : Schéma du groupement fonctionnel greffé sur la silice des cartouches d'extraction en phase solide 66
Figure 35 : Synthèse d'un brin d'ADN après ajout d'un désoxynucléotide ou d'un didésoxynucléotide 71
Figure 36 : Chromatogrammes typiques de sérum humain après SPE 77
Figure 37 : Droite d'étalonnage moyenne de la ribavirine rapportée au standard interne 78
Figure 38 : Représentation des concentrations de ribavirine dans les sérums de 11 répondeurs et de 13 non-répondeurs après 12 et 24 semaines de bithérapie IFN-ribavirine 80
Figure 39 : Visualisation sur gel d'agarose des produits de PCR 81
Figure 40 : Schéma d'électrophérogramme représentant des fragments d'ADN amplifiés portant à leur extrémité un ddNTP marqué et exemple de graphe obtenu 81
Figure 41 : Arbre phylogénétique de séquences de NS5B des patients répondeurs et non répondeurs avant traitement, le sous type est précisé lorsqu'il est connu 82
Figure 42 : Alignement des séquences en acides aminés de 19 patients avant traitement 83
Figure 43 : Evolution des charges virales des non-répondeurs à W0-12-24 83
Figure 44 : Evolution des concentrations de ribavirine en cours de traitement 84
Figure 45 : Exemples de séquences en acides aminés de la région centrale de NS5b, charge virale et concentration sérique de ribavirine de 4 patients non répondeurs à W0-12-24 d'un traitement par bi-thérapie IFN-RBV 85
Figure 46 : Arbre phylogénétique de séquences de la région centrale de NS5B de 9 patients non-répondeurs avant traitement à W0-12-14 de bi-thérapie 86
Figure 47 : Formules chimique de la ribavirine et des deux analogues nucléosidiques utilisés dans les thérapies anti-VIH: le DDI et le DDC 88
Figure 48 : Structure primaire et effets des mutations de NS5b de la souche HCV JK-1 91
Figure 49 : Représentation de la structure secondaire de la polymérase du VHC 92

Tableau 1 : Différents systèmes de classification des génotypes du VHC 19
Tableau 2 : Terminologie des études relatives à la diversité génomique du VHC 20
Tableau 3 : Pourcentage d'homologie observé par comparaison entre les différentes régions génomiques du VHC de plusieurs isolats 21
Tableau 4 : Sore de Knodell 27
Tableau 5 : Sore Metavir 28
Tableau 6 : Tests ELISA de détection des Ac anti-VHC disponibles 33
Tableau 7 : Tests de détection qualitative de l'ARN du VHC disponibles 34
Tableau 8 : Techniques de quantification de l'ARN du VHC disponibles 36
Tableau 9 : Techniques de génotypage du VHC disponibles. 38
Tableau 10 : Caractéristiques pharmacocinétiques de la ribavirine 51
Tableau 11 : Pourcentages de réponse virologique soutenue à la bi-thérapie IFNPeg+RBV en fonction du génotype du VHC 56
Tableau 12 : Caractéristiques des patients inclus dans l'étude pharmacologique 69
Tableau 13 : Caractéristiques des patients inclus dans l'étude virologique 70
Tableau 14 : Amorces utilisées pour la RT-PCR, la PCR nichée et la réaction de séquence 72
Tableau 15 : Répétabilité et reproductibilité de la méthode 78
Tableau 16 Molécules fréquemment co-prescrites avec la ribavirine 79
Tableau 17 : Concentrations sériques de ribavirine après 12 et 24 semaines de traitement 80

# Table des abréviations :

AA : acide aminé
ADN : acide désoxyribonucléique = DNA
ALAT : alanine aminotransférase
ALD : affection de longue durée
ATP : adénosine triphosphate
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager
AZT : zidovudine
BVDV : virus de la diarrhée virale bovine
CHC : carcinome hépatocellulaire
CVID : syndrome d'immunodéficience commune variable
ddNTP : didésoxyribonucléotides
DDI : didanosine
D4T : stavudine
DGV : dépistage génomique viral
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
EMCV : virus de l'encéphalomyocardite
FDA : food and drug administration
HPLC-UV : chromatographie liquide haute pression et détection par ultraviolets
HVR1 : région hypervariable 1
IFN : Interféron, IFNPeg : Interféron Pégylé
Ig : immunoglobuline
IMPDH : Inosine mono phosphate déshydrogénase
INRT : inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase
IRES : internal ribosome entry site : site d'entrée du ribosome
ISDR : interferon sensitivity determining region : région déterminant la sensibilité à l'IFN
LDLR : low density lipoprotein receptor: récepteurs de lipoprotéines basse densité
LVV : lévovirine
MEC : matrice extracellulaire
Met-ARNt : acide ribonucléique de transfert portant une méthionine : acide aminé d'initiation
NC : non codante = UTR : untranslated
ORF : open reading frame : cadre de lecture ouvert
PBMC : cellules mononuclées sanguines périphériques
PBH : ponction biopsie hépatique
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PKR : protéine kinase R
RBV : ribavirine ; RTP : ribavirine triphosphate, RMP : ribavirine mono phosphate
RdRp : ARN polymérase ARN dépendante
RT-PCR : rétrotranscription de l'ARN viral en ADN puis réaction de polymérisation en chaîne.
RVS : réponse virologique soutenue : PCR<0 6 mois après l'arrêt du traitement
SCID : severe combined immunodefiency disease: déficit immunitaire combiné sévère
SPE : extraction en phase solide
UI : unités internationales
VHB : virus de l'hépatite B
VHC : virus de l'hépatite C = HCV
VIH : virus de l'immunodéficience acquise

# Introduction

On estime que 3% de la population mondiale soit environ 170 millions de personnes dans le monde [1] sont des porteurs chroniques du virus de l'hépatite C (VHC) et que 3 à 4 millions de personnes sont infectées chaque année. En fait, la prévalence du virus est très variable d'un pays à l'autre et on estime qu'elle s'étale de 0,3 % en Suède à plus de 20 % en Egypte [83]. En France 1,1 % de la population serait atteinte d'après une évaluation réalisée en 1994 [178]. A cette époque, moins de 20 % des sujets connaissaient leur statut virologique. A l'issue des journées nationales de dépistage du VHC mises en place depuis 2000, 2 associations de biologistes libéraux publient des données qui réévaluent la prévalence en France au chiffre plus élevé de 1,26% soit 780 000 personnes contaminées [13bis] mais cette étude se base uniquement sur le sérodiagnostic.

Il faut, en effet, faire attention à l'interprétation de ces données car une sérologie positive peut indiquer une infection ancienne chez un patient ayant éradiqué le virus. Néanmoins, seules 15 à 20 % des personnes ayant été contaminées par le VHC parviennent à éliminer le virus pendant la phase aiguë de la maladie. Dans environ 80-85% des cas, le VHC cause une infection chronique qui peut évoluer vers des maladies graves telles que la cirrhose (10-20%) puis le carcinome hépatocellulaire (1-5%) [1].

Le VHC se transmet principalement par contact direct avec du sang contaminé : les modes majoritaires de transmission sont la transfusion de sang de sujet non soumis à un dépistage et la réutilisation d'aiguilles et de seringues non stériles. Le développement de tests de dépistage a permis de réduire considérablement les risques de contamination post-transfusionnelle et actuellement plus de 70% des cas de contamination sont dus à la toxicomanie. Néanmoins, le mode de transmission reste encore indéterminé pour près de 20% des hépatites C.

Le VHC est l'un des cinq virus (A,B,C,D et E) qui, à eux tous, sont responsables de la grande majorité des cas d'hépatites virales. Il s'agit d'un virus à ARN enveloppé appartenant à la famille des *flaviviridaes* (parmi lesquels on peut citer les virus de la fièvre jaune, de la dengue et de l'encéphalite japonaise). Une caractéristique potentiellement importante de ce virus à ARN tient à la relativement grande capacité de son génome à muter (comme dans le cas du VIH ou du virus de la grippe), ce qui n'est probablement pas sans rapport avec sa forte propension à provoquer des infections chroniques. Le VHC présente plusieurs génotypes distincts qui peuvent jouer un rôle important dans la réponse au traitement.

A l'heure actuelle, le traitement de l'hépatite C chronique est basé sur une bithérapie associant l'interféron alpha pégylé et la ribavirine. Chez environ 55 % des patients soignés, ce traitement va permettre d'éradiquer durablement le virus [178], ces patients seront alors appelés répondeurs. En revanche, dans les autres cas (non-répondeurs), on ne constatera pas de disparition du virus. Bien que certains facteurs pronostiquant une mauvaise réponse au traitement soient actuellement connus (virus de génotype 1, forte charge virale, par exemple) et que la résistance à l'interféron soit l'hypothèse la plus travaillée [41, 122, 126], d'autres éléments comme les paramètres pharmacocinétiques et le mode d'action de la ribavirine méritent d'être étudiés. En effet, l'adjonction de la ribavirine a permis un net gain d'efficacité : le pourcentage de patients répondeurs est passé de 15% avec la monothérapie IFN standard à 40% [178]. Or le mode d'action de cette molécule reste encore largement inexpliqué. De plus, une grande variabilité inter-individuelle des concentrations plasmatiques de ribavirine a été décrite chez des sujets sains [125]. Ainsi, un sous-dosage effectif de ribavirine (biodisponibilité trop faible) pourrait être à l'origine d'une inefficacité du traitement. Dans la partie expérimentale de ce travail, afin de documenter cette hypothèse, nous avons, dans un premier temps, développé une méthode analytique de dosage sérique de la ribavirine et comparé *a posteriori* les taux sériques de ribavirine chez des patients répondeurs et non répondeurs au traitement. Parallèlement à cette hypothèse d'ordre pharmacologique, nous avons entrepris de chercher sur le génome viral lui-même un facteur de résistance à la ribavirine.

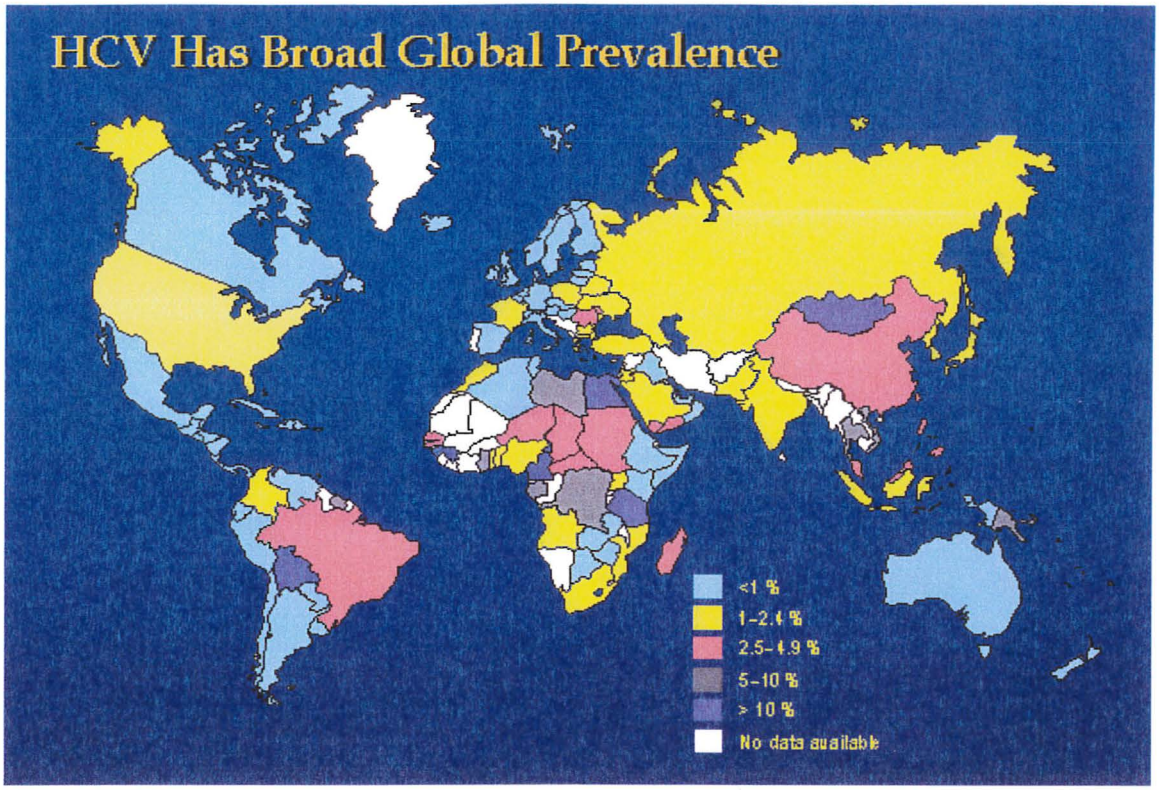



Figure 1 : Extraite du site :
http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/HepatitisC/epidmain.html
Prévalence mondiale du virus de l'hépatite C. Basé sur les données de [1].

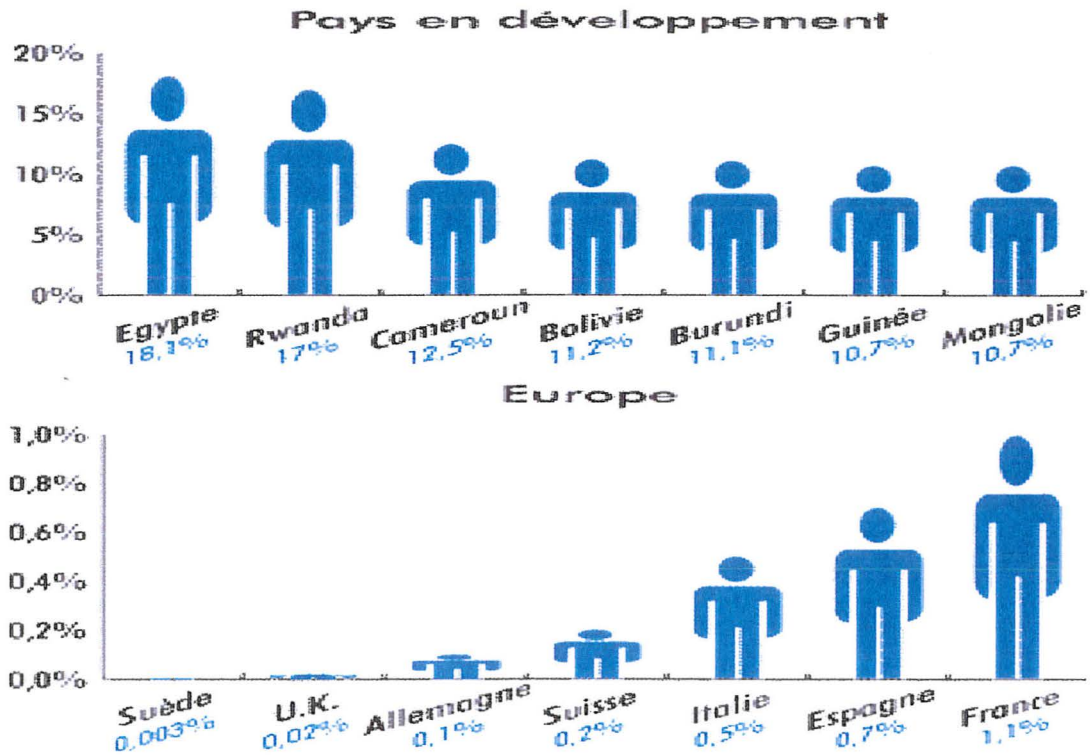



Figure 2 : Extraite du site : http://www.doctissimo.fr/hepatite_c.htm.
Prévalence du virus de l'hépatite C dans différents pays.

# Données bibliographiques

# I-Les modèles d'étude du VHC

Bien que la connaissance du génome de l'hépatite C fournisse de nombreuses indications sur sa structure potentielle (par recoupement avec les données connues concernant d'autres virus proches structurellement), jusqu'en 1994 cette structure n'est restée qu'hypothétique. A cette époque, un certain nombre d'équipes [78, 93, 141] vont publier la mise en évidence, grâce à des anticorps contre les protéines d'enveloppe du VHC, par microscopie électronique, de particules virales de 50 à 70 nm de diamètre issues de sérums ou de tissus hépatiques humains. Ils décrivent une enveloppe où sont insérées 2 glycoprotéines de surface entourant une capside icosahédrique d'environ 50 nm de diamètre. Ces caractéristiques confirment la présence chez le VHC de caractéristiques proches des *flavivirus* et *pestivirus* de la famille des *Flaviviridae*.

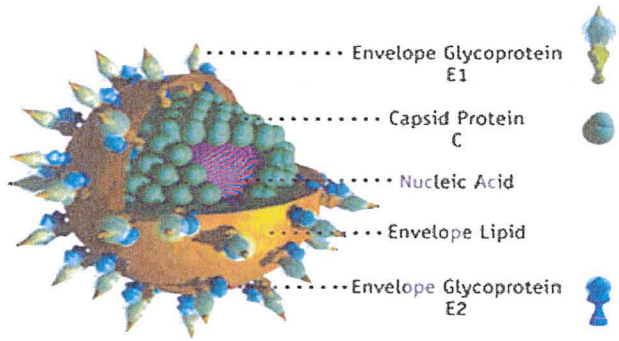



Figure 3 : Extraite de [158]. Vue en coupe d'une représentation schématique de la structure en 3D supposée du Virus de l'hépatite C.

## 1-Les modèles animaux :

Le seul animal susceptible de servir de modèle valable pour étudier le virus de l'hépatite C est le chimpanzé. Chez le chimpanzé, le virus se multiplie et cause une infection aiguë puis chronique sur le même mode que celui observé chez les humains. Il a donc été utilisé pour de nombreuses études [19]. Mais l'utilisation de chimpanzés est limitée pour des raisons éthiques, mais également à cause de leur rareté et du coût de l'entretien de ces animaux. Les tentatives de nombreux chercheurs pour trouver un modèle animal plus simple ont échoué. Il a cependant été montré que les Tupaïas, une espèce sensible à l'infection par le virus de l'hépatite B, devenaient parfois infectés par le VHC et développaient une virémie à des taux faibles [168]. Des systèmes de greffe de tissu hépatique humain ou de marmotte chez des souris immunodéprimées ont également été utilisés pour l'hépatite B et pourraient être essayés pour le VHC [72, 104].

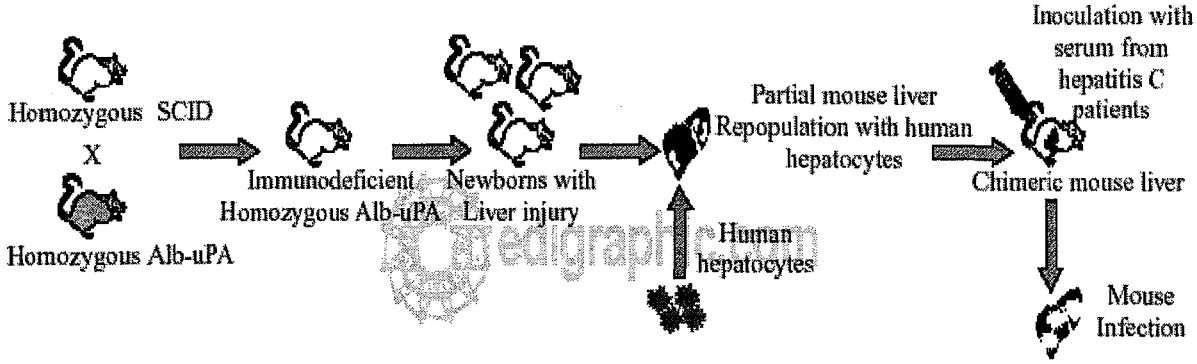



Figure 4 : Extraite de [156]: Modèle murin d'infection HCV. Dans ce modèle des hépatocytes humains sont transplantés dans une souris immunodéprimée (SCID) et transgénique pour la protéine Alb-uPA (protéine hépatotoxique). Ensuite, le foie chimérique de ces souris est infecté avec un sérum de patient VHC. Environ 75 % des souris vont développer une hépatite C persistante pour une période d'environ 15 à 17 semaines.

## 2-Les virus apparentés :

Pour contourner la difficulté de travailler directement sur le virus de l'hépatite C, un certain nombre d'équipes ont commencé leurs recherches sur des virus apparentés de structure proche. Le GBV-B (virus du tamarin) est un *Flaviviridae* hépatotrope ayant de nombreuses similitudes avec le VHC tout en présentant l'avantage de donner une virémie très élevée chez les tamarins et de pouvoir se cultiver sur hépatocytes de tamarins. Des études ont notamment été réalisées pour montrer que la ribavirine exerce un effet antiviral direct sur la réplication du GBV-B et que la ribavirine triphosphate est incorporée par sa polymérase. Ceci aboutit à une grande diminution de l'infectiosité sous ribavirine [88].

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est un pestivirus de la famille des *Flaviviridae* ayant une organisation également proche de celle du VHC. Ce virus possède des souches cytopathiques ce qui rend l'analyse fonctionnelle plus aisée. Ainsi, il a pu être montré que la ribavirine avait un effet antiviral direct sur la réplication du BVDV en culture cellulaire [42].

Le poliovirus a également été utilisé comme modèle de virus à ARN, notamment pour démontrer l'effet mutagène létal de la ribavirine [35].

## 3-Les systèmes de culture cellulaire :

Afin de pouvoir étudier le cycle réplicatif du virus et de pouvoir tester différentes molécules thérapeutiques comme c'est en général le cas pour les autres virus, de nombreuses équipes ont tenté de mettre au point un système de culture cellulaire du VHC. Néanmoins, et pour des raisons encore méconnues, il s'avère très difficile d'obtenir des lignées cellulaires répliquant le virus sur une suffisamment longue période pour permettre ces études.

Il a tout d'abord été essayé de cultiver directement des cellules issues de patients ayant une infection chronique (cf. Fig.5). Mais ces systèmes ont montré une mauvaise reproductibilité et un très faible taux de réplication. Puis des lignées d'hépatocytes humains ou de chimpanzé ont été infectées par des sérums de patients. Iacovacci et al [71] prouvent que les hépatocytes ont bien été infectés (multiplication par 20 du taux d'ARN négatif signant une réplication virale) sur une période de 24 jours de culture. Mais le rendement de ce système est trop faible : au maximum 20 000 copies d'ARN pour $10^6$ cellules. Dans les dernières années, de nouveaux systèmes expérimentaux ont continué à être développés avec pour base l'infection de lignées cellulaires. Le temps de survie a nettement augmenté (jusqu'à 4 mois) sans changement morphologique mais le rendement de multiplication reste trop faible. L'infection de cellules mononucléées sanguines (PBMC : peripheral blood mononuclear cells) a également été rapportée [32]. Dans cette étude, l'ARN viral est détecté pendant 28 jours mais les taux détectés sont encore plus faibles que sur les cultures d'hépatocytes.

**Table 1.** Systems of cell culture for the study of HCV.

| Cell type | Species | Methods for detecting HCV replication [a] | Days of Persistence [b] | Reference |
|---|---|---|---|---|
| | | **Primary Cell Cultures** | | |
| Hepatocytes | Human | RNA (+), (-); antigen (IF); sequence-HVR; Transmission | 28 | Ito et al., 1996 |
| Fetal hepatocytes | Human | RNA (+), (-) | 24 | Iacovacci et al., 1993, 1997 |
| Hepatocytes | Chimpanzee | RNA (+), (-); INF-$\alpha$ | 25 | Landford et al., 1994 |
| Hepatocytes | Human | RNA (+), (-); antigen (EIA) | 90 | Rumin et al., 1999 |
| | | **Immortalized Lines** | | |
| PBMCs | Human | RNA (+), (-); ISH; Transmission | 26 | Cribier et al., 1995 |
| PH5CH liver cells | Human | RNA (+); HVR-sequence | 30 | Kato et al., 1996 |
| PH5CH Clones | Human | RNA (+); INF-$\alpha$ | 100 | Ikeda et al., 1997, 1998 |
| HepG2 Hepatoma | Human | RNA (+), (-) | < 20 | Tagawa et al., 1995 |
| WRL68 Hepatoma | | | | |
| HepG2 and Huh-7 | Human | RNA (+), (-) | 130 | Seipp et al., 1997 |
| HepG2 Hepatoma | Human | RNA (+); HVR-sequence | 77 | Clarysse et al., 2001 |
| JHH-1, -4, -6 Hepatoma | Human | RNA (+), RNA (-) only in JHH-4 | Continuous | Tsuboi et al., 1996 |
| Daudi B-Cells | Human | RNA (+); HVR-sequence; Transmission to chimpanzee | > 2 years | Yoshikura et al., 1995<br>Nakajima et al., 1996<br>Shimizu et al., 1998 |
| MT-2 T Cells | Human | RNA (+), (-); HVR-sequence | 15 | Kato et al., 1995<br>Ikeda et al., 1997 |
| MT-2C Clone | Human | RNA (+); Transmission; HVR-sequence | 198 | Mizutani et al., 1996 |
| MOLT-4 Ma Cells | Human | Strand (+), (-); ISH; antigen (IF) | 25 | Shimizu et al., 1992 |
| HPB-Ma T-cells | Human | RNA (+), (-); antigen (IF) | 76 | Shimizu et al., 1993 |
| HPBMA 10-2 Clone | Human | RNA (+), genomic sequence, transmission; EM | > 365 | Shimizu y Yoshikura, 1994; Nakajima et al., 1996; Shimizu et al., 1996 |

edigraphic.com

[a] Methods used for monitoring replication of HCV; Strand (+) and (-) of RNA; Inhibition of HCV replication in the presence of interferon-$\alpha$ (INF-$\alpha$); Transmission; Detection of antigen by Immunofluorescence (IF), Enzimatic immunoassay (EIA); *In situ* hybridization (ISH); Detection of viral particles by electron microscopy (EM); Determination of the nucleotide sequence of the hypervariable region (HVR-sequence).
[b] Number of days between infection and the last day of detection of HCV plus strand RNA.

Figure 5. Extraite de [156]: Différents systèmes de culture du VHC étudiés.

## 4-Les réplicons sub-génomiques ou génomiques :

En 1999, un groupe de chercheurs allemands a rapporté un système d'étude original du VHC. Il s'agit de réplicons sub-génomiques du VHC capables de se répliquer de façon autonome sur une culture de cellules hépatiques [96]. La stratégie pour les obtenir consiste à isoler le génome viral à partir du sérum de patients infectés, puis à synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) par rétrotranscription et à amplifier cet ADNc par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). On sélectionne alors les clones contenant la séquence complète du génome du VHC y compris les parties 5' et 3'non codantes (NC). Ces ADNc sont ensuite introduits dans un vecteur d'expression (pCR2.1) qui contient le promoteur T7 de sorte qu'après sa linéarisation il puisse être transcrit *in vitro* et des copies de l'ARN viral puissent être obtenues. C'est de cette manière qu'a été obtenu le premier « replicon », dans lequel a été introduit, plus tard, un gène de résistance à la néomycine et qu'on a ensuite délété de la partie codante pour les protéines structurales. L'enzyme néomycine-phosphotransférase conférant la résistance à la néomycine est utilisée comme marqueur de réplication virale. On a également introduit entre le gène de la résistance à la néomycine et le gène de NS3, l'IRES (internal ribosome entry site) du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV). Les réplicons sub-génomiques, bien qu'il leur manque une partie de l'information virale, possèdent tous les éléments nécessaires pour la réplication et la traduction mais ne sont pas capables de fournir des virions infectieux. A ce jour, cette construction a permis la mise en place de systèmes de culture cellulaire, notamment sur la lignée Huh-7, capables de maintenir sur plus d'un an des hauts niveaux de réplicons. Des mutations conférant un avantage réplicatif à ces réplicons ont été mises en évidence, notamment dans la région de NS5a. Une seconde génération de réplicons a été créée avec pour but de produire des particules virales complètes. Dans ces réplicons, un gène « reporter » a été introduit permettant la mesure de la réplication du réplicon. En dehors de cela, la construction comprend tous les gènes codant pour toutes les protéines virales. Malheureusement, en dépit d'une bonne efficacité d'expression des protéines virales et de taux de réplication élevés, il n'a pas été possible de produire des particules virales en culture cellulaire. En revanche, le système des réplicons délétés des protéines structurales a été adapté sur des lignées cellulaires variées [9]. Ces modèles sont désormais très utiles pour étudier la fonction de telle ou telle partie du génome dans la réplication virale [56] mais aussi pour évaluer de nouvelles molécules thérapeutiques [97].

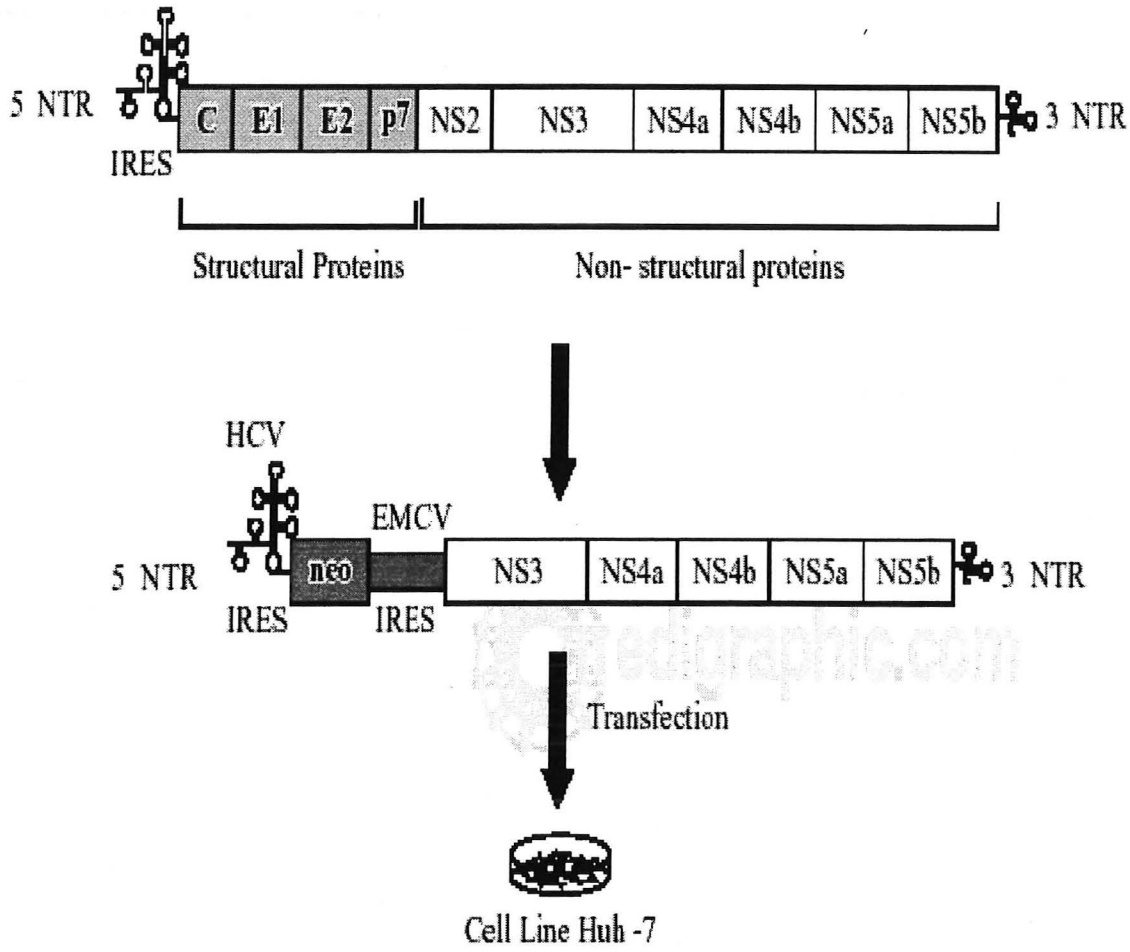



Figure 6 : Extraite de [156]. Comparaison du génome du VHC avec la structure d'un réplicon sub-génomique. Les régions codant pour les protéines structurales ont été substituées par le gène de résistance à la néomycine « neo » et l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite. Le réplicon sub-génomique est cloné et traduit *in vitro* pour être ensuite transfecté dans une lignée d'hépatocytes humains Huh7 qui exprimera alors les protéines du VHC.

# II-Le virus de l'hépatite C :

## 1-Son génome :

Constitué d'un ARN simple brin de polarité positive d'environ 9600 paires de bases (pb) [28], le génome du VHC contient un cadre de lecture ouvert (ORF : Open Reading Frame) et deux régions non codantes (NC) en 3' et en 5'.

La région codante va donner, lors de la traduction, une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés dont la partie N-terminale est formée de protéines virales structurales (protéine de capside C, protéine d'enveloppe E1 et E2) et la partie C terminale de protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) [28]. Cette polyprotéine est ensuite clivée par l'action de protéases virales et cellulaires.

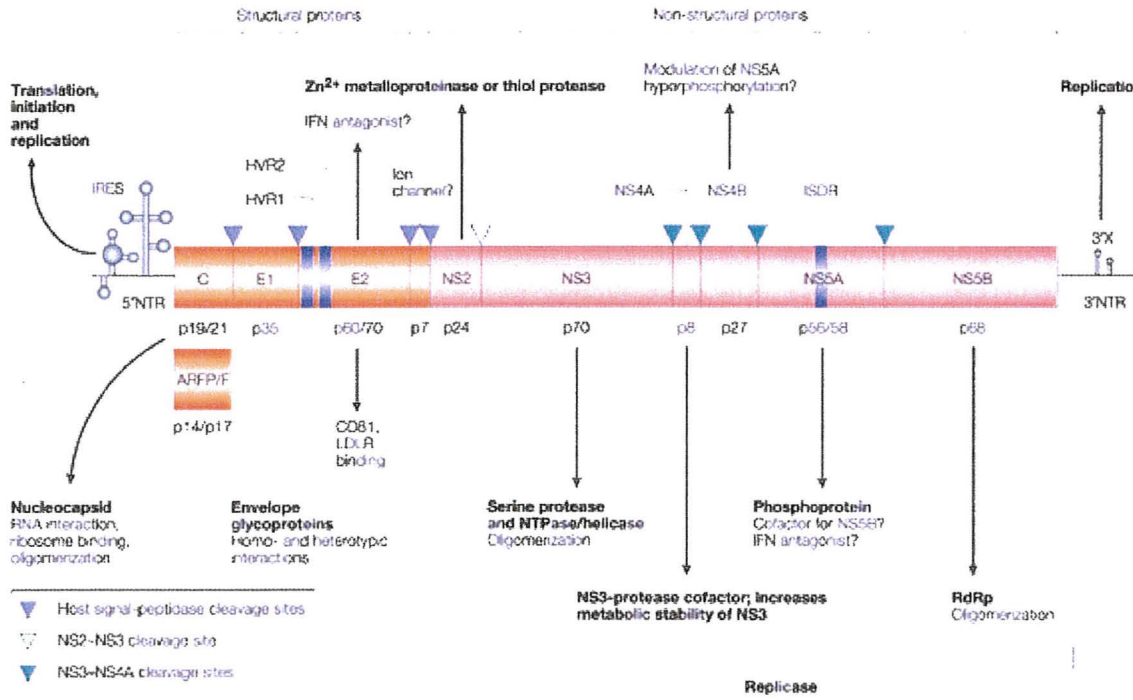



Figure 7 : Extraite de [151]. Génome du VHC et rôles supposés des différentes protéines codées.

A- La région 5' non codante (5'NC) :

La région 5'NC, en amont de la phase ouverte de lecture, comprend 341 pb et contient les séquences les plus conservées du génome du VHC qui jouent un rôle majeur dans la réplication du génome et la synthèse des protéines virales [154]. Comme pour la plupart des virus à ARN, cette région est impliquée dans le processus d'initiation de la traduction. Bien qu'il utilise le matériel de

la cellule hôte eucaryote, le VHC n'a pas recours au mécanisme classique de traduction dit « cap-dependant » où les facteurs de traduction eIF4 se fixent sur la coiffe 7-méthylguanine (« cap ») pour amener la petite sous-unité du ribosome au niveau de l'ARNm. En effet, le complexe ribosomal 43S (40S + Met-ARNt + facteur d'initiation eucaryote eIF3) va venir directement se fixer sur cette région 5'NC du VHC. Cette région que l'on appelle IRES, pour Internal Ribosome Entry Site, présente une structure secondaire et tertiaire particulière. Elle permet la fixation des facteurs cellulaires à l'ARN viral et l'initiation de la traduction par un positionnement correct du codon d'initiation AUG situé sur la 4$^{ème}$ boucle de l'IRES dans le site « P » ribosomal sans phénomène de « scanning » comme dans la traduction cap-dépendante [54] (cf. Fig.9).

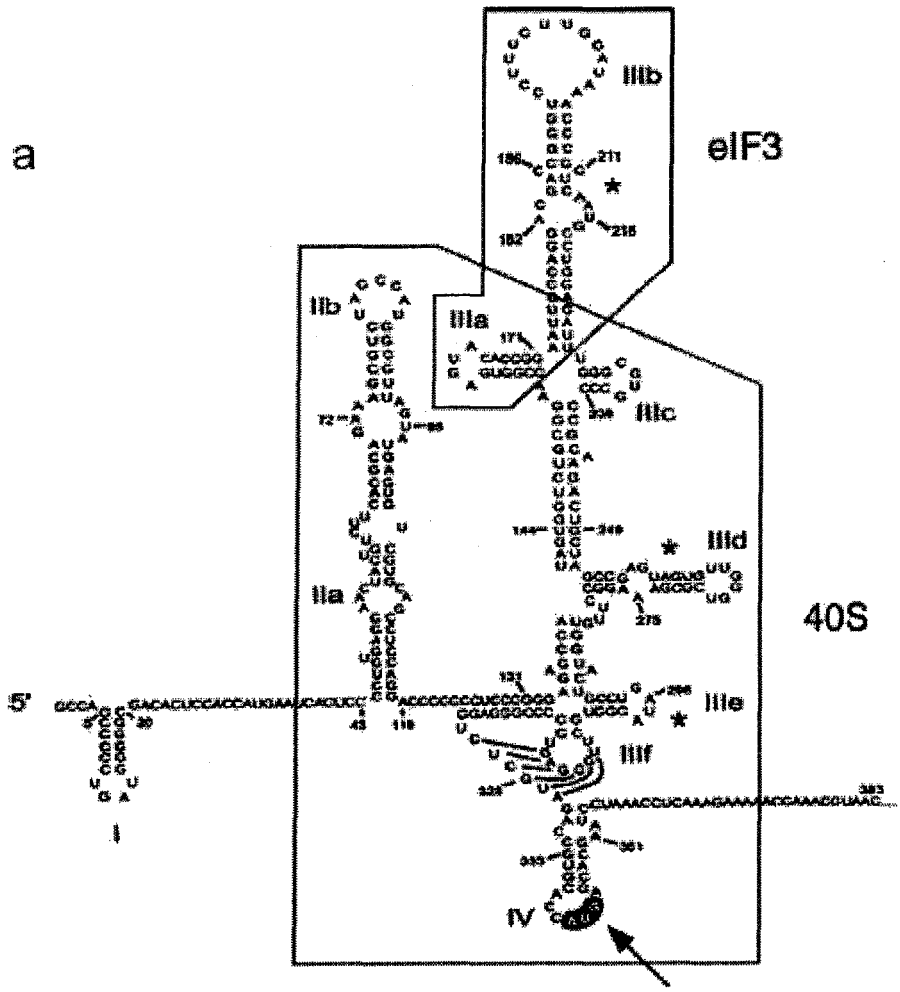



Figure 8 : Extraite de [54]: Structure secondaire de l'IRES du VHC : les sites de liaison de eIF3 et de la sous-unité ribosomale 40 S sont encadrés et la localisation du codon START est indiquée par une flèche. Les sous domaines dont la structure a été identifiée par RMN sont indiquées par un astérisque.

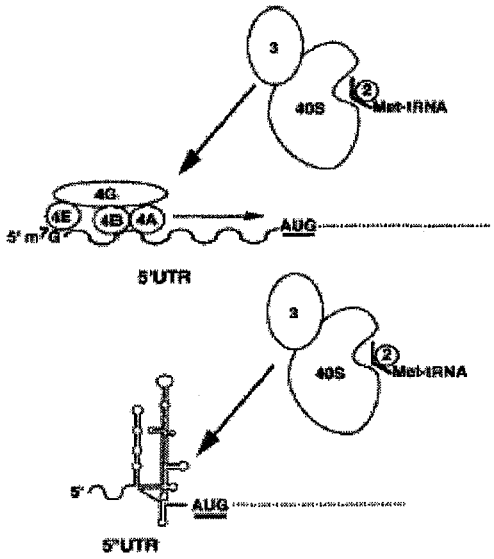



Figure 9 : Extraite de [54] : Mécanisme d'initiation de la traduction par l'IRES du VHC : (a) : initiation de la traduction « cap-dépendante » : la particule 43S se lie au complexe cap-eIF4 et la région 5' non traduite (5'UTR) montrée en ondulé est « scannée » jusqu'au codon d'initiation AUG où le ribosome est alors assemblé (b) : initiation « cap-indépendante » du VHC : la particule 43 S reconnaît directement le codon AUG grâce à la structure de l'IRES

B- Les protéines structurales :

a) La protéine de capside C :

Cette protéine de 21 kDa est riche en acides aminés basiques permettant sa liaison aux acides nucléiques et est utilisée lors de l'assemblage cytoplasmique de la nucléocapside virale. Des études *in vitro* lui ont, en outre, attribué un certain nombre de propriétés biologiques supplémentaires, notamment au niveau de la régulation des fonctions cellulaires. Sa localisation semble être mixte : cytoplasmique ou nucléaire [163]. On lui a prêté un effet pro- puis anti-apoptotique en fonction des conditions environnementales dans lesquelles étaient réalisées les expériences. L'interférence avec certains composants cellulaires, entre autres les lipides, semble lui conférer des propriétés transformantes [163]. Elle pourrait ainsi participer au développement de carcinomes hépato-cellulaires (CHC) comme le montrent différentes expériences avec des souris transgéniques [107, 163] où, bien que le mécanisme moléculaire induisant le cancer n'ait pu être mis en évidence, on note une accumulation de lipides précédant juste le début de la maladie. Cette dérégulation du métabolisme lipidique semble être confirmée par d'autres études [7]. Plus récemment, l'équipe INSERM 412 de Lyon travaillant sur les rétrovirus [33] a montré que la protéine de capside du VHC posséderait également des propriétés de protéine chaperonne qui « dimériserait » directement la partie 3'NC du brin d'ARN positif du virus. Cette protéine est maintenant la cible d'un test de recherche d'antigène développé par Ortho (cf. chapitre VI).

b) Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 :

D'un poids moléculaire respectif de 31 et 70 kDa, E1 et E2 sont des protéines hautement glycosylées dont les sites de glycosylation semblent très conservés. E1 et E2 s'associent soit sous forme d'agrégats de glycoprotéines mal repliées liées par des ponts disulfure (pré-budding complex), soit sous forme de complexes hétérodimériques non covalents de glycoprotéines natives correctement repliées. Elles se comportent comme des protéines transmembranaires de type I, possédant un ectodomaine N-terminal et une région hydrophobe C-terminale d'ancrage qui contient un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique où elles interagissent avec des molécules chaperonnes.

CD81 et les récepteurs de lipoprotéines basse densité (Low density lipoprotein receptor : LDLR) [3] ont été identifiés comme étant des récepteurs cellulaires possibles du VHC. La caractérisation de ces candidats montre que CD81 se lie à E2 mais n'est pas impliqué dans la fusion du virus avec la cellule [31]. En revanche, les virions utilisent les LDLR pour la liaison et l'entrée dans la cellule [167]. Une étude récente tend à montrer qu'il existerait d'autres récepteurs possibles pour E2 : human scavenger receptor (class B type I) et les héparanes sulfates, ainsi que de nombreux récepteurs solubles. Ceci suggère qu'il pourrait exister une voie permettant de biaiser la réponse humorale, fournissant ainsi un mécanisme alternatif d'échappement viral sans implication de mutation [66].

De plus, il a été démontré que la protéine E2 interagit avec la protéine kinase R (PKR) induite par l'IFN activé par la présence d'ARN double brin. Suite à l'induction par l'IFNα cette enzyme réduit la synthèse de protéine par la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction : eIF2-α. Dans les cellules contenant E2, la PKR est inhibée, permettant la continuation de la traduction en présence d'interféron [153]. Néanmoins ceci ne semble pas influencer la réponse à la thérapie par IFN [126].

La protéine E2 contient des épitopes importants pour la réponse humorale. Cette protéine est très variable, notamment sa partie N-terminale où on a identifié une région hypervariable HVR1 [44]. Cette région, récemment soupçonnée de faciliter la liaison du virus à la cellule hôte par affinité pour les protéoglycanes de surface [12], pourrait également être à l'origine de par son caractère hypervariable d'une partie de l'échappement du virus à la réponse immunitaire. Cependant, il semblerait que les propriétés physicochimiques et la conformation spatiale d'HVR1 restent relativement stables en dépit des variations fréquentes de séquence primaire.

c) La protéine p7 :

Une petite protéine appelée p7 a été identifiée. Elle est localisée entre E2 et la protéine NS2. Sa fonction est encore en discussion. Sakai et al [134] montrent que p7 est essentielle au pouvoir infectieux du virus. En effet, les ARN mutants délétés qu'ils ont réalisés ne leur ont pas permis d'infecter des chimpanzés. Les clivages E2/p7 et p7/NS2 semblent être catalysés par une signalase cellulaire. Il semble que les entités E2 et E2p7 soient toutes les deux stables et que l'efficacité de clivage entre E2 et p7 soit fonction de l'isolat viral.

C- Les protéines non structurales :

a) Les protéases : NS2-3 et NS3-4a :

La protéinase NS2-3 comprend la protéine hydrophobe C-terminale de NS2 et la partie N-terminale de NS3. Son rôle semble se limiter au clivage auto-protéolytique de la jonction NS2-3 en *cis* à la séquence Gly-Trp-Arg-Leu-Leu (1026)-↓-Ala (1027)-Pro-Ile [129]. Il est encore difficile de rattacher cette protéase à une des grandes familles connues : devant le fait qu'elle est inhibée par l'EDTA, on pourrait penser qu'il s'agit d'une métalloprotéase, mais l'inhibition observée peut être due au fait que NS3 a besoin de cation divalent pour sa structure ; une autre hypothèse est que NS3 est une thiol-protéase dont le site actif contient les Cys993 et His 952. Ces derniers sont essentiels au clivage de NS2-3 [118].

La protéine NS3 a son activité protéase localisée sur la partie N-terminale, la partie C–terminale codant pour une activité hélicase et nucléoside triphosphatase. Les clivages des sites en amont dans les régions non-structurales de la polyprotéine (NS3-4a, NS4a-4b, NS4b-5a, NS5a-5b) sont dépendants de cette activité protéasique [10]. La structure tridimensionnelle du domaine protéasique est maintenant connue. Des études d'expression ont montré que NS3 n'est pas stable dans les cellules en l'absence du co-facteur NS4a. Il a été suggéré que NS4a fonctionnerait comme un modulateur allostérique du domaine N-terminal de NS3 [103].

b) Les protéines de réplication : NS3 hélicase, triphosphatase et NS5b polymérase.

Les propriétés hélicase et nucléotide triphosphatase de la protéine NS3 se trouvent donc dans ses 500 acides aminés (AA) C-terminaux. L'activité hélicase est indispensable pour la réplication chez le chimpanzé, elle semblerait stabiliser un éventuel intermédiaire de réplication double brin ou enlever des structures secondaires, de sorte que l'ARN polymérase ARN dépendante puisse copier les brins positif et négatif. L'activité nucléoside triphosphatase est significativement stimulée par les polynucléotides et l'activité de déroulement de l'ARN est couplée à l'hydrolyse des nucléosides triphosphate, ce qui implique des dépendances cinétiques complexes [123]. La structure du domaine hélicase a été déterminée par plusieurs groupes. Il y a 3

sous domaines et la fissure entre les domaines I et II forme le site de liaison de l'ATP, alors que les interfaces entre le domaine en hélice III et les domaines I et II sont impliquées dans la liaison à l'ARN.

La protéine NS5b présente des motifs peptidiques analogues à ceux des ARN polymérases ARN dépendantes (RdRp) de nombreux virus à ARN. La polymérase du VHC étant une cible intéressante pour le développement de nouvelles thérapeutiques [166], elle a largement été étudiée. Sa structure primaire a été comparée aux autres polymérases virales connues comme celles du Moloney Leukémia Virus, du poliovirus ou du VIH.

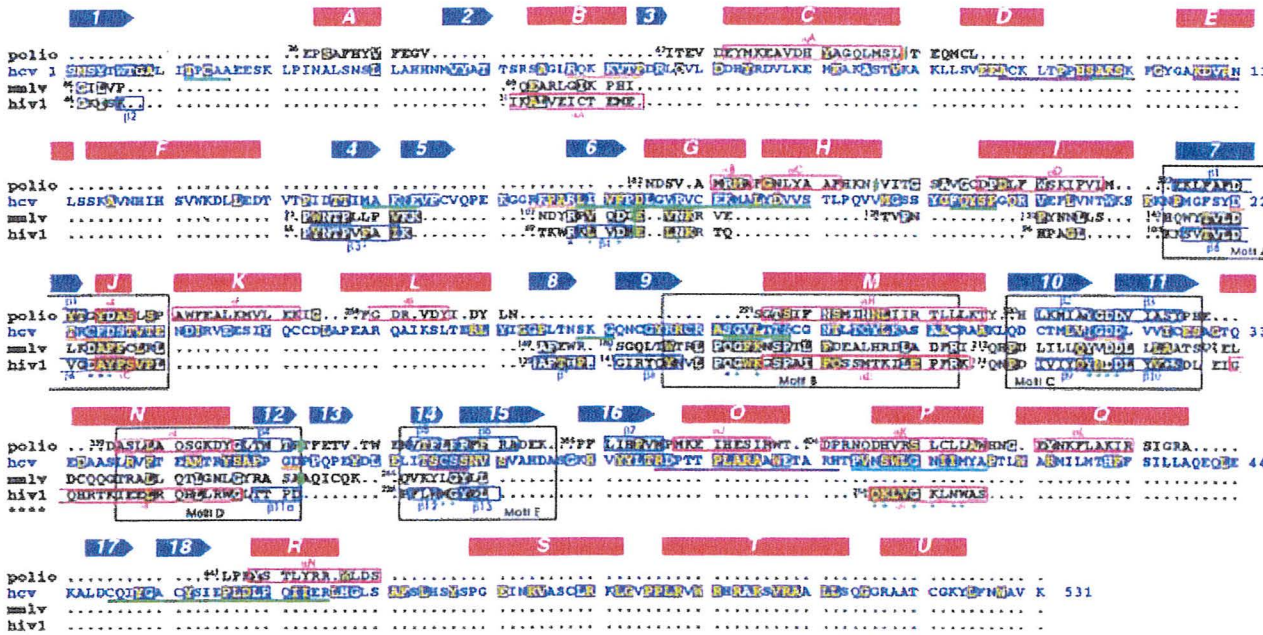



Figure 10 : Extraite de [20]. Alignement de séquences de polymérase du MMLV, du VIH et du VHC : les hélices α sont indiquées en rouge et les feuillets β en bleu au-dessus des séquences.

On retrouve des motifs très conservés (encadrés ci-dessus de noir) communs à toutes ces polymérases, entre autres le motif GDD (317-319) commun à toutes les ARN polymérases.

À l'inverse des polymérases cellulaires qui répliquent l'information génomique en copiant l'ADN en ADN ou transcrivent cette information d'ADN en ARN, la polymérase du VHC copie une molécule d'ARN en ARN. Ce processus de réplication de l'ARN est unique à certaines classes de virus, dont le VHC. La structure tridimensionnelle de la polymérase du VHC est également connue (cf. Fig.11)

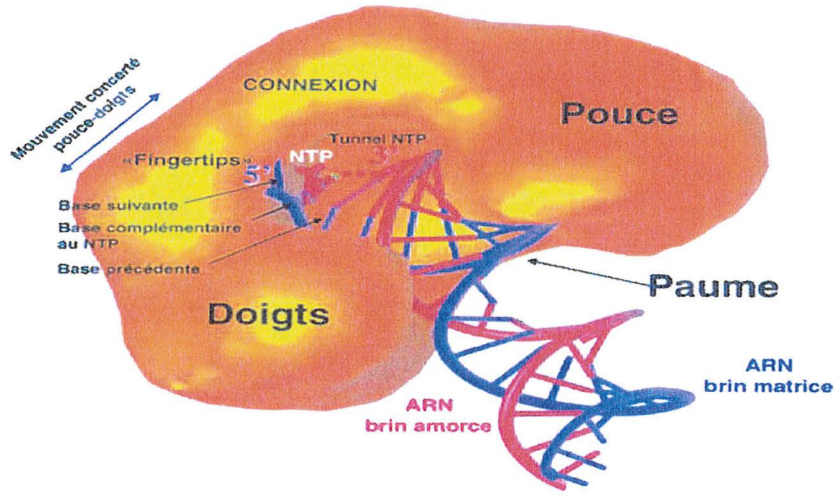



Figure 11 : Extraite de [20]. Modélisation de l'interaction entre la polymérase du VHC et l'ARN lors de la réplication du génome viral.

La protéine n'échappe pas à la règle qui prévaut dans les structures 3D des polymérases identifiées. La forme du domaine actif de l'enzyme ressemble à une main droite divisée en trois sous-domaines : les " doigts ", la " paume " et le " pouce ". Mais à l'inverse des autres protéines de structure 3D connue, la polymérase du VHC présente une connexion entre les domaines des " doigts " et du " pouce " qui ferme le site actif de l'enzyme. Récemment, une équipe américaine de chez Wyeth [4] a identifié par la technique du « phage display » un peptide contraint FPWGNTW qui inhibe sélectivement l'activité de la RdRp.

c) Les protéines virales de fonction encore inconnues : NS4b, NS5a

Bien qu'il ait été montré que ces protéines étaient associées à la membrane et donc, en complexe avec les autres protéines non structurales de HCV dans les cellules transfectées, leurs fonctions sont encore inconnues. L'hyperphosphorylation de NS5a a été beaucoup étudiée : elle apparaît nécessaire dans l'expression de la phosphorylation des autres protéines non structurales. Un rôle de NS5a dans la réponse à l'interféron a été également largement discuté. La région ISDR (interferon sensitivity determining region) (AA 2209 à 2248) de NS5a inhiberait l'activité protéine kinase R, en tout cas sur des populations d'origine japonaise (cf. Fig. 12 & chapitre VI-2-D).

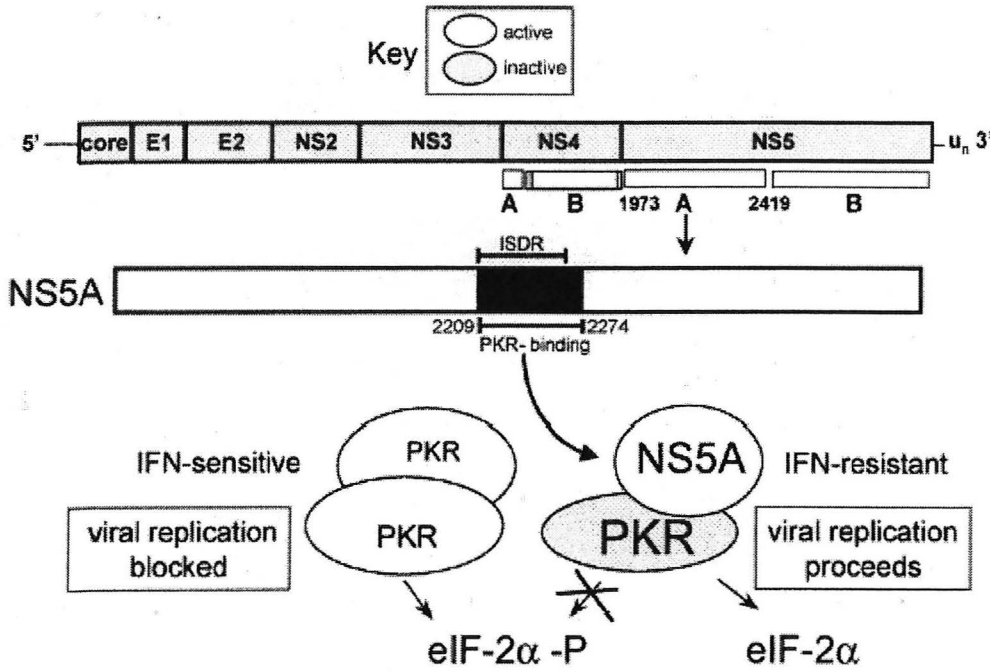



Figure 12 : Extraite de [53]: Principe de l'inhibition de la PKR par la région ISDR de NS5a. L'ISDR (en noir) se lierait avec une région de la PKR ce qui empêcherait sa dimérisation et ainsi son action sur eIF-2a. Les monomères de PKR sont incapables de phosphoryler eIF-2a.

D- La région 3' non codante (3'NC) :

La région 3'NC comprend une séquence d'environ 40 pb assez peu conservée, suivie d'une séquence poly(U) variable également et pouvant atteindre 50 à 100 pb, en aval de laquelle on trouve une séquence appelée 3'Xtail de 98 pb hautement conservée. Cette dernière partie serait responsable de la structure secondaire « stem and loop ». Cette région jouerait un rôle important dans l'initiation de la réplication du génome viral. On suppose que l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase ARN dépendante, en coopération avec différents facteurs cellulaires et viraux, a lieu à la fois aux extrémités 5' et 3' non codantes, utilisant les brins positifs et négatifs d'ARN viral comme matrice [131].

## 2-Le cycle viral

Le VHC se réplique dans les hépatocytes et les PBMC (peripheral blood mononuclear cells). Des études sur la dynamique de la réplication virale estiment la demi-vie du virus à 3-5 heures et sa production à $10^{12}$ particules /jour [171]. Ce taux peut sembler élevé au vu des faibles concentrations sanguines retrouvées mais il ne représente pas la production moyenne par hépatocyte. Seulement environ 10 % des hépatocytes sont infectés et le foie contient environ 2 x $10^{11}$ hépatocytes, ce qui correspondrait donc à une production de virions de 50 particules/hépatocyte/jour. [108].

Etant donné les difficultés d'étude du VHC évoquées plus haut (chapitre I), les données sur le cycle viral de l'hépatite C sont pour la plupart extrapolées d'analogies avec d'autres *Flaviviridae*. Néanmoins, certaines sont maintenant confortées par des observations réalisées grâce à la technique des réplicons.

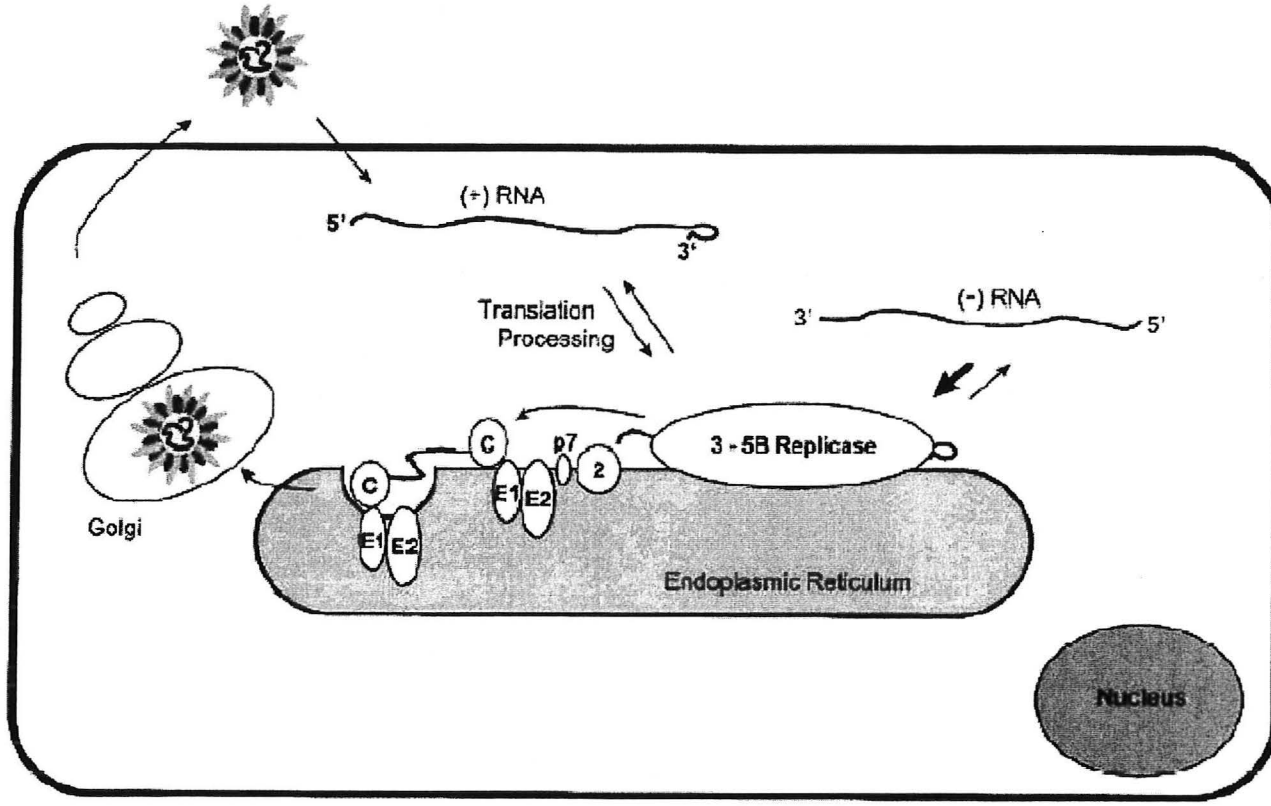



Figure 13 : Extraite de [11]. Modèle hypothétique du cycle viral du VHC. Le brin d'ARN + est libéré dans le cytoplasme et traduit. La polyprotéine alors traduite et les protéines virales restent associées à la membrane du réticulum endoplasmique. Le brin négatif est synthétisé par la réplicase composée de NS3-5B et servira de matrice pour la production d'une grande quantité d'ARNs positifs. Par son interaction avec les protéines de structure, le brin + est encapsidé. Les particules sont alors enveloppées et bourgeonnent dans la lumière du réticulum endoplasmique et sont exportées via le transport par le Golgi.

La première étape du cycle est donc l'attachement de la particule infectieuse à la cellule hôte. Les récepteurs potentiels permettant cet attachement sont le CD 81 [119] et le récepteur des LDL [3] auxquels se lierait la protéine E2. E2 serait la protéine majeure d'attachement du virus. En effet, des anticorps anti-E2 empêchent la liaison à la cellule hôte [45]. En revanche E2 ne semble pas permettre la fusion. Le rôle de E1 est moins clair mais la présence d'une région avec de nombreux acides aminés hydrophobes fait penser que E1 pourrait, lui, jouer le rôle de peptide de fusion [48].

Dès qu'il est libéré dans le cytoplasme, l'ARN viral est traduit par un mécanisme « cap-indépendant » (cf. chapitre II-1-A). Ce mécanisme requiert un certain nombre de co-facteurs : comme la partie X-tail à l'extrémité 3'NC du génome viral, mais également de nombreux facteurs

cellulaires. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'activité de IRES est dépendante du cycle cellulaire [69]. La polyprotéine virale est donc traduite au niveau du réticulum endoplasmique rugueux puis coupée pendant et après la traduction par des signalases de la cellule hôte et 2 protéases virales (cf. Fig.7).

Comme l'ont montré des études de co-précipitation, la plupart des produits de clivage de la polyprotéine de HCV, en particulier NS3-5B, forment un complexe réplicase associé avec des membranes intracellulaires contenant également des protéines de la cellule hôte. Cela permet la production des protéines virales et de l'ARN dans un compartiment distinct. La réplication de l'ARN viral est assez mal connue. La RdRp en est l'enzyme clé catalysant la synthèse des brins + et -. Le brin négatif est synthétisé par la réplicase composée de NS3-5B et servira de matrice pour la production d'une grande quantité d'ARN positif.

Par son interaction avec les protéines de structure et notamment la protéine de capside, le brin + est encapsidé. Les particules sont alors enveloppées et bourgeonnent dans la lumière du réticulum endoplasmique et sont exportées via le système de Golgi [11].

## 3-Variabilité génomique du VHC :

Le VHC, comme d'autres virus à ARN, présente une hétérogénéité génétique importante. La classification génotypique actuelle du VHC repose exclusivement sur des comparaisons de séquences nucléotidiques. La classification de Simmonds, la plus couramment utilisée, repose sur l'analyse d'alignements de séquences d'un fragment de NS5 et sur la construction d'arbres Phylogénétiques (cf. Fig. 14). Elle définit 6 génotypes majeurs désignés par un chiffre arabe selon l'ordre chronologique de découverte (1, 2, 3,...) avec de nombreux sous-types désignés par une lettre minuscule (1a, 1b, 2a,...).

| Okamoto et al. (96) | Enomoto et al. (38) | Simmonds et al. (115) | Cha et al. (17) | Consensus* (Simmonds et al., Letter) | Example isolates |
|---|---|---|---|---|---|
| I | PT | 1a | I | 1a | HCV-1, HCV-H |
| II | K1 | 1b | II | 1b | HCV-J, HCV-JT, HCV-BK |
| | | | | 1c | HC-G9, YS-117 |
| III | K2a | 2a | III | 2a | HC-J6, HC-J5, HCV-K2a |
| IV | K2b | 2b | III | 2b | HC-J8, HC-J7, HCV-K2b |
| | | | III | 2c | S-83, T-983 |
| V | | 3 | IV | 3a | HCV-K3a, T-1, T-7 |
| VI | | | IV | 3b | HCV-TR, T-9, T-10 |
| | | 4 | | 4a | Z4, Z8, Z5, Syr1, Syr2, N5, Cam600, Z1, N1, N2, DK13 |
| | | | V | 5a | SA-1, SA-7 |
| | | | | 6a | HK-2 |

* It has been recommended that this classification be used in all future publications.

Tableau 1 : Extrait de [170]: Différents systèmes de classification des génotypes de HCV décrits avant que ne soit adopté communément le système de Simmonds.

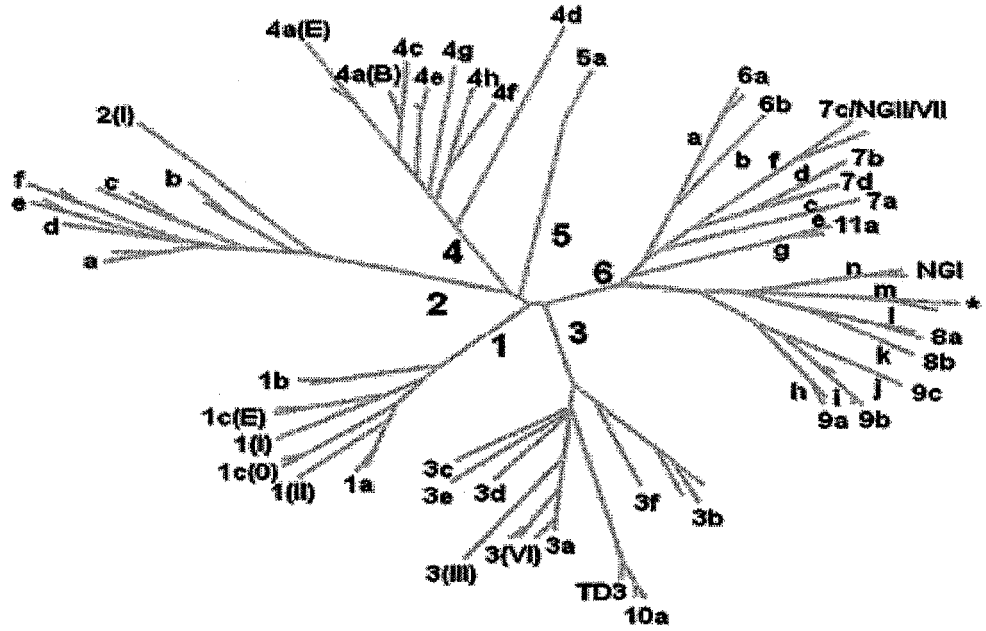



Figure 14 : Extraite du site BAYER HEPATITIS :
http://www.labnews.de//en/specials/hep/h_c/hc_classi.php:
Arbre Phylogénétique établi à partir d'une partie de NS5B.

Schématiquement, on considère que deux souches virales appartiennent au même sous-type lorsque l'homologie de séquence nucléotidique entre elles est de plus de 90 %. Lorsqu'elle est de l'ordre de 70 %, les souches appartiennent au même génotype mais à des sous-types différents. Enfin, en dessous de 65 % d'homologie, les souches sont considérées comme appartenant à deux types différents [170]. Chez un malade infecté, le VHC circule sous la forme d'un mélange de variants viraux, apparentés car dérivant tous de la même population initiale sur le mode mutations/sélections définissant une distribution en « quasi-espèces » ou isolats, ayant donc de 90 à 100% d'homologie.

| Terminology | Definition | % Nucleotide similarity[a] |
|---|---|---|
| Genotype | Genetic heterogeneity among different HCV isolates | 65.7–68.9 |
| Subtype | Closely related isolates within each of the major genotypes | 76.9–80.1 |
| Quasispecies | Complex of genetic variants within individual isolates | 90.8–99 |

[a] % Nucleotide similarity refers to the nucleotide sequence identities of the full-length sequences of the HCV genome.

Tableau 2 : Extrait de [170]: Terminologie communément utilisée dans les études relatives à la diversité génomique du VHC.

L'appartenance à un génotype donné est associée à certaines caractéristiques épidémiologiques et cliniques. Chaque génotype a une répartition mondiale qui lui est propre et la « mondialisation » d'un génotype initialement restreint à une population géographique isolée semble liée, au moins en partie, aux migrations de population. Ainsi les génotypes 1a et 1b sont les plus fréquents en Amérique du Nord et en Europe. Le sous-type 2c semble fréquent en Italie du Nord. Les génotypes 5 et 6 semblent confinés respectivement à l'Afrique du Sud et à Hong Kong. D'autre part, la répartition des virus suit l'émergence de certains modes de contamination [143] : la contamination par transfusion sanguine paraît être responsable de la répartition mondiale des génotypes 1b dont l'origine pourrait être l'Afrique centrale ou l'Afrique de l'Ouest. L'usage de drogues par injection intra-veineuse est clairement associée dans la plupart des pays industrialisés, à la diffusion des génotypes 3a apparemment originaires du sous continent indien ou de l'Asie du Sud Est [173bis]. L'association du génotype 1b avec une moindre réponse au traitement est maintenant communément admise.

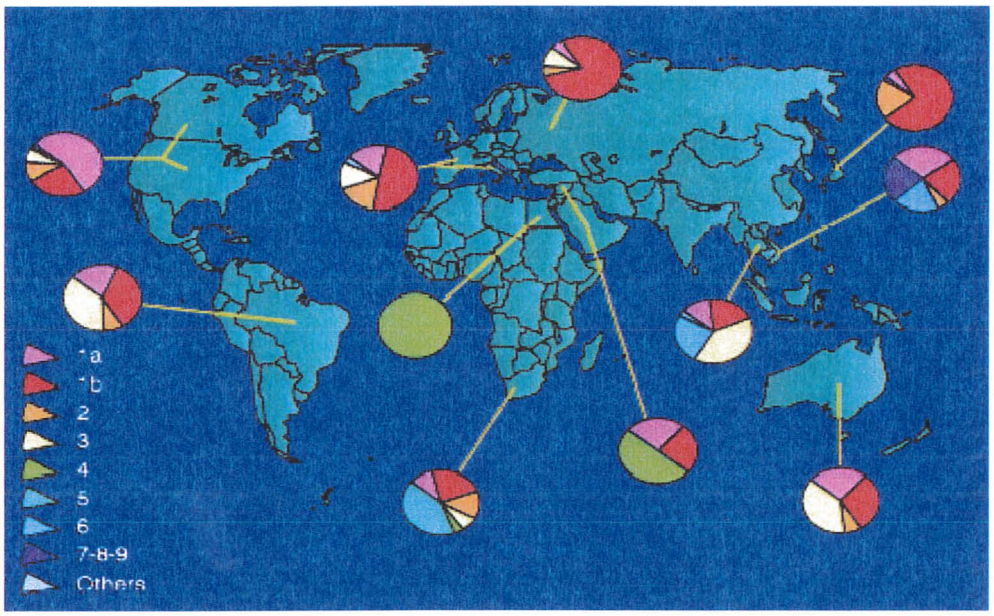



Figure 15 : Extraite de [170]: Répartition géographique mondiale des génotypes et sous-types du VHC.

Comme on peut le constater dans le tableau ci-dessous (Tableau 3), la variabilité est irrégulièrement répartie le long du génome viral :

| | 5'NC | C | E1 | E2 | NS2 | NS3 | NS4 | NS5 | 3'NC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % d'homologie entre les séquences nucléotidiques | 92 | 81 | 55 | 65 | 57 | 70 | 65 | 66 | 26 |

Tableau 3 : Pourcentage d'homologie observé par comparaison entre les différentes régions génomiques du VHC de plusieurs isolats [175].

Cette observation suggère que la variabilité génomique chez un même individu n'est pas simplement liée aux erreurs aléatoires commises par l'ARN polymérase ARN dépendante virale ($1.5 \times 10^{-3}$ substitution par position nucléotidique par an selon Bukh et al [23]), mais qu'elle est aussi le reflet de l'adaptation du virus à son hôte par des mécanismes de sélection actifs [3].

# III-Physiopathologie d'une hépatite C humaine

## 1-Infection aiguë :

Quel que soit le mode de transmission du virus, une hépatite aiguë survient après une période d'incubation de 4 à 12 semaines. Cependant, elle passe le plus souvent inaperçue. Elle est asymptomatique dans plus de 90 % des cas ou s'accompagne d'une symptomatologie modérée et atypique (ictère léger, fatigue...). Le déroulement d'une infection aiguë pourrait être résumé ainsi :

-L'ARN du VHC est le premier marqueur détectable dans le sérum 7 à 21 jours après la contamination.

-L'augmentation des transaminases sériques, notamment des alanines amino-transférases (ALAT), est constante, souvent moins importante que dans les hépatites A ou B et survient à partir du 15$^{ème}$ jour et le plus souvent vers 4 semaines après la contamination.

-Les symptômes cliniques, lorsqu'ils existent, s'observent 2 à 12 semaines après la contamination.

-Les Ac anti-VHC apparaissent dans le sérum 20 à 150 jours après la contamination et permettent le diagnostic de l'infection aiguë (par séroconversion). La positivité de l'ARN viral, habituelle à ce stade ne permet pas, à elle seule, de distinguer une infection aiguë d'une infection chronique. Quelques études portent sur le rôle diagnostique des IgM anti-core [109, 133, 142]. Elles semblent s'accorder sur le fait que les IgM dans l'hépatite C ne suivent pas un profil classique précédant l'arrivée des IgG : leur apparition est très variable et inconstante. En revanche, lorsqu'elles sont présentes, elles atteignent des taux plus élevés que lors des ré-infections. Actuellement, elles ne sont pas utilisées pour le diagnostic de routine [178].

En l'absence de co-facteurs, l'hépatite C aiguë n'est que très rarement fulminante; sa survenue pourrait être favorisée par un portage chronique de l'AgHBs [14, 29]. Dans un cas d'hépatite C fulminante sans co-infection, l'équipe de Kato [81] au Japon a séquencé le génome du virus responsable mais n'a pu mettre en évidence de différence notable conférant une pathogénicité supérieure à cette souche.

La guérison de l'infection aiguë est définie par l'absence d'ARN VHC détectable dans le sérum. L'étude de Villano [159] donne un délai médian de 19 mois. La négativité d'ARN viral dans le sérum serait associée à l'absence d'ARN VHC dans le foie, ce qui traduirait l'élimination complète du virus [8]. La guérison serait plus fréquente chez les patients ayant eu un ictère [8]. La normalisation des transaminases est fréquente malgré la persistance de l'infection et ne permet, en aucun cas de conclure à une guérison. On considère actuellement que le pourcentage de guérison ne dépasse pas 15 à 20 % des malades infectés [110]. Néanmoins, ce pourcentage a été déterminé à partir de malades contaminés par transfusion sanguine et pourrait être plus élevé dans d'autres populations. En effet, l'étude de Kenny-Walsh [82] sur des femmes contaminées par des Immunoglobulines (Ig) anti-D donne une proportion de guérison de 45 %. Ce pourcentage est d'autant plus difficile à déterminer sur la population générale qu'il existe des personnes contaminées séronégatives (on les détecte par la présence d'une immunité cellulaire).

Par conséquent, dans environ 70 à 80 % des cas, l'hépatite ne conduit pas à l'élimination du virus et le malade développe une infection chronique.

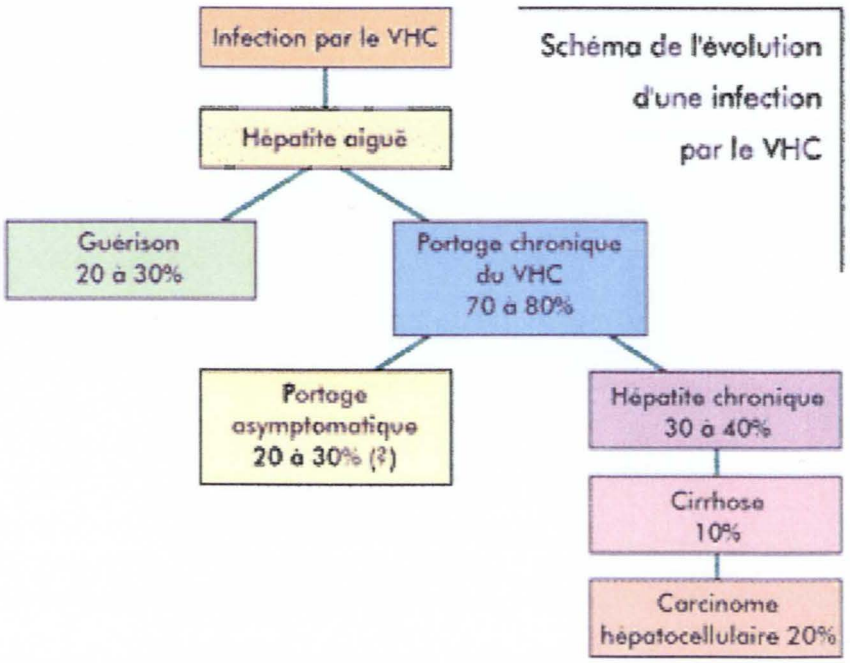



Figure 16 : Extraite de www.doctissimo.fr (source : Secrétariat d'état à la santé).
Schéma de l'évolution d'une infection par le VHC.

## 2-Infection chronique :

L'infection chronique est définie par la persistance de l'ARN viral 6 mois après l'hépatite aiguë. En pratique, le passage à une infection chronique est très probable si l'ARN du VHC reste détectable plus de 3 mois après l'épisode aigu. La plupart des malades sont identifiés à ce stade par la détection d'Ac anti-VHC lors d'un dépistage systématique ou fortuit. L'infection chronique est alors attestée par la présence d'ARN VHC dans le sérum. Certains malades peuvent avoir une virémie ponctuellement négative [86] et la guérison ne peut être affirmée que sur plusieurs résultats négatifs. En l'absence de maladie hépatique évoluée, les malades atteints d'hépatite C chronique sont le plus souvent asymptomatiques. Certains malades se plaignent d'asthénie, de troubles somatiques variés, notamment de douleurs articulaires ou musculaires. La prévalence élevée de troubles psychologiques a également été soulignée [8] bien qu'il semble difficile de faire la part entre la maladie elle-même et le contexte psychologique entourant sa découverte. L'évolution de la maladie est sujette à controverse. Pour certains, l'hépatite C reste une maladie sans impact détectable sur la survie, pour d'autres, il s'agit d'une maladie grave. En effet, un certain nombre d'études basées sur des cohortes de patients contaminés jeunes, comme celle sur les jeunes femmes irlandaises contaminées par des Ig anti-D, décrivent une évolution quasi nulle. Vingt ans après la contamination, on trouvait seulement 41 % de lésions inflammatoires minimes et 52 % de modérées, une fibrose minime ou modérée était observée dans 51 % des cas, mais seulement 2 % des malades avaient une cirrhose [82]. D'autres études [49], réalisées dans des centres de traitement spécialisés dans les maladies hépatiques, fournissent des résultats beaucoup plus inquiétants. Chez ces patients, la date de contamination est souvent inconnue, ils sont plus âgés au moment du diagnostic et ont été adressés dans ces centres souvent au vu d'anomalies cliniques ou biologiques évocatrices de pathologies hépatiques, ce qui biaise les résultats. Malgré toutes ces différences de recrutement, la vitesse de progression vers la cirrhose semble être très variable d'un malade à l'autre. Trois facteurs principaux influençant l'évolution vers la fibrose ont été identifiés : l'âge au moment de la contamination (>40-50 ans), la consommation d'alcool (>50g/j) et le sexe (masculin). L'obésité, de par la stéatose, serait également un facteur d'évolution défavorable de la cirrhose [39].

On peut schématiquement distinguer 3 formes d'hépatites chroniques [178]:

-L'hépatite chronique à transaminases normales est définie par la présence d'anticorps anti-VHC, la présence de l'ARN du VHC et un taux de transaminases régulièrement normal (au moins 3 dosages en 6 mois). Dans ce cas et en l'absence de facteurs de co-morbidité associés, la ponction biopsie hépatique (PBH) n'est habituellement pas indiquée et on réalise un suivi des transaminases 2 fois par an.

-L'hépatite chronique minime est caractérisée par des transaminases modérément élevées ou fluctuantes et un score Metavir de fibrose sur la PBH de F0 ou F1.

-L'hépatite chronique modérée ou sévère correspond, quant à elle, aux scores de fibrose de F2 à F4. Bien qu'un malade puisse évoluer d'une forme à l'autre, cette classification permet globalement d'apprécier le pronostic et d'évaluer le bénéfice potentiel d'un traitement.

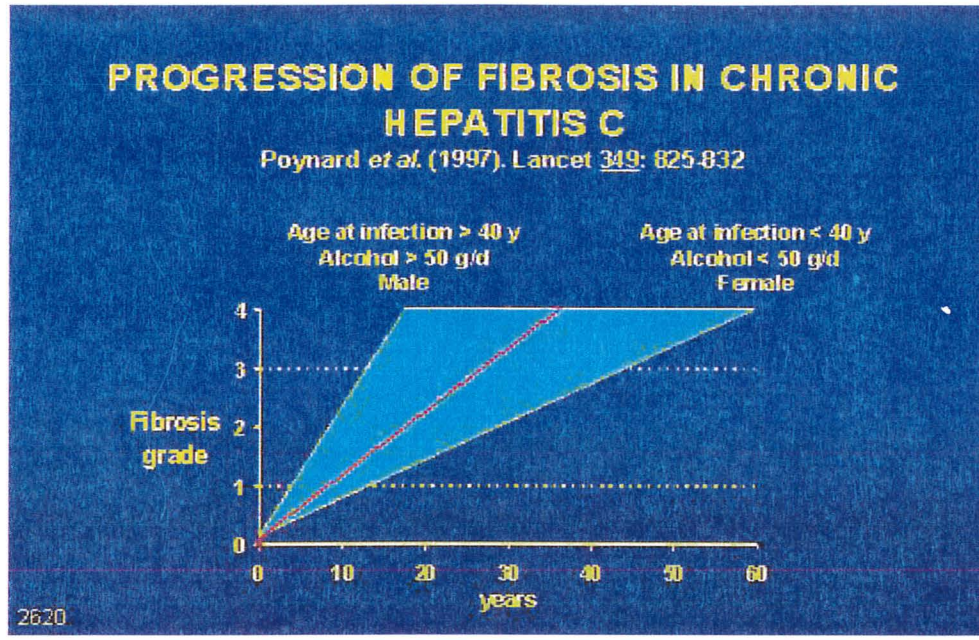



Figure 17 : Extraite de [124]. Progression de la fibrose dans l'hépatite chronique C.

L'hépatite chronique C est caractérisée, sur le plan histologique, par la présence d'infiltrats lymphoïdes dans les espaces portes. Les lésions hépatocytaires associent typiquement une nécrose cellulaire péri-portale et une inflammation lobulaire modérée. L'absence d'effet cytolytique du VHC démontrée dans différents systèmes d'expression, de même que la normalisation des transaminases lors d'une immunodépression transitoire chez un patient souffrant d'hépatite C chronique, suggèrent que la réponse immunitaire joue un rôle fondamental dans le processus de destruction progressive du tissu hépatique caractérisant l'hépatite C chronique. L'évolution ultérieure de la maladie vers l'accumulation de la fibrose et, à terme, la constitution d'une cirrhose semble dépendre en grande partie de cette réponse immunitaire et notamment de la réponse cytokinique au niveau hépatique. La fibrose hépatique est la principale complication de l'hépatite chronique C. Son terme évolutif, la cirrhose, est responsable de la morbidité et de la mortalité de l'hépatite C. La fibrogénèse est un processus dynamique caractérisé par la synthèse de molécules constitutives de la matrice extra-cellulaire (MEC) : ensemble complexe de molécules protéiques (collagène, élastine), glycoprotéines (fibronectine, laminine,…) et de protéoglycanes organisés en réseau tridimensionnel interconnecté [74]. Il s'agit d'un processus non spécifique d'organe qui se pérennise tant que l'agent agresseur reste présent dans le foie et qui vise à limiter l'extension de la

réaction inflammatoire. Il s'agit donc, au début, d'un mécanisme physiologique bénéfique pour l'organisme qui fait partie intégrante du mécanisme de cicatrisation [81]. La fibrose est caractérisée par un dépôt anarchique de molécules de la MEC et leur organisation en polymères complexes et peu solubles aboutissant à la perturbation de l'architecture hépatique. Dans l'hépatite C, la fibrose débute au niveau des espaces portes pour s'étendre ensuite vers les veines centro-lobulaires réalisant des septa ou ponts fibreux. Le stade ultime du développement de la fibrose hépatique est la cirrhose, caractérisée par des bandes de tissus fibreux reliant entre elles la majorité des structures mésenchymateuses portales et centro-lobulaires et isolant des nodules hépatocytaires.

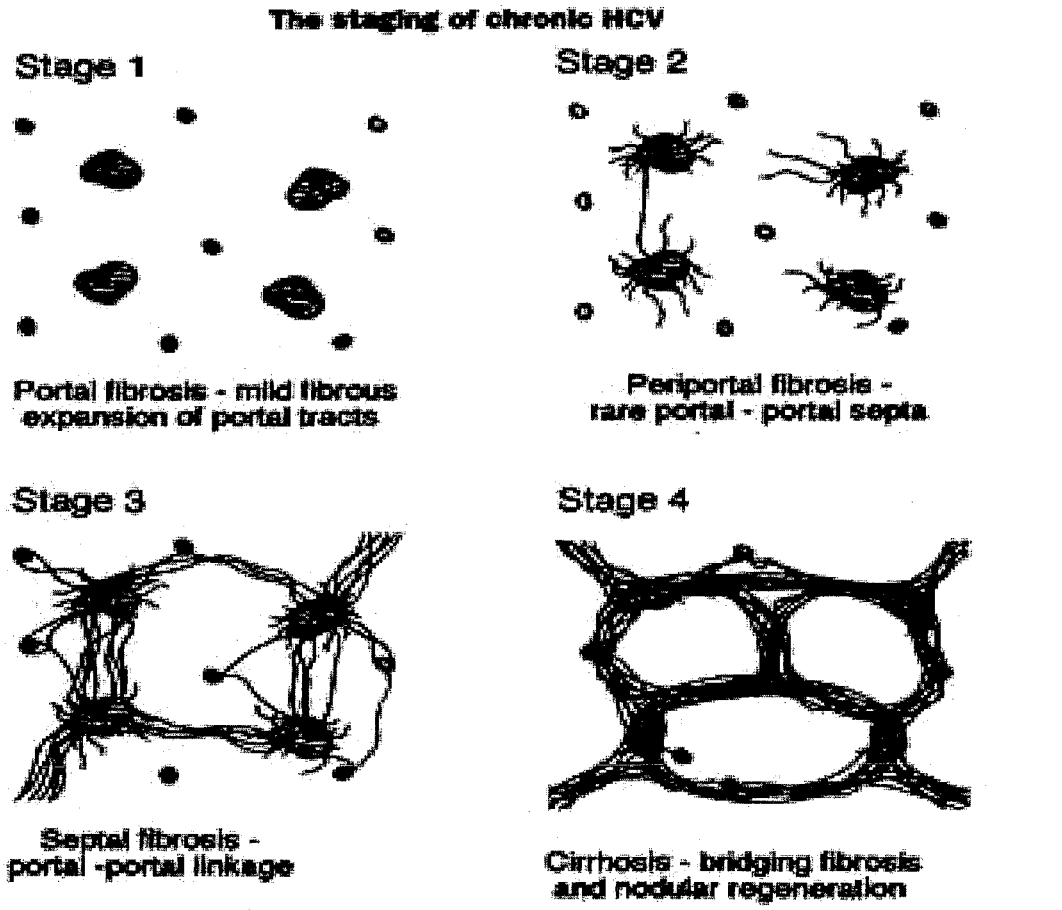



Figure 18 : Extraite de [13].
Evolution du processus de fibrose lors d'une hépatite virale C chronique.

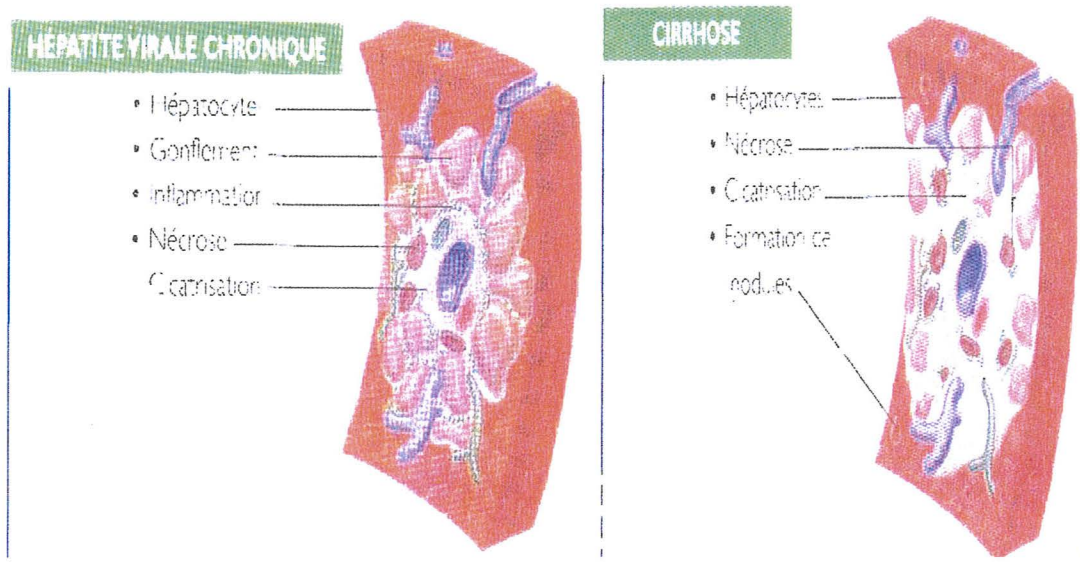



Figure 19 : Extraite d'un document Schering-Plough.
Schéma de la fibrose hépatique lors d'une hépatite virale chronique C et d'une cirrhose.

La ponction biopsie hépatique (PBH) permet d'apprécier la gravité des lésions hépatiques. Elle est habituellement effectuée par voie trans-pariétale, la voie trans-jugulaire étant plutôt réservée aux malades ayant des troubles de l'hémostase ou dialysés. La PBH est un geste invasif réalisé en milieu hospitalier sous anesthésie locale ou générale et généralement échoguidé.

La biopsie trans-pariétale se pratique sous anesthésie locale et consiste à prélever un fragment de foie sur le côté droit en piquant à travers la peau entre deux côtes avec une aiguille très fine. La lecture de la biopsie est réalisée par un anatomo-pathologiste. Pour une interprétation optimale, un échantillon de foie d'au moins 1 cm de haut et 1 mm de diamètre comportant au moins 6 espaces portes est requis (>10 est mieux).

L'anatomopathologiste donne une évaluation de l'état du foie qui peut être codifiée selon 2 scores : le score de Knodell qui va de 0 à 22 et le score METAVIR qui est maintenant la référence dans l'hépatite C. Il s'exprime sur deux dimensions : l'activité inflammatoire représentée par la lettre A suivi d'un chiffre de 0 à 3, et la fibrose représentée par la lettre F suivie d'un chiffre de 0 à 4.

| Lésions | Score |
|---|---|
| Nécrose périportale et nécrose en pont | 0 à 10 |
| Lésions dégénératives et nécroses focales | 0 à 4 |
| Inflammation portale | 0 à 4 |
| Fibrose | 0 à 4 |
| Index total d'activité histologique | 0 à 22 |

Tableau 4 : Score de Knodell.

| Activité | Fibrose |
|---|---|
| A0 : Pas d'activité | F0 : Pas de fibrose |
| A1 : Activité minime | F1 : Fibrose portale |
| A2 : Activité modérée | F2 : Quelques septa |
| A3 : Activité sévère | F3 : Nombreux septa |
| | F4 : Cirrhose |

Tableau 5 : Score Metavir.

La PBH est un acte médical non anodin. La conférence de consensus française de février 2002 en a d'ailleurs limité l'indication en précisant qu'elle n'était pas obligatoire lorsque la décision de traiter ne dépendait pas du score histologique (génotype 2 et 3 sans co-morbidité, femmes ayant un projet de grossesse, cryoglobulinémies, par exemple). De nombreuses équipes cherchent actuellement à mettre au point des combinaisons de marqueurs sanguins (nécessitant seulement une prise de sang) qui donneraient un reflet satisfaisant de l'état du foie. Une équipe grenobloise [92] a notamment testé un certain nombre de marqueurs et en retient deux : le peptide N-terminal du procollagène de type III reflétant la fibrogénèse et la métalloprotéase MMP-1 reflétant la fibrolyse. Un autre score est actuellement commercialisé : il s'agit de l'Actitest-Fibrotest [73]. L'index de fibrose (FibroTest) combine le dosage dans le sang de 5 marqueurs indirects de fibrose : Alpha-2 Macroglobuline, Haptoglobine, Apolipoprotéine A1, Bilirubine Totale, Gamma-Glutamyl Transpeptidase, avec un ajustement selon l'âge et le sexe de la personne. L'index d'activité (ActiTest) combine les mêmes marqueurs avec le dosage de la transaminase ALAT.

Une régénération hépatique peut s'associer ou survenir après l'installation de cette fibrose annulaire [74]. Cette régression nécessite l'élimination de l'agent agresseur, en l'occurrence du VHC. On peut également noter que le traitement par interféron seul semble ralentir la vitesse de progression de la fibrose et ce, en présence ou on d'un effet virologique complet.

## 3-Cirrhose et carcinome hépato-cellulaire (CHC) :

C'est presque exclusivement à ce stade que surviennent les complications responsables de la morbidité et de la mortalité de la maladie : la décompensation de la cirrhose et le CHC. La décompensation de la cirrhose (traduite cliniquement par une ascite, un ictère ou une hémorragie digestive par rupture des veines oesophagiennes) résulte de la détérioration de la fonction hépatique et de l'aggravation de l'hypertension portale. Le développement du CHC résulte principalement de l'accumulation de lésions pré-cancéreuses du parenchyme cirrhotique. En effet,

ce parenchyme présente fréquemment des altérations génétiques, et le caractère monoclonal de la moitié environ des micro ou macro nodules de régénération suggère fortement que la cirrhose est une maladie pré-néoplasique [169].

# IV-Les mécanismes immunitaires de la persistance virale

Environ 80 % des infections par le VHC deviennent des infections chroniques. Un certain nombre de mécanismes ont été proposés pour expliquer, du moins en partie, cette persistance virale.

## 1-Réponse humorale :

Une région hyper-variable de la protéine E2 nommée HVR1 a été identifiée. C'est un épitope B et sa variation semble influencée par la pression exercée par le système immunitaire [80]. Il a également été montré que les anticorps anti-HVR1 étaient neutralisants [45], ce qui impliquerait que les mutations de cet épitope participent à la persistance du virus dans l'organisme. Une équipe [15] a comparé le taux d'évolution nucléotidique de HVR1 chez 4 malades atteints du syndrome d'immunodéficience commune variable (CVID) où l'influence du système immunitaire est réduit et chez 5 malades contrôle. Le taux moyen d'évolution nucléotidique trouvé est de 6,954 bases par an chez les contrôles, contre 0,415 chez les malades atteints de CVID ($p<0,02$). Ces résultats semblent aller dans le sens d'une pression de sélection du système immunitaire sur l'évolution du virus. Dans cette hypothèse, l'élimination du VHC par les anticorps anti-HVR1 est plus lente que le taux d'échappement par substitution d'acides aminés [81]. Néanmoins, à ce jour, aucune différence qualitative ou quantitative des réponses humorales n'a été impliquée dans la guérison ou la persistance de l'infection après un épisode aigu. En revanche, les anticorps anti-VHC seraient impliqués dans certaines manifestations extra-hépatiques de l'hépatite C comme les cryoglobulinémies de type II et III qui sont très fréquemment retrouvées chez les patients atteints d'hépatite C [25, 98].

## 2-Réponse cellulaire :

Certaines études ont également montré des mutations dans des épitopes T qui pourraient participer à l'inefficacité de la réponse immunitaire [164].

a) Réponse lymphocytaire T CD4+ spécifique du VHC :

Les lymphocytes T CD4+ spécifiques du VHC sont détectables dans le sang périphérique environ 3 à 4 semaines après la contamination et leur apparition dans l'infiltrat cellulaire au niveau hépatique se superpose à l'augmentation de l'activité sérique des ALAT [178]. Les protéines de capside NS3 et NS4A sont les plus fortement immunogènes. Il existe une corrélation entre l'existence d'une réponse lymphocytaire T CD4+ spécifique du VHC forte et soutenue chez les malades et l'obtention d'une clairance virale durant la phase aiguë de l'infection [172]. Plus précisément, il semblerait que ce soit la diversité de réactivité des lymphocytes T CD4+ vis-à-vis des protéines virales qui intervienne dans la capacité des malades à éliminer le virus [30]. Les études de prolifération de lymphocytes T CD4+ circulants et l'analyse de la production périphérique de cytokines ont montré qu'une sécrétion de cytokines immunomodulatrices Th1 (IL-2 et IFN-γ) prédominait chez les sujets ne développant pas d'hépatite chronique, les autres présentant un profil pro-inflammatoire Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10) plus marqué. La clairance virale spontanée paraît donc d'autant plus probable que se développe une réponse lymphocytaire T CD4+ de type Th1.

b) Réponse lymphocytaire T CD8+ cytotoxique :

Il a été démontré qu'au cours de l'hépatite aiguë, le nombre de clones lymphocytaires spécifiques du VHC et produisant de l'IFN-γ présents dans le sang périphérique est corrélé avec l'éradication du VHC 6 mois après le début de l'infection [62]. Il semblerait que la diversité épitopique de la réponse cytotoxique spécifique du VHC soit plus large chez les malades ayant une hépatite aiguë guérissant spontanément que chez ceux développant une infection chronique. Au cours d'une hépatite chronique, des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ spécifiques du VHC sont également détectables au niveau de l'infiltrat cellulaire hépatique. Leur action sur la clairance virale pourrait ainsi être le résultat de la lyse des cellules infectées par apoptose et /ou de l'action de certaines cytokines telles que l'IFN-γ ou le TNF [172]

c) Les cellules dendritiques :

Il semblerait que le VHC puisse se multiplier dans les cellules dendritiques et que ces dernières soient également impliquées dans la non efficacité de la réponse immunitaire contre le VHC. Il a été récemment démontré qu'en dépit d'un phénotype normal et d'une capacité intacte de capture de l'antigène, la capacité des cellules dendritiques à activer les lymphocytes T allogéniques était profondément altérée chez les malades avec une hépatite C chronique contrairement aux sujets sains [6].

# V-Diagnostic et suivi biologique d'une hépatite virale C

Comme on l'a vu dans le chapitre III, l'hépatite C est le plus souvent asymptomatique ce qui rend difficile son diagnostic clinique. Elle est donc fréquemment découverte de façon fortuite lors d'un bilan général. Des campagnes de dépistage ont été mises en place par le ministère de la santé, visant notamment les personnes présentant des facteurs de risque (antécédents de transfusion, toxicomanie,...). Certaines personnes peuvent également être amenées à consulter pour une fatigue, des douleurs articulaires ou un ictère. Devant ces signes peu spécifiques, le médecin réalisera un bilan général, qui, s'il montre une augmentation des enzymes hépatiques, l'amènera à prescrire les sérologies des hépatites virales.

Le diagnostic d'une hépatite virale C repose donc essentiellement sur le diagnostic biologique. Ce diagnostic biologique, comme pour la plupart des infections virales, recherche soit le virus et/ou ses constituants (diagnostic direct), soit les anticorps spécifiques correspondants (diagnostic sérologique indirect). La culture cellulaire du VHC reste, pour le moment, du domaine de la recherche.

## 1-Diagnostic sérologique indirect :

Ce diagnostic repose sur l'utilisation de tests immuno-enzymatiques (ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay). Disponibles dès le début des années 1990, les tests ELISA de 1$^{ère}$ génération utilisaient comme antigène de capture la première protéine recombinante synthétisée : c100-3, localisée dans la région NS4 du génome viral. Ces premiers tests évoluèrent rapidement vers une 2$^{ème}$ génération incluant, en plus de la protéine de la région NS4, des antigènes de protéines de capside et NS3. Les études de la cinétique d'apparition des anticorps au cours de l'infection VHC ayant en effet montré que les anticorps les plus précoces étaient justement ceux dirigés contre des épitopes des protéines de capside et NS3, une amélioration considérable de la sensibilité fut obtenue avec l'introduction de ces antigènes. Les tests les plus récents dits de 3$^{ème}$ génération utilisent un mélange d'antigènes appartenant aux protéines de capside, NS3, NS4 et NS5.

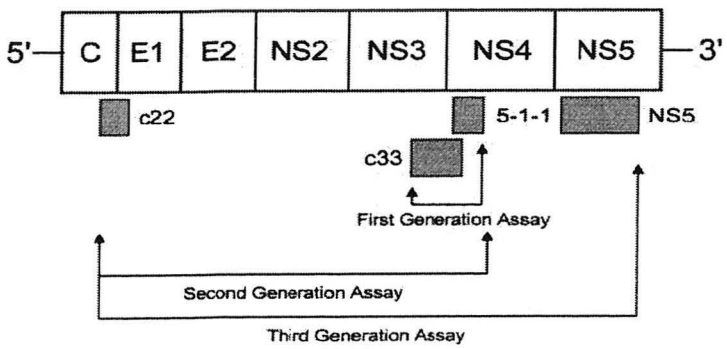



Figure 20: Extraite de [47] : Antigènes des différentes générations de tests sérologiques.

Une équipe de la banque du sang hollandaise [162] a évalué 3 kits de 3ème génération (Abbott, Murex et Ortho) et donne des spécificités respectives de 99.7, 99.3 et 99.9%. La nomenclature des actes de biologie médicale a retenu, du fait d'un meilleur rapport coût-efficacité, l'utilisation d'un seul test pour le dépistage avec l'obligation d'un contrôle sérologique sur un nouveau prélèvement au moyen de réactifs ELISA différents en cas de dépistage positif (coût d'un test ELISA B70 soit actuellement 18,20 €). Ces tests sont pris en charge à 100 % (Art R 322-1 du code de la sécurité sociale) en cas de prescription et sont gratuits dans les centres de dépistages anonymes et gratuits (CDAG). L'existence de résultats discordants, d'un test ELISA à l'autre s'explique, en général, par la nature et la conformation légèrement différentes des antigènes employés d'une part, et par le type de support solide sur lequel sont fixés ces antigènes d'autre part. Ces discordances sont, dans la grande majorité des cas, des faux positifs.

Un test de 4ème génération : Monolisa® HCV Ag-Ab ULTRA, développé par la firme Bio-Rad, est actuellement en cours d'agrémentation. Il combine la recherche de l'antigène de capside avec celle classique d'anticorps contre les régions non structurales du VHC, ainsi que contre la protéine de capside (mutée pour éviter toute interférence avec la captation de l'antigène).

Il existe des tests de validation basés sur des méthodes d'immunoblotting. Les antigènes viraux souvent identiques ou voisins de ceux utilisés dans les tests ELISA sont immobilisés sur une membrane de nitro-cellulose. Leur spécificité est légèrement meilleure que celle des tests ELISA, cependant ils sont de moins en moins utilisés dans la pratique, à l'exception des primo-infections où ils peuvent se révéler intéressants pour suivre l'apparition progressive du profil des anticorps.

Les anticorps détectables apparaissent en moyenne 4 à 17 semaines après le contage ; la fenêtre sérologique est donc importante. Une sérologie positive indique donc un contact avec le virus mais n'a aucune signification en terme de réplication virale. Elle pourra être le reflet d'une hépatite guérie, par exemple.

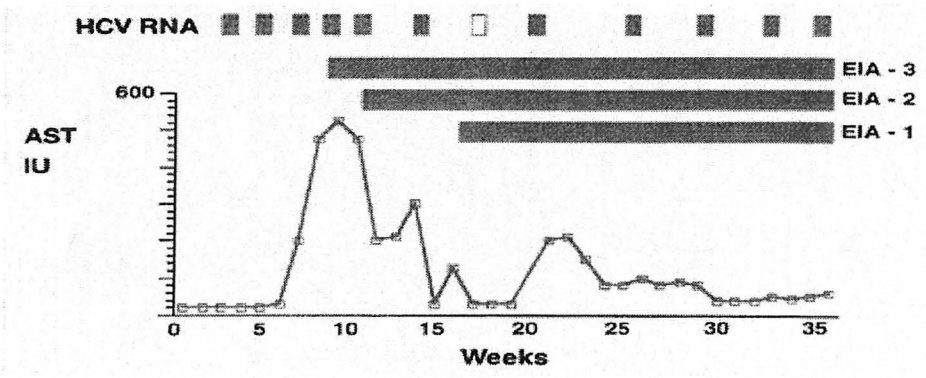



Figure 21 : Extraite de [135]. Détection de l'ARN du VHC et des ac anti-VHC par les différentes générations de tests lors d'une infection aiguë par le VHC. Malgré ces progrès la fenêtre sérologique demeure supérieure à 80 j.

| Test | Fabricant | Méthode | Ag utilisé |
|---|---|---|---|
| Ortho HCV 3.0 ELISA Test system | Ortho-Clinical diagnostics Raritan, New Jersey | ELISA microplaque | Capside, NS3, NS4, NS5 (Chiron corporation) |
| Vitros anti-HCV | Ortho-Clinical diagnostics Raritan, New Jersey | ELISA sur Automate Vitros ECI | Capside, NS3, NS4, NS5 (Chiron corporation) |
| Abbott HCV EIA 3.0 | Abbott Diagnostic, Chicago, Illinois | ELISA sur billes | Capside, NS3, NS4, NS5 (Chiron corporation) |
| IMX HCV 3.0 | Abbott Diagnostic, Chicago, Illinois | ELISA sur automate IMX | Capside, NS3, NS4, NS5 (Chiron corporation) |
| AXSYM HCV 3.0 | Abbott Diagnostic, Chicago, Illinois | ELISA sur automate AXSYM | Capside, NS3, NS4, NS5 (Chiron corporation) |
| PRISM HCV | Abbott Diagnostic, Chicago, Illinois | ELISA sur automate PRISM | Capside, NS3, NS4, NS5 (Chiron corporation) |
| Monolisa anti-HCV Plus version 2 | Bio-Rad , Marnes-la-Coquette, France | ELISA sur microplaque | Capside, NS3, NS4, (Bio-Rad) |
| Access HCV Ab plus | Bio-Rad , Marnes-la-Coquette, France | ELISA sur automate ACCESS | Capside, NS3, NS4, (Bio-Rad) |
| Innotest HCV Ab IV | Innogenetics | ELISA microplaque | Capside, NS3, NS4, NS5 de génotypes 1, 2 et 3a (Innogenetics) |

Tableau 6 : Extrait de [178].
Tests ELISA de détection des Ac anti-VHC disponibles.

## 2-Diagnostic direct :

A- Techniques de détection qualitative de l'ARN du VHC :

L'ARN du VHC est présent en quantité trop faible pour être détecté par les méthodes d'hybridation classique. Une étape d'amplification préalable est nécessaire. Divers protocoles de « reverse transcription polymerase chain reaction » (RT-PCR ) (rétrotranscription de l'ARN viral en ADN puis amplification avec une ADN polymérase thermostable), ont été développés. La plupart utilise un couple d'amorces spécifique de la région 5'NC et indépendant du génotype. La 2ème étape d'amplification fait appel à un couple d'amorces situé à l'intérieur de la

région préalablement amplifiée : on parle alors de PCR nichée ou « nested PCR ». Cette double amplification offre un gain de spécificité et de sensibilité important. Il existe cependant une deuxième technique appelée TMA pour « transcription-mediated amplification » qui utilise une T7 ARN polymérase à température constante pour synthétiser des copies d'ARN simple brin. Les caractéristiques techniques des tests commerciaux actuellement disponibles sont présentées dans le tableau 7.

Depuis Juillet 2001, les dons de sang en France sont testés pour la présence d'ARN VHC et VIH par des techniques de biologie moléculaire (dépistage génomique viral : DGV) ce qui amène le risque de transmission transfusionnelle à des valeurs proches de zéro.

| Test | Fabricant | Méthode | Seuil inférieur de détection | Application |
|---|---|---|---|---|
| **Amplicor HCV v2.0** | Roche Molecular Systems, Pleasanton, USA | PCR qualitative manuelle | 50 UI/ml | Diagnostic |
| **Cobas Amplicor HCV 2.0** | Roche Molecular Systems, Pleasanton, USA | PCR qualitative semi-automatisée | 50 UI/ml | Diagnostic |
| **Versant HCV RNA qualitative Assay** | Bayer Corporation, Tarrytown, USA | TMA qualitatif manuel | 10 UI/ml | Diagnostic |

Tableau 7 : Extrait de [91].
Tests de détection qualitative de l'ARN du VHC disponibles.

Un ARN qualitatif positif chez un patient ayant des Ac anti-VHC témoigne d'une infection active. En cas d'ARN qualitatif négatif, l'éradication virale est probable et doit être contrôlée à 6 mois ou 1 an plus tard. Le coût de cette recherche est un B200 (52 €) avec un remboursement à 100 % en cas d'affection de longue durée (ALD). Les faux positifs sont liés à des problèmes de contamination. Les faux négatifs sont dus à un défaut d'amplification ou à une mauvaise sensibilité. La fragilité de l'ARN viral impose des conditions rigoureuses de prélèvement et de conservation des échantillons (-80°C pour éviter la dégradation par les RNases) [64].

B- Quantification de l'ARN du VHC : mesure de la charge virale

La charge virale peut être mesurée dans le sérum ou le plasma par amplification de la cible (ARN) par les deux mêmes types de techniques que celles employées pour la détection

qualitative de l'ARN VHC. Ces techniques sont fondées sur l'amplification compétitive de l'ARN viral avec un ARN synthétique dont une quantité connue est rajoutée à l'échantillon au début de la réaction. La charge virale est établie par comparaison à une courbe standard établie en parallèle [91]. Un autre moyen de mesurer la charge virale est d'amplifier non pas la cible mais le signal. On utilise pour cela la technique dite des « ADN branchés », qui permet la détection sans amplification de faibles quantités d'ARN viral après hybridation sur un support solide.

Dans l'avenir, ces techniques pourraient être remplacées par la PCR dite « en temps réel », où la quantification de l'ARN se fait pendant la réaction dans un tube fermé. Ces techniques quantitatives très sensibles pourraient, à terme, permettre l'abandon des techniques purement qualitatives car elle sont très spécifiques et permettent la quantification de la charge virale sur un intervalle de valeurs étendu [138]. Un kit de PCR en temps réel vient d'ailleurs d'être mis sur le marché par Roche Diagnostics (cf. Tableau 8).

Les caractéristiques techniques des tests commerciaux disponibles sont présentées dans le tableau 8. Le coût de cette recherche est un B300 (78 €) avec un remboursement à 100% en cas d'ALD. Les indications de cet examen sont limitées au bilan pré-thérapeutique et au suivi thérapeutique des patients infectés par le VHC. Lorsque l'on traitait les patients avec la bithérapie IFN (3 MUI 3 x/semaine) + Ribavirine, la charge virale avant traitement permettait d'adapter le schéma thérapeutique. Ce n'est plus le cas actuellement avec l'IFN pégylé : le schéma thérapeutique dépend essentiellement du génotype. Au cours du suivi thérapeutique, la cinétique de décroissance de la charge virale permet de définir les patients n'ayant pas une réponse virologique précoce, en particulier à la 12$^{ème}$ semaine (S12) de traitement chez les génotypes 1. Dans ce cas, les chances d'obtenir une réponse virologique soutenue 6 mois après l'arrêt du traitement sont très faibles (0-3%) [64]. Cette absence de réponse virologique précoce est définie par une virémie toujours positive à S12, avec une diminution de moins de 2 log de la charge virale entre la mesure pré-thérapeutique et S12. La limite supérieure de l'intervalle de quantification linéaire varie de 500 000 à 7 700 000 UI/ml, voire même maintenant 200 000 000 UI/ml avec la dernière technique Roche en temps réel. L'intervalle de quantification linéaire de ces tests peut être augmenté en testant, après dilution, les échantillons donnant des valeurs supérieures à la limite haute de quantification du test. La spécificité des tests de mesure de la charge virale est de l'ordre de 98 à 99% et le génotype viral n'affecte pas leur exactitude. Depuis 1999, l'OMS a mis en place une unité standardisée de mesure de la charge virale: l'UI/ml. A titre indicatif, l'ancien seuil de décision thérapeutique de 2 millions de copies d'ARN VHC correspond à 800 000 UI VHC/ml (données Roche : journal d'information biomédicale, avril 2001). Etant donné le coefficient de variation non négligeable de ces techniques, il est recommandé de ne pas tenir compte de variations inférieures à 0,5 log [114].

| Test | Fabricant | Méthode | Seuil inférieur | Intervalle de quantification |
|---|---|---|---|---|
| Amplicor HCV Monitor v2.0 | Roche Molecular Systems, Pleasanton, USA | PCR compétitive manuelle | 600 UI/ml | 600- 850 000 UI/ml |
| Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0 | Roche Molecular Systems, Pleasanton, USA | PCR compétitive semi-automatisée | 600 UI/ml | 600- 850 000 UI/ml |
| Versant HCV RNA 2.0 Assay | Bayer Corporation, Tarrytown, USA | ADN branchés manuels | 200 000 équivalents génomes /ml | 200 000- 120 000 000 équivalents génomes /ml |
| Versant HCV RNA 3.0 Assay | Bayer Corporation, Tarrytown, USA | ADN branchés semi-automatisés | 615 UI/ml | 615- 7 700 000 UI/ml |
| LCx HCV RNA Quantitative Assay | Abbott Diagnostic, Chicago, USA | PCR compétitive semi-automatisée | 25 UI/ml | 25-2 630 000 UI/ml |
| Superquant | National Genetics Institute, Los angeles, USA | PCR compétitive semi-automatisée | 30 UI/ml | 30-1 470 000 UI/ml |
| Cobas Taqman HCV Test | Roche Molecular Systems, Pleasanton, USA | PCR en temps réel automatisée | 30 UI/ml | 30-200 000 000 UI/ml |

Tableau 8 : Extrait de [91].
Techniques de quantification de l'ARN du VHC disponibles.

C- Test de détection et de quantification de l'antigène de capside du VHC :

Un test ELISA de détection qualitative de l'antigène de capside du VHC a été développé pour permettre de réduire la fenêtre sérologique précédant la séroconversion, notamment pour la qualification des dons de sang [5]. Par ce test, l'antigène de capside est détecté en moyenne 1 à 2 jours après l'ARN viral (qui est lui-même détecté 1 à 2 semaines après la contamination), alors que la fenêtre sérologique est en moyenne de 7 à 8 semaines. Néanmoins, maintenant que le DGV a été généralisé à l'établissement français du sang, cette technique ne semble plus très intéressante.

Un test ELISA quantitatif utilisant le même Ac monoclonal et comportant une étape préliminaire de dissociation des complexes antigène-anticorps a également été développé pour être utilisé dans la prise en charge des malades infectés par le VHC (Total HCV core Ag assay, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) [152]. Le titre d'antigène de capside circulant est corrélé à la charge virale et peut être utilisé comme marqueur de celle-ci. La détection-quantification de l'antigène de capside du VHC est cependant moins sensible que les tests moléculaires pour la mise en évidence d'une réplication virale, puisqu'il ne détecte pas la réplication virale en deçà d'une charge virale de l'ordre de 20 000 UI/ml [17]. Ce test est donc très peu utilisé en pratique.

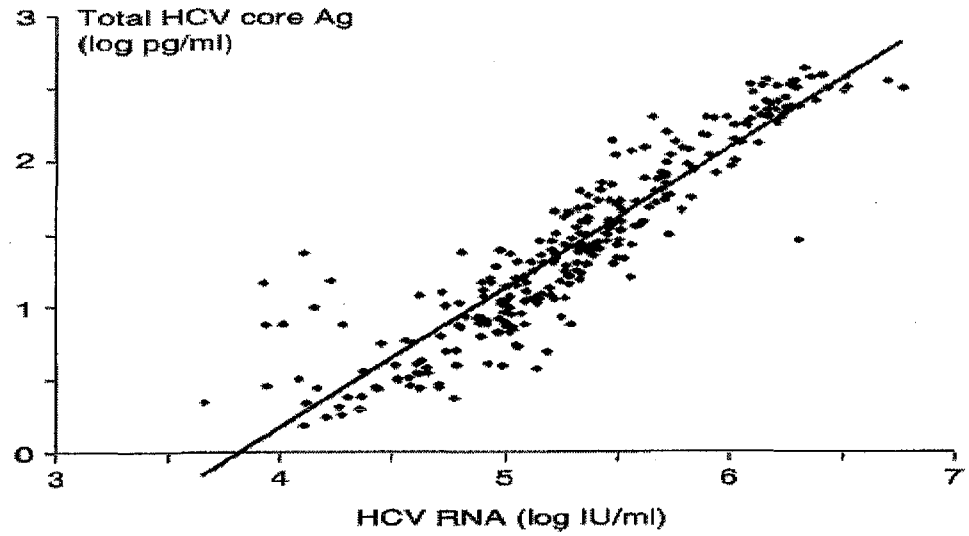



Figure 22 : Extraite de [17]. Relation entre l'ARN du VHC (en log10 IU/mL) et le total HCV core Ag (en log10 pg/mL) dans 293 échantillons.
Les 2 marqueurs sont significativement liés: ($r$ =0.92; $P$ = .0001).

D- Détermination du génotype :

La détermination du génotype, ou génotypage, repose sur des techniques de biologie moléculaire à partir de l'analyse de la région 5'NC et/ou de la région codant la capside virale par séquençage direct et analyse Phylogénétique (méthode de référence), ou par hybridation inverse utilisant des sondes spécifiques de type ou de sous-type.

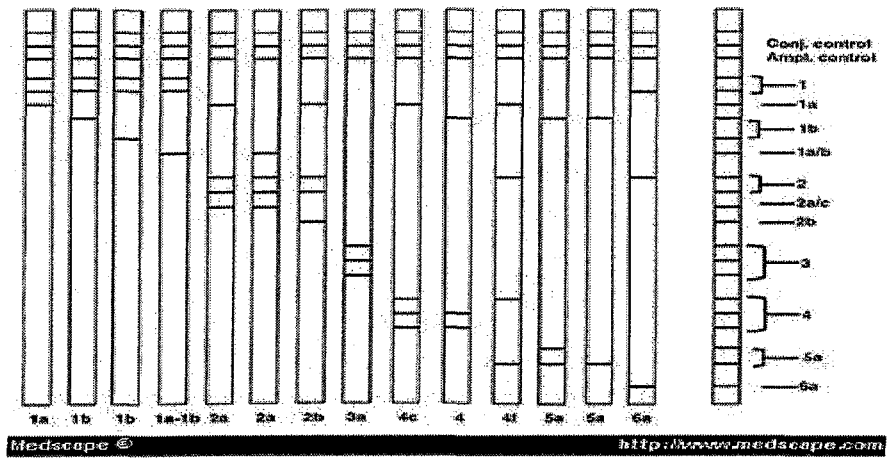



Figure 23 : Extraite de www.medscape.com Profils obtenu avec la technique Inno-LiPA HCV II pour les différents types et sous types du VHC.

Les caractéristiques techniques des tests commerciaux disponibles sont présentées dans le tableau 9.

| Test | Fabricant | Méthode | Types identifiés | Sous-types identifiés |
|---|---|---|---|---|
| Inno-LiPA HCV II | Innogenetics, Gand, Belgique | Hybridation inverse après PCR | 1à 6 | 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a, 10a |
| Trugene HCV 5'NC Genotyping kit | Visible Genetics Inc, Toronto, Canada | Séquençage direct de la région 5'NC et comparaison à une banque de séquences de reférence | 1 à 6 | 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 2d, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 5a, 6a, 6b |

Tableau 9 : Extrait de [91]. Techniques de génotypage du VHC disponibles.

Le génotype viral peut également être déterminé par des techniques sérologiques (sérotypage) grâce à la mise en évidence d'anticorps spécifiques de type par ELISA compétitif (les sous-types ne peuvent pas être déterminés par cette méthode). Il s'agit de la technique Murex® HCV Serotyping 1-6 Assay , commercialisée en France par Abbott Diagnostic, Chicago, Illinois. Il en existe maintenant une nouvelle version HC03 [57]. Le test est interprétable chez 90 % des patients immunocompétents ayant une hépatite C chronique et la concordance des tests moléculaires de la détermination de génotype est de 94 %. Cette concordance est meilleure pour les types 1 et 3 que pour les autres types. Il est cependant impossible avec ce test d'interpréter les sérotypes mixtes trouvés. La réponse au traitement étant variable selon les génotypes (cf. chapitre VI), le génotypage trouve son intérêt lors de la décision thérapeutique. Il permet aussi de déterminer la durée du traitement (6 mois pour les génotypes 2 et 3 et un an pour les génotypes 1). Le coût du test est un B400 (104 €) pour le génotypage et B200 (52 €) pour le sérotypage (les 2 examens n'étant pas cumulables) avec un remboursement à 100% par la sécurité sociale dans le

cadre d'une ALD. L'indication du typage du VHC est limitée au bilan pré-thérapeutique d'une hépatite C.

D'autres techniques de diagnostic sont actuellement en cours d'investigation. On peut citer, par exemple, l'utilisation de « puces » à basse densité qui permettent une détection simultanée du génome viral et des anticorps pour le VIH, le VHC et le VHB. Ces puces sont proposées par la société Apibio basée à Grenoble [117].

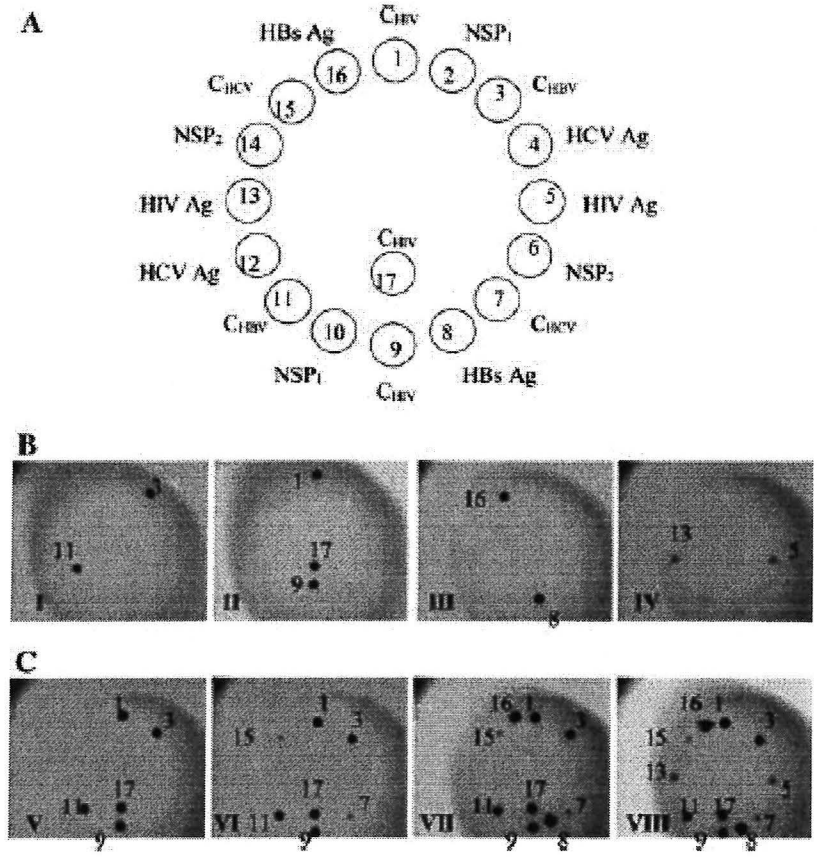



Figure 24 : Extraite de [117]
(A) Modèle du CombOLISA microarray (duplicated spots).
Acides nucléiques pour l'hybridation d'ADN : CHIV [1,9,17], CHBV [3,11], et CHCV [7,15]:.
Protéines virales pour la recherche dans le sérum HIV Ag [5,13], HBs Ag [8,16], et HCV Ag [4,12]
Protéines non-spécifiques pour l'évaluation de la spécificité de la puce. NSP1 [2,10] & NSP2 [6,14]
(B) CombOLISA array à l'issue de nombreux essais :
-Ajout indépendant des analytes : I: HBV DNA. II: HIV DNA. III: HBV serum. IV: HIV serum.
(C) Analytes ajoutés consécutivement dans le même puits: V: HBV et HIV DNAs. VI: HBV, HIV, et HCV DNAs. VII: HBV, HIV ,et HCV DNAs et HBV serum. VIII: HBV, HIV, et HCV DNAs et HBV et HIV sera.

# VI-Traitement d'une hépatite virale C

Depuis la découverte du VHC en 1989, l'efficacité du traitement de l'hépatite chronique C a considérablement progressé. En 1989, la monothérapie avec l'interféron alpha (IFNα) standard sur une période de 6 mois permettait d'obtenir à peine 10 % de réponse virologique soutenue (recherche d'ARN viral négative 6 mois après l'arrêt du traitement : RVS). L'allongement de la durée du traitement par IFN à 12 mois a permis d'obtenir environ 15% de réponse virologique soutenue. Depuis 1998, l'association de la ribavirine (RBV) à l'interféron a nettement augmenté l'efficacité du traitement : on obtenait alors environ 40 % de RVS. Enfin deux grands essais contrôlés [52, 100] ont montré que la nouvelle bithérapie associant la ribavirine à l'interféron pégylé (IFNPeg) permet d'obtenir 55 % de réponse virologique [178].

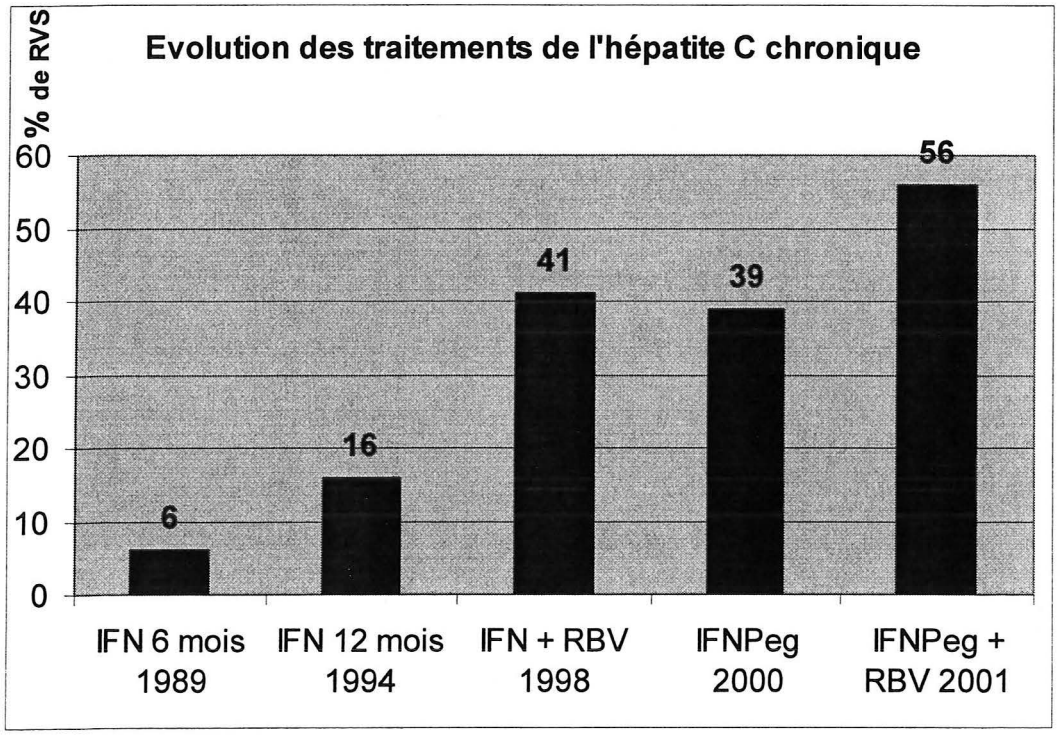



Figure 25 : Extraite de [172]. Evolution des traitements de l'hépatite C depuis la découverte du virus en 1989. RVS : réponse virologique soutenue.

## 1-Les indications de traitement :

Ce traitement étant lourd d'effets indésirables, il n'est pas systématiquement prescrit à toute personne chez qui le virus a été détecté. La décision de traiter dépend essentiellement des données virologiques et histologiques, mais doit être envisagée au cas par cas en tenant compte de l'âge, du terrain, des contre-indications éventuelles au traitement et des motivations du malade.

A- L'hépatite C aiguë :

L'attitude thérapeutique dans l'hépatite C aiguë est déterminée par la constatation rapportée dans de nombreuses études que les patients symptomatiques ont plus de chances que les asymptomatiques d'éliminer spontanément le virus [59, 159]. Si le contage est documenté, la recherche d'ARN positif et le malade asymptomatique, les recommandations de la conférence de consensus 2002 [178] sont de commencer immédiatement un traitement (IFNPeg + RBV, 24 semaines) sans faire de biopsie, car la probabilité de passage à la chronicité est élevée. Chez les malades ayant une hépatite C symptomatique, la conférence de consensus de Février 2002 suggère une recherche d'ARN viral 12 semaines après le début de l'ictère. Si l'ARN reste détectable à ce moment là, il est alors recommandé de traiter 24 semaines par IFNPeg + RBV [137]. D'après une étude récente [79], le traitement de l'hépatite aiguë par la monothérapie IFNPeg donne un taux de réponse soutenue de 80 % (n=20) et avec la bithérapie IFNPeg + RBV, le taux de réponse passe à 85 % (n = 20). De plus, cette étude montre que la réponse CD4+ TH1 est plus importante et plus étendue chez les patients traités que chez les non traités et que cette réponse est maintenue plus longtemps chez les sujets traités ou chez ceux qui vont éliminer spontanément le virus que chez ceux chez qui l'infection devient chronique.

B- L'hépatite chronique C « naïve » :

L'indication de traitement repose essentiellement sur 2 paramètres : le risque évolutif de la maladie et les chances de réussite du traitement. En fonction de ce deuxième critère, on recommande de traiter tous les génotypes 2 et 3 car ils ont plus de 80 % de chance de guérir avec un traitement de 24 semaines [178]. Pour les génotypes 1, on évaluera le risque évolutif de la maladie grâce à une PBH. Le rapport bénéfice-risque apparaît assez élevé pour des patients ayant une fibrose modérée ou sévère correspondant à un score METAVIR F2-4. L'indication de traitement est d'avantage à discuter pour des malades ayant une fibrose absente ou minime en l'absence de facteurs aggravants (obésité, consommation excessive d'alcool, co-infections,...). On recommande alors plutôt une surveillance régulière de la maladie et on ré-évalue l'indication de traitement si besoin. L'existence de manifestations extra-hépatiques (vascularites, par exemple), un projet futur de grossesse, ou une forte demande du patient peuvent également faire envisager un traitement.

C- L'hépatite chronique C déjà traitée :

Les échecs au traitement initial peuvent être des « rechutes », définies par la réapparition de l'ARN viral sérique dans les 6 mois suivant l'arrêt du traitement, ou des « non-réponses » définies par la persistance de l'ARN viral sérique à la fin du traitement.

D'après la conférence de consensus française de Février 2002, un traitement associant IFNPeg et RBV doit être proposé aux patients n'ayant pas répondu ou ayant rechuté après un traitement avec de l'IFN en monothérapie. En effet, les études existantes [37, 121] montrent un intérêt de reprendre une bithérapie IFN + RBV chez les patients ayant été traités en monothérapie. Par extrapolation des résultats observés chez les patients naïfs sur la meilleure efficacité de l'IFNPeg, on peut ainsi conseiller de retraiter ces patients avec le traitement de référence actuel (IFNPeg+ RBV). En revanche, il n'existe pas d'attitude clairement définie et peu de données sont actuellement disponibles concernant les patients non répondeurs ou rechuteurs à un traitement par bithérapie IFN standard-RBV .

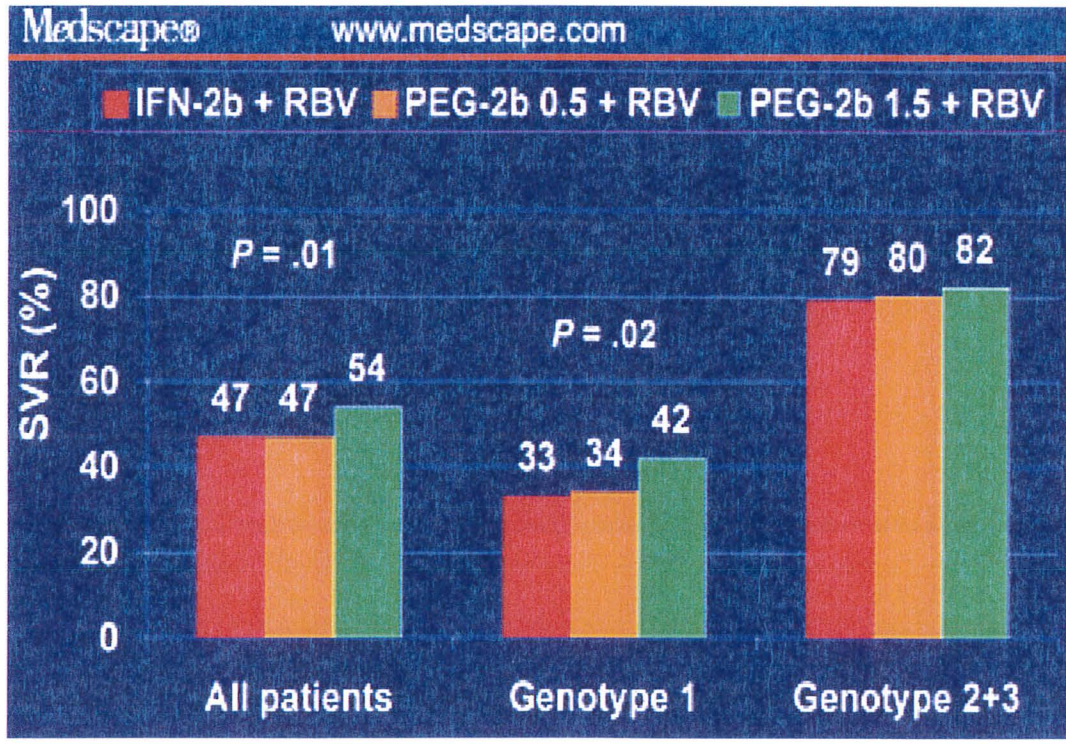



Figure 26 : Extraite de http://www.medscape.com/viewprogram/2035_pnt. Auteur : Norbert Bräu , 2002. Avancées dans le traitement de l'hépatite C.

D- Les patients transplantés hépatiques :

La récidive de l'infection par le VHC est quasi systématique après transplantation hépatique pour cirrhose ou CHC lié au VHC. Une charge virale élevée, la survenue d'une hépatite symptomatique ou une forte immunosuppression seraient des facteurs d'évolution défavorables, justifiant le traitement des patients par la bithérapie IFNPeg + RBV [132]. Il serait intéressant de pouvoir traiter les patients rapidement en post-opératoire tant que leur charge virale est encore faible. Cependant, dans cette période, le traitement antiviral entraîne des risques très importants de toxicité hématologique, d'aggravation de l'état général et de complications septiques.

E- Les traitements d'entretien :

Chez les malades non répondeurs avec une hépatopathie évolutive et un risque important de progression vers la cirrhose, un traitement d'entretien doit être discuté pour stabiliser la maladie et éventuellement attendre l'arrivée de nouvelles molécules thérapeutiques plus efficaces.

Près de la moitié des non répondeurs présentent quand même une amélioration histologique à l'issue de leur traitement. L'IFN diminue l'activité inflammatoire intra-hépatique et pourrait ainsi ralentir l'évolution de la fibrose hépatique, et ceci même en cas de persistance de l'infection virale [150]. De nombreuses études sont en cours pour évaluer la prise au long cours de faibles doses d'interféron. Les laboratoires Roche dirigent l'étude HALT-C (Hepatitis C Antiviral Long-Term Treatment Against Cirrhosis) avec le Pegasys® sur plus de 1000 patients n'ayant pas obtenu de réponse soutenue à une bithérapie IFN + RBV d'au moins 12 semaines (quel que soit l'IFN). Les patients reçoivent Pegasys® + Copegus® pendant 6 mois puis, si la charge virale est toujours détectable à l'issue de ces 6 mois, les patients sont randomisés en 2 groupes : « ½ dose de Pegasys® pendant 3 ans et demi » ou « pas de traitement ». Les laboratoires Schering-Plough coordonnent, eux, l'étude COPILOT (Colchicine versus Peg-intron® Long-Term) qui regroupe environ 1000 participants n'ayant pas obtenu de réponse soutenue à l'issue d'un ou plusieurs traitements. Les patients sont randomisés en 2 groupes : le 1er reçoit une faible dose de Peg-intron® 1 x /semaine et le second de la colchicine par voie orale 2x/jour. La colchicine est une drogue anti-fibrotique qui a montré des effets bénéfiques sur des patients ayant des lésions hépatiques liées à l'abus d'alcool.

La ribavirine en monothérapie, bien que n'ayant *a priori* pas d'effet durable sur la charge virale (cf. chapitre VI-3), permet d'obtenir une diminution significative des transaminases et leur normalisation (=réponse biochimique) chez 30 à 50 % des malades. Le taux de réponse biochimique est plus faible chez les patients cirrhotiques (24 %) et chez les patients non répondeurs à l'IFN (26 %) [172]. Hoofnagle et al [70] montrent chez 108 patients non répondeurs à une 1ère cure de 24 semaines d'IFN + RBV, puis randomisés en 2 groupes, l'un recevant de la

ribavirine 1000 ou 1200 mg/j pendant 48 semaines et l'autre recevant un placebo, que la monothérapie RBV permet de maintenir un taux de transaminases plus faible, ce qui diminue l'apparition de lésions nécrotico-inflammatoires du foie.

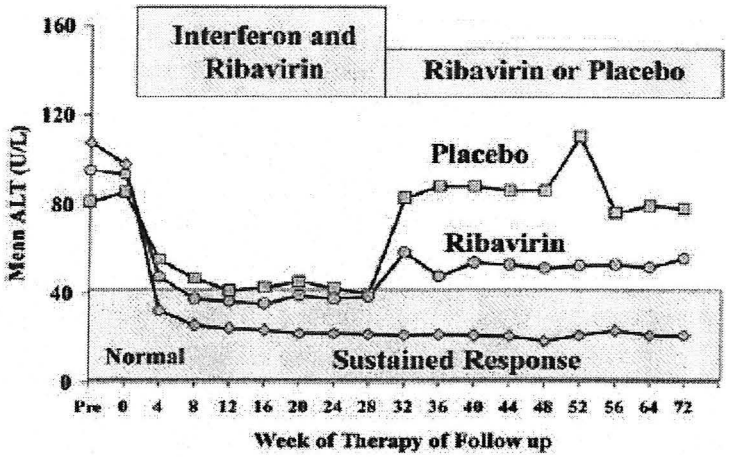



Figure 27 : Extraite de [70]. Comparaison des taux sériques moyens d'ALAT chez 41 patients qui ont une réponse virologique soutenue (**losanges**) et chez 34 patients virologiquement non répondeurs. A la 24ème semaine, les patients non répondeurs ont été randomisés en 2 groupes : un groupe traité par la RBV seule (n = 17; **ronds** ), un groupe traité par placebo (n = 17 ; **carrés**) pendant les 48 semaines suivantes.

Pour les patients déjà atteints de cirrhose (F4), le but du traitement n'est plus seulement l'éradication virale, mais surtout la stabilisation de la maladie pour éviter l'évolution vers un CHC. Les études rapportent quand même des taux de réponse soutenue de 41 % pour les génotypes 1 et de 73 % chez les patients génotypes 2 et 3 ayant une fibrose avancée ou une cirrhose compensée. Ces taux chutent à 30 % pour les patients ayant un génotype 1 et une cirrhose décompensée [43]. En l'absence de réponse virologique, un traitement d'entretien par IFN seul peut être proposé si le patient a eu une réponse biochimique à l'issue du traitement initial.

F- Autres cas [178]:

Les troubles constitutionnels de l'hémostase (hémophilie, notamment) ne modifient pas les traitements.

Chez les patients thalassémiques, la surcharge en fer, induite par la dysérythropoïèse et les transfusions multiples, aggrave l'hépatopathie et pourrait diminuer l'efficacité de l'IFN. La ribavirine est, par ailleurs, généralement contre-indiquée du fait des risques d'hémolyse sévère. Selon les données de la PBH, un traitement par IFN peut être proposé et s'il échoue, on peut alors envisager une bithérapie sous très étroite surveillance et avec des transfusions régulières.

Chez l'insuffisant rénal non dialysé, l'IFN et la RBV sont habituellement contre-indiqués. L'évaluation histologique du foie est indispensable, notamment pour rechercher une cirrhose qui contre-indique une transplantation rénale isolée. Un traitement par IFN peut tout de même être

proposé malgré sa mauvaise tolérance. Il est justifié de traiter l'infection virale C avant d'envisager une transplantation rénale qui contre indique l'IFN.

Chez les alcooliques chroniques, l'évolution de l'hépatite C est plus rapide. L'efficacité du traitement antiviral, sa tolérance et son observance sont diminuées. Il est recommandé d'obtenir un arrêt ou une diminution notable de la consommation d'alcool au moins 6 mois avant de débuter un traitement.

Chez les toxicomanes, l'hépatite C étant le plus souvent détectée assez tôt, l'atteinte histologique est encore minime et la prévalence du génotype 3 est plus élevée dans cette population. Tous ces éléments sont plutôt de pronostic favorable, néanmoins certains facteurs fréquemment associés à une toxicomanie active sont moins favorables : consommation d'alcool, co-infection par le VIH ou le VHB, fréquence des troubles psychiatriques et fragilité du lien social. Pour ces patients, une prise en charge pluri-disciplinaire doit être mise en place afin d'évaluer la stabilité psychologique, relationnelle et sociale et éventuellement pour gérer un traitement substitutif.

Chez les personnes souffrant de troubles psychiatriques, il semble raisonnable de ne traiter qu'en cas d'hépatopathie sévère en raison du risque d'apparition ou d'aggravation de manifestations psychiatriques graves.

Chez les co-infectés VIH-VHC, l'hépatite C est associée à une sévérité accrue des lésions histologiques hépatiques et à une évolution plus fréquente et plus rapide vers la cirrhose. Chez les patients non immunodéprimés, sans indication immédiate de traitement anti-VIH, on essaiera de traiter en premier le VHC : cette stratégie facilite l'observance et évite les interactions médicamenteuses entre la RBV et les analogues nucléosidiques, ainsi que la majoration de l'hépatotoxicité des antirétroviraux par l'hépatopathie sous-jacente. Chez les patients co-infectés recevant déjà un traitement antirétroviral, l'indication d'un traitement anti-VHC repose sur les mêmes bases histologiques que celles retenues pour les malades monoinfectés par le VHC, en faisant attention au risque d'interactions médicamenteuses cité ci-dessus. En cas d'immunodépression, le traitement anti-VHC n'est pas la priorité. De plus, l'immunodépression sévère semble associée à une diminution de la réponse virologique et de la tolérance clinique et biologique des traitements anti-VHC.

## 2-L'interféron :

L'interféron a été découvert en 1957 en tant que substance ayant une activité antivirale et/ou sur le système immunitaire. L'interféron a été largement utilisé comme régulateur négatif de la croissance cellulaire. L'interféron est produit naturellement dans la plupart des cellules

humaines mais en quantité très faible. Il existe plusieurs formes d'interféron : α essentiellement sécrété par les macrophages, β essentiellement sécrété par les fibroblastes et γ sécrété par les cellules T activées et les cellules Natural Killer (NK). C'est l'IFN α qui est utilisé contre l'hépatite C. Il en existe 2 formes commercialisées l'IFN α-2a de Roche et IFN α-2b de Schering-Plough.

A- Pharmacodynamie:

**Activité antivirale** : L'inhibition de la réplication virale par l'IFNα est médiée par sa liaison aux récepteurs de surface cellulaire de type 1. Par la suite, l'internalisation du complexe IFN induit la synthèse et la libération de plus de 20 protéines effectrices, telles que la 2'5'-oligoadénylate synthétase, la protéine kinase dépendante de l'ARN double brin et les protéines Mx qui inhibent la réplication virale à différents niveaux. L'induction de la protéine kinase dépendante de l'ARN double brin inhibe la traduction virale [136]. La production de 2'5'-oligoadénylate synthétase entraîne la dégradation des ARN messagers [58]. Les modèles mathématiques montrent que les concentrations d'ARN du VHC diminuent de manière dose-dépendante après des injections simples ou multiples sous-cutanées d'IFN. Lors de la phase initiale (0–2 jours), la décroissance est rapide. Lors de la seconde phase, la diminution de charge virale ralentit et la variabilité interindividuelle de cette charge virale augmente. Contrairement à la première phase, la seconde n'est pas dose-dépendante mais est corrélée négativement avec la charge virale initiale et positivement avec le taux d'ALAT sérique [108].

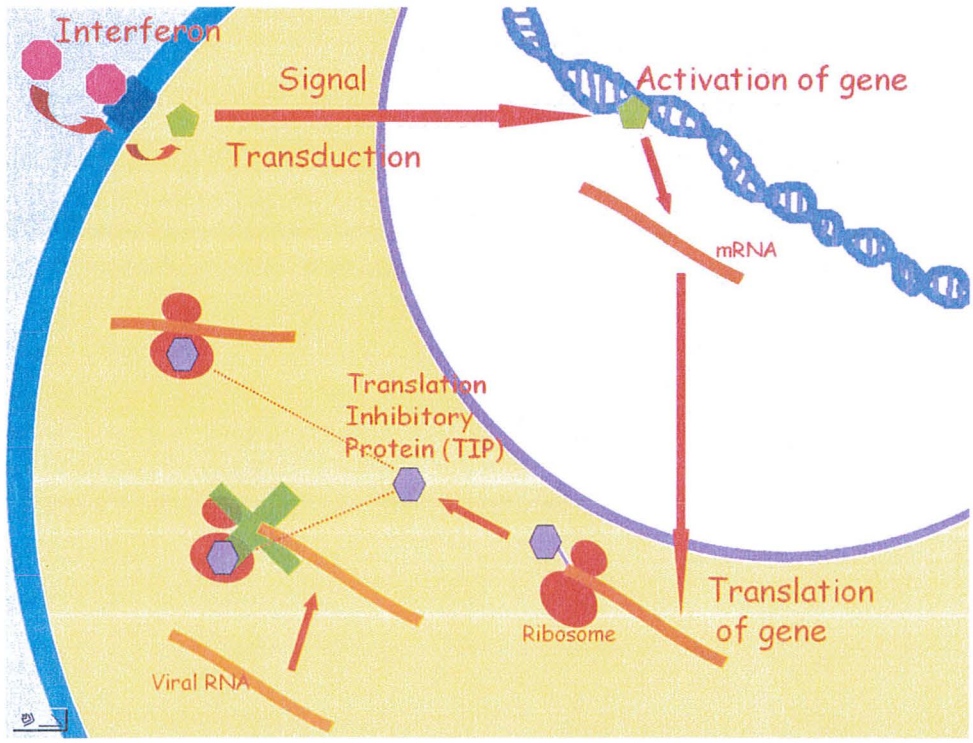



Figure 28 : Extraite de http://www.lionden.com/ap2out-lymph.htm.
Action antivirale de l'interféron dans une cellule infectée par un virus.

**Effet immunomodulateur** : L'IFN a montré *in vitro* de nombreux effets immunomodulateurs : activation des monocytes-macrophages, induction de l'expression d'antigènes à la surface cellulaire et augmentation de l'activité des lymphocytes T cytotoxiques. L'IFNα stimule préférentiellement les lymphocytes T CD4+ helpers de type 1 (TH-1) et, par conséquent, la synthèse de cytokines comme l'interleukine 2 (IL-2) et l'interféron gamma [139]. D'autre part, on sait que lors des hépatites B et C, on a une adhésion des hépatocytes entre eux médiée par des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 dont l'expression augmente lors de ces infections. Or, après une monothérapie d'IFN, il a été noté une diminution significative de l'expression des ICAM-1 sur des biopsies de foie de répondeurs au traitement par rapport à des non-répondeurs [55].

**Autres effets** : L'interféron réduit les concentrations sériques de transforming growth factor β1 (TGF-β1) [158]. Or le TGF-β1 favorise la synthèse de composants de la matrice extra-cellulaire et ainsi la fibrose. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, l'effet bénéfique de l'IFN pour ralentir l'évolution de la fibrose.

En terme d'histologie hépatique, une méta analyse d'une équipe italienne [26] montre que l'IFNPeg améliore plus efficacement l'état du foie que l'IFN standard.

B- Pharmacocinétique [139] :

Suite à une injection sous cutanée simple ou multidoses d'IFNα 3MUI, le pic maximum de concentration plasmatique (Cmax) médian se situe respectivement à 13,9 et 29,7 UI/ml et est atteint en environ 7 heures en simple dose et 5 heures en doses multiples. La clairance plasmatique totale après l'injection d'une simple dose de 3MUI est de 14,3 l/h. La demi vie de l'IFNα est d'environ 7h. Une nouvelle forme galénique de l'interféron, l'interféron pégylé, est maintenant sur le marché et tend à supplanter l'IFNα classique. La pégylation (attachement à une molécule de polyéthylène glycol : PEG) ralentit l'élimination de la molécule et augmente ainsi sa demi-vie. Elle permet une seule injection par semaine (au lieu de 3 auparavant) et permet d'avoir des taux plus stables d'interféron dans le sang [116]. Ceci visait à augmenter le confort du patient, à diminuer les réactions immunologiques et éventuellement le taux de mutation virale. Là encore, il existe 2 molécules : l'IFN α-2a de Roche : Pegasys® dont le PEG est ramifié et pèse 40 kDA, qui a une ½ vie de 77 heures et le Viraferon-Peg® de Schering-Plough IFN α-2b dont le PEG est linéaire et pèse 12 kDA et qui a une ½ vie de 59 heures [116]. Les recommandations actuelles de posologie sont de 180 µg/sem pour le Pegasys® et 1,5 µg/kg/sem pour le Viraferon-Peg®. Elles peuvent être diminuées respectivement jusqu'à 90 µg/semaine et 0,5 µg/kg/semaine.

C- Effets indésirables [139] :

Il sont importants lors de la bithérapie IFNα + RBV et amènent à diminuer les doses du traitement initial chez près d'un tiers des patients. Les effets secondaires amenant le plus fréquemment à une modification de posologie sont ceux sur la formule sanguine. En effet, on observe fréquemment une diminution des globules blancs et notamment des neutrophiles lors d'un traitement par IFN. La neutropénie est le seul effet indésirable de grade 4 (mettant en jeu le pronostic vital) qui ait une incidence > 1%. Les plaquettes peuvent également être diminuées.

Un effet secondaire moins grave mais très fréquemment décrit est le syndrome pseudo-grippal qui comprend des maux de tête, fatigue, malaises, myalgies, arthralgies, fièvre et apparaît généralement lors des premières semaines de traitement. Du paracétamol est couramment prescrit pour limiter ces symptômes. Ce syndrome n'est responsable que de 6 % des diminutions de dose en monothérapie IFN.

Vingt pour cent des patients traités par l'IFN souffrent de troubles psychiatriques. Les dépressions sévères et les idées suicidaires apparaissent souvent chez les personnes ayant déjà eu des antécédents psychiatriques. Une légère dépression, une irritabilité, de l'insomnie sont fréquemment décrites chez des personnes n'ayant pas d'antécédents. Ces effets indésirables sont à l'origine de 6,4 % des diminutions de dose.

Au total, on estime que des effets indésirables sérieux (grade 3) ou mettant en jeu le pronostic vital (grade 4) apparaissent chez 17 % des patients recevant un traitement pour la première fois et chez 10 % des patients déjà traités.

Un des espoirs mis dans l'intérféron pégylé était également une diminution des effets indésirables étant donné que les patients ne reçoivent plus qu'une injection par semaine. Or les études cliniques [100] ont montré une plus forte fréquence des signes inflammatoires au point d'injection ainsi qu'un syndrome grippal un peu plus fréquent et un peu plus marqué. Une neutropénie a également été observée plus fréquemment qu'avec l'interféron standard mais sans complication. Néanmoins, d'après ces mêmes études [100], la bithérapie IFN pégylé-ribavirine donne des taux de réponse prolongée de 56 % contre 45 % avec une bithérapie classique, et 30 % avec l'interféron pégylé en monothérapie.

D- Facteurs de non réponse au traitement :

Le traitement actuel (bithérapie IFNPeg + RBV), qui pourtant présente une nette amélioration par rapport aux précédents, donne un taux d'échec de 18-24 % chez les patients infectés par un virus de génotype 2 ou 3, et de 54-58 % avec les génotypes 1. Ces échecs peuvent être dus à des facteurs liés à l'hôte ou à un phénomène d'échappement du virus à la thérapeutique. Un certain nombre de protéines virales ont été incriminées dans ces phénomènes de résistance.

Elles inhiberaient *in vitro* les effecteurs de l'action antivirale de l'IFN. Deux régions du génome du VHC ont été montrées comme interagissant *in vitro* avec la protéine kinase R (PKR) cellulaire induite par l'interféron. Il s'agit de la région déterminant la sensibilité à l'interféron (ISDR) de la région NS5A [41] et du domaine d'homologie de phosphorylation du facteur de transcription eucaryote eIF2-α de la protéine kinase activée par l'ARN: PePHD de la région E2. Des mutations dans ces deux régions pourraient donc être à l'origine de résistance à l'interféron. Une étude espagnole de 2001 [126] trouve des mutations dans la région ISDR associées significativement à une réponse à long terme chez des patients infectés par un virus de génotype 1b, mais pas chez les patients infectés par un virus de génotype 3a. En revanche, ces mêmes auteurs ne trouvent pas de mutations dans PePHD associées à la réponse au traitement. Récemment, une équipe japonaise [149] démontre, en culture cellulaire, que la protéine NS5A entière interagit physiquement avec la 2', 5'-oligoadénylate synthétase, mais que cette interaction existe aussi avec la région 1-148 de la protéine NS5A qui ne contient ni l'ISDR ni le domaine de liaison à la PKR remettant ainsi en cause le rôle de ces 2 régions.

La région hypervariable 1 (HVR1) a également été beaucoup étudiée. Son hétérogénéité pourrait être à l'origine de l'émergence de quasi-espèces résistantes non seulement à l'action des anticorps mais également à la bithérapie IFNPeg + RBV. Or une étude récente [2] montre que les modifications des quasi-espèces de HVR1 semblent apparaître essentiellement lors de la phase précoce de traitement mais ne jouent pas de rôle dans la réponse soutenue à la bithérapie.

D'un autre côté, la diminution quantitative et/ou qualitative des lymphocytes CD4+ et CD8+ semble être un facteur déterminant de la persistance virale [114].

Il a également été remarqué [101] que les non-répondeurs avaient des taux plus élevés de Tumor Necrosis Factor (TNF-α) que les témoins, et des études récentes suggèrent une implication de cette cytokine dans un contrôle négatif de l'IFNα. Des études complémentaires semblent néanmoins encore nécessaires afin de mieux comprendre l'implication de cette molécule dans la réponse à l'IFNα.

Le virus de l'hépatite C n'étant pas cultivable de façon stable sur les lignées cellulaires testées jusqu'à maintenant, un certain nombre d'études sont en cours afin de trouver un moyen d'étude de la réponse du virus aux traitements (molécules actuelles ou à venir). Les systèmes de réplicons développés plus haut (cf. chapitre I-3) tentent de répondre à cette problématique. Deux équipes [45, 63] montrent sur un système de réplicons que l'IFNα induit une diminution de réplication des réplicons subgénomiques d'un facteur 10, et ceci indépendamment du fait que le réplicon contienne la région NS5A où se trouve situé l'ISDR, région de résistance potentielle à l'interféron décrite dans de nombreuses études.

Une équipe japonaise [36] a décrit une puce à ADN de basse densité (295 gènes) comprenant de nombreux gènes de l'inflammation des hépatocytes tels que le récepteur de l'interféron et un des facteurs inductibles par l'interféron. Cette puce a pour but d'évaluer la réponse à l'interféron à partir d'une biopsie hépatique.

## 3-La ribavirine :

Synthétisée en 1970 par les Drs Joseph T. Witowski et Roland K. Robins [90], la ribavirine (1-β-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide) est un analogue nucléosidique de la guanosine. Elle possède un large spectre antiviral. En 1986, son administration sous forme d'aérosols au cours des infections pulmonaires à virus respiratoire syncytial fut autorisée par la Food and Drug Administration (FDA) des USA. Depuis, des essais de traitement d'infections virales variées (virus de la fièvre de Lassa [102], VIH [113], VHB [173]) ont été réalisés. Pourtant, l'emploi de cette molécule est resté restreint, des effets tératogènes ayant effectivement été observés chez des rongeurs et des lapins [130]. L'efficacité connue de la ribavirine contre des virus appartenant à la famille des *Flaviviridae* incita cependant diverses équipes à l'évaluer dans le cadre du traitement de l'hépatite C chronique [130].

Comme pour l'interféron, il en existe 2 formes commerciales : le Rebetol® de Schering-Plough et le Copegus® de Roche. Elles sont actuellement utilisées dans le cadre d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en association avec l'IFN α-2b à la posologie de 800 mg pour un poids inférieur à 65 kg, 1000 mg pour un poids compris entre 65 et 85 kg et 1200 mg au-delà de 85 kg pour le Rebetol®, et en association avec l'IFN α-2a à la posologie de 1000 mg pour un poids inférieur à 75 kg et 1200 mg au-delà de 75 kg pour le Copegus®, et cela en 2 prises orales par jour.

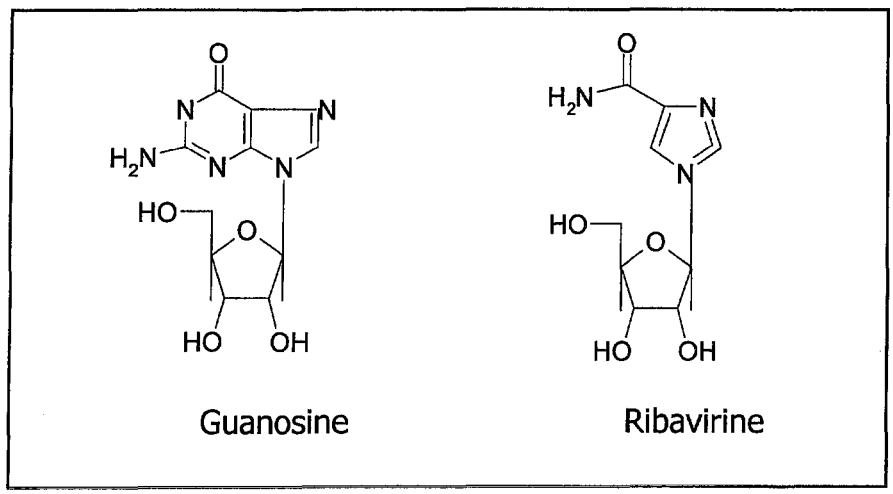



Figure 29 : Structures de la guanosine et de la ribavirine.

Utilisée en monothérapie chez des patients infectés chroniquement par le VHC [113], la ribavirine induit une réponse biochimique complète, définie comme une normalisation du taux d'ALAT, reflet de la cytolyse hépatique, dans 30 à 50 % des cas environ, et une réponse partielle (diminution d'au moins 50 % du taux d'ALAT) dans également près de 40 % des cas. Cependant, à l'arrêt du traitement, une nouvelle augmentation des transaminases survient chez la quasi-totalité des patients traités pour atteindre en 2 à 3 mois des valeurs semblables à celles mesurées avant l'initiation du traitement.

A-Pharmacocinétique :

| | RBV[(1)] (600 mg) dose simple | RBV[(2)] (600 mg) dose simple |
|---|---|---|
| Tmax (h) | 1,7 | 1-2 |
| Cmax (mg/l) | 0,78 | |
| F (%) | 64 | 45-65 |
| T ½ (h) | 43,6 | 140-160 |
| Vd (l) | 2825 | 4500 |
| CL(l/h) | 38,2 | 22-29 |

Tableau 10 : Extrait des données de l'étude REBETRON de Schering Plough [139][(1)] et dossier scientifique de Copegus[(2)]. Caractéristiques pharmacocinétiques de la ribavirine. Cmax= concentration plasmatique maximale, CL= clairance plasmatique totale, F = biodisponibilité, T ½ : demi-vie d'élimination, Tmax : temps mis pour atteindre la concentration plasmatique maximale, Vd : volume de distribution.

D'après les données des fabricants Schering Plough et Roche, la ribavirine est rapidement et massivement absorbée après une administration orale. La concentration moyenne plasmatique de ribavirine est de 2,2 mg/l ; elle est obtenue, avec une dose de 600 mg par jour, en environ 4 semaines. La faible biodisponibilité de la ribavirine est vraisemblablement le reflet d'un fort effet de premier passage hépatique. La ribavirine a un volume de distribution très important (2825-4500 l), confirmant la forte affinité pour les tissus de cette drogue. On ne note pas de liaison particulière de la ribavirine avec les protéines plasmatiques. La co-administration de ribavirine avec des anti-acides contenant du magnésium ou de l'aluminium diminue l'aire sous la courbe et le Cmax. L'administration orale d'une dose unique de 400 mg de ribavirine marquée au $^{13}$Carbone chez des volontaires sains montre des résultats proches [125].

Le métabolisme de la ribavirine se réalise via 2 voies : une phosphorylation réversible dans les cellules nucléées ou une déribosylation et une hydrolyse de la fonction amide qui donne un

métabolite triazole-carboxylique. A priori, il n'y a pas d'implication des cytochromes P450 dans les voies de biotransformation de la ribavirine [60]. Les métabolites de la ribavirine sont éliminés par voie rénale. Une étude suédoise [22] mesurant en parallèle les concentrations sériques de patients ayant une fonction rénale normale et celles de patients insuffisants rénaux, montre clairement que la clairance de la ribavirine est liée de façon linéaire à la fonction rénale. Elle suggère donc d'adapter la posologie chez les patients insuffisants rénaux. La ribavirine n'est pas éliminée par l'hémodialyse. Chez les patients dont la fonction hépatique est diminuée, on ne remarque pas de changement notable dans la pharmacocinétique de la molécule [61].

B-Interactions médicamenteuses,effets indésirables et contre-indications :

On note une interaction entre la ribavirine et les inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase (INRT) utilisés contre le VIH. Des cas d'associations s'étant révélées létales ont été rapportés : par exemple un cas d'acidose lactique et de pancréatite fatale chez un patient prenant de la ribavirine et de la didanosine (DDI) [24]. Une étude récente [106] montre que sur 35 patients recevant de la ribavirine et du DDI, 57 % développent des effets indésirables dans une moyenne de 87 jours, les plus fréquents étant l'hyperamylasémie et l'hyperlactatémie. Cette étude suggère qu'une telle association médicamenteuse doit être évitée autant que possible. Cette toxicité peut être due à un mécanisme d'action similaire des deux molécules qui augmenterait ainsi la toxicité mitochondriale connue du DDI. La ribavirine pourrait également antagoniser l'activation par phosphorylation des INRT : il a en effet été démontré [67] que la ribavirine diminue la phosphorylation de la stavudine (d4T) et de la zidovudine (AZT).

L'effet indésirable le plus fréquent est l'anémie hémolytique (7 % des patients), rarement responsable de l'arrêt du traitement (1 %), mais parfois d'une réduction de posologie (14 %) [139]. Son mécanisme n'est pas encore parfaitement établi. Néanmoins, on sait que la ribavirine est convertie en son dérivé triphosphate dans les érythrocytes, mais que la conversion retour par déphosphorylation n'est possible que dans les cellules nucléées. Les érythrocytes n'ont par conséquent pas ces enzymes de déphosphorylation et accumulent donc la forme triphosphorylée, ce qui réduit leur demi-vie, peut être à cause de l'analogie de structure entre la RTP et l'ATP [90]. Une étude récente [147] précise l'amplitude et la fréquence de ces changements du taux d'hémoglobine au cours du traitement : une diminution du taux d'hémoglobine de plus de 30 g/L est observée chez plus de 50 % de leurs patients. Cette baisse du taux d'hémoglobine, même si elle n'a pas forcément de répercussion directe grave, peut être à l'origine d'une certaine diminution de la qualité de vie (fatigue, dyspnées, etc..), ce qui peut inciter le clinicien à diminuer les posologies voire arrêter le traitement. Diverses solutions sont proposées pour essayer de pallier à cet effet indésirable du traitement. Notamment, il a été proposé d'adapter les doses de ribavirine en

fonction de la clairance à la créatinine. Un dosage sérique simple du taux de ribavirine serait aussi vraisemblablement un atout important pour mieux gérer cette diminution d'hémoglobine. Il a également été proposé un protocole avec de l'érythropoïetine recombinante associée aux traitements classiques lorsque le taux d'hémoglobine passe en dessous de 120 g/l.

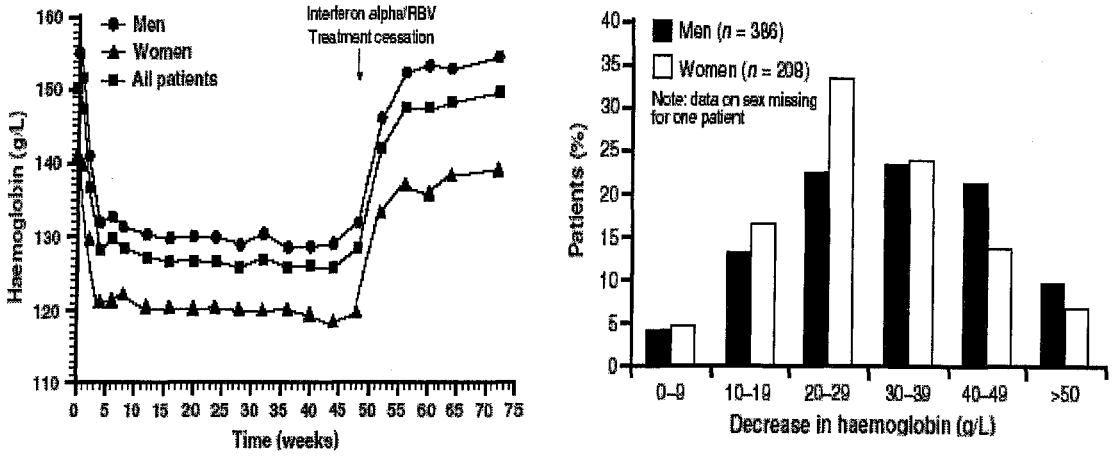



Figure 30 : Extraite de [147]. A gauche : Evolution des concentrations d'hémoglobine chez des patients traités par la bithérapie IFN-RBV. A droite : Diminution de l'hémoglobine en 4 semaines.

La ribavirine étant également potentiellement tératogène, elle n'est utilisée qu'avec une contraception efficace des 2 partenaires, y compris jusqu'à 4 mois après l'arrêt du traitement pour une femme et 7 mois pour un homme. Néanmoins un certain nombre de grossesses normales ont été rapportées sous traitement ou dans le délai suivant son arrêt sans problème particulier [38, 65, 105].

C-Mécanisme d'action :

La ribavirine est transportée activement dans les cellules par des transporteurs membranaires comme le transporteur de nucléoside sodium-dépendant [112] et les transporteurs sensibles à la nitrobenzylthioinosine [76]. La plupart des cellules de l'organisme possèdant de tels transporteurs, cela pourrait expliquer l'important volume de distribution observé. Une fois dans la cellule, la ribavirine est métabolisée en formes actives mono-, di- et tri-phosphate.

➢Action immunomodulatrice de la ribavirine : Certaines données suggèrent une action de la ribavirine sur la balance des lymphocytes T [145]. Elle favoriserait le développement d'une réponse TH1 aux dépens de la réponse TH2. En effet, le profil cytokinique de lymphocytes T activés sous ribavirine révèle une augmentation des cytokines de type I (IL-2, IFN gamma, TNF alpha) et une diminution des types II (IL-4, IL-5 et IL-10). Néanmoins, certaines équipes [161] semblent arriver à des résultats contraires ne mettant pas en évidence d'effet immunomodulateur de la ribavirine, en tous cas en l'absence d'un stimulus très fort. Ce manque d'action sur le

système immunitaire de la ribavirine pourrait expliquer l'échec d'efficacité de la lévovirine (LVV) qui était décrite comme possédant les mêmes propriétés immunomodulatrices que la ribavirine (cf. chapitre VI-4).

➢Inhibition de l'inosine mono phosphate deshydrogènase (IMPDH) par la ribavirine monophosphate (RMP). La RMP, par son analogie avec l'inosine 5' monophosphate, inhibe l'IMPDH et, de fait, diminue le pool cellulaire de GTP, ce qui pourrait permettre d'augmenter l'incorporation de la ribavirine en tant qu'analogue du GTP [146, 165]. D'autres inhibiteurs connus de l'IMPDH comme l'acide mycophénolique et le VX-497 ont montré, notamment sur des systèmes de réplicons, une inhibition de la réplication du VHC rétablie par l'ajout de guanosine, ce qui n'était pas le cas pour la ribavirine. Il semblerait donc que l'inhibition de l'IMPDH ne puisse pas, à elle seule, expliquer l'action antivirale de la ribavirine.

➢Inhibition directe de la réplication du VHC par action sur sa polymérase. De nombreux analogues triphosphates peuvent s'incorporer dans les polymérases virales et provoquer un arrêt de la réplication. Concernant la ribavirine, il a été démontré un faible effet inhibiteur du RTP sur les polymérases de virus comme le virus de la stomatite vésiculaire, le virus de la grippe, des réovirus et même le VIH [90]. Récemment, une équipe lyonnaise [42] a montré une faible activité inhibitrice du RTP contre la polymérase du virus de la diarrhée virale bovine (un virus proche du VHC). Un effet inhibiteur faible a également été mis en évidence avec le système des réplicons [90] et plus spécifiquement au niveau de la polymérase, car les tests sur d'autres cibles (Protéase NS3, RNA hélicase, NTPase et IRES) se sont révélés négatifs. Néanmoins, plusieurs équipes ont maintenant montré que l'incorporation d'une RMP n'arrête pas la synthèse du brin d'ARN comme le montre la capacité de l'ARN polymérase à poursuivre la synthèse de plusieurs nucléotides après la RMP incorporée. Si l'incorporation de RMP ne stoppe pas la synthèse du brin d'ARN, il semblerait en revanche que l'accumulation des RMP inclus dans le brin d'ARN à faible concentration de GTP induise la formation de complexes d'élongation tronqués notamment dans les régions riches en résidus cytidine. Ceci a pour conséquence de réduire la synthèse d'ARN viral [160].

➢La ribavirine triphosphate (RTP) est mutagène. Il a été montré *in vitro* sur le modèle de la RNA polymérase du poliovirus que l'utilisation de RTP induit un grand nombre de mutations de l'ARN. La ribavirine peut s'apparier de façon équivalente avec la cytidine ou avec l'uridine [34], entraînant ainsi des mutations de A en G ou de G en A.

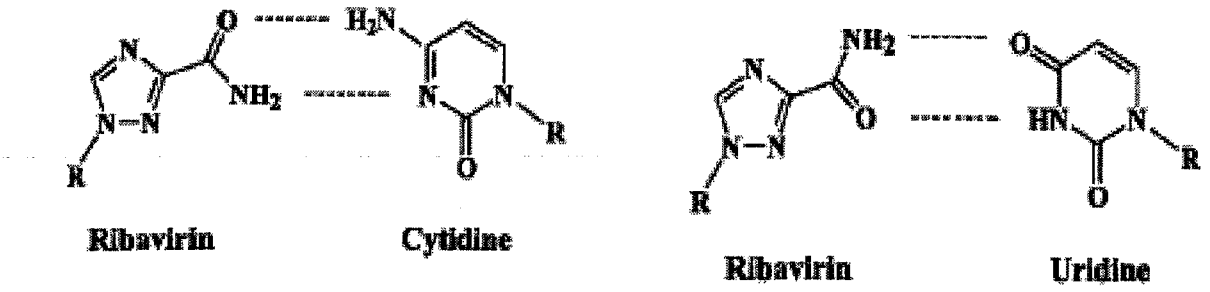



Figure 31. Extraite de [99]. La pseudo base (1,2,4-triazole 3-carboxamide) de la ribavirine s'apparie de façon équivalente avec la cytosine et l'uracile. *R* représente un ribofuranosyl mono- ou triphosphate.

L'incorporation de ribavirine au cours des différents cycles de réplication de l'ARN induit une augmentation significative du nombre de génomes défectifs qui peut mener à « l'erreur catastrophe » ayant un effet létal sur le poliovirus [34].

Des tests ont été réalisés avec une polymérase de VHC (NS5B recombinante délétée en C-terminale) [99]. Ils ont montré que la ribavirine était bien un substrat possible pour cette enzyme qui lui permettait de s'incorporer à l'ARN viral (1 incorporation pour 7000 pb selon les auteurs [34], ce qui nécessite de nombreux cycles avant d'arriver à un nombre suffisant de mutations pour diminuer la réplication virale). Récemment, une équipe canadienne [16] a publié une étude basée sur la spectroscopie de fluorescence de l'ARN polymérase du VHC permettant de mesurer ses interactions avec la ribavirine. Ils montrent que la RTP et la RMP se lient au même site actif que les nucléotides mais avec une affinité moindre. En se basant sur le dichroïsme circulaire et sur des études de dénaturation, ils démontrent que l'ARN polymérase subit de subtils changements conformationnels lors de la liaison avec la RTP, bien que l'interaction ne modifie pas la stabilité de la protéine. Ceci confirme l'hypothèse d'une liaison directe de la forme triphosphate de la ribavirine dans le site actif de l'ARN polymérase.

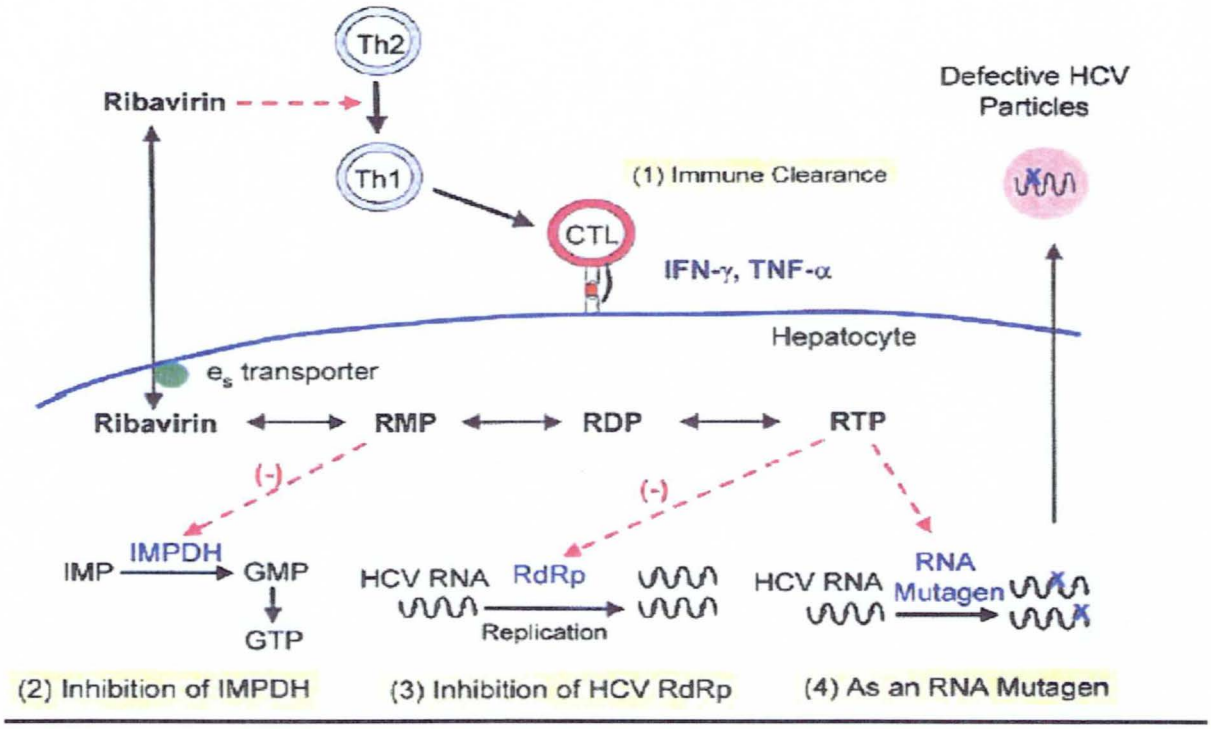



Figure 32 : Extraite de [90]: Différents mécanismes d'action possibles de la ribavirine. (1) Stimulation du système immunitaire : la ribavirine induit un biais de la réponse de TH2 vers TH1. (2) La RMP peut inhiber l'enzyme IMPDH de l'hôte , et ainsi réduire le taux de GMP et le pool de GTP. (3) Il a été démontré que le RTP présentait une faible activité contre la NS5B RdRp du VHC. (4) La ribavirine peut également agir comme mutagène sur le génome ARN du VHC et induire ainsi la synthèse de particules de virus défectives.

## 3-La combinaison interféron-ribavirine:

Le taux de réponse soutenue est maximum avec la bithérapie IFNPeg+ RBV par rapport aux traitements antérieurs. Néanmoins, ce taux de réponse dépend essentiellement du génotype viral par lequel le patient est infecté (cf. tableau 11).

Table 1
Sustained Virologic Response to PEG-IFN alfa-2a and RBV According to Hepatitis C Virus Genotype

| | PEG-IFN alfa-2a and RBV, % | IFN alfa-2b and RBV, % | PEG-IFN alfa-2a and Placebo, % |
|---|---|---|---|
| All genotypes | 56 | 44 | 29 |
| Genotype 1 | 46 | 36 | 21 |
| Genotype 2 or 3 | 76 | 61 | 45 |
| Genotype 4 | 77 | 36 | 44 |

PEG-IFN, peginterferon; RBV, ribavirin; IFN, interferon.

Tableau 11 : Extrait de [51]. Pourcentages de réponse virologique soutenue à la bithérapie IFNPeg + RBV en fonction du génotype du VHC.

L'étude comparée des pharmacocinétiques respectives de l'interféron et de la ribavirine ne semble pas indiquer d'interaction de cet ordre [84]. En effet, on ne note pas de différence entre les paramètres pharmacocinétiques de chacune de ces molécules utilisée en monothérapie et lors de leur utilisation simultanée en bithérapie [157]. Les études dynamiques de diminution de la charge virale sous traitement montrent une courbe biphasique. La première phase de déclin viral reflète l'élimination des particules virales du sérum, elle est rapide (approximativement 1 log/48 heures). La seconde phase de déclin viral est plus lente. La première phase se déroule dans les premières semaines de traitement alors que la ribavirine n'a pas encore atteint sa concentration à l'état d'équilibre (4 semaines). De plus, il ne semble pas que la ribavirine ait un effet antiviral direct, puisqu'elle ne permet pas d'éliminer les virus en monothérapie. Néanmoins, elle pourrait donc jouer un rôle important lors de cette seconde phase de déclin viral pour finir de vider les réservoirs cellulaires de virus. Pour autant, ce qui semble déterminer l'issue du traitement, du moins chez les génotypes 1 semble se situer dans ces 4 premières semaines de traitement : il faut que l'IFN réduise la charge virale de façon suffisamment conséquente pour que le patient puisse avoir une chance d'éliminer complètement le virus par la suite. Les protocoles actuels préconisent donc, pour les génotypes 1, une mesure de charge virale à 12 semaines. Ils considèrent que si la charge virale n'a pas diminué de plus de 2 log, on peut arrêter le traitement car le patient sera non répondeur (valeur prédictive négative 97-98 %). Ferenci [46] suggère même que la diminution de la charge virale 24 h après la première injection reflète la réponse finale au traitement avec une spécificité de 100 % et une sensibilité de 83 %.

Le schéma de traitement classique actuellement reconnu est donc celui présenté dans la figure 33.

Néanmoins, certaines équipes suggèrent que le traitement de 48 semaines n'est pas suffisant pour les génotypes 1. En effet, Drusano et collaborateurs [40] développent un modèle mathématique qui montre que les patients ayant un virus de génotype 1 ont besoin de 36 semaines pendant lesquelles le virus reste indétectable dans le sérum pour atteindre un taux de réponse soutenue de 90 %. Le temps moyen mis pour éliminer un virus de génotype 1 du sang est de 30,4 semaines, ce qui indiquerait donc, selon eux, que la durée de traitement de 48 semaines serait insuffisante.

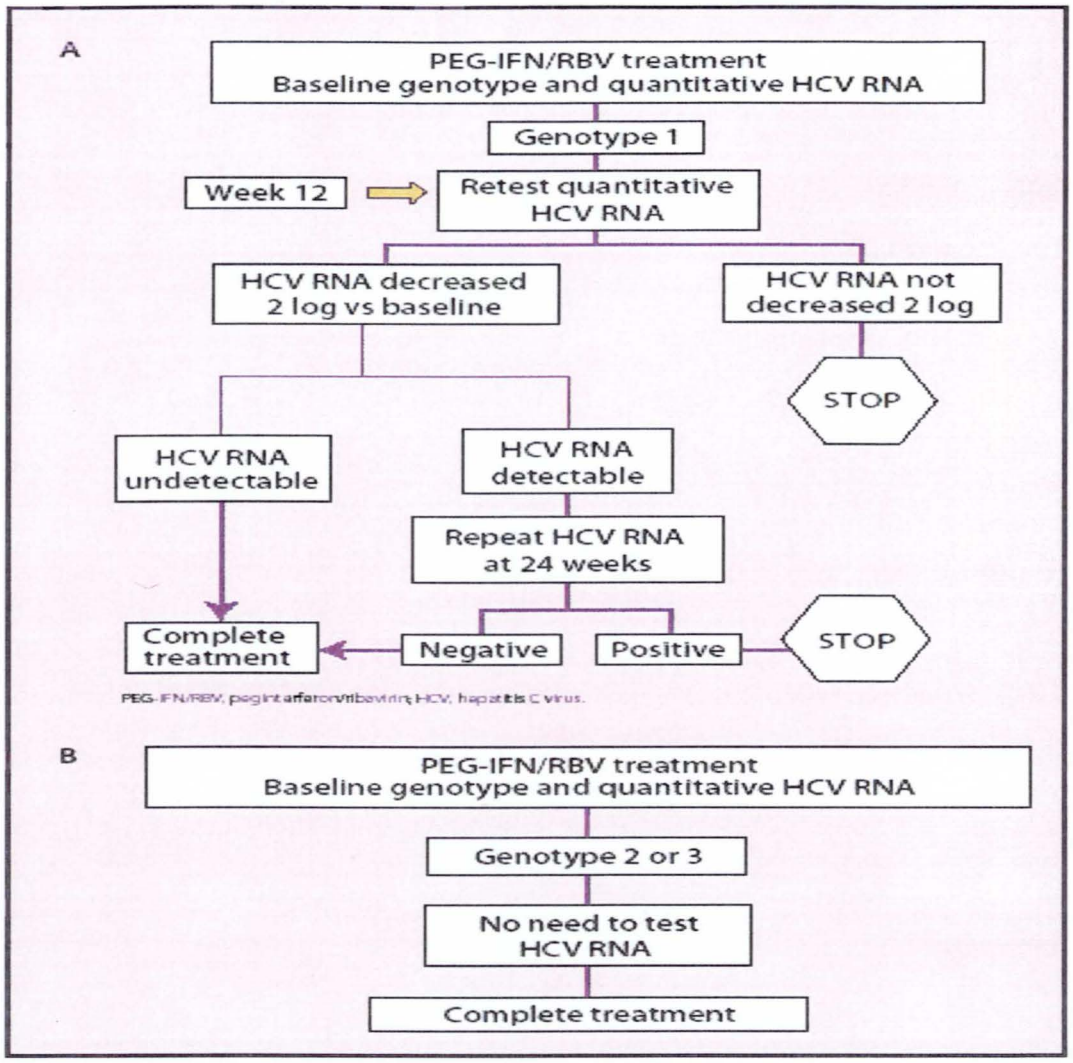



Figure 33 : Extraite de [51] : **(A)** Schéma d'application de la réponse virologique précoce chez des patients avec un genotype 1. **(B)** Schéma d'application de la réponse virologique précoce chez des patients avec un génotype 2 ou 3

## 4-Nouvelles perspectives thérapeutiques :

A- Amélioration des traitements existants :

➢L'interféron : Les différents interférons existant dans la nature semblent avoir des propriétés antivirales, immunomodulatrices et antifibrosantes différentes. C'est dans cette logique qu'a été développé un interféron consensus (Infergen®), interferon de synthèse regroupant un certain nombre de séquences consensus retrouvées chez tous les interférons. Il possède une homologie de 89 % avec l'interféron α, 30 % avec le β et 60 % avec l'ω. Son affinité pour les récepteurs cellulaires est supérieure et son activité biologique est multipliée par 5 à 10. Concrètement, il a été montré que des patients infectés par un virus de génotype 1 et traités par Infergen® avaient une clairance de l'ARN viral plus rapide qu'avec de l'interféron α-2b, et que des malades ne répondant pas à une première cure d'interféron α peuvent répondre à cet interféron consensus

[155]. De même que pour les essais ayant abouti à l'interféron pégylé, des équipes cherchent à modifier les propriétés de l'interféron. Une protéine humaine recombinante, associant de l'albumine à l'IFNα, appelée Albuféron (Human Genome sciences Inc., Rockville, MD, USA) est en phase I d'évaluation clinique et a montré une bonne tolérance [111].

➢La ribavirine : Actuellement 2 analogues de la ribavirine sont développés : la lévovirine et la viramidine. La lévovirine est l'énantiomère lévogyre de la ribavirine, qui, de par sa stéréostructure différente, ne peut se transformer en dérivés mono, di et triphosphate. Elle n'a donc pas d'activité antivirale directe ni de toxicité associée (anémies hémolytiques notamment) mais est présentée comme possédant les mêmes propriétés immunomodulatrices [90] que la ribavirine. Néanmoins l'étude Roche comparant l'efficacité d'une bithérapie classique PegIFN-RBV par rapport à une bithérapie PegIFN-LVV vient d'être interrompue prématurément. En effet, les données à la 12$^{ème}$ semaine montraient pour le bras de patients traités par lévovirine des résultats non significativement différents d'une monothérapie PegIFN.

La deuxième molécule est la Viramidine qui est une prodrogue de la ribavirine et ne s'accumule pas dans les érythrocytes (les concentrations retrouvées sont 2 fois moindres) mais se concentre spécifiquement au niveau du foie où elle est convertie en ribavirine par l'adénosine déaminase (enzyme abondante au niveau des hépatocytes) [50]. Une étude de phase III destinée à comparer son rapport efficacité/toxicité par rapport à la ribavirine vient d'ailleurs de débuter.

➢L'amantadine : Cet agent antiviral de spectre large utilisé dans le traitement de la grippe A, mais également dans le traitement du Parkinson pour ses propriétés dopaminergiques, semble montrer une légère activité en association à l'interféron et à la ribavirine dans une tri-thérapie contre le VHC, bien que les essais cliniques sur ce sujet donnent des résultats assez contradictoires [21].

B- Nouveaux traitements :

➢Immunomodulateurs et immunothérapie:

On peut chercher à renforcer la réponse humorale neutralisante en injectant des immunoglobulines anti-VHC : des immunoglobulines de haut titre provenant de plasma humains sont développés par la société NABI aux Etats Unis. Une autre approche utilisant des anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre la protéine d'enveloppe E2 du VHC est en cours de développement par une société israélienne. Pour l'instant, aucune étude clinique n'a confirmé la validité de ces stratégies, et le rôle de la réponse humorale dans l'éradication du virus reste encore très contesté. Le but premier de ces Ig serait d'éviter la ré-infection des greffons après une transplantation hépatique, comme c'est le cas actuellement pour le VHB.

La réponse cellulaire est également, et même davantage, une cible de choix puisqu'elle semble être déterminante dans la clairance du virus notamment après une hépatite aiguë. De

nombreuses stratégies vaccinales sont en cours d'étude et sont très séduisantes de par leur mécanisme et les technologies de pointe qu'elles mettent en œuvre. Cependant, elles semblent encore du domaine de la recherche fondamentale. De plus, elles posent le problème de savoir si le fait de favoriser une réponse cytotoxique forte chez les malades ne va pas exacerber l'atteinte hépatique via la lyse des cellules infectées, plutôt que de la diminuer et de la contrôler. Pour l'instant, seuls quelques vaccins potentiels en sont au stade des études cliniques. Le vaccin de la société Innogenetics utilisant la protéine E1 passe maintenant en phase II. Les essais de phase I chez des volontaires sains ont montré une bonne tolérance et une prolifération des cellules spécifiques d'E1, ainsi que des anticorps anti-E1 montrant que le vaccin est immunogène. Les résultats préliminaires de la phase II chez les malades ayant une hépatite chronique C montrent un effet favorable du vaccin sur l'histologie hépatique et sur la valeur des ALAT mais pas sur la virémie.

Enfin, comme c'est un mécanisme supposé des deux molécules actuellement utilisées, on peut chercher de nouvelles molécules immunomodulatrices. L'IL-2 associée à l'interféron est en cours d'étude ; l'IL12, quant à elle, a donné jusqu'à maintenant des résultats plutôt décevants. La thymosine α1 est un peptide synthétique de 28 acides aminés qui a montré des propriétés immunomodulatrices. Des données sur de petites études suggèrent que l'association IFN-thymosine α1 est sûre et semble plus efficace que la monothérapie IFNα. L'efficacité de cette combinaison chez des patients cirrhotiques ou non, n'ayant pas répondu à une première cure d'IFN seul ou avec de la RBV, est actuellement en cours d'évaluation [111].

Une équipe allemande [161] propose également de courts oligodéoxynucleotides contenant des dinucléotides CpG non méthylés qui miment l'activité d'ADN bactériens chez les vertébrés, et sont reconnus par les Toll-like receptors 9 (TLR9). Ces composés, via leur liaison aux TLR9, induisent une forte réponse TH1 et pourraient donc éventuellement être utilisés dans le traitement de l'hépatite C pour « booster » la réponse TH1 aux dépens de la TH2.

➢Approches antivirales :

Sur le modèle du VIH, de nombreux espoirs ont été mis dans les inhibiteurs de protéase. La structure de la protéase NS3 du VHC est connue maintenant depuis un certain temps. Récemment, la bonne tolérance et l'efficacité virologique (baisse de plus de 2 à 3 log après 2 jours de traitement) d'un petit peptide inhibant la NS3 est porteur d'espoir : il s'agit du BILN 2061 [94]. L'étude de phase I a montré une bonne tolérance de la molécule jusqu'à des doses supérieures à 2000 mg et l'étude de phase II est actuellement en cours. Néanmoins, de façon similaire aux inhibiteurs de protéases existant pour le VIH, l'apparition de résistances est à craindre. Une équipe

de Abbott [97] a mis en évidence, sur un système de réplicons de génotype Ib, l'apparition, au contact du BILN 2061, de 3 mutations situées à proximité du site d'inhibition visé.

Très à la mode, les ribozymes qui sont de petites molécules d'ARN ayant une capacité de catalyse spécifique de séquences d'ARN cible, ont été testés *in vitro* avec succès sur l'ARN du VHC. Hepatzyme est un ribozyme résistant aux nucléases qui cible l'ARN du VHC. Cette nouvelle molécule diminue de plus de 0,5 log l'ARN VHC chez 3 des 33 patients inclus avec une posologie de 10 $mg/m^2$ sur 8 semaines. Cinq patients ont été obligés d'arrêter pour effets indésirables. Une étude associant l'hepatzyme à l'interféron est projetée, mais on attend les résultats d'une étude de toxicologie réalisée sur des singe,s au cours de laquelle un animal a développé une perte de vision [50].

Une autre stratégie est celle des « anti-sens » qui vise à produire des molécules d'ADN ou d'ARN complémentaires de séquences virales essentielles des étapes de réplication. Dans le cas du VHC, l'IRES est une des séquences les plus ciblées. ISIS 14803 est un oligonucléotide de 20 bases qui se lie à une région hautement conservée d'initiation de la traduction de l'ARN du VHC et inhibe ainsi l'expression des protéines virales. Dans les études de phase I, la molécule a été administrée par voie intraveineuse (IV) et sous-cutanée (SC) pendant 4 semaines chez des patients ayant une hépatite C chronique. Trente pour cent d'entre eux ont eu une diminution de leur charge virale de 1 à 2 log. Des poussées d'augmentation des transaminases ont été observées chez certains patients, ainsi que des fièvres résultant de la libération de cytokines pro-inflammatoires. Des études de phase II, dans lesquelles la molécule est administrée à la posologie de 6 mg/kg en IV, sont en cours [50].

Dans un futur plus proche, un grand problème reste de savoir que proposer aux patients qui n'ont pas répondu aux différentes thérapeutiques, afin de ralentir le plus possible l'évolution de leur hépatopathie, et ainsi l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire. On peut poursuivre l'IFNα en monothérapie dans cette indication car il semble avoir des propriétés anti-fibrosantes. Les effets de l'IFN-Peg dans cette indication sont en cours d'évaluation. La ribavirine en monothérapie a également apporté une amélioration biochimique et histologique [111]. Un certain nombre d'autres molécules sont également utilisées en pratique dans cette indication ; on peut citer le tocophérol (vitamine E) pour ses propriétés anti-oxydantes, le Torental® (Pentoxifylline) qui est un vasodilatateur périphérique, et la Sylimarine extraite d'une plante, le « chardon-marie », traditionnellement connue comme étant un protecteur hépatique. Cependant, leurs activités antifibrosantes respectives restent à évaluer.

# Objectifs de l'étude

L'utilisation de la ribavirine en bithérapie avec de l'IFN standard dans le traitement des hépatites C chroniques a apporté un net gain de réponse virologique soutenue (40% de RVS) par rapport à l'IFN standard en monothérapie (15% de RVS) [139]. Néanmoins, son mode d'action et ses caractéristiques pharmacologiques sont encore mal connus et pourraient peut être expliquer certains cas de mauvaise réponse au traitement.

## I-Etude pharmacologique :

L'objectif de ce travail a été de mettre au point une technique analytique de dosage de la ribavirine facilement réalisable sur sérum. En effet, la biodisponibilité de la ribavirine est faible et semble variable [125]. Il était donc intéressant de mesurer, chez les patients traités, les taux sériques de ribavirine afin de vérifier qu'ils étaient suffisants pour permettre l'efficacité de la molécule. Dans le cadre d'une étude bioclinique rétrospective incluant des patients répondeurs et des non-répondeurs à la bithérapie IFN-ribavirine, nous nous sommes proposé de comparer la variabilité des taux sériques de ribavirine dans chaque groupe de patients après 12 semaines (S12) et 24 semaines (S24) de traitement, et d'étudier une éventuelle relation statistique entre les taux sériques de ribavirine et réponse au traitement.

## II-Etude virologique :

Parallèlement à l'étude pharmacologique, une étude virologique a été réalisée afin de vérifier si une non-réponse au traitement pouvait être expliquée, au moins en partie, par une résistance du virus à la ribavirine. En effet, la ribavirine étant un analogue nucléosidique incorporé au génome viral par la polymérase virale, nous avons émis l'hypothèse que, pour devenir résistant à la ribavirine, un virus devait présenter une mutation au niveau de sa polymérase. Nous avons donc séquencé la région centrale (correspondant au site actif) de la polymérase du VHC, tout d'abord chez des patients non encore traités (S0) dont nous connaissions le statut répondeur/non répondeur (étude *a posteriori*), afin de rechercher une éventuelle mutation initiale du gène de la polymérase. Dans un deuxième temps, un travail identique a été réalisé chez des patients non répondeurs à une bithérapie IFN-Ribavirine à S12 et S24 du traitement. Le but était de mettre en évidence une éventuelle sélection de souches de VHC portant une mutation au niveau de la polymérase qui ne permettrait plus l'incorporation de la ribavirine. Nous avons vérifié, au préalable, que ces patients avaient des concentrations plasmatiques efficaces de ribavirine grâce au dosage HPLC-UV de la ribavirine.

# Matériel & Méthodes

# I-Etude pharmacologique:

## 1-Matériel et réactifs:

Tous les produits chimiques utilisés sont de grade HPLC et obtenus chez Prolabo (Paris, France). La Ribavirine (1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4 triazole-3-carboxamide) est fournie gracieusement par Schering-Plough (Kenilworth, NJ, USA) sous la forme d'une poudre blanche cristallisée. Le 3 methylcytidine méthosulfate utilisé comme standard interne provient de chez Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Les colonnes d'acide phénylboronique Bond Elut PBA [100mg] utilisées pour l'extraction en phase solide viennent de chez Varian (Harbor City, Cal, USA).

Des solutions mères de stockage à 10 mg/ml de la ribavirine et de 3 méthylcytidine méthosulfate sont préparées dans de l'eau distillée, aliquotées et stockées à -20°C. Des solutions filles de ribavirine à 100 µg/ml et 10 µg/ml et de 3 méthylcytidine méthosulfate à 100 µg/ml sont préparées chaque semaine par dilution des solutions mères dans du méthanol et sont également conservées à -20°C.

## 2-La Chromatographie liquide haute pression (CLHP) :

A-Principe:

Les composés à séparer (solutés) sont introduits dans une phase mobile liquide qui va être poussée à haute pression grâce à une pompe sur la phase stationnaire contenue dans la colonne. Les solutés seront ensuite séparés en fonction de leur affinité pour la phase mobile ou pour la phase stationnaire.

B-Appareillage et conditions chromatographiques:

Le système de CLHP utilisé est constitué d'une pompe Waters 510 (Waters Associates, Milford, Mass., USA), d'une boucle d'injection Rhéodyne 7125 d'un volume d'injection de 20 µl, d'une colonne en phase inverse: silice greffée de chaînes en C18 (Novapack [3.9sur 300mm], Waters Associates, Milford, Mass., USA), d'un détecteur UV L4000 Merck (Darmstadt, Germany) et d'un intégrateur Shimadzu, modèle C-R3A.

Après détection par barrette de diode du maximum d'absorption dans l'UV de la ribavirine, la longueur d'onde du détecteur est fixée à 207 nm, et la sensibilité est de 0.005 unités d'absorbance.

Les conditions chromatographiques sont adaptées de la méthode de Homma [68]. La phase mobile est du phosphate d'ammonium 10 mM dont le pH est ajusté à 2.5 avec de l'acide orthophosphorique. Elle est utilisée à un débit de 0.7 ml/min.

Entre les analyses, la colonne de CLHP est rincée et stockée dans une solution d'acétonitrile:eau (50:50).

## 3-Extraction en phase solide (SPE):

A-Principe:

Les cartouches utilisées contiennent de l'acide phénylboronique. Elles permettent de fixer spécifiquement les nucléotides, nucléosides, les carbohydrates et les catécholamines par leur fonction diol vicinal. Le mécanisme de fixation est ici covalent. Lorsque le pH est bas, l'atome de Bore du groupe acide boronique est lié à 3 atomes différents. Lorsque le pH passe à 8.5, le groupe acide boronique accepte un ion hydroxyle qui s'attache directement à l'atome de bore. La géométrie de ce groupe fonctionnel est alors optimale pour réaliser des liaisons covalentes sur les 2 atomes d'oxygène rattachés au bore. Cette liaison covalente n'est possible qu'avec des diols, des di-amines ou des amino-alcools surtout s'ils sont en *cis*. Les espèces retenues ne seront éluées que par un pH très acide. En effet, les protons éjecteront l'hydroxyle du groupe acide boronique et casseront ainsi les liaisons covalentes établies.

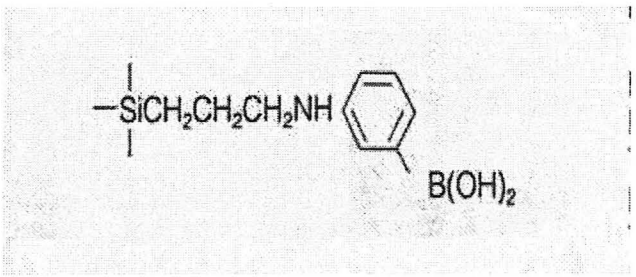



Figure 34 : Schéma du groupement fonctionnel greffé sur la silice des cartouches d'extraction en phase solide

B-Extraction en phase solide:

Une gamme de référence contenant 0.1, 0.5, 1, 3, et 5 µg/ml de ribavirine est préparée par dilution des solutions filles dans du sérum reconstitué Biotrol (Biotrol diagnostic, Chennevières les Louvres, France). Elle servira à établir la droite d'étalonnage et est préparée pour chaque série d'extraction.

Les échantillons (500 µl de sérum de patient + 500 µl de Biotrol) ainsi que les points de gamme seront dilués au 1/4 dans l'acétate d'ammonium 250 mM (pH ajusté à 8.5 avec de l'ammoniaque). Ces solutions sont ensuite passées sur les cartouches d'acide phénylboronique, qui ont été préalablement traitées par 1 ml d'acide formique 3 % suivis de 5 ml d'acétate d'ammonium 250 mM (pH 8.5). Les cartouches sont installées sur le système de vide Vac Elut Vacuum Manifold. Une fois que les échantillons sont passés, les colonnes sont rincées par 5 fois 1 ml d'acétate d'ammonium 250 mM (pH 8.5). La ribavirine et le standard interne sont ensuite élués avec 1 ml d'acide formique 3 % dans des tubes en verre. Les éluats sont séchés sous azote, puis repris par 200 µl de phase mobile et injectés dans la colonne de CLHP.

## 4-Validation de la méthode (normes FDA [31]):

A-Items :

➢Linéarité: 5 gammes composées chacune des points: 0, 0.2, 1, 3 et 5 µg/ml sont réalisées.

➢Répétabilité: 3 points de contrôle: un faible à 0.2 µg/mL, un moyen à 1 µg/ml et un fort à 3 µg/ml repris dans le Biotrol sont analysés 5 fois chacun au cours d'une même journée.

➢Reproductibilité: les 3 mêmes points sont analysés une fois par jour, 6 jours de suite.

➢Stabilité des concentrations de ribavirine :

-Dans un premier temps, la stabilité de la ribavirine dans le plasma est testée en préparant des tubes de 6 ml de plasma contenant des concentrations données de ribavirine. Juste après leur préparation, 1 ml est prélevé et analysé : ce sera la valeur de référence, puis les tubes sont conservés à 4°C et chaque jour pendant 4 jours 1 ml est prélevé et analysé.

-Dans un deuxième temps, la stabilité de la ribavirine dans les résidus secs obtenus après extraction en phase solide est testée en préparant à J0 4 résidus secs à partir d'échantillons de 1 ml de plasma surchargés en ribavirine. Le résidu sec chromatographié le premier jour servira de valeur de référence (J0), les autres résidus sont conservés à -20°C et analysés après 1 (J1), 2 (J2) et 3 (J3) jours de stockage.

-Enfin, la stabilité de la concentration de ribavirine dans le plasma va être testée sur des cycles de congélation/décongélation. 5 ml de plasma sont surchargés avec une concentration donnée de

ribavirine. Juste après leur préparation, 1 ml est prélevé et analysé : il est considéré comme la valeur de référence, puis le tube est congelé à -20°C. Le lendemain, le tube est décongelé et 1 ml est prélevé pour l'analyse à J1, puis le tube est recongelé, et ainsi de suite pour 3 cycles de congélation/ décongélation.

➢Spécificité de la méthode:

-Six plasmas provenant de patients différents non traités par la ribavirine sont surchargés avec 2 µg/ml de ribavirine..

-D'éventuelles interférences avec des molécules fréquemment co-prescrites et ayant un structure chimique proche de celle de la ribavirine sont recherchées. La ribavirine étant un analogue nucléosidique, les différents inhibiteurs nucléosidiques utilisés contre le VIH (les patients porteurs du VHC étant fréquemment co-infectés par le VIH) sont ainsi testés. L'aciclovir et le ganciclovir, ayant également une structure nucléosidique, sont également testés.

B-Expression et analyse statistique des résultats:

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne.

La précision de la méthode, l'influence de la matrice et des conditions de conservation sur la concentration de ribavirine sont évaluées par le coefficient de variation de la concentration de ribavirine.

La conservation de la ribavirine dans le plasma ou le résidu sec est évaluée par le coefficient de variation des pentes des droites de régression obtenues.

La perte de ribavirine lors des cycles de congélation/décongélation est exprimée en pourcentage de la valeur initiale.

Le rendement d'extraction est calculé par le rapport entre la pente d'une droite d'étalonnage obtenue sans extraction et celle d'une droite obtenue après extraction.

Dans l'étude bioclinique, la concentration sérique de la ribavirine est exprimée en µg/ml rapportée à la dose journalière de ribavirine en mg/kg.

La corrélation entre la dose administrée de ribavirine et la concentration sérique trouvée est étudiée avec un test de rang de Spearman. La comparaison rétrospective des taux sériques de ribavirine des patients avec leur statut répondeur/non-répondeur a été réalisée grâce à un test non paramétrique de Mann-Withney : dans les deux tests, une valeur de $P<0.05$ est considérée comme significative.

## 5-Sélection des patients:

Les sérums utilisés provenaient de la sérothèque (conservation à –80°C) du service d'hépato-gastrologie du CHU de Grenoble (Pr Zarski). 24 patients ayant une hépatite C chronique prouvée virologiquement (PCR positive) et histologiquement (sur biopsie) ont été sélectionnés rétrospectivement sur les critères suivants :

- Génotype 1
- Antigène HBs négatif
- Séronégatifs pour le VIH
- Traitement de 1ère intention par bithérapie :

Remarque : 11 patients sont répondeurs (définis comme ayant une charge virale indétectable et transaminases normales au 6ème mois) et ont été traités pendant un an. 13 sont non répondeurs à la bithérapie IFN-Ribavirine qui a alors été stoppée à la fin du 6ème mois.

| **Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude (n=24) :** | |
|---|---|
| **Age moyen (moyenne et minima-maxima)** | 44.3 ans (24-67) |
| **Poids (moyenne et minima-maxima)** | 73.8 kg (50-112) |
| **Principaux critères d'inclusion :** | Patients ayant une hépatite C chronique naïve |
| **Knodell (moyenne et minima-maxima)** | 9.7 (4-15) |
| **Métavir : activité (moyenne et minima-maxima)** | 2.0 (1-3) |
| **fibrose (moyenne et minima-maxima)** | 2.1 (0-4) |
| **Transaminases : ALAT (moyenne et minima-maxima)** | 2.2 N (0.94-4.7) |
| **Charge virale (moyenne et minima-maxima)** | 2208414 UI/ml (113,300 – 5295043) |
| **Thérapie anti-virale en cours** | Bithérapie standard (première cure) |
| **Posologie de ribavirine** | 1200 mg/j: 5patients; 1000 mg/j: 17 patients; 600 mg/j: 2 patients (ajustement pour effets indésirables) |
| **Réponse au traitement** | Réponse virologique soutenue: 11 patients<br>Echec au traitement (Non-réponse ou rechute): 13 patients |

Tableau 12 : Caractéristiques des patients inclus dans l'étude pharmacologique.

Les dosages de ribavirine ont été effectués sur les prélèvements de la 12ème (S12) et de la 24ème (S24) semaine de traitement.

# II-Etude virologique :

## 1-Sélection des patients :

Vingt patients ont été sélectionnés selon les critères définis plus haut :

- 10 sont répondeurs à une bithérapie IFN ou IFN pégylé + RBV.
- 10 sont non-répondeurs.

| Charactéristiques patients | Répondeurs (n=10) | Non-répondeurs (n=10) |
|---|---|---|
| Age (moyenne et minima-maxima) | 44.2 ans (24-67) | 51.7 ans (29-67) |
| Sexe (moyenne et minima-maxima) | 3 femmes, 7 hommes | 4 femmes, 6 hommes |
| Poids (moyenne et minima-maxima) | 80.7 kg (41-112) | 68.4 kg (48-93) |
| Génotype | Genotype 1 n=10 patients | Genotype 1 n=10 patients |
| Sous-type | 1a n=3, 1b n=4, ND n=3 | 1a n=1, 1b n=7, ND n=2 |
| Knodell (moyenne et minima-maxima) | 10.1 (6-15) | 11.1 (4-17) |
| Metavir : Activity (moyenne et min-max) | 2.1 (1-3) | 2.2 (0-3) |
| Fibrosis (moyenne et min-max) | 2 (1-4) | 3.1 (3-4) |
| ALAT (UI/L) : (moyenne et min-max) W4 : | 2.40 (0.3-4.11) | 2.38 (1.14-4.11) |
| W12 : | 0.70 (0.27-1.15) | 1.44 (0.37-4.7) |
| W24 : | 0.59 (0.27-1.04) | 1.11 (0.44-2.15) |
| Traitement par interféron | Peg-IFN (1.5 µg/kg/W) n=7<br>IFN Standard (3x3MUI/W) n=3 | Peg-IFN (1.5 µg/kg/W) n= 4<br>IFN Standard (3x3MUI/W) n=6 |
| Dose de Ribavirine | 1200 mg n= 3<br>1000 mg n= 2<br>800 mg n=:5 | 1000 mg n= 3<br>800 mg n= 4<br>600 mg n= 3 |

Tableau 13: Caractéristiques des patients inclus dans l'étude virologique.

## 2-Mesure de la charge virale :

Elle est réalisée par la technique COBAS AMPLICOR Hepatitis C virus Test, v 2.0 (Roche Diagnostics, Meylan) basée, après extraction, sur l'amplification en parallèle du virus contenu dans l'échantillon et d'un standard interne à l'aide d'amorces communes aux 2 séquences. La détection de l'ADN amplifié est réalisée par des sondes oligonucléotidiques spécifiques qui différencient l'amplicon du VHC de celui du standard interne.

## 3-Extraction de l'ARN viral en vue du séquençage:

Les ARN viraux sont extraits à l'aide du kit « Qiagen® QIAamp Viral RNA mini kit » à partir de 140 µl de sérum. Les virus sont d'abord lysés dans des conditions dénaturantes (560 µl de tampon AVL/RNA Carrier) permettant d'inactiver les Rnases. L'ARN est ensuite précipité par ajout de 560 µl d'éthanol absolu. La solution est déposée sur la colonne de gel de silice. Les contaminants sont ensuite éliminés par 2 étapes de lavage successives utilisant 2 tampons différents. Enfin, l'ARN viral est élué par 60 µl de tampon d'élution et stocké à -80°C.

## 4-Amplification par PCR en vue du séquençage:

L'amplification est réalisée en 2 étapes : une RT-PCR suivie d'une PCR nichée.

A-Principe :

Pour la RT-PCR, on utilise le kit « Qiagen® OneStep RT-PCR ». L'ARN extrait va d'abord être transcrit en ADN complémentaire (ADNc), c'est la « reverse transcription » (RT). Elle est réalisée par deux reverse transcriptases : Omniscript™ et Sensiscript™ qui sont des enzymes hétérodimériques recombinantes exprimées dans *E.coli.*

L'ADNc ainsi obtenu est ensuite amplifié par des cycles successifs de dénaturation (séparation des 2 brins d'ADN complémentaires), hybridation des amorces, élongation à partir de la matrice par la HotStarTaq™ DNA Polymerase (forme recombinante modifiée de la polymérase de *Thermus aquaticus*, exprimée dans *E.coli).* Les produits de chaque étape de synthèse sont utilisés comme matrice pour les étapes suivantes, ce qui permet une amplification exponentielle du produit de départ.

Grâce aux caractéristiques de la HotStarTaq™ DNA Polymerase, ces deux réactions de RT et de PCR peuvent être réalisées en un seul tube. En effet, cette polymérase est inactive pendant toute la « reverse transcription » car elle a besoin d'une étape de chauffage de 15 min à 95°C pour être activée. Cette étape de chauffage permet également de détruire les reverse transcriptases qui seront donc inactives lors de l'amplification.

Afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN en vue du séquençage, les amplicons obtenus vont être réamplifiés par une PCR nichée réalisée avec la Taq polymérase Roche et en utilisant des amorces plus internes.

B-Les amorces :

Elles ont été décrites par F.Querenghi [128]. Elles délimitent une région de 330 pb (taille cohérente avec un séquençage aisé) centrée sur le site actif de la polymérase virale et plus particulièrement sur le site supposé d'incorporation des nucléotides. Les amorces ont été synthétisées puis purifiées par HPLC (Genset, Evry, France) et stockées à la concentration de 100 µM. Elles sont ensuite diluées pour être utilisées à la concentration de 10 µM.

| **Nom de l'amorce** | **Séquence** | **Localisation (pb)*** |
|---|---|---|
| NS5b outer sens | 5'-CTC TCC TGG GCA GCG GGT TGA-3' | 8171-8191 |
| NS5b outer anti-sens | 5'-ATC AAC TCC AAG TCG TAT TC-3' | 8655-8674 |
| NS5b inner sens | 5'-GTC ACC GAG AGT GAC ATC CGT-3' | 8268-8288 |
| NS5b inner anti-sens | 5'-CTC GTA GGC TCG CCG CGT CCT C-3' | 8577-8598 |

Tableau 14 : Amorces utilisées pour la RT-PCR, la PCR nichée et la réaction de séquence
*La localisation des séquences nucléotidiques correspond à la séquence d'Enomoto .[8]

C-Réaction de RT-PCR :

✓Composition du mélange réactionnel : (volume final 50 µL) : 1X de Qiagen OneStep RT-PCR Buffer (contenant 12.5 mM de MgCl2), 400 µM de chaque dNTP, 0.6 µM d'amorce NS5b outer sens et 0.6 µM de outer anti-sens, 2 µl du Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix, 5 unités de Rnase inhibitor, 10 µl d'ARN extrait, eau (QSP 50 µl).

✓Cycles de chauffage réalisés sur le thermocycleur 9600 Perkin:

| *Etape* | *Température* | *Temps* | *Nombre de cycles* |
|---|---|---|---|
| « Reverse transcription » | 50°C | 40 min | 1 |
| Etape d'activation de la Taq polymérase | 95°C | 15 min | 1 |
| Dénaturation de l'ADN | 94°C | 60 sec | 40 |
| Fixation des amorces | 55°C | 60 sec | |
| Extension par la polymérase | 72°C | 90 sec | |
| Extension finale | 72°C | 10 min | 1 |

D-PCR nichée :

✓Mix (volume final 100 µL): 1X de tampon Taq polymerase Roche, 400 µM de chaque dNTP, 0.4 µmole d'amorce NS5b inner sens et 0.4 µmole de inner anti-sens, 1.5 UI de Taq polymerase Roche, 10 µl du produit de la RT-PCR, eau (QSP 100µl).

✓Cycles de chauffage réalisés sur le thermocycleur 9600 Perkin: :

| *Etape* | *Température* | *Temps* | *Nombre de cycles* |
|---|---|---|---|
| 1ère étape de dénaturation | 94°C | 5 min | 1 |
| Séparation des brins hybridés | 94°C | 30 sec | 35 |
| Fixation des amorces | 55°C | 30 sec | |
| Extension par la polymérase | 72°C | 1 min | |
| Extension finale | 72°C | 7 min | 1 |

La conservation des produits de PCR s'effectue à 4°C.

E-Analyse et purification des produits de PCR :

Les produits de PCR sont analysés par migration sur un gel d'agarose MP Roche à 1.5% (tampon tris-borate EDTA 1X). Les échantillons sont déposés en mélange avec du bleu de bromophénol 0.5% (w/v), xylène cyanol 0.5% (w/v) et du glycérol. La migration est réalisée à 90V. La taille du fragment amplifié est déterminée grâce au marqueur de poids moléculaire (« Smart ladder » de Eurogenetec) que l'in fait migrer en parallèle après coloration au bromure d'éthidium et observation sous UV.

Les produits de PCR sont ensuite purifiés par filtration en utilisant le système Multiscreen PCR Millipore.

## 5-Le séquençage :

A-Principe : technique de Sanger :

Une réaction de PCR est réalisée : une ADN polymérase synthétise le brin complémentaire du brin d'ADN à séquencer. Dans le milieu réactionnel se trouvent des dNTP en grand nombre, et une faible proportion de didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en 3'. Ils sont marqués par des molécules fluorescentes différentes pour chaque base : A, T, G, C. A un moment aléatoire, un ddNTP sera ajouté à la chaîne en cours de synthèse par l'ADN polymérase, la synthèse s'arrêtera alors à cet endroit. En effet, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle ne peut plus poursuivre l'élongation. On obtiendra donc des fragments de taille différente en fonction du site d'incorporation du ddNTP.

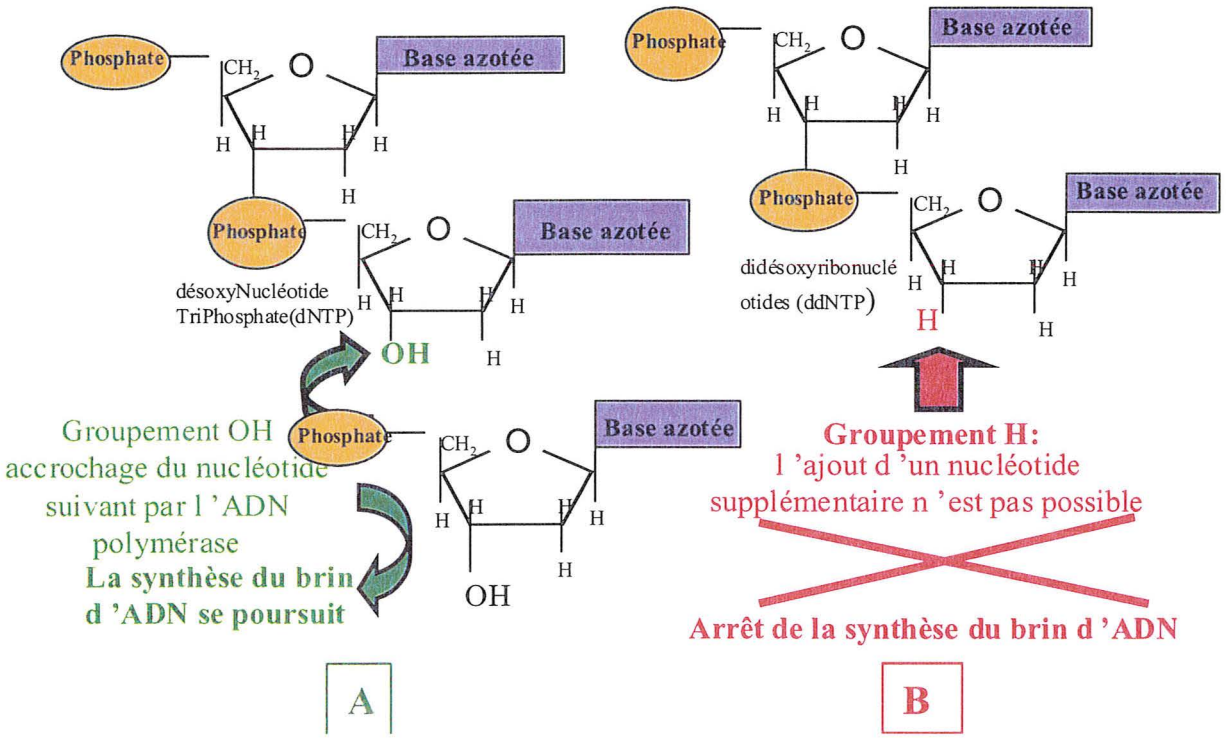



Figure 35 : Synthèse d'un brin d'ADN après ajout d'un désoxynucléotide (A) ou d'un didésoxynucléotide (B)

Une étape de purification par filtration sur Sephadex G-50 est ensuite réalisée afin d'éliminer les ddNTP non incorporés. Sur un séquenceur automatique à capillaires CEQ 2000 XL Beckman, l'échantillon est alors soumis à une électrophorèse en condition dénaturante sur un gel de polyacrylamide. Une haute tension (>100 V/cm) est appliquée entre les deux extrémités du capillaire : les plus petites molécules migreront le plus vite. Juste avant leur sortie à l'autre extrémité du capillaire, les fragments d'ADN marqués passent dans le faisceau de lumière laser qui éclaire transversalement les capillaires. Les fluorochromes des ddNTP terminaux sont excités et

émettent une fluorescence spécifique de la base. La détection s'effectue par une barrette de diodes. Le traitement informatisé des signaux transmis permet d'obtenir automatiquement la séquence.

B-Préparation de la réaction de séquence et migration :

Le rapport entre l'amorce et la matrice d'ADN est un paramètre important, il est optimum aux alentours de 40 : 1 (amorce : matrice). Pour un produit de PCR, 2 réactions seront réalisées, une avec l'amorce NS5b sens et l'autre avec l'amorce anti-sens, ce qui permettra de séquencer le fragment d'ADN en partant de chacune de ses extrémités. Le mélange réactionnel contient donc 2 à 4 µL d'ADN (quantité déterminée en fonction de l'intensité de la bande vue sous UV), 2 µl d'amorce (10 µM), 8 µl de master mix® du kit Beckman et de l'eau (qsp 20 µl).

Le programme de thermocyclage est le suivant : 96°C 20 sec
50°C 20 sec
60°C 4 min
} pendant 30 cycles

puis maintien à 4°C.

La migration est réalisée comme décrit auparavant sur le CEQ 2000 XL Beckman Coulter. Les fluorochromes employés sont les Well Red™ dont la longueur d'onde d'excitation se situe entre 650 et 750 nm. Leurs émissions sont bien séparées et se situent dans l'infra-rouge ce qui permet de diminuer les interférences avec le matériel biologique.

C-Analyse Phylogénétique des séquences obtenues :

Les séquences nucléotidiques obtenues sont alignées en utilisant le logiciel CLUSTAL W, version 1.8. La création d'arbre Phylogénétique est réalisée avec le logiciel PHYLIP, version 3.572. Dans un premier temps, une matrice de distance (Kimura 2 paramètres) est établie en utilisant DNADIST. Puis cette matrice est traitée par Neighbour-joining (NJ). On analyse ensuite la robustesse des différentes branches par bootstrapping [$10^3$ répétitions (programmes SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOUR et CONSENSE du logiciel PHYLIP)].

Afin d'améliorer la performance de l'analyse , on ajoute également des souches de référence de génotype différents : HCV-4d (D86537), HCV-4f (L29593), HCV-3a (D28917), HCV-2b (D10988) et HCV-2c (D50409).

# Résultats

# I-Etude pharmacologique :

## 1-Phase de validation :

Les temps de rétention de la ribavirine et du Standard interne (SI) sont respectivement 6.7 min et 11 min. Des exemples de chromatogrammes sont présentés ci-dessous (cf. Fig. 36).

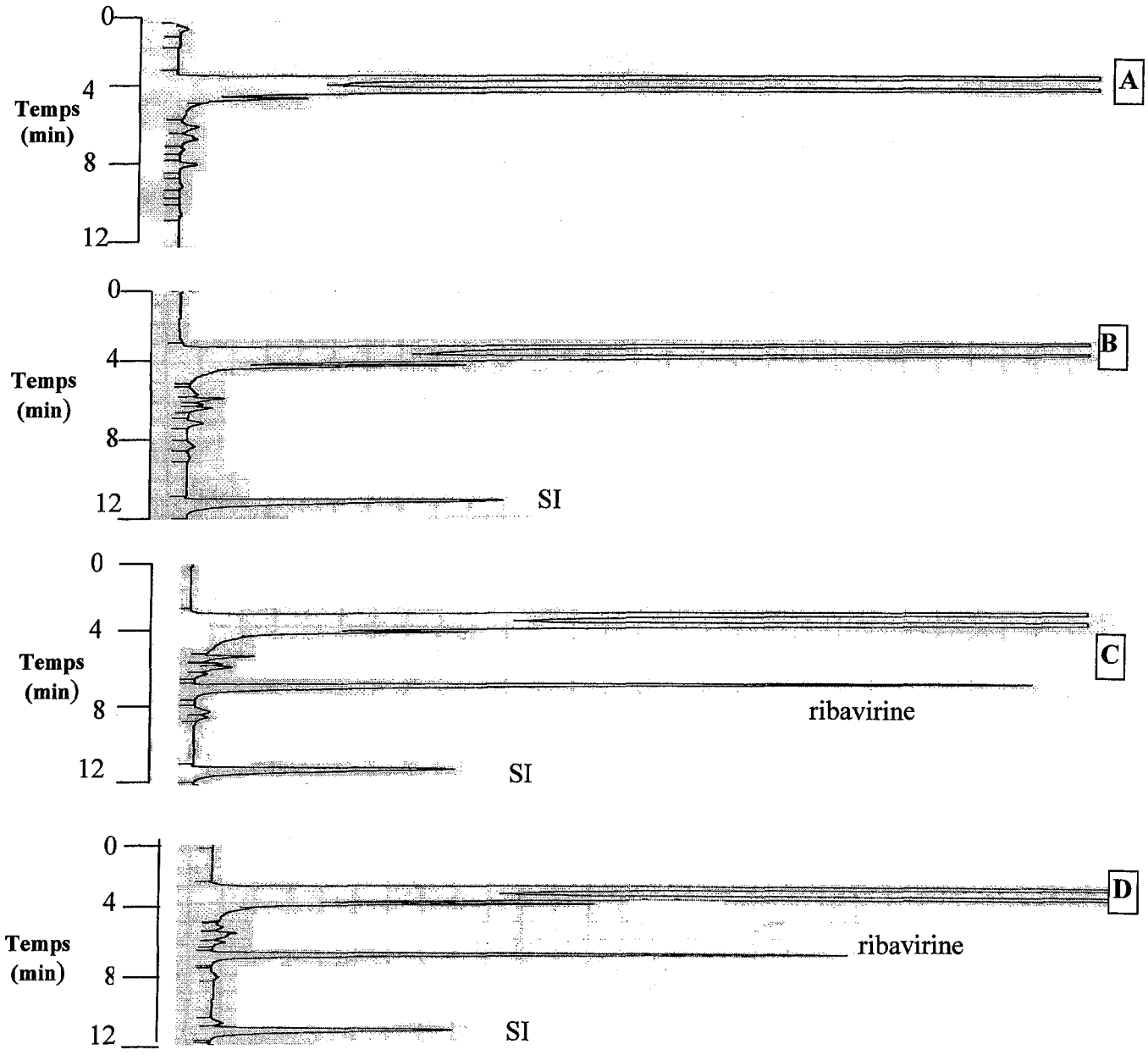



Figure 36 : Chromatogrammes typiques de sérums humains après SPE , (A) : double blanc, (B) : sérum humain surchargé avec 2.5 µg/ml de SI, (C ) : serum humain surchargé avec de la ribavirine et du SI et (D) : serum de patients recevant de la ribavirine en bithérapie avec de l'IFN

Une série de droites d'étalonnage a permis d'établir que l'équation moyenne de la droite était **Y= 0.977 (±0.161) X -0.0173 (±0.095)** avec un coefficient de corrélation de $\mathbf{r^2=0.99}$ **(±0.007)**. Cette corrélation linéaire a été vérifiée jusqu'à une concentration de 10 µg/ml.

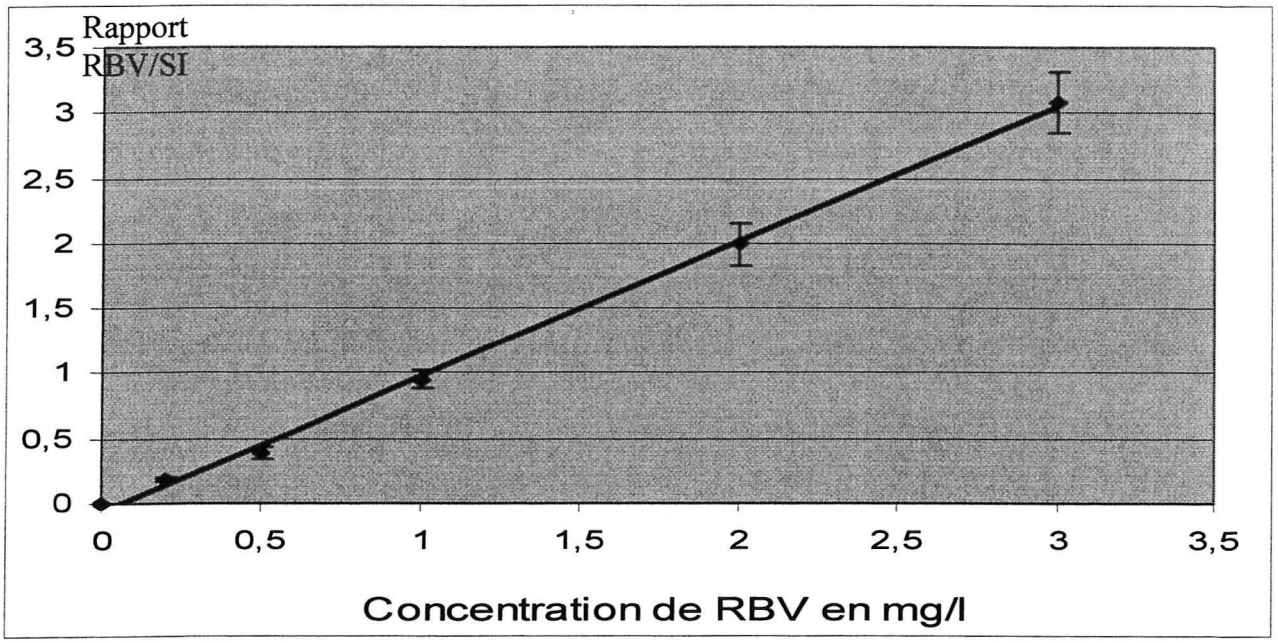



Figure 37 : Droite moyenne d'étalonnage de la ribavirine rapportée au standard interne avec les écarts types pour chaque point.

La « Lower Limit of quantification » (LLOQ) est de **0.2 µg/ml** et la limite de détection (LOD) est de **0.06 µg/ml.**

La précision de la méthode est indiquée ci-dessous (Tableau 15) :

| Concentration cible (µg/ml) | n | Coefficient de variation (%) | |
|---|---|---|---|
| | | Répétabilité | Reproductibilité |
| 0.2 | 5 | 5.1 | 12.9 |
| 1 | 5 | 11.2 | 9.3 |
| 3 | 5 | 7 | 8.4 |

Tableau 15 : Répétabilité et reproductibilité de la méthode

La concentration de ribavirine dans le plasma conservé à 4°C ne subit pas de baisse significative sur 5 jours : le coefficient de variation des pentes est de 14 %.

En revanche, la concentration de ribavirine dans les résidus secs stockés à –20°C a tendance à diminuer. Les pentes sont de 0.9439 à J0, 0.7869 à J1, 0.6237 à J2 et 0.5914 à J3, ce qui donne un coefficient de variation de 19.1% avec une diminution de la concentration de **37.4 % entre J0 et J3**.

Le test de congélation/décongélation met en évidence une tendance à la perte de ribavirine : **-32.6%** après 3 cycles de congélation/décongélation par rapport à la valeur initiale.

Le rendement d'extraction, exprimé en pourcentage, est défini comme étant le rapport de la pente obtenue sur une gamme sans extraction par rapport à une gamme obtenue après extraction; il est ici de **87%.**

On ne note pas ici d'influence de la matrice sur la concentration de ribavirine (CV=6%).

Les analogues nucléosidiques anti-VIH n'interfèrent pas avec la technique de dosage. En effet, seuls le DDI et le DDC donnent des pics qui perturbent le chromatogramme lorsqu'ils sont injectés directement, mais l'étape d'extraction permet d'éliminer ces interférences :

| **Molecules** | **Cmax (litterature)** | **Concentrations testées** | **Injection directe** | **Après SPE** |
|---|---|---|---|---|
| Lamivudine (3TC) | 1.5 to 1.9 µg/ml | 10 µg/ml | PI | PI |
| Zalcitabine (DDC) | 11.6 to 37.5 µg/ml | 10 µg/ml | I | PI |
| Zidovudine (AZT) | 1.9 µg/ml | 10 µg/ml | PI | PI |
| Didanoside (DDI) | ? | 10 µg/ml | I | PI |
| Stavudine (D4T) | 700 to 900 ng/ml | 10 µg/ml | PI | PI |
| Abacavir | 3 to 6 µg/ml | 30 µg/ml | PI | PI |
| Aciclovir | ? | 25 µg/ml | PI | PI |
| Ganciclovir | 8.3 µg/ml | 10 µg/ml | PI | PI |

Tableau 16 : Molécules fréquemment co-prescrites avec la ribavirine (i=interférence, PI= pas d'interférence).

## 2-Etude clinique :

A-Variation de la biodisponibilité :

Les concentrations moyennes de ribavirine après 12 et 24 semaines de traitement sont indiquées dans le tableau 17. Ces résultats montrent une importante variation inter-individuelle de la concentration sérique de ribavirine :

| 12ème semaine de traitement | 24ème semaine de traitement |
|---|---|
| 0.19 µg/ml/mg/kg/j (±0.02) | 0.24µg/ml/mg/kg/j (±0.02) |
| **CV=44%** | **CV=48%** |

Tableau 17 : Concentrations sériques de ribavirine après 12 et 24 semaines de traitement. Les concentrations de ribavirine ne sont pas statistiquement différentes à S12 et S24.

Avec un test de rang de Spearman, on ne trouve pas de corrélation entre la dose administrée et la concentration sérique de ribavirine trouvée : **p = 0.25 à S12 et p = 0.27 à S24.**

B-Relation avec le statut répondeur/ non-répondeur :

A S12 et S24, les concentrations sériques moyennes de ribavirine sont plus élevés chez les répondeurs (n = 11) que chez les non-répondeurs (n = 13) (cf. Fig 39).

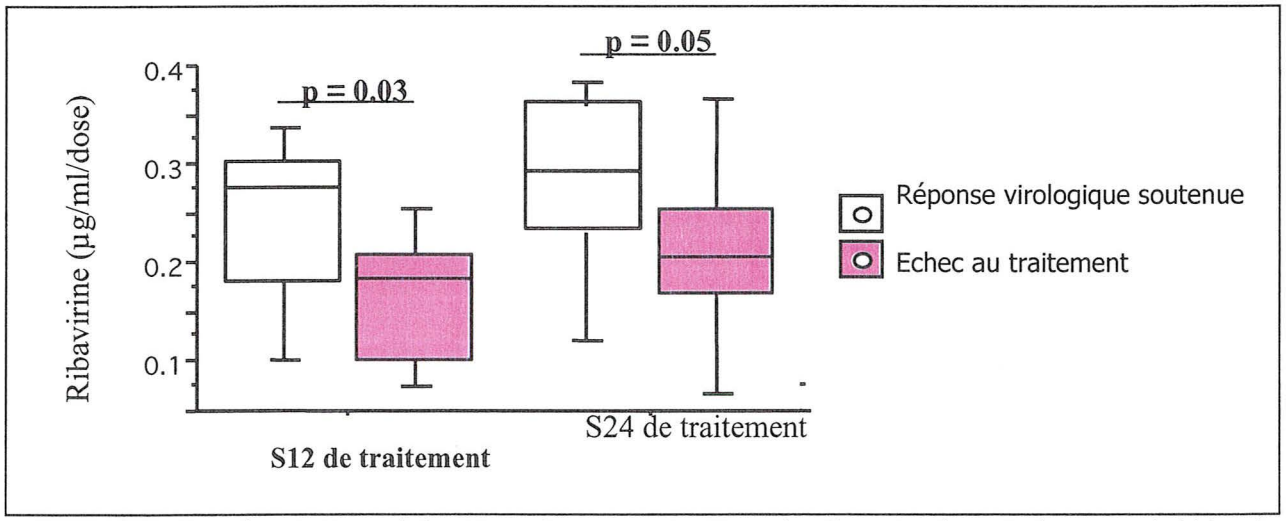



Figure.38 : Représentation schématique des concentrations de ribavirine (exprimées en µg/ml/dose) dans les sérums de 11 répondeurs et de 13 non-répondeurs après 12 et 24 semaines de bithérapie IFN-ribavirine.
Les boites représentent 50 % des valeurs. La ligne horizontale correspond à la valeur médiane. Les traits hauts et bas correspondent aux 25 ème et 75 ème percentiles.

## II-Etude virologique :

L'ARN viral du VHC est extrait du sérum des patients puis par RT-PCR suivie d'une PCR nichée, on amplifie la partie centrale du gène de la polymérase virale. A l'issue de cette amplification, on révèle les produits sur un gel d'agarose. Un exemple de gel est montré ci dessous :

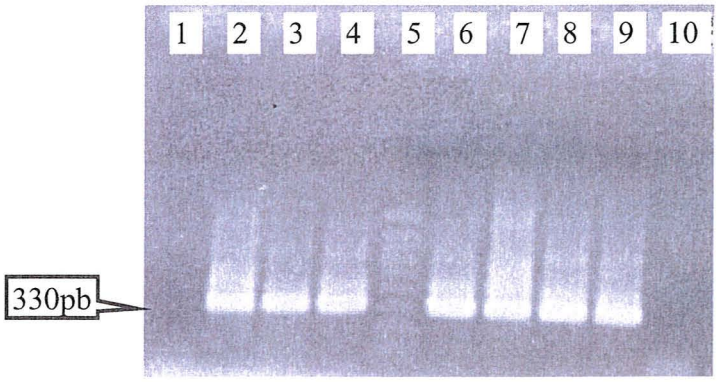



Figure 39 : Visualisation sur gel d'agarose des produits de PCR : puits n°1 : patient n°1 dont l'ARN viral n'a pu être amplifié, puits n°2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 : patients 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 , puits n°5 : marqueur de poids moléculaire et puits n°10, témoin négatif sans ADN.

Sur ce gel, on voit que l'on a obtenu un produit d'amplification pour 7 patients sur 8. Au total, on arrivera à amplifier la polymérase des 10 patients répondeurs à WO et de 28 échantillons des patients non-répondeurs à W0, W12 et W24. En effet, pour un patient non-répondeur, l'amplification n'a pas été possible à W12 et W24.

Les produits amplifiés ont tous pu être séquencés (sens et anti-sens) permettant d'obtenir des séquences de bonne qualité.

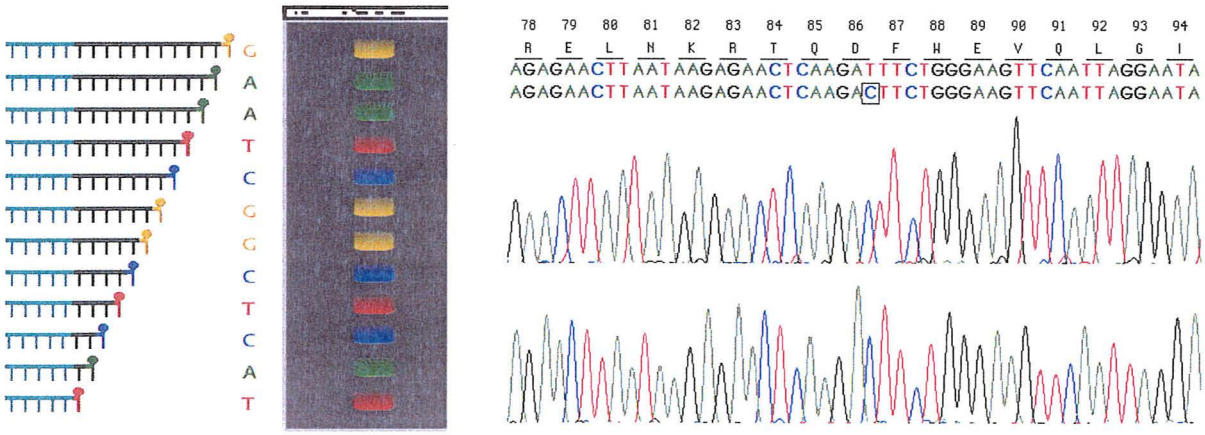



Figure 40 : Schéma d'électrophérogramme représentant des fragments d'ADN amplifiés portant à leur extrémité un ddNTP marqué et exemple de graphe obtenu.

Un arbre Phylogénétique regroupant les 20 séquences (alignées en figure 42) à W0 des patients répondeurs et non-répondeurs a été construit. Il est présenté en figure 41.

La phylogénie ne met pas en évidence de corrélation directe entre le statut répondeur/non-répondeur et la séquence de la polymérase virale avant traitement. L'arbre obtenu comporte 2 branches principales retrouvées 1000 fois sur 1000 par la méthode du « bootstrap », ce qui signe une excellente fiabilité. La première branche comprend 2 non-répondeurs sur 7 patients, et la seconde compte 8 non-répondeurs sur 13 patients. Cette première branche regroupe les sous-types 1a (au moins 4/7) et la deuxième les 1b (au moins 10/13). Le sous-type n'a pu être déterminé pour 5 patients.Il semble donc que la répartition Phylogénétique des souches virales à W0 soit davantage en relation avec le sous-type qu'avec le statut répondeur/non répondeur.

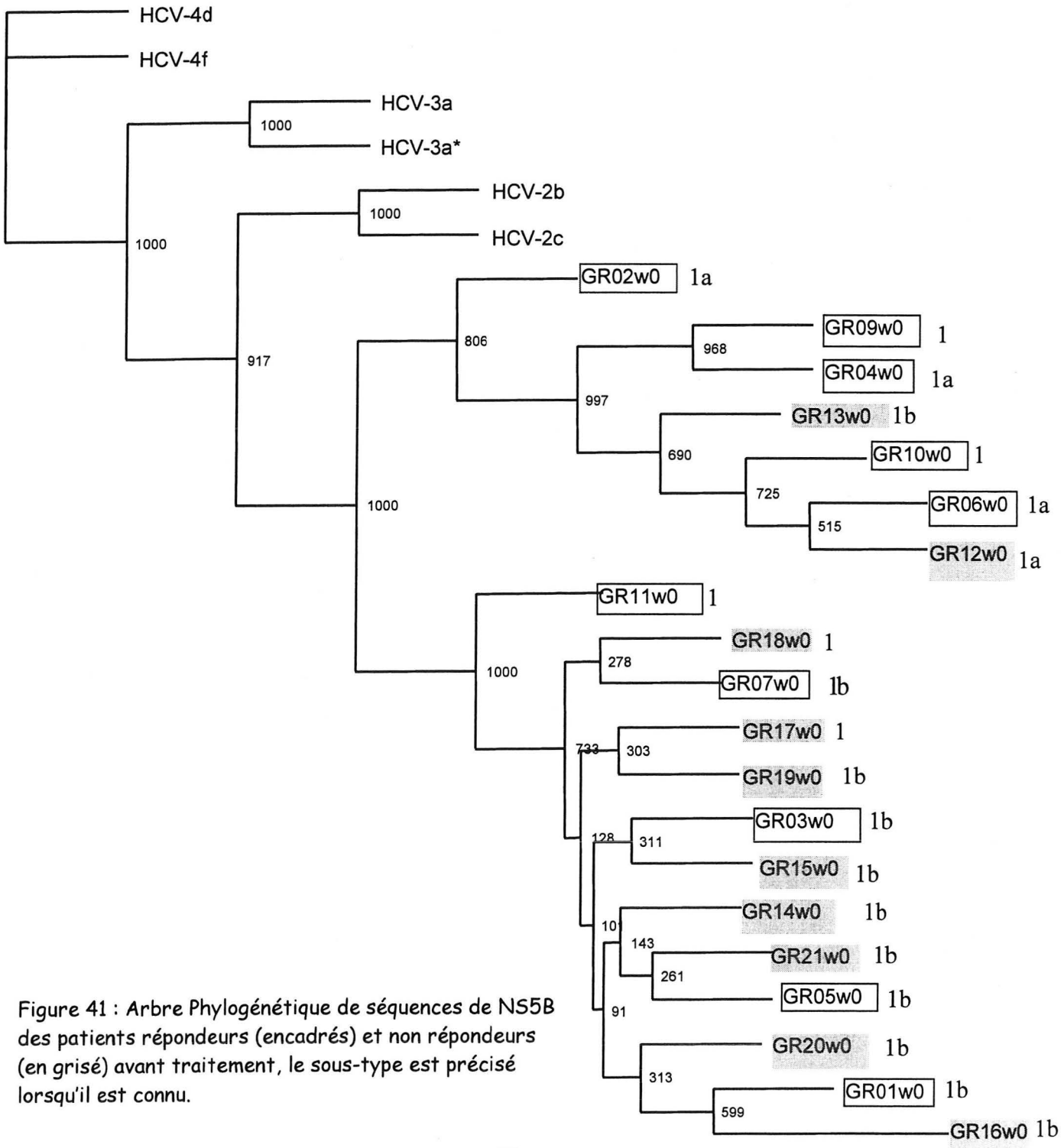



Figure 41 : Arbre Phylogénétique de séquences de NS5B des patients répondeurs (encadrés) et non répondeurs (en grisé) avant traitement, le sous-type est précisé lorsqu'il est connu.

```
IRTEEAIYXCCDLDPQAXVAIKSLTERLYVGXPLTXSRGENCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYIKAQAACXAAGLRDCTMLVCGDDLVVICESQGVQEDAXSXR
IRTEEAIYQCCDLDPQAXVAIKSLTERLYVGGPLTNSRGENCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYIKAQAACRAAGLRDCTMLVCGDDLVVICESQGVQEDAASLR
IRTEEAIYQCCDLDPQARVAIKSLTERLYVGGPLTNSRGENCGYRRCRASGVLXTSCGNTLTCYIKAQAACRAAGLQNCTMLVCGDDLVVICESQGVQEDAASXR
IRTEEAIYQXCDLDPQARVAIXSLTERLYVGXPLTNSKGENCGYRRCRASGVLXTSCGNTLTCYIKAQAACRAAGLRDCTMLVCGDDLVVICXSXGVQEDAASXR
IRTEEAIYQCCDLDPQARVAIKSLTERLYVGXXLTNSRGENCGYRRCRXSGVLTTSCGNTLTCYIKAQAACRAARLRDCTMLVCGDDLVVICESAGVQEDAASLR
IRTEEAIYQCCDLDPQARVAIRSLTERLYVGGPLTNSRGENCGYRRCRASGXLTTSXGNTLTXYIKAXAACRAAGLRDCTMLVXGDDLVVICESQGVQEDAASLR
IRXEEXIYQCCDLAPEAXQAIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKASAACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDAASLR
IRXEESIYQCCDLAPEARQVIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCXASGXLTTSCGNTLTCYLKASAACRAAKLQXCTMXVCGDDLVVICXSAGTXEDAASLR
IRVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGXLTTSCGNTLTCYLKASAACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDAASLR
IRVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKASAACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQKDAASLR
IRVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRXSGVLTTSCGNTLTCYLKASAACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDAASLR
IXVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGGXLINSKGQNCGYRRCRXSGVLTTSCGNTLTCYLKASAACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDAASLR
IRVEESIYQCCDLAPEARQAIKSLTERLXIGGPLTNSKGQNCGYRRCRXSGVLTTSXGNTLTCYLKAAAACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDAASLX
IRVEESIYQCCDLAPEARQAIKSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKASAACRAAKLQDCTMLVNGDDLVVICESAGTQEDAASLR
IRVEESIYQCCDLAPEARQVIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKATAACRAAKLQDCTMLVCGXDLVVICESAGTQEDAASLR
IRVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGXPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTXSCGNTLTCYLKATAACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDAAXLR
IRVEESIYQCCDLAPEXKQAIKSLTERLYIGXPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKATAACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDAASLR
IRVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRXSGVLTTSCGNTLTCYLKATAACRAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGXQEDAASLR
IRTEESIYQCCDLAPEARKAIRSLTERLYVGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCYLKATAACRAAKLQDCTMLVCGXDLVVICESAGTQEDAASLX
IRTEEXIYXCCDLXPXAXXAXKXLXEXLYVGXPXXNSRGXNCGYRXXRASGXLTTSCGXTLTXXXKAXAACRXXXLXDCXMLVXXDDXVVICXXXGXQEDAASLR
```

Figure 42 : Alignement des séquences en acides aminés de 19 patients avant traitement réalisé avec le logiciel « Clustalw PBIL multiple alignment ».
Dans l'ordre : GR06, 10, 04, 13, 09, 14, 01, 19, 15, 16, 19, 05, 17, 18, 03, 07, 20, 11, 02.

Il semble donc qu'il n'y ait pas de différence inter-individuelle entre répondeurs et non-répondeurs dans la séquence du site actif de la polymérase avant traitement. La même région de la polymérase (nt: 8268 à 8598 → 330 pb) a ensuite été séquencée pour chaque patient non-répondeur à la 12ème et à la 24ème semaine de la bithérapie IFN-RBV. A ces deux temps, la charge virale (cf. Fig.43) ainsi que la concentration de ribavirine sériques (cf. Fig.44) ont également été mesurées. Les cinétiques des charges virales sont typiques de celles de non-répondeurs. Elles ne descendent pas en dessous de la limite de détection de l'ARN viral, mais certaines diminuent, majoritairement en début de traitement (jusqu'à la semaine 12) puis semblent se stabiliser à des taux encore assez élevés entre les semaines 12 et 24, alors que les autres ne chutent quasiment pas.

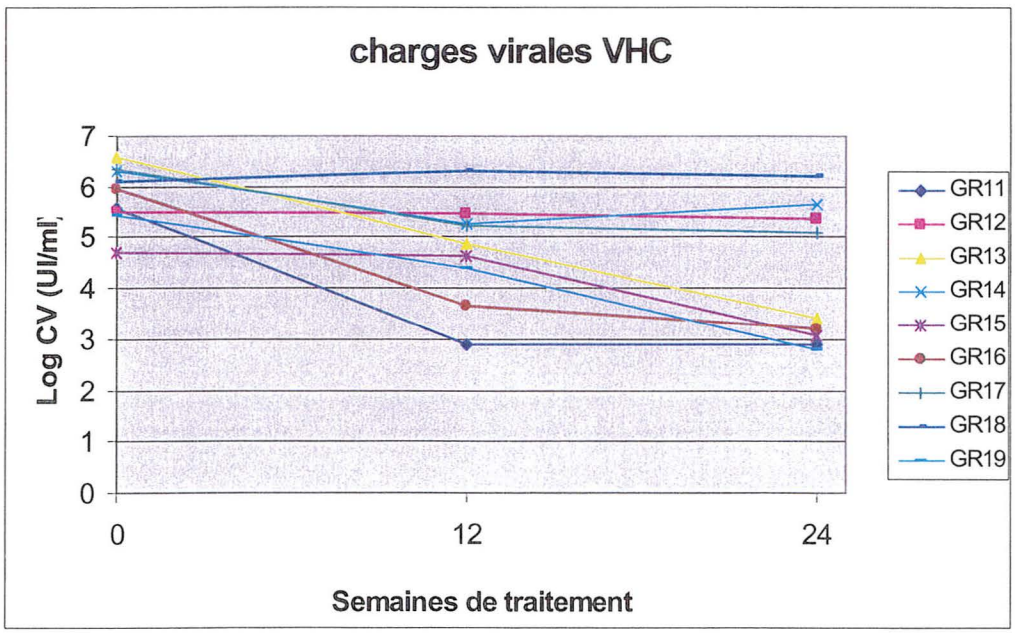



Figure 43: Evolution des charges virales des patients non-répondeurs à W0, W12 et W24.

Les concentrations sériques de ribavirine trouvées sont du même ordre que celle de notre précédente étude [89]. Néanmoins, on peut noter que le patient GR14 a des concentrations de ribavirine indétectables à la 12ème semaine de traitement, ce qui met vraisemblablement en lumière un cas de mauvaise observance du traitement. Les concentrations sont très dispersées à la 12ème semaine (de 0 à 7,2 mg/ml : **CV=76,3%**) et plus homogènes lors de la 24ème semaine (de 1,4 à 3,8 mg/ml : **CV=34,1%**).

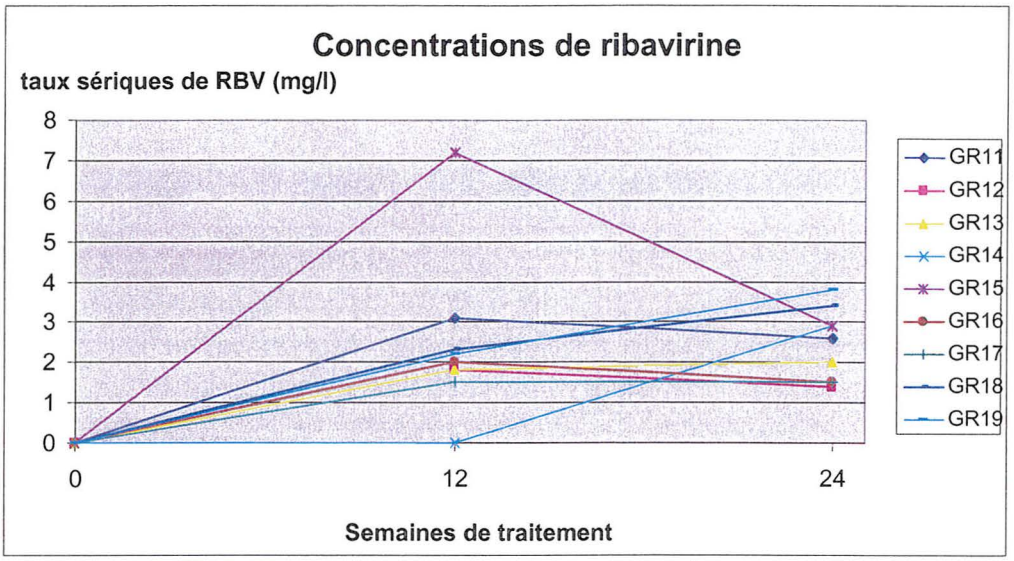



Figure 44 : Evolution des concentrations de ribavirine en cours de traitement chez les 9 patients non-répondeurs séquencés.

Un exemple des séquences obtenues pour 4 patients non-répondeurs sont montrés en figure 45. On trouve très peu de différence inter-individuelle dans cette région de la polymérase virale à l'exception d'un patient (GR13) pour lequel on retrouve 51 mutations (sur 333 pb). Parmi ces mutations, 28 sont des mutations synonymes et 23 mènent à 12 changements d'acides aminés. Ces mutations par rapport à la séquence de référence sont principalement observées chez les souches virales avant traitement. Lors du traitement, cette souche virale assez différente tend à s'estomper au profit d'une souche plus proche de la séquence de référence obtenue en poolant tous les répondeurs avant traitement. Pour les autres patients nous observons respectivement 9 mutations de bases pour GR 19, 8 pour GR 15, 4 pour GR 14, 1 pour GR 18 et 0 mutation pour les six derniers patients. Environ 50 % de ces mutations conduisent à un changement d'acide aminé et 50 % sont silencieuses. On ne remarque pas d'augmentation notable du nombre de mutation au cours du traitement.

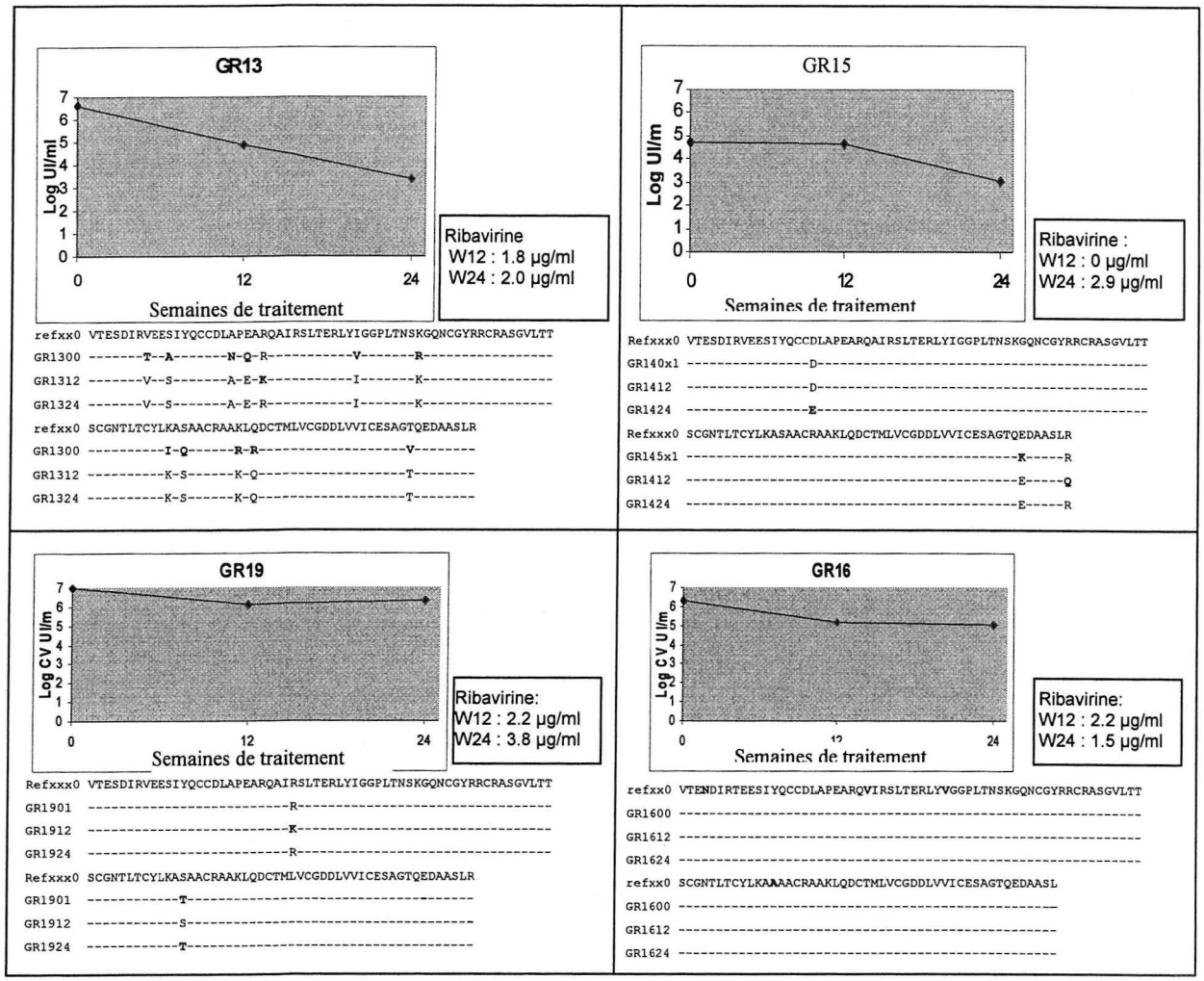



Figure 45 : Exemple de séquences en acides aminés de la région centrale de la polymérase du VHC , des charges virales et concentrations sériques de ribavirine de 4 patients non répondeurs à W0, W12, W24 d'un traitement par bithérapie IFN-RBV. La séquence de référence « ref » correspond à la séquence en acides aminés consensus des répondeurs à W0.

Afin d'analyser ces résultats longitudinaux, un arbre Phylogénétique a été construit (Fig. 46). Il ne permet pas de mettre en évidence de réelle évolution de séquence au cours des 24 semaines de traitement chez les patients non-répondeurs. Les 3 séquences d'un même patient se trouvent regroupées (valeurs de bootstrap : 69,7 à 82,9 % ). Deux exceptions sont remarquables : la séquence de GR13 avant traitement est très éloignée des deux autres obtenues pendant le traitement et la séquence après 12 semaines de traitement pour GR19 n'est pas directement reliée aux 2 autres.

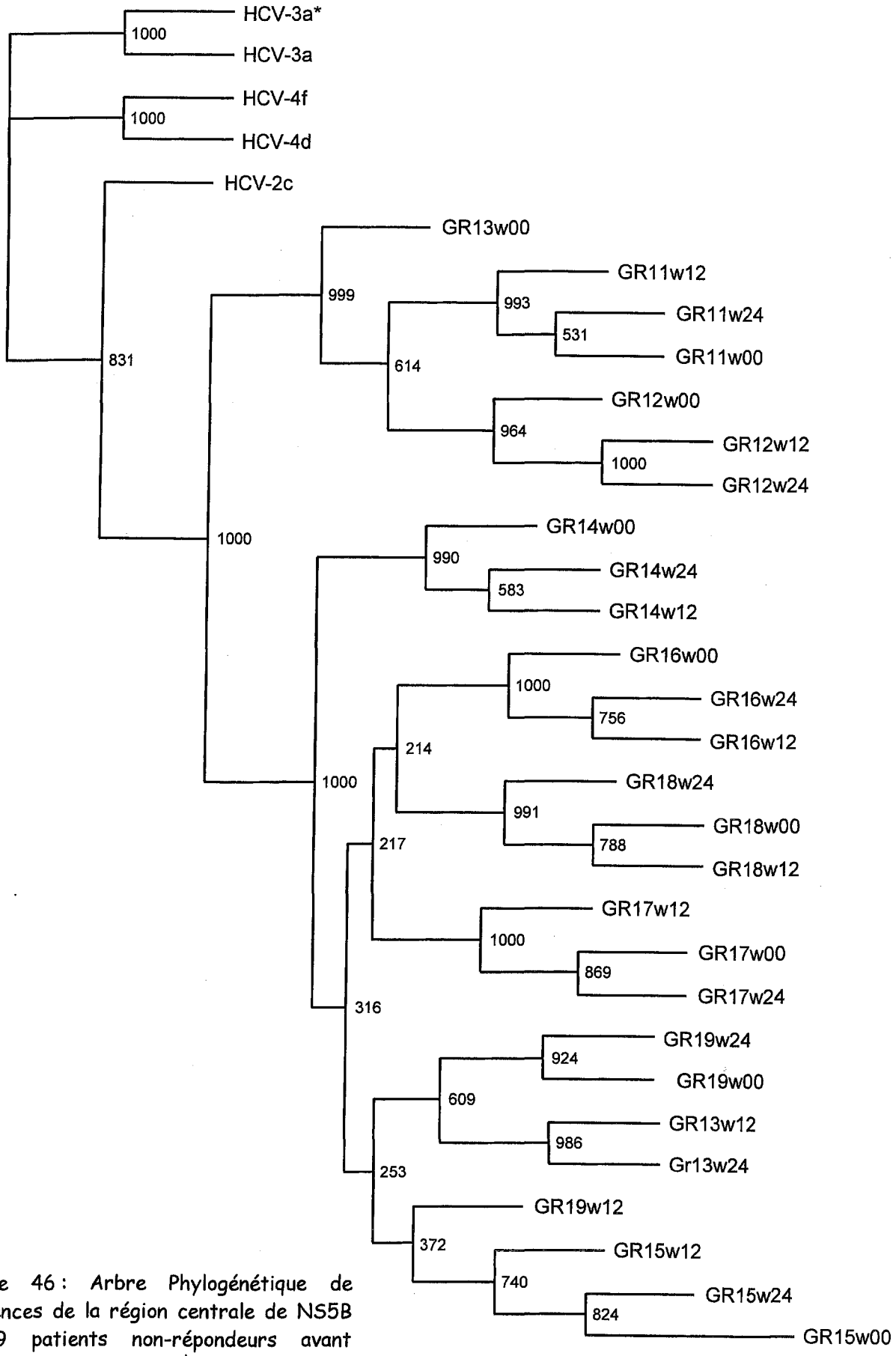



Figure 46 : Arbre Phylogénétique de séquences de la région centrale de NS5B de 9 patients non-répondeurs avant traitement (w0), à la 12ème semaine (w12) et à la semaine 24 (w14) de bithérapie. Chaque patient est représenté par un code (GR 10→19) suivi de la semaine de traitement.

# Discussion

Ce travail présente : -la validation d'une méthode de quantification de la ribavirine dans le sérum humain. Son application en vue de la surveillance thérapeutique des patients traités contre l'hépatite C chronique a été évaluée par une étude rétrospective sur 24 patients.

-la recherche de mutations de la polymérase virale qui pourraient avoir un effet sur l'efficacité de la ribavirine chez 10 patients répondeurs et 9 non-répondeurs.

La méthode de quantification est adaptée de celle de Homma [68], en modifiant la longueur d'onde de détection (207 nm) et l'étape d'extraction purification (SPE). En effet, une solution méthanolique contenant 3 % d'acide formique est utilisée pour éluer la ribavirine après son extraction dans le but de faciliter l'étape suivante d'évaporation.

La méthode présentée a une « LLOQ » de 0.2 µg/ml et une limite de détection de 0.06 µg/ml sur échantillons extraits, ce qui est du même ordre que celles données dans les méthodes déjà décrites utilisant une HPLC avec détection UV [144, 148].

Le rendement d'extraction, la sensibilité, la linéarité de la courbe de calibration ainsi que la précision intra et inter-essais de la méthode sont en accord avec les recommandations de validation d'une méthode bioanalytique de la FDA [140] et permettent donc la quantification de la ribavirine dans une large gamme de concentrations incluant celles retrouvées en clinique.

Les analogues nucléosidiques testés n'interférent pas avec la méthode. Cette spécificité est due à l'étape de SPE. En effet, l'extraction est réalisée grâce à de l'acide phénylboronique qui, à pH élevé, fixe les diols vicinaux. La ribavirine a un pentose complet et présente donc un diol vicinal ce qui n'est pas le cas des autres analogues nucléosidiques testés. C'est un point important de la validation de la méthode car les patients co-infectés VHC-HIV sont fréquemment traités par une association de la ribavirine avec d'autres analogues nucléosidiques. Cette association peut donner une toxicité mitochondriale accrue [87] qui pourrait peut être être mieux gérée avec une adaptation thérapeutique de la ribavirine.

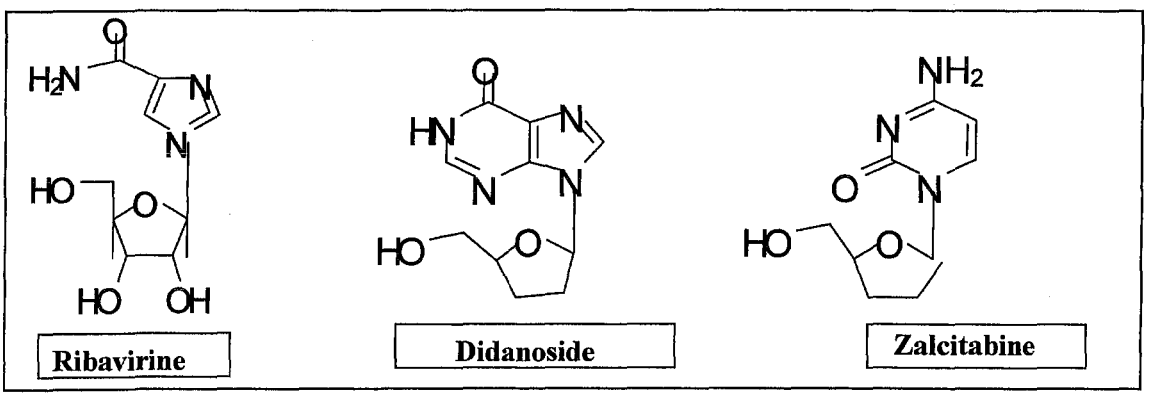



Figure 47: Formules chimique de la ribavirine et des deux analogues nucléosidiques utilisés dans les thérapies anti-VIH: le DDI et le DDC

L'analyse de la stabilité de la ribavirine dans différentes conditions montre que la concentration de ribavirine reste stable dans un sérum conservé 5 jours à 4°C ou à –20°C. Elle tend à diminuer dans les résidus secs d'extraction conservés à –20°C pendant 4 jours de même que si on la soumet à des cycles de congélation/décongélation. Ces données indiquent clairement que le stockage des résidus secs est à éviter, ainsi que les étapes de décongélation/recongélation. En revanche, le stockage des échantillons à 4°C ou –20°C assure une bonne conservation de la ribavirine pendant 5 jours.

La dose minimale efficace de la ribavirine n'a pas été cliniquement établie. Les premiers essais cliniques [18, 60] ont été réalisés sur la base d'une posologie de 1000 mg ou 1200 mg en fonction du poids du patient (inférieur ou supérieur à 75 kg). La « ribavirine Roche » reste actuellement prescrite sur ce schéma alors que Schering Plough recommande une posologie toujours adaptée au poids, mais de la façon suivante : 800/1000/1200mg pour <65/65-85/>85kg. Cette adaptation posologique ne tient compte que du poids du patient alors que la concentration sérique de ribavirine semble dépendre également d'autres facteurs tels que la fonction rénale [22, 77].

L'objectif second de cette étude a été d'explorer une possible relation entre la concentration sérique de ribavirine et l'efficacité de la bithérapie. Une étude récemment publiée [115] montre que, chez des patients traités en monothérapie de ribavirine, on obtient une diminution de la charge virale significative, bien que modérée et transitoire chez la moitié des patients. Cet effet est lié à une ½ vie plus longue de la ribavirine et à des concentrations sériques plus élevées. Une étude de Schering Plough démontre également que la concentration de ribavirine à la 4$^{ème}$ semaine de traitement est corrélée positivement avec la réponse virologique initiale [77]. Nos données ne sont pas basées sur des valeurs mesurées si précocement dans le traitement mais analysent plutôt le résultat final, c'est-à-dire la réponse virologique soutenue (6 mois après l'arrêt du traitement). Ces données suggèrent que des taux élevés de ribavirine (bonne biodisponibilité) pourraient être un facteur prédictif de réponse soutenue au traitement. Cette étude a également permis de mettre en évidence un cas de non-observance du traitement : le patient ayant un taux de ribavirine de 1.27 µg/ml lors du dosage à S12 et un taux indétectable à S24.

Cependant, notre étude étant rétrospective et ne portant que sur un petit nombre de patients (n total=24), il est nécessaire de confirmer les résultats obtenus sur un échantillon plus large et lors d'une étude cette fois-ci prospective. C'est ce qui a été réalisé avec l'étude RIBATOP dont les inclusions viennent de s'achever, et qui est en cours d'analyse. Il s'agit d'une étude prospective de pharmacologie clinique chez des patients en cours de bithérapie pour hépatite chronique C de génotype 1 ou 4. L'évaluation a porté sur la mesure au cours des 3 premiers mois du traitement,

des concentrations sériques de ribavirine d'une part et d'autre part des marqueurs d'efficacité (charge virale VHC) et de tolérance de ce traitement (essentiellement taux d'hémoglobine). Une corrélation entre ces éléments est recherchée afin de confirmer nos données préliminaires concernant l'efficacité de la molécule sur la diminution de la charge virale, mais également afin d'évaluer la relation entre la concentration sérique de ribavirine et sa toxicité. A 3 mois de traitement, un ajustement de posologie de la ribavirine a été proposé aux patients sur la base des données recueillies durant l'étude. La concentration de ribavirine après ajustement de posologie a été contrôlée 4 semaines plus tard afin d'évaluer l'effet de cette adaptation thérapeutique sur le taux sérique mesuré. On teste ainsi le concept d'une adaptation thérapeutique de la ribavirine qui se ferait en fonction des concentrations sanguines et non plus en fonction du poids du patient et qui permettrait également de fait de vérifier l'observance du patient.

La non-réponse à la bithérapie interféron-ribavirine pourrait donc être favorisée par des taux trop faibles de ribavirine. Mais des taux sériques élevés de ribavirine ne sont pas, pour autant suffisants pour assurer une efficacité à long terme de cette molécule en monothérapie sur le virus de l'hépatite C. Son mode d'action est d'ailleurs encore assez mal élucidé (cf. *Données bibliographiques* chapitre VI-3). Sa structure chimique, proche de celle de la guanosine fait penser à un mode d'action d'analogue nucléosidique s'incorporant via la polymérase virale, à l'ARN viral. Il a en effet été démontré que la ribavirine était un substrat potentiel pour la polymérase du VHC et qu'elle pouvait s'incorporer au génome viral tout en favorisant l'apparition de mutations [35, 99, 160]. Dans cette optique, et par analogie avec les phénomènes observés avec les inhibiteurs nucléosidiques utilisés dans le VIH, nous avons émis l'hypothèse qu'une cause de mauvaise réponse au traitement par la ribavirine pourrait être une mutation au niveau de la polymérase virale qui ne permettrait plus l'incorporation de la ribavirine. Il a d'abord été vérifié que les patients répondeurs et non-répondurs ne présentaient pas de différence significative de leur polymérase virale avant traitement. Nos résultats n'ont pas mis en évidence de mutation favorisant ou diminuant la réponse ultérieure au traitement. Ils permettent, en revanche, de voir que la région séquencée de la polymérase virale permettrait de rediscriminer les sous-types a et b des génotypes I de façon identique à celle classiquement utilisée, basée sur le séquençage de la région 5'NC. Pendant le traitement, on observe une moyenne de 7,3 mutations pour 330 pb sur 24 semaines. Si l'on extrapole ces données sur un an, on obtient $4 \times 10^{-2}$ mutations par position nucléotidique par an ce qui est légèrement supérieur au taux donné par Bukh et al [23] pour l'ensemble du génome ($1.5 \times 10^{-3}$ substitution par position nucléotidique par an). Néanmoins, ces résultats sont logiques puisque la polymérase n'est pas une des régions les plus conservées du génome (cf. tableau 3). De plus, on peut peut-être voir dans ce taux plus élevé de mutations le reflet de l'effet mutagène de la

ribavirine, mais notre population n'est pas assez étendue pour permettre d'étayer cette hypothèse. Seule la moitié des mutations trouvées conduit à un changement d'acide aminé (1,9 %). En définitive, dans la population étudiée (n = 9), 5 patients ont un changement d'acide aminé ou plus dans leur souche virale mais aucune de ces mutations n'est récurrente. On peut tout de même noter que, même si la majorité des mutations silencieuses est causée par un échange de base en 3ème position du codon, environ 20 % concernent le premier nucléotide du codon et n'occasionnent pas de changement d'acide aminé. Ceci dénote vraisemblablement le fait que certaines régions de la polymérase doivent rester stables pour le bon fonctionnement de l'enzyme. Un certain nombre de motifs d'acides aminés très conservés (A, B , C, D, E, et F), cruciaux pour la réplication virale, ont été mis en évidence dans la polymérase du VHC par comparaison aux polymérases d'autres virus [20, 95, 120, 127].

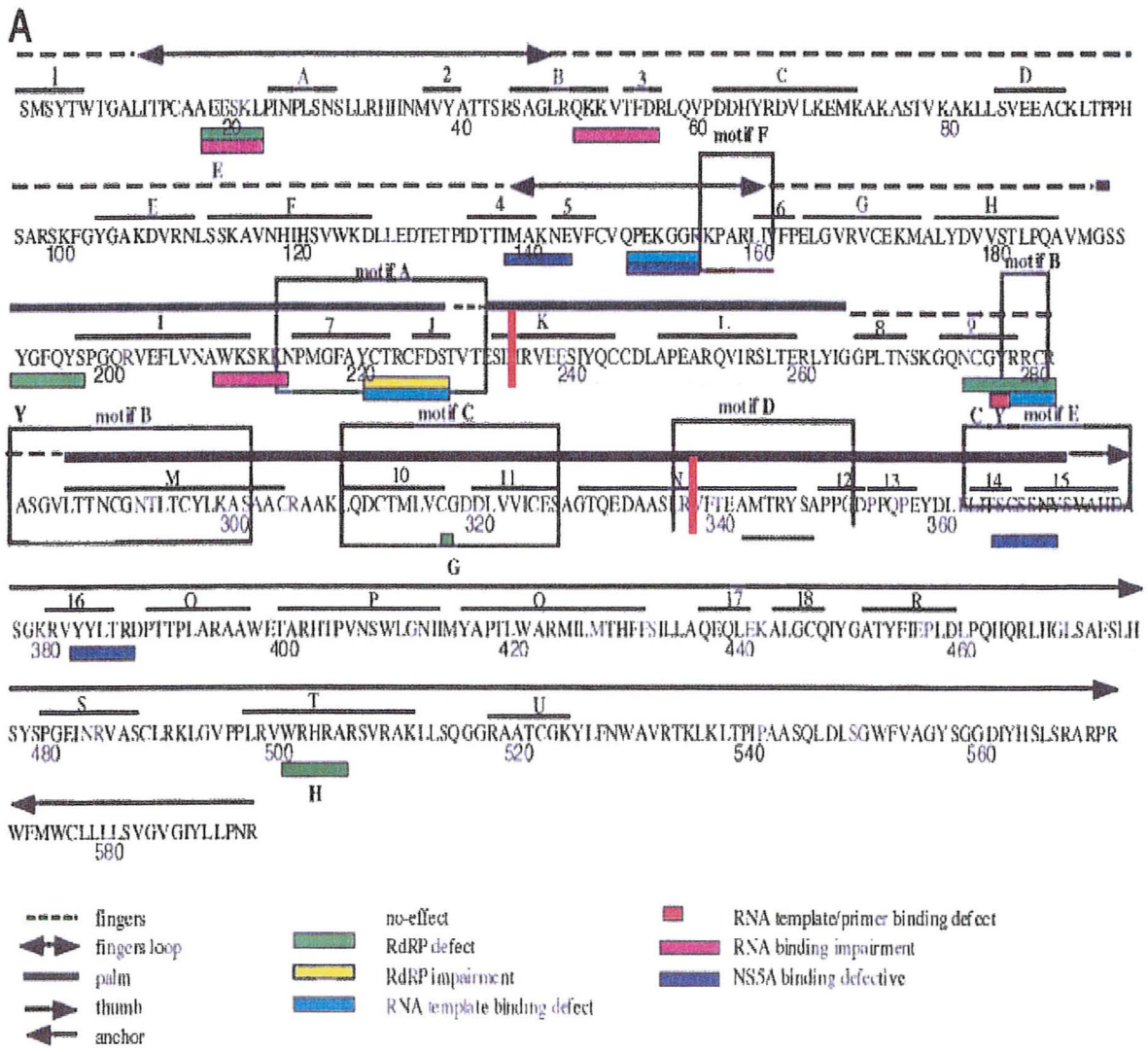



Figure 48 : Extraite de [127]. Structure primaire et effets divers des mutations de NS5b de la souche HCV JK-1. Les motifs connus de polymérases de A à F sont encadrés en noir, les nombres sur la séquence indiquent les hélices α et les lettres, les feuillets β. Les 2 barres verticales rouges délimitent la région amplifiée dans cette étude (AA 235→337).

Si l'on se réfère à la notation utilisée dans l'article de Qin et al [127], les mutations trouvées dans les souches que nous avons étudiées se situent essentiellement (14/17) en dehors de motifs très conservés A, B et C. Quelques-unes (4/17) sont localisées entre des structures secondaires en hélice ou en feuillet β (par exemple entre les hélices α 8 et 9 ou entre le feuillet β L et l'hélice α 8), les autres sont dans des feuillets β : 4 dans le feuillet β L, 3 dans le N, 2 dans le K et 2 dans le M. Aucune mutation n'est retrouvée dans les hélices α.

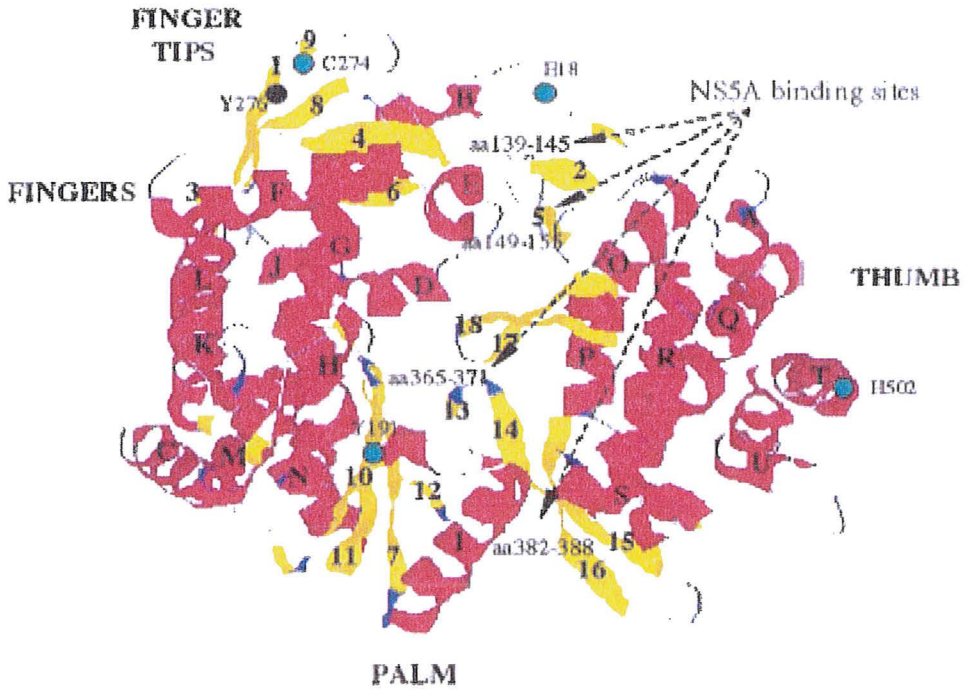



Figure 49 . Extraite de [127]. Représentation de la structure secondaire de la polymérase du VHC avec l'emplacement des acides aminés identifiés comme étant essentiels au fonctionnement de l'enzyme (cercles bleus et noirs). Les feuillets β sont en jaune et les hélices α en rouge.

Il faut cependant noter que lors de notre travail, nous n'avons séquencé que la souche virale majoritaire. Le clonage des produits d'amplification obtenus dans des plasmides bactériens pourrait permettre d'avoir une meilleure visibilité sur l'ensemble des sous-populations virales et éventuellement de mettre en évidence des phénomènes sous jacents dans l'équilibre des différentes populations qui n'aboutissent pas pour autant à la modification de la souche majoritaire. Ils pourraient donc être passés inaperçus dans cette étude. On pourrait ainsi peut être expliquer les variations observéesentre W0 et W12 pour les patients GR13 et GR19.

Nous n'avons donc pas mis en évidence de mutation de résistance à la ribavirine, chez la souche virale majoritaire au niveau du sérum, dans la région centrale de la polymérase du VHC étudiée. En revanche, nous trouvons des mutations qui, de par leur position et leur nombre, sont en accord avec les données déjà connues concernant la stabilité de la polymérase du VHC. Très

récemment, une équipe japonaise [85] vient de publier une étude qui met en évidence, par séquençage direct de la souche majoritaire, 2 mutations : la substitution d'un acide glutamique par une lysine en position 124, et celle d'une isoleucine par une valine en position 85. Ces mutations sont associées à un déclin de la charge virale à la 8ème semaine de traitement chez 5 patients répondeurs précoces par rapport à 3 non-répondeurs. Ces acides aminés étant situés en dehors de la région que nous avons amplifiée, il nous est impossible de dire si nos données concordent. Nous avions choisi d'amplifier le centre de la polymérase virale, car c'est là que se situe le site actif comme l'ont démontré de nombreuses équipes [27, 75, 95]. Mais, sans doute, et comme elle est très importante pour le virus, cette région est assez peu soumise aux mutations. Il est donc possible que les mutations recherchées se situent plus en aval dans une région plus éloignée du site actif, mais qu'elles puissent perturber l'incorporation des nucléotides par des modifications de potentiel électrostatique à la surface de la protéine, ou par d'autres mécanismes [85].

En conclusion, cette étude propose deux hypothèses, une pharmacologique et l'autre virologique, de mauvaise efficacité de la ribavirine chez certains patients traités pour une hépatite C chronique. Une méthode de dosage sérique de la ribavirine est proposée dans le but de permettre un suivi pharmacologique des patients sous traitement, afin d'essayer d'adapter au mieux les doses prescrites. Ceci permettrait de limiter les effets indésirables de la molécule et de s'assurer que sa concentration est suffisante pour avoir une chance d'être efficace. Ainsi, cette étude a posé les bases d'une étude prospective, RIBATOP, dont les objectifs sont d'étudier une éventuelle relation entre concentration sérique de ribavirine et diminution de la charge virale et/ou diminution du taux d'hémoglobine.

En ce qui concerne l'étude virologique, la première étape n'a pas mis en évidence de différence au niveau de la partie centrale de la polymérase virale entre les répondeurs et les non-répondeurs avant traitement. Un travail similaire sur les sérums des patients non-répondeurs à S12 et S24 de traitement ne permet pas non plus de mettre en évidence une sélection de souches de VHC mutées au niveau de la polymérase.

# CONCLUSION

**THESE SOUTENUE PAR** : Sylvie LARRAT

**TITRE :** RECHERCHE DE FACTEURS PHARMACOLOGIQUES ET VIROLOGIQUES DE REPONSE A LA RIBAVIRINE CHEZ LES PATIENTS TRAITES POUR UNE HEPATITE C CHRONIQUE

**CONCLUSION :**

La bithérapie interferon-α2 - ribavirine est le traitement actuel de l'hépatite virale chronique C. Plusieurs études pharmacologiques ont suggéré qu'il existait une grande variabilité inter-individuelle de la biodisponibilité de la ribavirine, ce qui pourrait influencer l'efficacité thérapeutique. Afin de mesurer les concentrations de cette molécule pendant la durée du traitement, nous avons développé et validé une méthode d'analyse quantitative adaptée à la pratique de routine. Cette méthode comprend une extraction en phase solide sur des cartouches d'acide phénylboronique suivie d'une chromatographie liquide haute pression avec une détection par rayonnement ultra-violet.

La sensibilité de la méthode, la linéarité de la courbe de calibration, la répétabilité et la reproductibilité intra et inter essais, de même que la stabilité de la ribavirine à 4°C, sont compatibles avec l'utilisation de cette technique en routine. De plus, les tests réalisés avec les analogues nucléosidiques utilisés dans le traitement des co-infections VHC-VIH montrent qu'ils n'interfèrent pas avec la méthode.

Dans un deuxième temps, une étude clinique a été réalisée *a posteriori* sur les sérums de 24 patients naïfs ayant une hépatite chronique virale C histologiquement prouvée (génotype 1). Le traitement comportait l'interféron α-2b (3 MUI, 3 fois/semaine) et la ribavirine (>10.6 mg/kg sauf chez un patient). La concentration sérique de ribavirine était mesurée pour chaque patient avant traitement ainsi qu'à la 12ème (S12) et à la 24ème (S24) semaine de traitement. La concentration moyenne de ribavirine dans le sérum était de 2.67 ± 1.03 µg/ml à S12 et 3.24 ± 1.35 µg/ml à S24. Les taux de ribavirine montraient une large variabilité inter-individuelle : les coefficients de variation des concentrations ajustées à la dose administrée étaient de 44 % à S12 et de 48 % à S24. La concentration de ribavirine rapportée à la dose administrée était significativement plus élevée ($p=0.030$ à S12 et $p=0.049$ à S24) chez les patients répondeurs (0.24 ± 0.03 µg/ml/dose à S12 et 0.28 ± 0.03 µg/ml/dose à S24, n=11) que chez les non-répondeurs (0.16 ± 0.2 µg/ml/dose à S12 et 0.21 ± 0.32 µg/ml/dose à S24, n=13).

La mise en évidence de faibles taux sériques de ribavirine associés à une non-réponse au traitement suggère que ce dosage pharmacologique pourrait être un outil intéressant pour le monitoring des patients traités contre le VHC, permettant éventuellement d'accroître l'efficacité

de la bi-thérapie mais aussi la sécurité d'utilisation de la ribavirine compte tenu de ses nombreux effets indésirables.

Parallèlement à l'étude pharmacologique, une étude virologique a été réalisée afin de vérifier si une non-réponse au traitement pouvait être expliquée, au moins en partie, par une résistance du virus à la ribavirine. En effet, la ribavirine étant un analogue nucléosidique incorporé au génome viral par la polymérase virale, nous avons émis l'hypothèse qu'un des modes de résistance possible à la ribavirine était une mutation de la polymérase.

Nous avons donc séquencé la région centrale (correspondant au site actif) de la polymérase du VHC, tout d'abord chez des patients non encore traités dont nous connaissions le statut répondeur/non-répondeur (étude a posteriori), afin de rechercher une éventuelle mutation initiale du gène de la polymérase. Il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre le statut répondeur/non-répondeur et la séquence de la polymérase virale avant traitement.

Les souches virales majoritaires des patients non répondeurs ont ensuite été séquencées à S12 et S24 afin de rechercher une éventuelle sélection de souches de VHC portant une mutation au niveau de la polymérase qui ne permettrait plus l'incorporation de ribavirine. On observe une moyenne de 7,3 mutations pour 330 pb sur 24 semaines, soit $4 \times 10^{-2}$ mutations par position nucléotidique par an. Environ 50 % de ces mutations conduisent à un changement d'acide aminé mais aucun n'est récurrent. Ces mutations se situent dans les parties les plus variables de la polymérase.

Nous n'avons donc pas mis en évidence de mutation de résistance à la ribavirine, chez la souche virale majoritaire au niveau du sérum, dans la région centrale de la polymérase du VHC étudiée. En revanche, nous retrouvons des mutations qui, de par leur position, et leur nombre sont en accord avec les données déjà connues concernant la stabilité de la polymérase du VHC.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

LE DOYEN :
(P.DEMENGE)

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
U.F.R.
DE
PHARMACIE
GRENOBLE 1

LE PRESIDENT DE LA THESE :
(E.DROUET)

LABORATOIRE DE [illegible]
MOLECULAIRE ET [illegible]
Emmanuel DROUET
Professeur des Universités

# Bibliographie

## Articles:


1. 1999. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. J Viral Hepat **6:**35-47.
2. **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:**831-6.
3. **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:**12766-71.
4. **Amin, A., J. Zaccardi, S. Mullen, S. Olland, M. Orlowski, B. Feld, P. Labonte, and P. Mak.** 2003. Identification of constrained peptides that bind to and preferentially inhibit the activity of the hepatitis C viral RNA-dependent RNA polymerase. Virology **313:**158-69.
5. **Aoyagi, K., C. Ohue, K. Iida, T. Kimura, E. Tanaka, K. Kiyosawa, and S. Yagi.** 1999. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. J Clin Microbiol **37:**1802-8.
6. **Bain, C., A. Fatmi, F. Zoulim, J. P. Zarski, C. Trepo, and G. Inchauspe.** 2001. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. Gastroenterology **120:**512-24.
7. **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:**1200-5.
8. **Barrett, S., J. Goh, B. Coughlan, E. Ryan, S. Stewart, A. Cockram, J. C. O'Keane, and J. Crowe.** 2001. The natural course of hepatitis C virus infection after 22 years in a unique homogenous cohort: spontaneous viral clearance and chronic HCV infection. Gut **49:**423-30.
9. **Bartenschlager, R.** 2004. Unexpected host range of hepatitis C virus replicons. Hepatology **39:**835-8.
10. **Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen.** 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. J Virol **68:**5045-55.
11. **Bartenschlager, R., and V. Lohmann.** 2000. Replication of hepatitis C virus. J Gen Virol **81:**1631-48.
12. **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:**4478-86.
13. **Batts, K. P., and J. Ludwig.** 1995. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. Am J Surg Pathol **19:**1409-17.
14. **Bianco, E., T. Stroffolini, E. Spada, A. Szklo, F. Marzolini, P. Ragni, G. Gallo, E. Balocchini, A. Parlato, M. Sangalli, P. L. Lopalco, and C. Zotti.** 2003. Case fatality rate of acute viral hepatitis in Italy: 1995-2000. An update. Dig Liver Dis **35:**404-8.
15. **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:**223-7.
16. **Bougie, I., and M. Bisaillon.** 2003. Initial binding of the broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin to the hepatitis C virus RNA polymerase. J Biol Chem **278:**52471-8. Epub 2003 Oct 16.

17. **Bouvier-Alias, M., K. Patel, H. Dahari, S. Beaucourt, P. Larderie, L. Blatt, C. Hezode, G. Picchio, D. Dhumeaux, A. U. Neumann, J. G. McHutchison, and J. M. Pawlotsky.** 2002. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. Hepatology **36:**211-8.
18. **Braconier, J. H., O. Paulsen, K. Engman, and A. Widell.** 1995. Combined alpha-interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C: a pilot study. Scand J Infect Dis **27:**325-9.
19. **Bradley, D. W.** 2000. Studies of non-A, non-B hepatitis and characterization of the hepatitis C virus in chimpanzees. Curr Top Microbiol Immunol **242:**1-23.
20. **Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco, and F. A. Rey.** 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A **96:**13034-9.
21. **Brillanti, S.** 2004. Role of amantadine and other adjuvant therapies in the treatment of hepatitis C. Semin Liver Dis **24:**89-95.
22. **Bruchfeld, A., K. Lindahl, R. Schvarcz, and L. Stahle.** 2002. Dosage of ribavirin in patients with hepatitis C should be based on renal function: a population pharmacokinetic analysis. Ther Drug Monit **24:**701-8.
23. **Bukh, J., R. H. Miller, and R. H. Purcell.** 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. Semin Liver Dis **15:**41-63.
24. **Butt, A. A.** 2003. Fatal lactic acidosis and pancreatitis associated with ribavirin and didanosine therapy. AIDS Read **13:**344-8.
25. **Cacoub, P., C. Renou, E. Rosenthal, P. Cohen, I. Loury, V. Loustaud-Ratti, A. M. Yamamoto, A. C. Camproux, P. Hausfater, L. Musset, P. Veyssier, G. Raguin, and J. C. Piette.** 2000. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatite C. Medicine (Baltimore) **79:**47-56.
26. **Camma, C., D. Di Bona, F. Schepis, E. J. Heathcote, S. Zeuzem, P. J. Pockros, P. Marcellin, L. Balart, A. Alberti, and A. Craxi.** 2004. Effect of peginterferon alfa-2a on liver histology in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. Hepatology **39:**333-42.
27. **Carroll, S. S., V. Sardana, Z. Yang, A. R. Jacobs, C. Mizenko, D. Hall, L. Hill, J. Zugay-Murphy, and L. C. Kuo.** 2000. Only a small fraction of purified hepatitis C RNA-dependent RNA polymerase is catalytically competent: implications for viral replication and in vitro assays. Biochemistry **39:**8243-9.
28. **Choo, Q. L., K. H. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, and P. J. Barr.** 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A **88:**2451-5.
29. **Chu, C. M., C. T. Yeh, and Y. F. Liaw.** 1999. Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus. Gut **45:**613-7.
30. **Cooper, S., A. L. Erickson, E. J. Adams, J. Kansopon, A. J. Weiner, D. Y. Chien, M. Houghton, P. Parham, and C. M. Walker.** 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. Immunity **10:**439-49.
31. **Cormier, E. G., F. Tsamis, F. Kajumo, R. J. Durso, J. P. Gardner, and T. Dragic.** 2004. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A **101:**7270-4. Epub 2004 May 03.
32. **Cribier, B., C. Schmitt, A. Bingen, A. Kirn, and F. Keller.** 1995. In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. J Gen Virol **76:**2485-91.
33. **Cristofari, G., R. Ivanyi-Nagy, C. Gabus, S. Boulant, J. P. Lavergne, F. Penin, and J. L. Darlix.** 2004. The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. Nucleic Acids Res **32:**2623-31. Print 2004.



U.J.F. MÉD. GRENOBLE

34. **Crotty, S., C. E. Cameron, and R. Andino.** 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. Proc Natl Acad Sci U S A **98:**6895-900. Epub 2001 May 22.
35. **Crotty, S., D. Maag, J. J. Arnold, W. Zhong, J. Y. Lau, Z. Hong, R. Andino, and C. E. Cameron.** 2000. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. Nat Med **6:**1375-9.
36. **Daiba, A., N. Inaba, S. Ando, N. Kajiyama, H. Yatsuhashi, H. Terasaki, A. Ito, M. Ogasawara, A. Abe, J. Yoshioka, K. Hayashida, S. Kaneko, M. Kohara, and S. Ito.** 2004. A low-density cDNA microarray with a unique reference RNA: pattern recognition analysis for IFN efficacy prediction to HCV as a model. Biochem Biophys Res Commun **315:**1088-96.
37. **Davis, G. L., R. Esteban-Mur, V. Rustgi, J. Hoefs, S. C. Gordon, C. Trepo, M. L. Shiffman, S. Zeuzem, A. Craxi, M. H. Ling, and J. Albrecht.** 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med **339:**1493-9.
38. **De Santis, M., B. Carducci, A. F. Cavaliere, L. De Santis, A. Lucchese, G. Straface, and A. Caruso.** 2003. Paternal exposure to ribavirin: pregnancy and neonatal outcome. Antivir Ther **8:**73-5.
39. **de Torres, M., and T. Poynard.** 2003. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. Ann Hepatol **2:**5-11.
40. **Drusano, G. L., and S. L. Preston.** 2004. A 48-week duration of therapy with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin may be too short to maximize long-term response among patients infected with genotype-1 hepatitis C virus. J Infect Dis **189:**964-70. Epub 2004 Feb 27.
41. **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.
42. **Escuret, V., P. Parvaz, O. Hantz, M. A. Petit, C. Trepo, and F. Zoulim.** 2002. [Study of the antiviral mechanism of action of ribavirin in the bovine viral diarrhea virus model]. Gastroenterol Clin Biol **26:**584-90.
43. **Everson, G. T.** 2004. Treatment of chronic hepatitis C in patients with decompensated cirrhosis. Rev Gastroenterol Disord **4:**S31-8.
44. **Farci, P., A. Shimoda, A. Coiana, G. Diaz, G. Peddis, J. C. Melpolder, A. Strazzera, 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:**339-44.
45. **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:**15394-9.
46. **Ferenci, P.** 2004. Predicting the therapeutic response in patients with chronic hepatitis C: the role of viral kinetic studies. J Antimicrob Chemother **53:**15-8. Epub 2003 Nov 25.
47. **Ferreira-Gonzalez, A., and M. L. Shiffman.** 2004. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. Semin Liver Dis **24:**9-18.
48. **Flint, M., E. R. Quinn, and S. Levy.** 2001. In search of hepatitis C virus receptor(s). Clin Liver Dis **5:**873-93.
49. **Forns, X., S. Ampurdanes, J. M. Sanchez-Tapias, M. Guilera, M. Sans, A. Sanchez-Fueyo, L. Quinto, P. Joya, M. Bruguera, and J. Rodes.** 2001. Long-term follow-up of chronic hepatitis C in patients diagnosed at a tertiary-care center. J Hepatol **35:**265-71.
50. **Foster, G. R.** 2004. Past, present, and future hepatitis C treatments. Semin Liver Dis **24:**97-104.

51. **Fried, M. W.** 2004. Viral factors affecting the outcome of therapy for chronic hepatitis C. Rev Gastroenterol Disord **4:**S8-S13.
52. **Fried, M. W., M. L. Shiffman, K. R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F. L. Goncales, 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:**975-82.
53. **Gale, M., Jr., C. M. Blakely, B. Kwieciszewski, S. L. Tan, M. Dossett, N. M. Tang, M. J. Korth, S. J. Polyak, D. R. Gretch, and M. G. Katze.** 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. Mol Cell Biol **18:**5208-18.
54. **Gallego, J., and G. Varani.** 2002. The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research. Biochem Soc Trans **30:**140-5.
55. **Garcia-Monzon, C., L. Garcia-Buey, A. Garcia-Sanchez, J. M. Pajares, and R. Moreno-Otero.** 1993. Down-regulation of intercellular adhesion molecule 1 on hepatocytes in viral chronic hepatitis treated with interferon alfa-2b. Gastroenterology **105:**462-9.
56. **Gates, A. T., R. T. Sarisky, and B. Gu.** 2004. Sequence requirements for the development of a chimeric HCV replicon system. Virus Res **100:**213-22.
57. **Gault, E., P. Soussan, Y. Morice, L. Sanders, A. Berrada, B. Rogers, and P. Deny.** 2003. Evaluation of a new serotyping assay for detection of anti-hepatitis C virus type-specific antibodies in serum samples. J Clin Microbiol **41:**2084-7.
58. **Giannelli, G., G. Antonelli, G. Fera, F. Dianzani, and O. Schiraldi.** 1993. 2',5'-Oligoadenylate synthetase activity as a responsive marker during interferon therapy for chronic hepatitis C. J Interferon Res **13:**57-60.
59. **Giuberti, T., M. G. Marin, C. Ferrari, S. Marchelli, C. Schianchi, A. M. Degli Antoni, G. Pizzocolo, and F. Fiaccadori.** 1994. Hepatitis C virus viremia following clinical resolution of acute hepatitis C. J Hepatol **20:**666-71.
60. **Glue, P.** 1999. The clinical pharmacology of ribavirin. Semin Liver Dis **19:**17-24.
61. **Glue, P., S. Schenker, S. Gupta, R. P. Clement, D. Zambas, and M. Salfi.** 2000. The single dose pharmacokinetics of ribavirin in subjects with chronic liver disease. Br J Clin Pharmacol **49:**417-21.
62. **Gruner, N. H., T. J. Gerlach, M. C. Jung, H. M. Diepolder, C. A. Schirren, W. W. Schraut, R. Hoffmann, R. Zachoval, T. Santantonio, M. Cucchiarini, A. Cerny, and G. R. Pape.** 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. J Infect Dis **181:**1528-36. Epub 2000 May 05.
63. **Guo, J. T., V. V. Bichko, and C. Seeger.** 2001. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. J Virol **75:**8516-23.
64. **Halfon, P., D. Ouzan, L. Cattan, and P. Cacoub.** 2004. [The diagnostic tools of hepatitis C virus infections]. Presse Med **33:**538-41.
65. **Hegenbarth, K., U. Maurer, P. M. Kroisel, P. Fickert, M. Trauner, and R. E. Stauber.** 2001. No evidence for mutagenic effects of ribavirin: report of two normal pregnancies. Am J Gastroenterol **96:**2286-7.
66. **Heo, T. H., J. H. Chang, J. W. Lee, S. K. Foung, J. Dubuisson, and C. Y. Kang.** 2004. Incomplete humoral immunity against hepatitis C virus is linked with distinct recognition of putative multiple receptors by E2 envelope glycoprotein. J Immunol **173:**446-55.
67. **Hoggard, P. G., S. Kewn, M. G. Barry, S. H. Khoo, and D. J. Back.** 1997. Effects of drugs on 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine phosphorylation in vitro. Antimicrob Agents Chemother **41:**1231-6.
68. **Homma, M., A. L. Jayewardene, J. Gambertoglio, and F. Aweeka.** 1999. High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in whole blood to assess disposition in erythrocytes. Antimicrob Agents Chemother **43:**2716-9.

69. **Honda, M., S. Kaneko, E. Matsushita, K. Kobayashi, G. A. Abell, and S. M. Lemon.** 2000. Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. Gastroenterology **118:**152-62.

70. **Hoofnagle, J. H., M. G. Ghany, D. E. Kleiner, E. Doo, T. Heller, K. Promrat, J. Ong, F. Khokhar, A. Soza, D. Herion, Y. Park, J. E. Everhart, and T. J. Liang.** 2003. Maintenance therapy with ribavirin in patients with chronic hepatitis C who fail to respond to combination therapy with interferon alfa and ribavirin. Hepatology **38:**66-74.

71. **Iacovacci, S., A. Manzin, S. Barca, M. Sargiacomo, A. Serafino, M. B. Valli, G. Macioce, H. J. Hassan, A. Ponzetto, M. Clementi, C. Peschle, and G. Carloni.** 1997. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. Hepatology **26:**1328-37.

72. **Ilan, E., T. Burakova, S. Dagan, O. Nussbaum, I. Lubin, R. Eren, O. Ben-Moshe, J. Arazi, S. Berr, L. Neville, L. Yuen, T. S. Mansour, J. Gillard, A. Eid, O. Jurim, D. Shouval, Y. Reisner, and E. Galun.** 1999. The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents. Hepatology **29:**553-62.

73. **Imbert-Bismut, F., V. Ratziu, L. Pieroni, F. Charlotte, Y. Benhamou, and T. Poynard.** 2001. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. Lancet **357:**1069-75.

74. **Iredale, J. P., R. C. Benyon, J. Pickering, M. McCullen, M. Northrop, S. Pawley, C. Hovell, and M. J. Arthur.** 1998. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. J Clin Invest **102:**538-49.

75. **Ishii, K., Y. Tanaka, C. C. Yap, H. Aizaki, Y. Matsuura, and T. Miyamura.** 1999. Expression of hepatitis C virus NS5B protein: characterization of its RNA polymerase activity and RNA binding. Hepatology **29:**1227-35.

76. **Jarvis, S. M., J. A. Thorn, and P. Glue.** 1998. Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (es)-nucleoside transporters. Br J Pharmacol **123:**1587-92.

77. **Jen, J. F., P. Glue, S. Gupta, D. Zambas, and G. Hajian.** 2000. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C. Ther Drug Monit **22:**555-65.

78. **Kaito, M., S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki, M. Kohara, M. Baba, M. Takegawa, K. Miyamoto, and R. Kakehashi.** 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study

Propagation of hepatitis A virus in a renal cell line JTC-12.P3 of cynomolgus monkey origin

Appropriate interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C: an assessment by quantitative changes in serum hepatitis C virus-RNA. J Gen Virol **75:**1755-60.

79. **Kamal, S. M., A. Ismail, C. S. Graham, Q. He, J. W. Rasenack, T. Peters, A. A. Tawil, J. J. Fehr, S. Khalifa Kel, M. M. Madwar, and M. J. Koziel.** 2004. Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics. Hepatology **39:**1721-31.

80. **Kato, N., Y. Ootsuyama, H. Sekiya, S. Ohkoshi, T. Nakazawa, M. Hijikata, and K. Shimotohno.** 1994. Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. J Virol **68:**4776-84.

81. **Kato, T., A. Furusaka, M. Miyamoto, T. Date, K. Yasui, J. Hiramoto, K. Nagayama, T. Tanaka, and T. Wakita.** 2001. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. J Med Virol **64:**334-9.

82. **Kenny-Walsh, E.** 1999. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. N Engl J Med **340:**1228-33.

83. **Kew, M., G. Francois, D. Lavanchy, H. Margolis, P. Van Damme, P. Grob, J. Hallauer, D. Shouval, G. Leroux-Roels, and A. Meheus.** 2004. Prevention of hepatitis C virus infection. J Viral Hepat **11:**198-205.
84. **Khakoo, S., P. Glue, L. Grellier, B. Wells, A. Bell, C. Dash, I. Murray-Lyon, D. Lypnyj, B. Flannery, K. Walters, and G. M. Dusheiko.** 1998. Ribavirin and interferon alfa-2b in chronic hepatitis C: assessment of possible pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions. Br J Clin Pharmacol **46:**563-70.
85. **Kumagai, N., N. Takahashi, M. Kinoshita, S. Tsunematsu, K. Tsuchimoto, H. Saito, and H. Ishii.** 2004. Polymorphisms of NS5B protein relates to early clearance of hepatitis C virus by interferon plus ribavirin: a pilot study. J Viral Hepat **11:**225-35.
86. **Kuramoto, I. K., T. Moriya, V. Schoening, and P. V. Holland.** 2002. Fluctuation of serum HCV-RNA levels in untreated blood donors with chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat **9:**36-42.
87. **Lafeuillade, A., G. Hittinger, and S. Chadapaud.** 2001. Increased mitochondrial toxicity with ribavirin in HIV/HCV coinfection. Lancet **357:**280-1.
88. **Lanford, R. E., D. Chavez, B. Guerra, J. Y. Lau, Z. Hong, K. M. Brasky, and B. Beames.** 2001. Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. J Virol **75:**8074-81.
89. **Larrat, S., F. Stanke-Labesque, A. Plages, J. P. Zarski, G. Bessard, and C. Souvignet.** 2003. Ribavirin quantification in combination treatment of chronic hepatitis C. Antimicrob Agents Chemother **47:**124-9.
90. **Lau, J. Y., R. C. Tam, T. J. Liang, and Z. Hong.** 2002. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. Hepatology **35:**1002-9.
91. **Lee, S. C., A. Antony, N. Lee, J. Leibow, J. Q. Yang, S. Soviero, K. Gutekunst, and M. Rosenstraus.** 2000. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. J Clin Microbiol **38:**4171-9.
92. **Leroy, V., F. Monier, S. Bottari, C. Trocme, N. Sturm, M. N. Hilleret, F. Morel, and J. P. Zarski.** 2004. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. Am J Gastroenterol **99:**271-9.
93. **Li, X., L. J. Jeffers, L. Shao, K. R. Reddy, M. de Medina, J. Scheffel, B. Moore, and E. R. Schiff.** 1995. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. J Viral Hepat **2:**227-34.
94. **Llinas-Brunet, M., M. D. Bailey, G. Bolger, C. Brochu, A. M. Faucher, J. M. Ferland, M. Garneau, E. Ghiro, V. Gorys, C. Grand-Maitre, T. Halmos, N. Lapeyre-Paquette, F. Liard, M. Poirier, M. Rheaume, Y. S. Tsantrizos, and D. Lamarre.** 2004. Structure-activity study on a novel series of macrocyclic inhibitors of the hepatitis C virus NS3 protease leading to the discovery of BILN 2061. J Med Chem **47:**1605-8.
95. **Lohmann, V., F. Korner, U. Herian, and R. Bartenschlager.** 1997. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. J Virol **71:**8416-28.
96. **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:**110-3.
97. **Lu, L., T. J. Pilot-Matias, K. D. Stewart, J. T. Randolph, R. Pithawalla, W. He, P. P. Huang, L. L. Klein, H. Mo, and A. Molla.** 2004. Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. Antimicrob Agents Chemother **48:**2260-6.
98. **Lunel, F., and L. Musset.** 1998. Hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia. J Hepatol **29:**848-55.

99. **Maag, D., C. Castro, Z. Hong, and C. E. Cameron.** 2001. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. J Biol Chem **276:**46094-8. Epub 2001 Oct 15.
100. **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:**958-65.
101. **Mbow, M. L., and R. T. Sarisky.** 2004. What is disrupting IFN-alpha's antiviral activity? Trends Biotechnol **22:**395-9.
102. **McCormick, J. B., I. J. King, P. A. Webb, C. L. Scribner, R. B. Craven, K. M. Johnson, L. H. Elliott, and R. Belmont-Williams.** 1986. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. N Engl J Med **314:**20-6.
103. **McCoy, M. A., M. M. Senior, J. J. Gesell, L. Ramanathan, and D. F. Wyss.** 2001. Solution structure and dynamics of the single-chain hepatitis C virus NS3 protease NS4A cofactor complex. J Mol Biol **305:**1099-110.
104. **Mercer, D. F., D. E. Schiller, J. F. Elliott, D. N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W. R. Addison, K. P. Fischer, T. A. Churchill, J. R. Lakey, D. L. Tyrrell, and N. M. Kneteman.** 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. Nat Med **7:**927-33.
105. **Mishkin, D., and M. Deschenes.** 2001. Conception soon after discontinuing interferon/ribavirin therapy: a successful outcome. Am J Gastroenterol **96:**2285-6.
106. **Moreno, A., C. Quereda, L. Moreno, M. J. Perez-Elias, A. Muriel, J. L. Casado, A. Antela, F. Dronda, E. Navas, R. Barcena, and S. Moreno.** 2004. High rate of didanosine-related mitochondrial toxicity in HIV/HCV-coinfected patients receiving ribavirin. Antivir Ther **9:**133-8.
107. **Moriya, K., H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, and K. Koike.** 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. Nat Med **4:**1065-7.
108. **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:**103-7.
109. **Nikolaeva, L. I., N. P. Blokhina, N. N. Tsurikova, N. V. Voronkova, M. I. Miminoshvili, D. M. Braginsky, O. N. Yastrebova, O. B. Booynitskaya, O. V. Isaeva, M. I. Michailov, and A. I. Archakov.** 2002. Virus-specific antibody titres in different phases of hepatitis C virus infection. J Viral Hepat **9:**429-37.
110. **Orland, J. R., T. L. Wright, and S. Cooper.** 2001. Acute hepatitis C. Hepatology **33:**321-7.
111. **Papatheodoridis, G. V., and E. Cholongitas.** 2004. Chronic hepatitis C and no response to antiviral therapy: potential current and future therapeutic options. J Viral Hepat **11:**287-96.
112. **Patil, S. D., L. Y. Ngo, P. Glue, and J. D. Unadkat.** 1998. Intestinal absorption of ribavirin is preferentially mediated by the Na+-nucleoside purine (N1) transporter. Pharm Res **15:**950-2.
113. **Patterson, J. L., and R. Fernandez-Larsson.** 1990. Molecular mechanisms of action of ribavirin. Rev Infect Dis **12:**1139-46.
114. **Pawlotsky, J. M.** 2003. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. Curr Opin Infect Dis **16:**587-92.
115. **Pawlotsky, J. M., H. Dahari, A. U. Neumann, C. Hezode, G. Germanidis, I. Lonjon, L. Castera, and D. Dhumeaux.** 2004. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. Gastroenterology **126:**703-14.
116. **Pedder, S. C.** 2003. Pegylation of interferon alfa: structural and pharmacokinetic properties. Semin Liver Dis **23:**19-22.

117. **Perrin, A., D. Duracher, M. Perret, P. Cleuziat, and B. Mandrand.** 2003. A combined oligonucleotide and protein microarray for the codetection of nucleic acids and antibodies associated with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infections. Anal Biochem **322:**148-55.
118. **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:**6373-80.
119. **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:**938-41.
120. **Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tordo.** 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. Embo J **8:**3867-74.
121. **Pol, S., P. Couzigou, M. Bourliere, A. Abergel, J. M. Combis, D. Larrey, A. Tran, J. Moussalli, R. Poupon, P. Berthelot, and C. Brechot.** 1999. A randomized trial of ribavirin and interferon-alpha vs. interferon-alpha alone in patients with chronic hepatitis C who were non-responders to a previous treatment. Multicenter Study Group under the coordination of the Necker Hospital, Paris, France. J Hepatol **31:**1-7.
122. **Polyak, S. J., and M. Gerotto.** 2000. The molecular basis for responsiveness to anti-viral therapy in hepatitis C. Forum (Genova) **10:**46-58.
123. **Porter, D. J., S. A. Short, M. H. Hanlon, F. Preugschat, J. E. Wilson, D. H. Willard, Jr., and T. G. Consler.** 1998. Product release is the major contributor to kcat for the hepatitis C virus helicase-catalyzed strand separation of short duplex DNA. J Biol Chem **273:**18906-14.
124. **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:**825-32.
125. **Preston, S. L., G. L. Drusano, P. Glue, J. Nash, S. K. Gupta, and P. McNamara.** 1999. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ribavirin in healthy volunteers as determined by stable-isotope methodology. Antimicrob Agents Chemother **43:**2451-6.
126. **Puig-Basagoiti, F., J. C. Saiz, X. Forns, S. Ampurdanes, M. Gimenez-Barcons, S. Franco, A. Sanchez-Fueyo, J. Costa, J. M. Sanchez-Tapias, and J. Rodes.** 2001. Influence of the genetic heterogeneity of the ISDR and PePHD regions of hepatitis C virus on the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. J Med Virol **65:**35-44.
127. **Qin, W., T. Yamashita, Y. Shirota, Y. Lin, W. Wei, and S. Murakami.** 2001. Mutational analysis of the structure and functions of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. Hepatology **33:**728-37.
128. **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:**120-31.
129. **Reed, K. E., A. Grakoui, and C. M. Rice.** 1995. Hepatitis C virus-encoded NS2-3 protease: cleavage-site mutagenesis and requirements for bimolecular cleavage. J Virol **69:**4127-36.
130. **Reichard, O., J. Andersson, R. Schvarcz, and O. Weiland.** 1991. Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. Lancet **337:**1058-61.
131. **Rosenberg, S.** 2001. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. J Mol Biol **313:**451-64.
132. **Ross, A. S., A. K. Bhan, M. Pascual, M. Thiim, A. Benedict Cosimi, and R. T. Chung.** 2004. Pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin in the treatment of post-liver transplant recurrent hepatitis C. Clin Transplant **18:**166-73.
133. **Sagnelli, E., N. Coppola, C. Marrocco, G. Coviello, G. Rossi, M. Battaglia, C. Sagnelli, V. Messina, A. Tonziello, C. Scolastico, and P. Filippini.** 2003. Diagnosis of HCV related acute hepatitis by serial determination of IgM to HCV: a preliminary observation. J Biol Regul Homeost Agents **17:**207-10.

134. **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:**11646-51. Epub 2003 Sep 22.
135. **Saldanha, J.** 2001. Validation and standardisation of nucleic acid amplification technology (NAT) assays for the detection of viral contamination of blood and blood products. J Clin Virol **20:**7-13.
136. **Samuel, C. E.** 1991. Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. Virology **183:**1-11.
137. **Santantonio, T.** 2004. Treatment of acute hepatitis C. Curr Pharm Des **10:**2077-80.
138. **Schroter, M., B. Zollner, P. Schafer, R. Laufs, and H. H. Feucht.** 2001. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA by light cycler PCR and comparison with two different PCR assays. J Clin Microbiol **39:**765-8.
139. **Scott, L. J., and C. M. Perry.** 2002. Interferon-alpha-2b plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C. Drugs **62:**507-56.
140. **Shah, V. P., K. K. Midha, J. W. Findlay, H. M. Hill, J. D. Hulse, I. J. McGilveray, G. McKay, K. J. Miller, R. N. Patnaik, M. L. Powell, A. Tonelli, C. T. Viswanathan, and A. Yacobi.** 2000. Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. Pharm Res **17:**1551-7.
141. **Shimizu, Y. K., S. M. Feinstone, M. Kohara, R. H. Purcell, and H. Yoshikura.** 1996. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. Hepatology **23:**205-9.
142. **Shioda, A., M. Moriyama, N. Hayashi, M. Sugitani, T. Uchida, T. Shikata, A. Nishizono, K. Abe, and Y. Arakawa.** 2000. Immunoglobulin G and M hepatitis C virus core antibody (JCC.2) response in chimpanzees infected experimentally with hepatitis C virus. Intervirology **43:**146-53.
143. **Simmonds, P.** 2001. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. J Gen Virol **82:**693-712.
144. **Smith, R. H., and B. E. Gilbert.** 1987. Quantification of ribavirin in biological fluids and tissues by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr **414:**202-10.
145. **Souvignet, C., and J. P. Zarski.** 2000. Combination treatment for chronic hepatitis C: what is the role of ribavirin? Fundam Clin Pharmacol **14:**321-5.
146. **Streeter, D. G., J. T. Witkowski, G. P. Khare, R. W. Sidwell, R. J. Bauer, R. K. Robins, and L. N. Simon.** 1973. Mechanism of action of 1- -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. Proc Natl Acad Sci U S A **70:**1174-8.
147. **Sulkowski, M. S., R. Wasserman, L. Brooks, L. Ball, and R. Gish.** 2004. Changes in haemoglobin during interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat **11:**243-50.
148. **Svensson, J. O., A. Bruchfeld, R. Schvarcz, and L. Stahle.** 2000. Determination of ribavirin in serum using highly selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Ther Drug Monit **22:**215-8.
149. **Taguchi, T., M. Nagano-Fujii, M. Akutsu, H. Kadoya, S. Ohgimoto, S. Ishido, and H. Hotta.** 2004. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. J Gen Virol **85:**959-69.
150. **Takimoto, M., S. Ohkoshi, T. Ichida, Y. Takeda, M. Nomoto, H. Asakura, A. Naito, S. Mori, K. Hata, K. Igarashi, H. Hara, H. Ohta, K. Soga, T. Watanabe, and T. Kamimura.** 2002. Interferon inhibits progression of liver fibrosis and reduces the risk of hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C: a retrospective multicenter analysis of 652 patients. Dig Dis Sci **47:**170-6.

151. **Tan, S. L., A. Pause, Y. Shi, and N. Sonenberg.** 2002. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. Nat Rev Drug Discov **1:**867-81.
152. **Tanaka, E., C. Ohue, K. Aoyagi, K. Yamaguchi, S. Yagi, K. Kiyosawa, and H. J. Alter.** 2000. Evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis C virus (HCV) core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. Hepatology **32:**388-93.
153. **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:**107-10.
154. **Thelu, M. A., E. Drouet, M. N. Hilleret, and J. P. Zarski.** 2004. Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. J Med Virol **72:**396-405.
155. **Tong, M. J., L. M. Blatt, J. G. McHutchison, R. L. Co, and A. Conrad.** 1997. Prediction of response during interferon alfa 2b therapy in chronic hepatitis C patients using viral and biochemical characteristics: a comparison. Hepatology **26:**1640-5.
156. **Trujillo-Murillo Kdel, C., L. Garza-Rodriguez Mdel, H. G. Martinez-Rodriguez, H. A. Barrera-Saldana, F. Bosques-Padilla, J. Ramos-Jimenez, and A. M. Rivas-Estilla.** 2004. Experimental models for hepatitis C virus (HCV): new opportunities for combating hepatitis C. Ann Hepatol **3:**54-62.
157. **Tsubota, A., N. Akuta, F. Suzuki, Y. Suzuki, T. Someya, M. Kobayashi, Y. Arase, S. Saitoh, K. Ikeda, and H. Kumada.** 2002. Viral dynamics and pharmacokinetics in combined interferon alfa-2b and ribavirin therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high pretreatment viral load. Intervirology **45:**33-42.
158. **Tsushima, H., S. Kawata, S. Tamura, N. Ito, Y. Shirai, S. Kiso, Y. Doi, A. Yamada, O. Oshikawa, and Y. Matsuzawa.** 1999. Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. J Hepatol **30:**1-7.
159. **Villano, S. A., D. Vlahov, K. E. Nelson, S. Cohn, and D. L. Thomas.** 1999. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. Hepatology **29:**908-14.
160. **Vo, N. V., K. C. Young, and M. M. Lai.** 2003. Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. Biochemistry **42:**10462-71.
161. **Vollmer, J., R. Rankin, H. Hartmann, M. Jurk, U. Samulowitz, T. Wader, A. Janosch, C. Schetter, and A. M. Krieg.** 2004. Immunopharmacology of CpG oligodeoxynucleotides and ribavirin. Antimicrob Agents Chemother **48:**2314-7.
162. **Vrielink, H., H. L. Zaaijer, H. W. Reesink, J. Borst-Loef, H. T. Cuypers, and P. N. Lelie.** 1995. Performance of a new third-generation anti-hepatitis C virus ELISA (Monolisa anti-HCV new antigens) in various serum panels. Vox Sang **69:**257-8.
163. **Watashi, K., and K. Shimotohno.** 2003. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: a novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. Cancer Sci **94:**937-43.
164. **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:**2755-9.
165. **Wray, S. K., B. E. Gilbert, M. W. Noall, and V. Knight.** 1985. Mode of action of ribavirin: effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. Antiviral Res **5:**29-37.
166. **Wu, J. Z., and Z. Hong.** 2003. Targeting NS5B RNA-dependent RNA polymerase for anti-HCV chemotherapy. Curr Drug Targets Infect Disord **3:**207-19.
167. **Wunschmann, S., J. D. Medh, D. Klinzmann, W. N. Schmidt, and J. T. Stapleton.** 2000. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. J Virol **74:**10055-62.

168. **Xie, Z. C., J. I. Riezu-Boj, J. J. Lasarte, J. Guillen, J. H. Su, M. P. Civeira, and J. Prieto.** 1998. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. Virology **244:**513-20.
169. **Yeh, S. H., P. J. Chen, W. Y. Shau, Y. W. Chen, P. H. Lee, J. T. Chen, and D. S. Chen.** 2001. Chromosomal allelic imbalance evolving from liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. Gastroenterology **121:**699-709.
170. **Zein, N. N.** 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. Clin Microbiol Rev **13:**223-35.
171. **Zeuzem, S., J. M. Schmidt, J. H. Lee, M. von Wagner, G. Teuber, and W. K. Roth.** 1998. Hepatitis C virus dynamics in vivo: effect of ribavirin and interferon alfa on viral turnover. Hepatology **28:**245-52.
172. **Zitron, I. M., M. Laurinaitis, L. Qu, A. L. Silverman, and S. C. Gordon.** 2000. Immunological responses in patients who have spontaneously eradicated hepatitis C virus infection. Viral Immunol **13:**521-31.
173. **Zoulim, F., and C. Trepo.** 1994. Nucleoside analogs in the treatment of chronic viral hepatitis. Efficiency and complications. J Hepatol **21:**142-4.

## Ouvrages et Textes d'experts:

173bis.**Pawlotsky, JM., and D. Dhumeaux.** Hépatite C. Editions E.D.K, Paris, 2004
174. **Mammette, A.** Virologie médicale. Collection Azay. Editions Presses universitaires de Lyon, Lyon, 2002.
175. **Germi, R.** Multiplication du virus de l'hépatite C dans les cultures cellulaires. Les cellules AP61 de moustique permettent la fixation, la multiplication et le maintien du virus en culture pendant plusieurs passages. Thèse d'exercice. Grenoble, 1999.
176 **Querenghi, F.** Action de la ribavirine sur la variabilité génétique de la région hypervariable 1 (HVR1) du virus de l'hépatite C et sur la réponse immunitaire anti-VHC chez les patients atteints. Thèse d'exercice. Lyon, 2000.
177. **Henderson, LE.** Physicians' research network notebook. Volume 6, Number 1, March 2001
178. Textes des experts. Conférence de consensus. Traitement de l'hépatite C. ANAES. Février, Paris, 2002

## Sites internet:

http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/HepatitisC/epidmain.html
http://www.doctissimo.fr/hepatite_c.htm.
http://www.labnews.de//en/specials/hep/h_c/hc_classi.php
http://www.medscape.com
http://www.medscape.com/viewprogram/2035_pnt
http://www.lionden.com/ap2out-lymph.htm

# Annexe

Table des Codons:

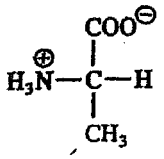
| The Genetic Code (mRNA codons) | | | |
|---|---|---|---|
| UUU, UUC: phe<br>UUA, UUG: leu | CUU, CUC, CUA, CUG: leu | AUU, AUC, AUA: ile<br>AUG: start/met | GUU, GUC, GUA, GUG: val |
| UCU, UCC, UCA, UCG: ser | CCU, CCC, CCA, CCG: pro | ACU, ACC, ACA, ACG: thr | GCU, GCC, GCA, GCG: ala |
| UAU, UAC: tyr<br>UAA: stop<br>UAG: stop | CAU, CAC: his<br>CAA, CAG: gln | AAU, AAC: asn<br>AAA, AAG: lys | GAU, GAC: asp<br>GAA, GAG: glu |
| UGU, UGC: cys<br>UGA: stop<br>UGG: trp | CGU, CGC, CGA, CGG: arg | AGU, AGC: ser<br>AGA, AGG: arg | GGU, GGC, GGA, GGG: gly |

| Nom | Abréviations | Nature du groupement R | Formule du groupement R | Rôle dans la structure des protéines | Essentiel |
|---|---|---|---|---|---|
| Alanine | Ala, A | Aliphatique | (CH3)2-CH- | Non Polaire. Le faible encombrement stérique confère la flexibilité à la chaîne protéique | Non |
| Arginine | Arg, R | Diamine | NH2-C($NH2^+$)-NH-(CH2)3- | Polaire. Chargé positivement | Non |
| Asparagine | Asn, N | Amide | NH2-CO-CH2- | Polaire. Non chargé | Non |
| Aspartate | Asp, D | Carbonate | $COO^-$-CH2-CH2- | Polaire. Chargé négativement | Non |
| Cystéine | Cus C | Groupe soufré | -CG2-SH | Polaire. Non chargé. Forme des ponts disulfures entre les chaînes qui stabilisent la structure | Non |
| Glutamine | Gln, Q | Amide | NH2-CO-CH2-CH2- | Polaire. Non chargé | Non |
| Glycine | Gly, G | Aliphatique | H- | Non Polaire. Le faible encombrement stérique confère la flexibilité à la chaîne protéique | Non |
| Histidine | His, H | Imidazole | Im-CH2- | Polaire. Basique | Non |
| Isoleucine | Ile, I | Aliphatique | CH3-CH2-C(CH3)H- | Non Polaire. Le faible encombrement stérique confère la flexibilité à la chaîne protéique | Oui |
| Leucine | Leu, L | Aliphatique | (CH3)2-CH-CH2- | Non Polaire. Le faible encombrement stérique confère la flexibilité à la chaîne protéique | Oui |
| Lysine | Lys, K | Diamine | $NH3^+$-(CH2)4- | Polaire. Chargé positivement | Oui |
| Méthionine | Met, M | Groupe soufré | CH3-S-CH2-CH2- | Polaire. Non chargé. Forme des ponts disulfures entre les chaînes qui stabilisent la structure | Oui |
| Phénylalanine | Phe, F | Aromatique | Phe-CH2- | Non Polaire. | Oui |
| Proline | Pro, P | | (N)-CH2-CH2-CH2- | Non Polaire. L'hétérocycle (le dernier carbone est relié au N de la fonction amine) confère rigidité à la chaîne protéique | Non |
| Sérine | Ser, S | Alcool | -CG2-OH | Polaire. Non chargé | Non |
| Thréonine | Thr, T | Alcool | -C(CH3)H-OH | Polaire. Non chargé | Oui |
| Tryptophane | Trp, W | Noyau Indole | In-CH2- | Le noyau indole (In) absorbe très fortement les UV | Oui |
| Tyrosine | Tyr, Y | Aromatique | PheOH-CH2- | Non polaire. | Non |
| Valine | Val, V | Aliphatique | (CH3)2-CH- | Non Polaire. Le faible encombrement stérique confère la flexibilité à la chaîne protéique | Oui |

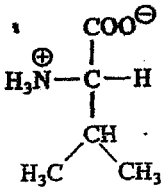
Tableau avec les principaux acides aminés et leurs propriétés principales

DOCUMENT 1 :

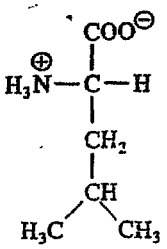
Formule des Acides Aminés à pH = 7



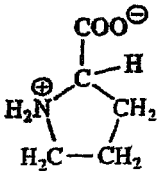
Alanine [A] (Ala)



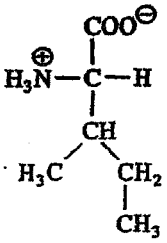
Valine [V] (Val)



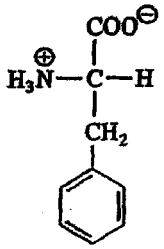
Leucine [L] (Leu)



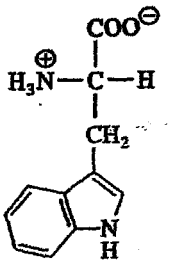
Proline [P] (Pro)



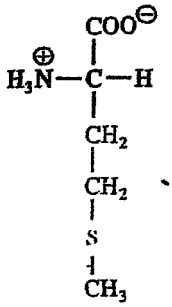
Isoleucine [I] (Ile)



Phénylalanine [F] (Phé)



Tryptophane [W] (Trp)

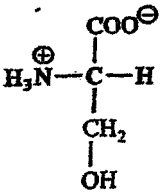


Méthionine [M] (Mét)

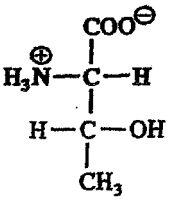
HYDROPHOBES



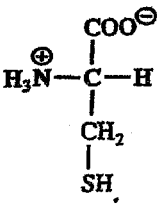
Glycine [G] (Gly)



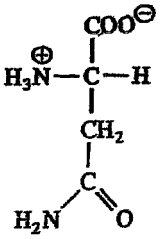
Sérine [S] (Sér)



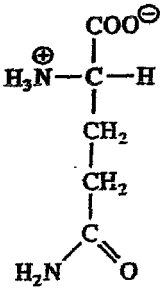
Thréonine [T] (Thr)



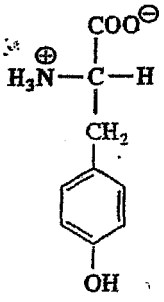
Cystéine [C] (Cys)



Asparagine [N] (Asn)



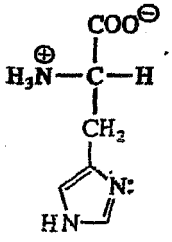
Glutamine [Q] (Gln)



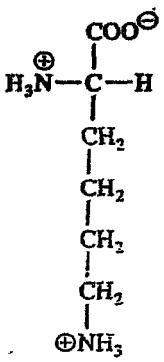
Tyrosine [Y] (Tyr)

RADICAUX HYDROPHILES

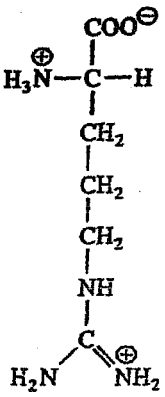
Il existe aussi des acides aminés basiques qui sont juste polaires



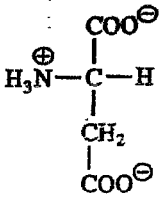
Histidine [H] (His)



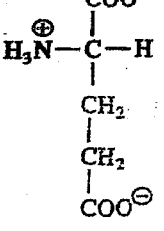
Lysine [K] (Lys)



Arginine [R] (Arg)



Aspartate [D] (Asp)



Glutamate [E] (Glu)

basique

acide

/3

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Jan. 2003, p. 124–129 Vol. 47, No. 1
0066-4804/03/$08.00+0 DOI: 10.1128/AAC.47.1.124–129.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

# Ribavirin Quantification in Combination Treatment of Chronic Hepatitis C

Sylvie Larrat,[1] Françoise Stanke-Labesque,[1]* Agnès Plages,[2] Jean-Pierre Zarski,[2] Germain Bessard,[1] and Claude Souvignet[2]

*Laboratory of Pharmacology[1] and Hepato-Gastro-Enterology Department,[2] Grenoble University Hospital, BP217, F-38043 Grenoble Cedex 09, France*

Received 29 May 2002/Returned for modification 13 August 2002/Accepted 7 October 2002

**Ribavirin in combination with alpha 2 interferon is the consensus treatment for chronic hepatitis C. However, recent preliminary pharmacological studies have suggested that the bioavailability of ribavirin displays great interindividual variability. In order to monitor serum ribavirin levels during combination treatment, we developed and validated a quantitative assay using an approach adaptable for routine hospital laboratories. The method involved solid-phase extraction on phenyl boronic acid cartridges followed by high-performance liquid chromatography with a $C_{18}$-bonded silica column and a mobile phase containing 10 mM ammonium phosphate buffer (with the pH adjusted to 2.5) and UV detection (207 nm). The sensitivity, recovery, linearity of the calibration curve, intra- and interassay accuracies, precision, and stability at 4°C were consistent with its use in the laboratory routine. In addition, other nucleoside analogues sometimes used with ribavirin in patients coinfected with hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus did not interfere with the quantification of ribavirin levels. The ribavirin concentration was quantified in 24 serum samples from patients with chronic hepatitis C treated with a combination of ribavirin and alpha 2 interferon. The mean serum ribavirin concentration was 2.67 ± 1.06 μg/ml ($n$ = 24) at week 12 of treatment (W12) and 3.24 ± 1.35 μg/ml ($n$ = 24) at week 24 of treatment (W24). In addition, ribavirin concentrations displayed high interindividual variabilities: the coefficients of variation of the serum ribavirin concentrations adjusted to the administered dose were 44 and 48% at W12 and W24, respectively. Moreover, the ribavirin concentration was higher in patients with a sustained virological response ($n$ = 11) than in patients with treatment failure ($n$ = 13), with significant intergroup differences at W12 ($P$ = 0.030) and W24 ($P$ = 0.049). The present study describes a simple analytical method for the quantification of ribavirin in human serum that could be a useful tool for the monitoring of ribavirin concentrations in HCV-infected patients in order to improve the efficacy and safety of therapy with ribavirin plus interferon.**

In patients chronically infected with hepatitis C virus (HCV), combination therapy with ribavirin plus alpha 2 interferon has greatly improved the rates of sustained biochemical and virological response compared to those achieved with interferon monotherapy (3, 6, 12, 14). Unfortunately, more than 40% of treated patients either remain nonresponsive or have relapses with this treatment. Although some epidemiological factors support the predictive value of the treatment in terms of the long-term outcome, no clear explanation for the lack of efficacy in some patient subgroups has been provided. Resistance to interferon is the hypothesis that has been the most investigated, but other mechanisms including those related to ribavirin should also be closely examined.

The pharmacokinetics of ribavirin were initially investigated in studies with healthy volunteers and patients after the administration of either a single dose or multiple doses (4). Although intermediate bioavailability and a high level of interindividual variability were described, no further evaluation was performed with patients with chronic HCV infection receiving combination therapy. However, the extensive use of this drug, which induces numerous side effects, requires complementary pharmacological investigations in order to adjust the dose of the drug according to individual patient characteristics. For instance, no data on the bioavailability of ribavirin from large-scale clinical trials of the efficacy of combination treatment have been published. One reason could be that no standard assay for plasma ribavirin concentration determination was available for routine laboratories, although descriptions of some analytical methods have been published, including radioimmunoassay (1), high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV (5, 7, 10, 13, 19, 20) or mass spectrometric (15) detection, and gas chromatography-mass spectrometry (16). However, these methods differ according to their sensitivities, specificities, and difficulty (time and cost).

The main purpose of the present study was to adapt and validate a routine assay for the quantification of ribavirin in serum for the management of therapy in patients with chronic HCV infection. In this regard, an HPLC method with commercially available reagents was chosen since its use is feasible in most hospital laboratories. In order to illustrate this technique, we retrospectively tested a small number of treated patients and compared their serum ribavirin concentrations to their response to treatment.

* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Pharmacology, Albert Michallon Hospital, BP217, 38043 Grenoble Cedex 09, France. Phone: 33 (0)4 76 76 54 92. Fax: 33 (0)4 76 75 89 38. E-mail: FStanke@chu-grenoble.fr.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and instruments.** All chemicals were of HPLC or reagent grade and were obtained from Prolabo (Paris, France). Ribavirin (1-beta-D-ribofurano-

syl-1*H*-1,2,4 triazole-3-carboxamide) (purity, 99%) and 3-methylcytidine methosulfate (purity, 98%), which was used as an internal standard (IS), were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Zidovudine, lamivudine, and abacavir were from Glaxo Wellcome (London, United Kingdom); acyclovir was from Glaxo Wellcome (Marly le Roi, France); and zalcitabine and ganciclovir were from Roche (Neuilly-sur-Seine, France). Didanosine and stavudine were from Bristol-Myers Squibb (Princeton, N.J.).

Phenyl boronic acid cartridges (Bond Elute phenyl boronic acid [100 mg/10 ml]), which were used for solid-phase extraction (SPE), were obtained from Varian (Harbor City, Calif.) Sample Preparation Product. The cartridges were positioned on a Vac Elut vacuum manifold from the Varian Sample Preparation Product. Stock solutions of ribavirin (10 mg/ml) and 3-methylcytidine methosulfate (10 mg/ml) were prepared in distilled water and were stored in 1.0-ml aliquots at −20°C until use. Working solutions of ribavirin (100 and 10 μg/ml) and 3-methylcytidine methosulfate (100 μg/ml) were prepared weekly by dilution of stock solutions in methanol. Stock solutions of anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) nucleoside analogues (0.1 mg/ml) were prepared in methanol, stored at −20°C until use, and then diluted in distilled water to 30 μg/ml for abacavir and to 10 μg/ml for all the other nucleoside analogues.

**HPLC apparatus and conditions.** The HPLC system used consisted of the following: an M-510 HPLC pump (Waters Associates, Milford, Mass.) set to deliver 0.7 ml/min, which led to a typical back pressure of 1,500 lb/in$^2$; a Rheodyne 7125 injection system with an injection volume of 20 μl; a $C_{18}$-bonded silica column with 5-μm beads (3.9 by 300 mm; Novapak); an L4000 UV detector (Merck, Darmstadt, Germany); and a Shimadzu model C-R3A integrator.

The wavelength was fixed at 207 nm, and the sensitivity was 0.005 absorbance units. The mobile-phase solvent consisted of 10 mM ammonium phosphate buffer (the pH was adjusted to 2.5 with orthophosphoric acid). After the run analysis, the HPLC column was stored in an acetonitrile-water (50:50; vol/vol) mixture.

**Solid-phase extraction.** The extraction procedure that follows was performed by a methodology derived from a previous report (7). The assay was calibrated by using five nonzero calibrators containing 0.2, 0.5, 1, 3, and 5 μg of ribavirin per ml and the IS (2.5 μg/ml). The calibrators were obtained by diluting the working solutions with blank bovine serum (Biotrol, Biotrol Diagnosis, Chennevrières, France). Previous experiments demonstrated that double blanks were similar in human serum and bovine serum (data not shown).

The samples (1 ml) were diluted (1:4) in 250 mM ammonium acetate buffer (the pH was adjusted to 8.5 with ammoniac). The diluted samples were loaded onto phenyl boronic acid cartridges that had been pretreated with 1 ml of 3% formic acid in methanol, followed by 5 ml of 250 mM ammonium acetate buffer (pH 8.5). The samples were drained away and the cartridges were washed five times with 1-ml aliquots of 250 mM ammonium acetate buffer. Ribavirin and the IS were subsequently eluted with 1 ml of 3% formic acid into glass tubes. The effluents were dried under nitrogen and reconstituted with 200 μl of the mobile phase. Twenty microliters of the reconstituted samples was injected onto the HPLC column.

**Validation of the method.** The validation of the method was performed in accordance with Food and Drug Administration guidelines (17, 18). The linearity was tested by assaying a set of five calibrators (0.2, 0.5, 1, 3, and 5 μg/ml) six times and by calculating the measured concentration of each calibrator from the calibration curve. A plot of the percent deviation from the calculated concentration against the expected concentration was drawn and inspected for trends.

Within-day precision was calculated by repeated analysis of spiked serum samples (0.2, 1, and 3 μg/ml) during 1 working day by the same operator. Between-day precision was calculated by analysis of serum samples spiked with the same concentration of ribavirin, with one analysis being performed a day.

The stability of ribavirin in serum was assessed by five replicate analyses of three samples spiked with ribavirin (0.2, 1, and 3 μg/ml). The samples were analyzed immediately or after storage at 4°C for 24, 48, 72, or 96 h, respectively.

To determine the stability of ribavirin after freezing-thawing, control plasma samples spiked with 2 μg of ribavirin per ml were compared with samples of the same batch that were frozen at −20°C and thawed at ambient temperature. This freeze-thaw cycle was repeated three times. In addition, the stability of ribavirin in dried residues after SPE was tested with four replicates spiked with 0.2, 1, and 3 μg of ribavirin per ml. Each sample was extracted, dried under nitrogen, and analyzed immediately or after storage at −20°C for 24, 48, or 72 h, respectively.

In order to investigate the influence of the matrix on the concentration of ribavirin, the specificity of the assay was investigated by analyzing blank plasma from six different human plasma samples spiked with 2 μg of ribavirin per ml.

Lastly, some nucleoside inhibitors most likely to be encountered in the plasma of HCV-positive patients as a result of concomitant therapy were screened by the HPLC assay. Drugs were tested as pure solutions diluted in methanol so that the concentrations were 30 μg/ml for abacavir and 10 μg/ml for the other nucleoside analogue tested; the drugs were then injected into the system, and their peak retention times were compared with the peak retention time of ribavirin. An interfering drug was defined as a molecule that exhibited a retention time within 0.3 min of that of ribavirin or the IS.

**Demographic and clinical characteristics of the patients tested.** Twenty-four patients with chronic HCV infection previously treated with combination therapy were selected for the analysis, provided that blood samples recovered on week 12 of treatment (W12) and week 24 of treatment (W24) were available from a stored serum bank. The patients' characteristics are summarized in Table 1. All patients were infected with a genotype 1 isolate of HCV and were drug-naive patients receiving their first anti-HCV treatment, consisting of interferon plus ribavirin at the doses usually prescribed at that time, as follows: subcutaneous injection of standard alpha 2 interferon at 3 million IU three times per week and 1,000- or 1,200-mg ribavirin tablets per day according to their weight (less than or more than 75 kg, respectively). Because of side effects caused by the drugs, two patients were receiving a reduced ribavirin dose (600 mg/day) at the time of assay for ribavirin quantification. All the patients were negative for HBsAg and HIV infection. The clinical outcome analysis defined among the 24 patients two subgroups of patients with equilibrated responses: 11 patients had sustained virological responses and 13 patients had treatment failures (the patients were either nonresponders or relapsers). Responders were defined as patients with a negative test result for HCV RNA at the end of therapy (48 weeks, which is the period of treatment for the responders at present), and nonresponders were defined as patients with a positive test result for HCV RNA at the end of a course of 24 weeks of therapy.

Blood samples were collected from October 1998 to August 2000 in Vacutainer tubes without additives. After centrifugation the serum was transferred to another tube and stored at −80°C until analysis. Ribavirin quantification was carried out with serum samples drawn 2 to 4 h after the morning administration of ribavirin at W12 and W24 of a 48-week combination treatment.

No unusual investigations and the administration of no specific drug was requested from the patients for the purpose of this study, which conformed with local ethical considerations and the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

**Statistical analysis.** For each series of experiments, the variability of the ribavirin concentration was estimated by determination of the relative standard deviation (17, 18). The dose-normalized concentration of ribavirin was expressed as the concentration in serum (in micrograms per milliliter) adjusted to the daily ribavirin dose according to the patient's weight (milligrams per day per kilogram of body weight).

For the retrospective comparison of serum ribavirin concentrations according to the outcome for the patients, a nonparametric Mann-Whitney test was used in order to avoid the making of assumptions about the distributions of the measured variables. $P$ values <0.05 were considered significant.

## RESULTS

**Ribavirin assay validation.** Typical chromatograms of blank serum, blank serum with IS, serum supplemented with a medium-range calibrator, and patient serum containing ribavirin are shown in Fig. 1. The retention times of ribavirin and the IS were 6.7 and 11.0 min, respectively.

A plot of the ratio of the height of ribavirin/height of the IS versus the ribavirin concentration provides a linear relationship described by the equation $y = 0.977\ (\pm\ 0.161)\ x - 0.0173\ (\pm\ 0.095)$, with $r$ equal to $0.988 \pm 0.007$. This linear correlation was verified over a range of concentrations from 0.1 to 10.0 μg/ml.

Extraction recovery, expressed as a percentage, was defined as the ratio of the slope of the calibration curve for the extracted analytes to the slope of the calibration curve for the nonextracted analytes. The recovery was 87%.

Within-day and between-day precisions are given in Table 2. The lower limit of quantification and the limit of detection were set at 0.2 and 0.06 μg/ml, respectively, for extracted samples.

The concentrations of ribavirin in serum stored at 4°C were

TABLE 1. Clinical characteristics of patients with chronic HCV infection and treated with ribavirin-interferon combination therapy[a]

| Patients characteristic | All patients ($n$ = 24) | Responders ($n$ = 11) | Nonresponders ($n$ = 13) |
|---|---|---|---|
| Mean (minimum-maximum) age (yr) | 44.3 (24–67) | 39 (24–67) | 49 (35–62) |
| Mean (minimum-maximum) wt (kg) | 73.8 kg (50–112) | 76 (50–112) | 72 (51–100) |
| Mean (minimum-maximum) Knodell score | 9.7 (4–15) | 9.5 (6–15) | 9.5 (4–15) |
| Mean (minimum-maximum) Métavir | | | |
| Activity | 2.0 (1–3) | 2 (1–3) | 2 (1–3) |
| Fibrosis | 2.1 (0–4) | 2.1 (1–3) | 2 (0–4) |
| Mean (minimum-maximum) ALAT (ULN)[b] | 2.2 (0.94–4.7) | 2.3 (0.9–4.1) | 2.1 (0.9–1.7) |
| Mean (minimum-maximum) viral load IU/ml | 1,238,767 IU/ml (8,000–5,078,650) | 1,126,218 IU/ml (8,000–3,160,000) | 1,334,000 IU/ml (111,300–5,078,650) |
| Ribavirin dose (mg/day) | | 1,000 ($n$ = 9), 1,200 ($n$ = 2) | 600 ($n$ = 2, adjusted for adverse effects), 1,000 ($n$ = 8), 1,200 ($n$ = 3) |

[a] All patients were infected with genotype 1 HCV isolates and were drug naive and receiving their first standard combination therapy.
[b] ALAT, alanine aminotransferase; ULN, upper limit of normality.

not reduced over 96 h; the coefficient of variation of the slopes of the linear regression lines was 14%.

In contrast, storage of dried residues at −20°C for 72 h induced a gradual decrease in the ribavirin concentration. The slopes of the linear regression lines were 0.944 for fresh samples and 0.787, 0.623, and 0.591 after storage at −20°C for 24, 48, and 72 h, respectively. After storage for 72 h at −20°C, the concentration of ribavirin was reduced by 37% compared with the concentration in fresh samples.

Three freeze-thaw cycles with spiked samples induced a trend toward a loss of ribavirin. The concentration of ribavirin was reduced by 33% compared with the concentration in fresh samples after three freeze-thaw cycles.

There was no influence of the matrix on the concentration of ribavirin (coefficient of variation, 6%). In addition, the nucleoside analogues didanosine, stavudine, zidovudine, lamivudine, abacavir, zalcitabine, acyclovir, and ganciclovir did not interfere with the analytical method.

**Serum ribavirin concentrations during combination treatment.** The mean absolute concentration of ribavirin at W12 was 2.67 ± 0.21 μg/ml ($n$ = 24). The ribavirin concentration at W24 (3.23 ± 0.28 μg/ml; $n$ = 24) was similar to that at W12. The mean relative concentrations of ribavirin adjusted according to the dose of ribavirin received by the patient (in milligrams per kilogram per day) were 0.20 ± 0.02 μg/ml/dose ($n$ = 24) at W12 and 0.24 ± 0.02 μg/ml/dose ($n$ = 24) at W24. The coefficients of variation for these adjusted concentrations were 44 and 48% at W12 and W24, respectively. The ranges of ribavirin concentrations at W12 and W24 were 0.07 to 0.35 and 0.08 to 0.48 μg/ml/dose, respectively.

In order to evaluate the interest in quantification of ribavirin in serum in the management of patients treated for HCV infection, we retrospectively compared the concentrations of ribavirin according to the outcome status of the patients tested. In the responder group of patients ($n$ = 11), the relative concentrations of ribavirin were 0.24 ± 0.03 and 0.28 ± 0.03 μg/ml/dose at W12 and W24, respectively, while in patients with treatment failures ($n$ = 13) they were 0.16 ± 0.20 and 0.21 ± 0.32 μg/ml/dose at W12 and W24, respectively. These relative concentrations of ribavirin were significantly different between patients who were responders and those who were nonresponders ($P < 0.030$ at W12 and $P < 0.049$ at W24 [Mann-Whitney test]) (Fig. 2).

## DISCUSSION

This study presents the validation of a simple bioanalytical method for the quantification of ribavirin in human serum. Its feasibility for the monitoring of drug therapy for HCV-infected patients was also investigated.

The method was adapted from a previous report (7) by changing the detection wavelength (207 nm) and modifying the SPE and purification steps. Indeed, a methanolic solution containing 3% formic acid was used to elute ribavirin in the SPE procedure in order to improve the evaporation step. Finally, the stability of ribavirin during sample storage and interference with other nucleoside analogues were assessed.

The method described here yielded linear results, with a lower limit of quantification of 0.2 μg/ml with samples from which ribavirin was extracted. In addition, the limit of detec-

TABLE 2. Within-day and between-day variabilities of ribavirin concentrations in serum samples measured by HPLC with UV detection[a]

| Spiked concn (μg/ml) | Relative % standard deviation[b] | |
|---|---|---|
| | Within-day precision | Between-day precision |
| 0.2 | 4.8 (0.2 ± 0.0) | 17.8 (0.2 ± 0.0) |
| 1 | 11.2 (0.9 ± 0.1) | 9.4 (1.0 ± 0.1) |
| 3 | 6.9 (3.1 ± 0.1) | 8.9 (2.8 ± 0.2) |

[a] Five serum samples were tested.
[b] The values in parentheses are means ± standard errors of the mean accuracy (in micrograms per milliliter).

Analysis of the stability of ribavirin under various storage conditions showed that the ribavirin concentration remains stable in serum stored for 4 days at 4 or −20°C, whereas it tends to decrease in dried residues stored at −20°C for 3 days as well as in samples undergoing three freeze-thaw cycles. These data suggest that storage of dried residues as well as freeze-thaw cycles should be avoided for the preservation of ribavirin in human serum, whereas storage of serum samples at 4 or −20°C ensures the good preservation of ribavirin for 4 days.

It has been suggested that only 27% of the pharmacokinetic variability in ribavirin clearance relies on the main cofactors influencing this clearance, including body weight, gender, age, and serum creatinine levels (8). Therefore, the bioavailability of ribavirin is probably controlled by many other, unknown parameters. In this context, a reliable and simple method for the quantification of ribavirin in serum could be highly helpful for the management of patients with HCV infection receiving combination treatment. Indeed, not only response rates but also the frequency of adverse events are probably dependent on the interindividual variability of serum ribavirin concentrations. The monitoring of serum ribavirin concentrations could improve the efficacy and the safety of the combination treatment. The minimum dose of ribavirin required for efficacy has not been clinically established. Initial clinical trials have adopted a standard dose defined on the basis of the results of pilot studies (2, 4). The recommended dose of ribavirin was chosen to be 1,000 or 1,200 mg according to the patient's weight (less than or more than 75 kg, respectively). A subsequent recommendation for adaptation of the dose according to body weight was made by the manufacturer (800, 1,000, and 1,200 mg for body weights of <65, 65 to 85, and >85 kg, respectively). To our knowledge, these recommendations are based not on direct measurements of ribavirin concentrations but on extrapolation of statistical relations among dose, body weight, and response status.

Thus, the analytical method for the quantification of ribavirin presented in this paper could be a useful tool that can be used to define the minimum efficient dose of ribavirin that takes into account all the factors affecting pharmacokinetic variability instead of body weight only. Subsequently, it will probably be used to define new rules for dose adjustment for the management of ribavirin-related adverse events.

The secondary objective of the study was to explore a possible relation between the bioavailability of ribavirin and the efficacy of combination therapy. Our study population was chosen in order to represent the most likely group of patients who could benefit from monitoring of ribavirin concentrations: patients infected with HCV genotype 1, patients undergoing first treatment for cure, and patients undergoing treatment with the standard combination of interferon and ribavirin. The response status of these patients was defined as treatment success (patients with sustained virological responses) or treatment failure (nonresponders and patients who were responders but who then had relapses). Our data suggest that high serum ribavirin levels could be one factor predictive of long-term treatment success. A recent clinical trial with pegylated interferon supports our observation by showing that the doses of the two medications (ribavirin and interferon) received by the patient are significant predictors of a sustained virological response ($P = 0.015$ for ribavirin and $P = 0.002$ for pegylated interferon) (11). Another study confirmed that the ribavirin concentration at treatment week 4 is positively correlated to the initial virological response (a negative result by an HCV-specific reverse transcription-PCR at week 24) (8). Our data suggest that this relation could be extended to the sustained virological response (a negative PCR result at week 24 of

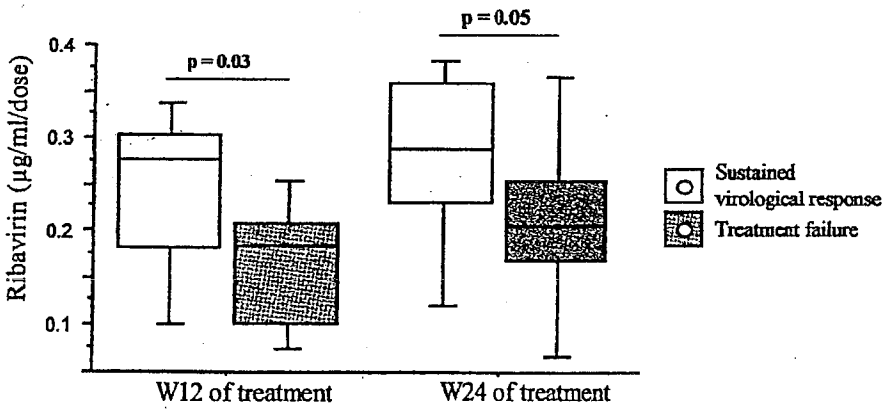



FIG. 2. Concentration of ribavirin in sera from 11 responders and 13 nonresponders after 12 and 24 weeks of ribavirin and interferon combination therapy. Data are presented as box plots in which 50% of the values lie within the box. The horizontal lines drawn through the middle of the boxes represent the median values. The top and bottom of each box are the 10th and 90th percentiles of all values, respectively. *P* values were 0.03 and 0.05 for responder patients versus nonresponder patients after 3 and 6 months of treatment, respectively.

posttreatment follow-up). In this context, monitoring of the ribavirin concentration at the time of treatment initiation could help to adapt the ribavirin dose to the patient's pharmacological characteristics in order to improve efficacy in the case of low bioavailability or to prevent severe adverse events in the case of high bioavailability.

In conclusion, the present study describes a simple analytical method for the quantification of ribavirin in human serum that could be a useful tool for the monitoring of ribavirin concentrations in patients with chronic HCV infection in order to improve the efficacy and the safety of therapy with ribavirin plus interferon.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by a grant from Schering-Plough Laboratories.

## REFERENCES

1. **Austin, R. K., P. E. Trefts, M. Hintz, J. D. Connor, and M. F. Kagnoff.** 1983. Sensitive radioimmunoassay for the broad-spectrum antiviral agent ribavirin. Antimicrob. Agents Chemother. 24:696–701.
2. **Braconier, J. H., O. Paulsen, K. Engman, and A. Widell.** 1995. Combined alpha-interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C: a pilot study. Scand. J. Infect. Dis. 27:325–329.
3. **Davis, G. L.** 1999. Combination therapy with interferon alfa and ribavirin as retreatment of interferon relapse in chronic hepatitis C. Semin. Liver Dis. 19:49–55.
4. **Glue, P.** 1999. The clinical pharmacology of ribavirin. Semin. Liver Dis. 19:17–24.
5. **Granich, G. G., D. J. Krogstad, J. D. Connor, K. L. Desrochers, and C. Sherwood.** 1989. High-performance liquid chromatography (HPLC) assay for ribavirin and comparison of the HPLC assay with radioimmunoassay. Antimicrob. Agents Chemother. 33:311–315.
6. **Heathcote, J.** 2000. Antiviral therapy for patients with chronic hepatitis C. Semin. Liver Dis. 20:185–199.
7. **Homma, M., A. L. Jayewardene, J. Gambertoglio, and F. Aweeka.** 1999. High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in whole blood to assess disposition in erythrocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2716–2719.
8. **Jen, J. F., P. Glue, S. Gupta, D. Zambas, and G. Hajian.** 2000. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C. Ther. Drug Monit. 22:555–565.
9. **Khakoo, S., P. Glue, L. Grellier, B. Wells, A. Bell, C. Dash, I. Murray-Lyon, D. Lypnyj, B. Flannery, K. Walters, and G. M. Dusheiko.** 1998. Ribavirin and interferon alfa-2b in chronic hepatitis C: assessment of possible pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions. Br. J. Clin. Pharmacol. 46:563–570.
10. **Lafeuillade, A., G. Hittinger, and S. Chadapaud.** 2001. Increased mitochondrial toxicity with ribavirin in HIV/HCV coinfection. Lancet 357:280–281.
11. **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.
12. **McHutchison, J. G., and T. Poynard.** 1999. Combination therapy with interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. Semin. Liver Dis. 19:57–65.
13. **Paroni, R., C. R. Sirtori, C. Borghi, and M. G. Kienle.** 1987. High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in serum and urine and of its urinary metabolite 1,2,4-triazole-3-carboxamide. J. Chromatogr. 420:189–196.
14. **Poynard, T., P. Marcellin, S. S. Lee, C. Niederau, G. S. Minuk, G. Ideo, V. Bain, J. Heathcote, S. Zeuzem, C. Trepo, J. Albrecht, et al.** 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. Lancet 352:1426–1432.
15. **Preston, S. L., G. L. Drusano, P. Glue, J. Nash, S. K. Gupta, and P. McNamara.** 1999. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ribavirin in healthy volunteers as determined by stable-isotope methodology. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2451–2456.
16. **Roboz, J., and R. Suzuki.** 1978. Determination of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole) in blood and urine by chemical ionization-mass fragmentography. J. Chromatogr. 160:169–179.
17. **Shah, V. P., K. K. Midha, S. Dighe, I. J. McGilveray, J. P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C. T. Viswanathan, C. E. Cook, R. D. McDowall, et al.** 1991. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 16:249–255.
18. **Shah, V. P., K. K. Midha, J. W. Findlay, H. M. Hill, J. D. Hulse, I. J. McGilveray, G. McKay, K. J. Miller, R. N. Patnaik, M. L. Powell, A. Tonelli, C. T. Viswanathan, and A. Yacobi.** 2000. Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. Pharm. Res. 17:1551–1557.
19. **Smith, R. H., and B. E. Gilbert.** 1987. Quantification of ribavirin in biological fluids and tissues by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 414:202–210.
20. **Svensson, J. O., A. Bruchfeld, R. Schvarcz, and L. Stahle.** 2000. Determination of ribavirin in serum using highly selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Ther. Drug Monit. 22:215–218.

Faculté de Pharmacie de Grenoble

# Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**LARRAT Sylvie**

# RECHERCHE DE FACTEURS PHARMACOLOGIQUES ET VIROLOGIQUES DE REPONSE A LA RIBAVIRINE CHEZ LES PATIENTS TRAITES POUR UNE HEPATITE C CHRONIQUE

RESUME :

La bi-thérapie interferon α - ribavirine est le traitement actuel de l'hépatite chronique C. Il semble exister une grande variabilité inter-individuelle de la concentration sérique de la ribavirine qui pourrait influencer sur son efficacité. Afin de mesurer sa concentration pendant la durée du traitement, nous avons développé et validé une méthode d'analyse quantitative par HPLC-UV.

Une étude clinique réalisée *a posteriori* sur les sera de 24 patients naïfs ayant une hépatite chronique C montre des concentrations de ribavirine significativement plus élevées ($p=0.030$ à S12 et $p=0.049$ à S24) chez les patients répondeurs ($0.24 \pm 0.03$ µg/ml/dose à S12 et $0.28 \pm 0.03$ µg/ml/dose à S24, $n=11$) que chez les non-répondeurs ($0.16 \pm 0.2$ µg/ml/dose à S12 et $0.21 \pm 0.32$ µg/ml/dose à S24, $n=13$). Ces résultats suggèrent que ce dosage pharmacologique pourrait être un outil de suivi thérapeutique intéressant chez les patients traités contre le VHC pour tenter d'accroître l'efficacité de la bi-thérapie et la sécurité d'utilisation de la ribavirine.

Une étude virologique a été également réalisée afin de vérifier si une non-réponse au traitement pouvait être expliquée par une résistance du virus à la ribavirine. Nous avons séquencé le site actif de la polymérase du VHC, tout d'abord chez des patients non encore traités dont nous connaissions le statut répondeur/non répondeur, afin de rechercher une éventuelle mutation initiale. Il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre ce statut et la séquence de la polymérase virale avant traitement. Les souches virales des patients non-répondeurs ont ensuite été séquencées à S12 et S24. On observe une moyenne de 7,3 mutations pour 330 pb sur 24 semaines, soit $4 \times 10^{-2}$ mutations par position nucléotidique par an. Environ 50% de ces mutations conduisent à un changement d'acide aminé mais aucun ne semble récurrent.

MOTS-CLES :

- Virus
- Hépatite C
- Polymérase
- Ribavirine
- Interféron
- Pharmacocinétique

JURY :

Monsieur le Professeur E. DROUET – Président du jury
Monsieur le Professeur J.M. SEIGNEURIN
Monsieur le Professeur J.P. ZARSKI
Madame le Docteur F. STANKE-LABESQUE
Monsieur le Docteur C. SOUVIGNET

ADRESSE DE L'AUTEUR :

*[Données à caractère personnel]*