HAL
open science

Mutliplication 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

Raphaële Germi

To cite this version:

Raphaële Germi. Mutliplication 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. Sciences pharmaceutiques. 1999. dumas-01536704

HAL Id: dumas-01536704

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01536704v1

Submitted on 12 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
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 :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.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 039736 0

1er exemplaire

Université Joseph FOURIER – GRENOBLE I
Sciences, Technologies, Médecine
U.F.R. de PHARMACIE
Domaine de la Merci – La Tronche

ANNEE : 1999 **N° D'ORDRE** 7049

MULTIPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE 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.

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE SPECIALISEE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 04 Octobre 1988 tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenu le 9 décembre

Par Mademoiselle Raphaële GERMI
[Données à caractère personnel]

JURY

PRESIDENT : Monsieur le Professeur E. DROUET

MEMBRES : Monsieur le Professeur J.-P. ZARSKI
Monsieur le Docteur D. GARIN
Madame le Docteur G. INCHAUSPE

Université Joseph FOURIER – GRENOBLE I
Sciences, Technologies, Médecine
U.F.R. de PHARMACIE
Domaine de la Merci – La Tronche

ANNEE : 1999 **N° D'ORDRE**

MULTIPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE 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.

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE SPECIALISEE
Conformément aux dispositions de l'arrêté du 04 Octobre 1988 tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenu le 9 décembre

Par Mademoiselle Raphaële GERMI
[Données à caractère personnel]

JURY

PRESIDENT : Monsieur le Professeur E. DROUET

MEMBRES : Monsieur le Professeur J.-P. ZARSKI
Monsieur le Docteur D. GARIN
Madame le Docteur G. INCHAUSPE

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE GRENOBLE MEDECINE - PHARMACIE

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 Doyen	M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	*Josette*	*Chimie Analytique*
BAKRI	*Abdelaziz*	*Pharmacie Galènique*
BENOIT-GUYOD	*Jean-Louis*	*Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie*
CALOP	*Jean*	*Pharmacie Clinique et Bio-technique*
CUSSAC	*Max*	*Chimie Thérapeutique*
DECOUT	*Jean-Luc*	*Chimie Générale*
DEMENGE	*Pierre*	*Physiologie/Pharmacologie*
DROUET	*Emmanuel*	*Microbiologie-Immunologie*
FAVIER	*Alain*	*Biochimie*
GOULON	*Chantal*	*Physique-Pharmacie*
GRILLOT	*Renée*	*Parasitologie*
LECLERC	*Gérard*	*Chimie Organique*
MARIOTTE	*Anne-Marie*	*Pharmacognosie*
RIBUOT	*Christophe*	*Physiologie-Pharmacologie*
ROUSSEL	*Anne-Marie*	*Biochimie*
SEIGLE-MURANDI	*Françoise*	*Botanique et Cryptogamie*
STEIMAN	*Régine*	*Biologie Cellulaire*
WOUESSIDJEWE	*Denis*	*Pharmacie Galénique*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté	M. le Professeur J. L. DEBRU
Vice-Doyen	M. le Professeur J. P. CHIROSSEL
Assesseurs	M. le Professeur J. LEBEAU
	M. le Professeur J.P. ROMANET
	M. le Professeur B. SELE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AMBLARD	Pierre	Dermato. VénéréologieA
MBROISE-THOMAS	Pierre	Parasitologie et Mycol.
BACHELOT	Ivan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
BACONNIER	Pierre	Biostatistiques et Informatique Méd.
BARGE	Michel	Neurochirurgie
BARRET	Luc	Médecine Légale
BAUDAIN	Philippe	Radiologie et Imag. Méd.
BEANI	J.-Claude	Dermatologie,Vénéréologie
BENABID	Al.-Louis	Biophys. et Trait. de l'image
BENSA	J. Claude	Immunologie
BERNARD	Pierre	Gynéco et Obstétrique
BESSARD	Germain	Pharma. Fondamentale
BLIN	Dominique	Chir. Thor.et Cardio Vascul.
BOLLA	Michel	Radiothérapie
BOST	Michel	Pédiatrie
BOUCHARLAT	Jacques	Pédo Psychiatrie
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'adultes
BRAMBILLA	Christian	Pneumologie
BRAMBILLA	Elisabeth	Anatomie et Cyto. Pathol.
BRICHON	P.Yves	Chir. Thor. et Cardio.Vasc.
CARPENTIER	Françoise	Thérapeutique
CARPENTIER	Patrick	Méd.Interne
CESBRON	Jean-Yves	Immunologie
CHAMBAZ	Edmond	Biologie Cellulaire
CHARACHON	Robert	O.R.L.
CHIROSSEL	J. Paul	Anatomie
CINQUIN	Philippe	Biostatistique et Inf. Méd.
COLOMB	Maurice	Immunologie
CORDONNIER	Daniel	Néphrologie
COULOMB	Max	Radiologie et Imagerie Méd.
CROUZET	Guy	Radiologie et Imagerie Méd.
DEBRU	Jean-Luc	Médecine Interne
DE GAUDEMARIS	Régis	Méd. du Trav. et des risques professionnels.
DEMONGEOT	Jacques	Biostatistique et Inf. Méd
DESCOTES	Jean-Luc	Urologie
DUPRE	Alain	Chirurgie Générale
DYON	J.François	Chirurgie Infantile
FAGRET	Daniel	Bioph et Trait. Image
FAURE	Claude	Anatomie
FAVROT	Marie C.	Cancerologie CLB Lyon
FEUERSTEIN	Claude	Physiologie
FOURNET	Jacques	Hépato-Gastro-Entéro.
FRANCO	Alain	Médecine. Interne
FRANCOIS	Patrice	Épidém., Écon. de la Sant. et Prévention.
GARNIER	Philippe	Pédiatrie
GIRARDET	Pierre	Anesthé. et Réa. Chir.
GOULLIER-FLEURET	Andrée	Parasitologie et Mycologie
GUIDICELLI	Henri	Chirurgie Vasculaire
GUIGNIER	Michel	Réanimation Médicale
HADJIAN	A.-Jean	Biochimie et biol.Mol
HALIMI	Serge	Nutrition
HOMMEL	Marc	Neurologie.
HOSTEIN	Jean	Hépato-Gastro-Entérol.
JOUK	Pierre-Simon	Biologie du Dévelop.. et de la reproduction.
JUVIN	Robert	Rhumatologie
LAVIEILLE	Jean-Pierre	O.R.L.
LE BAS	François	Biophys.et Trait. de l'Image.
LEBEAU	Jacques	Stomat. et Chirurgie Maxillo-Faciale
LEROUX	Dominique	Génétique
LETOUBLON	Christian	Chirurgie Générale
LEVERVE	Xavier	Thérapeutique
LEVY	Patrick	Physiologie
LUNARDI	Joël	Biochimie et Bio. Molécu.
MACHECOURT	Jacques	Cardio. et Maladie Vascu.
MAGNE	Jean-Luc	Chir. Vasculaire
MALLION	J. Michel	Méd.du Trav. et Risques Prof.
MASSOT	Christian	Médecine Interne
MERLOZ	Philippe	Chir. Ortho. et Traumato.
MOREL	Françoise	Bioch. et Biol. Moléculaire
MICOUD	Max	Maladies Infect. et Trop.
MOUILLON	Michel	Ophtalmologie
MOUSSEAU	Mireille	Cancérologie
MOUTET	François	Chir. Plast.Reconst. et Esth.
PASQUIER	Basile	Anat. et Cyto.Patho
PASSAGIA	J.-Guy	Anatomie.
PAYEN de LA GARANDERIE	J. François	Anesthésiologie
PELLAT	Jacques	Neurologie
PHELIP	Xavier	Rhumatologie
PISON	Christophe	Pneumologie
POLACK	Benoît	Hématologie
POLLAK	Pierre	Neurologie
PONS	Jean-Claude	Gynécologie et Obstétrique
RAMBAUD	Pierre	Pédiatrie
RAMBEAUD	J. Jacques	Urologie
RAPHAEL	Bernard	Stomato. et Chirurgie Maxillo-faciale
REYT	Emile	O.R.L.
ROMANET	J. Paul	Ophtalmologie
SARAGAGLIA	Dominique	Chir. Orthopédique et Traumatologique
SCHAERER	René	Cancérologie
SEIGNEURIN	Daniel	Histo.embryo.cytogénét. Reproduction
SEIGNEURIN	J. Marie	Bactério-Viro - Hygiène.
SELE	Bernard	Biologie du Développement et de la Reproduction
SOTTO	J. Jacques	Hématologie et Transfusion
STAHL	J. Paul	Maladies Infect. et Trop.
VANZETTO	Gérald	Clin./Urgences Cardio.
VIALTEL	Paul	Néphrologie
VROUSOS	Constantin	Radiothérapie
VUILLEZ	J.-Philippe	Biophys./Méd. Nucléaire
ZARSKI	J.Pierre	Hépato-Gastro-Entérol.

Université Joseph FOURIER – GRENOBLE I
Sciences, Technologies, Médecine
U.F.R. de PHARMACIE
Domaine de la Merci – La Tronche

ANNEE : 1999 **N° D'ORDRE**

MULTIPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE 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.

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE SPECIALISEE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 04 Octobre 1988 tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenu le 9 décembre

Par Mademoiselle Raphaële GERMI
Née le 2 Mai 1972 à Saint Martin d'Hères

JURY

PRESIDENT : Monsieur le Professeur E. DROUET

MEMBRES : Monsieur le Professeur J.-P. ZARSKI
Monsieur le Docteur D. GARIN
Madame le Docteur G. INCHAUSPE

A Mon frère Yann,

toujours présent dans ma vie et mon esprit,
son souvenir m'accompagne et me guide,
j'espère qu'il aurait été aussi fier de moi que je le suis de lui.

Remerciements

A Monsieur le Professeur Emmanuel Drouet pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de virologie moléculaire et structurale de l'UFR de médecine/pharmacie de la Tronche, pour avoir initié et supervisé mon travail et dont les conseils éclairés m'ont orientée vers les laboratoires les plus aptes à faire progresser ma recherche et à développer mes connaissances scientifiques.

A Monsieur le professeur Jean-Pierre Zarski pour m'avoir intégrée dans le projet hospitalier de recherche clinique « Evolution et traitement de l'hépatite virale chronique C :interaction virus-système immunitaire » mis en place au sein du CHU de Grenoble, pour m'avoir permis de rencontrer des personnalités avec lesquelles j'ai pu avoir des échanges très enrichissants et pour la valorisation de ce travail.

A Monsieur le Docteur Daniel Garin pour sa disponibilité, son dynamisme, ses conseils avisés en biologie moléculaire, pour l'enthousiasme qu'il a su me communiquer ainsi que pour l'intérêt qu'il témoigne à cette recherche.

A Madame le Docteur Geneviève Inchauspé pour l'honneur qu'elle me fait de bien vouloir participer à ce jury.

Je tiens aussi à remercier :

Ma famille, toujours très présente à mes côtés et plus particulièrement
Mes parents, mon frère Manel et Olivier qui ont su me supporter me guider et m'entourer de leur amour et de leur tendresse.

Mes Amis qui ont partagé mes bons moments et m'ont soutenue dans les mauvais.

Josette, Corinne, Danielle, Henri, Noël, Cécile pour leur disponibilité, leur compréhension, pour leur aide précieuse ainsi que pour avoir éclairé les dures journées de labeur acharné.

Marie-Ange Thélu pour son soutien, sa gentillesse et ses conseils en biologie moléculaire.

Monsieur le Docteur Jean-Marc Crance pour ses conseils avisés en virologie, sa patience et ses encouragements ainsi que pour son encadrement scientifique au sein du centre de recherche du service de santé des armées.

Monsieur le Docteur Alain Jouan pour m'avoir permis de travailler dans le laboratoire de virologie du C.R.S.S.A. Emile Pardé.

SOMMAIRE :

SOMMAIRE.....5

LISTE DES ABREVIATIONS.....9

I/ PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....10

1 Introduction 10

2 Structure du virus 11

2.1 Généralités.....11

2.2 Le génome 13

2.3 Les protéines (tableau I et figure 3).....15

2.3.1 La nucléocapside, capside ou core.....15

2.3.2 Les protéines d'enveloppe E1 et E2.....16

2.3.3 Les protéines non structurales.....

3 Variabilité génétique.....20

4 Le cycle viral (Figure 6).....22

5 La réponse immune.....24

5.1 La réponse cellulaire.....24

5.1.1 La réponse T auxilliaire (CD4+).....24

5.1.2 La réponse T cytotoxique (CD8+) 25

5.2 La réponse humorale 25

6 Epidémiologie 26

7 Approche clinique 30

7.1 Manifestations cliniques hépatiques et évolution.....30

7.1.1 Hépatite aiguë.....30

7.1.2 Hépatite chronique.....30

8 Le diagnostic 33
8.1 Les tests sérologiques *34*
8.2 Les tests moléculaires. *37*
8.2.1 Les tests qualitatifs 37
8.2.2 Les tests quantitatifs 38
8.2.3 Le génotypage 39

9 Le traitement de l'hépatite C chronique 40
9.1 L'interféron α *40*
9.1.1 Généralités 40
9.1.2 Pharmacologie 41
9.1.3 Traitement des hépatites C par l'IFNα 42
9.2 La ribavirine *44*
9.3 Les nouveaux interférons *45*
9.4 Autres traitements *45*
9.5 Perspectives *46*

10 Conclusion 47

II/ DEUXEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE 48

A / TRAVAUX ANTERIEURS 48

1 Cultures primaires de cellules 48
1.1 Hépatocytes humains *48*
1.2 Cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) humaines *50*
1.3 Conclusion *50*

2 Culture de lignées cellulaire (Tableaux III-IV-V) 50

2.1 Lignées d'hépatocytes humains *50*

2.2 Lignées lymphocytaires humaines *52*

2.2.1 Lignées de lymphocytes T 52

2.2.2 Lignées de lymphocytes B 54

2.3 Autres lignées *55*

2.3.1 Lignée fibroblastique (cellules VH3) 55

2.3.2 lignée de cellules de rein de singe vert (cellules VERO) 56

2.3.3 Autres lignées cellulaires 56

2.4 Conclusion *57*

B / TRAVAUX PERSONNELS.....60

1 Matériel et méthodes 60

1.1 Source de virus *60*

1.2 Culture cellulaire *61*

1.2.1 Cellules utilisées.....61

1.2.2 Conditions de culture cellulaire 62

1.2.3 Inoculation virale 63

1.3 Détection de l'ARN viral *66*

1.3.1 Extraction de l'ARN.....67

1.3.2 Transcription inverse (RT).....67

1.3.2 Polymérisation en chaîne (PCR) 68

1.3.3 Détection des ADN amplifiés.....68

1.4 Détection des protéines de membrane par cytométrie de flux *70*

1.4.1 Principe 70

1.4.2 Méthode.....70

2 Résultats et discussion 71

2.1 Etude des différents plasmas et sérums *71*

2.2 Mise en évidence de la fixation du virus sur la cellule *72*

2.3 Mise en évidence de la persistance et de la réplication du virus dans les cultures lors du premier passage viral *75*

2.4 Mise en évidence de la persistance et de la multiplication du virus dans les cellules lors des passages suivants *78*

2.5 Détection des molécules CD81 à la surface des cellules *80*

3 Conclusion 83

III/ CONCLUSION 84

IV/ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 86

V/ ANNEXES 97

Annexe 1 : Détection de l'ARN du VHC dans les cultures infectées (autoradiographies) 97
Annexe 2 : Demande de brevet d'invention 98
Annexe 3 : Soutien financier 112

Liste des abréviations

aa = acides aminés
Ac = anticorps
ADN = acide desoxyribonucléique
ADNb = ADN branché
ADNc = ADN complémentaire
ALAT/ASAT = transaminases (alanine/ asparagine aminotransférase)
AMM = autorisation de mise sur le marché
ARN = acide ribonucléique
ATP = adénosine triphosphate
ATU = autorisation temporaire d'utilisation
DEPC = diéthyl pyrocarbonate
d.l.p.i = dernier lavage post-infection
dNTP = désoxynucléotide triphosphate
DTT = dithiothreitol
Et coll = et collaborateurs
FITC = fluorescéine isothiocyanate
HEPES = N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'[2-ethanesulfonic acid]
HTLV-I = human T lymphotropic virus = virus humain à lymphotropisme T
HVR1 = hypervariable region 1 = région hypervariable 1
IF = immunofluorescence
IFNα = interféron α
IRES = internal ribosome entry site = site d'entré des ribozomes
IV = intraveineuse
J0, J4 etc= jour 0, jour 4 etc...
kDa = kilo Dalton
LDL = lipoprotéines de basse densité
MU = million d'unités
NANB = non A non B
NC = non codante
nt = nucléotides
PAL = phosphatase alcaline
PBMC = peripheral blood mononuclear cells = cellules mononucléées du sang périphérique
PBS = phosphate buffer saline = tampon phosphate salin
PCR = polymerisation chain reaction = réaction de polymérisation en chaîne
PEG = polyéthylène glycol
p.i = post-infection
PKR = protéine kinase R
PM = poids moléculaire
ppi = pour préparation injectable
QS = quasi-espèces
RE = réticulum endoplasmique
RNase = ribonucléase
PNK = polynucléotides kinase
RPMI = Roswell Park Memorial Institut
RT = reverse transcription = transcription inverse
SDS = sodium dodecylsulfate
SSC = standard sodium citrate
SVF = sérum de veau fœtal
UI = unités internationales
UV = ultraviolet
VHA = virus de l'hépatite A
VHB = virus de l'hépatite B
VHC = virus de l'hépatite C
VIH = virus de l'immunodéficience humaine
V/V = volume à volume

PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Introduction

Les hépatites virales regroupent les infections à virus hépatotropes, induisant une inflammation et des lésions plus ou moins sévères du foie. Le groupe des virus hépatotropes est très hétérogène et réunit des familles de virus très différentes. Il comprend des virus nus comme le virus de l'hépatite A (VHA) ou enveloppés tel que les virus des hépatite B (VHB) et C (VHC). Le génome de ces virus est constitué soit d'ARN (VHA et VHC) soit d'ADN (VHB).

Avant 1988 on distinguait trois types d'hépatites virales : les hépatites A à transmission entérique, les hépatites B à transmission parentérale et sexuelle et un troisième groupe d'hépatites répondant négativement aux tests sérologiques concernant les deux précédentes. Ce groupe était ainsi appelé Non A Non B (NANB) puisqu'aucun virus n'avait pu être mis en évidence par les méthodes conventionnelles.

Après de nombreuses tentatives d'identification par des techniques microbiologiques classiques, les progrès de la biologie moléculaire permettent en 1988 de caractériser le virus de l'hépatite C par des techniques de clonage (Choo et coll 1989). Le groupe de Mickael Houghton (laboratoire Chiron, Californie) isole, par ultracentrifugation, l'ARN du plasma d'un chimpanzé infecté (par voie intraveineuse avec un concentré de facteur VIII ayant entraîné des hépatites NANB post transfusionnelles chez des sujets hémophiles). L'action d'une reverse transcriptase sur l'ARN isolé permet d'obtenir les brins d'ADN complémentaires. Ces ADN complémentaires sont clonés dans des vecteurs d'expression (bactériophages GT11) utilisés pour transfecter des souches d'*E. Coli.* Les polypeptides correspondant aux différentes séquences nucléotidiques transfectées sont synthétisés par les bactéries et analysés par immunomarquage grâce à des sérums de patients atteints d'hépatite NANB chronique, riches en anticorps. Après 8 ans d'effort et l'étude d'un million de clones, deux clones (5-1-1 et C100-3) codant pour des polypeptides viraux ont été isolés. Ces clones ont été utilisés comme sonde d'hybridation pour rechercher d'autres copies de gènes dans la banque d'ADN complémentaires et ont permis d'identifier la totalité du génome du virus de l'hépatite C.

Ce nouveau virus, appartenant au groupe des hépatites NANB, est transmis par voie parentérale principalement et plus particulièrement par transfusion de sang ou usage de drogues intraveineuses. Il est responsable d'une pathologie hépatique qui évolue vers la chronicité dans 80% des cas, et de complications extrahépatiques. L'évolution clinique est lente et peut aboutir après une vingtaine d'années à une cirrhose dans 20% des cas environ, et à un carcinome hépatocellulaire dans 2 à 3% des cas, après trente ans d'évolution.

La détection des personnes infectées a été possible dès 1990, par sérodiagnostic, grâce aux deux peptides recombinants initialement clonés. Elle a permis de dévoiler l'ampleur de l'épidémie et la nécessité de trouver des moyens thérapeutiques efficaces. Actuellement les deux molécules utilisées pour le traitement sont l'interféron α (IFNα) et la ribavirine, mais il est nécessaire d'optimiser les résultats obtenus et de chercher d'autres molécules efficaces.

2 Structure du virus

2.1 Généralités

Le VHC est un virus enveloppé dont la capside protéique icosaèdrique entoure une molécule d'ARN monocaténaire linéaire de polarité positive. Deux types de protéines sont insérées dans la membrane lipidique, ce sont les glycoprotéines E1 et E2. Des études de filtration et d'ultracentrifugation suggèrent que la taille des particules virales varie de 30 nm à 65 nm (Clarke 1997) (figure 1).

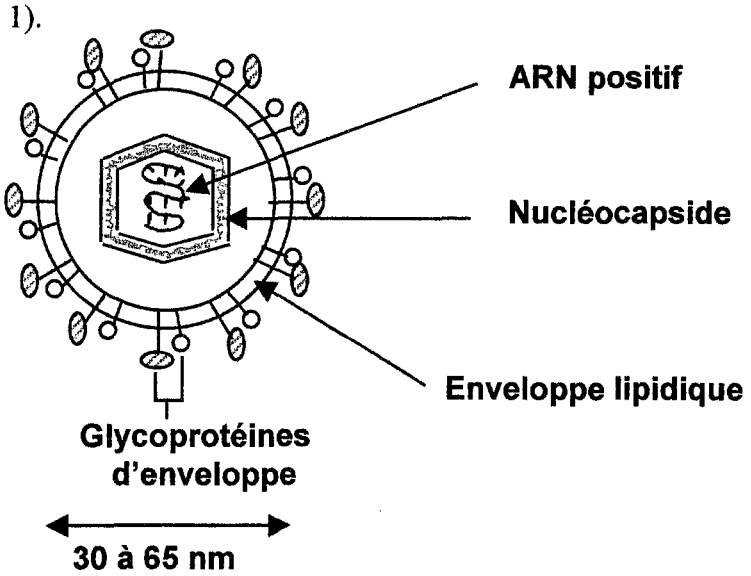


Figure 1: Structure présumée du virus de l'hépatite C d'après celle des autres flaviviridae

L'étude du génome du VHC a permis sa classification taxonomique en le comparant à celui d'autres virus à ARN de polarité positive. Par analogie avec les flavivirus (virus de la fièvre jaune, de la dengue et de l'encéphalite japonaise) et avec les pestivirus (virus de la diarrhée bovine, virus hog choléra) le VHC a été classé dans la famille des flaviviridae dans un genre autonome, les hépacivirus (figure 2).

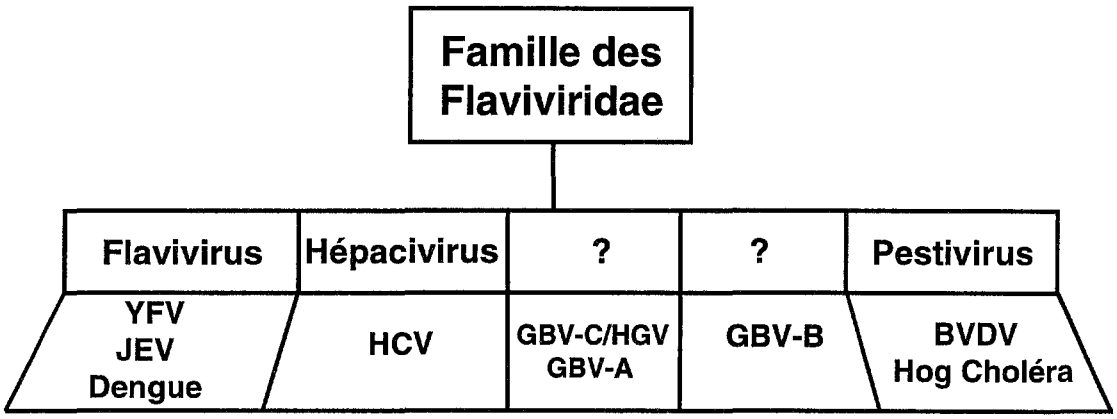


Figure 2 : Classification taxonomique du virus de l 'hépatite C

BVDV= virus de la diarrhée virale bovine
YFV = virus de la fièvre jaune
JEV = virus de l 'encéphalite japonaise
HGV = virus de l 'hépatite G
HCV = virus de l 'hépatite C

2.2 Le génome

Le génome du VHC est constitué de 9400 nucléotides environ dont la partie codante, formant un grand cadre de lecture ouvert, est encadrée par deux parties terminales non codantes, la région 5' non codante située en aval et la partie 3' non codante (NC) en amont.

La partie centrale de 9030 à 9099 nucléotides (nt) permet le codage d'une grande polyprotéine précurseur composée d'environ 3000 acides aminés (aa), ce nombre varie en fonction de la souche virale. Cette polyprotéine est ensuite clivée par des protéases virales et cellulaires pour donner des protéines fonctionnelles.

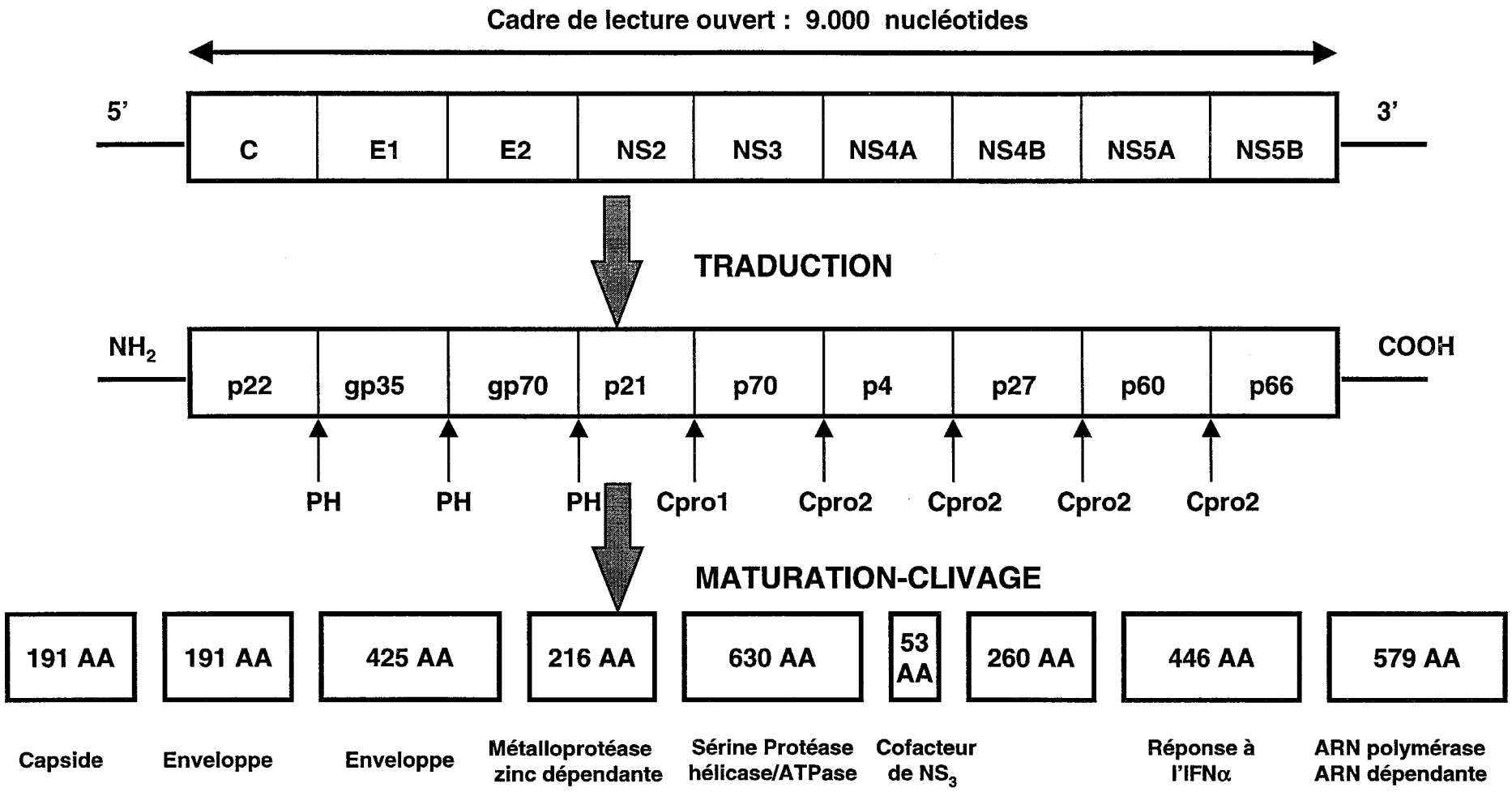
Les gènes codants pour les protéines structurales sont situés du côté 5' du génome (gènes de la capside et des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2) et sont suivis par les gènes des protéines non structurales (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. Entre ces deux groupes, existe un gène codant pour une petite protéine appelée p7 dont le rôle reste à déterminer.

Une région en boucle très stable située après NS5 et avant la partie 3'NC permettrait l'arrêt de la traduction (Pawlotsky et coll 1997a) (figure 3).

Les parties 5' et 3' terminales, bien que non codantes, jouent un rôle fondamental dans la régulation de la réplication et de la transcription du génome viral.

La région 5'NC constituée de 330 nt environ est très conservée. Elle est dépourvue d'une coiffe méthylée en 5' et contient de nombreux replis en épingle à cheveux. La première épingle à cheveux, constituée de 27 nt, aurait un rôle important dans la régulation négative de la transcription du génome. Cette région contient aussi 3 à 5 petits cadres de lecture ouverts non traduits et une grande boucle appelée IRES (Internal Ribosome Entry Site), celle-ci permet la traduction protéique par les ribosomes (Brechot 1997).
Ces données risquent d'évoluer rapidement car des travaux récents semblent démontrer que l'IRES comprend, en plus de la séquence NC, une portion du gène de la capside (extrémité 5') donc une séquence codante.

La région 3'NC, dont la taille et la séquence sont très variables, est beaucoup moins connue. Cette extrémité comporterait trois parties : une partie 3' terminale conventionnelle, une queue polyU, ainsi qu'une partie hautement conservée de 98 aa appelée queue 3'X (ou 3'X tail). Cette dernière se replie en formant une structure « stem-loop » qui constituerait le site d'initiation de la synthèse des brins négatifs d'ARN (Clarke 1997).



PH = Protéases de l'hôte
Cpro1 = Métalloprotéase zinc dépendante
Cpro2 = Sérine Protéase

AA = Acides Aminés
p22 = protéine de poids moléculaire 22 kDa
gp35 = glycoprotéine de poids moléculaire 35 kDa

Figure 3 : Génome polyprotéine et protéines de l'hépatite C

2.3 Les protéines (tableau I et figure 3)

Les protéines du virus de l'hépatite C sont issues de la polyprotéine précurseur codée par le cadre de lecture ouvert. Cette polyprotéine est clivée par des protéases cellulaires et virales.

Les protéases de l'hôte sont des signal peptidases ; ces enzymes coupent les jonctions C/E1, E1/E2 et E2/NS2. Elles génèrent ainsi les protéines structurales C, E1, E2.

Les deux protéases virales sont :

- La métalloprotéase zinc dépendante, codée par la partie C terminale de NS2 et la partie N terminale de NS3. Le domaine catalytique de cette enzyme se situe au niveau de la partie C terminale de NS2; il permet le clivage de la jonction NS2/NS3 et génère la protéine NS2.
- La sérine protéase, codée par le gène NS3. Son domaine catalytique se trouve dans la région N terminale de NS3.

Il faut noter que trois aa (His (1083), Asp (1107) et Ser (1165)) constituent la triade catalytique de cette sérine protéase. Ces trois aa sont hautement conservés pour tous les génotypes du VHC. Il a été observé qu'une seule mutation, au niveau de ces aa, inhibe le clivage de la polyprotéine.

La sérine protéase clive les jonctions NS3/NS4A (en cis), NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B (en trans) et génère les protéines non structurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B.

Cette enzyme a comme cofacteur NS4A qui paraît nécessaire pour cliver les liaisons NS3/NS4A et NS4B/NS5A et semble augmenter l'efficacité du clivage de NS5A/NS5B et NS4A/NS4B. Il existe encore des controverses sur la nature des clivages qui imposent la présence de NS4A. Il semble d'ailleurs que ceci soit fonction du génotype viral impliqué (Bouffard et coll 1995, Kim et coll 1996, Lin et coll 1995).

2.3.1 La nucléocapside, capside ou core.

C'est une protéine non glycosylée de 191 aa dont le poids moléculaire (PM) est de 21 ou 22 kDa ; elle est donc aussi appelée p21 ou p22.

Cette protéine est retrouvée dans le cytoplasme des cellules en association avec les membranes du réticulum endoplasmique (RE) ou avec des gouttelettes lipidiques. Des études ont montré que la protéine de capside pourrait modifier le métabolisme des lipides ; elle aurait donc un rôle dans la stéatose hépatique observée chez les patients atteints d'hépatite C (Clarke 1997).

La partie C terminale hydrophobe du core permet sa liaison aux membranes du RE et sa translocation dans le RE où la protéine subit une glycosylation et un repliement adéquat. Certains auteurs semblent penser que l'association Core/RE faciliterait le clivage entre E1 et cette protéine (Ladaviere 1997).

La partie N terminale permettrait le ciblage du core vers le noyau cellulaire (après coupure de la partie hydrophobe) et l'interaction spécifique avec l'ARN viral. Cette association pourrait se faire grâce à 14 aa basiques de la capside et la partie 5' terminale du génome (Pawlotsky 1997b).

La nucléocapside est bien conservée puisque l'homologie entre les différents sous-types viraux est de 79 à 99 %.

2.3.2 Les protéines d'enveloppe E1 et E2.

Les protéines d'enveloppe sont deux glycoprotéines, de séquence très variable qui s'associent pour former un complexe hétérodimèrique. La maturation de ces protéines d'enveloppe ainsi que la formation du complexe hétérodimèrique se font dans le RE et dépendent de l'association de ces deux protéines à une protéine chaperone : la calnexine (Chovkhi A et coll 1998, Duvet S et coll 1998)

- **E1** de PM 31 à 35 kDa, est aussi appelée gp31 ou gp35. Elle est constituée de 191 aa.
- **E2**, parfois désignée E2/NS1, est une glycoprotéine de 426 aa et d'environ 70 kDa ; on peut la retrouver dans la littérature sous les noms gp70 ou gp72. Cette protéine contient dans sa région N terminale une séquence hypervariable appelée HVR1 dont le taux de mutation est très important. Cette région serait la cible des anticorps neutralisants produits par les sujets infectés.

Ces protéines auraient la capacité de se lier à la lactoferrine. Le rôle de cette association n'est pas encore connu mais l'interaction des protéines structurales entre elles et avec les protéines non structurales pourrait aboutir à des complexes pré-réplicatifs (Pawlotsky 1997b, Brechot 1997).

2.3.3 Les protéines non structurales.

Six protéines non structurales ont été décrites : NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

- **NS2** est une protéine de 216 aa dont le PM varie entre 21 et 23 kDa.

C'est une protéine très hydrophobe ce qui permet son association aux membranes intracytoplasmiques de la cellule infectée.

La partie C terminale de NS2 a une fonction de métalloprotéase zinc dépendante qui implique aussi une petite partie N terminale de NS3, comme cela a déjà été décrit précédemment.

- **NS3** est une protéine de 60 à 70 kDa qui comporte 610 résidus d'aa environ.

Les 180 premiers résidus situés du côté N terminal portent la fonction sérine protéase " trypsine like ". Cette portion a beaucoup été étudiée puisqu'elle permet le clivage des protéines virales non structurales, et donc leur maturation. Les études portent principalement sur l'activité enzymatique et la structure de la protéine (identifiée par des techniques cristallographiques en 1996 par Kim et coll.), ceci dans le but de trouver des inhibiteurs de cette protéase et de les utiliser comme outils thérapeutiques (Kim et coll 1996, Pawlotsky 1997b).

La partie C terminale de la protéine NS3 a un rôle très important dans la réplication du virus puisque c'est une hélicase/ATPase. Elle permet le déroulement de l'ARN génomique indispensable à la réplication.

Des travaux ont montré que NS3 aurait un rôle dans l'évolution de l'hépatite chronique vers le carcinome hépato-cellulaire et plus précisément qu'il existerait une interaction NS3/anti-oncogène P53 et que NS3 aurait été localisée au niveau du noyau cellulaire (Muramatsu et coll 1997, Sakamuro et coll 1995).

- **NS4A** est une petite protéine de 4 kDa constituée de 53 aa.

Son rôle est très important puisqu'elle a été caractérisée comme étant le cofacteur de la protéase NS3 pour le clivage de la polyprotéine. Le domaine nécessaire à l'action cofacteur de NS3 se situe au niveau des 33 aa C terminaux. Il permet la reconnaissance du substrat et son interaction avec le site catalytique de NS3. La structure cristalline du complexe NS3/NS4A comme celle de NS3 a pu être identifiée grâce aux techniques de cristallographie utilisant les rayons X. Il est à noter que le complexe NS3/NS4A permettrait l'association virus VHC/complexe RNAse réplicase.
NS4A aurait en outre la capacité de moduler l'assemblage des protéines non structurales en interagissant avec les parties centrales de NS5A et NS4B, et donc de former des complexes pré-réplicatifs jouant un rôle important dans la réplication virale (Pawlotsky 1997b)

- **NS4B** est une protéine de 27 kDa constituée de 260 aa environ. Son rôle n'est pas bien connu actuellement.

- **NS5A** est une protéine phosphorylée de 446 aa et de PM 58 kDa.

La phosphorylation, et surtout l'hyperphosphorylation de NS5A, pourrait mettre en jeu le cofacteur NS4A.
NS5A semble être un facteur critique dans la susceptibilité du virus à l'IFNα. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que NS5A inhiberait l'activité d'une protéine (la PKR) dont la synthèse est induite par l'IFNα et dont l'activité antivirale s'exerce par phosphorylation du facteur eIF-2 (Gale et coll 1997).
Actuellement les travaux portent principalement sur une région particulière de NS5A appelée ISDR (région déterminante de la sensibilité à l'IFNα) (Clarke 1997).

- **NS5B** a un rôle beaucoup mieux connu. Il s'agit d'une protéine de 580 aa dont le PM se situe entre 66 et 70 kDa.

Son activité ARN polymérase ARN dépendante permet la réplication du virus. Il a même été proposé un site de fixation de l'ARN à la protéine mais cela reste à vérifier.
Actuellement des travaux sont en cours pour exprimer cette enzyme dans différents organismes ou lignées cellulaires afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine et de développer éventuellement des molécules capables d'inhiber la réplication virale en bloquant l'activité de NS5A (Pawlotsky 1997b).

Tableau I : Structure et fonction des protéines du virus de l'hépatite C

	Nombre d'acides aminés	Poids moléculaire (kDa)	Structures associées	Fonction	Cibles de la réponse immune
Capside **Nucléocapside Ou Core**	191	21-22	-réticulum endoplasmique -gouttelettes lipidiques -ARN viral	-structurale (protéine de capside) -Modification du métabolisme des lipides (rôle dans la stéatose hépatique) ?	-réponse humorale* (RH) →anticorps précoces (3 à 12 semaines) -réponse cellulaire (RC) →CD4+, CD8+
E1	191	31-35	-complexe hétérodimèrique entre E1 et E2 -avec la calnexine	-structurale (glycoprotéine d'enveloppe)	-RH
E2/NS1	425	70	-avec les protéines non structurales (formation d'un complexe préréplicatif)		-RC CD8+>CD4+
NS2	216	21-23		-métalloprotéase zinc dépendante (au niveau C terminal)	-RC CD8+
NS3	630	60-70	-polyprotéine (substrat)	-sérine protéase trypsine like (côté N terminal) (recherche d'inhibiteurs de cette protéine) -hélicase/ATPase (côté C terminal) (déroulement de l'ARN génomique indispensable à la réplication)	-RH→anticorps précoces -RC CD4+
NS4A	53	4	-polyprotéine -site catalytique deNS3	-cofacteur de la sérine protéase -association VHC/complexe RNAse réplicase ? -formation de complexes préréplicatifs ?	-RH -RC CD4+
NS4B	260	27		-phosphorylation de NS5A ?	
NS5A (phosphorylée)	446	58-60		-sensibilité du virus à l'interféron α (inhibition de l'action de la protéine kinase C dont la synthèse est induite par l'IFNα)	-RH→anticorps précoces
NS5B	579	60-70		-ARN polymérase ARN dépendante → réplication du virus (recherche d'inhibiteurs de cette protéine)	

? = hypothèses étudiées
* = mise en évidence à l'aide de peptides recombinants ou de synthèse (Cf figure 10)

3 Variabilité génétique

Le virus de l'hépatite C a une variabilité génétique importante. Cette diversité génétique s'explique par le fort pourcentage d'erreur de réplication de l'ARN polymérase ARN dépendante qui, de plus, n'a pas la capacité de corriger les erreurs qui surviennent pendant la réplication. Ainsi, comme la plupart des virus à ARN, le VHC a une fréquence de mutation variant de 10^{-3} à 10^{-4} mutation par génome et par an. Si ces mutations ne perturbent pas la réplication du virus, elles sont stables et seront transmises à la descendance ; si ce n'est pas le cas, le variant viral disparaît.

Il est probable que ces erreurs de réplication puissent donner naissance à de nombreux virus défectifs. Ces virus défectifs seraient la cause de la difficulté à isoler et à identifier le virus par des techniques moléculaires classiques.

De nombreux chercheurs ont proposé une classification du virus en génotypes et sous-types. Une nomenclature consensuelle a été proposée par Simmonds et coll (1993). Le génotype est représenté par des chiffres arabes et le sous-type par des lettres minuscules. Cette classification ne cesse d'évoluer : en 1995 Simmonds a recensé six génotypes et 11 sous-types différents (numérotés dans l'ordre de leur découverte), à l'heure actuelle il existerait, dans le monde, plus de 10 génotypes et 52 sous-types.

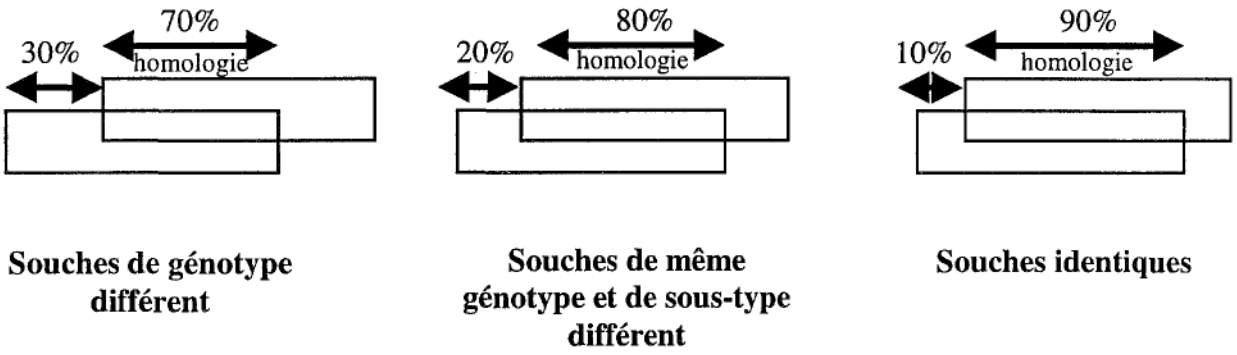


Figure 4 : Classification des souches du VHC en fonction du pourcentage d'homologie du génome viral :

Les génomes ayant moins de 70% d'homologie sont considérés comme de génotypes différents. Dans un même génotype, les sous-types ont au plus 80% d'homologie ; au dessus de 90%, il s'agit de la même souche.

En France, 85% des cas d'hépatite C connus appartiennent aux génotypes 1a, 1b, 2a, ou 3a. L'étude de la répartition des génotypes est très importante puisqu'elle est fonction de facteurs géographiques, épidémiologiques (mode de transmission principalement) et cliniques (gravité de la maladie et résistance au traitement). Cette notion sera développée dans un chapitre ultérieur.

L'étude de la variabilité génétique et le séquençage des différents génotypes ont permis de déterminer l'hétérogénéité des mutations. En effet certaines régions du génome sont très conservées et d'autres sont plus variables (figure 5) (Van der Poel et coll 1994). E2 contient, du côté N terminal, une région particulière dont le taux de mutation est important. Cette région appelée HVR1 (hypervariable region 1) est constituée d'une trentaine d'aa et contiendrait le principal épitope neutralisant du virus de l'hépatite C. La mutation rapide de ce site permettrait l'échappement du virus au système immunitaire de l'hôte et conduirait à la sélection de mutants résistants

Ces sous-populations résistantes présentes au même moment dans l'organisme hôte sont appelées " quasi-espèces virales ". Lors d'une infection chronique à VHC, le nombre et le type de quasi-espèces virales sont stables. Cet équilibre peut être rompu sous la pression d'un traitement antiviral ou d'une modification de l'immunité de l'hôte.

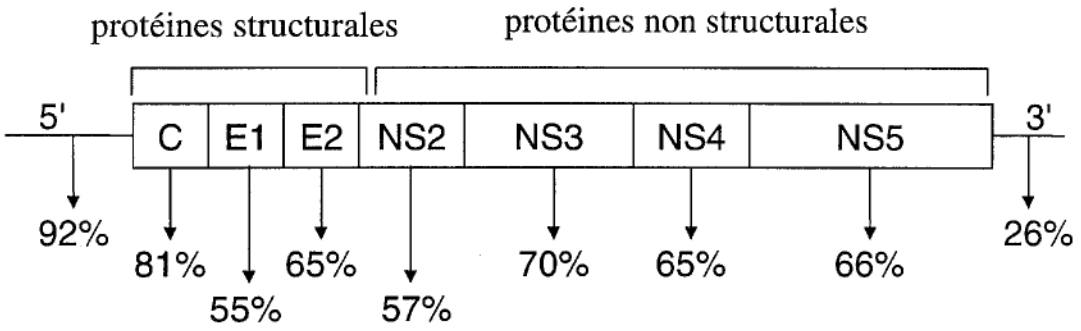


Figure 5 : Pourcentage d'homologie nucléotidique entre les différents génotypes du VHC (d'après Van der Poel et coll, 1994)

4 Le cycle viral (Figure 6)

Le cycle viral de multiplication est difficile à étudier du fait de l'absence de systèmes de culture *in vitro*, de modèles animaux mal adaptés et des difficultés à identifier le virus.

Malgré tout, on connaît l'importance des régions 3' et 5'NC dans la réplication du virus et dans la régulation de la réplication. On sait aussi que l'ARN polymérase ARN dépendante est capable de synthétiser des brins d'ARN négatifs à partir de brins positifs. Ces brins négatifs permettent la synthèse massive d'ARN messagers qui assurent la traduction des protéines virales et des brins positifs d'ARN qui seront encapsidés et enveloppés afin de former de nouveaux virions. Les brins négatifs sont utilisés comme marqueurs de réplication alors que les brins positifs prouvent la présence du virus mais ne donnent pas d'information quant à son activité. Actuellement, il est possible de détecter et quantifier de façon spécifique les brins positifs et négatifs. Le rapport des deux permet de déterminer le niveau de réplication du virus (Lerat et coll 1996).

La réplication virale se déroule principalement dans les cellules hépatocytaires mais les cellules mononucléées du sang abritent aussi ce virus et constituent un réservoir viral, ce qui expliquerait la réinfection du foie après un traitement antiviral ou une transplantation hépatique.

La porte d'entrée cellulaire du virus reste discutée. Certaines études suggèrent que le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDL) pourrait avoir un rôle dans la fixation du VHC aux cellules cibles ; les particules virales étant associées *in vivo* aux LDL et aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL), il est probable que ce récepteur ne soit pas spécifique (Clarke 1997). D'autres études semblent s'orienter vers les glycosaminoglycanes de surface, et plus particulièrement pour les héparane sulfates (Cribier et coll 1998, Garson et coll 1999). Enfin des travaux récents ont montré que la protéine d'enveloppe E2 se fixait à la molécule CD81. Les molécules CD81 sont des récepteurs de la superfamille des tetraspanines exprimés sur différents types cellulaires dont les hépatocytes et les lymphocytes (Levy et coll 1998) ; ces molécules CD81 jouent sans doute un rôle important lors de la pénétration du virus dans la cellule en tant que récepteur ou corécepteurs du VHC ainsi que dans la transmission de signaux cellulaires (Pileri et coll 1998, Rice et coll 1999, Flint et coll 1999a et b).

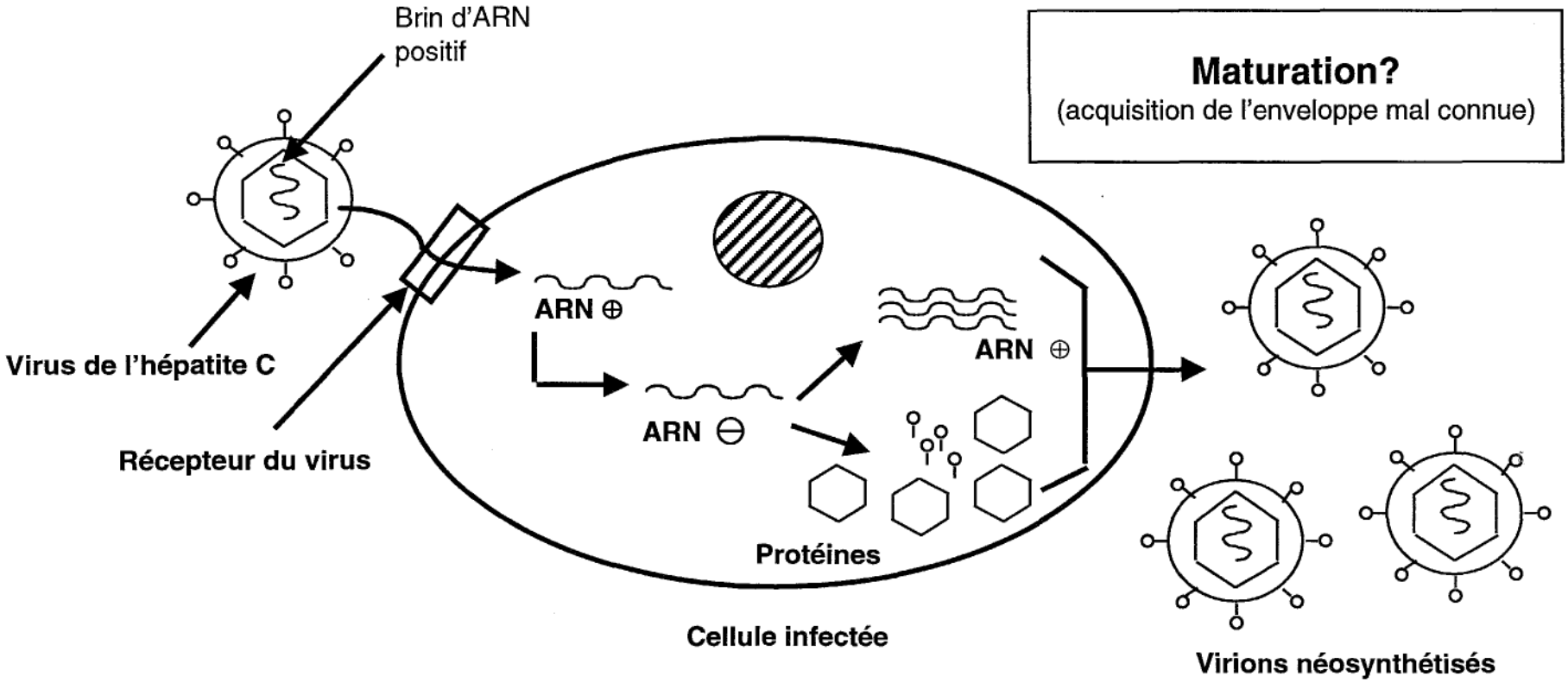


Figure 6 : Cycle de réplication du virus de l'hépatite C

5 La réponse immune

La réponse immune provoquée par une infection à virus C ne confère qu'une faible protection. Dans 90 % des cas l'infection aiguë reste asymptomatique et évolue, dans 80 % des cas, vers la chronicité. Ce faible niveau de protection peut être dû à l'importante variabilité du virus, mais aussi au bas niveau d'expression du virus et à son faible relargage antigénique (Houghton 1996, Rehermann et coll 1997)

5.1 La réponse cellulaire

Une réponse cellulaire CD4+ et CD8+ a pu être mise en évidence, lors de l'infection à VHC, en mesurant la capacité de certaines protéines virales recombinantes à induire la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique (Botarelli et coll 1993).

Cette immunité cellulaire ne permet pas à elle seule l'élimination du virus de l'organisme, mais pourrait moduler la replication virale lors de l'infection chronique (Lechmann et coll 1996).

La réponse immune cellulaire serait impliquée dans l'atteinte histologique du foie, également due à un effet cytopathogène direct puisqu'il a été montré qu'un traitement immunosuppresseur diminuait l'importance de l'atteinte hépatique (Fournillier-Jacob et coll 1997, Pawlotsky 1997).

5.1.1 La réponse T auxilliaire (CD4+)

Les épitopes T CD4+ sont principalement situés au niveau de la protéine de capside, de NS3 et de NS4 (Hoffman et coll 1995). Une forte réponse T CD4+ spécifique de ces trois protéines serait associée à une évolution bénigne voire à une résolution de l'infection (Diepolder et coll 1995).

L'activation des cellules T CD4+ répondant à des épitopes secondaires situés au niveau des protéines E1, E2 et NS5 serait, elle, associée à un contrôle de l'infection et à une bonne réponse au traitement (Ferrari et coll 1994).

Une séquestration des lymphocytes T CD4+ a été mis en évidence au niveau du foie. Quarante à quatre vingt pourcent de ces lymphocytes T expriment des marqueurs d'activation mais seulement 1 % d'entre eux semblent spécifique des protéines du VHC (Minutello et coll 1993). Ces lymphocytes pourraient être activés indépendamment des antigènes par effet « bystander » (Abrignani 1997)

5.1.2 La réponse T cytotoxique (CD8+)

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont détectés dans le sang périphérique après stimulation spécifique, mais rarement après stimulation non spécifique par les anticorps anti-CD3. En revanche les CTL intrahépatiques répondent à une activation non spécifique. Il semble donc que la concentration intrahépatique des CTL soit beaucoup plus importante que la concentration périphérique.

Les principaux épitopes T CD8+ sont situés au niveau de la protéine de capside, de NS2 et des protéines d'enveloppe (Fournillier-Jacob et coll 1997).

Une forte activité cytolytique des CTL semble associée à une réponse favorable au traitement (Inchauspé 1999) ainsi qu'à une infection résolutive lorsque la réponse anticorps est faible; en revanche lorsque l'activité CTL est faible l'infection évolue vers la chronicité (Cooper et coll 1999)

5.2 La réponse humorale

Les anticorps anti-VHC (IgG) ont pu être détectés grâce à la production de protéines recombinantes. Les anticorps les plus précoces apparaissent entre 3 et 12 semaines, il s'agit des anticorps dirigés contre la capside, NS3 et NS5. Les anticorps anti-NS4 et anti-protéines d'enveloppe sont plus tardifs (entre 11 et 22 semaines). La production de ces anticorps ne semblent pas suivre un schéma précis en fonction de l'évolution de la maladie.

Par la suite, les peptides de synthèse ont permis une étude plus poussée des épitopes B qui semblent être, pour la plupart, des épitopes conformationnels. La région HVR1 contient également des épitopes linéaires (Fournillier-Jacob et coll 1997).

En 1994, le groupe de Shimizu a mis au point un test de neutralisation du VHC *in vitro.* Ce test consiste à bloquer l'adsorption du virus sur des cellules en lignée (cellules HPB-Ma) en utilisant des anticorps issus de sérums de chimpanzés. Ce test a permis de montrer que les principaux anticorps neutralisants sont dirigés contre la région HVR1 de la protéine E2, région spécifique des « Quasi-espèces » virales ; ceci permettrait d'expliquer l'échappement du virus à la réponse immune humorale (Shimizu el coll 1994a, Shimizu et coll 1996a).

Les anticorps (Ac) neutralisants sont appelés anticorps NOB (Neutralization of binding). Une étude a montré que les patients chroniquement infectés par le VHC avaient un faible taux d'Ac NOB (Rosa et coll 1996). En revanche, les patients ayant spontanément éliminé le virus ont un titre élevé en Ac NOB sur une longue période. Cette production d'Ac intense et soutenue pourrait être due à une réponse T auxiliaire d'excellente qualité (Abrignani 1997).

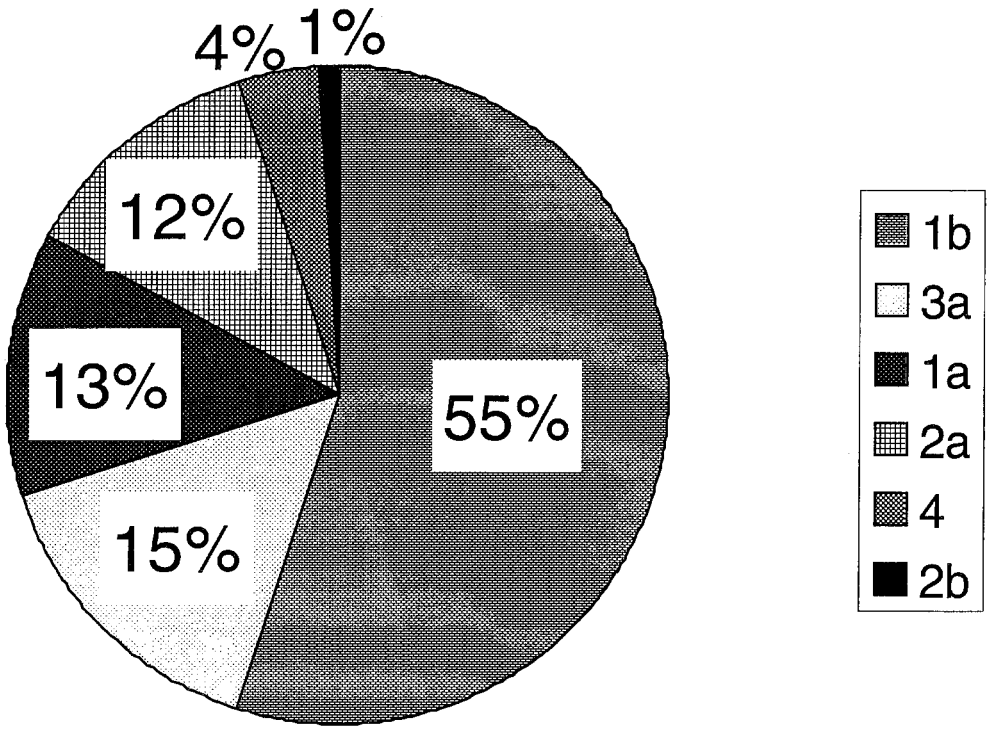
6 Epidémiologie

Les infections à VHC sont considérées à l'heure actuelle comme un problème de santé publique majeur du fait de leur prévalence et de leur gravité (évolution possible vers une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire). En effet, l'hépatite C touche toutes les populations avec une prévalence de 0,5% (Australie, Canada, Suisse, pays Scandinaves) à 6% de la population générale dans les pays en voie de développement (Egypte notamment). En France, la prévalence de l'infection est estimée à 1,2% soit 500.000 à 600.000 sujets infectés et environ 6000 nouveaux cas par an.

La répartition géographique du VHC est encore à l'étude mais elle semble suivre grossièrement celle du VHB.

Les différents génotypes sont répartis inégalement autour du globe. Le génotype 1b est impliqué dans 70 à 80% des infections au Japon et dans 50 à 70% en Europe, tandis qu'en Afrique et au Moyen-Orient on retrouve essentiellement le génotype 4. Aux Etats Unis, on retrouve les génotypes 1a et 1b. Ces données tendent à évoluer puisque le génotype est aussi fonction du mode de contamination et que tous les moyens sont mis en œuvre pour éliminer les contaminations *via* les produits sanguins (Cuthbert JA 1994, Dubois et coll 1997, Karmochkine et coll 1998) (figure 7).

Figure 7 : répartition des génotypes du VHC en France
Enquête conduite auprès de 30 services hospitaliers, incluant 6664 malades atteints d'hépatite chronique C diagnostiquée entre 1990 et 1993.
(Roudot-Thoraval et coll 1996)



Le mode de contamination principal est la transmission parentérale. Deux grands groupes ont été identifiés: les transfusés et les toxicomanes intra veineuse (IV).

Avant 1991, la transfusion de produits sanguins labiles (concentrés érythrocytaires, plaquettaires, leucocytaires ou plasma) ou stables (facteurs de coagulation, voire immunoglobulines IV) était le principal mode de contamination. Le risque d'infection post-transfusionnelle étant fonction du nombre d'unités de sang transfusées et de la fréquence de l'acte transfusionnel, les polytransfusés, les hémophiles et les hémodialysés étaient donc des groupes à très haut risque.

Depuis 1991, de nombreux efforts ont été faits pour détecter les donneurs de sang contaminés grâce à des questionnaires évaluant les facteurs de risques du donneur, à l'élimination des lots ayant un taux d'alanine aminotransférase - transaminase (ALAT) deux fois supérieur à la normale ou plus et aux tests sérologiques de plus en plus sensibles.

Toutefois, certains donneurs peuvent être en phase sérologique et clinique muette (contamination récente ou cas atypiques) ; les lots de plasma utilisés pour la production de facteurs de coagulation ou d'hémoglobines spécifiques sont donc traités par la technique appelée " solvant détergent " dont l'efficacité a été prouvée pour les virus enveloppés. Grâce à ces nouvelles mesures, le risque de transmission transfusionnelle est passé de plus de 6% à moins de 0,5% puisque subsiste toujours un risque résiduel.

Le génotype le plus fréquemment rencontré dans ce groupe est le génotype 1b. Le nombre d'infections mixtes (à plusieurs génotypes) est plus élevé dans cette population que dans les autres groupes infectés par d'autres modes de transmission.

A l'heure actuelle, le groupe à risque le plus important est celui des toxicomanes IV; ceci est essentiellement dû à l'échange de seringues usagées contaminées. Depuis l'épidémie à VIH et grâce à la campagne préventive qui lui a été associée, cette pratique a diminué. Malgré tout, des études montrent qu'après deux ans de toxicomanie IV, 50% des sujets sont infectés et 90% le sont après six ans. Dans ce groupe, les génotypes 1a et 3a sont les plus fréquemment rencontrés, ce qui explique l'augmentation de la prévalence de ces génotypes en comparaison au génotype 1b (Roudot-Thoraval 1997).

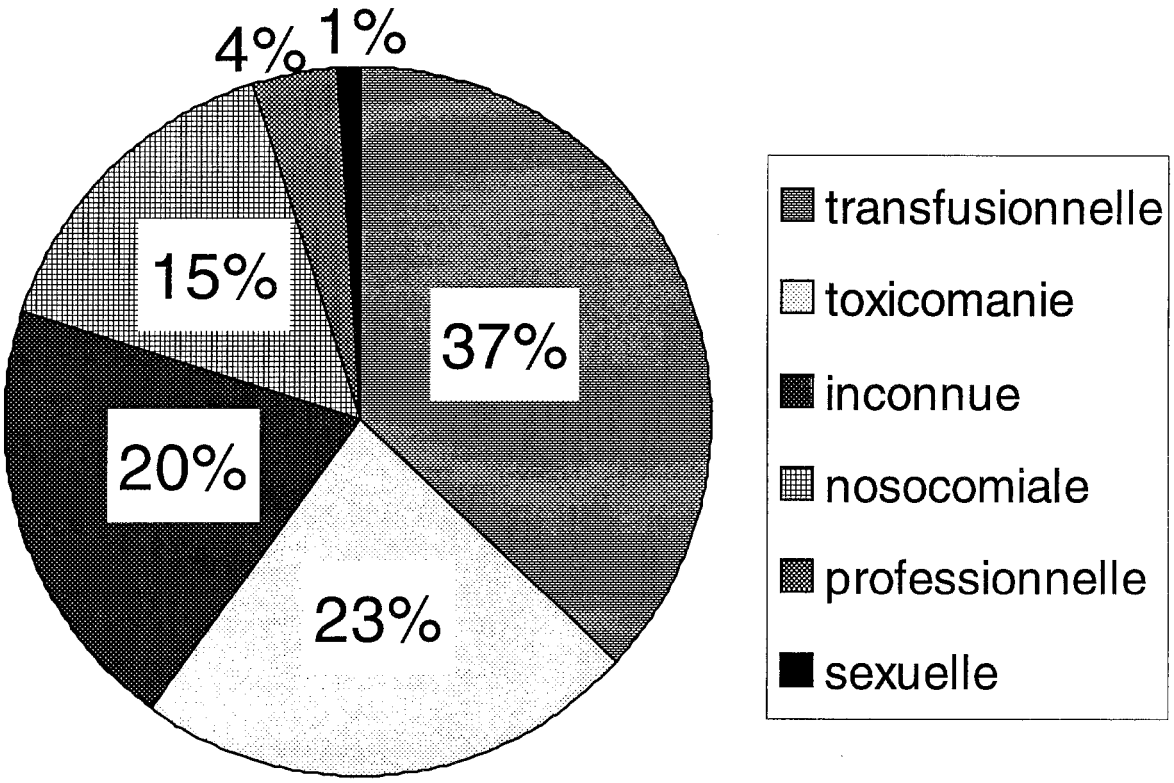
D'autres modes de contamination existent mais leur fréquence reste difficile à évaluer.

- La transmission sexuelle semble exister mais reste exceptionnelle. Ceci pourrait être lié au fait que l'ARN du virus n'a jamais été clairement mis en évidence dans les liquides biologiques autres que le sang (Rooney.et coll 1998).
- La transmission familiale a aussi été évoquée (Brusaferro et coll 1999).
- La transmission verticale mère/enfant existe dans moins de 5% des grossesses. Ce taux semble fortement augmenter lorsque la mère est coinfectée par le VIH (20%) puisque le risque de contamination de l'enfant est fonction de la charge virale de la mère et que la coinfection par le VIH augmente la virémie à VHC (Cribier et coll 1996). Cette transmission serait plutôt périnatale qu'*in utero*. Aucune preuve de contamination par le lait maternel n'a été apportée, et l'allaitement est possible (Menendez et coll 1999).

♦ Enfin, les contaminations nosocomiales et professionnelles dans les centres de santé existent, mais tendent à diminuer grâce à la sensibilisation du personnel de santé vis à vis de la manipulation d'objets souillés. Il faut noter que la mésothérapie, l'acupuncture, les soins dentaires, les tatouages, le « percing » et toutes autres pratiques percutanées peuvent être à l'origine d'une contamination (Irish et coll 1999, Izopet et coll 1999, Serfaty 1999).

Malgré les études épidémiologiques faites sur le virus de l'hépatite C, il existe 20% des sujets infectés chez qui aucune source de contamination n'a pu être retrouvée. Les caractéristiques de ces sujets ressemblent à celles des patients contaminés par transfusion. Il pourrait donc s'agir d'une transmission par injection parentérale dont le patient n'a pas souvenir ou d'une contamination *via* les pratiques percutanées, endoscopiques ou dentaires. De plus chez ces patients la notion de voyage en zone de forte endémie est souvent retrouvée.

Figure 8 : les sources d'infection à VHC en France
Enquête conduite auprès de 30 services hospitaliers, incluant 6664 malades atteints d'hépatite chronique C diagnostiquée entre 1990 et 1993. (Roudot-Thoraval et coll 1996)



(Alter 1997, Dubois et coll 1997, Roudot-Thoraval 1997) (figure 8).

7 Approche clinique

7.1 *Manifestations cliniques hépatiques et évolution*

7.1.1 Hépatite aiguë

La contamination d'un sujet par le VHC est suivie d'une phase d'incubation variant de 4 à 12 semaines puis parfois d'une hépatite aiguë. Dans le cas d'une hépatite aiguë, 10% des sujets seront symptomatiques (troubles digestifs, asthénie, syndrome pseudo-grippal, douleur à l'hypochondre droit, prurit etc...) mais dans la majorité des cas, l'hépatite restera asymptomatique. Seulement 20% des patients développeront un ictère. Sur le plan biologique, les transaminases s'élèvent de façon modérée (10 à 20 fois les valeurs normales). Les hépatites aiguës sévères sont rares et l'existence d'éventuelles hépatites C fulminantes reste discutée.

Chez 20% des patients infectés, le virus sera éliminé ; chez les 80% restants, le virus échappe à la réponse immunitaire et l'infection devient chronique.

7.1.2 Hépatite chronique

A ce stade, les patients sont souvent asymptomatiques, la découverte de la maladie est donc fortuite la plupart du temps (souvent à l'occasion d'un don de sang). Parfois les patients peuvent présenter une asthénie, une hépatomégalie avec ou sans splénomégalie, des angiomes stellaires ou une hypertension portale. L'élévation des transaminases est modérée et instable.

Pour 70% des sujets, des lésions hépatiques vont apparaître, celles-ci sont dues à la réplication du virus au niveau du foie ; 30% évolueront vers une hépatite chronique active qui conduit à des lésions lobulaires et/ou une inflammation portale qui peut être accompagnée d'une infiltration lymphocytaire, d'une stéatose ou d'une fibrose hépatique.

Dans 10% des cas d'hépatite chronique active, une cirrhose apparaît, 5 à 10 ans suivant l'infection. L'âge, le sexe et la consommation chronique d'alcool sont les principaux facteurs pronostiques défavorables à l'évolution de la maladie (augmentent le risque de développer une cirrhose). Il n'a pas été démontré que le génotype influençait l'histoire naturelle de la maladie, par contre le nombre de « quasi-espèces virales » pourraient jouer un rôle.

Un carcinome hépatocellulaire apparaît entre 20 et 30 ans après l'infection chez 2 personnes sur les 10 ayant développé une cirrhose.

Il faut noter que 20 % des sujets atteints d'hépatite chronique restent asymptomatiques. La virémie est alors faible et les lésions hépatiques sont modérées voire absentes. Il faut néanmoins surveiller ces personnes car leur évolution à long terme reste imprévisible (Degos et coll 1996, Marcellin et coll 1997, Mattsson L et coll 1988, Pawlotsky et coll 1997a) (figure 9).

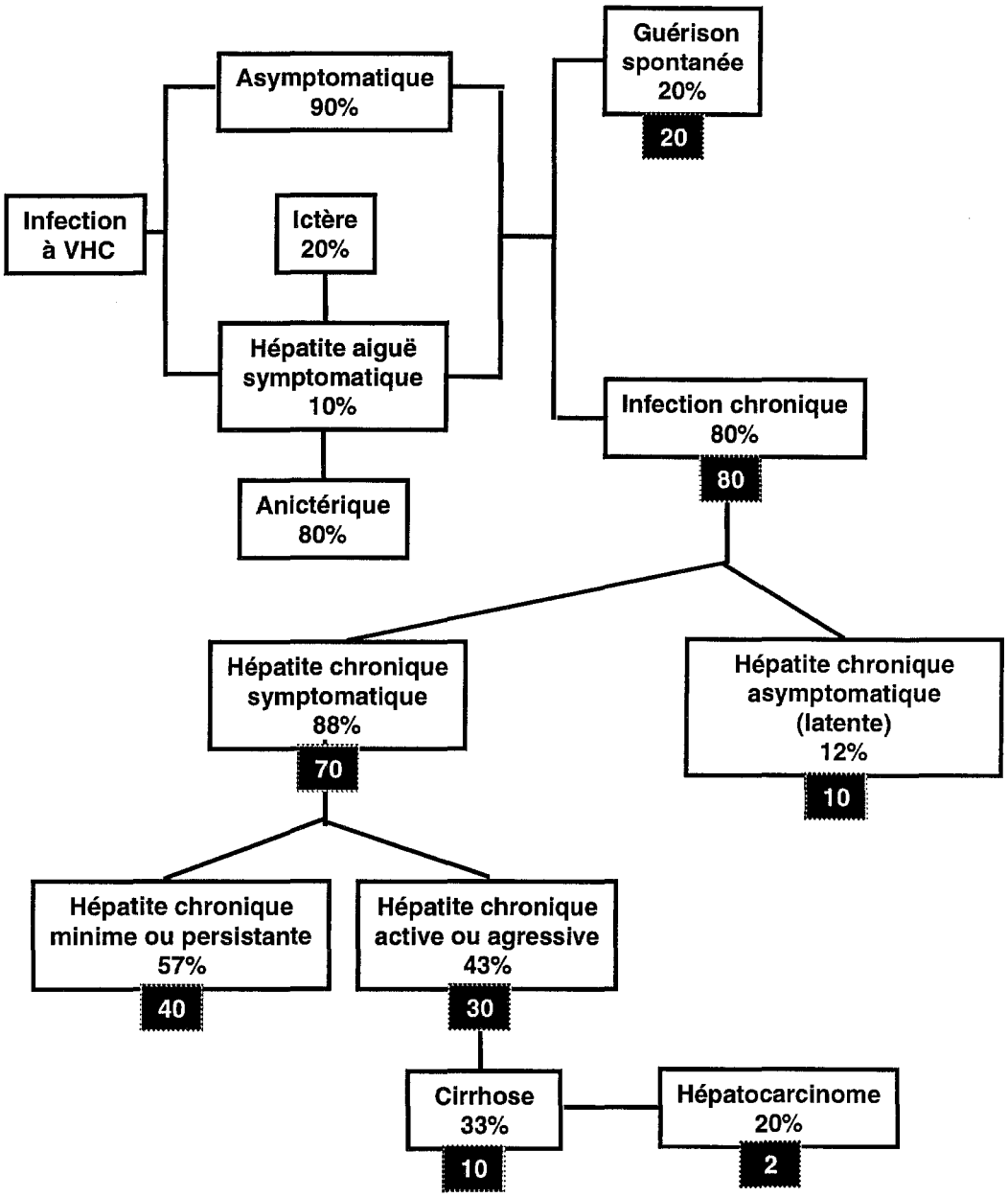


Figure 9 : Caractéristiques de l'évolution d'une infection à VHC

Nombre de patients pour 100 patients contaminés par le VHC

7.2 Signes cliniques extra hépatiques

Chez certains patients, les troubles hépatiques sont associés à des désordres immunologiques.

Il a en effet été mis en évidence des anticorps anti-tissus (anti-nucléaire et anti-muscles lisses) chez 5 à 20% des patients infectés par le VHC ; mais ces auto-anticorps sont aussi retrouvés chez les personnes atteintes d'autres pathologies hépatiques et pourraient être dus à l'hypergammaglobulinémie présente chez ces patients ou à une réaction croisée avec les anticorps anti-VHC. Les anticorps anti-LKM1 (microsomes de foie et de rein) et anti-LC1 (cytosol hépatique de type 1) paraîtraient plus représentatifs d'un désordre immunitaire vrai associé à l'hépatite C.

Les études portant sur la relation entre l'infection à VHC et les affections thyroïdiennes auto-immunes sont divergentes. Certains groupes ont en effet observé une prévalence importante des anticorps anti-VHC chez les malades atteints de dysthyroïdie, alors que d'autres semblent montrer le contraire. En fait les résultats sont souvent fonction de la sensibilité et de la spécificité des tests utilisés (ELISA de 1ère, 2ème, 3ème génération ou RIBA).

Dans tous les cas, il faut tenir compte de la prévalence relativement élevée des anticorps anti-thyroïdiens et anti-VHC dans la population générale et du fait que les malades ayant des troubles thyroïdiens peuvent être plus sensibles à l'infection par le virus de l'hépatite C (Marcellin et coll 1993).

En contrepartie, le rôle du traitement à l'IFNα dans l'apparition des anomalies thyroïdiennes est beaucoup mieux connu. Il semble qu'un tel traitement puisse déclencher, par ces effets immunomodulateurs, des maladies auto-immunes chez les personnes ayant un terrain particulier. Il a été décrit des anémies hémolytiques, des purpuras thrombopéniques, des lupus érythémateux et des diabètes de type I sous IFNα (Marcellin et coll 1993).

L'association du syndrome de Sjögren à l'infection par le VHC a aussi été suggérée. Si la prévalence des sialadénites lymphocytaires chez le sujet VHC positif est élevée, les autres symptômes de cette pathologie sont absents, le lien n'a donc pas été formellement démontré.

En revanche, il est reconnu que le VHC peut être à l'origine d'une cryoglobulinémie mixte (50% des sujets VHC positifs ont une cryoglobulinémie mixte et plus de la moitié des cryoglobulinémies mixtes sont associées à des anticorps anti-VHC). Ce désordre immunologique serait dû à la formation de complexes immuns circulants cryoprécipitables contenant de l'ARN et des antigènes viraux, des anticorps anti-VHC et des IgM à activité facteur rhumatoïde. Dans 25% des cas apparaissent des manifestations cliniques dont la sévérité et la localisation sont variables : atteintes cutanées (purpura, vascularite), neurologiques (neuropathie périphérique) ou rénales (glomérulonéphrite membranoproliférative). La cryoglobulinémie semble aussi être associée à la gravité de l'atteinte histologique du foie (Degos et coll 1996).

De nombreuses autres immunopathologies ont été découvertes chez des patients atteints d'hépatite C chronique telles que la périartérite noueuse, le lichen plan, le lupus érythémateux disséminé. Ces associations semblent fortuites ou liées aux désordres immunitaires induits par l'infection et les lésions hépatiques, plus qu'au virus VHC lui-même (Marcellin et coll 1997).

Enfin, l'infection à VHC semble être fortement liée à l'apparition d'une porphyrie cutanée tardive et à l'exacerbation de ses symptômes cutanés. Dans la majorité des cas il existe une anomalie génétique préexistante (Marcellin et coll 1993 et 1997).

8 Le diagnostic

Actuellement il existe deux outils de diagnostic virologique. Le sérodiagnostic par détection des anticorps anti-VHC dans le sérum des patients et la détection du génome du virus à partir des sérums des patients. L'étude histologique d'une biopsie hépatique peut être utilisé en complément des deux tests précédents pour évaluer le degré d'atteinte hépatique, définir le traitement et préciser le pronostic.

Mais le dépistage de l'hépatite C est onéreux, il n'est donc pas réalisé de façon systématique dans la population générale, mais uniquement dans les groupes à risque tels que les toxicomanes et les personnes ayant été transfusées avant 1991, ainsi que les hémophiles, les hémodialysés et les populations carcérales (Conférence de consensus, Hépatite C, 1997).

En ce qui concerne les dépistages sporadiques, ils sont recommandés lors de la découverte, chez un patient, d'un taux de transaminases anormalement élevé et inexpliqué.

8.1 Les tests sérologiques

A la suite de l'identification du génome de l'hépatite C en 1988, les premières protéines recombinantes produites ont été utilisées afin de détecter les anticorps anti-VHC présents dans le sérum des patients. La technique utilisée met en jeu une réaction immunoenzymatique (ELISA).

Les premiers tests commercialisés utilisaient le peptide 5-1-1 codé par une partie de NS4 et le peptide c100-3 codé par NS4 et une petite partie de NS3. Le manque de spécificité et de sensibilité de ces tests de première génération et le nombre de faux positifs qui en découlait ont conduit à la recherche de nouveaux antigènes recombinants.

Les antigènes tels que c22-3 (protéine de capside), c33c (codée par le gène NS3) et c200 (comprenant NS3 et NS4) ont donné naissance aux tests de deuxième génération. Plus sensibles et plus spécifiques, ils permettent aussi un dépistage plus précoce (2 à 3 mois plus tôt) puisque les anticorps anti-capside sont les plus rapides à apparaître.

Il faut noter que la plupart des patients infectés ont des anticorps anti-c22-3 ou anti-c33c, d'où une diminution importante du nombre de faux négatifs.

Les tests de troisième génération sont apparus avec la production d'une protéine NS5 recombinante et ont été améliorés grâce à des peptides synthétiques dénommés c22p et c100p. Ces nouveaux tests ont permis un gain de sensibilité (surtout dû au changement de conformation de la protéine recombinante c33c) mais leur spécificité et la précocité du dépistage n'ont que légèrement été améliorées par rapport aux tests de deuxième génération (Buisson et coll 1997, Conry-Cantilena 1997, Degos et coll 1996) (figure 10).

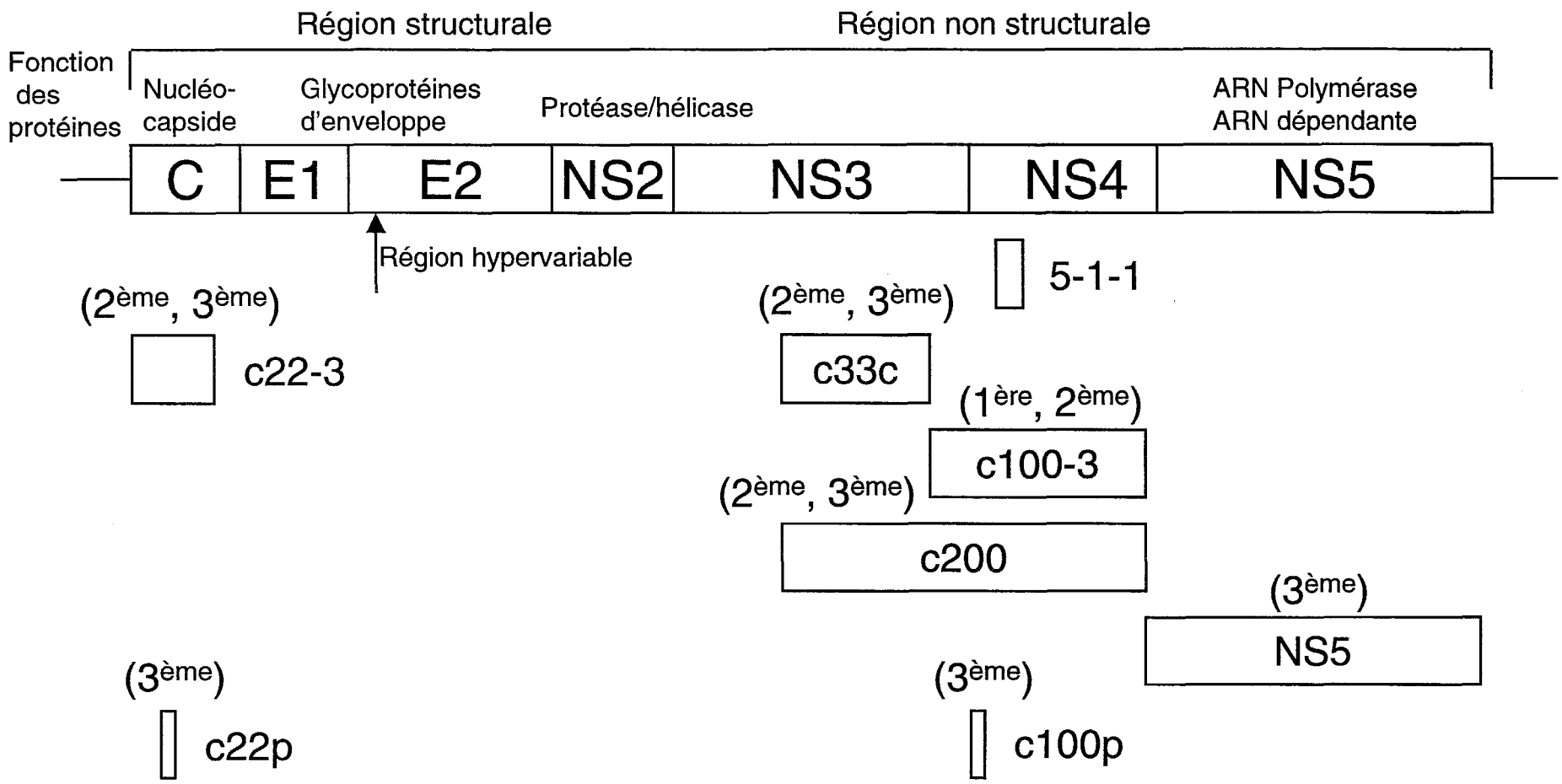


Figure 10 : Organisation du génome du VHC et des protéines utilisées dans les tests anticorps de première, seconde et troisième génération

Les protéines du VHC sont codées par les régions structurales (C = nucléocapside, E1 et E2 = glycoprotéines d'enveloppe) et non-structurales (de NS1 à NS5) du génome. Les antigènes recombinants 5-1-1, c22-3, c33c, c100-3, c200 et NS5 sont utilisés dans les sérodiagnostics. Les peptides synthétiques c22p et c100p ont récemment été introduits dans ces tests. Entre parenthèses sont indiquées les générations de sérodiagnostic dans lesquelles sont utilisées les protéines (D'après Cathy Conry-Cantilena 1997)

Le Journal Officiel du 12/08/97 préconise, pour le dépistage d'une infection à VHC, de réaliser un sérodiagnostic par une technique ELISA. Un résultat négatif n'impose pas un test de confirmation ; par contre si le résultat est positif ou douteux, un contrôle sérologique doit être effectué sur un second prélèvement. Cette confirmation peut être réalisée par une technique ELISA, en utilisant des réactifs différents de ceux utilisés pour le dépistage, ou par une technique d'immunoblot (RIBA) (Journal Officiel de La République Française 1997).

Ces tests sérologiques de dépistage, bien que très importants dans le diagnostic d'une infection par le virus de l'hépatite C, comportent certains inconvénients. En effet, l'apparition tardive des anticorps anti-VHC laisse une fenêtre sérologiquement muette où les sérodiagnostics ne peuvent être utilisés. Ils ne permettent pas non plus de déceler la maladie chez les nouveaux nés de mère VHC positives, puisque ceux-ci n'ont pas encore leur propres anticorps et ont encore ceux de leur mère. Ils sont inutiles lors d'hépatites C aiguës ou chroniques séronégatives et ne sont pas suffisants lorsque les patients sont immunodéprimés et lorsque les résultats sont discordants ou positifs chez des patients avec des transaminases normales. Dans ce cas, un diagnostic direct s'impose (figure 11).

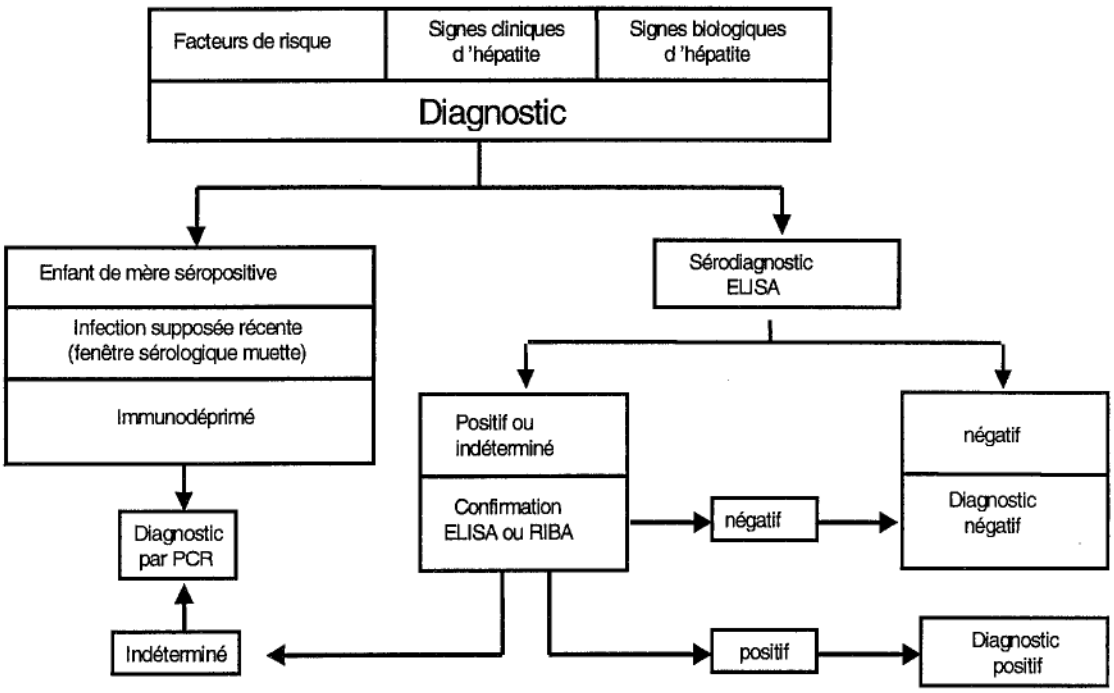


Figure 11 : Diagnostic d'une infection à VHC

8.2 Les tests moléculaires.

Les techniques biologiques usuelles de détection des virus ne sont pas utilisable en ce qui concerne le VHC. En effet, ce virus est en trop faible concentration dans le sang pour être mis en évidence par microscopie électronique, et il n'existe pas de systèmes cellulaires permettant sa mise en culture. Les antigènes de ce virus sont aussi en trop faible concentration dans le sang pour être détectés.

Le seul diagnostic direct possible pour le virus de l'hépatite C est la détection de son ARN génomique (Garson 1994).

Trois techniques de biologie moléculaire permettant la détection et / ou la quantification de l'ARN viral sont utilisées en clinique. Les deux premières ont comme principe d'amplifier le nombre de molécules d'ARN présentes dans le sérum avant de les révéler (RT-PCR et NASBA). La troisième est basée sur la détection d'un signal amplifié à partir des molécules d'ARN existant dans le sérum des patients (ADNb).

8.2.1 Les tests qualitatifs

La seule technique de détection de l'ARN viral utilisée à des fins diagnostiques est la RT-PCR : les molécules d'ARN viral sont transformées en molécules d'ADN complémentaires par une enzyme, la réverse transcriptase (étape de transcription inverse, RT). Ces ADN complémentaires sont amplifiés de façon cyclique grâce à une enzyme à activité ADN polymérase (étape de polymérisation en chaîne, PCR). La détection du produit amplifié se fait par électrophorèse suivie ou non d'une hybridation spécifique des séquences génomiques ciblées. Pour augmenter la sensibilité de la technique, une PCR nichée peut être réalisée sur les amplicons obtenus après la première PCR ; dans ce cas la révélation se fera uniquement par électrophorèse.

Cette technique est très sensible. Le problème principal est le risque de contamination croisée lors de la réalisation de la PCR et donc de résultats faussement positifs. Les trousses standardisées commercialisées actuellement (Amplicor HCV®, Roche Diagnostic Systems) sont plus faciles à utiliser et de ce fait diminuent le risque de contamination.

8.2.2 Les tests quantitatifs

La quantification de l'ARN viral n'est pas nécessaire pour poser un diagnostic. En revanche, elle est essentielle au suivi thérapeutique des patients VHC positifs et à la surveillance des malades ayant subi une transplantation hépatique après une infection à virus C. En effet, la quantification de l'ARN viral permet d'évaluer la réplication du virus dans l'organisme et ainsi de suivre l'évolution de la maladie, d'évaluer l'efficacité du traitement ou de mettre en évidence la réinfection d'un greffon.

Trois techniques permettent La quantification de l'ARN viral :

- La RT-PCR citée ci-dessus peut être adaptée à une analyse quantitative.
- La méthode NASBA HCV® (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, Organon Teknika) permet de fabriquer de nombreux ARN simple brin antisens à partir d'une molécule d'ARN viral.
- La technique des ADNb consiste à fixer sur une molécule d'ARN viral plusieurs molécules d'ADN branché (ADNb). Chacun des ADNb peut fixer un grand nombre de molécules marquées à la phosphatase alcaline (PAL). Après incubation de la PAL avec son substrat, le signal est détecté par chemioluminescence. Cette technique d'amplification du signal est spécifique et reproductible mais beaucoup moins sensible que la PCR (20% des patients ARN positifs en PCR apparaissent négatifs avec cette technique).

Actuellement deux tests sont utilisés en clinique :

- le kit de RT-PCR quantitative mis au point par les laboratoires Roche Diagnostic Systems sous le nom Monitor HCV ® dont la sensibilité est inférieure à 1000 copies de génome / ml lorsqu'il est réalisé à l'aide de l'automate Cobas
- le test bDNA quantitatif commercialisé par les laboratoires Chiron Diagnostics sous forme de trousse standardisée appelée Quantiplex HCV RNA® ; la sensibilité de ce test est inférieure à 2×10^5 copies de génome / ml, mais sa grande reproductibilité, qui permet d'établir une courbe d'étalonnage avec des ARN viraux synthétiques, explique qu'il soit très utilisé.

Il faut noter que les résultats obtenus avec ces deux kits ne sont pas superposables. En effet, un même sérum testé avec deux techniques différentes peut donner des virémies extrêmement variables. Il est donc indispensable de conserver, pour une étude, le même type de test, ceci afin de pouvoir corréler l'évolution clinique de la maladie à une virémie donnée.

Actuellement des techniques de détection de l'ARN viral en temps réel, autorisant une analyse quantificative, ont été mises au point sur des automates (Lightcycler® Roche Diagnostic, ABI Prism 7700® Perkin Elmer). Ces techniques permettent de réaliser dans le même tube la reverse transcription et la PCR en présence d'une sonde fluorescente ; la détection de la fluorescence combinée à l'activité 5'-3' nucléase de la Taq polymérase permet une quantification directe des produits de PCR. La sensibilité, la simplicité et la reproductibilité de ces techniques permettent d'analyser de nombreux échantillons et pourraient être très intéressantes pour les suivis de traitement (Martell et coll 1999).

8.2.3 Le génotypage

Le génotypage n'est pas systématique lors du diagnostic. Il est utilisé pour des recherches épidémiologiques et permet éventuellement de prédire en partie l'évolution de la maladie et de la réponse au traitement surtout en ce qui concerne le génotype 1b qui résiste fréquemment au traitement.

La RT-PCR permet le génotypage des souches virales. Dans ce cas, les amorces, utilisées pour la synthèse d'ADN complémentaire sont spécifiques d'une séquence du génome qui varie en fonction du génotype. Il s'agit en général d'une région de la capside, de E1, de NS5B ou de la partie 5'NC. Le seul produit standardisé commercialisé actuellement se nomme Inno LiPA HCV® des laboratoires Innogenetics.

Des techniques de sérotypage (détection des anticorps spécifiques des épitopes de NS4) ont été mises sur le marché (HCV Serotyping Assay® par Murex Diagnostic). Elles sont moins sensibles, n'identifient pas les sous-types, mais présentent l'intérêt d'être moins onéreuses, plus faciles à manipuler et utilisables même en l'absence de virémie (Buisson et coll 1997, Degos et coll 1996, Pawlotsky et coll 1997a, Wattre 1997).

Ces techniques de biologie moléculaire sont donc des outils essentiels à l'étude épidémiologique, au suivi de la maladie et du traitement ainsi qu'au diagnostic de l'infection par le VHC. En fait, la détection d'ARN viral dans le plasma d'un patient permet d'affirmer qu'il a contracté le virus et que celui-ci se réplique dans son organisme. Par contre, l'absence de détection du génome n'exclut pas définitivement un tel diagnostic car la sensibilité de ces tests ne permet pas la détection d'une virémie très faible (possible pour ce type de virus). Un sérodiagnostic négatif associé confirmera le résultat.

9 Le traitement de l'hépatite C chronique

9.1 L'interféron α

9.1.1 Généralités

Les interférons IFN sont des interleukines sécrétées en faible quantité par l'organisme et sont spécifiques d'espèces. Il existe trois types d'IFN : les IFNα, les IFNβ et l'IFNγ. Les IFNα et β sont sécrétés respectivement par les leucocytes et les fibroblastes, l'IFNγ est produit par les lymphocytes T. L'IFNα est une protéine de 166 aa codée par 22 gènes situés sur le bras court du chromosome 9. Sa synthèse est induite par les virus et plus particulièrement par les ARN double brin synthétisés au cours du cycle viral (c'est à dire uniquement lorsque le virus se multiplie).

L'activité antivirale de l'IFNα peut s'exercer directement sur la cellule infectée, par inhibition de la synthèse des protéines virales ; dans ce cas la fixation de l'IFNα sur son récepteur induit la synthèse de deux protéines antivirales :

- la protéine kinase R (PKR) qui permet la phosphorylation donc l'inactivation du facteur eIF2, et l'arrêt de la traduction des protéines virales.
- la 2'-5' oligoadénylate synthétase, laquelle active une endonucléase qui dégrade les ARN messagers viraux.

L'action antivirale peut s'exercer indirectement sur la cellule infectée par stimulation de la réponse immune de l'hôte (augmentation de la synthèse des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité, stimulation de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, sécrétion d'autres cytokines).

Ainsi l'IFNα protège les cellules saines, inhibe la réplication du virus dans les cellules infectées et élimine le virus de l'organisme (Goudeau 1997).

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de cloner le gène de l'IFNα dans *E Coli* et de produire des IFNα recombinants. En 1991 deux IFNα recombinants ont reçu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des hépatites B et C : l'IFNα 2a produit par les laboratoires Roches (Roferon® A ou Laroferon®) et l'IFNα 2b produit par les laboratoires Schering-Plough (Introna® ou Vitaferon®), dont les structures ne diffèrent que par un aa.

9.1.2 Pharmacologie

L'IFNα est administré principalement en injection sous-cutanée, moins douloureuse que l'intramusculaire et plus efficace que l'intraveineuse. Il est présenté sous forme d'un lyophilisat à reconstituer dans 1 ml d'eau ppi (pour préparation injectable) pour plus de facilité d'emploi, et doit être conservé entre 2°C et 8°C (ne doit pas être congelé). Le catabolisme et l'élimination de l'IFNα se font par voie rénale.

L'activité de l'IFNα est dose dépendante ; il en est de même pour les effets secondaires. A faible dose, 3 à 5 Millions d'Unités (MU), ceux-ci sont rares et on observe essentiellement un syndrome pseudo-grippal. A des doses supérieures à 18 MU, ils sont plus fréquents et plus sévères, principalement d'ordre neurologique et digestif.

Les effets secondaires peuvent être transitoires en début de traitement et sont réversibles à l'arrêt du traitement. Les effets secondaires et les contre-indications de l'IFNα sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : Effets secondaires et contre-indications de l'interféron α

Effets secondaires de l'interféron α :		**Contre-indications à l'interféron α :**
Syndrome pseudogrippal	+++	Grossesse
Asthénie	+++	
Anorexie, Amaigrissement	++	
Nausées, diarrhées,		Insuffisance rénale sévère
Douleurs abdominales		Cardiopathie sévère
Insomnies, hypersomnies		Hépatite autoimmune
Eruptions cutanées		
Dysthyroïdies	++	Troubles psychiques graves
Troubles de l'humeur, Dépression		Atteinte du SNC
Epilepsie		Epilepsie
Leuconeutropénies	+++	Cytopénie sévère
Thrombopénies		Infection à VIH avec diminution des
Anémies		lymphocytes
		Traitement aux immunosuppresseurs

Les contre-indications médicamenteuses à l'IFNα sont peu nombreuses ; elles concernent les immunosuppresseurs, les salicylés et les glucocorticoïdes car leurs actions sont antagonistes. Il est donc nécessaire de prévenir les patients en ce qui concerne le syndrome pseudo-grippal et leur conseiller d'utiliser du paracétamol pour faire baisser la fièvre et diminuer les courbatures. L'association avec des médicaments fortement métabolisés par le foie doit être surveillée car leur élimination peut être diminuée. Enfin, lors d'un traitement comprenant des médicaments hématotoxiques ou neurotoxiques, un ajustement posologique doit être effectué afin de ne pas majorer la toxicité de l'IFNα (Chauvet et coll 1996).

9.1.3 Traitement des hépatites C par l'IFNα

L'IFNα recombinant a reçu une autorisation de mise sur le marché (A.M.M.) pour le traitement des hépatites C chroniques actives. Cet état doit être confirmé par l'étude histologique d'une biopsie hépatique. Le bénéfice du traitement n'est pas net pour les sujets avec une fibrose ou une cirrhose décompensée et la décision de traiter ces sujets est encore très controversée (risque d'effet rebond à l'arrêt du traitement et d'aggravation des lésions hépatiques).

Les patients répondant le mieux au traitement sont des femmes jeunes (les raisons en sont encore inexpliquées), contaminées récemment par un génotype autre que 1b, sans cirrhose, avec une charge virale et un degré d'hétérogénéité virale faibles. L'absence de déficit immunitaire, de consommation d'alcool et des valeurs basses de γ glutamyl transférase et de ferritine sont aussi des critères favorables.

L'activité de l'IFNα dans l'hépatite C s'exerce principalement par son action antivirale directe. L'action immunomodulatrice ou antivirale indirecte n'entrerait pas ou peu en compte contrairement au traitement de l'hépatite B.

La posologie préconisée est la suivante : 3 MU d'IFNα 3 fois par semaine pendant 12 mois.

Les résultats escomptés à court terme sont une normalisation des transaminases, une négativation de la recherche d'ARN viral par PCR et une amélioration des lésions histologiques du foie.

Les deux premiers critères évoluent rapidement. On peut alors distinguer les patients répondeurs (50%) des non-répondeurs (50%) pour qui le traitement est arrêté au bout de trois mois sans amélioration. Chez les patients répondeurs, 60% rechutent à plus ou moins long terme (6 mois = rechuteurs précoces, plus de 24 mois = rechuteurs à long terme) et seulement 40% ont une réponse prolongée (figure 12). Ces résultats peuvent être améliorés en prolongeant le traitement pendant 6 mois.

Les améliorations histologiques sont plus tardives et doivent être évaluées au moins 6 mois après la fin du traitement. Elles peuvent exister même chez les patients n'ayant pas normalisé leurs transaminases dans le cas où le traitement est maintenu au moins 12 mois.

A long terme l'objectif d'un traitement par l'IFNα est de diminuer le risque d'apparition des cirrhoses et des carcinomes hépatocellulaires.

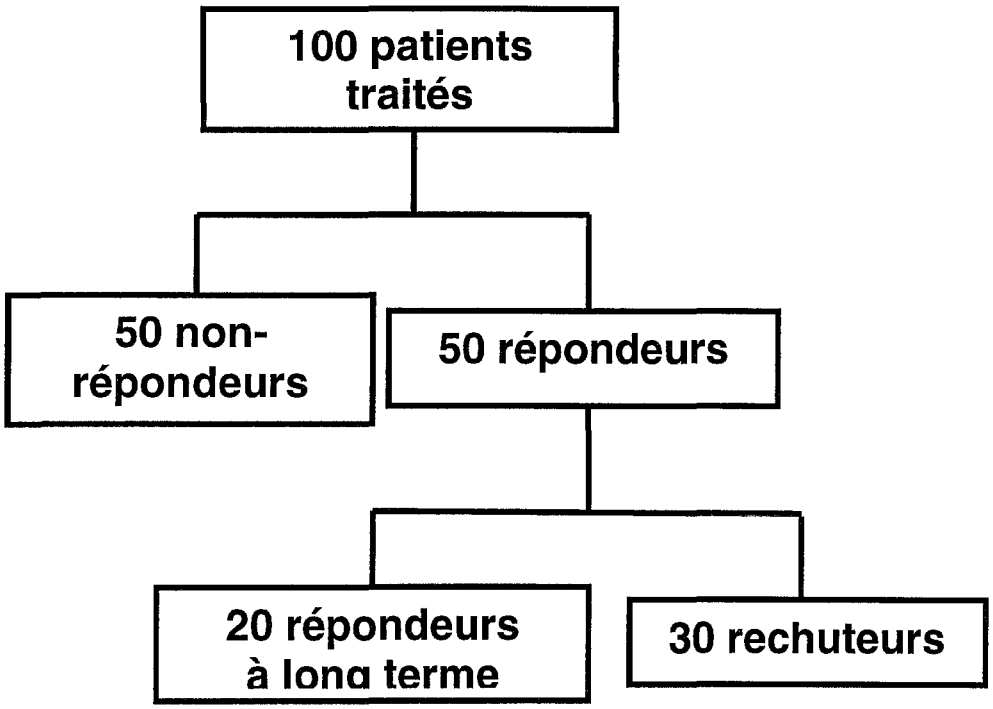


Figure 12 : Réponse au traitement par l'interféron α lors d'une hépatite C chronique

Des méta-analyses ont montré que le nombre de patients répondeurs à long terme augmente de 17% quand le traitement est porté de 6 à 12 mois. Aussi l'A.M.M. de l'IFNα préconise à l'heure actuelle un traitement d'au moins 12 mois. En contrepartie le bénéfice d'un traitement à des doses plus élevées ne semble pas clair et est peu documenté d'autant que de fortes doses d'IFNα posent de gros problèmes d'intolérance.

Les patients rechuteurs sont généralement soumis à un deuxième traitement, ce qui permet d'améliorer le nombre de répondeurs à long terme (20 à 25% de répondeurs à long terme lors du deuxième traitement). Une bithérapie IFNα/Ribavirine peut aussi être envisagée, mais ce traitement n'a pas encore obtenu l'A.M.M. et n'est utilisé qu'en autorisation temporaire d'utilisation (A.T.U).

Pour les patients non répondeurs au premier traitement, il n'y a pas de bénéfice supplémentaire à traiter un seconde fois (Poynard et coll 1996).

L'utilisation de l'IFNα dans l'hépatite C aiguë n'est pas notifiée dans l'A.M.M. mais elle pourrait diminuer le risque de passage à la chronicité (Goudeau et coll 1997).

9.2 La ribavirine

La ribavirine est un analogue nucléosidique synthétique. Son action antivirale correspond à son interférence avec le synthèse des nucléosides naturels, induisant une déplétion du stock intracellulaire de guanosine triphosphate.

L'étude de cette molécule a montré qu'elle diminuait efficacement le taux des transaminases pendant la durée du traitement mais son effet disparaît à l'arrêt de celui-ci. Cette molécule n'a en outre aucun effet sur la virémie. Elle n'est donc jamais utilisée seule.

En revanche, son utilisation en association avec l'IFNα a montré son efficacité ; 40% des patients traités par l'association sont répondeurs à long terme contre 20% pour les patients traités par l'IFNα seul. Le traitement par l'association IFNα/ribavirine peut être envisagé en première intention et serait efficace chez les patients rechuteurs lors d'un second traitement (Davis et coll 1998, Poynard et coll 1998). L'efficacité de cette association n'a pas été démontrée chez les malades non répondeurs à un premier traitement à l'interféron seul (Poupon et coll 1997, Zarski 1999).

Dans le cas où l'atteinte hépatique nécessite une greffe de foie, il est possible que le greffon soit réinfecté. Ceci est certainement dû au réservoir de virus que constituent les cellules mononucléées du sang. Cette réinfection se manifeste par une hépatite aiguë et un pic virémique. Le greffon sera à nouveau lésé mais n'évoluera que très rarement vers une cirrhose (Pawlotsky et coll 1997a). L'association IFNα/ribavirine semble être efficace dans 48 % des récidives virales après transplantation hépatique (Bizollon et coll 1997).

9.3 Les nouveaux interférons

L'interféron pégylé correspond à une molécule d'IFNα associée à une molécule de polyéthylène glycol. Cette association permet une diffusion progressive et prolongée de l'interféron ce qui améliore le confort du patient en ne réalisant qu'une injection par jour. Cette nouvelle molécule semble en outre donner de meilleurs résultats que l'IFNα classique.

L'interféron "consensus" est un interféron préparé à partir d'une séquence d'ADN complémentaire transfectée dans *E. Coli.* C'est un IFNα de type 1 synthétique recombinant provenant de l'alignement de 10 IFNα connus et de l'IFNβ.

L'interféron naturel appelé aussi interféron lymphoblastoïde est obtenu par induction d'une lignée cellulaire lymphoïde avec le virus Sendaï. Sa structure, comportant des sites de glycosylation différent de l'IFNα classique, lui confererait une activité antivirale et immunomodulatrice différente ainsi qu'une capacité à induire des anticorps moins importante.

Les résultats obtenus avec ces deux dernières molécules ne semblent pas très différents de ceux obtenus avec l'IFNα classique. L'IFN "consensus" pourrait malgré tout avoir un intérêt comme alternative thérapeutique dans des groupes de malades ayant de mauvais facteurs prédictifs (Zarski 1999).

9.4 Autres traitements

L'acide ursodésoxycholique dont les effets seraient similaires à ceux de la ribavirine, aurait un intérêt chez les patients ayant une cholestase. Il permettrait de lever la cholestase et d'améliorer l'efficacité de l'IFNα (Takano et coll 1994).

La déplétion martiale pourrait, elle aussi, améliorer la réponse à l'IFNα, principalement chez les patients ayant un surcharge ferrique.

Des études portant sur l'association antiinflammatoires non stéroïdiens/IFNα sont en cours mais les résultats ne semblent pas satisfaisants (Poupon et coll 1997).

L'amantadine, molécule utilisée dans le traitement préventif des infections grippales à virus *Influenza A*, administrée 2 fois par jour (doses de 100 mg) pendant 6 mois induirait une réponse virologique soutenue dans 18 % des cas. Mais son intérêt porterait plutôt sur son association à l'IFNα seul ou à la bithérapie IFNα/ribavirine (Brillanti et coll 1997).

Enfin, les glucocorticoïdes diminuent le taux des transaminases mais augmentent significativement la virémie. Le bénéfice d'une telle thérapie serait donc nul, d'autant que l'effet cesse dès l'arrêt du traitement (Fong et coll 1994).

9.5 Perspectives

Les travaux actuels pourraient aboutir, à moyen terme, à la découverte d'inhibiteurs spécifiques de la protéase, de l'hélicase ou de la polymérase du virus de l'hépatite C.

Des ribozymes ou oligonucléotides anti-sens complémentaires du génome viral ont montré leur efficacité *in vitro* ; ils permettent le clivage de l'ARN viral et l'inhibition de la traduction protéique. Ces activités restent à démontrer *in vivo* (Lieber et coll 1996, Mizutani et coll 1995, Welch et coll1998).

La recherche d'un vaccin est toujours d'actualité. Malheureusement sa mise au point à court terme semble peu probable du fait des nombreuses difficultés rencontrées.

Le premier gros problème concerne la grande diversité génomique du virus en général et plus particulièrement de la région HVR1, cible des anticorps neutralisants; le virus peut donc aisément échapper à la réponse immune de l'hôte.

Le second problème est l'absence de système cellulaire de réplication stable et bien documenté qui permettrait une évolution plus rapide des connaissances concernant le virus, ce que ne permettent pas les systèmes animaux tels que le chimpanzé.

Le troisième problème important, lié au précédent, est la méconnaissance de la réponse immune de l'hôte vis-à-vis du virus. Quelques progrès ont cependant été réalisés en ce qui concerne la stratégie vaccinale. En effet, la production des glycoprotéines d'enveloppe recombinantes a été améliorée en utilisant des systèmes d'expression permettant d'obtenir des protéines glycosylées et sous forme de dimère. Sous cette forme elles seraient beaucoup plus immunogènes.

De nouvelles perspectives vaccinales sont actuellement envisagées, elles concernent la production de vaccins à virus génétiquement atténués et à virus recombinants ou l'injection d'ADN nu codant pour les protéines de structure (Fournillier et coll 1999).

Tous ces projets nécessiteront encore beaucoup de temps avant d'aboutir à un vaccin utilisable chez l'homme (Cahour 1995, Fournillier-Jacob et coll 1997, Koshy et coll 1996).

10 Conclusion

Depuis la découverte du VHC et la prise de conscience de l'importance de l'épidémie et de sa gravité, les connaissances concernant ce virus n'ont cessé d'évoluer. Il reste néanmoins de nombreux points à élucider notamment l'absence de systèmes de culture du virus.

De nombreux efforts sont faits actuellement pour trouver des systèmes de réplication cellulaire. Ils permettront dans l'avenir d'étudier et de comprendre la variabilité génétique du virus afin de connaître les mécanismes de persistance virale, de trouver de nouvelles thérapeutiques et de mettre au point une stratégie vaccinale.

La mise au point d'outils diagnostiques et de suivi de la maladie plus reproductibles, plus spécifiques, plus sensibles et plus précoces sera utile pour mieux connaître l'évolution de la maladie avec ou sans traitement.

Enfin les connaissances épidémiologiques devront permettre de mieux caractériser les modes de contamination pour mettre en place des moyens prophylactiques efficaces.

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Un certain nombre d'obstacles gêne la compréhension de la pathogénèse du virus de l'hépatite C. Un obstacle majeur est l'absence de système de culture permettant la réplication efficace du virus. Il est donc très difficile actuellement d'étudier le cycle viral et la pathogénèse virale *in vitro*.

L'objectif du présent travail était de sélectionner une ou plusieurs lignées cellulaires capables de fixer le virus de l'hépatite C et de soutenir une réplication stable du virus. Cinq lignées cellulaires ont été étudiées : deux lignées lymphocytaires humaines, les cellules B Namalwa et les cellules T MOLT-4, une lignée d'hépatocarcinome humain (cellules PLC/PRF/5), une lignée de rein de singe vert (cellules Vero) et la lignée AP61 de cellules de moustique.

Dans un premier temps une étude bibliographique sera exposée sous forme d'une revue générale avant de présenter les résultats expérimentaux du travail réalisé au laboratoire.

A / TRAVAUX ANTERIEURS

Quelques groupes de chercheurs ont néanmoins obtenu des résultats intéressants sur différents modèles cellulaires. Certaines équipes ont utilisé des cultures primaires de cellules humaines, d'autres des lignées cellulaires. En outre, il a pu être mis en évidence une production d'ARN viral après transfection de plusieurs types cellulaires (Dash et coll 1997, Kolykhalov et coll 1997, Yanagi et coll 1998, Yoo et coll 1995).

1 Cultures primaires de cellules

1.1 Hépatocytes humains

♦ En 1993, l'équipe de Iacovacci publiait un des premiers essais d'infection de culture primaire d'hépatocytes fœtaux humains isolés d'un embryon de 9 semaines.

Ces cellules, incubées avec 0,5 ml d'un sérum VHC positif contenant 10^6 copies de génome par ml, étaient maintenues en culture pendant 24 jours. Les brins positifs (+) d'ARN viral ainsi que les intermédiaires de réplication du génome viral (brins négatifs (-) d'ARN)

étaient détectés par RT-PCR dans les cellules (Iacovacci et coll 1993) et le surnageant de culture (Carloni et coll 1993) jusqu'à 24 jours post infection (p.i.) à des quantités de plus en plus importantes (technique des dilutions limites). Après réinoculation d'un lysat de cellules infectées à des cellules saines, il était possible de détecter l'ARN viral dans les cellules jusqu'à 12 jours p.i., trois passages viraux pouvaient ainsi être réalisés. Ce système cellulaire était ensuite utilisé pour l'étude des caractéristiques du VHC dans ce type de culture (immunofluorescence, microscopie électronique, RT-PCR quantitative et ultracentrifugation en gradient de saccharose) (Iacovacci et coll 1997a).

♦ En 1994, Lanford et coll avaient utilisé des hépatocytes de chimpanzé et des hépatocytes humains, qu'ils incubaient avec un sérum VHC positif pendant 3 heures à 37°C. L'ARN (+) et (-) du virus était détecté dans les cellules pendant 25 jours p.i., avec une augmentation importante de la quantité d'ARN lors de la première semaine. L'addition d'interféron α (IFNα) dans la culture inhibait la multiplication du virus.

♦ Une technique différente était utilisée en 1996 par Ito et coll. Des hépatocytes provenant d'un patient ayant une hépatite chronique à virus C étaient mis en culture. Les brins d'ARN (+) et (-) étaient détectés dans les cellules et dans le surnageant de culture pendant 4 semaines. L'ARN du VHC était toujours présent dans les cellules. Le génome viral pouvait être détecté dans les surnageants de culture bien que le milieu soit changé régulièrement ; ceci suggérait un relargage permanent du virus. Cette étude a également permis de détecter la protéine du core du virus par immunofluorescence et de mettre en évidence une évolution génétique de la région HVR1.

♦ La dernière étude portant sur les hépatocytes humains en culture primaire est celle de Fournier et coll en 1998. Cette équipe avait testé le caractère infectieux de 33 sérums VHC positifs sur ce modèle cellulaire et montrait qu'il était possible de détecter les brins (+) d'ARN viral jusqu'à 30 jours p.i. alors que les intermédiaires de réplication (détection des brins (-) par la technique de la RTth) n'étaient détectables que 14 jours avec un maximum à 5 jours et une diminution par la suite.

1.2 Cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) humaines

Le seul groupe ayant travaillé sur les PBMC est un groupe de Strasbourg.

Une première publication (Cribier et coll 1995) avait montré qu'il était possible de détecter l'ARN (+) dans les cellules pendant 3 semaines, avec une diminution la première semaine et un pic la seconde ou la troisième semaine. La quantité d'ARN (+) détectée dans le surnageant de culture était très faible et les brins (-) d'ARN viral étaient détecté uniquement dans les cellules, il existait donc une réplication virale mais très faible.

Dans un second article (Cribier et coll 1998), ce groupe étudiait, grâce à ce système, la le rôle des dextrane sulfates dans la fixation du virus à la cellule culture.

1.3 Conclusion

Les systèmes de culture primaire de cellules humaines semblent donc intéressants pour la multiplication du VHC, puisque L'ARN viral est détecté pendant 1 mois dans ces modèles. Néanmoins, l'infection ne semble perdurer que lors des premiers passages viraux et ces systèmes n'ont pas montré de production massive de virus. De plus, ces cultures présentent l'inconvénient de ne pouvoir être maintenus qu'un mois environ et d'être difficile à mettre en œuvre en comparaison aux lignées cellulaires.

2 Culture de lignées cellulaire (Tableaux III-IV-V)

2.1 Lignées d'hépatocytes humains

Trois équipes ont tenté d'infecter ce type cellulaire par le virus de l'hépatite C.

♦ Les premiers travaux (Tagawa et coll 1995) concernaient la lignée WRL68 d'hépatocytes embryonnaires et la lignée Hep G2 d'hépatoblastome. Après incubation pendant 24 heures d'environ 10^6 cellules avec 400 µl d'un sérum titré à 10^9 copies de génome par ml, la recherche de brins (+) et (-) d'ARN viral était effectuée dans les cellules et les surnageants de culture. Les cellules Hep G2 sont peu intéressantes puisque, si l'ARN (-) était présent pendant 39 jours dans les cellules, les brins (+) n'étaient détectés que pendant 2 jours, ce qui pourrait traduire un cycle viral incomplet. En revanche, pour les cellules WRL68, les brins (+)

étaient détectés dans les cellules jusqu'à 48 jours et jusqu'à 62 jours dans le surnageant ; les brins (-) étaient présents dans les cellules pendant 62 jours. Cette lignée semblait donc être permissive pour le VHC.

♦ Les travaux de Ikeda et Kato qui depuis 1996 ont exploité une lignée d'hépatocytes non néoplasiques PH5CH. Ces cellules (10^5) étaient incubées, pendant au moins 7 heures à 37°C avec 50 µl d'un inoculum contenant 10^7 copies de génome par ml (génotype 1b). L'analyse de la présence des brins (+) d'ARN viral dans les cellules PH5CH et leur surnageant de culture révèle que le VHC peut être maintenu 30 jours dans ce type de culture (Kato et coll 1996).

Dans un article ultérieur (Ikeda et coll 1998a) cette équipe montre qu'il est possible de maintenir une infection de la lignée pendant 70 à 100 jours si l'on réduit la température de culture à 32°C, que l'on peut inhiber cette infection en ajoutant l'IFNα à la culture, et que le clonage de la lignée permet d'obtenir, dans certains cas, de meilleurs résultats que pour la lignée mère. La même année, ce groupe montrait que la lactoferrine avait une action anti-VHC (Ikeda et coll 1998b).

Enfin la comparaison de l'infection des cellules PH5CH et MT2 (lignée lymphocytaire Cf 1-2-2-1) a permis d'analyser le tropisme hépatocytaire ou lymphocytaire de différentes souches du virus (Ikeda et coll 1997) et l'évolution des quasi-espèces virales dans chacune de ces lignées (Kato et coll 1998)

♦ La troisième équipe, une équipe allemande (Seipp et coll 1997), avait testé différentes lignées cellulaires (Cf. 1.2.3 - Autres lignées) dont la culture de cellules d'hépatoblastome (HuH7 et Hep G2). Un million de cellules étaient incubées pendant 12 heures à 37°C avec 250 µl d'un sérum de génotype 1b ou 1a contenant 10^5 ou 10^6 copies de génome par ml.

Le point original de leur étude était l'utilisation de la lovastatine, molécule qui stimule l'expression des récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LDL). L'élévation du taux de ces récepteurs de surface (induit par la lovastatine) était corrélée à l'augmentation du nombre de copies d'ARN viral à l'intérieure des cellules. Ceci suggérait que les récepteurs des LDL permettait la pénétration du VHC dans les cellules.

D'autres essais montraient que le PEG (polyéthylène glycol) et le DMSO (diméthyl sulfoxyde) facilitaient la pénétration du virus dans la cellule, chose peu surprenante vu la capacité de ces 2 produits à réaliser des zones de fragilité dans les membranes cellulaires.

Enfin cette équipe avait pu réaliser 2 passages viraux en utilisant le surnageant des cultures contaminées comme inoculum pour des cellules saines (Seipp et coll 1997).

2.2 Lignées lymphocytaires humaines

La découverte de la présence du génome du VHC dans les cellules hématopoïétiques a poussé les chercheurs à penser que le réservoir du virus se situe dans ce type cellulaire.

C'est donc de façon logique que différents groupes se sont intéressés à ce modèle cellulaire pour l'infection *in vitro*.

2.2.1 Lignées de lymphocytes T

- Les premiers à avoir essayé d'infecter ce type de cellules par le VHC sont aussi les premiers à avoir tenté de mettre en culture le VHC, c'est le groupe de Shimizu et Nakajima.

  - Dans un premier travail (Shimizu et coll 1992), ce groupe avait incubé les cellules T humaines MOLT-4 (et MOLT-4 Ma qui correspondent à la même lignée infectée par un rétrovirus murin) pendant 2 heures à 37°C avec 1 ml de sérum de chimpanzé contenant 10^4 copies du génome du VHC par ml. Les brins positifs d'ARN étaient détectés jusqu'à 24 jours dans les cellules et 14 jours dans le milieu de culture. La détection des brins (-) dans les cellules (qui étaient absents du sérum d'origine) était intermittente du 7ème au 18ème jour. Le système cellulaire infecté par le rétrovirus murin semblait plus adapté que les cellules MOLT-4. Les techniques de détection utilisées dans ce travail étaient déjà très diversifiées (immunofluorescence et hybridation *in situ*).

  - Dans les travaux suivants (Shimizu et coll 1993), cette équipe utilisait d'autres cellules T, les cellules HPB Ma (lignée T humaine infectée par un rétrovirus murin) et réalisait les infections avec différents sérums de chimpanzés ou humains. Ces cellules semblaient mieux adaptées au maintien en culture du VHC puisqu'il était possible de détecter de façon intermittente les brins (+) jusqu'à 76 jours dans les cellules et 40 jours dans le surnageant et les brins (-) du 8ème au 26ème jour. La susceptibilité de la lignée peut être modulée en réalisant des clones de la lignée mère.

Cette étude a aussi montré que le caractère infectieux des différents sérums *in vitro* et *in vivo* (chez le chimpanzé) étaient corrélés indépendamment du titre viral des inoculums et que le cycloheximide pouvait favoriser la multiplication du VHC dans ces cellules.

➢ Shimizu et coll en 1994 tentaient de démontrer que le cycle viral était complet. Les cellules HPB Ma, récoltées à 14 et 32 jours p.i., étaient co-cultivées avec un autre type cellulaire, ADneo, sélectionnable par la néomycine. Après sélection de ces cellules par l'antibiotique l'analyse en RT-PCR montrait que l'ARN du virus était présent dans ces cellule. Un second passage viral était alors réalisé des cellules Adneo aux cellules Mahygr. Cette étude montre aussi la capacité antivirale des IFNα et β dans ce type de culture et la moins bonne capacité antivirale de l'IFNγ (Shimizu et coll 1994b).

➢ En 1996 Nakajima et coll, étudiaient la variabilité génétique des régions HVR1, E2, NS5 et 5' non codante du VHC en culture, grâce à 2 modèles permettant la réplication du VHC pendant plus d'1 an (le clone HPB Ma et les cellules B Daudi).

➢ Enfin ces deux modèles cellulaires étaient utilisés pour tenter de repérer les particules virales par microscopie électronique (Shimizu et coll 1996b).

♦ La seconde équipe ayant travaillé sur les lignées T est celle de Ikeda et Kato. Avant d'étudier les cellules PH5CH, elle s'était intéressée à une lignée T humaine infectée par le virus HTLV-I, les cellules MT-2. Un million de cellules étaient incubées pendant 16 à 24 heures à 37°C avec 100 µl à 1 ml de sérum humain VHC positif, de génotype 1b et ayant une virémie égale à 10^7 copies de génome par ml.

➢ En 1995, ils publiaient leurs premiers résultats sur cette lignée (Kato et coll 1995). Les brins (+) d'ARN du VHC étaient détectables pendant 15 jours dans les cellules et 4 jours dans le surnageant de culture. Les brins (-) étaient présents pendant 10 jours avec une disparition au 7ème jour p.i. La comparaison avec les autres lignées testées (lignées d'hépatocarcinome, lignées de conduit biliaire, cultures primaires d'hépatocytes, lignées de monocytes, autres lignées T infectées par HTLV-I et lignée de rein de porc) montrait que la lignée MT-2 était la mieux adaptée pour la réplication du VHC. Ces travaux montraient aussi la variabilité génétique du VHC en culture ; en effet, sur les 3 quasi-espèces présentes dans l'inoculum, une seule restait détectable 10 jours p.i. ; de plus, les anticorps anti-HVR1 de cette quasi-espèce n'étaient pas

représentés dans l'inoculum ; ceci suggérait que le caractère infectieux des sérums dépendait de leur capacité à former des complexes immuns.

➢ Toujours en 1995, l'amélioration et l'exploitation de leur système leur permettait une nouvelle publication (Mizutani et coll 1995). Grâce au clonage de leur lignée, ils obtenaient un clone (MT-2C) pour lequel l'ARN (+) était présent jusqu'à 21 jours p.i. Ce nouveau modèle était alors utilisé pour montrer qu'un oligonucléotide antisens complémentaire à la séquence codant pour le core pouvait inhiber la réplication du virus *in vitro*.

➢ En 1996 l'étude des conditions de culture du clone MT-2C montrait que la diminution de la température d'incubation de 37°C à 32°C permettait de détecter le génome viral jusqu'à 198 jours. Trois passages viraux successifs étaient réalisés en inoculant un surnageant de cellules infectées à des cellules saines. Cette étude montrait aussi que l'addition d'antibiotiques (G418, Hygromycine B) favorisait l'infection contrairement à l'IFNα et l'oligonucléotide antisens précédemment cités.

➢ Les travaux de Ikeda et coll 1997, Kato et coll 1998, Sugiyama et coll 1997 portaient principalement sur l'étude du génome du VHC en culture (Cf. 1.2.1-PH5CH).

2.2.2 Lignées de lymphocytes B

Deux équipes ont utilisé ce modèle cellulaire.

♦ Le groupe de Shimizu et Nakajima qui avait aussi travaillé sur les lignées de lymphocytes T avait utilisé dans les mêmes conditions d'infection une lignée B infectée par le virus d'Epstein Barr, les cellules Daudi (Nakajima et coll 1996). En 1998, Shimizu et coll injectaient le surnageant d'une culture infectée (58ème jour p.i.) à un chimpanzé. le génome du VHC était détecter dans le sérum, le foie et les PBMC de l'animal. L'analyse des « quasi-espèces » (QS) montrait que les celles retrouvées dans le foie et le sérum correspondaient aux QS présentes dans l'inoculum de départ et que celles retrouvées dans les PBMC correspondaient à celles du surnagent de culture injecté.

♦ L'autre équipe était celle de Bertolini et coll qui utilisait 2 lignées B humaines issues de moelle osseuse, les cellules CE et TOFE.

➢ Leurs premiers travaux (Bertolini et coll 1993) consistaient à incuber 10^7 cellules de cette lignée pendant 18 heures avec 1 ml de sérum humain VHC positif contenant 10^5 copies de génome par ml. L'ARN du virus était alors détecté pendant 65 jours p.i. dans les cellules et 22 jours p.i. dans le surnageant de culture. Trois passages viraux pouvaient être réalisés à partir du lysat des cellules prélevées à 22 jours p.i. Enfin l'analyse par immunofluorescence des cellules à 24 jours p.i. donnait des résultats positifs avec les anticorps anti-C100-3 et anti-core.

➢ Valli et coll en 1995 avaient étudié la variabilité génétique du virus en culture : ils mettaient alors en évidence une mutation dans la partie 5' non codante qui semblait modifier la stabilité de l'IRES (Internal Ribozome Entry Site) et expliquer la sélection de ce variant.

➢ En 1997 cette équipe montrait, grâce à des techniques de RT-PCR compétitive et de détection du brin (-) d'ARN viral, que les cellules TOFE étaient plus efficaces pour la réplication du VHC que les cellules CE. En effet, le génome viral était présent dans les cellules TOFE pendant plus de 6 mois et en quantité plus importante que dans les cellules CE. De plus, les brins (-) d'ARN viral étaient plus régulièrement détectés pour les cellules TOFE que pour les cellules CE (Iacovacci et coll 1997b).

➢ Serafino et coll en 1997 et 1998 utilisaient le modèle mis au point pour tenter de mettre en évidence le virus en microscopie classique et électronique.

2.3 Autres lignées

2.3.1 Lignée fibroblastique (cellules VH3)

Zibert et coll en 1995 étudiaient l'inhibition par les anticorps anti-HVR1 de la fixation du VHC sur ces cellules. Ce modèle s'était avéré intéressant pour la multiplication du virus puisque après incubation pendant 2 heures à 4°C de 10^6 cellules avec 10 µl d'un sérum humain titré à $5x10^5$ copies de génome par ml, il était possible de détecter l'ARN (+) du virus pendant 29 jours et l'ARN (-) du 5ème au 20ème jour p.i.

2.3.2 lignée de cellules de rein de singe vert (cellules VERO)

Ce type cellulaire a été utilisé par Valli et coll en 1997. L'infection était réalisée avec 100 µl d'un sérum humain contenant 10^5 copies d'ARN viral par ml incubés pendant 18 heures à 37°C avec $3x10^5$ cellules. Les résultats montraient qu'il était possible de détecter des brins (+) d'ARN pendant 150 jours dans les cellules et le surnageant de culture ; en revanche les brins (-) n'étaient détectables que dans les cellules du 14ème au 150ème jour. Le clonage de la lignée permettait d'obtenir des quantités plus importantes de virus à l'intérieur des cellules.

2.3.3 Autres lignées cellulaires

♦ En 1997 Seipp et coll avait criblé différentes lignées cellulaires afin d'évaluer leur permissivité pour le virus de l'hépatite C.

Après inoculation du virus sur les cellules STE (cellules de testicule de porc) le génome viral n'était pas détecté dans la culture ; ces cellules n'étaient donc pas permissives pour le VHC. En revanche, l'ARN (+) viral était détecté dans les cellules PK15 (cellules de rein de porc) un jour après l'infection, disparaissait ensuite pour réapparaître au 30ème et 50ème jour p.i.. Il n'était pas possible de détecter des brins (-) dans cette lignée, mais un second passage viral avait pu être réalisé.

♦ Le deuxième groupe à avoir criblé différentes populations cellulaires était celui de Kato et coll (1995). Dix sept lignées cellulaires déjà citées ci-dessus (Cf. 1.2.2.1) avaient été testées, dont 8 lignées d'hépatocarcinome (HuH7, HLE, HLF, PLC/PRF/5, Li21, Li22, LI23, Li24), 2 lignées de conduit biliaire (HuCCT1, HuH28), 2 lignées monocytaires (U937, THP-1), 4 lignées T infectées par le virus HTLV-I (C91/PL, OCH, MT-2) et une lignée de rein de porc (PK15). Parmi tous ces systèmes de culture *in vitro*, les cellules MT-2 semblaient avoir les meilleures capacités de maintien du VHC en culture, mais les cellules Li21, Li23, Li24 et PK15 donnaient elles aussi des résultats satisfaisants.

♦ Enfin, en 1999 Morrica et coll avaient testé la susceptibilité pour le VHC d'un grand nombre de lignées cellulaires, en essayant de favoriser l'infection par centrifugation des cellules lors de l'inoculation (incubation de cellules à confluence avec 0,5 ml de sérum et sous une centrifugation à 2000 g pendant 45 min à 35°C).

Les cellules ayant donné des résultats positifs en RT-PCR 15 jours après l'infection étaient les lignées humaines Hep-2 (carcinome épidermique de larynx), Hep G2 (hépatoblastome), K562^b (leucémie myeloïde chronique) et SW620 (adénocarcinome de

colon) ; ainsi que les lignées MBM^b (lymphocytes de chats), BHK et V79 (rein et poumon de hamster), $MiCl_1$ (poumon de vison), LLC-MK2 et Vero (rein de singe) et PKR (rein de lapin).

Les lignée V79 et Vero ont donné des résultats particulièrement intéressants puisqu'il était possible de détecter le génome viral 30 jours après l'infection ainsi que les brins négatifs d'ARN viral. La lignée V79 a même permis de détecter par immunofluorescence (à l'aide d'anticorps de lapin anti-core) la protéine de capside à l'intérieur du cytoplasme.

2.4 Conclusion

En conclusion, le modèle lymphocytaire semble le plus adapté à la culture du VHC. Cependant, il faut tenir compte du fait que seules ont été vraiment étudiées les lignées hépatocytaires et lymphocytaires.

Les résultats obtenus sur ces systèmes de culture sont encourageants mais n'ont pas abouti à une réelle production du virus. Dans chacune de ces études, le virus est maintenu en culture mais n'est ni massivement produit ni réellement détecté puisque la production de protéines virales n'a que rarement été mise en évidence et jamais dans les études récentes. Enfin, la détection de l'ARN viral prouve la présence du génome viral mais pas l'existence du virus infectieux. La détection des brins (-) d'ARN viral, intermédiaires de réplication du génome, est d'un intérêt certain puisque sa mise en évidence fournit la preuve de la réplication. Il faut néanmoins être très prudent dans cette interprétation car les techniques de détection du brin(-) sont souvent peu spécifiques et pas assez sensibles. Une autre preuve de multiplication du virus est la réaliser des passages viraux d'une culture à une autre en utilisant comme inoculum un lysat de cellules infectées ou le surnageant d'une culture infectée.

Tableau III : techniques et matériel utilisés pour l'inoculation du VHC à des lignées cellulaires

Auteurs	Lignées cellulaires utilisées	Inoculum viral T=copies de génome viral/ml G=génotype	Méthode d'infection	
			ml d'inoculum /nombre de cellules /ml de milieu	température et temps d'incubation
Bertolini / Iacovacci et coll	**CE** et **TOFE**(lignée B humaine issue de moelle osseuse)	Sérum humain : T=10^5	1 ml/10^7/5ml	18h
Shimizu / Nakajima et coll	**HPBMa** (lignée T humaine infectée par un rétrovirus murin) **Daudi** (lignée B humaine)	Inoculum H77 : T=10^7	20µl/10^6/2ml	37°C 2h
Shimizu et coll	**MOLT-4** (lignée T humaine +/- infecté par un rétrovirus murin)	Sérum de chimpanzé : T=10^4	1ml/6x10^6/2ml	37°C 2h
Shimizu et coll	**HPBMa**	Sérums de chimpanzés : T=10^5-10^7 Plasmas humains : T=10^4-10^5	100µl/5x10^5/1ml	37°C 2h
Ikeda / Kato / Sugiyama et coll	**PH5CH** (hépatocytes humains) **MT-2** (lignée T infectée par le virus HTLV-I)	Sérum humain : T=10^7 G=1b	50µl/10^5/0.1ml 100µl/10^6/1ml 1ml/10^6/3ml	37°C / 32°C 7h ou 20h
Mizutani et coll	**MT-2**	Sérum humain : T=10^7 G=1b	200µl/10^6/4ml ou 10µl/10^6/0.2ml	37°C / 32°C 15h ou 24h
Tagawa et coll	**HepG2/WRL68** (hépatocytes embryonnaires humains)	Sérum humain : T=10^9	400µl/cellules à 50% de confluence +2ml de milieu	37°C 4h ou 20h
Seipp et coll	**P15** (rein de porc) **STE** (testicules de porc) **HepG2/HuH7** (hépatocytes humains)	Sérum humain : T=10^5 à 10^6 G=1b ou 1a	250µl/cellules à 50% de confluence +2ml de milieu	37°C 1h30 ou 12h
Valli et coll	**Vero** (cellules de rein de singe)	Sérum humain : T=10^5	100µl/3 x10^5/1ml	37°C 18h
Zibert et coll	**VH3** (fibroblastes humains)	sérum humain	10µl/10^6/200µl	4°C 2h

Tableau IV : Temps maximum de détection (en jours) de l'ARN (+ et -) viral dans les cultures

(Chaque colonne regroupe les résultats d'un même groupe de chercheurs sur les mêmes lignées cellulaires)

Auteurs		Nakalima et coll	Valli et coll	Ikeda/Kato et coll	Mizutani et coll	Shimizu et coll	Bertolini/ Iacovacci et coll	Seipp et coll	Tagawa et coll	Zibert et coll	Shimizu et coll
Cellules utilisées		Daudi/ HPBMa	Vero	MT2/ PH5CH	MT2	HPBMa	TOFE/CE	HepG2/ HuH7	HepG2/ WRL68	VH3	MOLT-4
Dans les cellules	ARN +	298	150	100	80	76	65	60	48	29	24
	ARN -	ND	15	10	ND	26	24	60	62	20	18
Dans le surna-geant	ARN +	ND	150	30	16	40	>7	ND	62	ND	14

Tableau V : Molécules et techniques permettant de favoriser ou d'inhiber l'infection par le VHC.

(Chaque colonne regroupe les résultats d'un même groupe de chercheurs sur les mêmes lignées cellulaires)

Auteurs		Shimizu et coll	Ikeda/Kato et coll	Mizutani et coll	Seipp et coll
Cellules		HPB Ma MOLT-4	MT2/ PH5CH	MT2	HepG2/ HuH7
molécules	Favorisant l'infection	Cycloheximide		-G418 -Hygromycine B	-Lovastatine -PEG -DMSO
	Inhibant l'infection	-IFN α -IFN β -IFN γ	-Lactoferrine bovine ou humaine -IFN α	-Oligonucléotide complémentaire du core du virus -IFN α	
techniques	Favorisant l'infection	-Coinfection avec HTLV -Clonage de la lignée	-37°C→32°C -Clonage de la lignée	37°C→32°C	
	Inhibant l'infection			37°C→39°C	

B / TRAVAUX PERSONNELS

Plusieurs lignées cellulaires ont été incubées avec des sérums ou plasmas de patients infectés par le virus de l'hépatite C. Le choix des lignées cellulaires a été guidé par les travaux précédemment cités et / ou par l'appartenance de ce virus à la famille des *Flaviviridae*. Cinq lignées ont été étudiées :

- deux lignées lymphoïdes humaines, les cellules T MOLT-4 et les cellules B Namalwa : les cellules mononucléées du sang semblent constituer un réservoir du VHC *in vivo* (Lerat et coll 1996),
- les cellules PLC/PRF/5 d'hépatocarcinome humain : le foie est le site de réplication et la cible du virus,
- les cellules Vero de rein de singe vert : cellules déjà été utilisées par Valli et coll en 1997 pour la multiplication du VHC, utiles dans la production de vaccins humains et permettent la multiplication des *Flaviviridae in vitro* (Monath et coll 1996).
- les cellules AP61 de moustique : de nombreux *Flaviviridae* comme le virus de la dengue ou le virus de la fièvre jaune *(Flavivirus)* se multiplient dans les cellules de moustique *in vivo* et *in vitro* (Monath et coll 1996).

Notre étude avait pour but dans un premier temps, de mettre en évidence la fixation du virus sur les cellules testées et sa persistance dans ces lignées ; dans un second temps nous avons montré la capacité de ces cellules à multiplier le virus et à produire du virus infectieux en réalisant des passages viraux successifs. Enfin, des travaux concernant la première étape du cycle viral, c'est-à-dire l'étape l'adsorption du virus sur la cellule, ont été initiés.

1 Matériel et méthodes

1.1 Source de virus

Le matériel viral provient de :

- deux plasmas prélevés chez des donneurs de sang contaminés par le VHC (plasmas GR416 et GR838),
- un sérum prélevé chez un patient du service d'hépato-gastro-entérologie du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, atteint d'hépatite C chronique (sérum GR55),

- six sérums contaminés issus de l'hôpital d'instruction des armées Legouest de Metz (sérums M1, M3, M5, M6, M7, M9).

La virémie et le génotype de la souche virale de ces échantillons sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau VI : Echantillons utilisés comme inoculum pour les cultures cellulaires

Identification de l'échantillon	Virémie en Meq (10^6 copies/ml)	Génotype
GR416	0,5	1b
GR838	0,05	3a
GR55	55,7	2a
M1	5,7	1a
M3	14,13	1b
M5	2,8	5a
M6	13	1a
M7	11,8	2
M9	7,69	4

L'analyse quantitative de l'ARN viral plasmatique et sérique a été réalisée par RT-PCR quantitative (Amplicor HCV Monitor®, Roche diagnostics system, Meylan France) pour les plasmas GR416, GR838 ou par la technique des ADN branchés (Quantiplex HCV-RNA®, Chiron corporation, Cergy Pontoise, France) pour les sérums de Metz et GR55.

1.2 Culture cellulaire

1.2.1 Cellules utilisées

Cinq types cellulaires ont été utilisés :

- Les cellules Namalwa sont des cellules lymphomateuses B d'origine humaine (cellules en suspension) issues d'un lymphome de Burkitt et contenant 2 copies du génome du virus d'Epstein Barr intégré dans le chromosome 21 cellulaire (ATCC CRL-1432).
- Les cellules lymphocytaires T d'origine humaine MOLT-4 sont des cellules en suspension issues de leucémie lymphoblastique aiguë (ATCC CRL-1582).

- Les cellules PLC/PRF/5 sont des hépatocytes adhérents issus d'hépatocarcinome humain (ATCC CRL-8024).
- Les cellules Vero sont des cellules adhérentes de rein de singe vert (ATCC CCL-81).
- Enfin les cellules AP61 sont des cellules adhérentes de moustique *Aedes pseudoscutellaris* (Institut Pasteur, Dakar).

1.2.2 Conditions de culture cellulaire

- Les cellules Namalwa et MOLT-4 sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 1% V/V d'acides aminés non essentiels, 100 unités internationales (UI)/ml de pénicilline G, 0,1 mg/ml de streptomycine, 0,25 µg/ml d'amphotéricine B, 1 mM de pyruvate de sodium et 0,25 mM de β-mercaptoéthanol. 10% V/V de sérum de veau fœtal (SVF) sont ajoutés extemporanément. Ces cellules sont incubées à une température de 37°C sous 5% de CO_2.
- Les cellules PLC/PRF/5 sont cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 100 UI/ml de pénicilline G, 0,1 mg/ml de streptomycine et 10% V/V de SVF. En phase de maintien on utilise le même milieu dépourvu de SVF. La température d'incubation est de 31,5°C sous 2,5% de CO_2.
- Les cellules Vero sont cultivées en milieu M199 supplémenté avec 100 UI/ml de pénicilline G, 0,1 mg/ml de streptomycine et 5% V/V de SVF. Le milieu de maintien ne contient pas de SVF. Les cellules sont incubées à 31,5°C sous 5% de CO_2.
- Les cellules AP61 sont cultivées en milieu L15 (Leibovitz medium : Gibco) supplémenté avec 100 UI/ml de pénicilline G, 0,1 mg/ml de streptomycine, 10% V/V SVF et 10% V/V de tryptose phosphate. Le milieu de maintien ne contient que 2% V/V de SVF et de tryptose phosphate. Les cellules sont incubées à 28°C sans addition de CO_2.
- Les types cellulaires en suspension (Namalwa et MOLT-4) sont dédoublées tous les deux à trois jours, de façon à obtenir une suspension d'environ 10^6 cellules par ml. Pour les cellules adhérentes en phase de maintien, la totalité du milieu est remplacé par du milieu neuf, une fois par semaine.

1.2.3 Inoculation virale

1.2.3.1 Premier passage viral

- Cellules en suspension (figure 13)

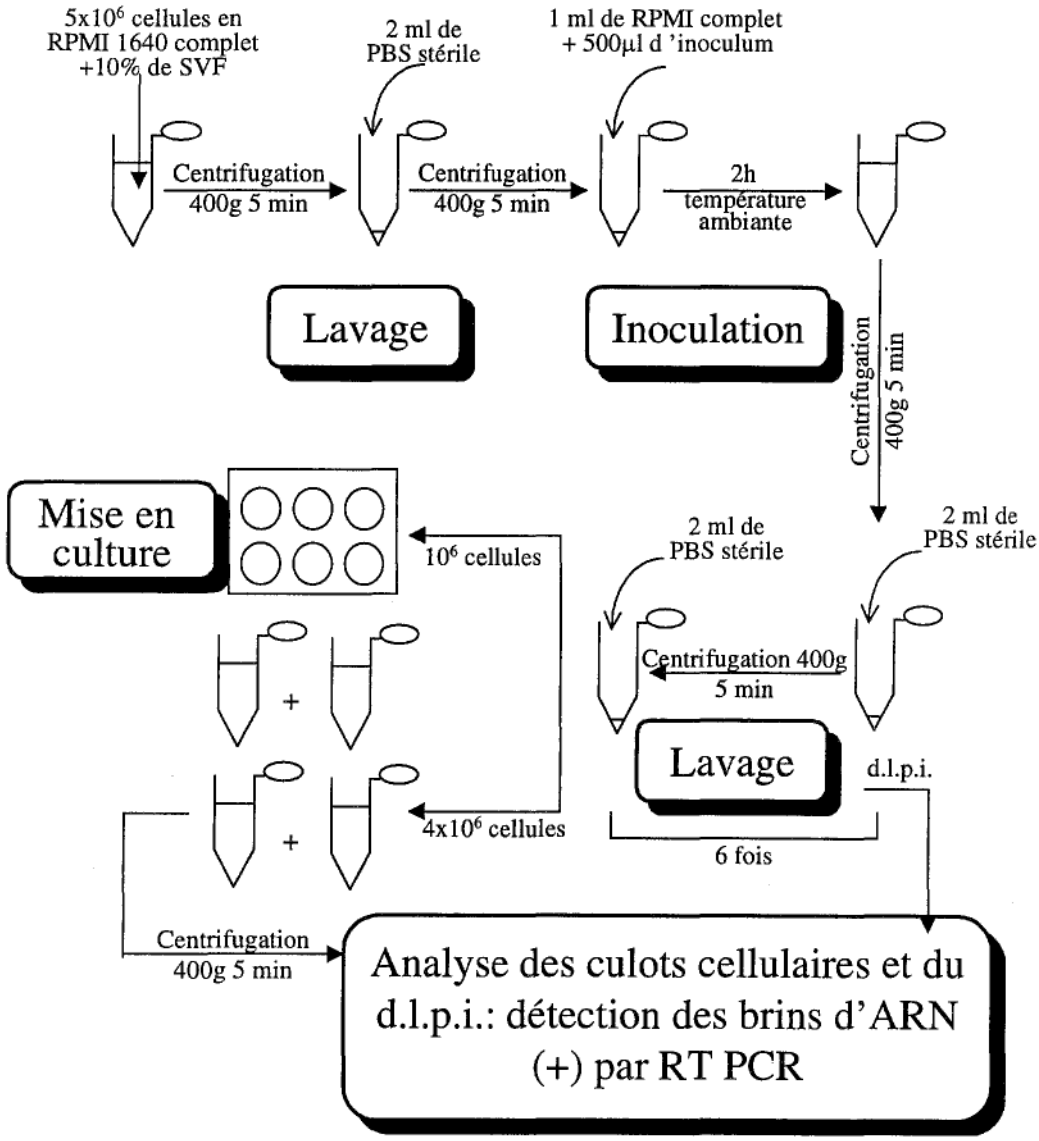


Figure 13 : Les étapes de l'infection des cellules en suspension par les inoculums VHC positifs

Les cellules sont lavées deux fois avec du milieu dépourvu de SVF (pour éliminer le SVF qui pourrait gêner la fixation du virus) et incubées pendant deux heures avec l'inoculum (100 µl, soit $5x10^4$ copies de génome viral pour le plasma GR416, pour 10^6 cellules) dilué au 1/3 dans du milieu RPMI 1640. Les cellules sont ensuite lavées six fois avec du PBS (tampon phosphate salin) stérile pour éliminer l'inoculum. Quatre volumes aliquotes de 10^6 cellules sont conservés ainsi que leur dernier liquide de lavage post-infection (d.l.p.i.) pour analyse en RT-PCR ; le reste des cellules est remis en culture dans du RPMI 1640 supplémenté par 10% de SVF pour des prélèvements ultérieurs.

- Cellules adhérentes (figure 14)

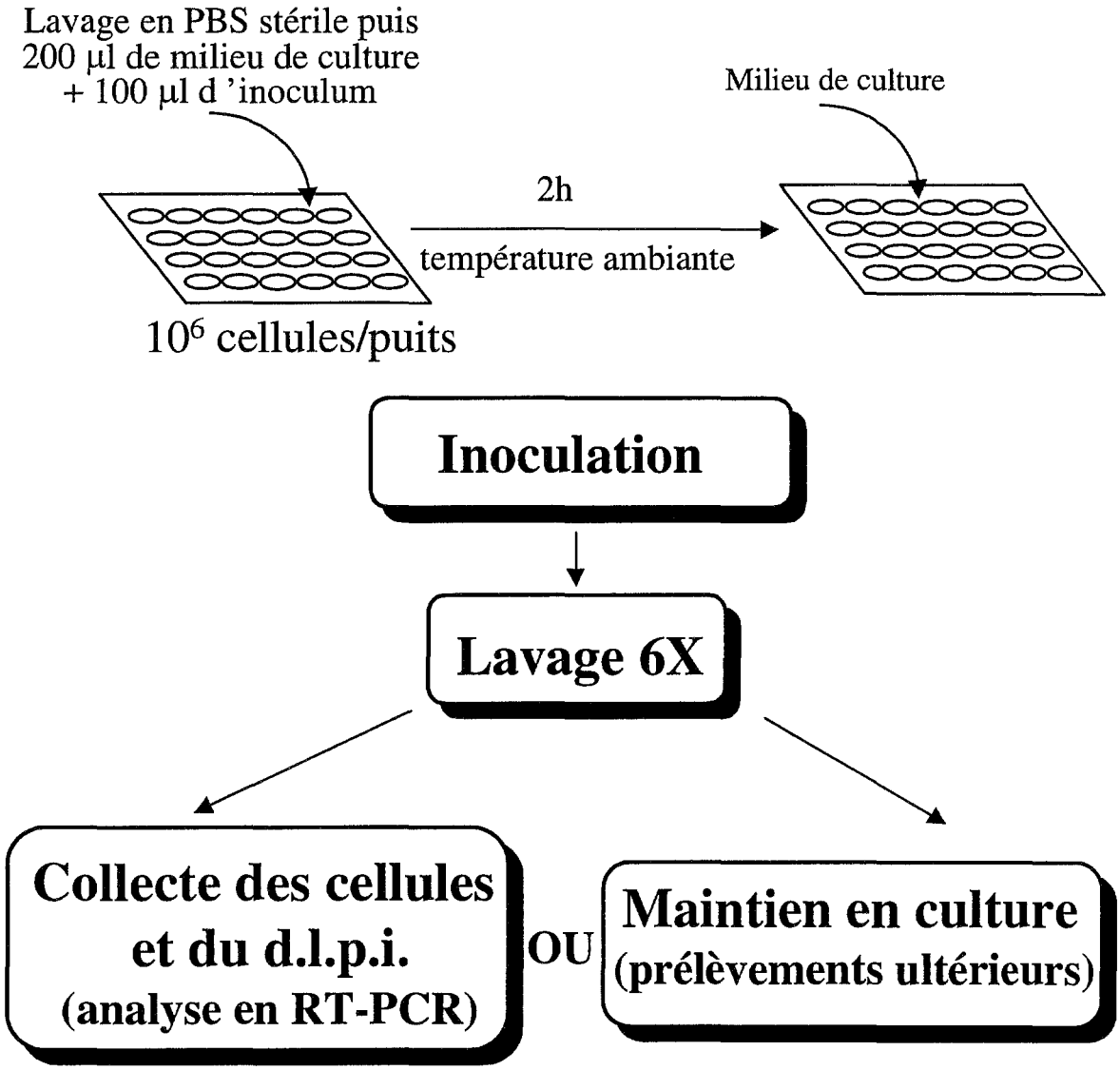


Figure 14 : Les étapes de l'infection des cellules adhérentes par les inoculums VHC positifs

Dans une plaque de 24 puits les cellules sont mises en culture jusqu'à confluence. Les tapis cellulaires sont lavés deux fois avec du milieu de culture dépourvu de SVF puis incubés pendant deux heures avec 100 µl d'inoculum dilué au 1/3 dans le milieu de culture. Les tapis cellulaires sont ensuite lavés six à sept fois avec du PBS stérile pour éliminer l'inoculum. Quatre puits sont prélevés et le dernier liquide de lavage post-infection (d.l.p.i.) est conservé pour analyse en RT-PCR. Les autres puits sont maintenus en culture pour un prélèvement ultérieur.

1.2.3.2 Autres passages viraux (figure 15)

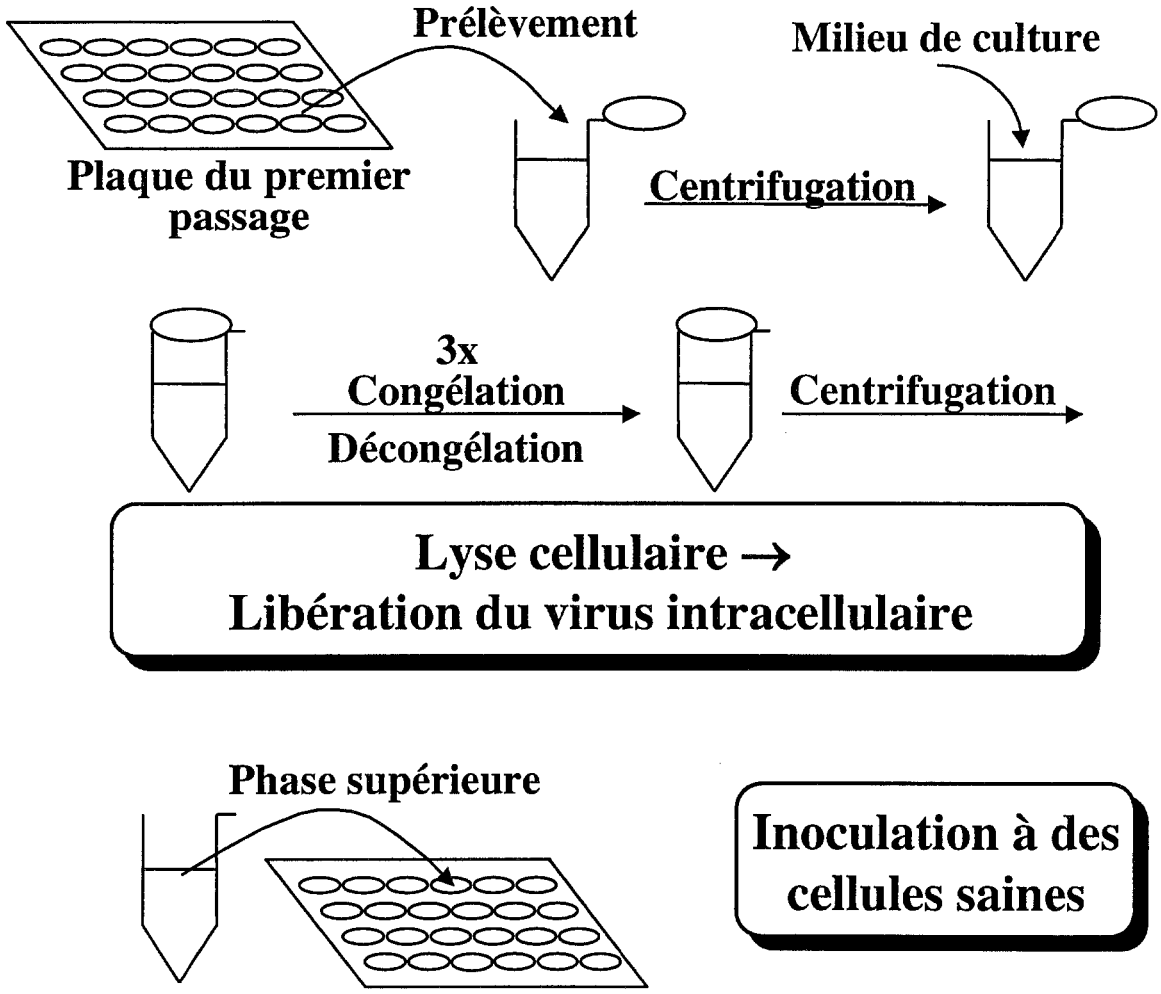


Figure 15 : Technique d'infection pour les passages viraux

Les culots cellulaires (auxquels on a rajouté 1 ml de milieu de culture) récoltés lors du premier passage sont congelés à –80°C et décongelés à +37°C trois fois afin de faire éclater les cellules et de libérer le virus. Ces échantillons sont ensuite centrifugés, la phase supérieure contenant le virus libéré est utilisée comme inoculum pour des cellules saines. Cette deuxième culture est appelée deuxième passage. Les cultures inoculées avec les échantillons récoltés au second passage sont appelées troisième passage etc…

Des passages sont aussi effectués avec des surnageants de culture. Dans ce cas l'échantillon est centrifugé pour éliminer toute trace résiduelle de cellules et inoculé sur des cellules saines.

Chacune de ces cultures est maintenue 28 jours ; des cellules sont récoltées toutes les semaines pour analyse en RT-PCR.

1.2.3.3 Récolte des cellules et des surnageants

Les prélèvements sont effectués le jour de l'infection (J0) puis quatre, sept, quatorze, vingt et un et vingt-huit jours après l'infection (J4, J7, J14, J21, J28).

Dans le cas des cellules en suspension, des volumes aliquotes de 10^6 cellules sont prélevés dans le puits de culture et centrifugés cinq minutes à 400 g. Le surnageant de culture est conservé, le culot lavé deux fois avec du PBS stérile est conservé sec.

Pour les cellules adhérentes, le surnageant de culture est prélevé et conservé ; le tapis cellulaire est lavé six fois avec du milieu de culture, prélevé par grattage et conservé en culot sec.

Les échantillons sont stockés à –80°C

Il faut noter que pour chaque essai d'infection des témoins négatifs «cellules» sont réalisés (incubation des lignées cellulaires avec un sérum humain non infecté par le VHC). Les prélèvements sont effectués aux mêmes temps et de la même façon que pour les cellules infectées.

1.3 Détection de l'ARN viral

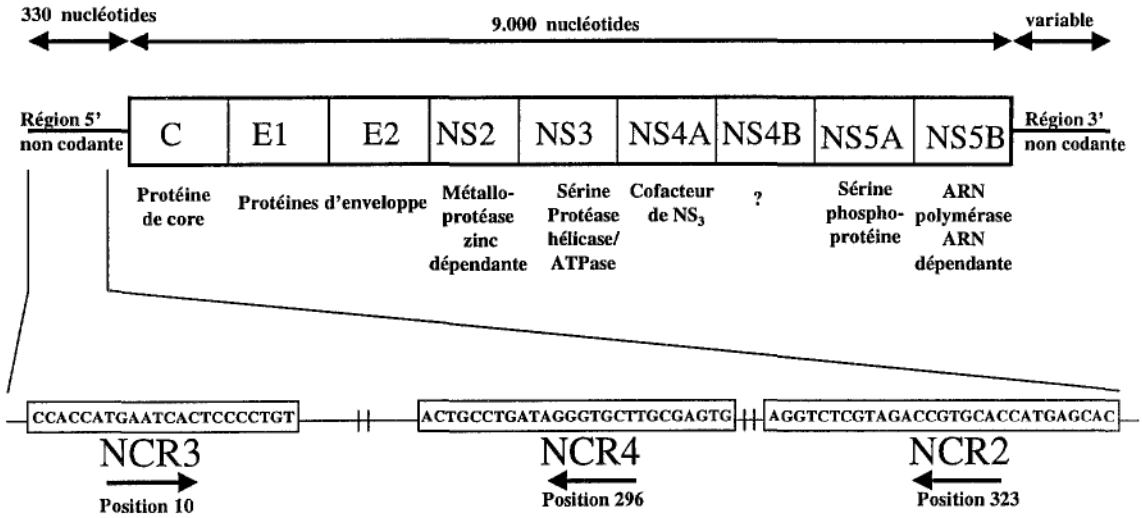


Figure 16 : Organisation du génome viral et séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification et la détection l'ARN viral (d'après Garson et coll 1990, Okamoto et coll 1990)

1.3.1 Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN total est réalisée à partir d'un culot cellulaire grâce à la trousse Rneasy mini kit (Quiagen, Courtaboeuf France), d'un surnageant de culture ou d'un lavage post infection (PBS ou milieu de culture) avec la trousse QIAamp viral RNA extraction kit (Quiagen, Courtaboeuf France).

1.3.2 Transcription inverse (RT)

1.3.2.1 Principe

La transcription inverse consiste à copier un ARN en ADN complémentaire monobrin grâce à l'utilisation d'une enzyme : la transcriptase inverse. Cette enzyme d'origine virale, codée par le gène pol des rétrovirus a besoin, pour réaliser la transcription dans le sens 3'→5', d'une amorce oligonucléotidique complémentaire à l'extrémité 3' de l'ARN à transcrire.

1.3.2.2 Méthode

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) nécessite au préalable la dénaturation de l'ARN extrait (destruction des structures secondaires qui pourraient gêner la réaction) afin de permettre la fixation d'une amorce antisens sur la séquence cible. 8 µl d'ARN sont donc incubés 2 min à 90°C avec 5 mM de tampon HEPES (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'[2-ethanesulfonic acid]) et 0,5 µM d'amorce antisens NCR2 (Figure 16).

La transcription inverse est alors réalisée (dans un volume final de 20 µl) en incubant 1h à 42°C l'amorce hybridée à l'ARN en présence de :

⇒ 50 UI de transcriptase inverse (Expand Reverse transcriptase, Boehringer Mannheim, Meylan France) et son tampon (Tris HCl 50 mM, KCl 40 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tween 20 0,5% V/V, pH 8,3)

⇒ 10 mM de DTT (dithiothreitol) (Boehringer Mannheim)

⇒ 1 mM de dNTP (désoxynucléotides triphosphates) (Boehringer Mannheim)

⇒ 20 à 40 UI de Rnase inh, inhibiteur des Rnases (Boehringer Mannheim).

La RT est ensuite inactivée 5 min à 94°C afin d'éviter toute polymérisation ultérieure.

1.3.2 Polymérisation en chaîne (PCR)

1.3.2.1 Principe

La PCR consiste à amplifier de façon cyclique et exponentielle une séquence d'ADN spécifique. La Taq ADN polymérase, enzyme thermostable d'origine bactérienne (*Thermus aquaticus*), catalyse la réaction d'amplification de l'ADN dans des cycles opératoires stricts et automatisés. L'utilisation d'un appareil automatique d'amplification permet de réaliser des cycles de température qui correspondent à trois étapes : dénaturation-hybridation-élongation. L'élongation des brins par la Taq ADN polymérase nécessite deux amorces oligonucléotidiques encadrant la séquence à amplifier.

1.3.2.2 Méthode

5 µl d'ADNc obtenus précédemment, mélangés au réactif d'amplification sont recouverts d'huile minérale (pour éviter l'évaporation) et suivent dans un appareil automatique d'amplification (Perkin ELMER) 40 fois le cycle suivant :

⇒ 1 min à 94°C : dénaturation de l'ADNc

⇒ 1 min à 55°C : hybridation de l'amorce

⇒ 1 min à 72°C : élongation.

Une étape de 5 min à 72°C permet l'élongation finale.

L'amplification de l'ADNc est réalisée dans un volume de 50 µl comprenant :

⇒ 1,25 UI de Taq polymérase (Pharmacia Biotech, Orsay France) en présence de son tampon (KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, Tris HCl 10 mM, pH 9)

⇒ 0,4 µM d'amorce sens NCR3 (Figure 16)

⇒ 0,4 µM d'amorce antisens NCR2 (Figure 16)

⇒0,2 mM de dNTP

1.3.3 Détection des ADN amplifiés

1.3.3.1 Séparation des ADN amplifiés

Les produits de PCR sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et révélés par le bromure d'éthidium sous lumière ultraviolette (UV). La longueur des produits amplifiés est de 314 paires de bases.

La quantité d'ARN viral étant trop faible, l'amplification exponentielle ne permet pas de visualiser les produits amplifiés sous UV. Un blot ou transfert sur membrane suivi d'une hybridation spécifique par sonde radioactive est donc nécessaire.

1.3.3.2 Transfert sur membrane de Nylon

Le gel est déposé sur une mèche trempant dans la soude 0,4 N et recouvert d'une membrane Nylon (Hybond-N+ : Amersham) et de papier absorbant. L'ADN migre par capillarité sur la membrane pendant une nuit.

1.3.3.3 Marquage radioactif de la sonde

Le marquage de la sonde par le phosphore 32 est réalisé dans un volume final de 20 µl en incubant, 30 minutes à 37°C, 5 µM de sonde NCR4 (Figure 16) avec :

⇒ 2 µl de γ^{32}PATP (ICN Biomedicals, Asse-Relgem, Belgique) (10 mCi/ml)

⇒ 10 UI de Polynucléotide Kinase ou PNK (Boehringer Mannheim) et son tampon (Tris HCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, dithiotreitrol 5 mM, spermine 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,6)

La PNK transfère le phosphate γ de l'ATP sur l'hydroxyle libre en 5' de l'oligonucléotide. L'enzyme est ensuite dénaturée deux minutes à 90°C.

1.3.3.4 Hybridation spécifique

L'étape de préhybridation a pour but de saturer de façon homogène les sites potentiels de fixation de la membrane. Ceci permet d'éviter un bruit de fond trop important et de limiter la fixation de la sonde aux seuls fragments complémentaires. La membrane est donc préhybridée 2h à 40°C en présence de SSC (standard sodium citrate) 5X, de SDS (dodécyl sulfate de sodium) 0,2% et de Denhardt't 5X

L'hybridation est réalisée par addition de la sonde NCR4 (Figure 16) marquée au phosphore 32, que l'on incube avec la membrane pendant 2h à 40°C.

La membrane est ensuite lavée pour éliminer les hybridations non spécifiques et diminuer le bruit de fond sans faire disparaître le signal. On réalise trois lavages successifs avec des tampons de stringence croissante (SSC 2X 10 min à température ambiante / SDS 1%, SSC 2X 10 min à température ambiante / SDS 0,1%, SSC 0,2X 5 min à 40°C)

La révélation se fait par autoradiographie en mettant en contact la membrane hybridée avec un film photographique (film Kodak X-OMAT) à -80°C pendant une nuit.

Le seuil de sensibilité de cette technique de détection moléculaire de l'ARN du virus de l'hépatite C est de 10^2 à 10^3 copies par ml.

Pour chaque analyse effectuée, trois contrôles négatifs correspondant à l'extraction de l'ARN, à la transcription inverse et à la PCR, sont réalisés. Un contrôle positif et un témoin d'inhibition (un plasma VHC positif est ajouté à un culot cellulaire pour vérifier l'absence d'inhibiteur de la Taq polymérase) sont systématiquement effectués.

1.4 Détection des protéines de membrane par cytométrie de flux

1.4.1 Principe

La cytométrie de flux ou cytofluorimétrie est basée sur l'étude des interactions entre des cellules et un faisceau de lumière incidente. Après interception de cette lumière, la cellule émet des signaux optiques qui pourront être corrélés avec les propriétés de la cellule. Par exemple, la présence ou l'absence de molécules de surface peuvent être analysées par émission de lumière fluorescente après incubation des cellules avec des réactifs spécifiques.

1.4.2 Méthode

Un million de cellules sont lavées 2 fois avec du PBS 2% SVF, le SVF servant à saturer les sites de fixation non spécifiques. Les cellules sont ensuite incubées 30 min à 4°C (pour éviter une éventuelle internalisation de la molécule ciblée par l'anticorps) avec un anticorps monoclonal purifié anti-CD81 humain (IgG1κ , Pharmingen International, San Diego USA). Après 5 lavages avec du PBS 2% SVF qui permettent d'éliminer les anticorps non fixés, les cellules sont incubées 30 min à 4°C avec un anticorps de chèvre, anti-souris, spécifique du fragment Fc et conjugué au FITC (Sigma, St Quentin Fallavier France). Cinq nouveaux lavages sont réalisés.

En parallèle, un témoin négatif est réalisé avec le même type cellulaire et la même technique, mais l'anticorps spécifique est remplacé par un anticorps de souris (IgG1κ) non réactif.

Un total de 10 000 cellules sont analysées par fluorimétrie mono-couleur à l'aide d'un cytomètre FACS SCAN (Becton & Dickinson, Pont de Claix France).

Résultats et Discussion

2. Résultats et discussion

2.1 Etude des différents plasmas et sérums

L'analyse des plasmas et sérums avait pour but d'isoler un inoculum efficace, capable d'induire des signaux forts et reproductibles en RT-PCR.

Les différents échantillons ont été incubés avec les cinq types cellulaires choisis. Des prélèvements ont été réalisés à J0, J4, J7 pour détecter la présence du virus dans les cellules.

Tableau VII : Etude des différents plasmas et sérums

Détection de l'ARN du VHC par RT-PCR à différents jours p.i.	Plasma GR416			Plasma GR838			Sérum GR55		
	J0	J4	J7	J0	J4	J7	J0	J4	J7
Cellules MOLT-4	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Cellules Namalwa	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Cellules PLC/PRF/5	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Cellules Vero	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Cellules AP61	+	-	-	+	+	-	-	-	-

Détection de l'ARN viral par RT-PCR dans les cellules à différents temps post infection (J0, J4, J7) après incubation des plasmas GR416, GR838 et du sérum GR55 avec cinq types cellulaires.(+) génome viral> 10^2-10^3 copies/ml (-) génome viral < 10^2-10^3 copies/ml

- Le plasma GR416 semble donner de meilleurs résultats que les autres inoculums : le génome viral est détectable au moins jusqu'à J7 lors de l'utilisation des cellules Namalwa ou Vero et jusqu'à J4 avec les cellules PLC/PRF/5.

- Le plasma GR838 et le sérum GR55 donnent des résultats moins intéressants car l'ARN viral n'est détectable à J4 que pour les cellules AP61 (plasma GR838) et pour les cellules Namalwa (sérum GR55). Néanmoins d'autres tests on été effectués avec ces inoculums.

♦ Pour les six autres inoculums le génome viral disparaît après J0 dans presque tous les cas ; le virus ne semble donc pas pénétrer et / ou se multiplier dans les cellules. Aucun essai supplémentaire n'a été réalisé avec ces sérums.

⇒ De nouveaux essais d'infection ont été mis en place avec les trois premiers inoculums, ; les derniers liquides de lavages p.i. sont conservés afin d'évaluer la fixation du virus sur la cellule.

2.2 Mise en évidence de la fixation du virus sur la cellule

L'absence de détection par RT-PCR de l'ARN viral dans le dernier liquide de lavage p.i. permet d'affirmer que l'inoculum a été éliminé et donc que les résultats positifs observés sur les culots cellulaires ne sont pas dus aux résidus de l'inoculum.

La comparaison de l'analyse du dernier lavage p.i. (d.l.p.i.) et des cellules à J0 permet la mise en évidence de la fixation du virus sur la cellule, puisqu'à ce temps le virus n'a pas encore été internalisé dans la cellule (Tableaux VIII A, VIII B, VIII C).

Tableau VIII : Evaluation de la fixation du VHC sur les cinq types cellulaires

A : Inoculum viral provenant du plasma GR416 (0,5 x 10^6 copies de génome/ml)

Plasma GR416	Détection de l'ARN du VHC par RT-PCR à différents jours post inoculation			
	d.l.p.i	J0	J4	J7
MOLT-4	-	+	-	-
Namalwa	+	+	-	+
PLC/PRF/5	+	+	+	-
Vero	-	+	-	+
AP61	+	++	-	-

B : *Inoculum viral provenant du plasma GR838* ***(0,05 x 10^6 copies de génome/ml)***

Plasma GR838	Détection de l'ARN du VHC par RT-PCR à différents jours post inoculation			
	d.l.p.i	J0	J4	J7
MOLT-4	-	-	-	-
Namalwa	-	-	-	-
PLC/PRF/5	+++	-	-	-
Vero	-	+	-	-
AP61	+	++	+	-

C : *Inoculum viral provenant du sérum GR55* ***(55,7 x 10^6 copies de génome/ml)***

Sérum GR55	Détection de l'ARN du VHC par RT-PCR à différents jours post inoculation			
	d.l.p.i	J0	J4	J7
MOLT-4	-	+	-	-
Namalwa	-	+	+	-
PLC/PRF/5	-	-	-	-
Vero	-	++	-	-
AP61	-	-	-	-

Détection de l'ARN viral dans le dernier lavage p.i. (d.l.p.i.) et dans les cellules à différents temps p.i (J0, J4, J7) après incubation des plasmas GR416, GR838 et du sérum GR55 avec cinq lignées cellulaires.

(+) génome viral> 10^2-10^3 copies/ml *(-) génome viral < 10^2-10^3 copies/ml*

♦ Dans certains cas (Namalwa-GR416 / AP61-GR416 et GR838 / PLC/PRF/5-GR416 et GR838) le d.l.p.i. est encore positif. Ceci pose un problème d'interprétation car il est possible que l'inoculum soit encore présent dans le milieu de culture. Ces résultats montrent que le nombre de lavages p.i. doit être augmenté de façon à éliminer les virus non fixé aux cellules sans pour autant éliminer les virions qui s'y sont adsorbés.

♦ Pour le d.l.p.i des cellules AP61, le signal correspondant à la présence de l'ARN viral est nettement moins important que pour les cellules AP61 à J0 (cellules incubées avec les plasmas GR416 et GR838). On peut donc supposer que le virus s'est adsorbé sur ces cellules.

♦ Le d.l.p.i. des cellules Namalwa incubées avec le sérum GR55 est négatif alors que les culots cellulaires prélevés à J0 et J4 sont positifs : le VHC se fixe donc sur ce type cellulaire.

Malgré la positivité du d.l.p.i. des cellules Namalwa incubées avec le plasma GR416, il faut noter que l'ARN viral est présent dans les culots cellulaires à J0 et J7 mais n'est pas détectable à J4. Il est probable que la méthode de RT-PCR utilisée ne soit pas suffisamment sensible pour mettre en évidence la faible quantité de virus présent à ce temps p.i. On peut tout de même conclure que la quantité d'ARN viral diminue de J0 à J4 pour augmenter de J4 à J7. Ceci suggère une phase « d'éclipse » phénomène classique décrite pour d'autres virus (Roizman et coll 1996) qui serait du à la lyse de l'ARN viral après la décapsidation et avant l'activation de l'ARN polymérase. Cette absence de détection du génome du VHC, lors des étapes précoces de l'infection *in vitro*, avait déjà été montrée par d'autres travaux (Mizutani et coll 1996, Seipp et coll 1997, Shimizu et coll 1992).

♦ Le même phénomène d'absence de détection à J4 est observé pour les cellules Vero incubées avec le plasma GR416. Dans tous les cas, il n'a pas été possible de détecter l'ARN viral dans le d.l.p.i. issu des cellules Vero alors que les cellules contenaient le génome du virus à J0. Cette lignée cellulaire est donc capable de fixer le VHC.

♦ Pour les cellules PLC/PRF/5, les résultats sont plus délicats à interpréter, mais la détection du génome viral jusqu'à J4 lors de l'incubation avec le plasma GR416 mous a incité à renouveler l'expérience.

♦ Les cellules MOLT-4 présentent un d.l.p.i. négatif ; la présence de l'ARN viral à J0 montre que le virus se fixe à la cellule (GR416 et GR55) mais l'absence de détection du génome du VHC après ce temps laisse penser que le virus n'y pénètre pas et / ou ne s'y multiplie pas. Ces cellules n'ont donc pas été retenues dans les expériences suivantes.

⇒ Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le plasma GR416 : i) détection du génome viral jusqu'à J4 avec les PLC/PRF/5 ; ii) mise en évidence d'une «phase d'éclipse» avec les cellules Namalwa et Vero ; iii) fixation du virus sur les cellules AP61 Vero et MOLT-4. Les expériences ultérieures seront donc réalisées avec cet inoculum.

⇒ Après avoir mis en évidence la fixation du virus sur la cellule, notre travail consistait à évaluer la présence, à plus long terme, du génome viral dans les cellules ainsi que sa multiplication.

2.3 Mise en évidence de la persistance et de la réplication du virus dans les cultures lors du premier passage viral

Des essais d'infection ont été réalisés avec le plasma GR416 en augmentant le nombre de lavages p.i. et en gardant en culture les cellules jusqu'à J28. L'analyse des culots cellulaires permet d'évaluer la présence de l'ARN viral à l'intérieur des cellules (Tableau IX A et figure 15) ; l'analyse du surnageant de culture permet d'évaluer le relargage viral à l'extérieur de la cellule (Tableau IX B et figure 15).

Tableau IX : Evaluation de la persistance du VHC dans les cultures lors d'un premier passage viral

A : Détection par RT-PCR de l'ARN du VHC dans <u>les cellules</u> à différents jours post inoculation

Cellules	d.l.p.i.	J0	J4	J7	J14	J21	J28
Namalwa	-	+	-	+	-	-	-
PLC/PRF/5	-	+	+	+/-	-	-	-
Vero	-	+	-	+	+	+	+
AP61	+	+	-	+	+	+	+

B : Détection par RT-PCR de l'ARN du VHC dans <u>les surnageants</u> de culture à différents jours post inoculation

Cellules dont sont issus les surnageants de culture :	J4	J7	J14	J21	J28
Namalwa	-	-	-	+	-
PLC/PRF/5	-	-	-	-	-
Vero	-	-	-	-	+
AP61	+	-	-	-	+

Détection de l'ARN viral dans le dernier lavage p.i (d.l.p.i) dans les surnageants de culture et dans les cellules à différents temps p.i (J0, J4, J7, J14, J21, J28) après incubation du plasma GR416 avec quatre lignées cellulaires.

(+) génome viral> 10^2-10^3 copies/ml *(-) génome viral < 10^2-10^3 copies/ml*

(+/-) limite de détection

♦ Le d.l.p.i. issu des cellules PLC/PRF/5 est cette fois négatif après 6 lavages réalisés, mais la décroissance du signal de détection du génome viral dans les cellules (jusqu'à être indétectable à J14) montre que l'ARN viral se dégrade. De plus, il n'a pas été possible de détecter l'ARN viral dans les surnageants issus de cette culture. Ces cellules ne sont donc pas permissives.

♦ Comme pour les cellules PLC/PRF/5, l'ARN viral n'est plus présent dans le d.l.p.i. issu des cellules Namalwa mais ne persiste dans ces cellules que jusqu'à J7. Néanmoins, la «phase d'éclipse» est reproduite ce qui suggère une réplication du VHC. Cette hypothèse est confirmée par le fait qu'il est possible de détecter le génome viral dans le surnageant de culture à J21 alors que cela n'était possible ni à J4 ni à J7. La réplication du virus a permis un relargage du virus dans le milieu.

♦ Pour les cellules Vero la «phase d'éclipse» est aussi reproduite. Le phénomène de relargage viral est également observé mais il est un peu plus tardif (J28). Cette lignée cellulaire semble d'autant plus intéressante que le génome viral y est détecté pendant 28 jours p.i.

♦ Pour les cellules AP61 il n'a pas été possible d'éliminer totalement l'inoculum, malgré 6 lavages (après le 6ème lavage, les cellules perdent leur adhérence) ; d'ailleurs le surnageant de culture reste positif jusqu'à J4. En revanche, le génome viral était détectable dans les cellules jusqu'à J28 après une «phase d'éclipse» à J4, ainsi qu'à J28 dans le surnageant de culture. Ceci suggère que si l'étape d'adsorption cellulaire n'est pas très nette pour ce type cellulaire, il semble que le virus puisse pénétrer dans les cellules, s'y répliquer et être libéré dans le milieu.

⇒ Les trois types cellulaires, Namalwa, Vero et AP61, ayant montré leur capacité à multiplier le virus ont ensuite été testés pour leur capacité à supporter des passages viraux successifs.

2.4 *Mise en évidence de la persistance et de la multiplication du virus dans les cellules lors des passages suivants*

Au moins quatre passages viraux ont pu être réalisés avec les lignées Vero et AP61. Le tableau X montre les résultats obtenus. De nombreuses autres expériences ont été réalisées puisque chaque prélèvement d'un passage a été utilisé pour les passages suivants. Plusieurs expériences ont permis de maintenir le virus pendant 4 passages successifs dans ces deux modèles cellulaires.

Tableau X : Evaluation de la persistance du VHC dans les cellules lors de passages viraux successifs

A : Cellules Vero

Passages	Détection de l'ARN du VHC à différents jours post inoculation			
	J7	J14	J21	J28
1er(1)	+	+	+	+(2)
2ème	-	-	-	+(2)
3ème	-	-	-	-(2)
4ème	-(2)	+	+	-
5ème	+(2)	-	+	+
6ème	+	+	+	+

B : Cellules AP61

Passages	Détection de l'ARN du VHC à différents jours post inoculation			
	J7	J14	J21	J28
1ème	+	+(2)	+	+
2ème	+	-	-	+(2)
3ème	-	+	-(2)	+
4ème	-	+	+	+

Détection de l'ARN viral par RT-PCR dans 2 lignées cellulaires à différents temps p.i (J7, J14, J21, J28) lors de la réalisation de quatre passages viraux successifs.

(+) Génome viral> 10^2-10^3 copies/ml *(-) Génome viral < 10^2-10^3 copies/ml*

(1) Inoculum du premier passage : plasma GR416

(2) Echantillons utilisés comme inoculum pour le passage suivant

♦ Les cellules Namalwa n'ont pas permis de réaliser de passages viraux. L'ARN viral n'était plus détectable dès le second passage.

♦ Les cellules Vero et AP61 ont donné des résultats très intéressants puisqu'il était possible de détecter l'ARN du virus pendant 6 passages successifs pour les cellules Vero et 4 pour les cellules AP61.

♦ Certains échantillons ayant donné des résultats négatifs en RT-PCR ont cependant été utilisés comme inoculum pour le passage suivant et les échantillons prélevés dans ce passage ont donné des résultats positifs. Ceci montre que les prélèvements négatifs en RT-PCR ne sont pas forcément exempts de virus infectieux, mais que la quantité de virus présente dans ces échantillons est inférieure au seuil de détection de notre technique.

Les surnageants cellulaires ont aussi été analysés et très peu d'entre eux étaient positifs en RT-PCR. Certains des surnageants négatifs en RT-PCR ont servis d'inoculum pour de nouvelles cellules. L'analyse en RT-PCR de ces cellules à différents jours p.i. a permis de détecter le génome du VHC (résultats non présentés).

♦ Des études antérieures avaient montré la réalisation de passages viraux, mais jamais plus de quatre successivement. Bertolini et coll 1993 avait décrit deux passages en utilisant le virus intracellulaire libéré par congélation/décongélation. D'autres équipes utilisaient comme inoculum les surnageant de culture infectées et avaient pu réaliser deux (Seipp et coll 1997) trois ou quatre passages (Mizutani et coll 1996a et b), mais la persistance viral était relativement faible puisque l'ARN viral n'était détecté dans les cultures que pendant 7 jours.

⇒ Ces résultats montrent que les cellules Vero et AP61 sont permissives pour la multiplication du VHC mais aussi que le virus produit par ces lignées cellulaires est infectieux *in vitro* puisque les virions isolés d'une de ces cultures peuvent infecter des cellules saines.

Ainsi, même en quantité indécelable, nos cultures contiennent du virus infectieux. Une quantité très faible de virus semble suffisante pour infecter des cellules saines.

Les cellules Vero (déjà utilisées par Valli et coll en 1997) mais surtout les cellules AP61 (jamais utilisées pour la multiplication du VHC) sont donc des modèles cellulaires originaux de fixation et de réplication du virus de l'hépatite C.

⇒ Toute les expériences de détection de l'ARN viral ont été réalisées à l'aide d'une méthode de RT-PCR permettant la détection globale de l'ARN du VHC. La méthode de détection spécifique du brin négatif, intermédiaire de réplication de l'ARN viral, qui aurait donné un argument en faveur d'une multiplication virale n'a pas été utilisée pour deux raisons :

i) on sait que la quantité de brins négatifs d'ARN est 100 fois à 1000 fois inférieure a celles des brins positifs ;

ii) les quantités d'ARN viral que nous détectons ne sont que 10 ou 100 fois supérieures à notre seuil de détection (10^2–10^3 copies / ml). Il aurait donc été quasiment impossible de détecter des brins négatifs dans nos cultures. Il faut aussi noter que la réalisation de quatre passages viraux prouve à elle seule que le virus est infectieux et donc qu'il se multiplie dans les cellules (Lanford et coll 1995).

2.5 Détection des molécules CD81 à la surface des cellules

Les molécules CD81 (Levy et coll 1998) ont été décrites comme étant des molécules importantes pour l'étape initiale d'adsorption du VHC sur la cellule (Pileri et coll 1998, Rice et coll 1999). Il a même été envisagé qu'elles pourraient être le récepteur cellulaire du virus ; dans tous les cas l'activation de ces molécules par la glycoprotéine E2 module les fonction cellulaires (Flint et coll 1999a et b).

L'expression des molécules CD81 à la surface des différentes cellules a donc été évaluée par cytofluorimétrie (Figure 17).

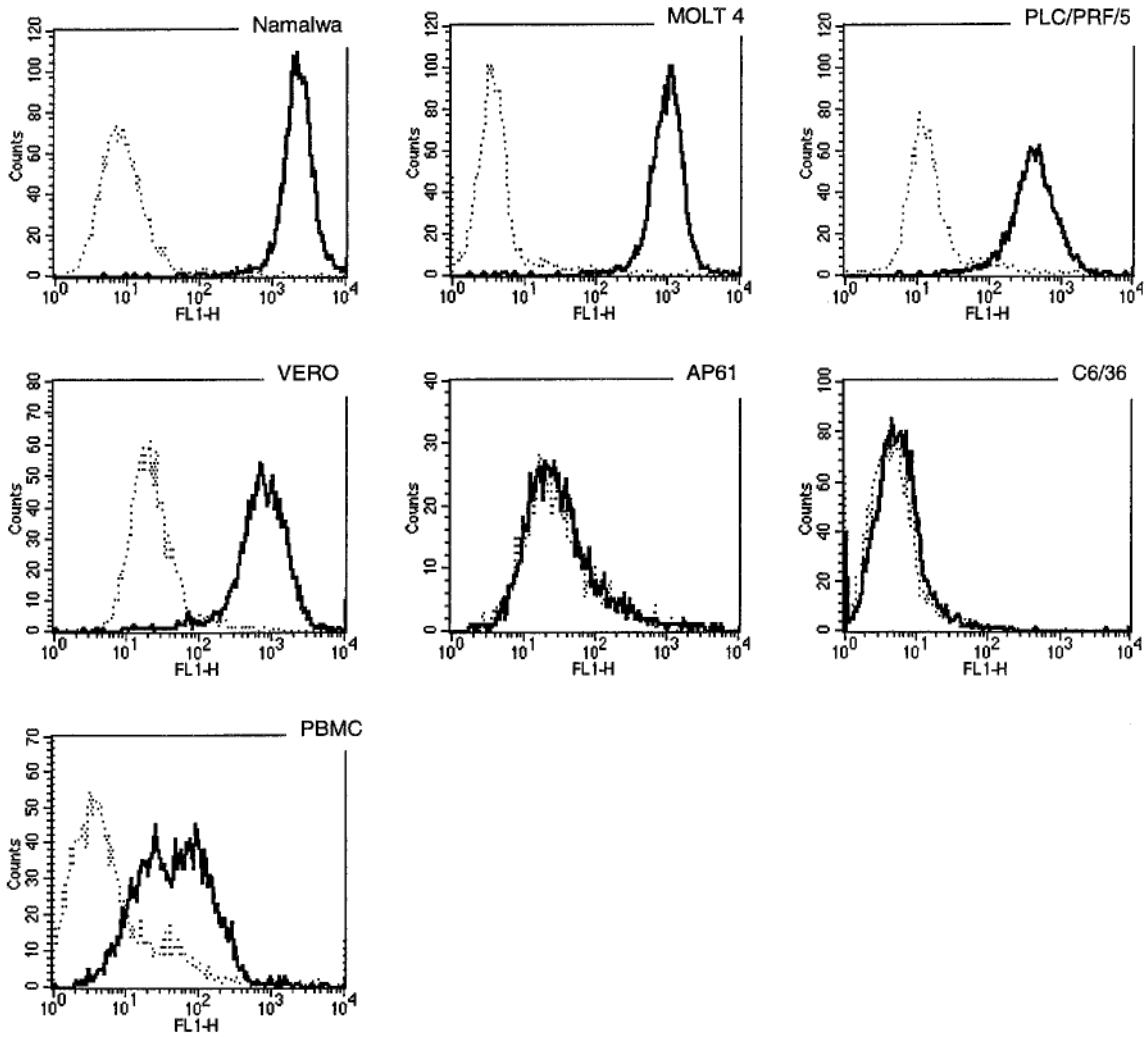


Figure 17. : Expression des molécules CD81 par six types cellulaires différents. L'analyse par cytométrie de flux des antigènes de surface a été réalisée grâce à une technique d'immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps anti-CD81 (lignes pleines) ou d'anticorps non réactifs (pointillés). Des cellules mononucléées du sang périphérique ont été utilisées comme contrôle positif. Deux lignées de lymphocytes, les cellules B Namalwa et T MOLT-4, une lignée hépatocytaire (PLC/PRF/5), une lignée de rein de singe vert d'Afrique Vero et deux lignées de cellules de moustique (AP61 et C6/36) ont été analysées.

Les cellules de mammifère Namalwa, MOLT-4, PLC/PRF/5 et Vero expriment les molécules de surface CD81 alors que les cellules de moustique AP61 en sont dépourvues. L'analyse par immunofluorescence de la lignée C6/36 de cellules de moustique *Aedes albopictus* (utilisée pour la réplication et la production des flavivirus également) confirme que les molécules CD81 ne sont pas exprimées sur les cellules de moustique.

L'interprétation de ces données permet d'envisager deux hypothèses.

i) En premier lieu, ces résultats pourraient suggérer que les molécules CD81 ne sont pas les récepteurs du VHC à la surface des cellules. En effet, certaines cellules permissives pour le VHC (cellules AP61) ne possèdent pas de telles molécules de surface alors que certaines cellules non permissives (cellules PLC/PRF/5 et MOLT-4) en sont pourvues. Les molécules CD81 pourraient donc être un co-récepteur suffisant mais non nécessaires à la pénétration du virus dans la cellule hôte.

ii) La deuxième hypothèse serait que les molécules CD81 seraient les récepteurs du VHC à la surface des cellules de mammifères, mais que les récepteurs à la surface des cellules de moustique seraient différents.

Cette hypothèse est étayée par l'étude de l'adsorption du VHC à la surface des différentes lignées cellulaires (Tableau VIII). Cette étude a montré que pour les cellules de moustique AP61, contrairement aux cellules de mammifères, il n'était pas possible d'obtenir un d.l.p.i. (dernier lavage post-infection) négatif malgré six lavages post-infection. Il paraît peu probable que la présence du génome viral dans ces lavages soit due à un résidu de l'inoculum puisque les résultats obtenus avec les autres lignées montrent que six lavages sont suffisants pour éliminer totalement l'inoculum. La détection de l'ARN viral dans ces lavages pourrait être expliquée par une fixation différente du virus sur les cellules de moustique et sur les cellules de mammifères. Le récepteur des cellules de moustique aurait peut être une spécificité de fixation moins importante et le virus pourrait se décrocher à la suite de lavages trop nombreux ou trop vigoureux.

Le deuxième point ayant permis cette hypothèse porte sur l'origine phylogénétique du VHC. En effet le VHC est un hépacivirus appartenant à la famille des *Flaviviridae*, comme les flavivirus. Certains flavivirus, tels que le virus de la dengue et le virus de la fièvre jaune, se multiplient dans les cellules de moustique *in vitro* et *in vivo* (Monath et coll 1996) ; ils possèdent donc un récepteur à la surface de ces cellules. Les cellules de moustique pourraient avoir un récepteur ancestral, compatible avec l'évolution phylogénétique des virus de la famille des *Flaviviridae* au contact de leurs vecteurs arthropodes. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait vérifier la permissivité de la seconde lignée de cellules de moustique C6/36 pour la multiplication du VHC (puisque cette lignée ne possède pas de molécule CD81 et permet aussi la multiplication des flavivirus). Dans un deuxième temps il faudrait vérifier que ce récepteur reste fonctionnel *in vivo* car, dans ce cas, la transmission du VHC *via* les arthropodes pourrait être évoquée et permettrait peut-être d'expliquer une partie des 20 % de contaminations non élucidées (Alter 1997).

3 Conclusion

Cette étude présente les résultats obtenus après incubation d'un plasma humain infecté par le VHC avec cinq lignées cellulaires différentes. Notre choix s'est porté sur des lignées de lymphocytes B et T humains (Namalwa et MOLT-4), les cellules mononucléées du sang constituant un réservoir du virus *in vivo*, sur des cellules d'hépatocarcinome humain (PLC/PRF/5), le foie étant le site de le réplication virale et la cible du virus, et enfin sur des cellules de moustique (AP61), et de rein de singe vert d'Afrique (Vero), ces lignées étant utilisées pour la réplication et la production de virus appartenant à la même famille que le VHC (famille des *Flaviviridae).*

Nos résultats suggèrent que la souche VHC GR416 se multiplie dans les cellules Vero et AP61 puisqu'il est possible de maintenir le virus en culture pendant 28 jours dans ces lignées cellulaires avec observation, 4 jours après l'infection, d'une phase « d'éclipse » du virus. L'infection de cellules saines, à l'aide de lysats de cellules infectées ou de surnageants de culture infectée, montre que le virus est infectieux et qu'il reste infectieux pendant 4 passages successifs au moins. Ainsi, cette étude a permis de confirmer la permissivité des cellules Vero pour la multiplication du VHC et de sélectionner un modèle original de culture du virus, les cellules AP61.

Dans un second temps, l'étude par cytofluorimètrie de l'expression des molécules CD81 (décrites comme les récepteurs supposés du VHC) montre que les cellules de moustique AP61, pourtant permissives pour le VHC, en sont dépourvues. Ainsi, cette molécule pourrait être le récepteur du VHC à la surface des cellules de mammifères, mais les cellules de moustique auraient un récepteur différent. Des études complémentaires seraient nécessaires pour vérifier que ce récepteur reste fonctionnel *in vivo*, car dans ce cas la transmission du VHC *via* les arthropodes pourrait être évoquée. Pour étayer cette hypothèse, l'infection d'autres cellules de moustique par le VHC devra être étudiées (par exemple les cellules C6/36 de moustique *Aedes albopictus* ou des lignées de cellules de moustique *Aedes aegyptii*).

La suite de ce travail portera principalement sur cette étape d'adsorption du VHC et plus précisément sur le rôle des glycosaminoglycanes de surface pour la fixation virale. Cette étude sera réalisée, en parallèle, sur le virus de la dengue cultivé au laboratoire de façon à comparer le comportement des deux virus dans les cultures de cellules Vero et AP61.

CONCLUSION

MEMOIRE SOUTENU PAR : Raphaële GERMI

TITRE : MULTIPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE 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.

CONCLUSION :

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est considérée comme un problème de santé publique du fait de sa prévalence (1,2% en France) et de sa gravité puisque dans 70% des cas son évolution est chronique et peut conduire à un hépatocarcinome. La transmission du virus se fait principalement par voie parentérale mais, pour 20% des contaminations, aucun facteur de risque n'est retrouvé. Le diagnostic est soit sérologique (détection des anticorps sériques grâce à des antigènes recombinants ou synthétiques) soit moléculaire (détection de l'ARN viral par RT-PCR, NASBA ou ADN branché). La PCR quantitative et le génotypage des souches ont permis l'amélioration du suivi du traitement. La thérapeutique par l'IFNα est efficace dans 20% des cas et son association à la ribavirine a permis de doubler le nombre de bonnes réponses durables au traitement. De nouvelles stratégies thérapeutiques (IFNα pégylé, IFNα consensus, IFNα lymphoblastoïde, les inhibiteurs de la protéase, les ribozymes) et vaccinales (vaccin à virus génétiquement atténué, vaccin à virus recombinant ou injection d'ADN nu) sont à l'étude, mais un obstacle majeur à l'avancée de ces travaux subsiste : l'absence de systèmes de culture permettant la multiplication efficace du virus. C'est ce constat qui a motivé la partie scientifique de ce travail.

Plusieurs travaux ont montré qu'il était possible de maintenir le VHC en culture sur des cellules hépatocytaires et lymphocytaires mais aussi dans les cellules de rein de singe vert d'Afrique (lignée Vero). Dans la plupart de ces systèmes, la multiplication du VHC reste modeste et aucune adaptation du virus n'a été observée. L'objectif du présent travail a été de sélectionner une lignée cellulaire originale permettant une réplication stable du VHC. Les cellules Namalwa (lymphocytes B), PLC/PRF/5 (lignée d'hépatocarcinome), Vero et les cellules AP61 de moustique *Aedes pseudoscutellaris* (jamais utilisées pour la multiplication du VHC *in vitro*) ont été incubées avec un plasma VHC positif, lavées 6 fois puis prélevées à différents temps post-infection. Le génome du VHC a été détecté dans les cellules Vero et

AP61 par RT-PCR pendant 28 jours et 7 jours pour les autres lignées. Les virus extraits des cellules prélevées aux différents temps ont servi d'inoculum pour des cellules AP61 et Vero saines et 4 passages viraux successifs ont été possibles pour ces deux modèles cellulaires. La détection par cytofluorimétrie des molécules CD81 (récepteur supposé du VHC) à la surface des 2 lignées a révélé que les cellules Vero exprimaient ces molécules de surface alors que les cellules AP61 en étaient dépourvues. Cette étude a donc permis de sélectionner un modèle original de multiplication et d'étude du VHC : les cellules AP61. Ces cellules pourraient disposer d'un récepteur cellulaire pour le VHC spécifique et compatible avec l'évolution phylogénétique du virus au contact des arthropodes (déjà constatée avec d'autres *Flaviviridae*). Si ce récepteur était fonctionnel *in vivo*, la transmission du VHC par piqûre de moustiques pourrait être évoquée.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble Le

LE DOYEN :

P. DEMENGE

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1 - FACULTÉ DE PHARMACIE

FACULTÉ DE PHARMACIE

LE PRESIDENT DE THESE :

Professeur

UNIVERSITE

PHARMACIE

IMMUNOLOGIE

Pr. Emmanuel DROUET

Domaine de la Merci F 38706 LA TRONCHE Cedex

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Abrignani S. Immune responses throughout hepatitis C virus (HCV) infection : HCV from the immune system point of view. *Springer seminars in immunopathology* 1997 ; 19 : 47-55
- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepathology.* 1997 ; 26, Suppl 1 : 62S-65S.
- Bertolini L, Iacovacci S, Ponzetto A, Gorini G, Battaglia M, Carloni G. The human bone-marrow-derived B-cell line CE, susceptible to hepatitis C virus infection. *Res. Virol.* 1993 ; 144 : 281-285
- Bizollon T, Palazzo U, Ducerf C, chevallier M, Elliott M, Baulieux J, Pouyet M, Trepo C. Pilot study of the combination of alpha-interferon and ribavirin as therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 1997 ; 26 : 500-504
- Bouffard P, Bartenschlager R, Ahlborn-Laak L, Mous J, Robert N, Jacobsen H. An *in vitro* assay for hepatitis C virus NS3 serine proteinase. *Virology* 1995 ; 209 : 52-59
- Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weiner AJ, Choo Q-L, Shuster JR, Kuo G, Bonino F, Houghton M, Abrignani S. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993 ; 104 : 580-587
- Brechot C. Virus de l'hépatite C. Structure et variabilité génétique. *Ann Gastroent Hépato* 1997 ; 33 : 5-15
- Brillanti S, Foli M, Di Tomaso M, Gramantieri L, Masci C, Bolondi L. Pilot study of triple antiviral therapy for chronic hepatitis C in interferon non responder : a pilot randomized controlled study. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999 ; 31 : 130-134
- Brusaferro S, Barbone F, Andrian P, Brianti G, Ciccone L, Furlan A, Gnesutta D, Stel S, Zamparo E, Toniutto P, Ferroni P, Gasparini V. A study on the rôle of the family and others risk factors in HCV *transmission. Eur J Epidemiol* 1999 ; 15 : 125-32
- Buisson Y, Teyssou R. Diagnostic biologique des infections à VHC. *Ann Gastroent Hépato* 1997 ; 33 : 17-22
- Cahour A. Les perspectives de vaccin contre l'hépatite C : Quelles stratégies adopter? *Médecine/sciences* 1995 ; 11 : 81-91

- Carloni G, Iacovacci S, Sargiacomo M, Ravagnan G, Ponzetto A, Peschle C, Battaglia M. Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection. *Arch Virol suppl.* 1993 ; 8 : 31-39
- Chauvet CJ, Deweerdt C, Pivot-Dumarest C. Roféron®A, Introna® : les interférons α. *Lyon Pharmaceutique* 1996 ; 47 : 29-33
- Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1997 ; 78 : 2397-2410
- Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989 ; 244 : 359-362
- Chovkhi A, Ung S, Wychowski C, Dubuisson J. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol* 1998 ; 72 : 3851-3858
- Conférence de consensus, Hépatite C, dépistage et traitement, *Virologie* 1997 ;1 : 147-156
- Conry-Cantilena C. Hepatitis C virus diagnostics : technology, clinical applications and impacts. *TIBtech* 1997 ; 15 : 71-76
- Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999 ; 10 : 439-449
- Cribier B, Schmitt C, Birgen A, Kirn A, Keller F. *In vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J. Gen Virol* 1995 ; 76 : 2485-2491
- Cribier B, Rey D, Uhl G, Schmitt C, Libbercht E, Vetter D, Lang J M, Kirn A, Stoll-Keller F. Quantification of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells : a comparison between patients chronically infected by HCV and patients coinfected by HIV. *Res Virology* 1996 ; 147 : 325-332
- Cribier B, Schmitt C, Kirn A, Stoll-Keller F. Inhibition of hepatitis C virus adsorption to peripheral blood mononuclear cells by dextran sulfate. *Arch Virol* 1998 ; 143 : 375-379
- Cuthbert JA. Hepatitis C : progress and problems. *Clin Microbiol Rev* 1994 ; 7 : 505-532
- Dash S, Halim A-B, Tsuji H, Hiramatsu N, Gerber M A. Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome. *Am J Pathol* 1997 ; 151 : 361-373
- Davis GL, Esteban-Murr R, Rustgli V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeuzems S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatement of relapse of chronic hepatitis C. International hepatitis C interventional therapy group *N Engl J Med* 1998 ; 339 : 1493-1499
- Degos F, Dhumeaux D, Trepo C. L'hépatite C. Document édité par *L'Association Française pour l'étude du foie* 1996

- Diepolder HM, Zachoval R, Hoffman RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995 ; 346 : 1006-1007
- Dubois F, Descenclos JC, Mariotte N, Goudeau A.Hepatitis C in French population-based survey, 1994 : seroprevalence, frequency of viremia, genotyp distribution, and risk factors. *Hepatology* 1997 ; 25 : 1490-6
- Duvet S, Cocquerel L, Pillez A, Carcan R, Verbert A, Moradpour D, Wychowski C, Dubuisson J. Hepatitis C virus glycoprotein complex localisation in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *J Biol Chem.* 1998 ; 273 :32088-32095
- Ferrari C, Valli A, Galati L, Penna A, Scaccaglia P, Giuberti T, Schianchi C, Missale G, Grazia M, Fiaccadori F. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C infection. *Hepatology* 1994 ; 19 : 286-295
- Flint M, Maidens C, Loomis-Price L, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, Higginbottom A, Levy S, McKeating JA. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 1999a ; 73 : 6235-44
- Flint M, Thomas JM, Maidens C, Shotton C, Levy S, Barclay WS, McKeating JA. Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 1999b ; 73 : 6782-90
- Fong T-L, Valinluck B, Govindarajan S, Charboneau F, Adkins RH, Redeker AG. Short-term prednisolone therapy affects aminotransferase activity and hepatits C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994 ; 107 : 196-199
- Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, Domergue J, Maurel P. *In vitro* infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J. Gen.Virol.*1998 ; 79 : 2367-2374
- Fournillier A, Depla E, Karayiannis P, Vidalin O, Maertens G, Trepo C, Inchauspé G. Expression of noncovalent hepatitis C virus enveloppe E1-E2 complexes is not required for induction of antibodies with neutralising properties following DNA Immunization. *J Virol* 1999 ; 73 : 7497-504

- Fournillier-Jacob A, Girard M, Wychowski C. Infection par le virus de l'hépatite C et réponse immunitaire : application au diagnostic et à la vaccination. *Virologie* 1997; 1 : 217-228
- Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM, Tan S-L, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by nonstructural 5A protein. *Virology* 1997 ; 230 : 217-227
- Garson JA, Ring C, Tuke P, Tedder RS. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet* 1990 ; 336 : 878-879
- Garson JA. The polymerase chain reaction and hepatitis C virus diagnosis. *FEMS Microbiol Rev* 1994 ; 14 : 229-240
- Garson JA, Lubach D, Passas J, Whitby K, Grant PR. Suramin blocks hepatitis C biding to human hepatoblastoma cells *in vitro*. *J Med Virol* 1999 ; 57 : 238-242
- Goudeau A. Médicaments actifs contre les virus des hépatites. *La Revue du Praticien* 1997 ; 47 : 640-645
- Hoffman RM, Diepolder HM, Zachoval R, Zwieber FM, Jung MC, Scholz S, Nitschko H, Riethmüller G, Pape GR. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* 1995 ; 21 : 632-638
- Houghton M. *In : Virology,* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia : Fields B M, Knipe D M, Howley P M *et al*, 1996 ; Hepatitis C virus: 1035-1058
- Iacovacci S, Sargiacomo M, Parolini I, Ponzetto A, Peschle C, Carloni G. Replication and multiplication of hepatitis C virus genomic in human fœtal liver cells. *Res Virol.* 1993 ; 144 : 275-279
- Iacovacci, Manzin A, Barca S, Sargiacomo M, Serafino A, Valli MB, Macioce G, Hassan HJ, Ponzetto A, Clementi M, Peschle C, Craloni G. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected *in vitro*. *Hepatology* 1997a ; 26 :1328-1337
- Iacovacci S, Bertolini L, Manzin A, Valli MB, Battaglia M, Ponzetto A, Clementi C, Carloni G. Quantification of hepatitis C virus RNA production in two human bone marrow-derived B-cell lines infected *in vitro*. *Res Virol* 1997b ; 148 : 147-151
- Ikeda M, Kato N, Mizutani T, Sugiyama K, Tanaka K, Shimotohno K. Analysis of cell tropism of HCV by using *in vitro* HCV-infected human lymphocytes and hepatocytes. *J Hepatol* 1997 ; 27 : 445-454

- Ikeda M, Sugiyama K, Mizutani T, Tanaka T, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K, Kato N. Human hepatocyte clonal cell lines that support persistent replication of hepatitis C virus. *Virus Res* 1998a ; 56 : 157-167
- Ikeda M, Sugiyama K, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K, Kato N. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998b ; 245 : 549-553
- Inchauspé G. DNA vaccine strategies for hepatitis C. *J Hepatol* 1999 ; 30 : 339-346
- Irish DN, Blake C, Christophers J, Craske JE, Burnapp L, Abbs IC, MacMahon EM, Muir P, Banatvala JE, Simmonds P. Identification of hepatitis C virus seroconversion resultingfrom nosocomial transmission on a haemodialysis unit : implications for infection control and laboratory screening. *J Med Virol* 1999 ; 59 : 135-40
- Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, Yasui K. Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of titre infectious virus. *J Gen Virol* 1996 ; 77 : 1043-1054
- Izopet J, Pasquier C, Sandres K, Puel J, Rostaing L. Molecular evidence for nosocomial transmission of hepatitis C virus in a French hemodialysis unit. *J Med Virol* 1999 ; 58 : 139-44.
- Journal Officiel de la République Française du 12 Août 1997 ; articles 3784 et 3785
- Karmochkine M, Carrat F, Valleron AJ, Raguin G. Modes de transmission du virus de l'hépatite C. *Press Med* 1998 ; 27 : 871-6
- Kato N, Nakazawa T, Mizutani T, Shimotohno K. Susceptibility of human T-lymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 ; 209 : 863-869
- Kato N, Ikeda M, Mizutani T, Sugiyama K, Noguchi M, Hirohashi S, Shimotohno K. Replication of hepatitis C virus in cultured non-neoplasic human hepatocytes. *Jpn J Cancer Res* 1996 ; 87 : 787-792
- Kato N, Ikeda M, Sugiyama K, Mizutani T, Tanaka T, Shimotohno K. Hepatitis C virus population dynamics in human lymphocytes and hepatocytes infected *in vitro*. *J Gen Virol* 1998 ; 79 : 1859-1869
- Kim J-L, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Haberson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA. Crystal structure of hepatitis C virus NS3 protease domaine complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 1996 ; 87 : 343-355

- Kolykhalov A, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997 ; 277 : 570-574
- Koshy R, Inchauspe G. Evaluation of hepatitis C virus protein epitopes for vaccine development. *TIBtech* 1996 ; 4 : 364-369
- Ladaviere L. Analyse de la structure tridimensionnelle du site antigènique immunodominant de la nucléocapside du virus de l'hépatite C par résonance magnétique nucléaire. Th. D. Pharm. Université Claude Bernard Lyon I. 1997, nbp
- Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR. Demonstration of *in vitro* infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT-PCR. *Virology* 1994 ; 202 :606-614
- Lanford RE, Chavez D, Chisari FV, Sureau C. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *J Virol* 1995 ; 69 : 8079-83.
- Lechmann M, Ihlenfeldt HG, Braunschweiger I, Giers G, Jung G, Matz B, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U. T- and B-cell response to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus-positive blood donors without viremia. *Hepatology* 1996 ; 24 : 790-795
- Lerat H, Berby F, Trabaud M-A, Vidalin O, Major M, Trepo C, Inchauspé G. Specific detection of hepatitis C minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996 ; 97 : 845-851
- Lerat H, Inchauspé G. Tropisme extrahépatique du virus de l'hépatite C. *Virologie* 1997 ; 1 : 291-300
- Levy S, Todd SC, Maecker T. CD81 (TAPA-1) : a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998 ; 16 : 89-109
- Lieber A, He CY, Polak SJ, Gretch DR, Barr D, Kay MA. Elimination of hepatitis C RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol* 1996 ; 70 : 8782-91
- Lin C, Rice CM. The hepatitis C virus NS3 serine proteinase and NS4A cofactor : establishement of a cell-free trans-processing assay. *P Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 7622-7626

- Marcellin P, Pouteau M, Messian O, Bok B, Erlinger S, Benhamou JP. Virus de l'hépatite C, interféron alfa et dysthyroïdies. *Gastroenterol Clin Biol* 1993 ; 17 :887-891
- Marcellin P, Erlinger S. Clinique et évolution de l'hépatite C. *Ann Gastroent Hépato* 1997 ; 33 : 29-33
- Martell M, Gomez J, Esteban JI, Sauleda S, Quer J, Cabot B, Esteban R, Guardia J. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 : 327-32
- Mattsson L, Weiland O, Glauman H. Long-term follow-up of chronic post transfusion non-A, non-B hepatitis : clinical and histological out-com. *Liver* 1988 ; 8 : 184-188
- Menendez C, Sanchez-Tapia JM, Kahigwa E, Mshinda H, Costa J, Vidal J, Acosta C, Lopez-Labrador X, Olmedo E, Navia M, Tanner M, Rodes J, Alonso PL. Prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis viruses B, C and E in souther Tanzania. *J Med Virol* 1999 ; 58 : 215-20
- Minutello M, Pileri P, Unutmaz D, Censini S, Kuo G, Houghton M, Brunetto M R, Bonino F, Abrignani S. Compartmentalization of T-lymphocytes to the site of disease : intrahepatic CD4+ T cell specifique for the protein NS4of hepatitis C virus in patient with chronic hepatitis. *J Exp Med* 1993 ; 178 : 17-25
- Mizutani T, Kato N, Hirota M, Sugiyama K, Murakami A, Shimotohno K. Inhibition of hepatitis C virus replication by antisens oligonucleotide in culture cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 ; 212 : 906-911
- Mizutani T, Kato N, Ikeda M, Nakazawa T, Sugiyama K, Shimotohno K. Long-term human T-cell culture system supporting hepatitis C virus replication. *Biochem Biophys Res Commun* 1996a ; 227 : 822-826
- Mizutani T, Kato N, Saito S, Ikeda M, Sugiyama K, Shimotohno K. Characterisation of hepatitis C virus replication in cloned cells obtained from a human T-cell leukemia virus type I-infected cell line, MT-2. *J Virol* 1996b ; 70 : 7219-7223
- Monath TP, Heinz FX. *In : Virology,* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia : Fields BM, Knipe DM, Howley PM *et al*, 1996 ; Flavivirus : 961-1034.
- Morrica A, Giorgi M, Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Marchi S, Ricchiuti A, Antonelli G, Pistello M, Bendinelli M. Susceptibility of human and non-human cell line to HCV infection as determined by the centrifugation-facilitated method. *J Virol Meth* 1999 ; 77 : 207-215
- Muramatsu S, Ishido S, Fujita T, Itoh M, Hotta H. Nuclear localisation of the NS3 protein of hepatitis C virus and factors affecting the localisation. *J Virol* 1997 ; 71 : 4954-4961

- Nakajima N, Hijikata M, Yoshikura H, Shimizu Y K. Characterization of long-term culture of hepatitis C virus. *J Virol* 1996 ; 70 : 3325-3329
- Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Yotsumoto S, Tanaka T, Yoshizawa H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. The 5'- terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn J Exp Med* 1990 ; 60 : 167-77
- Pawlotsky J-M, Lefrere J-J. *In : Virologie moléculaire médicale,* LAVOISIER, Paris : Seigneurin J-M, Morand P, 1997(a) ; Virus de l'hépatite C.
- : 247-269
- Pawlotsky J-M. 4ème Conférence internationale sur le virus de l'hépatite C et les virus apparentés (compte-rendu). *Virologie* 1997(b) ; 1 : 250-3
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Biding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998 ; 282 : 938-941
- Poynard T, Leroy V, Cohard M, Thevenot T, Mathurin P, Opolon P, Zarski J-P. Metaanalysis of interferon randomized trials in the treatement of viral hepatitis C : effect of dose and duration. *Hepatology* 1996 ; 24 : 778-789
- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niedereau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzems S, Trepo C, Albrecht J.Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirine for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatement of chronic infection with hepatitis C virus. International hepatitis interventional therapy group. Lancet 1998 ; 352 : 1426-32
- Poupon R, Serfaty L. Prophylaxie et traitement de l'hépatite C. *Ann Gastroent Hépato* 1997 ; 33 : 34-38
- Rice C M. Is CD81 the key to hepatitis C virus entry? *Hepatology* 1999 ; 29 : 990-992
- Roizman B, Palese P. *In : Virology,* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia : Fields BM, Knipe DM, Howley PM *et al,* 1996 ; Multiplication of viruses : an overview : 101-12.
- Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzy E, Cousens L, Chin M, Dong C, Weiner A, Lau J, Choo Q, Chien D, Pileri P, Houghton M, Abrignani S. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus : cytofluorimetric assessment of enveloppe glycoprotein-E2 binding to target cells. *P Natl Acad Sci USA* 1996 ; 13 : 1759-1763
- Rehermann B, Manns MP. Immunologic aspects of acute and chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology* 1996 ;12 : 554-559

- Rooney G, Gilson RJ. Sexual transmission of hepatitis C virus infaction. *Sex transm Infect* 1998 ; 74 : 399-404
- Roudot-Thoraval F. Epidémiologie des infections liées au virus de l'hépatite C en France. *Ann Gastroent Hépato* 1997 ; 33 : 23-27
- Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, Dhumeaux D et le groupe d'étude de la prévalence et de l'épidémiologie des hépatites C. Epidémiologie et morbidité du virus de l'hépatite C en France. Etude de 6664 patients atteints d'hépatite chronique C *BEH* 1996 ; 5 : 20-21
- Sansonno D, Iacobelli AR, Cornacchiulo V, Iodice G, Dammacco F. Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic *in situ* hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 1996 ; 103 : 414-421
- Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transform NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995 ; 69 : 3893-3896
- Seipp S, Mueller HM, Pfaff E, Stremmel W, Theilmann L, Goeser T. Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication *in vitro*. *J Gen Virol* 1997 ;78 :2467-2476
- Serafino A, Valli MB, Alessandrini A, Ponzetto A, Carloni G, Bertolini L. Ultrastructural observation of viral particles within hepatitis C virus-infected human B lymphoblastoid cell line. *Res Virol* 1997 ; 148 : 153-159
- Serafino A, Valli MB, Andreola F, Carloni G, Bertolini L. Morphological modification induced by HCV infection in the TOFE human lymphoblastoid cell lin. *Res Virol* 1998 ; 149 : 299-305
- Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikata M, Purcell RH, Yoshikura H. Evidence for *in vitro* replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5477-5481
- Shimizu YK, Purcell RH, Yoshikura H. Correlation between the infectivity of hepatitis C virus *in vivo* and its infectivity *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 6037-6041
- Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H. Neutralizing antibody against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol* 1994 (a) ; 68 : 1494-1500
- Shimizu YK, Yoshikura H. Multicycle infection of hepatitis C virus in cell culture and inhibition by alpha and beta interferon. *J Virol* 1994 (b) ; 68 : 8406-8408
- Shimizu Y, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T, Farci P, Purcell RH, Yoshikura H. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region

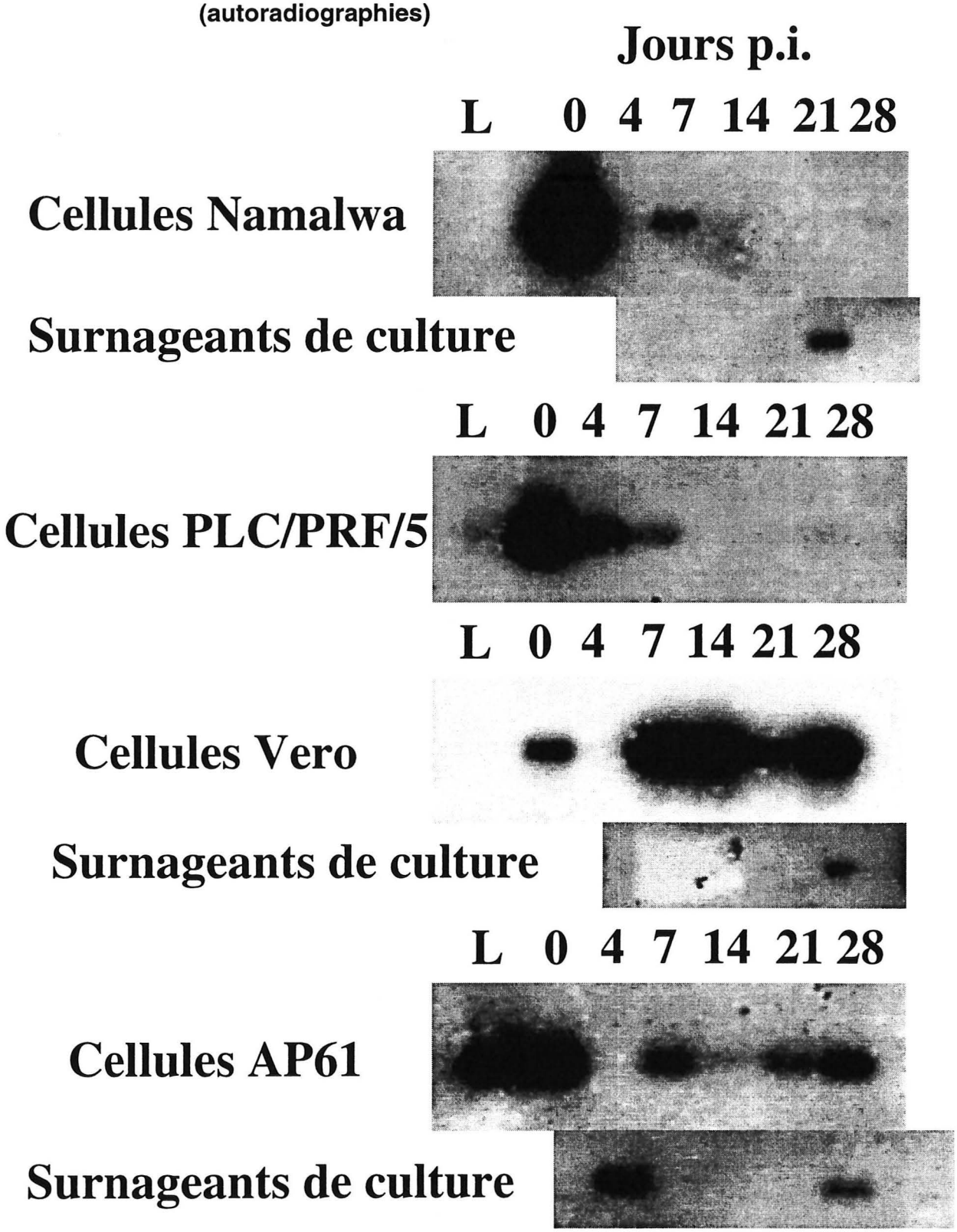
1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell culture. *Virology* 1996 (a) ; 223 : 409-412

- Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus : detection of intracellular virus particules by electron microscopy. *Hepatology* 1996 (b) ; 23 : 205-209
- Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Shapiro M, Wong DC, Purcell RH, Yoshikura H. Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J Gen Virol* 1998 ;79 :1383-1386
- Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995 ; 21 : 570-583
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol* 1993 ; 74 : 2391-2399
- Sugiyama K, Kato N, Mizutani T, Ikeda M, Tanaka T, Shimotohno K. Genetic analysis of the hepatitis C virus (HCV) genome from HCV-infected human T cells. *J Gen Virol* 1997 ;78 : 329-336
- Tagawa M, Kato N, Yokosuka O, Ishikawa T, Ohto M, Omata M. Infection of human hepatocytes cell lines with hepatitis C virus *in vitro*. *J. Gastroen Hepatol* 1995 ; 10 : 523-527
- Takano S, Ito Y, Yokosuka O, Ohto M, Uchiumi K, Hirota K, Omata M. A multicenter randomized controlled dose study of ursodeoxycholic acid for chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994 ; 20 : 558-564
- Valli MB, Bertolini L, Iacovacci S, Ponzetto A, Carloni G. Detection of a 5' UTR variation in the HCV genome after long-term *in vitro* infection. *Res Virol* 1995 ; 146 : 285-288
- Valli MB, Carloni G, Manzin A, Nasorri F, Ponzetto A, Clementi C. Hepatitis C virus infection of a Vero cell clone displaying efficient virus-cell biding. *Res Virol* 1997 ; 148 : 181-186
- Van der Poel CL, Cuypers HTM, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *The Lancet* 1994 ; 344 : 1475-1479
- Wattre P. La biologie moléculaire au service de la virologie médicale quotidienne. *Ann Biol Clin* 1997 ; 55 : 25-31
- Welch PJ, Yei S, Barber JR. Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Diagn Virol* 1998 ; 10 : 163-71

- Yanagi M, St Claire M, Shapiro M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. Transcripts of a chimerics cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious *in vivo*. *Virology* 1998 ; 244 : 161-172
- Yoo JB, Selby, MJ, Choe J, Suh BS, Choi SH, Joh JS, Nuovo GJ, Lee H-S, Houghton M, Han J. Transfection of a differentiated human hepatoma cell line (Huh7) with *in vitro*-transcribed hepatitis C virus (HCV) RNA and establishment of a long-term culture persistently infected with HCV. *J Virol* 1995 ; 69 : 32-38
- Zarski J-P. Nouveaux traitements de l'hépatite C. *Revue Française des laboratoires* 1999 ; 312 : 147-150
- Zibert A, Schreier E, Roggendorf M. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virol* 1995 ;208 :653-661

ANNEXES

Annexe 1 : détection de l'ARN du VHC dans les cultures infectées (autoradiographies)



Détection de l 'ARN du VHC, par RT-PCR southern blot et hybridation spécifique avec une sonde marquée à l'ATPγ^{32}P, dans les cellules B Namalwa, les cellules d'hepatocarcinome PLC/PRF/5, les cellules Vero, les cellules de moustique AP61 et dans les dernier liquides de lavage post-infection (L) correspondants.

Annexe 2 : Demande de brevet d'invention

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

cerfa N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

DATE DE REMISE DES PIÈCES 99 05771 06 MAI 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT 06 MAI 1999

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Bureau de la Propriété Industrielle de la
Délégation Générale pour l'Armement
DSP/SDAG/BPI
16 bis, Avenue Prieur de la Côte d'Or
94114 ARCUEIL CEDEX

n° du pouvoir permanent 6143 — références du correspondant ALM/GT/1028/98 — téléphone 01.42.31.88.58

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

X brevet d'invention — demande de brevet européen — certificat d'utilité — transformation d'une demande de brevet européen — demande initiale — brevet d'invention — certificat d'utilité n° — date

Établissement du rapport de recherche — différé — X immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance — oui — non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Procédé de culture cellulaire du virus de l'hépatite C

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN — code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

ETAT FRANCAIS représenté par le Délégué Général pour l'Armement

Forme juridique

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s) — Pays

"La Rotonde"
26, Boulevard VICTOR
00457 ARMEES

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs — oui — X non — Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES — requise pour la 1ère fois — requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine — numéro — date de dépôt — nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° — date — n° — date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)

ICT Annie LE MOENNER

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION — SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

BA 540 A/200298

Demande de brevet n° 99 05771 du 06/05/1999 au nom de l'Etat français représenté par le Délégué Général pour l'Armement pour « Procedé de culture cellulaire du virus de l'hépatite C ».

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

ETAT FRANCAIS représenté par le Délégué Général pour l'Armement

PROCEDE DE CULTURE CELLULAIRE DU VIRUS DE L'HEPATITE C

R. Germi, M. Baud, H. Blancquaert, J.-M. Crance, E. Drouet, D. Garin, D. Gratier, J. Guimet, A. Jouan, C. Rothlisberger, M.-A. Thelu, J.-P. Zarski.

A B R E G E D E S C R I P T I F

La présente invention concerne un procédé de culture cellulaire du virus de l'hépatite C comprenant les étapes suivantes :

a. inoculation d'une souche de virus aux cellules pendant un temps suffisant pour permettre l'adsorption du virus,

b. élimination de l'inoculum par lavage des cellules,

c. incubation des cellules dans des conditions compatibles à leur survie et à la multiplication du virus,

d. récolte du virus dans les extraits cellulaires et/ou dans les surnageants de culture,

caractérisé en ce que l'incubation est effectuée à une température inférieure à 33°C, dans une atmosphère contenant de 0 à 3 % de CO_2 et en présence de 0 à 2 % de sérum de veau fœtal.

La présente invention concerne un procédé de multiplication du virus de l'hépatite C dans des systèmes cellulaires compatibles avec la production d'antigènes et utilisables pour le diagnostic et la mise au point d'un vaccin contre l'hépatite C.

Le domaine technique de l'invention est celui des cultures cellulaires permettant la réplication du virus de l'hépatite C.

L'hépatite virale de type C a longtemps été décrite comme hépatite non-A non-B avant que le virus ne soit identifié comme tel en 1989. L'hépatite virale chronique de type C est désormais reconnue comme un problème majeur de santé publique. L'Organisation mondiale de la santé a estimé à 170 millions le nombre de personnes atteintes dans le monde. Bien que les symptômes initiaux comme les nausées, l'asthénie et l'ictère modéré soient peu spectaculaires, la maladie est surtout caractérisée par une évolution chronique vers la cirrhose hépatique et l'hépatocarcinome. Même si la biologie moléculaire et des études sérologiques ont permis de caractériser le virus de l'hépatite C, l'obtention d'une réplication virale sur culture cellulaire reste un moyen d'étude indispensable de la réplication du pathogène.

Etant donné l'intérêt majeur de l'établissement d'un système permissif permettant l'étude du virus de l'hépatite C et la mise au point éventuelle d'un vaccin, de nombreuses recherches ont été menées dans cet objectif. Ainsi, plusieurs systèmes cellulaires ont été décrits permettant la multiplication du virus de l'hépatite C depuis sa récente caractérisation par des techniques de clonage dont les résultats et les applications sont divulgués dans le brevet européen EP 0318216 sur les vaccins et diagnostics de l'hépatite non-A non-B. Il est précisé, sans que soit apportée aucune donnée technique permettant de prouver le succès de la réplication virale, que les techniques standards de culture des flavivirus pourraient être appliquées au virus de l'hépatite C. De plus, la technique classique, connue de l'homme du métier, de sélection de souches atténuées y est suggérée par l'utilisation de passages successifs sur des cultures de tissu et/ou sur des modèles animaux.

Le brevet WO 94/25064 décrit les méthodes traditionnelles de culture cellulaire in vitro appliquées au virus de l'hépatite C. Le virus utilisé provient de sérum ou de plasma de chimpanzés infectés et nécessite, par conséquent, une étape adaptative animale intermédiaire. Lors de la première infection, le virus est inoculé à différents types cellulaires provenant de reins ou /de foies de mammifères tels que le singe et la souris. L'incubation des cellules infectées est effectuée dans des conditions de température, de taux de CO_2 et de sérum de veau fœtal traditionnellement utilisées pour ce type de cellules. Les infections successives sont réalisées en inoculant des cellules infectées à des cultures de cellules saines et non à partir de virus libéré

dans le surnageant. Il n'y a pas de passages réalisés au sens classique qui consiste à utiliser du virus libéré des cellules. Avec l'utilisation de cellules infectées comme inoculum, l'étude du cycle viral et le criblage de substances antivirales sont impossibles.

Le brevet WO96/24662 décrit la réplication du virus de l'hépatite C dans des cellules de rein de singe de type Vero. Il est décrit trois passages successifs réalisés à 37°C par inoculation des extraits cellulaires. L'incubation des cellules à 37°C ne permet pas une survie cellulaire supérieure à 24 jours. Il n'y a pas persistance de la réplication du virus au-delà de trois passages.

Le but de l'invention est de remédier aux inconvénients ci-dessus en proposant un procédé de multiplication du virus de l'hépatite C dans des systèmes cellulaires originaux compatibles avec la production d'antigènes et utilisables pour le diagnostic, la mise au point d'un vaccin contre l'hépatite C à faible coût ainsi que le criblage de substances antivirales.

Un autre but de l'invention est d'obtenir des souches du virus de l'hépatite C adaptées en culture cellulaire permettant de le produire en grande quantité.

Pour ce faire, l'invention a pour objet un procédé de culture cellulaire du virus de l'hépatite C comprenant les étapes suivantes :

a. inoculation d'une souche de virus aux cellules pendant un temps suffisant pour permettre l'adsorption du virus,

b. élimination de l'inoculum par lavage des cellules,

c. incubation des cellules dans des conditions compatibles à leur survie et à la multiplication du virus,

d. récolte du virus dans les extraits cellulaires et/ou dans les surnageants de culture, ce procédé étant caractérisé en ce que l'incubation est effectuée à une température inférieure à 33°C, dans une atmosphère contenant de 0 à 3 % de CO_2 et en présence de 0 à 2 % de sérum de veau fœtal.

On utilise pour ce faire une lignée cellulaire provenant d'invertébrés, d'insectes, d'arthropodes, de moustiques, en particulier de moustiques du genre *Aedes* et, de préférence, une lignée cellulaire provenant du moustique *Aedes pseudoscutellaris* de type AP61.

Lorsqu'on utilise ce type de lignée, l'étape d'incubation est effectuée à une température de 28°C, dans une atmosphère contenant 0% de CO_2 et en présence de 2 % de sérum de veau fœtal.

Le procédé objet de l'invention peut également être mis en œuvre avec une lignée cellulaire Vero provenant de reins de singe.

Avec cette lignée cellulaire, l'étape d'incubation est effectuée, de préférence, à une température de 31,5°C, dans une atmosphère contenant un taux inférieur à 3% de CO_2 et en absence de sérum de veau fœtal.

Selon un mode de réalisation préférentiel et dans le but d'effectuer des passages successifs, l'étape d'inoculation est réalisée à partir d'une souche de virus récoltée au cours de l'étape d) du procédé objet de l'invention. La souche du virus de l'hépatite C ainsi obtenue est adaptée en culture cellulaire.

De préférence, après l'étape d) du procédé, la présence du virus de l'hépatite C est mesurée par la technique de la transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne qualitative et/ou quantitative ou par la technique de révélation immunochimique de protéines virales.

Le procédé selon l'invention présente l'avantage de produire des virus infectieux en grande quantité et à faible coût. La possibilité de cultiver efficacement le virus de l'hépatite C in vitro dans des cultures cellulaires constitue un outil précieux pour l'étude des mécanismes de réplication virale, pour le développement de tests immunologiques et de traitements antiviraux. De plus, l'utilisation d'une basse température au cours de la phase d'incubation entraîne une diminution du métabolisme cellulaire des cellules Vero, permet une survie cellulaire plus longue et une réplication complète du virus de l'hépatite C.

L'utilisation du virus libéré dans le surnageant comme inoculum pour les passages successifs présente un double avantage. Elle constitue la preuve d'une réplication complète du virus cultivé qui conserve ses propriétés infectieuses. De plus, elle présente l'avantage de simplifier les procédures de purification pour la production d'un vaccin, par exemple. Ainsi, elle permet d'envisager une production en masse du virus de l'hépatite C facilitée et moins coûteuse.

L'adaptation du virus en culture cellulaire peut entraîner aussi une diminution, voire une disparition, de sa pathogénicité permettant la sélection de souches atténuées communément utilisées dans le développement de vaccins animaux et humains.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description détaillée, non limitative, ci-dessous.

Exemple 1 :Multiplication du virus de l'hépatite C dans les cellules AP 61 au cours de plusieurs passages successifs.

La souche virale utilisée est la souche GR 416 prélevée chez un donneur de sang. Ce plasma contient 5 x 10^5 équivalents copies virales par ml et le virus est de génotype 1b.

Les cellules sont cultivées à 28°C dans le milieu L15 de Leibovitz commercialisé par la Société Sigma sous la dénomination Milieu Leibovitz L15 Sigma L5520, en présence de 10 % de sérum de veau fœtal et de 10% de tryptose.

Après infection, les cellules sont maintenues à 28°C dans le milieu L15 en présence de 2% de sérum de veau fœtal et de 2% de tryptose.

Les cellules sont inoculées par le plasma à raison de 50 µl pour 10^6 cellules. Après 2 heures d'incubation, l'inoculum est éliminé, les cellules sont lavées 4 fois et sont incubées dans les conditions décrites précédemment avec renouvellement du milieu tous les 7 jours. Des prélèvements de surnageants et de cellules sont réalisés régulièrement pour analyse par transcription inverse (RT) et polymérisation en chaîne (PCR) et conservés à -80°C.

L'ARN est extrait par passage sur colonne de gel de silice commercialisé sous la marque QuiaAmp® par la société Quiagen.

La transcription inverse (RT) est réalisée en présence de l'amorce NCR2 (ATA CCG ACG TGC ACG GTC TAC GAG ACC T région 5' non codante).

L'ADNc est ensuite amplifié par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) en présence de l'amorce NCR2 et de l'amorce NCR3 (CCA CCA TGA ATC ACT CCC CTG T région 5' non codante). L'ADNc amplifié subit une électrophorèse en gel d'agarose et est transféré par capillarité sur une membrane en nylon. Il est hybridé par une sonde radioactive (sonde NCR4 : CAC TCG CAA GCA CCC TAT CAG GAG T région 5' non codante) et révélé par autoradiographie.

Une autre méthode d'amplification consiste à réaliser une double PCR à partir des amorces 1CH (GGT GCA CGG TCT ACG AGA CCT C) et 2 CH (AAC TAC TGT CTT CAC GCA GAA) pour la première PCR, et 1TS (GCG ACC CAA CAC TAC TCG GCT) et 4CH (ATG GCG TTA GTA TGA GTG) pour la deuxième amplification. Le fragment de 170 pb est visualisé par migration sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Le seuil de sensibilité de 10^3 copies virales par ml est vérifié par amplification concomitante d'un témoin positif d'extraction titré commercialisé sous la marque Accurun®. Un témoin négatif consistant en une extraction de cellules non infectées de la plaque de culture est systématiquement intégré.

Les cellules d'un passage, récoltées et conservées à -80°C, sont utilisées pour réaliser le passage suivant. Elles sont congelées et décongelées 2 fois, la suspension est alors centrifugée à basse vitesse pour éliminer les débris cellulaires et le surnageant est inoculé à une nouvelle culture.

Des prélèvements de cellules et de surnageants de culture sont alors réalisés régulièrement et servent à nouveau pour un passage ultérieur et ainsi de suite.

Le génome viral est détecté par la transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) sur les cellules AP 61 immédiatement après l'infection (J0). Il n'est plus détecté à J+4 alors qu'il est de nouveau détecté à J+7, J+14, J+21 et J+28 comme on peut l'observer dans le tableau I. Les cellules récoltées au jour J+28 au cours du premier passage sont congelées et décongelées 2 fois et le surnageant de l'extrait cellulaire est utilisé pour réaliser le deuxième passage. L'ARN viral n'est détecté qu'à J+28 au cours du deuxième passage. Le troisième passage est réalisé après inoculation d'une culture de cellules avec l'extrait cellulaire J+28 du deuxième passage. L'ARN viral est détecté à J+14, J+21 et J+28 au cours de ce passage. Le quatrième passage est réalisé après inoculation d'une culture de cellules avec l'extrait cellulaire du troisième passage prélevé à J+21. L'ARN viral est détecté à J+14, J+21 et J+28.

Le caractère infectieux du virus de l'hépatite C (VHC) de tous les prélèvements est d'autre part déterminé par inoculation de ces échantillons à des cellules AP61, incubation à 28°C pendant au moins 21 jours et détection de l'ARN viral par RT-PCR.

TABLEAU I : Détection de l'ARN du virus de l'hépatite C et du virus infectieux dans les cellules AP 61 infectées par la souche GR 416 au cours des passages successifs.

Passages	Détection (+) ou non (-) de l'ARN viral par RT-PCR[1] ou présence du virus infectieux[2] aux jours postinfection			
	J+7	J+14	J+21	J+28
1er passage [a]	+	+	+	+
2ème passage [b]	-	-	-	+
3ème passage [c]	-	+	+	+
4ème passage [d]	-	+	+	+

(a) inoculum : plasma GR 416

(b) inoculum : extrait cellulaire du premier passage prélevé à J+28

(c) inoculum : extrait cellulaire du deuxième passage prélevé à J+28

(d) inoculum : extrait cellulaire du troisième passage prélevé à J+21

(1) La RT-PCR est réalisée selon la technique décrite précédemment

(2) La présence du virus infectieux est révélée par inoculation du prélèvement à des cellules AP 61 et détection de l'ARN viral par RT-PCR.

Des passages sont également réalisés par inoculation du surnageant de culture de cellules AP61 infectées par le VHC. Le tableau II montre les résultats obtenus au cours de quatre passages. La détection de l'ARN viral par RT-PCR au cours du quatrième passage met en évidence le caractère infectieux du virus produit au cours des trois passages précédents.

TABLEAU II : Détection de l'ARN du virus de l'hépatite C et du virus infectieux dans le surnageant de culture des cellules AP 61 infectées par la souche GR 416 au cours des passages successifs.

Passages	Détection (+) ou non (-) de l'ARN viral par RT-PCR[1] ou présence du virus infectieux[2] aux jours postinfection			
	J+7	J+14	J+21	J+28
1er passage [a]	-	-	-	+
2ème passage [b]	-	-	-	+
3ème passage [c]	-	-	+	+
4ème passage [d]	-	-	+	+

(a) inoculum: Plasma GR 416

(b) inoculum: Surnageant du premier passage prélevé à J+28

(c) inoculum: Surnageant du deuxième passage prélevé à J+28

(d) inoculum: Surnageant du troisième passage prélevé à J+28

(1) La RT-PCR est réalisée selon la technique décrite précédemment

(2) La présence du virus infectieux est révélée par inoculation du prélèvement à des cellules Vero et détection de l'ARN viral par RT-PCR.

Exemple 2 : Multiplication du VHC dans les cellules Vero au cours de plusieurs passages successifs.

La souche utilisée est la souche GR 416 prélevée chez un donneur de sang. Ce plasma contient 5 x 10^5 équivalents copies virales par ml et le virus est de génotype 1b.

Les cellules sont cultivées à 37°C dans le milieu M199 commercialisé par la Société Sigma sous la dénomination Milieu 199 10x Sigma M0650, en présence de 5 % de sérum de veau fœtal dans une atmosphère contenant 5% de CO_2.

Après infection, les cellules sont maintenues à 31,5°C dans le milieu M199 sans sérum de veau fœtal.

Les cellules sont inoculées par le plasma à raison de 50 µl pour 10^6 cellules. Après 2 heures d'incubation l'inoculum est éliminé, les cellules sont lavées 4 fois et sont incubées dans les conditions décrites précédemment avec renouvellement du milieu tous les 7 jours. Des

prélèvements de surnageants et de cellules sont réalisés régulièrement pour analyse en RT-PCR et conservés à -80°C.

L'ARN est extrait par passage sur colonne de gel de silice commercialisé sous la marque QuiaAmp® par la société Quiagen. La transcription inverse est réalisée en présence de l'amorce NCR2 (ATA CCG ACG TGC ACG GTC TAC GAG ACC T région 5' non codante). L'ADNc est ensuite amplifié par la technique de polymérisation en chaîne en présence de l'amorce NCR2 et de l'amorce NCR3 (CCA CCA TGA ATC ACT CCC CTG T région 5' non codante). L'ADNc amplifié subit une électrophorèse en gel d'agarose et est transféré par capillarité sur une membrane en nylon. Il est hybridé par une sonde radioactive (sonde NCR4 : CAC TCG CAA GCA CCC TAT CAG GAG T région 5' non codante) et révélé par autoradiographie.

Une autre méthode d'amplification consiste à réaliser une double PCR à partir des amorces 1CH (GGT GCA CGG TCT ACG AGA CCT C) et 2 CH (AAC TAC TGT CTT CAC GCA GAA) pour la première PCR, et 1TS (GCG ACC CAA CAC TAC TCG GCT) et 4CH (ATG GCG TTA GTA TGA GTG) pour la deuxième amplification. Le fragment de 170 pb est visualisé par migration sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Le seuil de sensibilité de 10^3 copies virales par ml est vérifié par amplification concomitante d'un témoin positif d'extraction titré commercialisé sous la marque Accurun®. Un témoin négatif consistant en une extraction de cellules non infectées de la plaque de culture est systématiquement intégré.

Les cellules d'un passage, récoltées et conservées à -80°C, sont utilisées pour réaliser le passage suivant. Elles sont congelées et décongelées 2 fois, la suspension est alors centrifugée à basse vitesse pour éliminer les débris cellulaires et le surnageant est inoculé à une nouvelle culture.

Des prélèvements de cellules et de surnageants de culture sont alors réalisés régulièrement et servent à nouveau pour un passage ultérieur et ainsi de suite.

Le génome viral est détecté par RT-PCR sur les cellules Vero immédiatement après l'infection (J0). Il n'est plus détecté à J+4, alors qu'il est de nouveau détecté à J+7, J+14 et J+28 (Tableau III). Les cellules récoltées au jour J+28 au cours du premier passage sont congelées et décongelées 2 fois et le surnageant de l'extrait cellulaire est utilisé pour réaliser le deuxième passage. L'ARN viral n'est détecté au cours du deuxième passage qu'à J+28. Au cours du troisième passage, réalisé après inoculation d'une culture de cellules avec l'extrait cellulaire J+28 du deuxième passage, l'ARN viral n'est également détecté qu'à J+28. Le quatrième passage est réalisé après inoculation d'une culture cellulaire avec l'extrait cellulaire J+28. L'ARN viral est détecté à J+7, J+14,J+21 et J+28 au cours du quatrième passage. Le cinquième passage est réalisé en inoculant les cellules Vero avec l'extrait cellulaire prélevé à J+28 au cours

du quatrième passage. L'ARN viral est détecté à J+7, J+14, J+21 et J+28. Le sixième passage est réalisé en inoculant les cellules avec l'extrait cellulaire prélevé à J+14 du cinquième passage. L'ARN viral est détecté à J+7, J+14 et J+21.

Le caractère infectieux du VHC de tous les prélèvements est déterminé d'autre part par inoculation de ces échantillons à des cellules Vero, incubation à 31,5°C pendant au moins 21 jours et détection de l'ARN viral par RT-PCR.

TABLEAU III : Détection de l'ARN du virus de l'hépatite C et du virus infectieux dans les cellules Vero infectées par la souche GR 416 au cours des passages successifs

Passages	Détection (+) ou non (-) de l'ARN viral par RT-PCR[1] ou présence du virus infectieux[2] aux jours postinfection			
	J+7	J+14	J+21	J+28
1er passage [a]	+	+	-	+
2ème passage [b]	-	-	-	+
3ème passage [c]	-	-	-	+
4ème passage [d]	+	+	+	+
5ème passage [e]	+	+	+	+
6ème passage [f]	+	+	+	-

(a) inoculum : plasma GR 416

(b) inoculum : extrait cellulaire du premier passage prélevé à J+28

(c) inoculum : extrait cellulaire du deuxième passage prélevé à J+28

(d) inoculum : extrait cellulaire du troisième passage prélevé à J+28

(e) inoculum : extrait cellulaire du quatrième passage prélevé à J+28

(f) inoculum : extrait cellulaire du cinquième passage prélevé à J+14

(1) La RT-PCR est réalisée selon la technique décrite précédemment

(2) La présence du virus infectieux est révélée par inoculation du prélèvement à des cellules Vero et détection de l'ARN viral par RT-PCR.

Des passages sont également réalisés par inoculation du surnageant de culture de cellules Vero infectées par le VHC. Le tableau IV montre les résultats obtenus au cours de quatre passages successifs. La détection de l'ARN viral par RT-PCR au cours du sixième passage met en évidence le caractère infectieux du virus produit au cours des trois passages précédents.

TABLEAU IV : Détection de l'ARN du virus de l'hépatite C et du virus infectieux dans le surnageant de culture des cellules Vero infectées par la souche GR 416 au cours des passages successifs.

Passages	Détection (+) ou non (-) de l'ARN viral par RT-PCR[1] ou présence du virus infectieux[2] aux jours postinfection			
	J+7	J+14	J+21	J+28
3ème passage [a]	-	-	-	+
4ème passage [b]	-	+	-	+
5ème passage [c]	+	+	+	+
6ème passage [d]	+	+	-	-

(a) inoculum : surnageant du deuxième passage prélevé à J+28

(b) inoculum : surnageant du troisième passage prélevé à J+28

(c) inoculum : surnageant du quatrième passage prélevé à J+14

(d) inoculum : surnageant du cinquième passage prélevé à J+14

(1) La RT-PCR est réalisée selon la technique décrite précédemment

(2) La présence du virus infectieux est révélée par inoculation du prélèvement à des cellules Vero et détection de l'ARN viral par RT-PCR.

L'adaptation du VHC au cours de passages successifs dans les cellules AP61 et/ou dans les cellules Vero entraîne une augmentation de la quantité de virus produit et une diminution de la durée du cycle viral.

Les cellules AP61 et Vero constituent des systèmes cellulaires permettant d'étudier le cycle viral, la production des différentes protéines virales et le criblage de substances antivirales actives sur le VHC. Elles sont utilisables pour la production d'antigène viral pour le diagnostic et de virus pour la mise au point d'un vaccin

REVENDICATIONS

1. Procédé de culture cellulaire du virus de l'hépatite C comprenant les étapes suivantes :

a. inoculation d'une souche de virus aux cellules pendant un temps suffisant pour permettre l'adsorption du virus,

b. élimination de l'inoculum par lavage des cellules,

c. incubation des cellules dans des conditions compatibles à leur survie et à la multiplication du virus,

d. récolte du virus dans les extraits cellulaires et/ou dans les surnageants de culture, caractérisé en ce que l'incubation est effectuée à une température inférieure à 33°C, dans une atmosphère contenant de 0 à 3 % de CO_2 et en présence de 0 à 2 % de sérum de veau fœtal.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on utilise une lignée cellulaire provenant d'invertébrés, d'insectes, d'arthropodes, de moustiques, de moustiques du genre *Aedes.*

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on utilise une lignée cellulaire provenant de moustiques *Aedes pseudoscutellaris* de type AP61.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'incubation est effectuée à une température de 28°C, dans une atmosphère contenant 0% de CO_2 et en présence de 2 % de sérum de veau fœtal.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce on utilise une lignée cellulaire Vero provenant de reins de singe.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'incubation est effectuée à une température de 31,5°C, dans une atmosphère contenant un taux inférieur à 3% de CO_2 et en absence de sérum de veau fœtal.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape d'inoculation est effectuée à partir d'une souche de virus récoltée au cours de l'étape d.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la présence du virus de l'hépatite C est mesurée par la technique de la transcription inverse suivie d'un réaction de polymérisation en chaîne qualitative et/ou quantitative.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la présence du virus de l'hépatite C est mesurée par la technique de révélation immunochimique de protéines virales.

Annexe 3 : Soutiens financiers

Ce travail a été financé par :

- le projet hospitalier de recherche clinique « Evolution et traitement de l'hépatite virale chronique C :interaction virus-système immunitaire » mis en place au sein du CHU de Grenoble
- le service de santé des armées
- le réseau national sur l'hépatite C

RESUME :

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est considérée comme un problème de santé publique du fait de sa prévalence (1,2% en France) et de sa gravité puisque dans 70% des cas son évolution est chronique et peut conduire à un hépatocarcinome. La transmission du virus se fait principalement par voie parentérale mais, pour 20% des contaminations, aucun facteur de risque n'est retrouvé. Le diagnostic est soit sérologique (détection des anticorps sériques grâce à des antigènes recombinants ou synthétiques) soit moléculaire (détection de l'ARN viral par RT-PCR, NASBA ou ADN branché). La PCR quantitative et le génotypage des souches ont permis l'amélioration du suivi du traitement. La thérapeutique par l'IFNα est efficace dans 20% des cas et son association à la ribavirine a permis de doubler le nombre de bonnes réponses durables au traitement. De nouvelles stratégies thérapeutiques (IFNα pégylé, IFNα consensus, IFNα lymphoblastoïde, les inhibiteurs de la protéase, les ribozymes) et vaccinales (vaccin à virus génétiquement atténué, vaccin à virus recombinant ou injection d'ADN nu) sont à l'étude, mais un obstacle majeur à l'avancée de ces travaux subsiste : l'absence de systèmes de culture permettant la multiplication efficace du virus. C'est ce constat qui a motivé la partie scientifique de ce travail.

Plusieurs travaux ont montré qu'il était possible de maintenir le VHC en culture sur des cellules hépatocytaires et lymphocytaires mais aussi dans les cellules de rein de singe vert d'Afrique (lignée Vero). Dans la plupart de ces systèmes, la multiplication du VHC reste modeste et aucune adaptation du virus n'a été observée. L'objectif du présent travail a été de sélectionner une lignée cellulaire originale permettant une réplication stable du VHC. Les cellules Namalwa (lymphocytes B), PLC/PRF/5 (lignée d'hépatocarcinome), Vero et les cellules AP61 de moustique *Aedes pseudoscutellaris* (jamais utilisées pour la multiplication du VHC *in vitro*) ont été incubées avec un plasma VHC positif, lavées 6 fois puis prélevées à différents temps post-infection. Le génome du VHC a été détecté dans les cellules Vero et AP61 par RT-PCR pendant 28 jours et 7 jours pour les autres lignées. Les virus extraits des cellules prélevées aux différents temps ont servi d'inoculum pour des cellules AP61 et Vero saines et 4 passages viraux successifs ont été possibles pour ces deux modèles cellulaires. La détection par cytofluorimétrie des molécules CD81 (récepteur supposé du VHC) à la surface des 2 lignées a révélé que les cellules Vero exprimaient ces molécules de surface alors que les cellules AP61 en étaient dépourvues. Cette étude a donc permis de sélectionner un modèle original de multiplication et d'étude du VHC : les cellules AP61. Ces cellules pourraient disposer d'un récepteur cellulaire pour le VHC spécifique et compatible avec l'évolution phylogénétique du virus au contact des arthropodes (déjà constatée avec d'autres *Flaviviridae*). Si ce récepteur était fonctionnel *in vivo*, la transmission du VHC par piqûre de moustiques pourrait être évoquée.