

**UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE PHARMACIE**

ANNÉE 2013

N° 013

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 15 mai 2013

Par Marc PLANÇON

Conformément aux dispositions de l'arrêté
Du 6 mai 1987 tient lieu de :

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Efficacité virologique des trithérapies anti-vhc après un an
d'utilisation au sein de la cohorte nantaise**

Président : Mme le Pr. Virginie FERRÉ, PU-PH, Laboratoire de Virologie - Faculté de Pharmacie - Nantes

Membres du Jury : Mme le Dr. Elisabeth ANDRÉ-GARNIER, PH, Laboratoire de Virologie – Faculté de Pharmacie – Nantes (Directeur de thèse)
Mr le Dr. Jérôme GOURNAY, PH, Hépatogastro-entérologie - Faculté de Médecine - Nantes
Mr le Pr. François RAFFI, PU-PH, Maladies Infectieuses et Tropicales –Faculté de Médecine - Nantes

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES TABLEAUX	3
LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION.....	6
GENERALITES	7
I- L'infection par le virus de l'hépatite C	7
A) Epidémiologie du VHC.....	7
1) Dans le monde.....	7
2) En France.....	7
B) Modes de transmission et facteurs de risque d'infection par le VHC.....	8
C) Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C.....	9
1) Histoire naturelle de l'infection aiguë.....	9
2) Histoire naturelle de l'infection chronique.....	9
3) La cirrhose et le carcinome hépato-cellulaire.....	11
D) Manifestations extra-hépatiques au cours de l'hépatite C.....	12
E) Diagnostic de l'infection par le VHC.....	13
F) Exploration de la fibrose hépatique.....	14
II- Le virus de l'hépatite C	15
A) La particule virale.....	15
B) Cycle de multiplication virale	17
1) Fixation du virus et entrée dans la cellule.....	17
2) Traduction de l'ARN viral	17
3) Réplication virale	17
4) Assemblage et sécrétion des virions.....	18
C) Génotypes et variabilité génétique du VHC	19
1) Origine de la variabilité du VHC	19
2) Variabilité du VHC à l'échelle mondiale	19
3) Variabilité du VHC à l'échelle individuelle.....	21
III- Traitement de l'hépatite C	22
A) Quelques définitions	22
B) Traitement standard de l'hépatite C.....	24
1) La bithérapie standard	24
2) Tolérance et effets indésirables de la bithérapie	25
2) Schéma de la bithérapie standard et indications thérapeutiques	26
4) Facteurs prédictifs de réponse au traitement	30
3) Suivi virologique et règles d'arrêt de la bithérapie standard.....	32
5) Efficacité du traitement standard.....	33

C) Les inhibiteurs de protéase du VHC	35
1) Efficacité des trithérapies anti-VHC	35
2) Indications et schémas thérapeutiques retenus dans les AMM	40
3) Surveillance virologique du traitement par trithérapie	44
4) Résistance aux inhibiteurs de protéase du VHC.....	45
5) Tolérance du traitement par trithérapies.....	51
D) Futurs traitements de l'hépatite C	53
ETUDE CLINICO-BIOLOGIQUE.....	56
I- Objectifs de l'étude.....	56
II- Matériels et méthodes.....	57
A) Echantillons biologiques des patients.....	57
B) Mesure des charges virales VHC.....	58
C) Détection du polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B.....	58
D) Génotypage VHC.....	58
E) Amplification et séquençage de la région NS3.....	59
1) Choix des amorces	59
2) Extraction des acides nucléiques	59
3) Amplification de l'ARN par RT-PCR.....	59
4) Séquençage direct de la protéase NS3.....	61
5) Analyse des séquences et recherche des mutations de résistance aux IP	62
III- Résultats de l'étude	64
A) 1^{ère} partie : Analyse virologique des séquences NS3 et du polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B chez des patients naïfs de traitement par IP.....	64
1) Comparaison du génotypage des souches après séquençage de la région NS3 ou NS5b.....	64
2) Analyse des mutations de résistance naturelle aux IP	64
3) Polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B	66
B) 2^{ème} partie : Suivi clinico-biologique de la cohorte de patients traités par trithérapies anti-VHC.....	67
1) Description de la population de la cohorte	67
2) Détermination du polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B	69
3) Caractéristiques de l'infection VHC	70
4) Facteurs de risque de contamination par le VHC.....	71
5) Stade de fibrose hépatique.....	72
6) Réponse virologique à la trithérapie.....	73
7) Interruptions de traitement	77
8) Analyse des échecs virologiques.....	77
DISCUSSION	82
CONCLUSION.....	97
ANNEXES.....	98
BIBLIOGRAPHIE	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Manifestations extrahépatiques associées à l'infection par le VHC (4)	12
Tableau 2. Efficacité du bocéprévir et du télaprévir dans les études de phase III (40–43).....	38
Tableau 3. Mutations de résistance émergentes (<i>emerging substitutions</i>) sous trithérapie antivirale incluant le télaprévir dans les essais de phase III chez les sujets n'obtenant pas de RVS (52).....	49
Tableau 4. Comparaison des études évaluant la prévalence des mutations de résistance aux IP chez des patients naïfs de traitement par IP (54–59).....	50
Tableau 5. Polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B	66
Tableau 6. Traitement antérieur de l'infection VHC	68
Tableau 7. Description de la population étudiée	68
Tableau 8. Polymorphisme rs 12979860 IL28B en fonction du type d'IP utilisé et de la réponse à un précédent traitement (n=30 patients).....	70
Tableau 9. Charge virale initiale à J0 du traitement.....	70
Tableau 10. Répartition des génotypes de VHC en fonction de l'IP utilisée: Télaprévir (TVR) ou Bocéprévir (BOC)	71
Tableau 11. Stade de fibrose hépatique.....	72
Tableau 12. Réponse virologique rapide observée en fonction du type de réponse à un précédent traitement	74
Tableau 13. Réponse virologique rapide en fonction de l'IP utilisé	74
Tableau 14. Réponse Virologique Rapide "étendue" (eRVR) en fonction de l'IP utilisé	75
Tableau 15. Réponse Virologique Rapide "étendue" (eRVR) en fonction du type de réponse à un traitement antérieur	75
Tableau 16. Echecs virologiques observés sous BOC et TVR	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de la particule du VHC (7)	15
Figure 2. Représentation schématique du génôme du VHC, de la traduction du cadre de lecture ouvert et de la maturation post-traductionnelle des protéines virales (12).....	16
Figure 3. Cycle de réplication du VHC et cibles potentielles des traitements actuels ou en cours de développement	18
Figure 4. Répartition géographique des principaux génotypes et sous-types du VHC (15) ...	20
Figure 5. Différents profils de réponse aux antiviraux: non répondeurs, répondeurs partiels et rechuteurs(18).....	23
Figure 6. Probabilité d'obtention d'une RVS en fonction de la réponse virologique au cours des premières semaines de bithérapie standard (20)	33
Figure 7. Schéma thérapeutique de l'AMM du télaprévir et règles d'arrêt (23).....	42
Figure 8. Schéma thérapeutique de l'AMM du bocéprévir et règles d'arrêt (23).....	44
Figure 9. Réplication virale du VHC et génération de variants viraux résistants (48)	46
Figure 10. Mutations de résistance aux différents inhibiteurs de protéase NS3 utilisés ou en cours de développement (47)	47
Figure 11. Génôme du VHC et cibles potentielles pour les nouvelles thérapeutiques (61).....	53
Figure 12. Mutations de résistance NS3 observées parmi 151 souches Nantaises de VHC génotype 1	66
Figure 13. Type de co-infection chez les patients co-infectés (n=25 patients).....	69
Figure 14. Efficacité virologique du télaprévir (N=38)	76
Figure 15. Efficacité virologique du bocéprévir (N=33).....	76

LISTE DES ABREVIATIONS

ALAT : Alanine Amino Transférase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide ribonucléique

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

BOC : Bocéprévir

CHC : Carcinome Hépato-Cellulaire

CM : Cryoglobulinémie Mixte

DAA : *Directly Acting Antivirals* ou Antiviraux d'Action Directe

EIA : *Enzyme ImmunoAssay*

EV : Echec Virologique

GGT : Gamma Glutamyl Transpeptidase

HAS : Haute Autorité de Santé

IFN : Interféron

IL 28B : Interleukine 28B

IP : Inhibiteur de protéase

IV : Intraveineuse

NR : *Null Response* ou réponse nulle

PBH : Ponction Biopsie Hépatique

PCR : *Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne

PR : *Partial Response* ou réponse partielle

RVR : Réponse Virologique Rapide

RVS : Réponse Virologique Soutenue

TGR ou RGT: Thérapie Guidée par la Réponse ou *Response-Guided Therapy*

TVR : Télaprévir

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

L'infection liée au virus de l'hépatite C (VHC) est un problème majeur de santé publique. Elle représente une des premières causes de cirrhose et carcinome hépatique (1). A l'échelle mondiale, 3% de la population serait infectée par le VHC. Le traitement standard, reposant jusqu'à présent sur la bithérapie par interféron alpha pégylé associé à la ribavirine, possède une efficacité limitée ne permettant d'éradiquer le virus que chez 50 à 60% des patients naïfs de traitement antérieur (2).

Les avancées thérapeutiques récentes ont permis le développement de nouveaux médicaments qui ciblent spécifiquement différentes protéines virales du cycle de réplication du VHC. Ces molécules, qui sont des antiviraux d'action directe (DAA) contre le VHC, sont actuellement à différents stades de développement.

Parmi ceux-ci, le bocéprévir (BOC) et le téléprévir (TVR), deux inhibiteurs de la protéase NS3 du VHC, ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en septembre 2011 pour le traitement de l'hépatite C chronique chez les patients infectés par un virus de génotype 1, en association à la bithérapie standard. Les essais cliniques de ces deux médicaments montrent une réelle efficacité et un bénéfice important par rapport à la bithérapie standard. L'arrivée de ces nouvelles thérapeutiques qui ciblent une protéine du VHC, s'accompagne du risque (déjà connu pour le virus de l'immunodéficience humaine et le virus de l'hépatite B) de résistance au traitement. Les études *in vitro* et *in vivo* pour l'obtention des AMM ont montré que l'émergence de souches résistantes était associée aux échecs virologiques.

Les objectifs de ce travail sont les suivants :

- analyser les souches virales par une technique innovante de génotypage NS3,
- rechercher la présence de mutations décrites comme associées à une résistance au BOC et/ou au TVR préexistantes et déterminer leur impact sur l'efficacité du traitement,
- suivre sur un plan virologique et clinique l'initiation de ces trithérapies sur une cohorte de patients,
- lors des échecs virologiques, rechercher d'éventuels profils de mutations de résistance non encore décrits.

GENERALITES

I- L'infection par le virus de l'hépatite C

A) Epidémiologie du VHC

1) Dans le monde

Selon les dernières estimations, 130 à 210 millions de personnes seraient infectées par le virus de l'hépatite C à travers le monde, soit environ 3% de la population mondiale (1).

La prévalence de l'infection varie beaucoup en fonction des zones géographiques et des populations concernées. Celle-ci varie de 0,4% à 3% de la population en Europe de l'Ouest tandis qu'elle est plus élevée en Europe de l'Est. L'Egypte est le pays le plus touché par l'hépatite C avec une prévalence de 9% en moyenne, l'infection pouvant concerner plus de 50% de la population dans certaines régions rurales (1).

2) En France

Selon une enquête de l'Institut National de Veille Sanitaire en 2004, 0,84% de la population vivant en France métropolitaine, âgée de 18 à 80 ans, possédaient des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C. Parmi ceux-ci, 57,4% connaissaient leur séropositivité pour le VHC.

On estime en France à environ 230 000 le nombre de sujets infectés de manière chronique par le VHC. De plus, au moins 90 000 personnes seraient porteuses de l'hépatite C mais non dépistées (3).

En 2010, environ 5 100 malades ont reçu un traitement standard par une bithérapie comprenant de l'interféron (IFN) alpha pégylé et de la ribavirine, parmi lesquels 3 200 étaient naïfs de traitement pour le VHC et 1 900 étaient en échec thérapeutique d'un traitement antérieur (3).

B) Modes de transmission et facteurs de risque d'infection par le VHC

Le VHC se transmet principalement par voie parentérale, par contact direct avec du sang ou des produits sanguins contaminés.

Avant l'apparition des tests sérologiques de détection des anticorps spécifiques du VHC au début des années 1990, les deux principaux modes de transmission du VHC étaient la transfusion de sang et de produits dérivés (produits sanguins labiles et produits sanguins stables) et la toxicomanie par voie intraveineuse (IV), responsables d'environ 70% des infections. Le nombre de sujets infectés par voie transfusionnelle en France a été estimé entre 100 000 et 400 000 (4,5). Le renforcement de la prévention et la recherche systématique du génome viral du VHC sur tous les dons de sang en France depuis 1992, a permis de diminuer ce risque de contamination au maximum (1/10 millions de dons de sang pour le VHC) (6).

La toxicomanie IV est aujourd'hui le principal risque d'infection par le VHC en France, responsable d'environ 70% des 5 000 à 6 000 nouveaux cas annuels en France.

La transmission nosocomiale pourrait expliquer un nombre important de contaminations inexplicables. Elle peut se faire par l'utilisation de matériel mal ou non désinfecté ou entre malades par l'intermédiaire d'objets souillés. Les soins dentaires et les pratiques telles que les piercing, tatouages ou acupuncture seraient à l'origine d'un nombre non négligeable de cas d'infection. Ce risque, aujourd'hui connu, a conduit à la mise en œuvre de moyens de prévention efficaces.

L'incidence de la transmission mère-enfant est faible : le risque est estimé à environ 5% en l'absence de co-infection par le VIH. Ce risque augmente chez les femmes co-infectées par le VIH (environ 20%). La transmission mère-enfant ne représente que quelques centaines de nouveaux cas par an. Une transmission intra-familiale peut survenir en cas de partage d'objets de toilettes coupants (ciseaux, rasoir).

La contamination sexuelle reste très faible, en dehors de rapports traumatiques ou survenant en période menstruelle.

Chez environ 10 à 20% des malades, aucun facteur de risque particulier n'est retrouvé (4).

C) Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C

1) Histoire naturelle de l'infection aiguë

L'hépatite C aiguë est asymptomatique chez la majorité des patients exposés au virus. Seuls 10% des malades présentent des signes cliniques. La durée moyenne d'incubation varie de 4 à 12 semaines. Le premier marqueur de l'infection par le VHC est l'apparition de l'ARN viral. Celui-ci est détectable au niveau sanguin (plasma ou sérum) une à trois semaines après la date présumée de contamination. L'augmentation des transaminases sériques intervient quant à elle au delà du 15^{ème} jour et celles-ci sont souvent supérieures à 10 fois la normale. L'apparition des anticorps anti-VHC survient en moyenne 9 semaines après le contagion. Cette séroconversion est l'élément majeur permettant le diagnostic de l'infection virale C aiguë qui est souvent fortuite (4,7).

Lorsque les symptômes sont présents (10% des malades), les signes cliniques ne sont pas distincts d'autres causes d'hépatites virales aiguës, les symptômes étant peu spécifiques : un ictère, une asthénie, des nausées et vomissements, des myalgies, de la fièvre ou encore des douleurs au niveau de l'hypochondre droit peuvent être observés.

La guérison de l'hépatite C aiguë est définie par la disparition spontanée de l'ARN du VHC dans un délai maximum de 6 mois après la primo-infection.

2) Histoire naturelle de l'infection chronique

Dans 60 à 80% des cas, le malade ne guérit pas spontanément et l'infection évolue vers la chronicité. La progression de la maladie est très variable et seule une minorité de patients développe des complications sévères de la maladie, comme la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (CHC). L'hépatite chronique active entraîne le développement progressif d'une fibrose hépatique. Le passage à la chronicité dépend de nombreux facteurs. Il est plus élevé chez les patients âgés, les hommes, les sujets de race noire et les sujets ayant un déficit de l'immunité, notamment les patients infectés par le VIH (4).

Différentes formes d'hépatite C chronique sont observées (8) :

- l'hépatite C chronique à transaminases normales : elle représente environ 25% des patients atteints d'hépatite C chronique ; ceux-ci n'ont habituellement aucun symptôme. Les transaminases restent normales, malgré la présence d'un ARN viral VHC détectable par PCR. En revanche, 80% de ces patients présentent des lésions histologiques d'hépatite chronique.

- l'hépatite C chronique minime : chez ces patients, l'ARN viral VHC est détectable et les transaminases sont modérément élevées (généralement deux à trois fois la normale), parfois fluctuantes et transitoirement normales. La ponction biopsie hépatique montre des lésions d'activité et de fibrose minimales, avec un score METAVIR d'activité de A0 ou A1 et de fibrose de F0 ou F1. Cette forme est la plus fréquente chez les patients jeunes et chez les femmes. Ces malades sont le plus souvent asymptomatiques, en dehors d'une asthénie fréquemment rapportée. Cette forme clinique semble évoluer très lentement avec un risque de développement de cirrhose très faible à court et moyen terme.

- l'hépatite C chronique modérée ou sévère : elle concerne environ 50% des malades; ceux-ci présentent des transaminases élevées. La biopsie hépatique montre ici une fibrose F2/F3 ou F4 et/ou un score d'activité A2 ou A3 selon le score METAVIR. Ces patients sont généralement asymptomatiques. Cependant, certains d'entre eux présentent une asthénie, des arthralgies et myalgies, ainsi que de l'anxiété, voire un syndrome dépressif. Ce type d'hépatite C chronique est la forme la plus fréquente avec un risque élevé d'évolution vers la cirrhose à court et long terme.

3) La cirrhose et le carcinome hépato-cellulaire

L'hépatite C chronique est une cause majeure de cirrhose et de carcinome hépato-cellulaire (CHC) (8).

Pour réagir contre l'agression virale, l'organisme met en place un mécanisme de défense qui vise au départ à limiter l'extension de la réaction inflammatoire : la fibrinogénèse. C'est un processus dynamique, réactionnel et précoce, caractérisé par la synthèse de molécules constitutives de la matrice extracellulaire. Celle-ci est au départ un processus physiologique bénéfique pour l'organisme puisqu'elle fait partie intégrante de la cicatrisation et perdure tant que la réplication virale persiste. Cette fibrinogénèse aboutit au remplacement de la matrice extracellulaire normale par un tissu pathologique avec pour conséquence une fibrose qui perturbe l'architecture du tissu hépatique (4).

Plusieurs facteurs influencent le mode de progression de la fibrose hépatique, notamment l'âge du patient (évolution plus rapide en cas de contamination après 40 ans), son sexe (évolution plus rapide chez les hommes), sa consommation d'alcool, la présence d'une immunodépression, la stéatose hépatique...

Après plusieurs années, la fibrose hépatique aboutit à un stade ultime : la cirrhose hépatique qui est une affection diffuse et irréversible du foie caractérisée par une fibrose cicatricielle, évolutive ou non, qui désorganise l'architecture lobaire normale et aboutit à la formation du nodule. Le score METAVIR est alors F4. Le diagnostic est histologique. La sévérité de cette cirrhose est évaluée grâce à la classification de *Child-Pugh*.

Une cirrhose compensée peut rester silencieuse pendant de nombreuses années. La mortalité de l'hépatite C est surtout liée aux complications évolutives de cette cirrhose: une décompensation oedémato-ascitique, l'hémorragie digestive, l'encéphalopathie hépatique ou encore le carcinome hépatocellulaire. L'incidence du CHC chez les patients ayant une cirrhose VHC induite est de l'ordre de 3 à 10% par an ; ceci justifie une surveillance tous les 6 mois de ces patients par une échographie hépatique et un dosage de l'alphafoetoprotéine sérique. En France, la cirrhose décompensée et le CHC représentent la deuxième cause de transplantation hépatique après la cirrhose alcoolique (4).

D) Manifestations extra-hépatiques au cours de l'hépatite C

Le tropisme du VHC ne se limite pas seulement au tissu hépatique. En effet, il serait également capable d'infecter les lymphocytes B et T et les monocytes, sans qu'une multiplication dans ce type de cellule ne soit véritablement établie. Ce phénomène pourrait expliquer les nombreuses manifestations extra-hépatiques associées à l'infection chronique par le VHC dont le mécanisme est principalement immunologique. Ces manifestations extra-hépatiques sont très fréquentes et polymorphes, à la fois cliniques et biologiques.

Le tableau 1 répertorie les principales manifestations extra-hépatiques retrouvées au cours de l'hépatite C chronique.

Tableau 1. Manifestations extrahépatiques associées à l'infection par le VHC (4)

Atteintes extrahépatiques liées au VHC	Prévalence (%)
Cryoglobulinémies mixtes	36-55%
Neuropathies périphériques	9-45%
Néphropathies glomérulaires membranoprolifératives	4-6%
Fatigue	36-67%
Arthralgies-myalgies	23-45%
Syndromes secs	9-67%
Vascularites systémiques de type périartérite noueuse	1-2%
Thrombopénies auto-immunes	10%
Porphyries cutanées tardives	1-5%
Diabète	14-33%

Les atteintes extra hépatiques cliniques les plus fréquentes, liées avec certitude au VHC, sont les cryoglobulinémies mixtes (CM). Les CM sont des complexes immuns circulants qui précipitent à froid et se resolubilisent au réchauffement. Le suivi prospectif de cohortes de patients infectés par le VHC a montré la présence d'une cryoglobulinémie mixte chez 36 à 55% d'entre eux mais seul un quart présente un syndrome clinique de cryoglobulinémie mixte. Celui-ci est historiquement caractérisé par la triade clinique purpura-arthralgies-asthénie (anciennement appelée syndrome de cryoglobulinémie mixte essentielle). Les dépôts de ces complexes au niveau des petits vaisseaux peuvent conduire au développement de vascularites systémiques et de glomérulonéphrites membrano-prolifératives. De nombreuses autres atteintes viscérales peuvent survenir (4,9).

E) Diagnostic de l'infection par le VHC

Le diagnostic et le suivi de l'infection par le VHC font appel à différents tests virologiques. Les uns détectent des anticorps spécifiques, marqueurs indirects de l'infection ; les autres mettent en évidence, quantifient et/ou caractérisent les constituants des particules virales (ARN génomique et antigènes viraux), marqueurs directs de l'infection (10).

La détection des anticorps anti-VHC dans le sérum ou le plasma est basée sur l'utilisation de technique immunoenzymatique sandwich de type EIA (*Enzyme ImmunoAssay*). Différents kits commerciaux existent et détectent les anticorps dirigés contre différents antigènes structuraux et non structuraux du virus. Tous ces kits présentent d'excellentes sensibilité et spécificité.

La réalisation d'un immunoblot au laboratoire (INNO-LIA[®] par exemple) permet de confirmer la spécificité de ces anticorps contre des antigènes du VHC recombinants ou de synthèse, déposés sur une membrane de nylon. L'utilisation d'un immunoblot n'est pas obligatoire. Dans la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM), il est recommandé de contrôler tout dépistage douteux ou positif par une deuxième technique sérologique différente, sur un deuxième prélèvement. Dans ce contexte, l'immunoblot peut être utilisé.

Des tests permettent la détection et la quantification de l'antigène de capsid du VHC dont le taux est fortement corrélé au niveau de la charge virale ARN du VHC. Néanmoins, la sensibilité de ces tests reste insuffisante pour permettre leur utilisation dans le suivi des patients sous thérapie anti-VHC.

La détection et la quantification de l'ARN du VHC par des techniques d'amplification de la cible en temps réel de type PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sont reconnues comme étant les techniques de choix pour le diagnostic de l'infection VHC répliquante et son suivi (10). Les techniques utilisées actuellement sont totalement ou partiellement automatisées. Les résultats de charge virale VHC sont exprimés en unités internationales (UI/mL) d'ARN VHC. Ceux-ci possèdent une limite de détection de 10 à 15 UI/mL et une très bonne spécificité. Le génotype et sous type de VHC sont déterminés par des techniques de biologie moléculaire (PCR en temps réel) ou de séquençage de la région NS5b du virus selon la méthode de l'ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales) (11).

F) Exploration de la fibrose hépatique

Une évaluation de la fibrose hépatique est indispensable au cours de l'infection chronique par le VHC. Il s'agit de déterminer la sévérité des lésions hépatiques, afin de décider la mise en place ou non d'un traitement. Elle permet également de surveiller l'évolution des lésions et l'éventuelle survenue d'une cirrhose.

Trois méthodes principales sont utilisables: la ponction biopsie hépatique (PBH), les marqueurs sanguins et l'élastographie impulsionnelle ultrasonore (12).

La PBH, méthode invasive, reste la technique de référence. Au cours de l'hépatite chronique C non traitée, les tests biologiques usuels réalisés dans le bilan initial (transaminases, bilirubine, GGT, numération des plaquettes, taux de prothrombine, etc.) ne constituent pas des marqueurs suffisamment fiables de fibrose. Seul le Fibrotest[®], score qui tient compte de ces différents paramètres, a été validé par des études publiées. D'autres scores (en particulier FibroMètre[®] et Hepascore[®]) ont des premiers résultats très satisfaisants quant à leurs performances diagnostiques mais ceci reste à confirmer.

L'élastographie impulsionnelle ultrasonore, ou Fibroscan[®], est validée. Dans les premières études, une valeur inférieure à 5-7 kPa suggère une absence de fibrose significative et une valeur supérieure à 13-15 kPa est en faveur de l'existence d'une cirrhose.

Au cours de l'hépatite chronique C chez l'adulte, seuls le Fibrotest[®] et le Fibroscan[®] sont utilisés comme tests « non invasifs » de fibrose. En cas de discordance dans l'interprétation des 2 tests, une PBH est recommandée.

II- Le virus de l'hépatite C

A) La particule virale

Le virus de l'hépatite C appartient à la famille des *Flaviviridae*, seul représentant du genre Hepacivirus. Cette famille regroupe les *flavivirus* mais aussi les *pestivirus* et les virus des hépatites G (10).

Le VHC est un petit virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre. Son génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive, d'environ 9600 paires de bases. L'ARN viral est contenu dans une capsidie protéique à symétrie icosaédrique. Cette capsidie est entourée d'une enveloppe lipidique dérivée par bourgeonnement des membranes du réticulum endoplasmique, dans laquelle sont insérées les protéines virales spécifiques E1 et E2 organisées en complexes dimériques (Figure 1).

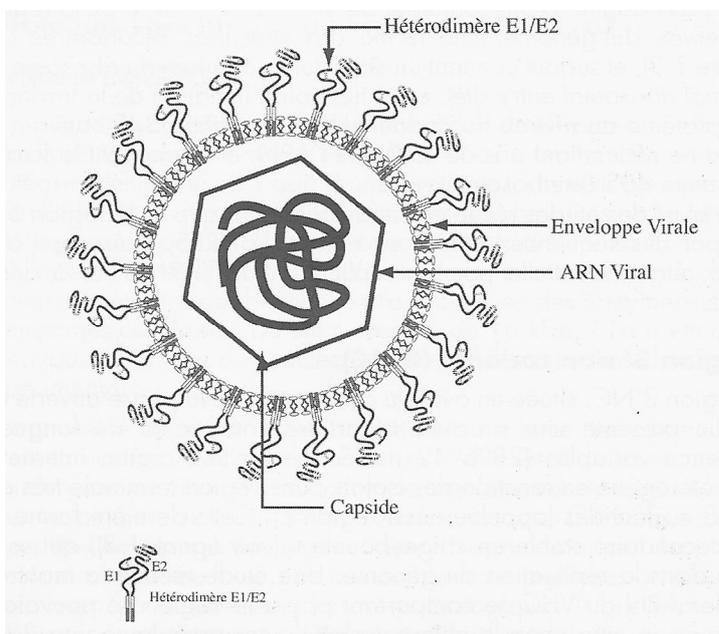


Figure 1. Structure de la particule du VHC (7)

Le génome viral est constitué de trois régions de 5' en 3' (Figure 2) :

- une région 5' non codante comprenant 341 nucléotides. C'est la région la plus conservée du génome. Elle forme des structures secondaires complexes formées de tiges et de boucles. Cette région comporte un site d'entrée du ribosome (ou IRES pour *Internal Ribosomal Entry Site*) essentiel pour le phénomène d'initiation de la traduction de la polyprotéine, mais également un signal d'encapsidation indispensable à la formation de la nucléocapside virale. Cette région intervient donc essentiellement dans les étapes de traduction et de réplication du virus.
- un cadre de lecture ouvert unique contenant 9024 à 9111 nucléotides. Il permet la synthèse d'un précurseur polyprotéique clivé ensuite en 10 protéines virales avec de 5' en 3' : les protéines structurales (protéines de capsid C et glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2) et les protéines non structurales NS (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B).
- une extrémité 3' non codante impliquée dans le processus de réplication.

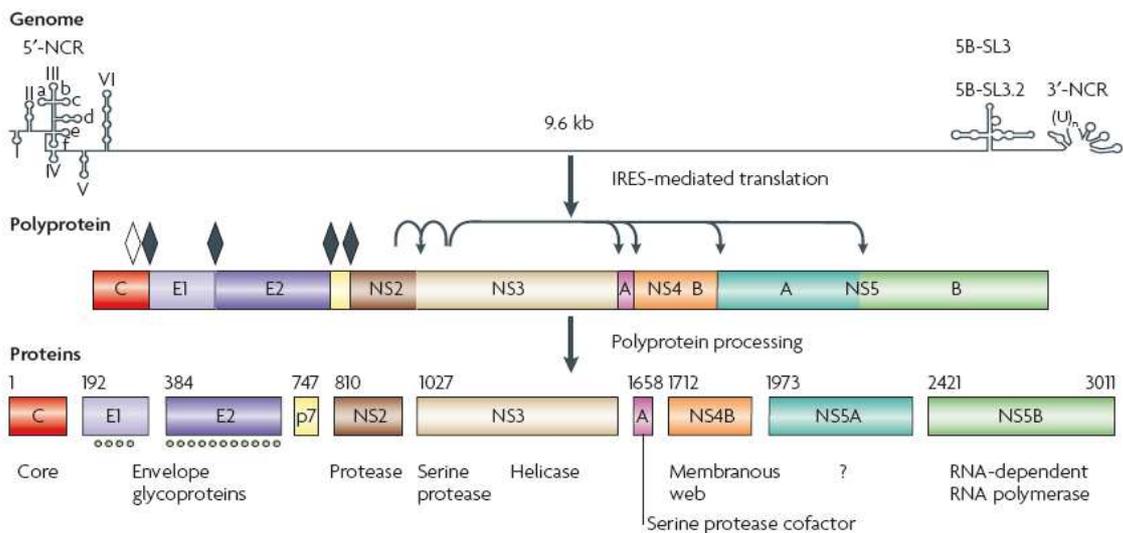


Figure 2. Représentation schématique du génome du VHC, de la traduction du cadre de lecture ouvert et de la maturation post-traductionnelle des protéines virales (12)

B) Cycle de multiplication virale

1) Fixation du virus et entrée dans la cellule

La fixation du virus à l'hépatocyte constitue la première étape du cycle de réplication virale. L'attachement du virus sur la cellule hôte fait intervenir notamment les protéines structurales E1 et E2 du VHC, ainsi que de nombreux récepteurs situés à la surface des cellules cibles. L'entrée du virion effectuée, la nucléocapside est alors libérée dans le cytoplasme. Cette décapsidation libère alors l'ARN viral de polarité positive dans le cytoplasme de l'hépatocyte(7,13).

2) Traduction de l'ARN viral

L'ARN génomique viral une fois libéré dans le cytoplasme sert d'ARN messenger. Il est alors traduit au niveau du réticulum endoplasmique directement en une grande polyprotéine. Cette polyprotéine précurseur est ensuite clivée par des protéases cellulaires et virales, donnant ainsi naissance aux différentes protéines virales structurales (capside, E1 et E2) et non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (7,8).

3) Réplication virale

La réplication virale est sous la dépendance du complexe de réplication formé par la protéine NS5B avec les autres protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A), mais également avec des protéines cellulaires de l'hôte.

La protéine NS5B joue un rôle primordial dans ce processus de réplication. Il s'agit d'une ARN polymérase ARN-dépendante.

La protéine NS3 possède une activité de protéase virale et assure, via son activité hélicase et NTPase, un déroulement des structures secondaires complexes, facilitant ainsi l'amorçage et l'élongation de la matrice ARN.

La protéine NS5A régule aussi cette réplication. La protéine NS4B servirait d'ancrage au complexe de réplication et régulerait ainsi l'activité de la polymérase. D'autres acteurs viraux interviendraient dans ce mécanisme de réplication qui reste encore, à l'heure actuelle, assez peu connu.

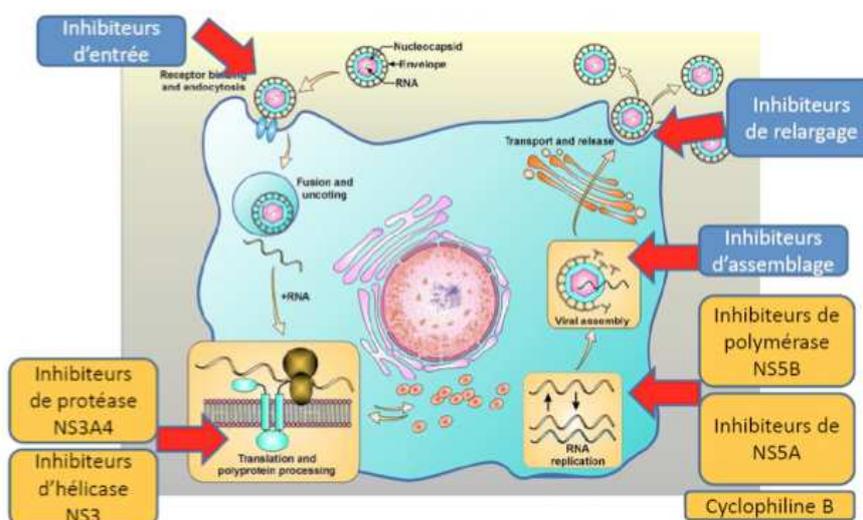
La réplication s'effectue en deux étapes par l'ARN polymérase ARN dépendante : celle-ci synthétise d'abord un brin d'ARN négatif qui servira ensuite de matrice pour la synthèse de nombreux brins d'ARN positifs, qui seront alors encapsidés, formant les génomes des particules virales néoformées (7,8,13).

4) Assemblage et sécrétion des virions

Une fois les nucléocapsides formées, celles-ci acquièrent une enveloppe par bourgeonnement dans les membranes du réticulum endoplasmique et du golgi. Les particules virales nouvellement synthétisées sont libérées de la cellule hôte par exocytose (8).

Depuis quelques années, des cibles pour de futurs traitements de l'infection par le VHC sont étudiées, grâce à différents modèles *in vitro* (14) (Figure 3):

- des inhibiteurs d'entrée du virus dans la cellule cible
- des inhibiteurs de la protéase NS3 du VHC dont deux médicaments ont récemment obtenu l'autorisation de mise sur le marché : le bocéprévir et télaprévir (inhibiteurs de protéase dits de première génération).
- des inhibiteurs de NS5A
- des inhibiteurs de la polymérase NS5B
- des inhibiteurs de la cyclophiline
- des inhibiteurs d'assemblage et de relargage de la particule virale.



Asselah T et al. *Liver International* 2009

Figure 3. Cycle de réplication du VHC et cibles potentielles des traitements actuels ou en cours de développement

C) Géotypes et variabilité génétique du VHC

1) Origine de la variabilité du VHC

Le génome du VHC, comme de nombreux virus à ARN, est caractérisé par sa grande variabilité génétique. Celle-ci résulte en partie du manque de fidélité de son ARN polymérase ARN-dépendante, responsable de la réplication, qui ne comporte pas d'activité de relecture ni de correction (absence d'activité 5'-3' exonucléasique correctrice ou activité de « *proofreading* »); elle accumule ainsi les erreurs au cours des cycles de réplication successifs. Le taux d'erreur de cette polymérase est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} par nucléotide copié. Ainsi, chaque nouvel ARN synthétisé contient environ une substitution nucléotidique par rapport à la séquence mère (4).

Certaines mutations, dites silencieuses ou synonymes, ne retentissent pas sur la structure en acides aminés de la protéine virale, mais peuvent avoir un impact sur la structure secondaire de l'ARN génomique. D'autres mutations ponctuelles, dites non synonymes, entraînent la modification de la structure des protéines et l'émergence de variants. Enfin, certaines mutations sont létales pour le virus et conduisent à la production de particules virales défectives. La majorité des séquences virales synthétisées au cours de la réplication du VHC sont défectives. Cependant, les zones du génome correspondant à des fonctions essentielles pour le virus (traduction et réplication notamment) ou présentant des contraintes structurales importantes (extrémités 3' et 5' non codantes) sont les plus conservées (15).

2) Variabilité du VHC à l'échelle mondiale

Cette variabilité du VHC a été à l'origine de l'émergence et de la diversification des différents géotypes viraux au cours de l'évolution.

L'analyse phylogénique de séquences de souches virales du VHC isolées au travers des différents continents a permis d'identifier 6 groupes principaux de virus appelés « géotypes », numérotés de 1 à 6 et plus d'une centaine de « sous types », identifiés au sein de chaque géotype par une lettre minuscule (géotype 1a, 1b...) (16).

Les différents géotypes diffèrent les uns des autres par 31 à 34% de leur séquence nucléotidique et environ 30% de leur séquence en acides aminés. Les sous types diffèrent les

uns des autres par 20 à 23% de leur séquence nucléotidique, avec des différences importantes selon la région du génome considérée (4).

La nomenclature actuelle repose sur la topologie des arbres obtenus par l'analyse du lien phylogénétique entre les variants viraux. Les variants du VHC sont ainsi classés en six clades, puis en sous-types correspondant aux sous ensembles de virus les plus reliés phylogénétiquement au sein d'un même clade (15).

Distribution géographique des génotypes :

La répartition géographique des différents génotypes varie en fonction des continents (Figure 4). Les génotypes 1, 2 et 3 sont ubiquitaires avec des prévalences variables d'une région à l'autre. Le génotype 1 est le génotype le plus fréquemment rencontré à travers le monde. Les sous types 1a et 1b sont majoritairement répandus en Amérique du Nord, au Japon et en Europe, de même que les sous types 2a et 2b. La répartition des génotypes 4, 5 et 6 apparaît restreinte à certaines régions du globe. Le VHC de génotype 4 est fréquemment observé dans le pourtour méditerranéen (notamment Egypte, Moyen-Orient, Afrique du Nord). Le génotype 5 est localisé principalement en Afrique du Sud et le génotype 6 dans les pays d'Asie du Sud-Est (15).

En Europe de l'Ouest et notamment en France, le génotype 1 (sous types 1a et 1b) est responsable de 60 à 65% des infections, tandis qu'environ 20% des malades sont infectés par le génotype 3a. Les autres principaux génotypes (2a, 2c et 4a) sont responsables de la plupart des cas restants (4).

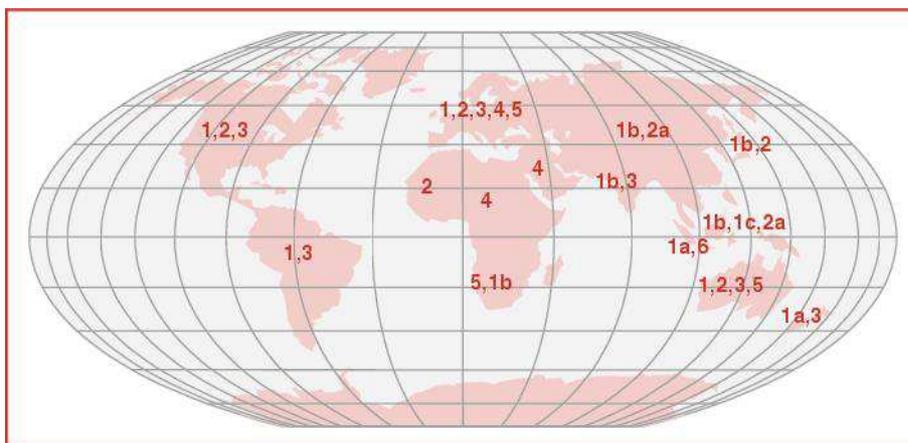


Figure 4. Répartition géographique des principaux génotypes et sous-types du VHC (15)

3) Variabilité du VHC à l'échelle individuelle

Du fait des erreurs commises par l'ARN polymérase, une hétérogénéité des populations virales chez les individus infectés est retrouvée. En effet, le VHC ne circule pas sous la forme d'une population homogène de virions identiques, mais sous la forme d'un mélange complexe, en équilibre instable de variants viraux, génétiquement distincts mais apparentés, appelé « quasi-espèce » (4). Par définition, les variants viraux d'une quasi-espèce présentent entre eux au moins 90% d'homologie de séquence (17). La quasi-espèce virale comprend un ou plusieurs variants, quantitativement prédominants, ainsi qu'une multitude de variants mineurs.

Le degré d'hétérogénéité au sein de la quasi-espèce peut être évalué à deux niveaux : la complexité génétique qui désigne le nombre total de variants viraux identifiés dans un prélèvement (*ultra deep sequencing*) et la diversité génétique définie comme étant la distance génétique moyenne entre les différents variants composant une quasi-espèce. A un instant t, la quasi-espèce d'un patient infecté est en équilibre transitoire. En effet, les quasi-espèces se modifient en permanence pour s'adapter à l'environnement sous l'influence de pressions évolutives (réponse immunitaire de l'hôte, traitements antiviraux). Celles-ci peuvent induire une modification, plus ou moins brutale, de la composition de la quasi-espèce.

La distribution en quasi-espèces joue un rôle primordial dans la persistance de l'infection, le tropisme cellulaire des variants viraux, l'échappement à la réponse immunitaire et les mécanismes de résistance du virus aux antiviraux.

III- Traitement de l'hépatite C

A) Quelques définitions

Le suivi virologique au cours du traitement de l'hépatite C chronique repose sur la quantification de l'ARN viral du VHC (charge virale (CV)).

L'objectif de ce traitement est l'obtention d'une réponse virologique soutenue (RVS), définie par l'indéteçtabilité de la CV VHC (<50UI/mL), 24 semaines après la fin du traitement.

L'optimisation du traitement antiviral est réalisée, depuis quelques années, grâce au suivi virologique : on parle de Réponse Thérapeutique Guidée, ce qui amène à la définition de différentes situations.

Différents profils de réponse peuvent être définis en fonction de la réponse virologique au traitement antiviral (Figure 5) :

- Réponse virologique rapide (RVR OU *Rapid Virological Response*) : ARN du VHC indéteçtable à la quatrième semaine (=S4) de traitement (≤ 50 UI/mL).
- Réponse virologique rapide étendue (eRVR) : ARN du VHC indéteçtable à S4 et S12.
- Réponse virologique précoce complète (RVPC) : ARN du VHC déteçtable à S4 mais indéteçtable à S12 et cela jusqu'à la fin du traitement.
- Réponse virologique précoce partielle (RVPP) : chute de l'ARN du VHC > 2 log à S12 mais déteçtable à S12, et qui devient indéteçtable à S24 et jusqu'à la fin du traitement.
- Non répondeur (NR ou *Null Response*) : chute de moins de 2log de l'ARN du VHC à S12 de la bithérapie

- Non répondeur partiel (PR ou *Partial Response*) : chute de la charge virale VHC de plus de 2log à S12 mais qui reste détectable à S12 et S24.
- Echappement : réapparition de l'ARN du VHC après une réponse virologique à n'importe quel moment du traitement.
- Rechute : réponse au traitement antiviral avec une CV indétectable à la fin du traitement mais réapparition de l'ARN du VHC dans les 6 mois suivant l'arrêt.

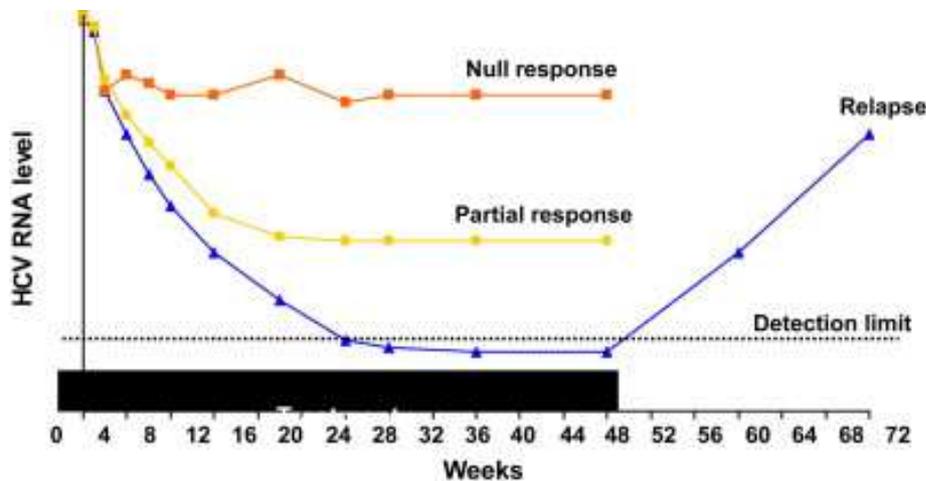


Figure 5. Différents profils de réponse aux antiviraux: non répondeurs, répondeurs partiels et rechuteurs(18)

B) Traitement standard de l'hépatite C

L'objectif du traitement antiviral est d'obtenir une éradication virale permettant la guérison de l'infection VHC mais aussi de stabiliser, voire de faire régresser les lésions de fibrose hépatique.

1) La bithérapie standard

Au cours des dernières années, le traitement antiviral de référence a reposé successivement sur l'usage d'interféron (IFN) alpha standard, puis une bithérapie par IFN alpha+ ribavirine et aujourd'hui l'association IFN alpha pégylé et ribavirine.

a) Mécanisme d'action et utilisation de l'interféron

Les IFN sont des cytokines endogènes secrétées en réponse à de nombreux stimuli, notamment les infections virales. Il en existe différents types dont les IFN alpha, bêta et lambda.

Les deux IFN alpha ayant actuellement l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de l'hépatite C sont les IFN alpha-2a pégylé (Pegasys[®]) et alpha-2b pégylé (Viraferon[®]) (19).

La pégylation de l'IFN alpha par du polyéthylène glycol diminue la clairance rénale du médicament, prolongeant ainsi sa demi-vie et augmentant sa concentration plasmatique; ceci permet une administration hebdomadaire du médicament.

Leur administration est hebdomadaire, par voie sous-cutanée, à la dose de 180 microgrammes pour l'IFN alpha-2a (Pegasys[®]) et de 1,5 microgrammes/kg pour l'IFN alpha-2b (ViraferonPeg[®]).

Dans l'hépatite C chronique, l'IFN alpha agit par différents mécanismes :

- une activité antivirale,
- une activité immunomodulatrice : notamment via une activation des lymphocytes T cytotoxiques et NK (Natural Killer), une augmentation des molécules HLA de classe I sur les cellules infectées et une prévention de l'apoptose des cellules T,
- et une activité antiproliférative (8).

b) Mécanisme d'action et utilisation de la ribavirine

La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine ayant des propriétés antivirales *in vitro* vis-à-vis de nombreux virus. Son mécanisme d'action reste en partie non élucidé.

In vivo, l'activité antivirale directe de la ribavirine sur le VHC reste modérée. Cependant, la ribavirine possède une synergie d'action et potentialise ainsi l'effet antiviral de l'IFN alpha.

La ribavirine est administrée par voie orale en deux prises quotidiennes matin et soir au moment des repas. La posologie de la ribavirine dépend du génotype viral et du poids du patient. Les spécialités disponibles en France sont Copegus[®] et Rebetol[®].

2) Tolérance et effets indésirables de la bithérapie

La bithérapie par IFN et ribavirine entraîne de nombreux effets indésirables chez les patients à la fois somatiques mais aussi parfois psychiatriques, altérant fortement leur qualité de vie. Une mauvaise tolérance de la bithérapie conduit dans 10 à 15% des cas à un arrêt thérapeutique, compromettant les chances d'obtention d'une éradication virale (4).

a) Effets indésirables induits par l'IFN alpha

De nombreux effets indésirables sont induits par l'utilisation d'IFN alpha. Ceux-ci sont fréquents mais généralement bénins et réversibles à l'arrêt du traitement. L'un des plus fréquents est le syndrome pseudo-grippal, présent dans plus de 50% des cas et regroupant différents symptômes : fièvre, frissons, céphalées, sueurs, arthralgies et myalgies.

Une asthénie est retrouvée chez environ 70% des patients. D'autres manifestations telles qu'une anorexie ou une perte de poids peuvent survenir après quelques semaines de traitement.

L'IFN alpha est responsable d'affections psychiatriques et de neurotoxicité, altérant la qualité des patients traités. La dépression est la manifestation la plus souvent rencontrée avec une prévalence estimée entre 16 et 31% (4,8,19).

D'autres effets indésirables sont également décrits comme des manifestations hématologiques (neutropénie ou thrombopénie) présentes chez environ 30% des patients, des manifestations cutanées, des troubles digestifs (à type de nausées et vomissements, douleurs abdominales, diarrhées ou constipation), des dysthyroïdies, une toux et dyspnée.

b) Effets indésirables induits par la ribavirine

Le principal effet indésirable induit par la ribavirine est d'ordre hématologique avec l'apparition rapide et fréquente d'une anémie nécessitant souvent une diminution de posologie de la ribavirine. Une prescription d'érythropoïétine est parfois nécessaire.

Un test de grossesse devra être effectué chez la femme avant toute initiation de traitement, du fait de la forte tératogénéicité de la ribavirine. De plus, une contraception efficace devra être poursuivie chez chacun des partenaires pendant tout le traitement et plusieurs mois après l'arrêt du traitement (19).

Des manifestations cutanées sont également observées: éruptions cutanées, prurit, sécheresses cutanée, alopecie...

De nombreux autres effets indésirables sont retrouvés tels que l'apparition d'une toux sèche, troubles digestifs, atteintes psychiatriques, vertiges (4,8)...

2) Schéma de la bithérapie standard et indications thérapeutiques

La durée standard de la bithérapie est de 24 semaines. Celle-ci dépend de la réponse virologique mais également du génotype du VHC.

Chez les patients obtenant une RVR lors d'une infection par un virus de génotype 2 ou 3 et avec un niveau initial bas de charge virale (<400 000-800 000 UI/mL), le traitement peut parfois être raccourci à 16 semaines.

Les patients infectés par un génotype 2 et 3 et ayant un stade avancé de fibrose, une cirrhose ou certains facteurs de risque de mauvaise réponse au traitement comme une insulino-résistance, un syndrome métabolique ou une stéatose hépatique non virale ne doivent pas recevoir un traitement antiviral raccourci à 16 semaines.

Concernant les infections par les virus de génotype 4, 5 et 6, elles doivent bénéficier du schéma de 48 semaines (20).

Les indications de traitement reposent sur :

- l'évaluation des lésions histologiques hépatiques,
- des facteurs individuels tels que l'âge, l'altération de la qualité de vie, les comorbidités, la présence de manifestations extra-hépatiques telles que cryoglobulinémies mixtes mais également sur la motivation du malade pour initier un traitement,
- les facteurs virologiques, tels que la charge virale et le génotype du VHC en particulier, sont essentiels à connaître lors de la prise en charge du patient. Ceux-ci peuvent entraîner des différences de réponse au traitement et permettre l'accès ou non à de nouvelles molécules antivirales.

a) Patients naïfs de traitement antérieur

La sévérité de l'infection VHC est principalement définie par le degré de fibrose hépatique.

Chez les patients atteints d'hépatite chronique minime (score METAVIR F0 ou F1), le bénéfice à long terme du traitement n'était pas encore totalement établi lors de la dernière conférence de consensus française de 2002 (21). Depuis 2011, les recommandations de l'EASL, (*European Association of the Study of the Liver*) (22) proposent des indications plus larges de traitement en suggérant une bithérapie chez tous les patients naïfs, quelle que soit la sévérité de l'atteinte hépatique, avec une discussion au cas par cas pour les patients ayant une atteinte hépatique minime.

Du fait du risque de progression de la fibrose chez les malades non traités, une surveillance au minimum annuelle est indispensable, selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) (21).

En cas de fibrose non sévère (F0-F1), il est tenu compte des facteurs connus de progression de la maladie hépatique, ainsi que des symptômes et de la motivation du patient (23).

La présence d'une hépatite chronique au stade F2 ou F3 de fibrose est une indication reconnue de traitement, quel que soit le degré d'activité nécrotico-inflammatoire.

Le traitement devra être initié rapidement chez les patients avec une fibrose avancée (score METAVIR F3-F4).

Chez les patients atteints de cirrhose (score METAVIR F4), le but du traitement n'est pas seulement d'atteindre une réponse virologique soutenue, mais aussi de stabiliser l'infection et ainsi de limiter les complications évolutives de la cirrhose, notamment le carcinome hépatocellulaire (CHC).

Le traitement antiviral est contre-indiqué en cas de cirrhose « décompensée ».

b) Patients rechuteurs et non répondeurs

Le taux de rechute après traitement par IFN alpha pégylé et ribavirine est de l'ordre de 15 à 25% en fonction du génotype viral et dépend du moment à partir duquel la charge virale ARN VHC est devenue indétectable pendant le traitement (2).

Un traitement associant l'IFN alpha pégylé et la ribavirine était proposé jusqu'à récemment aux patients ayant rechuté après une monothérapie par IFN ou bithérapie en échec (21).

c) Patients transplantés hépatiques pour cirrhose ou CHC liés au VHC

La récurrence de l'infection VHC est quasi constante chez ces patients. Une charge virale VHC élevée, la survenue d'une hépatite symptomatique ou une forte immunosuppression sont des facteurs défavorables d'évolution de l'infection VHC qui amènent à poser la question d'un traitement.

d) Patients au stade d'hépatite C aiguë

Le diagnostic doit être précoce car la mise en place d'un traitement au tout début de l'infection permet d'éviter le passage à la chronicité dans plus de 80% des cas (24). Cette démarche s'applique notamment aux contaminations par accident d'exposition au sang.

e) Patients co-infectés VIH-VHC

Tous les patients infectés par le VIH doivent être dépistés pour le VHC, avec un renouvellement annuel du dépistage et en cas d'augmentation des transaminases.

La co-infection VIH-VHC est associée à une sévérité accrue des lésions histologiques hépatiques et à une évolution plus fréquente et plus rapide vers la cirrhose, en particulier chez les patients avec un taux de lymphocytes T CD4 bas. La fréquence des cirrhoses, des décompensations hépatiques, des carcinomes hépato-cellulaires est accrue (25). Le risque d'évolution vers la cirrhose est 2 à 5 fois plus important et dans un délai plus court chez les patients infectés par le VIH (26).

Dans ce contexte, l'infection par le VIH doit être contrôlée, afin de restaurer l'immunité (25). Si l'infection chronique par le VHC est diagnostiquée avant qu'un traitement antirétroviral ne soit nécessaire pour l'infection par le VIH, il est recommandé de traiter d'abord le VHC (rares cas).

La place de la bithérapie est très restreinte mais peut être envisagée, en cas de non possibilité d'adaptation de traitement antirétroviral (interactions médicamenteuses), chez les malades naïfs, de génotype 1 ayant des facteurs prédictifs de bonne réponse au traitement (fibrose \leq F2, génotype C/C de l'IL28B et charge virale $<$ 600 000 UI/mL) (27).

Des essais de traitements par trithérapie anti-VHC sont en cours d'évaluation chez les patients co-infectés par un VHC de génotype 1 (28). La disponibilité de la trithérapie anti-VHC ne modifie pas fondamentalement les indications du traitement mais ses modalités (27). Un traitement anti-VHC doit être discuté chez tous les malades naïfs ayant une hépatite chronique C (sauf cirrhose décompensée). Le traitement doit être débuté rapidement chez les malades ayant une fibrose sévère (F3-F4) et est indiqué chez les malades ayant une fibrose modérée (F2). Chez les malades ayant une fibrose non sévère (F0-F1), l'indication du traitement est envisagée au cas par cas. Le traitement de choix pour l'infection VHC de génotype 1 doit être la trithérapie anti-VHC pour optimiser les chances de succès.

4) Facteurs prédictifs de réponse au traitement

Les principaux facteurs prédictifs de réponse virologique soutenue sont les suivants (22):

- le génotype du virus de l'hépatite C,
- le polymorphisme génétique de l'IL28B, localisé sur le chromosome 19, dans la région codant pour l'IL28B (ou IFN lambda 3),
- le stade de fibrose hépatique.

a) Génotype du VHC

Connaître le génotype du VHC est indispensable avant d'initier un traitement car celui-ci conditionne le choix de traitement utilisé (bi ou trithérapie), ainsi que sa durée.

Il s'agit du principal facteur prédictif de réponse au traitement chez les patients traités par bithérapie (29).

La probabilité d'obtenir une réponse virologique soutenue (RVS) avec le traitement standard, chez les patients infectés par un virus de génotype 1, est moins élevée que chez les patients infectés par d'autres génotypes. Le taux de RVS chez les patients infectés par un virus de génotype 1 varie entre 41% et 52% après 48 semaines de bithérapie pégylée alors qu'il est compris entre 76 à 84% pour les patients infectés par un virus de génotypes 2 et 3 (2,4).

Dans les études, un taux de RVS sensiblement meilleur est observé chez les patients infectés par un virus de génotypes 2 (RVS=74%), que chez les génotypes 3 (RVS=69%) traités par 24 semaines de bithérapie (30).

La probabilité d'obtention d'une RVS chez les patients infectés par des génotypes 5 et 6 est similaire à celle des génotypes 2 et 3 (29).

Le taux de RVS chez les génotypes 4 est de l'ordre de 65 à 72% (31).

Le sous-type a également son importance. En effet, le taux de RVS chez les patients infectés par un sous type 1a (30,6%) est plus faible que chez les patients infectés par un génotypes 1b (39%) (29).

b) Polymorphisme génétique rs 12979860 de l'IL 28B

Des études d'association génétique pangénomiques (*genome-wide association study*, GWAS) ont permis d'identifier des polymorphismes génétiques (SNP pour *single nucleotide polymorphism*) en amont du gène codant pour l'IFN lambda-3 (ou IL28B), associés à la réponse au traitement par IFN PEG et ribavirine. Le poids statistique de ce paramètre paraît similaire à celui du génotype viral. Chez les malades de génotype 1 et 4, le génotype de l'IL28B est apparu comme un facteur prédictif de RVS (32,33).

Dans le premier travail mené aux Etats-Unis, une homozygotie de l'allèle C en position rs 12979860 s'accompagne d'un meilleur taux de guérison virologique, après traitement standard, par rapport aux hétérozygotes C/T ou aux homozygotes T/T, quelque soit l'origine des patients infectés par le VHC de génotype 1 (80% versus 25%) (33). Ce polymorphisme est plus fréquent chez les sujets américains d'origine asiatique ou européenne que ceux d'origine africaine, ce qui pourrait expliquer les différences d'efficacité virologique observées sous traitement au sein de ces populations.

Chez les patients homozygotes C/C d'origine caucasienne (soit environ 30% des malades), le pourcentage de RVS est de 69% contre respectivement 33% et 27% pour les génotypes T/T et C/T (34).

Le pourcentage de guérison observé chez les malades C/C sans fibrose sévère traités par bithérapie est voisin de celui obtenu sous trithérapie. Ainsi, la détermination du génotype de l'IL28B et du degré de fibrose chez les malades de génotype 1 permet d'identifier un sous groupe de malades chez lesquels une bithérapie pourrait être suffisante (23).

Une réponse virologique rapide (RVR) est obtenue chez 28% des malades C/C contre seulement 5% des malades C/T et 5% des malades T/T. Près de 80% des malades ayant une RVR sont homozygotes C/C.

La RVR est un facteur puissant de réponse virologique soutenue et cela indépendamment du polymorphisme IL28B. Ainsi, en cas de RVR et ce quelque soit le génotype IL28B, les chances de RVS sont supérieures à 90%. En l'absence de RVR, la RVS n'est obtenue que chez 60% des malades.

Dans ce groupe de patients, la trithérapie anti-VHC n'augmente probablement pas les chances de RVS mais permet une réduction de la durée du traitement à 24 semaines.

c) Fibrose hépatique

Le stade de fibrose hépatique intervient également comme facteur prédictif de réponse au traitement. Plus la fibrose hépatique est importante, plus le taux de RVS sera faible (31).

De nombreux autres facteurs interviennent sur le niveau de réponse au traitement antiviral comme le niveau initial de la charge virale ARN VHC, la dose et durée du traitement, les facteurs liés au patient comme l'indice de masse corporelle, l'âge, l'origine ethnique, le diabète, le sexe, les caractéristiques de la maladie hépatique comme par exemple le niveau des ALAT et GGT (35).

3) Suivi virologique et règles d'arrêt de la bithérapie standard

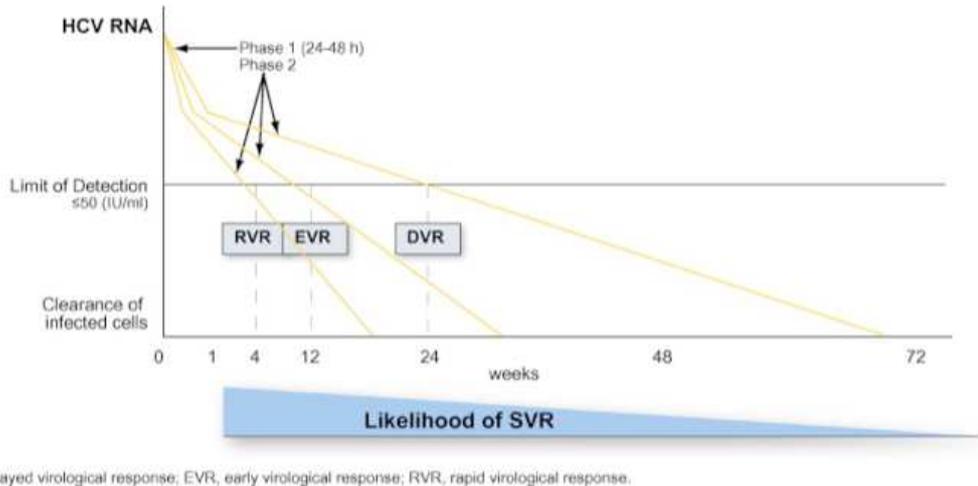
a) Suivi virologique de la bithérapie standard

Le suivi virologique au cours du traitement de l'hépatite C chronique repose sur la quantification de l'ARN viral du VHC.

La première charge virale doit être mesurée à JO du traitement. Dans le but de suivre l'efficacité du traitement et d'optimiser la durée de traitement, la réponse virologique VHC doit ensuite être évaluée aux semaines S4, S12 et S24, à la fin du traitement et 24 semaines après la fin du traitement pour affirmer l'obtention d'une RVS (20).

Le suivi virologique au cours du traitement antiviral est essentiel car il permet d'adapter sa durée en fonction du profil de réponse à la bithérapie, voire de l'interrompre en cas de réponse insuffisante. On parle de « traitement guidé par la réponse virologique » ou RGT pour *Response-Guided Therapy*.

La probabilité d'obtention d'une RVS est directement proportionnelle à la durée d'indélectabilité de l'ARN du VHC (Figure 6).



DVR, delayed virological response; EVR, early virological response; RVR, rapid virological response.

Figure 6. Probabilité d'obtention d'une RVS en fonction de la réponse virologique au cours des premières semaines de bithérapie standard (20)

b) Règles d'arrêt de la bithérapie standard :

Le traitement antiviral devra être arrêté à S12 si la charge virale n'a pas baissé de plus de 2log UI/mL par rapport à sa valeur initiale de début de traitement. Dans ce cas, la probabilité d'obtenir une RVS avec la bithérapie standard est inférieure à 2%.

Le traitement sera également arrêté si la charge virale reste détectable à S24 (probabilité d'obtention de RVS : 1-3% dans ce cas) (20).

5) Efficacité du traitement standard

a) Efficacité de la bithérapie chez les patients naïfs :

Chez les patients traités par bithérapie, le génotype du virus est le principal facteur prédictif de réponse au traitement. (Cf chapitre Facteurs prédictifs de réponse au traitement). Le taux de RVS obtenu est meilleur chez les patients infectés par un VHC de génotype 2 et 3, que ceux infectés par un génotype 1 (2).

La probabilité d'obtention d'une RVS dépend également du stade de fibrose hépatique : dans l'étude « *Hepatitis* » incluant 2066 patients, le taux de RVS chez les sujets infectés par un VHC de génotype 1 atteignait 69% chez les patients F0, 44% chez les patients F1-F2 et 31% des patients F3-F4 (36).

b) Efficacité de la bithérapie chez les patients rechuteurs et non répondeurs :

Les patients rechuteurs après traitement par IFN en monothérapie répondent à la bithérapie dans 32 à 53% des cas (37).

Chez les malades infectés par un virus génotype 1, en échec thérapeutique après bithérapie pégylée, un deuxième essai thérapeutique identique entraîne un taux de RVS de 23% chez les patients rechuteurs et de 6% chez les non répondeurs (38).

Pour les sujets n'ayant pas répondu à une première bithérapie par IFN alpha pégylé et ribavirine, répéter ce même schéma thérapeutique est efficace pour seulement 9 à 15% des patients, tous génotypes confondus contre seulement 4 à 6% pour les génotypes 1 (38,39).

Réintroduire une bithérapie n'est donc pas recommandé chez les patients infectés par le VHC de génotype 1 après échec d'une première bithérapie (22).

Chez ceux-ci, les nouvelles thérapeutiques anti-VHC, notamment les inhibiteurs de protéase du VHC, montrent un réel intérêt et semblent très prometteurs.

C) Les inhibiteurs de protéase du VHC

Récemment, deux nouveaux médicaments appartenant à une nouvelle classe thérapeutique antivirale très prometteuse, les inhibiteurs de protéase du VHC, ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché : le télaprévir (Incivo[®]) en septembre 2011 et le bocéprévir (Victrelis[®]) en juillet 2011. Ils appartiennent à la classe des antiviraux d'action directe (« DAA » pour « *Directly Acting Antivirals* »)

Il s'agit d'inhibiteurs de protéase du VHC de première génération. Une seconde vague d'inhibiteurs, dits de deuxième génération, est en cours de développement.

1) Efficacité des trithérapies anti-VHC

L'efficacité des traitements par IP du VHC, utilisant le bocéprévir ou le télaprévir, associés à la bithérapie standard a été évaluée lors de plusieurs études de phase III, multicentriques, randomisées en double aveugle, contrôlées versus placebo.

- Des études ont étudié l'efficacité et la tolérance du bocéprévir:
 - l'étude SPRINT-2 (Serine PRotease INhibitor Therapy 2) (40) a été conduite chez 1099 patients atteints d'hépatite C chronique de génotype 1, naïfs de tout traitement. Elle a été menée dans 149 centres internationaux.
 - l'étude RESPOND-2 (41) (Retreatment with HCV Serine Protease Inhibitor Boceprevir and Peg-Intron/Rebetol 2) a été menée chez 404 patients issus de 78 centres internationaux, atteints d'hépatite C chronique de génotype 1, rechuteurs ou non répondeurs à une bithérapie pégylée antérieure.

Le bocéprévir dans ces études était utilisé :

- soit associé à la bithérapie standard par IFN alpha pégylé et ribavirine pour une durée totale de 48 semaines de traitement (bras BOC PR48)
- soit associé à la bithérapie standard pendant 24 semaines (SPRINT-2) ou 32 semaines (RESPOND-2) puis protocole de traitement guidé par la réponse (TGR) en fonction de la réponse virologique à S8.

Dans toutes ces études évaluant le bocéprévir, une phase initiale de 4 semaines de bithérapie standard (phase de *lead-in*) était utilisée.

- Pour le télaprévir, l'utilisation de la trithérapie démarre d'emblée pour une durée maximum de 12 semaines avec relais par bithérapie standard :
- L'étude ADVANCE (42) a évalué l'efficacité de deux schémas thérapeutiques de télaprévir (8 ou 12 semaines) associé au peginterféron alfa-2a et à la ribavirine (pendant une durée totale de 24 ou 48 semaines) (bras T8-PR-TGR ou bras T12-PR-TGR) *versus* le peginterféron alfa-2a et la ribavirine (48 semaines) (bras PR48) chez 1095 adultes atteints de VHC génotype 1 naïfs de traitement antérieur par IFN alpha.
- L'étude REALIZE (43) a comparé l'efficacité de deux schémas thérapeutiques de télaprévir, associé au peginterféron alfa-2a et à la ribavirine, *versus* la bithérapie pégylée par IFN alpha-2a et ribavirine (PR) chez 662 patients adultes atteints de VHC génotype 1 en échec à une bithérapie antérieure.

Le critère de jugement principal de ces études de phase III était la réponse virologique soutenue (RVS) définie comme la proportion de patients présentant une charge virale ARN-VHC indétectable 24 semaines après la fin du traitement.

Les principales données de RVS obtenues dans ces études sont rassemblées dans le tableau 2.

Les deux études SPRINT-2 et RESPOND-2 ont permis de montrer que la trithérapie associant le bocéprévir à la bithérapie pégylée permet une guérison d'environ deux tiers des patients naïfs (SPRINT-2) et de plus de deux tiers des patients rechuteurs (RESPOND-2), soit une nette amélioration du taux de RVS par rapport à la bithérapie standard (PR48).

Cette efficacité du BOC est également démontrée chez les patients non répondeurs, puisque la trithérapie permet une guérison d'environ la moitié des patients, contre seulement 7% avec une bithérapie standard (RESPOND-2).

Les études REALIZE et ADVANCE ont également prouvé la supériorité de la trithérapie comprenant du télaprévir par rapport à la bithérapie standard, permettant un gain de RVS d'environ 30% chez les patients naïfs (ADVANCE) et d'environ 48% chez les patients rechuteurs ou non répondeurs (REALIZE).

Tableau 2. Efficacité du bocéprévir et du télaprévir dans les études de phase III (40-43)

Etudes de phase III	IP évalué	Nombre de patients inclus	Population de l'étude	Bras testés	RVS %	Bras comparateur	RVS %	Gain de RVS
SPRINT-2	Bocéprévir	1099	Patients naïfs	BOC-TGR	63,3%	PR48	38%	+25,3%
				BOC-PR48	66,1%			+28,1%
RESPOND-2	Bocéprévir	404	Patients rechuteurs ou non répondeurs	BOC-TGR	58,6%	PR48	21,3%	+37,3%
				BOC-PR48	66,5%			+45,2%
ADVANCE	Télaprévir	1095	Patients naïfs	T12-PR-TGR	75%	PR 48	44%	+31%
				T8-PR-TGR	69%			+25%
REALIZE	Télaprévir	662	Patients rechuteurs ou non répondeurs	TPR simultané	64,3%	PR 48	16,7%	+47,6%
				TPR différé	66,3%			+49,6%

Efficacité des trithérapies anti-VHC chez les patients co-infectés VIH-VHC (27) :

Les premiers résultats d'efficacité et de tolérance des IP de première génération chez les patients co-infectés par le VIH et le VHC reposent sur deux essais de phase III, menés chez des patients de génotype 1, naïfs de traitement contre le VHC.

Le premier essai a évalué une trithérapie comprenant du télaprévir, du Peg-IFN alpha-2a et de la ribavirine. Deux groupes de patients ont été constitués : un premier groupe de 13 patients ayant un taux de lymphocytes T CD4 $\geq 500/\text{mm}^3$, naïfs de tout traitement antirétroviral et un 2^{ème} groupe de 47 patients, sous traitement antirétroviral ayant un ARN du VIH < 50 copies/mL. 71% des patients étaient infectés par un virus de génotype 1a et 5% avaient une fibrose F4. La durée totale du traitement a été de 48 semaines dont 12 semaines initiales de trithérapie. 71% des patients sous trithérapie à base de télaprévir ont eu une réponse virologique soutenue (RVS 24) *versus* 41% des patients sous bithérapie standard.

Le second essai multicentrique randomisé en double aveugle a évalué une trithérapie associant bocéprévir, Peg-IFN alpha-2b et ribavirine. Les 98 patients inclus dans l'étude ont reçu un traitement antirétroviral optimisé avec un taux de CD4 $> 200/\text{mm}^3$ et un ARN-VIH < 50 copies/mL. Ceux-ci ont reçu une phase initiale de bithérapie par Peg-IFN/ribavirine de 4 semaines, poursuivie par une trithérapie ou placebo pendant 44 semaines. A l'inclusion dans l'étude, 65% des patients étaient infectés par un VHC de génotype 1a et 5% avaient une fibrose F4. Le taux de RVS obtenu à 12 semaines de la fin du traitement (RVS12) était de 61% dans le bras bocéprévir et 27% dans le bras placebo.

Ces deux essais confirment un bénéfice de 30 à 35% des trithérapies anti-VHC chez les co-infectés VIH/VHC par rapport à la bithérapie standard, comme observé chez les patients mono-infectés par le VHC.

2) Indications et schémas thérapeutiques retenus dans les AMM

Les inhibiteurs de protéase télaprévir et bocéprévir sont utilisés en association avec le peginterféron alfa et la ribavirine, dans le traitement de l'hépatite C chronique de génotype 1, chez les patients adultes ayant une maladie hépatique compensée (y compris ceux ayant une cirrhose) (44,45) :

- soit naïfs de traitement ;
- soit ayant préalablement été traités par l'interféron alfa (pegylé ou non pegylé) seul ou en association avec la ribavirine, y compris chez les patients rechuteurs, répondeurs partiels et répondeurs nuls.

a) Utilisation du télaprévir (Incivo®)

Le télaprévir doit être administré en association avec la ribavirine et le peginterféron alpha (45). Une dose de 750 mg (2 comprimés pelliculés de 375 mg) doit être prise par voie orale toutes les 8 heures en cours de repas.

La conduite du traitement par le télaprévir doit tenir compte des facteurs prédictifs de réponse, notamment le stade de fibrose hépatique, des thérapeutiques antérieures éventuelles et des cinétiques virales sous traitement.

Adultes naïfs de traitement ou rechuteurs à un précédent traitement (45) :

Le traitement par télaprévir doit être administré en association avec la bithérapie standard pendant une durée de 12 semaines.

- Les patients ayant une charge virale VHC indétectable aux semaines 4 et 12 (présence d'une eRVR) reçoivent 12 semaines supplémentaires de peginterféron alpha et de ribavirine seuls, soit une durée totale de traitement de 24 semaines (Traitement court)
- Les patients avec un taux d'ARN du VHC détectable à la semaine 4 ou à la semaine 12 reçoivent 36 semaines supplémentaires de peginterféron alpha et de ribavirine seuls, soit une durée totale de traitement de 48 semaines.

- Chez tous les patients ayant une cirrhose, indépendamment de l'obtention de l'indéteçtabilité de l'ARN du VHC aux semaines 4 ou 12, 36 semaines supplémentaires de peginterféron alpha et de ribavirine seuls sont recommandées, soit une durée totale de traitement de 48 semaines.

Adultes préalablement traités répondeurs partiels ou répondeurs nuls au précédent traitement :

Le traitement par téléprévir doit être administré en association avec le peginterféron alpha et la ribavirine pendant une durée de 12 semaines, suivi d'un traitement par peginterféron alpha et ribavirine seuls pour une durée totale de traitement de 48 semaines.

Les règles d'arrêt de la trithérapie antivirale ont été évaluées dans les différentes études de phase III, en fonction du statut des malades traités (naïf ou en échec de traitement antérieur) et selon la molécule utilisée.

Ces règles d'arrêt ont été légèrement modifiées dans les AMM du bocéprévir et téléprévir (46).

Le téléprévir doit être arrêté chez les patients naïfs et les patients en échec (Figure 7) en cas de :

- ARN du VHC ≥ 1000 UI/mL à S4
- ARN du VHC > 1000 UI/mL à S12
- ARN du VHC détectable à S40

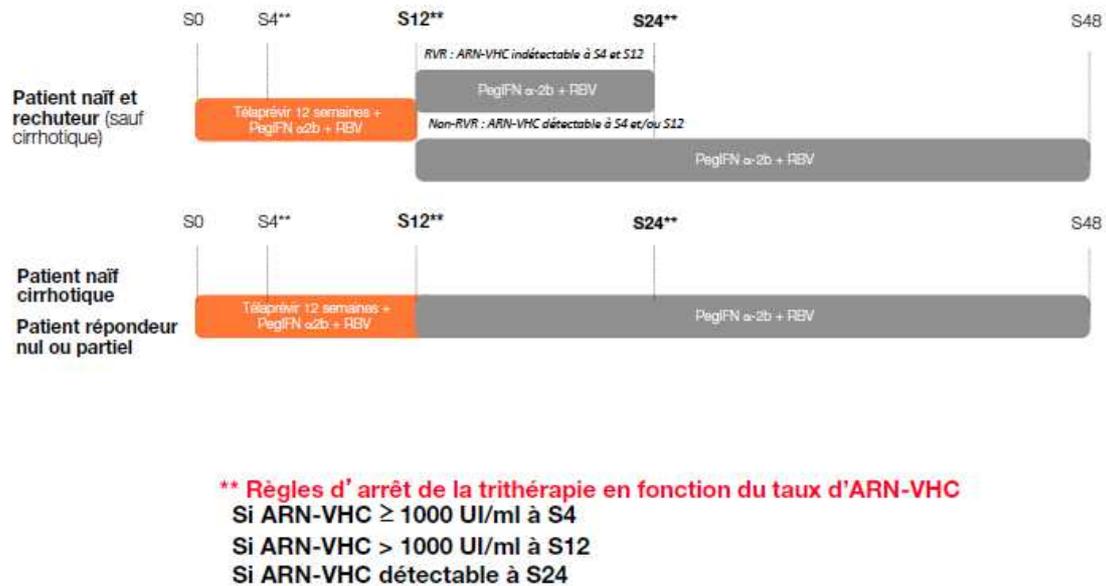


Figure 7. Schéma thérapeutique de l'AMM du télaprévir et règles d'arrêt (23)

b) Utilisation du bocéprévir (Victrelis[®])

Le bocéprévir doit être administré en association avec le peginterféron alpha et la ribavirine (44). La posologie recommandée est de 800 mg, administrée par voie orale trois fois par jour au cours d'un repas.

La durée du traitement dépend principalement de deux paramètres : un traitement antérieur de l'hépatite C et de la charge virale à S8, soit au bout de 4 semaines de trithérapie et 8 semaines de bithérapie par IFN+ ribavirine.

Le schéma de référence du Bocéprévir est un traitement de 48 semaines qui associe 4 semaines de bithérapie (phase dite de « *lead-in* »), 32 semaines de trithérapie, et enfin 12 semaines de bithérapie (Figure 8) (44).

Patients non préalablement traités (malades naïfs):

En cas de eRVR (ARN du VHC indétectable de S8 à S24), la durée totale du traitement peut être raccourcie à 28 semaines (traitement court). Ainsi, le patient recevra la bithérapie standard pendant 4 semaines puis la trithérapie pendant 24 semaines, jusqu'à S28.

En cas de charge virale détectable à S8 de la trithérapie, la durée du traitement sera prolongée à 48 semaines soit :

- une phase de bithérapie pégylée pendant 4 semaines,
- une phase de trithérapie avec ajout du BOC jusqu'à la fin de la semaine S36,
- la poursuite de la bithérapie seule jusqu'à la fin de S48.

Patients en échec à un traitement antérieur ou patients atteints de cirrhose:

En cas de cirrhose ou d'antécédent de réponse virologique nulle à la bithérapie, la durée du traitement doit être de 48 semaines, associant 4 semaines de bithérapie puis 44 semaines de trithérapie.

Un arrêt précoce de la trithérapie s'effectue en cas de (Figure 8):

- ARN du VHC ≥ 100 UI/mL à S12.
- ARN du VHC détectable à S24.

Certaines règles d'arrêt retenues dans l'AMM des médicaments n'ont pas été évaluées donc il est impossible de juger de leur pertinence clinique. Bien que la probabilité soit faible, il est possible que des patients ayant des critères d'arrêt mais chez qui le traitement serait continué, obtiennent une réponse virologique soutenue (RVS). En cas de décroissance importante et régulière de la charge virale, une poursuite du traitement doit être envisagée. En revanche si l'ARN du VHC est détectable à S24, la probabilité de RVS étant très faible, la question de l'arrêt du traitement doit être envisagée. De même, une réascension de la charge virale (échappement virologique) traduit un échec virologique (si l'observance est correcte) et doit faire interrompre le traitement.



Figure 8. Schéma thérapeutique de l'AMM du bocéprévir et règles d'arrêt (23)

3) Surveillance virologique du traitement par trithérapie

La surveillance de l'efficacité du traitement antiviral repose sur la mesure répétée de la charge virale.

Pour le bocéprévir, il est recommandé d'effectuer une charge virale à S0, S4 (fin de la phase de *lead in*), S8 (chez les malades naïfs), S12, S24, S28 (si traitement court de 28 semaines), S36, S48 et S72.

Pour le télaprévir, il est recommandé de contrôler la charge virale aux points suivants : S0, S4, S8 (chez les répondeurs nuls), S12, S24, S36, S48 et S76.

D'autres points de contrôle sont intéressants pour optimiser les règles d'arrêt de traitement. Ainsi, compte tenu de la cinétique très rapide de décroissance de la charge virale au cours des deux premières semaines sous trithérapie, il paraît utile de contrôler la charge virale 2 semaines après le début du traitement par trithérapie (S2 pour le télaprévir et S6 pour le bocéprévir) pour rechercher un éventuel échappement précoce.

Afin de dépister les éventuels échappements virologiques liés à l'arrêt de l'IP, la CV doit être mesurée 4 semaines après l'arrêt de ce dernier, soit à S16 pour le télaprévir ou S40 pour le bocéprévir.

L'ARN du VHC doit être contrôlé mensuellement tant que la charge virale reste détectable pour identifier de manière précoce les échappements virologiques liés à la sélection de variants avec des mutations de résistance aux IP.

4) Résistance aux inhibiteurs de protéase du VHC

La résistance du VHC aux DAA est définie comme étant la sélection de variants viraux, possédant des substitutions d'acides aminés altérant la cible thérapeutique. Ils confèrent ainsi une susceptibilité réduite du virus à l'effet inhibiteur de l'antiviral.

La résistance a été observée quelque soit la classe d'antiviraux, aussi bien pour les inhibiteurs de protéase NS3/4A, mais également pour les inhibiteurs de polymérase NS5B du VHC (47).

Le risque de sélection de résistance est lié à l'inhibition incomplète de la réplication virale. Plusieurs facteurs interviennent dans ce phénomène, notamment l'activité antivirale et immunomodulatrice, la pression sélective du médicament antiviral, le *fitness* du variant viral et la barrière génétique du médicament (47).

- Une hétérogénéité des populations virales est observée chez les individus infectés. Cette diversité de variants viraux présents chez le patient facilite l'adaptation des quasi-espèces à la pression antivirale, favorisant ainsi les chances de survie de la population virale mutée préexistante (Figure 9).
- La pression sélective du médicament intervient dans ce mécanisme de résistance. En effet, un médicament ayant une activité antivirale faible n'exerce pas de pression de sélection significative sur le virus et le risque d'émergence de résistance est alors faible (47). Inversement, une inhibition complète de la réplication virale ne laisse quasiment aucune opportunité aux variants viraux d'émerger car la mutagénèse est réplication dépendante. Le traitement antiviral idéal doit exercer une activité antivirale et/ou immunomodulatrice sur différentes cibles du cycle de réplication virale pour réduire la sélection de quasi-espèces résistantes au traitement.

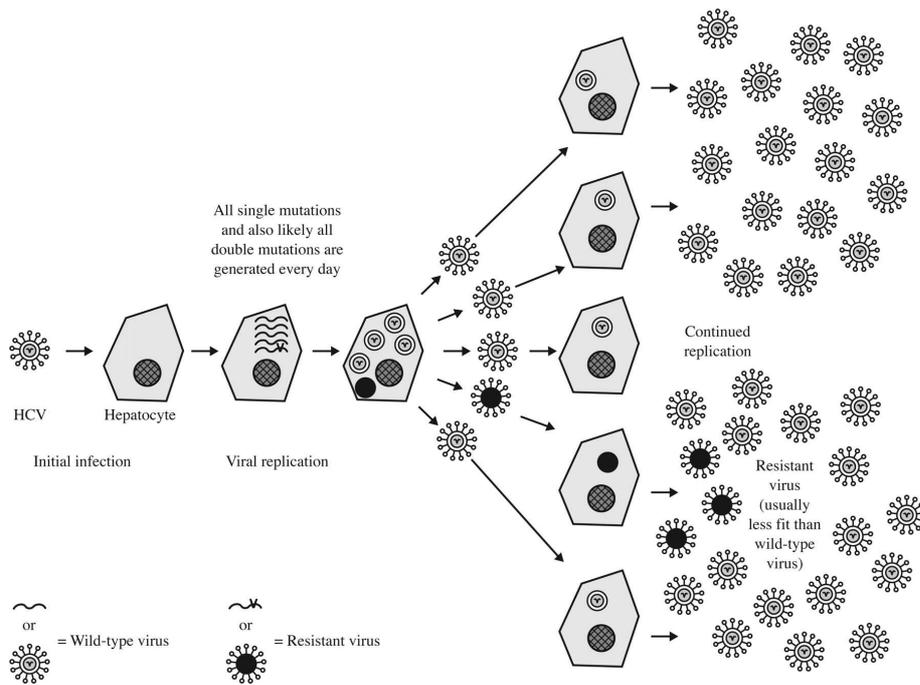


Figure 9. Réplication virale du VHC et génération de variants viraux résistants (48)

- La capacité répliquative du virus ou *fitness* du virus influence l'émergence de variants résistants aux IP. Elle est définie comme l'efficacité de la réplication de variants viraux résistants, par rapport à celle d'un virus sauvage. Les mutants VHC résistants aux IP ont dans la majorité un *fitness* réduit. L'accumulation de mutations de résistance peut conduire à une récupération progressive du *fitness*.
- La barrière génétique est définie comme le nombre de mutations nécessaires pour entraîner une résistance aux thérapeutiques antivirales. Plus le nombre de mutations nécessaires augmente, plus la barrière génétique est considérée comme élevée. Les IP anti-VHC de première génération ont une barrière génétique faible : une seule mutation étant suffisante pour qu'il y ait résistance. Cette barrière génétique varie en fonction du génotype 1a ou 1b du virus : deux changements de nucléotides sont nécessaires pour entraîner un changement d'acide aminé en position 155 pour les virus de génotype 1b (R155K (CGG->AAG)) contre un seul changement nécessaire pour les génotypes 1a (R155K (ACG->AAG)) (49).

- La mauvaise observance du patient au traitement antiviral favorise l'émergence de résistance. Une éducation thérapeutique est nécessaire au cours du traitement.
- D'autres facteurs interviennent dans le mécanisme de résistance aux antiviraux comme l'existence d'un traitement antérieur, des facteurs génétiques liés à l'hôte (comme le polymorphisme de l'IL28B, le métabolisme individuel ou encore la capacité du système immunitaire à lutter contre l'infection).

Différentes mutations de la protéase NS3/4A du VHC ont été décrites comme associées à une résistance *in vitro* et/ou *in vivo* du VHC aux IP actuellement utilisés (bocéprévir et télaprévir) ou en cours de développement (Figure 10).

	V36A/M	T54A	V55A	Q80R/K	R155K/T/Q	A156S	A156V/T	D168A/V/T/H	V170A
Telaprevir (linear)	■	■	•		■	■	■		■
Bocoprevir (linear)	■	■	■		■	■	■		■
SCH900518 (linear)	■	■			■	■	■		■
BILN-2061 (macrocylic)					■	■	■	■	
ITMN191 (macrocylic)					■	■	■	■	
MK7009 (macrocylic)		■			■	■	■	■	
TMC435350 (macrocylic)				■	■	■	■	■	
BI-201335 (linear)					■	■	■	■	■
MK5172 (macrocylic)					■	■	■	■	
GS-9256 (macrocylic)					■	■	■	■	
ABT 450 (macrocylic)					■	■	■	■	
BMS-791325 (macrocylic)					■	■	■	■	

*Mutations associated with resistance in vitro only.

Figure 10. Mutations de résistance aux différents inhibiteurs de protéase NS3 utilisés ou en cours de développement (47)

Résistance au télaprévir :

Les variants résistants au télaprévir ont été identifiés et caractérisés précocement *in vitro*. Différents niveaux de résistance ont ainsi été mis en évidence. Certaines mutations étaient identifiées comme entraînant une résistance de bas niveau au télaprévir : V36M/A/C (augmentation de CI50 du télaprévir de 3,5 à 7 fois par rapport au virus sauvage), T54A/S (CI50 augmenté de 6 à 12 fois), R155K/T/Q (CI50 augmenté de 8,5 à 11 fois). D'autres mutations étaient responsables de résistance de haut niveau : A156V/T (CI50 augmenté de 74 à 410 fois) et V36 M/A associée à R155K/T (augmentation du CI 50 de 57 à 71 fois) (50).

Les études de phase II et III du télaprévir ont permis d'étudier la prévalence des mutations de résistance aux IP avant traitement et également chez les patients n'obtenant pas de RVS sous TVR. Avant initiation de la trithérapie, 3449 souches de VHC ont été analysées et séquencées durant les études de phase II et III (51). Cinq pourcents des patients présentaient un profil de résistance naturelle aux IP. Les variants les plus souvent rencontrés étaient les suivants : V36L (1,5%) ou T54S (2,7%). Le reste des patients (moins de 1%) présentaient les mutations V36M (0,3%), T54A (0,03%) ou R155K (0,5%). Tous ces variants retrouvés confèrent des bas niveaux de résistance au télaprévir. Aucun patient ne présentait les mutations de haut niveau de résistance au télaprévir A156T ou l'association V36M+R155K.

La présence de variants résistants, en cas d'échecs virologiques à la trithérapie avec du télaprévir, a été observée chez 12% des patients naïfs de traitement antérieur (44/363) (étude ADVANCE, bras T12PR), 6% des patients rechuteurs (18/286), 24% des patients répondeurs partiels (23/97) et 51% des patients non répondeurs (75/147) (étude REALIZE, bras T12PR48) (42,43).

Les variants les plus souvent observés étaient V36M, R155K et V36M+R155K pour les patients infectés par un VHC de génotype 1a et V36A, T54A et A156S/T pour les génotypes 1b (Tableau 3) (51).

Tableau 3. Mutations de résistance émergentes (*emerging substitutions*) sous trithérapie antivirale incluant le télaprévir dans les essais de phase III chez les sujets n'obtenant pas de RVS (52)

Emerging Substitutions ¹ in NS3	Percent of No SVR Subjects (n) N=525	Percent Subtype 1a No SVR Subjects (n) N=356	Percent Subtype 1b No SVR Subjects (n) N=169
Any substitution at V36, T54, R155, A156 or D168	62% (323)	69% (247)	45% (76)
R155K/T	38% (201)	56% (200)	0.6% (1)
V36M	33% (178)	49% (173)	3% (5)
V36M + R155K ²	27% (142)	40% (142)	0% (0)
T54A/S	13% (68)	9% (31)	22% (37)
V36A/L	12% (65)	10% (37)	17% (28)
A156S/T	9% (48)	8% (28)	12% (20)
V36G/I, I132V, R155G/M, A156V/F/N or D168N	Less than 2%	Less than 2%	Less than 2%

1 : Mutations seules ou combinaison de mutations de résistances 2 : Les sujets présentant l'association V36M+R155K ont également été inclus dans les catégories R155K/T et V36M.

Résistance au bocéprévir :

Les études *in vitro* ont montré que les mutations de résistance au bocéprévir sont également associées à différents niveaux de résistance. Certaines d'entre elles entraînent un faible niveau de résistance au BOC: V36G, T54S, R155L (augmentation de CI50 de 3,8 à 5,5 fois). D'autres, un niveau moyen de résistance : V55A, R155K, V170A, T54A, A156S (augmentation de CI50 de 6,8 à 17,7 fois). La mutation A156T entraîne un niveau de résistance élevé au Bocéprévir (augmentation de CI50 >120 fois) (53).

Prévalence des mutations de résistance aux IP dans les études cliniques:

Des études s'intéressent aux mutations de résistance aux IP chez des patients naïfs, infectés par un VHC de génotype 1. Elles montrent des résultats hétérogènes sur le type et la prévalence de ces mutations (Tableau 4).

Tableau 4. Comparaison des études évaluant la prévalence des mutations de résistance aux IP chez des patients naïfs de traitement par IP (54–59)

Etudes	Nombre de patients	Génotype des souches	Mutations de résistances retrouvées	Prévalence des mutations de résistance (%)
Kuntzen et al., 2008, <i>Hepatology</i>	507	362 G1a	R155K V36L V36M T54S	0,8% 1,7% 0,6% 1,9%
		145 G1b	T54S	1,4%
Suzuki et al., 2012, <i>Journal of Clinical Virology</i>	362	362 G1b	T54S V36A Q80R D168E	3,3% 0,3% 0,7% 0,7%
Bartels et al., 2008, <i>Journal of Infectious Diseases</i>		389 G1a	V36M R155K V170A R109K	0,9% 0,7% 0,2% 0,2%
		241 G1b	Aucune	0%
Vallet et al., 2011, <i>Antiviral Therapy</i>	298	G1a +G1b =108	T54S	5%
Shindo et al., 2011, <i>Hepatology International</i>	261	261 G1b	T54S Q80K I153V D168E T54S+I153V I153V+D168E	5,4% 0,4% 8,4% 1,5% 1,5% 0,8%
Besse et al., 2012, <i>Journal of Virological Methods</i>	140	35 G1a	V36L T54S V55A R177H	2,9% 2,9% 5,8% 2,9%
		28 G1b	V36L T54S R177H D168E N174F	3,6% 3,6% 10,7% 3,6% 3,6%

5) Tolérance du traitement par trithérapies

La trithérapie anti-VHC par IP, IFN alpha pégylé et ribavirine entraîne de nombreux effets indésirables qui devront être surveillés attentivement au cours du traitement.

Le télaprévir présente deux effets indésirables principaux: les troubles cutanés (incluant rash et prurit) et l'anémie. Ces manifestations fréquentes, parfois sévères peuvent entraîner l'arrêt du traitement (23).

Le traitement par télaprévir s'associe à un rash cutané dans 54% des cas.

Dans plus de 90% des cas, il s'agit d'une dermatite eczématiforme déjà connue avec le traitement par IFN et ribavirine, mais plus fréquente et plus intense dans son expression clinique. Elle survient dans la moitié des cas au cours du premier mois de traitement.

Environ 90% des éruptions restent localisées ou modérées (<50% de la surface cutanée) tandis que 6% des patients ont eu un rash sévère (atteinte diffuse >50% de la surface cutanée) nécessitant un arrêt du télaprévir. Il peut s'agir d'une dermatite eczématiforme dont l'atteinte dépasse 50% de la surface corporelle et/ou de la présence de vésicules, décollements cutanés ou muqueux, pustules, purpuras, ulcérations muqueuses qui doivent faire suspecter un Syndrome de Stevens Johnson ou un DRESS syndrome (*Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms*). Celui-ci survient plus tardivement, après la 6^e semaine de traitement.

Sur les 3000 patients environ ayant reçu du télaprévir dans le cadre d'essais cliniques : 11 cas de DRESS syndrome et trois cas de syndrome de Stevens Johnson ont été décrits. La présence de ces lésions cutanées sévères doit être reconnue précocement. Elles imposent un arrêt de tous les médicaments et une hospitalisation en urgence. Le mécanisme exact responsable des éruptions induites par le télaprévir n'est pas connu à ce jour et aucun facteur prédictif n'a été identifié.

Le deuxième effet indésirable principal observé en cas de trithérapie est l'anémie. L'anémie hémolytique est fréquente chez les patients traités par la ribavirine. L'usage de la trithérapie augmente le risque d'anémie d'environ 20% par rapport à la bithérapie pégylée, lié à l'effet inhibiteur sur la moelle osseuse. En effet, une anémie sévère définie par une hémoglobine <10g/dL a été observée chez 36% des patients traités par une trithérapie comprenant le télaprévir contre 14% sous bithérapie. (42,43)

De la même façon, une anémie $<10\text{g/dL}$ est retrouvée chez 50% des malades traités par trithérapie contenant du bocéprévir contre 30% sous bithérapie (40,41).

Le traitement a été interrompu pour anémie chez 2% des patients recevant du bocéprévir contre 1% des patients traités par bithérapie. Dans ces études, l'utilisation d'érythropoïétine était recommandée et effectivement administrée chez 43% des patients.

D) Futurs traitements de l'hépatite C

Les bénéfices de ces inhibiteurs de protéase de 1^{ère} génération sont indiscutables. Néanmoins, ils présentent encore certaines limites, avec l'obligation de trois prises quotidiennes avec le bocéprévir, de nombreux effets indésirables imposant parfois l'arrêt de la trithérapie, ainsi que de nombreuses interactions médicamenteuses. De plus, ces médicaments possèdent une barrière génétique faible et leur activité est limitée au traitement de l'infection par un VHC de génotype 1.

Pour ces différentes raisons, de nombreux médicaments sont en cours de développement et font l'objet d'essais cliniques. Tous les enzymes du VHC (les protéases NS2-3 et NS3-4a, l'hélicase NS3 et l'ARN polymérase NS5b ARN dépendante) sont essentiels pour la réplication du virus. Des antiviraux d'action directe ciblant ces différents enzymes viraux sont actuellement testés (Figure 11), notamment de nouveaux inhibiteurs de protéase NS3, des analogues nucléosidiques/nucléotidiques et inhibiteurs non nucléosidiques de l'ARN polymérase NS5b et des inhibiteurs de NS5a (61).

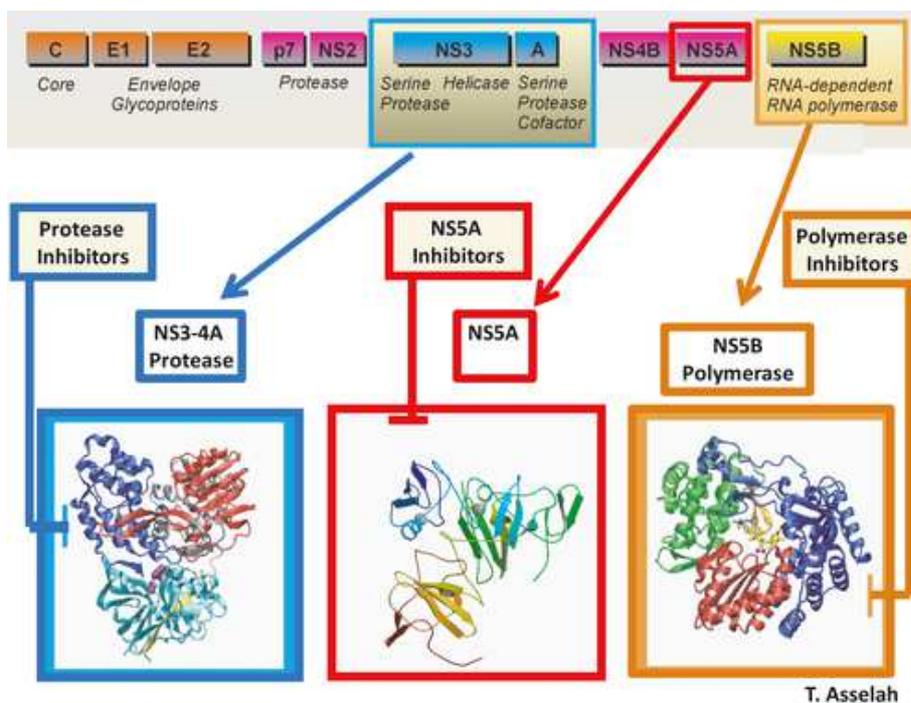


Figure 11. Génôme du VHC et cibles potentielles pour les nouvelles thérapeutiques (61)

Les objectifs de ces futurs traitements sont à terme d'obtenir une thérapeutique si possible en une seule prise par jour, avec moins d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses, une meilleure efficacité virologique et une activité pangénotypique. Certaines thérapeutiques prometteuses permettront même d'envisager l'éradication du VHC sans usage d'interféron, améliorant alors sans doute considérablement la tolérance du traitement anti-VHC (14).

Des inhibiteurs de protéase de première génération dits « de deuxième vague » sont en cours d'essais de phase II ou III avec notamment :

- le simeprévir ou TMC 435 en cours d'essai de phase III. Il présente une activité sur tous les génotypes de VHC excepté le génotype 3, peu d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses.
- le faldaprévir ou BI 201335 (phase III).
- le danoprévir/r (boosté par du ritonavir) ou RG7227 (phase II).
- le sovaaprévir ou ACH-1625 (phase II).
- l'ABT 450/r (phase II).

Leur efficacité antivirale ne sera sans doute pas nettement supérieure à celle des IP actuels (télaprévir et bocéprévir) mais leur administration sera simplifiée avec notamment une seule prise par jour pour la plupart d'entre eux.

Des inhibiteurs de protéase du VHC dits de deuxième génération sont également en cours de développement, avec principalement le MK 5172 en cours d'essai de phase II et l'ACH-2684. Le MK 5172 possède l'avantage d'avoir une activité pangénotypique, y compris sur le VHC de génotype 3. Les premiers essais thérapeutiques montrent une forte activité antivirale avec une chute de la CV VHC de plus 5log UI/mL après une semaine de traitement chez les patients infectés par une VHC de génotype 1.

Des inhibiteurs de polymérase NS5b du VHC sont en cours d'évaluation dans des essais II et III. Ils présentent l'avantage de posséder une barrière de résistance élevée et des activités pangénotypiques. Deux classes d'inhibiteurs de polymérase existent : des analogues nucléosidiques et nucléotidiques de l'ARN polymérase (sofosbuvir (GS-7977) ou la méricitabine) et des inhibiteurs non nucléosidiques (tegobuvir (GS-9190)).

D'autres médicaments sont également en développement comme de nouveaux interférons de type lambda qui agiraient directement sur le foie, entraînant beaucoup moins d'effets indésirables que l'IFN alpha actuellement utilisé. Ils sont actuellement en cours d'essais thérapeutiques en association avec les différentes classes d'antiviraux d'action directe (DAA) (62).

Les plus grands espoirs reposent sur l'utilisation d'associations d'antiviraux d'action directe, qui permettraient de guérir de l'hépatite C sans utilisation d'IFN. La première combinaison sans IFN associe l'asunaprevir (inhibiteur de protéase de deuxième vague) et le daclastavir (inhibiteur de NS5A) (GS-7977). Sur les 21 malades infectés par un virus de génotype 1, non répondeurs à un précédent traitement, la moitié a obtenu une guérison (63).

De même, le sofosbuvir (inhibiteur de polymérase NS5b du VHC en cours d'essai de phase III) a permis de guérir des patients infectés par un VHC de génotypes 2 et 3, naïfs de traitement antérieur, par une bithérapie associant sofosbuvir et ribavirine sans utilisation d'IFN (64).

Actuellement, au moins six essais sont en cours pour évaluer ces différentes combinaisons d'antiviraux d'action directe sans utilisation d'IFN (61).

ETUDE CLINICO-BIOLOGIQUE

I- Objectifs de l'étude

Cette étude présente deux objectifs principaux :

- le premier est d'étudier les mutations de résistance naturelle aux inhibiteurs de protéase NS3 du VHC chez des patients atteints d'hépatite C chronique de génotype 1, suivis au CHU de Nantes et éventuels futurs candidats à un traitement par Bocéprévir ou Télaprévir. Les résultats obtenus pour les patients de cette cohorte Nantaise ont ensuite été comparés aux données internationales.
- Le deuxième objectif est de suivre la cohorte de patients atteints d'hépatite C chronique de génotype 1, chez qui a été initiée une trithérapie anti-VHC comprenant le bocéprévir ou télaprévir, depuis l'obtention de l'autorisation temporaire d'utilisation (avril 2011) et des AMM (septembre 2011). Le recul de cette étude est actuellement de un an. La recherche de mutations de résistance primaires aux IP a également été effectuée chez ces patients à J0, préalablement à l'initiation du traitement antiviral. Tous ces patients sont des patients naïfs de traitement antérieur par IP du VHC. L'efficacité thérapeutique est mesurée grâce au suivi clinico-biologique : génotype du VHC, charges virales au cours du traitement, évaluation de la fibrose hépatique, tolérance du traitement... Un génotypage de résistance en cours de traitement est renouvelé en cas d'échec virologique chez ces patients.

II- Matériels et méthodes

A) Echantillons biologiques des patients

La première partie de cette étude prospective est réalisée à partir de données collectées chez 151 patients infectés par le VHC et suivis dans le service d'Hépatogastro-Entérologie et/ou de Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Nantes. Tous ces patients ont signé un consentement éclairé afin de participer à une étude sur « la détection du polymorphisme du gène de l'IL28B et la prédiction de la réponse virologique au traitement par IFN alpha pégylé et ribavirine ». Leurs échantillons sanguins (plasmas issus de sangs prélevés sur anticoagulant de type EDTA) sont alors conservés dans une biothèque conservée à -80°C (IL28B- Etude IMAD).

La cohorte de patients étudiés comprend 151 patients infectés par un VHC de génotype 1, naïfs de traitement antérieur par inhibiteurs de protéase du VHC. Il s'agit de 62 femmes (41,1%) et 89 hommes (58,9%) atteints d'hépatites C chronique, suivis au CHU de Nantes dans le service d'Hépatogastro-Entérologie et/ou dans le service d'Infectiologie. Les patients sont majoritairement mono-infectés (n=115).

La deuxième partie de l'étude concerne 71 patients ayant débuté un traitement par IP du VHC. Les échantillons sanguins pour le génotypage de résistance, réalisé initialement à J0 du traitement, sont des plasmas EDTA conservés à -80°C.

Parmi les 71 patients étudiés, on compte 22 femmes (31%) pour 49 hommes (69%).

L'âge moyen des patients est de 54,1 ans (âge minimum : 34ans ; maximum : 73 ans).

B) Mesure des charges virales VHC

Les charges virales (CV) VHC sont mesurées sur plasmas par une technique automatisée d'extraction et d'amplification : Roche COBAS AmpliPrep (Roche Diagnostics®) pour l'étape d'extraction de l'ARN du VHC et Roche COBAS Taqman (Roche Diagnostics®) pour l'étape de reverse transcription puis de PCR en temps réel. La détection et la quantification de l'ARN du VHC sont obtenues avec une limite de détection de 15UI/mL. La limite de linéarité de la technique est la suivante : 15 UI/mL à 1.10^8 UI/mL (soit 1,2 log UI/mL à 8 log UI/mL). Le déroulement de la technique suit les recommandations du fournisseur.

C) Détection du polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B

La recherche du polymorphisme de l'IL28B est réalisée par le laboratoire de Génétique Médicale du CHU de Nantes. Une technique de séquençage de la région en amont du gène codant pour l'IL28B est utilisée.

D) Génotypage VHC

Le génotype du VHC est déterminé en routine par séquençage de la région NS5b depuis 2001 selon les recommandations de l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites virales (ANRS) (11).

E) Amplification et séquençage de la région NS3

1) Choix des amorces

Un alignement de 475 séquences NS3 a été effectué à l'aide du logiciel d'analyse de séquences Seqscape[®], dont 374 séquences provenant de souches de génotypes 1 et 101 séquences de souches de génotypes 2 à 6 ; ces séquences provenant toutes de bases de données internationales (*GenBank* et LAL : *Los Alamos National Laboratory*). Cet alignement a permis de dessiner des amorces consensuelles dans la région d'intérêt NS2/NS3 afin de pouvoir amplifier tous les génotypes de VHC.

Pour augmenter la sensibilité de la PCR, des amorces internes et externes ont été choisies pour permettre de réaliser une PCR « nichée » si nécessaire.

Pour améliorer la spécificité, deux amorces sens ont été choisies et utilisées: NS3-1F (pour les génotypes 2, 4 et 6) et NS3-2F (pour les génotypes 1, 3 et 5), nestNS3-1F (génotypes 1 et 6) et nestNS3-2F (génotypes 2, 3, 4 et 5). Les deux amorces antisens NS3-R et nestNS3-R sont des séquences consensus.

Pour l'étape de réaction de séquence, des amorces universelles M13 sont ajoutées à l'extrémité 5' de chaque amorce.

2) Extraction des acides nucléiques

L'extraction des ARN de VHC est effectuée à partir de 400µL de plasma à l'aide de l'automate d'extraction I Prep Invitrogen[®] et du kit iPrep[™] PureLink[®] *Virus Kit for sensitive isolation of viral RNA and DNA*. L'élution des extraits d'ARN est faite dans un volume total de 50µL.

3) Amplification de l'ARN par RT-PCR

L'étape de reverse transcription des ARN et la PCR sont effectuées à l'aide du kit de PCR en temps réel One Step PrimeScript[®] (Takara). Quelques modifications sont apportées par rapport aux recommandations du fabricant.

Deux étapes se succèdent :

- une première étape de reverse transcription (étape très rapide ne durant que 10 minutes environ) utilisant la reverse transcriptase PrimeScript RTase[®]. Le mélange réactionnel (*mix*) de 15 µL contient 5 µL d'extrait d'ARN, 1X de tampon, 2,5µM de Random hexamers (Fermantas[®]), 0,1 µg/ µL de T4 Gene 32 (Biolabs[®]) et enfin 0,1 U/µL de *reverse transcriptase* Prime Script RT. L'étape d'hybridation des hexamers s'effectue à 30°C pendant 5 minutes. Suit alors la reverse transcription: 5 minutes à 42°C. Enfin le cycle se termine par une étape de destruction de la *reverse transcriptase* à 95°C pendant 15s puis un refroidissement à 4°C.
- Les 15 µL d'ADNc issu de la *reverse transcriptase* sont alors ajoutés au 15 µL de *mix* de PCR. Les 30 µL de *mix* de PCR contiennent alors: 15 µL d'ADNc, 1X de tampon, les deux amorces sens NS3-1F et NS3-2F à la concentration de 0,4 µM chacune, l'amorce antisens NS3-R à la concentration de 0,8 µM, 0,05U/µL de Taq polymérase (Takara Ex taq TM HS) ayant une activité correctrice 3'→5' exonucléasique (activité de « *proofreading* »).

Les conditions de PCR sont les suivantes : une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes puis 45 cycles : 94°C pendant 15 secondes (dénaturation), 53°C pendant 1 minute (hybridation des amorces), 72°C pendant 1 minute (étape d'élongation). Enfin, les produits de PCR sont maintenus à 4°C.

En cas d'absence d'amplification, une PCR nichée est réalisée en utilisant un *premix* prêt à l'emploi (Premix Ex Taq-Takara[®]). Deux µL du produit de la première PCR sont ajoutés à 23 µL de *mix* de PCR nichée (volume total 25 µL) contenant du *premix* Ex Taq 1X, les deux amorces sens nestNS3-1F et nestNS3-2F à la concentration de 0,4 µM et l'amorce antisens nestNS3-R à la concentration de 0,8 µM.

Les conditions de PCR nichée sont les suivantes : dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, puis 5 cycles : 94°C pendant 30 secondes (étape de dénaturation), 53°C pendant 1 minute (étape d'hybridation des amorces), 72°C pendant 1 minute (étape d'élongation), puis 35

cycles : 94°C pendant 15 secondes, 67°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 30 secondes. Les produits de PCR sont ensuite maintenus à 4°C.

Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide puis colorés dans un bain de bromure d'éthidium à 0,5 mg/L avant visualisation sous UV.

4) Séquençage direct de la protéase NS3

- ***Purification des produits de PCR***

Le séquençage est précédé d'une étape de purification des produits de PCR à l'aide d'une exonucléase et d'une phosphatase (ExoSAP-IT[®] ; SAP=*Shrimp Alkaline Phosphatase*). Un microlitre d'enzymes est ajouté à 5 µL de chaque produit de PCR puis placé dans le thermocycleur : 15 minutes à 37°C (étape d'action des enzymes) puis 15 minutes à 80°C (étape de dénaturation des enzymes).

- ***Réaction de séquence***

La réaction de séquence est ensuite effectuée sur un séquenceur automatisé ABI 3130 (Applied Biosystem[®]) utilisant la technique de Sanger adaptée avec de la fluorescence, permettant une réaction de séquence dans un tube unique. La technologie choisie est celle de Big Dye[®] Terminator version 1.1, en utilisant des amorces sens et antisens universelles M13. L'élongation de chaque produit monobrin se termine par l'incorporation d'un ddNTP spécifique. Chaque ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va permettre de différencier les fluorochromes et donc d'y associer la base correspondante pour définir ainsi la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial.

La technologie Big Dye[®] Terminator utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes reliés entre eux par un linker. Le premier est une

fluorescéine appelée donneur, commun aux 4 ddNTP. Le second est une dichlororhodamine qui joue le rôle d'accepteur.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est alors excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichlororhodamine est différent pour chaque type de ddNTP. Le spectre de fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP.

- ***Purification par chromatographie d'exclusion***

Une chromatographie d'exclusion permet de réaliser une purification des produits de séquençage en utilisant une solution de G50 qui exclut les ddNTP en excès, non fixés. En effet, ces ddNTP libres non incorporés lors de la réaction de séquence peuvent parasiter les signaux de fluorescence spécifiques. Pour cela, la solution de G50 est constituée de billes perforées dont les trous ont un diamètre de 20 à 50µm. Les petites particules de diamètre inférieur à ceux-ci entrent et restent piégées dans ces billes. Les grosses molécules quant à elles passent autour des billes et sont éluées rapidement.

- ***Séquençage sur l'ABI 3130***

Une électrophorèse capillaire en conditions dénaturantes permet de séparer les produits de la réaction de séquence purifiés. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permet alors d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice.

5) Analyse des séquences et recherche des mutations de résistance aux IP

Le logiciel Seqscape[®] permet l'analyse des séquences d'acides aminés et de nucléotides, en comparant la séquence NS3 obtenue pour la souche de VHC du patient à celle d'une souche

de référence sauvage (VHC 1b). D'éventuelles substitutions peuvent donc ainsi être mise en évidence.

L'analyse des mutations est effectuée grâce au logiciel Geno2Pheno[®] HCV V1.0 (Max-Planck-Institute Informatik). Il répertorie l'ensemble des mutations connues, grâce aux études cliniques *in vitro* et *in vivo*, pour entraîner une résistance certaine ou possible au télaprévir et/ou bocéprévir : V36A/G/L/M, Q41R/K/P, F43 C/S/L, T54A/S, V55A, Q80R/K, R109K, R155K/T/G/I/M/S, A156S/T/V et V170 A/T/G.

Les autres mutations recherchées par cet algorithme A87T, R117H, N174F et S138T/D ne sont que rarement retrouvées *in vivo*.

Une réponse au clinicien est faite au titre de la recherche sur la base de l'analyse de Geno2Pheno[®].

Ce séquençage de la région NS3 permet également, en une seule réaction, l'obtention du génotype du VHC. Il représente une alternative au génotypage du VHC, réalisé actuellement en routine dans la région NS5b selon les recommandations de l'ANRS.

III- Résultats de l'étude

A) 1^{ère} partie : Analyse virologique des séquences NS3 et du polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B chez des patients naïfs de traitement par IP

Un génotypage de résistance NS3 a été réalisé chez 151 patients atteints d'hépatite C chronique de génotype 1 afin de rechercher la présence de mutations décrites comme associées à une résistance aux IP, chez des patients naïfs de traitement par bocéprévir et télaprévir.

1) Comparaison du génotypage des souches après séquençage de la région NS3 ou NS5b

Le génotype initialement déterminé dans la région NS5b par la méthode ANRS est ici confirmé dans la région NS3 par la méthode de séquençage utilisée. Les génotypes et sous types concordent pour toutes les souches entre les deux techniques de génotypage.

Sur ces 151 souches de VHC étudiées, 87 sont des souches de génotype 1a (soit 57,6%) et 64 sont des souches de génotype 1b (soit 42,4%).

2) Analyse des mutations de résistance naturelle aux IP

Une recherche de mutations de résistance aux IP est effectuée à partir de la séquence de la région NS3.

La charge virale VHC moyenne au moment du séquençage est de 5,92 log UI/mL (minimum : 2,1 log UI/mL ; maximum : 7,5 log UI/mL).

Le recours à une PCR nichée (*nested PCR*) est nécessaire pour seulement 3 patients (2%). Les charges virales sont <3log UI/mL pour les trois prélèvements concernés.

Sur les 151 patients étudiés, 136 patients (90,1%) ne présentent aucune mutation préexistante au traitement par IP. En revanche, 15 souches de VHC (soit 9,9% des patients) séquencées présentent une ou plusieurs mutations de résistance aux IP.

Les mutations retrouvées parmi les 151 souches étudiées sont les suivantes (Figure 12) : R117H (n=4), R117H+168E (n=1) ; 168E (n=1), 87T (n=1) ; V36L (n=6) ; V55A (n=1) ; V36L+V55A (n=1) .

- **Souches de géotypes 1a :**

Parmi les souches de géotypes 1a (n=87 souches), 89% des patients (soit 77 patients) ne présentent aucune mutation de résistance aux IP.

En revanche 11% des patients infectés par un VHC de géotype 1a (soit 10 patients) présentent au moins une mutation de résistance NS3 préexistante à tout traitement par IP.

Les mutations retrouvées parmi les souches de géotype 1a sont les suivantes : R117H (n=2), 87T (n=1), V36L (n=5), V36L+V55A (n=1), V55A (n=1).

- **Souches de géotypes 1b :**

Parmi les souches de géotypes 1b (n=64 souches), 8% des patients infectés (soit 5 patients) présentent au moins une mutation de résistance NS3 préexistante à tout traitement par IP.

Les autres patients, soit 59 patients (92%) ne présentent aucune mutation de résistance.

Les mutations retrouvées parmi les souches de géotype 1b sont les suivantes : R117H (n=2), R117H+168E (n=1), 168E (n=1), V36L (n=1).

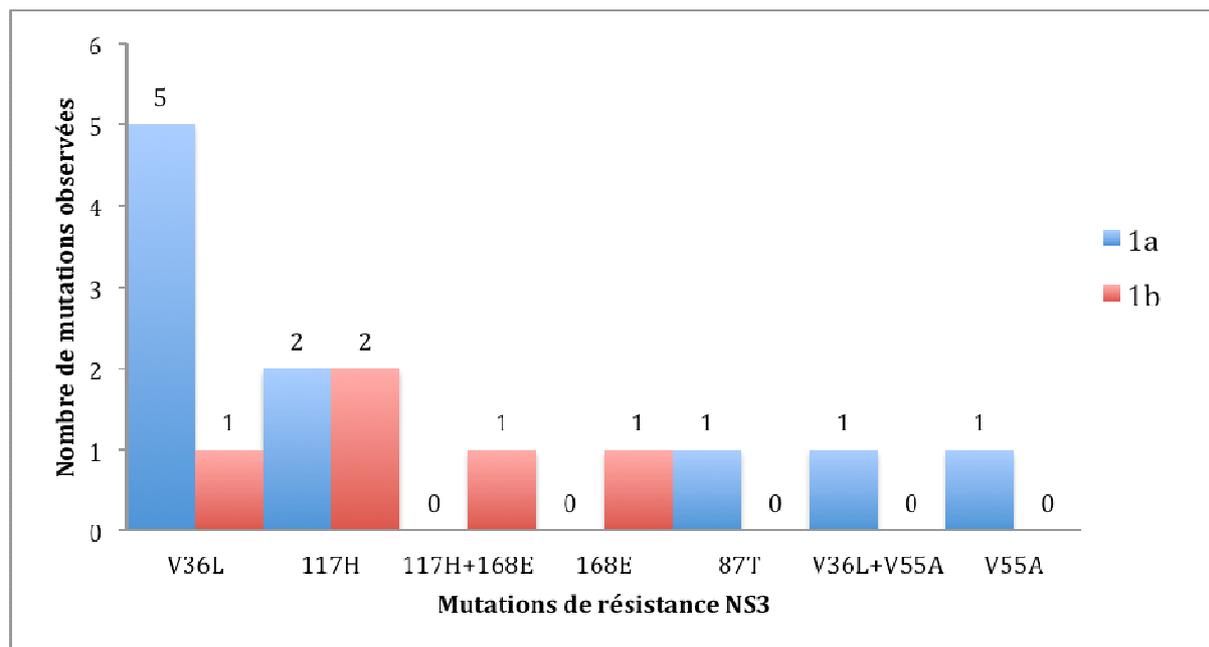


Figure 12. Mutations de résistance NS3 observées parmi 151 souches Nantaises de VHC génotype 1

3) Polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B

Une recherche du polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B a été effectuée par le laboratoire de Génétique Médicale chez 117 patients des 151 patients séquencés en NS3 (Tableau 5):

- 68 patients (58%) présentent le polymorphisme C/T ;
- 35 patients (30%) le polymorphisme C/C
- et 14 patients (12%) le polymorphisme T/T.

Trente quatre patients (23%) n'ont pas bénéficié de recherche du polymorphisme de l'IL28B.

Tableau 5. Polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B

Polymorphisme IL28B	C/C	C/T	T/T
Nombre de patients (n=117) (%)	35 (30%)	68 (58%)	14 (12%)

B) 2^{ème} partie : Suivi clinico-biologique de la cohorte de patients traités par trithérapies anti-VHC

Cette deuxième partie de l'étude repose sur le suivi clinico-biologique des patients au cours de leur traitement par IP, s'intéressant notamment à la réponse virologique, à la tolérance du traitement et à la recherche de mutations de résistance en cas d'échec virologique (EV).

1) Description de la population de la cohorte

Soixante et onze patients atteints d'hépatite C chronique ont débuté un traitement par trithérapie anti-VHC comprenant un inhibiteur de protéase du VHC sur la période avril 2011 à septembre 2012. Le suivi clinique de ces patients est effectué majoritairement dans le service d'Hépatogastro-Entérologie du CHU de Nantes, ainsi qu'en Infectiologie. Le suivi virologique est quant à lui réalisé au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes.

Type de trithérapie utilisée

Concernant l'IP utilisé, 33 patients (46,5%) bénéficient d'une trithérapie comportant le bocéprévir tandis que 38 patients (53,5%) reçoivent du télaprévir (Tableau 7).

Traitement antérieur de l'infection par le VHC

Quinze patients sont naïfs de tout traitement antérieur pour le VHC soit 21,1% des patients inclus. Cela concerne 9 patients sous bocéprévir (27,3% des patients sous bocéprévir) et 6 patients sous télaprévir (15,8% des patients sous télaprévir).

Les autres patients (n=56 patients) ont déjà reçu une ou plusieurs lignes de traitements antérieurs pour le VHC mais n'ayant jamais abouti à une guérison virologique (Tableau 6).

Trente cinq patients (soit 49% des patients de l'étude) ont déjà reçu une thérapie antivirale antérieure mais sont des sujets non répondeurs (répondeurs partiels ou répondeurs nuls).

On compte 17 patients non répondeurs dans le groupe bocéprévir (soit 51,5% des patients traités par bocéprévir) et 18 patients sous téléprévir (soit 47,4% des patients sous téléprévir).

Vingt et un patients (30%) sont rechuteurs à un précédent traitement (7 patients sous bocéprévir et 14 sous téléprévir).

Tableau 6. Traitement antérieur de l'infection VHC

	BOC		TVR	
	N	%	N	%
Patient naïf	9	27,3	6	15,8
Non répondeur	17	51,5	18	47,4
Rechuteur	7	21,2	14	36,8
Total	33	100	38	100

Tableau 7. Description de la population étudiée

Nombre de patients	71	
Sexe (H/F)	49/22	
Age moyen (mini-maxi)	54,1 (34-73)	
Charge virale VHC à J0 (log UI/mL)	6,02 (3,2-7,5)	
Génotype du VHC		
	1a	44 (62%)
	1b	27(38%)
Inhibiteur de protéase utilisé		
	Bocéprévir	33 (46,5%)
	Téléprévir	38 (53,5%)
Traitement VHC antérieur		
	Patient naïf	15 (21,1%)
	Non répondeur	35(49,3%)
	Rechuteur	21 (29,6%)
Fibrose hépatique		
	F0/F1	14 (19,7%)
	F2	15(21,1%)
	F3	10 (14,1%)
	Cirrhose	28 (39,5%) dont 4 patients au stade de CHC
	Non renseigné	4 (5,6%)

Co-infections associées

Cinq patients (soit 7% des patients suivis) sont des patients co-infectés VIH-VHC (Figure 13). Dix neuf patients (26,8%) sont co-infectés VHB-VHC dont 7 étant immunisés après infection VHB.

Un seul patient est co-infecté par les trois virus VIH, VHB et VHC (1,4%).

En revanche, 49 patients (69%) ne présentent aucune co-infection.

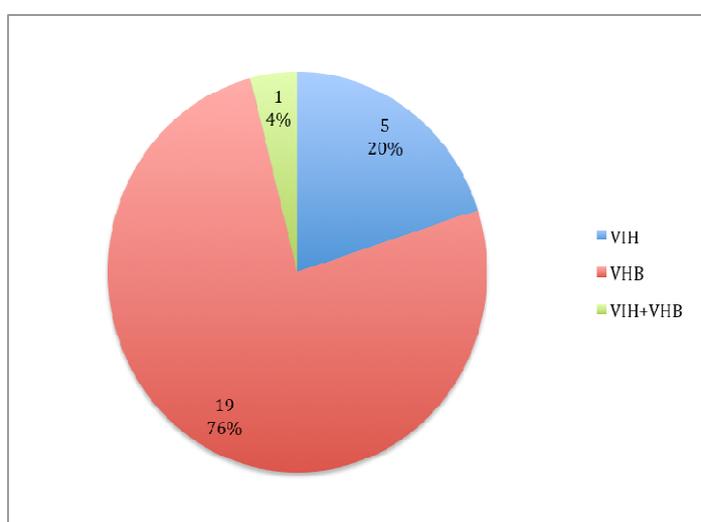


Figure 13. Type de co-infection chez les patients co-infectés (n=25 patients)

2) Détermination du polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B

Une recherche du polymorphisme IL28B a été effectuée chez 30 patients (soit 42,3% des sujets de la cohorte).

La répartition des différents polymorphismes est la suivante (Tableau 8) :

- Huit patients présentent un polymorphisme de type C/C (27%);
- Vingt patients sont C/T (67%);
- Deux patients sont T/T (6%).

Le polymorphisme IL28B n'a pas été exploré pour 41 patients (57,7%).

Tableau 8. Polymorphisme rs 12979860 IL28B en fonction du type d'IP utilisé et de la réponse à un précédent traitement (n=30 patients)

Polymorphisme IL28B	Bocéprévir (n)	Télaprévir (n)	Patients naïfs (n)	Patients non répondeurs (n)	Patients rechuteurs (n)
C/C	3	5	4	3	1
C/T	10	10	5	12	3
T/T	1	1	1	1	0

3) Caractéristiques de l'infection VHC

- **Charge virale avant initiation du traitement antiviral**

La charge virale moyenne initiale à JO est de 6,02 log UI/mL (CV minimale: 3,2 log UI/mL; CV maximale : 7,5log UI/mL).

Les CV VHC sont comparables dans les deux groupes de patients traités par Bocéprévir ou Télaprévir (Tableau 9).

Tableau 9. Charge virale initiale à J0 du traitement

Inhibiteur de protéase	CV moyenne (log UI/mL)	CV minimale (log UI/mL)	CV maximale (log UI/mL)
Bocéprévir (n=33)	5,99	3,2	7,1
Télaprévir (n=38)	6,03	4	7,5

- **Génotype du VHC à partir de la région NS3 et recherche de résistance aux inhibiteurs de protéase**

Le génotype du VHC déterminé initialement dans la région NS5b est confirmé par la technique de séquençage utilisée permettant le génotypage dans la région NS3. Aucune discordance de génotypes, ni de sous types n'a été relevée entre les deux régions étudiées.

Quarante quatre patients sont infectés par un virus de génotype 1a (soit 62% des patients) et 27 patients par un virus de génotype 1b (soit 38% des patients) (Tableau 7 et 10).

Tableau 10. Répartition des génotypes de VHC en fonction de l'IP utilisée: Téléprévir (TVR) ou Bocéprévir (BOC)

Génotype du VHC	TVR	BOC	TVR+BOC
1a	26	18	44
1b	12	15	27

Concernant la recherche de mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase à J0 de l'initiation de la trithérapie antivirale, un seul patient présentait une mutation de résistance NS3: il s'agissait d'une mutation V55A. Les 70 autres patients (98,6%) étudiés dans cette cohorte ne présentaient, à J0 du traitement par trithérapie anti-VHC, aucune mutation connue comme associée à une résistance au téléprévir et/ou bocéprévir.

4) Facteurs de risque de contamination par le VHC

Suite au recueil d'information dans les dossiers cliniques des différents patients de la cohorte, des facteurs de risque de contamination par le VHC sont identifiés pour plus de la moitié des patients.

Douze patients (16,9%) présentent un facteur de risque transfusionnel (existence de transfusion sanguine avant 1992).

Dix neuf patients (26,8%) présentent un facteur de risque parentéral non transfusionnel pour le VHC (antécédent de toxicomanie IV, utilisation de tatouages, piercings, acupuncture ...).

Six patients (8,5%) présentent à la fois un facteur de risque transfusionnel et de risque parentéral non transfusionnel.

Aucun facteur de risque de contamination par le VHC n'a pu être retrouvé sur le dossier clinique informatisé pour 34 patients (soit 47,8% des patients).

5) Stade de fibrose hépatique

Les 71 patients ont bénéficié au cours de leur suivi en Hépatogastro-Entérologie ou en Infectiologie d'une surveillance du stade de fibrose hépatique à l'aide de différents outils, en particulier le fibroscan®.

La valeur moyenne des derniers fibroscan® effectués chez 42 patients de la cohorte est de 15,4kPa (minimum : 4,7kPa ; maximum : 75kPa), ce qui est en faveur d'une moyenne de fibrose avancée dans la population étudiée.

Cinquante patients ont déjà bénéficié d'une ponction biopsie hépatique (soit 70,4% des patients).

Ainsi, 67 patients de la cohorte Nantaise étudiée ont été classés en différents groupes (Tableau 11) :

- Absence de fibrose hépatique ou fibrose minimale (score METAVIR F0-F1) : 14 patients (19,7%)
- Présence d'une fibrose modérée (score METAVIR F2) : 15 patients (21,1%)
- Fibrose sévère (F3) : 10 patients (14,1%)
- Cirrhose hépatique (F4) : 28 patients (39,5%) dont 4 patients présentent un carcinome hépatocellulaire.

Un patient a bénéficié d'une greffe hépatique en raison d'une cirrhose induite par le VHC, associée à un éthylysme chronique. Deux autres patients sont en attente d'un greffon hépatique.

Les données de fibrose hépatique ne sont pas connues pour 4 patients.

Tableau 11. Stade de fibrose hépatique

F0/F1	14 (19,7%)
F2	15(21,1%)
F3	10 (14,1%)
Cirrhose	28 (39,5%) dont 4 patients au stade de CHC
Non renseigné	4 (5,6%)

6) Réponse virologique à la trithérapie

Un suivi régulier des charges virales VHC est régulièrement réalisé chez les patients au cours de leur traitement par trithérapie.

Les valeurs des charges virales VHC sont notamment mesurées à J0 de l'initiation du traitement, à S4 de la trithérapie (soit à S8 du début du traitement pour le BOC en raison des quatre semaines initiale de bithérapie : « phase de *lead-in* »), S8, S12, S24...

- **Réponse virologique rapide (RVR)**

La réponse à S4 de la trithérapie permet d'évaluer la réponse virologique rapide (RVR) définie comme une indétectabilité de la charge virale VHC après 4 semaines de trithérapie.

Quinze patients sont naïfs de tout traitement antérieur pour le VHC. Treize d'entre eux ont obtenu une RVR (soit 86,7% des patients) (Tableau 12).

Parmi les 35 patients non répondeurs à un précédent traitement pour le VHC, 21 d'entre eux ont obtenu une RVR soit 61,8% des patients non répondeurs. On observe un pourcentage de RVR inférieur dans le groupe de patients traités par BOC (RVR=41,2%) que dans le groupe traités par TVR (RVR=82,4%).

Vingt et un patients sont des patients rechuteurs à un ancien traitement antiviral. Dans ce groupe de patients, une RVR est obtenue chez 81% des patients (N=17 patients). La RVR est également moins bonne dans le groupe de patients traités par BOC (41,2%) que dans le groupe de patients traités par TVR (100% des patients rechuteurs traités par TVR obtiennent une RVR).

Globalement, sur les 38 patients traités par TVR, près de 87% d'entre eux obtiennent une réponse virologique rapide (Tableau 13).

Dans le groupe bocéprévir (BOC) (33 patients), 18 d'entre eux (54,5%) présentent une réponse virologique rapide à S4 de la trithérapie (S8 du début du traitement).

Concernant le polymorphisme rs 12979860 de l'IL28B, une RVR est obtenue chez cinq patients de polymorphisme C/C (5/8 patients C/C soit 62,5%), sept patients de polymorphisme C/T (7/20 patients C/C soit 35%) et aucun des patients de polymorphisme T/T (0/2 patients T/T)

Au total, 71,8% des patients, suivis dans cette cohorte et traités par trithérapie comprenant un inhibiteur de protéase du VHC, atteignent une RVR à S4 (Tableau 13).

Tableau 12. Réponse virologique rapide observée en fonction du type de réponse à un précédent traitement

RVR		BOC+TVR		BOC		TVR	
		N	%	N	%	N	%
Patients naïfs	(N=15)	13	86,7	8	88,9	5	83,3
Patients non répondeurs	(N=35)	21	61,8	7	41,2	14	82,4
Patients rechuteurs	(N=21)	17	81	3	42,9	14	100

Tableau 13. Réponse virologique rapide en fonction de l'IP utilisé

RVR		BOC+TVR		BOC		TVR	
		N	%	N	%	N	%
oui		51	71,8	18	54,5	33	86,8
non		20	28,2	15	45,5	5	13,2

Réponse virologique rapide « étendue » ou eRVR

La réponse virologique rapide « étendue » ou eRVR est elle aussi évaluée parmi les patients de cette cohorte : il s'agit d'une virémie, devenue indétectable à S4 de la trithérapie, qui le reste jusqu'à S12 pour le télaprévir et S24 pour le bocéprévir.

Dans le groupe traité par télaprévir, une eRVR est obtenue chez 86,8% des patients (soit 33 patients/38).

Chez les patients traités par bocéprévir, ce pourcentage de eRVR atteint 54,5% des patients de la cohorte (soit 18 patients/33) (Tableau 14).

Globalement, 71,8% des patients traités par IP présentent une réponse virologique rapide « étendue », soit 51 patients sur les 71 de cette étude.

Les résultats de eRVR en fonction du type de réponse à un traitement antérieur sont représentés dans le Tableau 15.

Tableau 14. Réponse Virologique Rapide "étendue" (eRVR) en fonction de l'IP utilisé

eRVR	BOC+TVR		BOC		TVR	
	N	%	N	%	N	%
oui	51	71,8	18	54,5	33	86,8
non	20	28,2	15	45,5	5	13,2

Tableau 15. Réponse Virologique Rapide "étendue" (eRVR) en fonction du type de réponse à un traitement antérieur

eRVR		BOC+TVR		BOC		TVR	
		N	%	N	%	N	%
Patients naïfs (N=15)	naïfs	13	86,7	8	88,9	5	83,3
Patients répondeurs (N=35)	non	21	61,8	7	41,2	14	82,4
Patients rechuteurs (N=21)		17	81	3	42,9%	14	100%

Les deux figures 14 et 15 ci-après représentent le nombre de patients au sein de la cohorte Nantaise pour lesquels la charge virale VHC reste détectable sous TVR ou BOC en fonction du nombre de semaines de trithérapies.

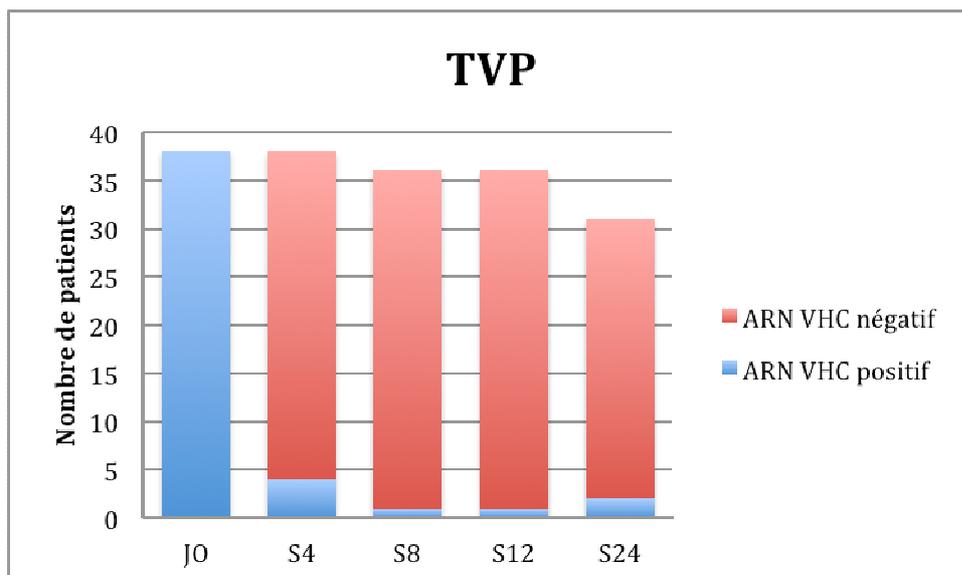


Figure 14. Efficacité virologique du télaprévir (N=38)

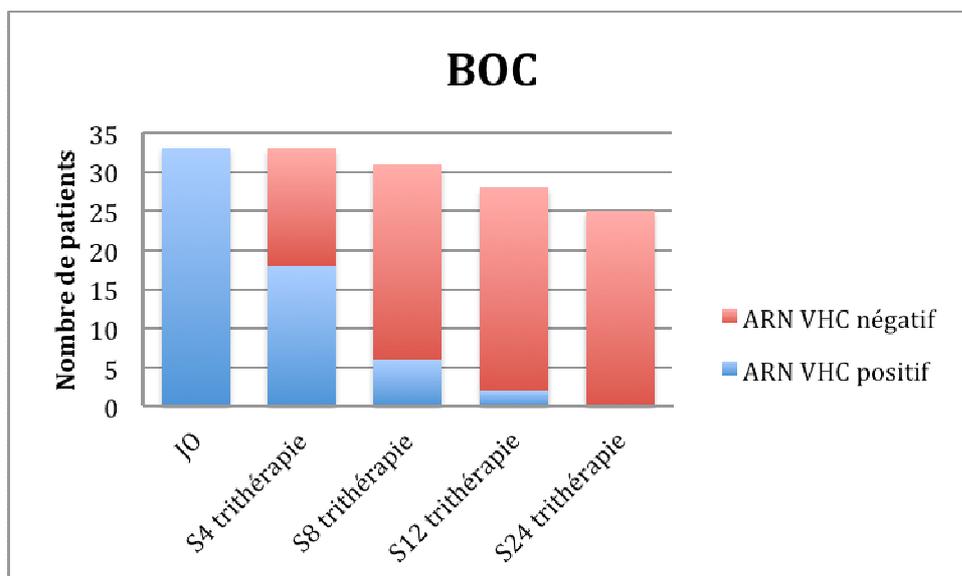


Figure 15. Efficacité virologique du bocéprévir (N=33)

Actualisation des données au 1^{er} avril 2013 :

46 patients ont terminé leur trithérapie anti-VHC avec succès. Trente deux patients ont d’ors et déjà obtenu une RVS (soit plus de 45% des patients de la cohorte). Sur les 5 patients co-infectés VIH/VHC de la cohorte étudiée, trois d’entre eux ont obtenu une RVS.

D’autres RVS seront bientôt observées puisque 14 patients sont en attente du résultat de suivi trois mois après l’arrêt du traitement. Depuis septembre 2012, 29 patients ont démarré une trithérapie anti-VHC.

7) Interruptions de traitement

Quinze interruptions de trithérapies ont été observées au cours de cette étude, représentant 21,1% des traitements par trithérapies anti-VHC.

Un premier patient a dû interrompre son traitement en raison d'une réactivation de sa co-infection virale VHB. Cette réactivation est apparue sous bocéprévir, après environ 3 mois de traitement (65).

Quatre patients ont stoppé leur traitement en raison d'une intolérance médicamenteuse à la trithérapie :

- un patient est décédé au cours du traitement par TVR. Une enquête de pharmacovigilance a été effectuée et l'imputabilité de la trithérapie dans ce décès reste douteuse.
- deux toxidermies généralisées ont été observées chez deux patients sous TVR, obligeant l'arrêt immédiat du traitement antiviral.
- enfin, un dernier patient a été contraint d'arrêter la trithérapie anti-VHC en raison d'une anémie sévère secondaire à l'utilisation de l'IP (bocéprévir dans ce cas) et à la ribavirine.

8) Analyse des échecs virologiques

- *Description des patients*

Les échecs virologiques concernent 11 patients traités par trithérapies soit 15,5% des patients de cette cohorte. Il s'agit de 7 hommes pour 4 femmes. L'âge moyen des patients en situation d'échec virologique est de 53 ans (Tableau 16).

Six patients en situation d'échec virologique sont traités par bocéprévir (soit 18,2% des patients traités par BOC) et 5 patients par télaprévir (N=5) (soit 13,2% des patients traités par TVR).

Concernant l'infection virale VHC, la charge virale moyenne réalisée à J0 du traitement est de 6,02 log UI/mL. Celle-ci est comparable à la charge virale moyenne de la cohorte de patients suivie dans cette étude.

Six patients en situation d'échec virologique sont infectés par un virus de génotype 1a et les 5 autres par un virus de génotype 1b. Aucun de ces patients n'est co-infecté par le VIH.

Une recherche du polymorphisme IL28B a été demandée pour 7 de ces 11 patients en situation d'EV : un patient est de polymorphisme C/C ; 4 patients présentent le polymorphisme C/T et 2 autres le polymorphisme T/T.

Deux patients sont des patients naïfs de tout traitement antérieur pour le VHC tandis que les 9 autres patients ont déjà reçu un ou plusieurs traitements par IFN/ribavirine: 7 d'entre eux sont des patients non répondeurs alors 2 patients sont rechuteurs à ce précédent traitement.

Huit patients sont des patients cirrhotiques (stade METAVIR F4) dont l'un est au stade de carcinome hépato-cellulaire. Les autres patients, en échec virologique, se répartissent de la façon suivante : deux ont une fibrose hépatique modérée (stade F2) et un autre une fibrose hépatique sévère (stade F3).

Tableau 16. Echecs virologiques observés sous BOC et TVR

Nombre de patients	11 (14,1%)
Sexe (H/F)	7/4
Age moyen (minimum-maximum)	53 (40-62)
CV VHC J0 (log UI/mL)	6,02 (5-6,8)
Génotype VHC	
1a	6 (54,5%)
1b	5 (45,5%)
Inhibiteur de protéase utilisé	
Bocéprévir	6 (54,5%)
Télaprévir	5 (45,5%)
Traitement VHC antérieur	
Patient naïf	2 (18,2%)
Non répondeur	7 (63,6%)
Rechuteur	2(18,2%)
Fibrose hépatique	
F0/F1	0
F2	2 (18,2%)
F3	1 (9,1%)
Cirrhose	8 (72,7%) dont 1 patient au stade de CHC

- ***Génotypage de résistance NS3 des patients en échec***

- **Génotypage de résistance à JO de la trithérapie**

Un seul des 11 patients en situation d'échec virologique présente une mutation de résistance aux IP dès J0 : il s'agit d'une mutation V55A.

Chez les dix autres patients, aucune mutation de résistance n'est retrouvée à J0.

- **Génotypage de résistance NS3 chez les patients en situation d'échec virologique**

Suite aux échecs virologiques, un génotypage de résistance NS3 est renouvelé.

Le génotype de résistance NS3 chez ces patients retrouve alors les mutations suivantes :

- Parmi les patients traités par TVR, quatre souches de génotypes 1a présentent les profils suivants de résistance : V36M+R155K (n=2), R155K (n=1) et V55A (retrouvée initialement dès J0) +V36M+R155K (n=1). Une souche de génotype 1b présente un profil V36A/V.
- Parmi les patients sous BOC, on retrouve 4 souches de génotype 1a aux profils V36M+R155K (n=3), R155T (n=1) et 2 souches de génotype 1b aux profils T54S (n=1) et T54T/A (n=1).

- ***Type d'échec virologique et son délai d'apparition au cours du traitement***

Trois de ces échecs sont des rechutes post-traitement de 48 semaines apparus respectivement à S60, S70 et S128 post-initiation de la trithérapie, soit respectivement 12 semaines, 22 semaines et 76 semaines après la fin du traitement.

Le premier patient est un patient traité par télaprévir, rechuteur à un précédent traitement en 2009 par bithérapie pégylée. Il s'agit d'un virus de génotype 1a. Le patient présente une cirrhose hépatique au moment de l'initiation du traitement antiviral. Une RVR et eRVR ont été observées au cours du traitement. La trithérapie antivirale est arrêtée à S48 avec un ARN du VHC indétectable. Malheureusement, une rechute est observée lors du contrôle de la CV VHC, 3 mois après l'arrêt du traitement à S60. Le génotypage de résistance alors réalisé retrouve la mutation R155K.

Le deuxième patient rechuteur a été traité par bocéprévir. Ce patient, non répondeur à un précédent traitement par bithérapie pégylée de septembre 2006 à juillet 2007, lui aussi au stade de cirrhose au moment de l'instauration de la trithérapie, est infecté par un virus de génotype 1a.

Une réponse tardive à la trithérapie est observée puisqu'à S4 de la trithérapie, la charge virale VHC reste toujours détectable à 2log UI/mL (absence de RVR). L'ARN du VHC reste détectable mais non quantifiable à S8. La durée de traitement est alors de 48 semaines avec une CV indétectable à S48.

Cependant, une rechute a été observée 6 mois environ après l'arrêt du traitement (S70). Le génotypage de résistance alors réalisé retrouve un profil de résistance V36M+R155K.

La troisième rechute post-trithérapie anti-VHC comprenant le bocéprévir est un échec tardif observé chez un homme rechuteur à un précédent traitement, ayant bénéficié d'une transplantation hépatique en mai 2012 pour CHC. Une eRVR sous traitement a été obtenue et la CV VHC a été indétectable à S48. Malheureusement, une reprise de la réplication est observée 7 mois après la greffe hépatique. Le génotypage de résistance alors réalisé retrouve la mutation R155K.

Quatre échappements virologiques ont été observés parmi les 11 échecs virologiques sous traitement. Les échappements virologiques sont alors observés aux semaines de traitement S28, S24, S20 et S19. Les génotypage de résistance NS3 alors réalisés montrent respectivement des profils : T54S ; V36A/V ; V55A/V36M/R155K ; V36M/R155K. Les patients concernés par ces échappements sont des patients sous bocéprévir pour un d'entre eux (échappement à S28) et télaprévir pour les trois autres. Trois d'entre eux ont été non

répondeurs à un précédent traitement par bithérapie pégylée standard tandis que le dernier patient est naïf de tout traitement.

Un seul de ces patients présente, dès J0 de l'instauration de la trithérapie comprenant du télaprévir, la mutation V55A. Il s'agit d'une femme infectée par une souche de génotype 1a, au stade de cirrhose et présentant des varices oesophagiennes. La patiente est naïve de traitement antérieur pour le VHC. Chez cette patiente, le génotypage de résistance a permis de mettre en évidence une accumulation de mutations de résistance. Le télaprévir est arrêté à la 12^{ème} semaine de traitement et la bithérapie poursuivie. Devant l'échappement virologique, un deuxième génotypage de résistance est alors réalisé. Il retrouve l'association de mutations de résistance V36M+V55A. Du fait de l'augmentation continue des CV VHC, malgré le maintien de la bithérapie, un arrêt complet du traitement est décidé à S20 de l'initiation de la trithérapie. La charge virale VHC mesurée est alors de 5,3 log UI/mL. Les mutations V55A+V36M+R155K sont alors retrouvées lors du dernier génotypage de résistance réalisé (S20).

Enfin, quatre patients sont des patients non répondeurs à la trithérapie, n'ayant jamais obtenu un ARN du VHC indétectable. Un d'entre eux a été traité par télaprévir et les trois autres par bocéprévir. Les profils de résistance retrouvés (recherchés aux semaines de trithérapie S4; S16 ; S12 ; S16) sont respectivement les suivants : V36M/R155K ; V36M/R155K ; V36M/R155K ; et T54A/T. Trois d'entre eux sont des patients rechuteurs à un précédent traitement antiviral et un autre est naïf de tout traitement antérieur.

DISCUSSION

L'hépatite C concerne actuellement environ 3% de la population mondiale et représente une des premières causes de cirrhose et carcinome hépato-cellulaire.

Jusqu'à récemment, le traitement de l'hépatite C chronique était basé exclusivement sur une bithérapie comprenant de l'interféron alpha pégylé et de la ribavirine (2,66). La disponibilité récente de nouveaux antiviraux d'action directe, comme le télaprévir et bocéprévir, constitue une révolution dans le traitement de l'hépatite C.

Hépatite C et Génétique :

Des études génétiques d'association pangénomiques ont permis d'identifier en 2009 des polymorphismes génétiques (SNP) en amont du gène codant pour l'IL 28B, dont le polymorphisme rs12979860. Cette variabilité génétique est un puissant facteur prédictif de la réponse virologique au traitement par IFN alpha pégylé et ribavirine (33). Le poids statistique de ce paramètre est apparu similaire à celui du génotype viral. Ainsi, les patients présentant un polymorphisme IL28B en position rs 12979860 de type C/C obtiennent un meilleur taux de guérison après bithérapie que les patients C/T ou T/T (33,34).

Dans ce contexte, une étude a été menée au CHU sur la détection du polymorphisme du gène de l'IL28B et a été associée à la constitution d'une bibliothèque de prélèvements de 151 patients infectés par un VHC de génotype 1, naïfs de traitement antérieur par IP.

Une recherche du polymorphisme rs12979860 IL28B a été effectuée chez 77% de ces 151 patients. Au sein de la cohorte Nantaise, 58% des patients ont un profil C/T, 30% C/C et 12% T/T.

Cette répartition correspond à celle observée dans les études effectuées chez des patients Européens. L'étude de Ge et al. retrouve 11,7% de patients T/T, 49,7% de patients C/T et 38,6% de patients C/C (33). L'intérêt de la détermination du polymorphisme IL28B dans les trithérapies anti-VHC reste plus limité que pour les bithérapies pour prédire l'efficacité du traitement antiviral (23). Il donne néanmoins une indication au clinicien pour orienter son choix vers une bithérapie ou d'emblée vers une trithérapie. En effet, en cas de facteurs de

bonne réponse (IL28B C/C et fibrose hépatique < F3), le bénéfice apporté par la trithérapie paraît plus faible (télaprévir) ou absent (bocéprévir) (23).

Dans notre étude, aucun lien n'a pu être établi entre ces différents polymorphismes et la présence de mutations naturelles de résistance aux inhibiteurs de protéase.

Concernant la cohorte de 71 patients sous trithérapie anti-VHC, 30 d'entre eux ont bénéficié de la recherche du polymorphisme IL28B. La répartition était la suivante : 27% de patients C/C ; 67% de patients C/T et 6% de patients T/T. De nouveau, il est observé une prédominance de polymorphisme C/T et une minorité de polymorphisme T/T associé à une moins bonne réponse à la bithérapie pégylée, comme décrit dans la littérature pour les patients d'origine européenne (33). Même si la réponse à trithérapie semble meilleure chez les patients présentant un polymorphisme C/C (RVR obtenue chez 62,5% des patients) par rapport à ceux ayant un polymorphisme C/T et T/T (respectivement 35% et 0% de RVR) dans cette étude, ces résultats devront être confirmés sur une plus large cohorte en raison des faibles effectifs (8 patients C/C, 20 patients C/T et seulement 2 patients T/T).

La résistance en Virologie :

Jusqu'à présent, aucune sélection de variants viraux résistants n'avait été décrite avec l'utilisation de la bithérapie standard dans le traitement de l'hépatite C (action immunomodulatrice) (67).

Les études menées et la connaissance du cycle de multiplication du VHC (modèle de culture *in vitro*) ont permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et l'avènement récent d'un nombre important de nouveaux antiviraux d'action directe, ciblant l'une ou l'autre des différentes étapes du cycle de réplication du virus. Parmi eux, les inhibiteurs de protéase NS3 du VHC sont les premiers, et actuellement les seuls, à avoir l'AMM en France (14).

L'utilisation de ces nouvelles trithérapies anti-VHC, comprenant un IP du VHC associé à la bithérapie pégylée de référence, représente une révolution dans le traitement de l'hépatite C (40,42).

Cependant, l'utilisation des antiviraux d'action directe s'associe à un risque de résistance des souches virales : concept nouveau en Hépatologie. En effet, le taux de réplication élevé du VHC associé à la faible fidélité de l'ARN polymérase ARN dépendante NS5B virale conduit à la production continue de variants viraux dits quasi-espèces du VHC (47).

Parmi eux, certains variants possèdent des mutations altérant la conformation du site de fixation des inhibiteurs de protéase NS3. Au cours de la thérapeutique antivirale, ces variants préexistants au traitement peuvent être sélectionnés et devenir la quasi-espèce prédominante ; ce phénomène peut alors altérer l'efficacité de la trithérapie anti-VHC et empêcher l'obtention d'une RVS.

- **Variants viraux préexistants possédant des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase du VHC**

La mise en évidence de ces variants résistants aux IP, chez des patients devant être traités par ces antiviraux, présente donc un réel intérêt (génotypage de résistance à J0). Cet outil permet également de détecter l'émergence d'une quasi-espèce virale résistante en cas d'échec virologique sous trithérapie anti-VHC (génotypage de résistance en cas d'échec virologique).

L'application de la technique innovante de génotypage de résistance NS3 par séquençage, mise au point récemment au laboratoire du CHU de Nantes (59), a permis tout d'abord d'évaluer la prévalence des mutations de résistance naturelle aux IP parmi une cohorte de 151 patients infectés par le VHC de génotype 1 suivis au CHU de Nantes, naïfs de traitement antérieur par IP (cohorte issue de l'étude IL28B). Cette cohorte est représentative de la répartition 1a et 1b en terme de sous types de VHC puisque 87 patients sont infectés par un VHC de génotype 1a et 64 patients par une souche de génotype 1b (29).

Comme démontré auparavant (59), cette nouvelle technique de séquençage est fiable et robuste puisqu'elle a permis une amplification de toutes les souches de VHC étudiées avec un recours à une PCR « nichée » (*nested PCR*) dans seulement trois cas (2% des PCR) : il s'agit de patients présentant une charge virale faible <3log UI/mL. Les autres charges virales VHC sont globalement élevées au moment du génotypage de résistance (CV VHC moyenne = 5,92 log UI/mL).

Le faible recours à la PCR « nichée » représente un avantage de cette technique. Celle-ci permet d'augmenter la sensibilité de la technique, notamment en cas de charge virale VHC faible. Cependant, elle possède aussi quelques inconvénients. Elle augmente le risque de contamination des produits de PCR, peut amener à sélectionner et amplifier une certaine

population virale et non pas l'espèce virale majoritaire ; enfin, elle allonge considérablement la durée de la technique de génotypage utilisée.

Les données cumulées de l'étude prospective sur 481 souches virales (de génotypes 1 à 7) de séquençage de NS3 en parallèle de NS5b avec celles de notre étude (sous type 1a et 1b) permettent de valider le changement de NS5b à NS3 pour la technique de génotypage du VHC à J0 ou au bilan initial. L'avantage est d'avoir avec une seule technique deux informations complémentaires pour le démarrage d'un traitement : le génotype et l'analyse des mutations de résistance NS3. Cette technique de génotypage a été diffusée au sein de l'ANRS.

Les données sur les résistances sont issues des essais *in vitro* et des essais de phase I (monothérapie), ainsi que des cas d'échecs issus des études de phase II et III. Il est bien établi que la barrière génétique des IP anti-VHC est faible (une seule mutation est susceptible d'entraîner la résistance). L'outil Geno2pheno VHC 1.0 a été construit sur la base de l'ensemble des mutations rapportées dans toutes ces études. Il considère toutes les mutations comme ayant un impact identique sur l'efficacité thérapeutique. Des études *in vitro* ont cependant montré un gradient d'impact de ces mutations (mutations de résistance de bas niveau et de haut niveau). Parmi celles-ci, à noter que certaines mutations comme la R117H et A87T n'ont été décrites jusqu'alors qu'*in vitro* et non *in vivo* en cas de reprise de la réplication virale sous IP (47).

Les questions suivantes peuvent se poser :

Quel est l'impact réel de ces mutations décrites sur l'efficacité *in vivo* ?

D'autres mutations peuvent-elles émerger au sein des cohortes de patients?

Parmi les 151 patients étudiés, moins de 10% présentent une ou plusieurs mutations de résistance « naturelles » aux IP.

Aucune mutation connue pour entraîner un haut niveau de résistance au télaprévir et/ou bocéprévir (A156V/T ou V36 A/M associée à R155K/T (50)) n'a été retrouvée parmi cette cohorte Nantaise préalablement au traitement par trithérapie.

Dans la précédente étude du laboratoire (59) sur des prélèvements de 63 patients infectés par un VHC de génotype 1, la prévalence des mutations de résistance aux IP retrouvée était de 19% (12 souches). Cette prévalence était supérieure à celle obtenue lors de l'analyse dans les

banques de données de 374 souches de référence de génotype 1, pour lesquelles seules 8% des souches présentaient une ou plusieurs mutations de résistance préexistantes.

Cette différence n'était statistiquement significative que pour les souches de génotypes 1b : en effet, 25% de souches Nantaises initialement étudiées présentaient au moins une mutation de résistance aux IP (soit 7 souches parmi les 28 G1b) contre 8% seulement des souches G1b de référence (19/229 souches G1b).

Ce taux de mutation de résistance primaire était également supérieur à celui observé dans d'autres études (de 4,9% à 13,4% parmi les génotypes 1b) (57,58,68). Une des hypothèses émises lors de cette précédente étude prospective était l'éventuelle existence d'un cluster de souches présentant un polymorphisme particulier, coïncidant avec une surincidence de codons mutés.

Cette prévalence élevée des résistances naturelles aux IP n'est pas confirmée sur cette plus large cohorte de 151 patients : seulement 9,9% des patients infectés par un VHC de génotype 1 présentent une ou plusieurs mutations naturelles associées à la résistance aux IP (soit 11% des souches G1a et 8% des souches G1b étudiées).

Nos travaux se sont poursuivis par l'étude d'une cohorte de patients porteurs chroniques du VHC chez qui une trithérapie a été débutée au cours de la période avril 2011 à mai 2012.

Un génotypage de résistance NS3 a été effectué chez tous ces patients avant l'initiation de la trithérapie (J0). Certains de ces patients font partie de la cohorte de 151 patients étudiés lors de la première partie de notre étude.

La technique de génotypage utilisée a de nouveau montré sa fiabilité puisque toutes les souches étudiées ont pu être amplifiées et séquencées sans l'aide de la PCR « nichée » ; de plus, le génotype et sous type du VHC concordent pour tous les patients avec la précédente détermination initiale dans la région NS5b.

Parmi les 71 patients sous trithérapie, un seul patient (soit 1,4% des patients de la cohorte) présente à J0 du traitement une mutation de résistance aux IP. Il s'agit de la mutation V55A décrite comme associée à une résistance au bocéprévir *in vivo*. Cette mutation, moins souvent retrouvée que les mutations V36M et A156S/T (les plus souvent retrouvées), est tout de même décrite dans les études de phase II et III (Sprint 1 et Sprint 2) s'intéressant au bocéprévir (69).

Nous constatons que la prévalence des mutations de résistance naturelle aux IP à JO du traitement est nettement plus faible dans cette cohorte de patients traités par IP, que dans la précédente cohorte étudiée de 151 patients.

Une hypothèse envisagée est que la connaissance par le clinicien de mutations de résistance naturelle aux IP avant traitement (répondues au titre de la recherche), les ait freinés dans l'instauration de la trithérapie, lorsque le traitement pouvait être décalé.

A noter que ce faible pourcentage de variants résistants préexistants aux traitements par IP est également retrouvé dans les différentes études cliniques s'intéressant au télaprévir et bocéprévir, témoignant de l'hétérogénéité des données à ce sujet (54,56,70).

- **Mutations de résistance en cas d'échec virologique sous trithérapie**

Dans notre cohorte de patients traités, nous avons observé onze arrêts de la trithérapie en raison d'un échec virologique, représentant environ 15,5% des traitements instaurés. Le nombre d'échecs virologiques sous télaprévir (n=5) et sous bocéprévir (n=6) est comparable. Moins d'échecs virologiques sont observés chez les patients infectés par un VHC de génotype 1a (n=6 patients, soit 13,6% des patients génotype 1a) que chez ceux infectés par un génotype 1b (n=5 patients, soit 18,5% des patients génotype 1b).

- **Echec virologique sous télaprévir**

Les mutations retrouvées lors des échecs virologiques sous TVR sont les suivantes : R155K chez un rechuteur à S60 du début du traitement ; V36A/V, V55A/V36M/R155K, et deux fois le profil V36M+R155K parmi des patients non répondeurs. L'impact clinique de la mutation V55A, présente dès J0 chez une patiente, devra être confirmé lors de futures études.

Ces mutations correspondent aux mutations décrites dans les études cliniques du télaprévir. En effet, l'étude ILLUMINATE (71) a retrouvé environ 7% d'arrêt précoce du traitement antiviral chez les patients traités par télaprévir liés à un échec virologique. Mais rappelons que dans cette étude n'étaient inclus que des patients naïfs de traitement antérieur.

Dans l'étude PROVE 2 (72), étude de phase II évaluant le télaprévir chez 334 patients naïfs atteints d'hépatite C chronique de génotype 1, 81 patients ont reçu la trithérapie télaprévir et bithérapie standard pendant 12 semaines puis 12 semaines de bithérapie (groupe T12PR24). Parmi eux, quatre échappements ont été observés au cours du traitement antiviral et 8 rechutes sur 57 patients (soit 14% des patients du groupe T12PR24) ayant terminé leur traitement avec succès. Les quatre patients échappeurs à la trithérapie présentent tous des mutations entraînant un haut niveau de résistance au télaprévir : V36M+ R155K (n=3) et A156T (n=1). Parmi les rechuteurs, 4 patients montrent des mutations de résistance de bas niveau au télaprévir : V36A/M (n=2) ; T54A (n=1) ; A156S (n=1) et 3 patients des résistances de haut niveau : V36M+R155K (n=3). En revanche, un dernier patient rechuteur ne présente aucune mutation de résistance associée au télaprévir.

Une analyse des données issues des différentes études de phase III du télaprévir (52) a permis d'évaluer les différentes mutations de résistance aux IP les plus souvent retrouvées parmi les patients n'ayant pas obtenu une RVS (rechute et échecs virologiques sous traitement). Les mutations V36M/A/L, T54A/S, R155K/T et A156S/T sont les plus fréquentes. Ces souches résistantes émergent chez la majorité des patients qui n'obtiennent pas de RVS.

○ **Echec virologique sous Bocéprévir**

Les mutations de résistance retrouvées dans la cohorte Nantaise en cas d'échec de traitement sous bocéprévir sont: V36M+R155K chez un patient rechuteur à S70 du début du traitement, R155T chez un patient rechuteur après greffe hépatique, T54S, T54A/T, deux fois l'association V36M+R155K chez des patients non répondeurs.

Pour le bocéprévir, l'analyse des études de phase III (SPRINT-2 et RESPOND-2) a permis de décrire les mutations de résistance aux IP les plus souvent retrouvées chez les patients n'ayant pas obtenu de RVS (73). Les mutations les plus fréquentes sont les suivantes : V36M, T54S, V55A, A156S, I/V170A, R155K.

Nos données sont en adéquation avec celles retrouvées dans ces études.

- **Impact du traitement antiviral antérieur sur l'émergence de résistance :**

Le type de réponse à une précédente thérapie semble avoir une importance sur la réponse à la trithérapie. L'émergence de variants résistants au télaprévir est plus fréquente chez les patients répondeurs nuls que chez les patients répondeurs partiels et les rechuteurs (70).

Ceci n'est pas surprenant puisque les patients répondeurs nuls sont par définition des patients n'ayant pas obtenu une baisse de plus de 2 log de la CV VHC à S12 de la précédente bithérapie par IFN alpha pégylé et ribavirine. Dans ce contexte, l'association d'une réponse immunomodulatrice insuffisante et d'une faible barrière génétique des IP est à l'origine de l'échec virologique avec émergence de résistances.

Cette observation se retrouve au sein de la cohorte Nantaise puisque sur les onze patients en situation d'échec virologique, sept d'entre eux sont des patients non répondeurs (répondeurs nuls et répondeurs partiels) contre deux patients rechuteurs et deux patients naïfs.

- **Impact du génotype sur l'émergence de résistance :**

Le génotype du VHC intervient également sur la fréquence et le type de mutations de résistance retrouvées dans les études cliniques des IP.

Avec les génotypes 1a, les mutations V36M et R155K seules ou en combinaison sont majoritaires, alors que chez les génotypes 1b, ce sont les variants V36A, T54A/S et A156S/T (70).

Parmi les sujets traités par TVR dans l'étude REALIZE, l'échec virologique était plus fréquemment observé chez les patients infectés par un virus de génotype 1a (24%) que par un génotype 1b (12%) (70).

Ces observations avec le TVR existent également pour le BOC : dans les études de phase III, les variants résistants sont détectés plus fréquemment chez les patients G1a versus G1b et les taux de RVS sont également plus faibles chez les patients G1a versus G1b (74).

Ces observations peuvent en partie s'expliquer par une barrière génétique de résistance plus haute chez les souches G1b versus G1a. Chez les génotypes 1a, les substitutions d'acides

aminés aux positions 36 (V36M) et 155 (R155K) ne requièrent qu'un seul changement de nucléotides contre deux changements nécessaires chez les G1b (75).

Une fréquence de mutations plus importante chez les patients G1a n'est pas retrouvée dans la cohorte Nantaise. Ceci est peut être dû à l'effectif de la cohorte (71 patients) avec par conséquent un faible nombre d'échec virologiques (n=11), certains patients n'ayant de plus toujours pas terminé leur traitement antiviral à ce jour. Enfin, toutes les données de RVS ne sont pas encore disponibles. En revanche, les mutations de résistance sont de plus haut niveau pour les souches de géotypes 1a.

- **Impact du moment de survenue de l'échec virologique sur l'émergence de résistance**

Le stade du traitement où survient l'échec virologique a également un impact.

Dans l'étude REALIZE, quand l'échec virologique apparaissait pendant la phase de bithérapie par IFN pégylée et ribavirine (relais des 12 semaines de trithérapie), celui-ci était associé à des variants résistants préalablement décrits pour les géotypes G1a (le plus souvent V36M et R155K) alors que pour les géotypes 1b, certains virus sont considérés comme « sauvage » à l'échec (70). Dans ces derniers cas, s'agit-il d'un problème d'observance ou de mutations de résistance non préalablement décrites ?

Les échecs virologiques pendant la phase de trithérapie seraient principalement associés à des variants résistants de haut niveau. En l'absence de pression antivirale exercée par l'IP, les variants viraux de haut niveau de résistance sont moins sélectionnés car les variants de bas niveau, au fitness plus important, sont favorisés (70).

Cette observation de l'étude REALIZE n'est que partiellement confirmée dans la cohorte : un échec virologique ayant eu lieu sous téléprévoir pendant la phase de trithérapie (échec à S4 du début du traitement) est bien associé à une résistance de haut niveau : V36M+R155K mais cette association de mutations de résistance est également observée chez deux patients non répondeurs à S19 et S20 du début de la trithérapie, donc pendant la phase de bithérapie par IFN alpha pégylé/ribavirine.

Cependant, deux autres patients ayant échoué pendant la phase de bithérapie (S24) ou rechuté post-traitement (S59 du début du traitement) montrent des résistances de bas niveau (V36A/V et R155K respectivement).

Le génotypage de résistance réalisé à J0 de l'initiation du traitement ou en cas d'échec virologique sous IP a permis d'évaluer la prévalence et le type de mutations de résistance retrouvée au sein de cette cohorte Nantaise. L'algorithme de résistance utilisé pourra être affiné si de nouvelles mutations sont identifiées dans cette cohorte. L'intérêt du génotypage de résistance dans l'infection par le VHC reste un sujet de discussion. En effet, contrairement à l'infection par le VHB et le VIH, l'existence de réservoir viral dans l'infection par le VHC n'est pas établie, donc il n'existe pas de possibilité d'archivage des mutations. A ce jour, aucun des patients de la cohorte, en échec à la trithérapie, n'a été retraité par la même thérapeutique. Mais la connaissance de ces mutations de résistance permettra d'évaluer leur impact en cas de nouveau traitement comprenant un IP. De plus, ce génotypage de résistance permet d'apporter au clinicien une information supplémentaire au génotype viral, pour un même coût.

Suivi de la cohorte de patients sous inhibiteurs de protéase du VHC

La majorité des patients ont été prétraités par IFN alpha pégylé et ribavirine (ou IFN seul). Seuls 21,1% des patients de la cohorte sont naïfs de tout traitement antérieur.

Chez les malades de génotype 1, en échec thérapeutique après bithérapie pégylée, un nouveau traitement par cette même bithérapie permet d'obtenir un taux de RVS de 23% chez les rechuteurs et de seulement 6% chez les non répondeurs (38).

Chez ces patients, la trithérapie anti-VHC présente un réel gain pour les patients. Elle permet d'accroître significativement le taux de réponse virologique soutenue par rapport à la bithérapie : gain de RVS d'environ 30%, toutes populations confondues (41,43).

La majorité des patients (69%) ne présente aucune co-infection virale. L'objectif du traitement est l'obtention d'une réponse virologique soutenue (RVS), synonyme d'éradication virale avec diminution du risque de développement de fibrose hépatique et par conséquent de carcinome hépato-cellulaire.

○ **Influence de la fibrose hépatique sur l'efficacité des trithérapies**

D'un point de vue histologique, presque 40% des patients de la cohorte sont au stade de cirrhose hépatique (score METAVIR F4) dont 4 patients au stade de carcinome hépatocellulaire. Quatorze pourcents des malades présentent une fibrose hépatique sévère (score METAVIR F3). Chez ces malades, il est recommandé d'initier rapidement la trithérapie anti-VHC (23).

Les chances d'obtenir une RVS sous trithérapie anti-VHC, dans ce groupe de patients, sont plus faibles que chez les malades ayant une fibrose hépatique moindre. En effet, le stade de fibrose apparaît dans les études cliniques comme étant un puissant facteur prédictif de RVS. Chez les patients naïfs de traitement antérieur, l'étude ADVANCE a montré que le pourcentage de RVS était plus faible chez les malades F3-F4 traités par téléprévir, que les malades F0-F2 (62% versus 78%) dans le bras TVR 12PR (42).

De même, dans l'étude SPRINT-2 (40), la RVS était plus fréquente en l'absence qu'en présence d'une fibrose F3-F4 (67% versus 52% dans le bras BOCPR48).

Les mêmes observations ont été effectuées dans les études cliniques s'intéressant aux patients déjà traités pour leur infection VHC. Le stade de fibrose hépatique apparaît comme étant le deuxième facteur prédictif de réponse à la trithérapie, après le profil de réponse antérieur au traitement dans les études REALIZE et RESPOND-2.

Dans l'étude REALIZE (43), les résultats globaux en termes de RVS dans les bras trithérapie sont de 74% chez les malades F0-F2, 66% en cas de fibrose F3 et 47% en cas de cirrhose. Chez les malades rechuteurs, le stade de fibrose n'a pas d'impact sur la RVS. En revanche, le poids de la fibrose hépatique sur la RVS est majeur chez les répondeurs partiels (F0-F2 : 72% ; F3 :56% ; F4 :34%) et chez les répondeurs nuls (F0-F2 : 41% ; F3 : 39% ; F4 :14%).

Dans l'étude RESPOND-2 (41), la fibrose influence également la RVS qui varie dans les bras trithérapie entre 66 et 68% chez les malades ayant des lésions de fibrose F0-F2 versus 44% à 68% chez ceux ayant des lésions de fibrose F3-F4.

Globalement, plus de la moitié des patients de la cohorte présentent un stade de fibrose hépatique avancé (score METAVIR F3 et F4). Sur les 11 échecs virologiques observés sous IP, neuf patients étaient au stade de fibrose hépatique sévère ou de cirrhose, confirmant l'impact négatif de la fibrose hépatique sur les chances de guérison.

○ **Facteurs de risque de contamination par le VHC**

Au moment du diagnostic de l'infection par le VHC, une recherche de facteurs de risques de contamination est effectuée par le clinicien. Sont retrouvés classiquement au sein de cette cohorte les principaux facteurs de risque d'acquisition du VHC, notamment par transmission parentérale non liée aux transfusions (antécédents de toxicomanie intra-veineuse, pratique du tatouage, piercings, acupuncture), proche du patient porteur chronique du VHC...

Près d'un quart des patients présentent également un risque de transmission du VHC lors d'une transfusion sanguine réalisée avant 1992 ou via l'utilisation de produits sanguins labiles, en particulier chez des sujets hémophiles. Enfin, pour quasiment la moitié des patients, on ne retrouve aucun facteur de risque de contamination par le VHC. Ces modes de transmission supposés sont comparables avec les principaux modes de transmission du VHC décrits dans la littérature (4).

○ **Efficacité des trithérapies au sein de la cohorte Nantaise**

Le suivi des charges virales VHC effectué au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes pour tous les patients de la cohorte étudiée permet d'évaluer l'efficacité virologique de la trithérapie anti-VHC. Les données de RVR existent pour les 71 patients.

La réponse virologique rapide (RVR) observée sous télaprévir est respectivement de 83,3%, 82,4% et 100% chez les patients naïfs, non répondeurs et rechuteurs à un précédent traitement.

Dans l'étude ADVANCE s'intéressant au télaprévir chez les patients naïfs (42), une RVR a été observée chez 68% des 363 patients du bras télaprévir pendant 12 semaines (bras T12PR RGT). Les chances d'obtention d'une RVS traités chez ces patients sont alors de 75% selon la même étude.

De même, l'étude ILLUMINATE (71) a montré l'obtention d'une RVR chez 72% des patients naïfs traités par télaprévir.

Concernant les patients en échec à un précédent traitement et retraités par une trithérapie anti VHC contenant le télaprévir, l'étude REALIZE (43) montre un pourcentage de RVR global de 57% parmi les 266 patients traités par une trithérapie de 48 semaines. Les pourcentages de RVR parmi les patients rechuteurs, répondeurs partiels et répondeurs nuls étaient respectivement de 89%, 65% et 26%.

Dans la cohorte Nantaise sous télaprévir, les résultats de RVR sont comparables à ceux des études de phase III, notamment chez les patients rechuteurs (100% de RVR dans la cohorte Nantaise contre 89% dans l'étude REALIZE) et chez les non répondeurs (82,4% de RVR dans cohorte Nantaise versus 65% et 26% de RVR dans les groupes répondeurs partiels et répondeurs nuls de l'étude REALIZE). Les différences peuvent être expliquées par les plus faibles effectifs de patients dans notre étude (17 patients non répondeurs et 14 patients rechuteurs traités par télaprévir dans cette cohorte). Ils sont rassurants quant à l'efficacité des trithérapies « dans la vraie vie ».

Dans le groupe de 33 patients traités par bocéprévir, un pourcentage de RVR de 88,9%, 41,2% et 42,9% est observé respectivement dans les groupes de patients Nantais naïfs, non répondeurs et rechuteurs à un précédent traitement. Ces résultats sont comparables à ceux de études cliniques du bocéprévir.

L'étude SPRINT-2 s'intéressant à l'efficacité du bocéprévir sur des patients naïfs (40) a permis d'observer une RVR chez 60% des 316 malades traités avec une durée adaptée à la réponse virologique (RGT).

Chez les patients ayant déjà reçu un traitement antérieur, l'étude RESPOND-2 (41) a montré un pourcentage de RVR de 46% parmi les 162 patients du bras bocéprévir, avec une durée adaptée à la réponse virologique (RGT). Le pourcentage de patients obtenant une RVS, chez les patients ayant obtenu une RVR, est estimée à 86%.

Globalement, un taux de RVR inférieur est observé dans les groupes de patients non répondeurs et rechuteurs traités par BOC par rapport à ceux traités par le TVR au sein de cette cohorte Nantaise. (41,2% *versus* 82,4% parmi les patients non répondeurs et 42,9% *versus* 100% chez les patients rechuteurs). Cette différence de RVR ne s'observe pas chez les patients naïfs de traitement antérieur (88,9% de RVR pour le BOC *versus* 83,3% pour le TVR).

La réponse virologique rapide « étendue » ou eRVR a elle aussi pu être évaluée dans notre étude.

Concernant les patients traités par télaprévir, un taux de eRVR de 83,3%, 82,4% et 100% est obtenu respectivement chez les patients naïfs de traitement antérieur, non répondeurs et rechuteurs.

Ces résultats sont globalement meilleurs que ceux observés dans les études cliniques de phase III. En effet, l'étude ADVANCE (42) montre l'obtention d'une eRVR chez 58% des 363 patients naïfs traités par 12 semaines de télaprévir, avec une durée de trithérapie adaptée à la réponse (bras T12PR RGT).

Parmi ceux traités par bocéprévir, une eRVR est obtenue chez 88,9% des patients de l'étude naïfs de traitement antérieur, 41,2% des patients non répondeurs et chez 42,9% des patients rechuteurs.

L'étude SPRINT-2 (40) a retrouvé un pourcentage de eRVR de 47% (inférieur à celui observé dans notre étude) chez les patients naïfs de traitement antérieur. Dans ce groupe de patients, 97% obtenaient une RVS, laissant espérer l'obtention d'une RVS chez un grand nombre de patients naïfs de traitement antérieur au sein de la cohorte Nantaise.

Les pourcentages de RVR et eRVR semblent être inférieurs pour le bocéprévir par rapport au télaprévir parmi les patients non répondeurs et rechuteurs à un précédent traitement anti-VHC. Cette observation doit être confirmée en poursuivant l'étude avec les patients ayant démarré une trithérapie depuis septembre 2012.

- **Echec des trithérapies anti-VHC au sein de la cohorte Nantaise**

Quinze patients ont été contraints de stopper leur trithérapie anti-VHC, soit un peu plus de 20% de la cohorte.

Certains arrêts sont liés à une intolérance aux médicaments (5,6% des patients de la cohorte). L'étude ADVANCE étudiant le télaprévir (42) rapporte une fréquence importante des effets indésirables sous trithérapie chez plus de 25% des patients avec un arrêt du traitement antiviral chez 7% des patients traités par 12 semaines de TVR versus 4% des patients traités par la bithérapie standard.

L'inhibiteur de protéase, ajouté à la bithérapie pégylée, majore le risque d'effets indésirables (76). L'anémie induite par la ribavirine est majorée en moyenne de 1g à 1,5g/dL par rapport à la bithérapie. Cette chute de l'hémoglobine a été la cause d'un arrêt pour anémie sévère chez un patient, malgré l'administration d'érythropoïétine et la réduction de posologie de la ribavirine.

Deux arrêts pour toxidermies généralisées ont été observés sous télaprévir. Dans les études de phase II et III, approximativement la moitié des patients traités par télaprévir développaient un rash, qui dans plus de 90% des cas était de sévérité faible à modérée et disparaissait classiquement après arrêt du télaprévir (77). Les formes sévères comme les syndromes de Stevens-Johnson ou DRESS syndrome ont été rarement décrits (<1% des patients).

Un patient de la cohorte Nantaise est décédé à l'arrêt de la trithérapie anti-VHC mais l'imputabilité de la trithérapie dans ce décès reste difficile. Deux autres patients sont également décédés au cours de leur trithérapie anti-VHC ; ils présentaient tous les deux une cirrhose hépatique évoluée au stade de CHC.

Onze arrêts de la trithérapie ont été observés en raison d'un échec virologique, représentant environ 15,5% des traitements instaurés (cf partie précédente).

Tous les échecs virologiques ont été associés à l'émergence de souches résistantes mutées.

CONCLUSION

L'excellente efficacité des trithérapies comprenant un inhibiteur de protéase du VHC de première génération est confirmée au sein de cette cohorte Nantaise, retrouvant en pratique clinique les résultats des différentes études de phase III (40–43). La puissante activité antivirale du bocéprévir et télaprévir, par rapport à la bithérapie standard pégylée seule, est démontrée. Malgré les effets indésirables majorés sous trithérapie, il est essentiel que l'observance et l'implication des patients soient optimales pour garantir l'efficacité de ces nouvelles thérapeutiques. Les échecs virologiques liés à la sélection de variants viraux résistants aux IP représentent un nouveau concept dans le traitement de l'hépatite C, jusqu'alors inconnu en bithérapie. Le génotypage de résistance, bien que controversé, montre un réel intérêt, notamment lors des échecs virologiques sous IP. L'impact des mutations présentes avant trithérapie sur l'efficacité du traitement par IP fera l'objet prochainement d'une étude rétrospective multicentrique (dans le cadre du Gemhep) chez les patients répondeurs nuls en bithérapie. L'objectif sera d'évaluer la présence de mutations de résistance aux IP, en utilisant la technique Nantaise de génotypage de résistance. La présence de ces mutations deviendra peut-être à l'avenir un facteur pronostique de réponse à la trithérapie.

Tous les nouveaux patients débutant une trithérapie au CHU de Nantes bénéficieront du même suivi clinico-biologique, permettant de confirmer les données de cette étude sur une plus large cohorte. Disposer de nouvelles thérapeutiques prometteuses dans la prise en charge de l'hépatite C est un réel espoir pour l'avenir de la pathologie. Néanmoins, il demeure essentiel de poursuivre et d'améliorer le dépistage des patients infectés.

- **Communication orale lors du Gemhep 2012 (Groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites), Paris, 11 décembre 2012**

Efficacité virologique des trithérapies anti-VHC après 1 an d'utilisation au sein de la cohorte nantaise

E André-Garnier¹, M Plançon¹, B Besse¹, J Gournay², C Feray², E Billaud³, M Coste-Burel¹
¹Laboratoire de virologie, EA4271, Services d'hépatologie² et d'infectiologie³, CHU de Nantes

Une méthode originale de génotypage des souches VHC dans la région NS3 est utilisée en virologie depuis le 1^{er} septembre 2011 (Besse et al, J. Virol. Methods 2012).

Pour chaque patient, à la découverte d'une infection par le VHC ou lors de l'initiation d'un traitement, le génotype est déterminé par l'analyse de la séquence NS3 (<http://www.hcv.lanl.gov>). Les mutations décrites comme associées à une résistance au TVP et/ou BOC sont recherchées à l'aide de 2 algorithmes : Geno2Pheno HCV 1.0 et Greg+ VHC (AC 33 ANRS). En cas d'échec virologique (EV) ou de rechute sous IP, le séquençage du gène NS3 est renouvelé.

481 souches ont été génotypées dont 327 G1. 71 traitements par IP ont été initiés : 38 TVP (26 1a et 12 1b) et 33 BOC (18 1a et 15 1b). La durée moyenne du traitement au 01/09/12 est de **9,1** mois. Une eRVR est obtenue chez **33** patients sous TVP (86%) et **18** sous BOC (54%). **14** patients ont achevé leur traitement avec succès au 01/11/12 dont **1** RVS.

Dix EV sont observés :

5 sous TVP (13%) 4 souches G1a aux profils : V36M + R155K (n=2), V55A (présente à J0) +V36M + R155K, R155K et 1 G1b = V36V/A.

5 sous BOC (14%) 2 G1b : T54S, T54T/A et 3G1a : V36M +R155K.

Le génotypage NS3, validé en routine, permet de disposer d'une séquence de référence à J0. La comparaison avec la séquence réalisée en cas d'EV permettra de faire progresser de l'algorithme. Les taux élevés d'eRVR correspondent à ceux obtenus dans les études de phase III. Le gain thérapeutique des trithérapies est incontestable pour le traitement des patients infectés par un G1. Le suivi de la cohorte se poursuit et les critères épidémiologiques et de tolérance sont en cours d'exploitation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* janv 2009; 29 Suppl 1:74-81.
2. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet.* 22 sept 2001; 358(9286):958-965.
3. Meffre C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau E, Dubois F, Antona D, Lemasson J-M, et al. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus infections in France in 2004: social factors are important predictors after adjusting for known risk factors. *J. Med. Virol.* avr 2010;82(4):546-555.
4. Marcellin P, Asselah T. Hépatites virales. Wolters Kluwer France; 2008.
5. Huraux J-M. Traité de virologie médicale. De Boeck Secundair; 2003.
6. Pillonel J, Laperche S. Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT). *Euro Surveill.* févr 2005;10(2):5-8.
7. Dény P. Virus de l'hépatite C. Elsevier Masson; 2003.
8. Pawlotsky J-M. Hépatite C. L'Editeur: EDP Sciences; 2004.
9. Cacoub P, Terrier B, Sène D. Manifestations extrahépatiques liées au virus de l'hépatite C. Hépatites virales. Wolters Kluwer France; 2008. p. 295-308.
10. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. Virology of hepatitis C virus infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* août 2012; 26(4):381-389.
11. Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J. Virol. Methods.* mai 2003; 109(2):187-193.
12. Recommandations HAS. Méthodes d'évaluation de la fibrose hépatique au cours des hépatopathies chroniques [Internet]. 2006. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_476346/methodes-d-evaluation-de-la-fibrose-hepatique-au-cours-des-hepatopathies-chroniques.
13. Pawlotsky J-M, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology.* mai 2007; 132(5):1979-1998.
14. Asselah T, Marcellin P. New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int.* janv 2011;31 Suppl 1:68-77.

15. Gaudy C, Goudeau A. La diversité du virus de l'hépatite C: méthodes d'étude, implication dans la pathogenèse et la résistance au traitement. *Virologie*. 2005; 9:343-355.
16. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005; 42(4):962-73.
17. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* avr 2000;13(2):223-235.
18. Asselah T. Triple therapy with boceprevir or telaprevir for prior HCV non-responders. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. août 2012; 26(4):455-462.
19. Dictionnaire VIDAL. 2012.
20. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. août 2011; 55(2):245-264.
21. HAS. Conférence de consensus pour le traitement de l'hépatite C [Internet]. 2002 [cité 1 déc 2012]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/hepatite_C.pdf
22. Calvaruso V, Craxi A. 2011 European Association of the Study of the Liver hepatitis C virus clinical practice guidelines. *Liver International*. 2012; 32:2-8.
23. AFEF. Prise de position de l'AFEF sur les trithérapies dans la prise en charge des malades atteints d'hépatite C [Internet]. 2011. Disponible sur: <http://www.afef.asso.fr/bibliotheque/recommandations>.
24. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet*. 26 juill 2008; 372(9635):321-332.
25. Alberti A, Clumeck N, Collins S, Gerlich W, Lundgren J, Palù G, et al. Short statement of the first european consensus conference on the treatment of chronic hepatitis B and C in HIV co-infected patients. *Journal of Hepatology*. mai 2005; 42(5):615-624.
26. Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, Charlotte F, Azria F, Coutellier A, et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology*. oct 1999;30(4):1054-1058.
27. Prise de position sur l'utilisation des inhibiteurs de protéase de 1ere génération chez les patients coinfectés VHC/VIH [Internet]. [cité 4 avr 2013]. Disponible sur: http://www.afef.asso.fr/rc/org/afef/htm/Article/2013/20130402-133108-311/src/htm_fullText/fr/Recommandations%20patients%20co-infectees%20VIHVHC.pdf

28. Sulkowski MS. HCV therapy in HIV-infected patients. *Liver International*. 2013; 33:63-7.
29. Legrand-Abravanel F, Colson P, Leguillou-Guillemette H, Alric L, Ravaux I, Lunel-Fabiani F, et al. Influence of the HCV subtype on the virological response to pegylated interferon and ribavirin therapy. *Journal of Medical Virology*. 2009; 81(12):2029-35.
30. Awad T, Thorlund K, Hauser G, Stimac D, Mabrouk M, Gluud C. Peginterferon alpha-2a is associated with higher sustained virological response than peginterferon alfa-2b in chronic hepatitis C: systematic review of randomized trials. *Hepatology*. avr 2010;51(4):1176-1184.
31. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J. Hepatol.* oct 2008;49(4):634-651.
32. Lange CM, Zeuzem S. IL28B single nucleotide polymorphisms in the treatment of hepatitis C. *J. Hepatol.* Sept 2011; 55(3):692-701.
33. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 16 août 2009; 461(7262):399-401.
34. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology*. juill 2010;139(1):120-129.e18.
35. Manns MP. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*. 1 sept 2006; 55(9):1350-1359.
36. Bourlière M, Ouzan D, Rosenheim M, Doffoël M, Marcellin P, Pawlotsky J-M, et al. Pegylated interferon- α 2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in a real-life setting: the Hepatys French cohort (2003-2007). *Antivir. Ther. (Lond.)*. 2012; 17(1):101-110.
37. Sarrazin C, Susser S, Doehring A, Lange CM, Müller T, Schlecker C, et al. Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *Journal of Hepatology*. mars 2011; 54(3):415-421.
38. Poynard T, Colombo M, Bruix J, Schiff E, Terg R, Flamm S, et al. Peginterferon alfa-2b and Ribavirin: Effective in Patients With Hepatitis C Who Failed Interferon alfa/Ribavirin Therapy. *Gastroenterology*. mai 2009; 136(5):1618-1628.e2.
39. Jensen DM, Marcellin P, Freilich B, Andreone P, Di Bisceglie A, Brandão-Mello CE, et al. Re-treatment of patients with chronic hepatitis C who do not respond to peginterferon-alpha2b: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 21 avr 2009; 150(8):528-540.

40. Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 31 mars 2011; 364(13):1195-1206.
41. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 31 mars 2011; 364(13):1207-1217.
42. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 23 juin 2011; 364(25):2405-2416.
43. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N. Engl. J. Med.* 23 juin 2011; 364(25):2417-2428.
44. Dictionnaire VIDAL. Monographie du bocéprévir. 2012.
45. Dictionnaire VIDAL. Monographie du téléprévir. 2012.
46. Jacobson IM, Marcellin P, Zeuzem S, Sulkowski MS, Esteban R, Poordad F, et al. Refinement of stopping rules during treatment of hepatitis C genotype 1 infection with boceprevir and peginterferon/ribavirin. *Hepatology.* août 2012; 56(2):567-575.
47. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J. Hepatol.* juill 2011;55(1):192-206.
48. Kieffer TL, Kwong AD, Picchio GR. Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). *J. Antimicrob. Chemother.* févr 2010;65(2):202-212.
49. McCown MF, Rajyaguru S, Kular S, Cammack N, Nájera I. GT-1a or GT-1b subtype-specific resistance profiles for hepatitis C virus inhibitors telaprevir and HCV-796. *Antimicrob. Agents Chemother.* mai 2009; 53(5):2129-2132.
50. Pawlotsky J-M. Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology.* mai 2011; 53(5):1742-1751.
51. Kieffer TL, De Meyer S, Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges A, et al. Hepatitis C viral evolution in genotype 1 treatment-naïve and treatment-experienced patients receiving telaprevir-based therapy in clinical trials. *PLoS ONE.* 2012; 7(4):e34372.
52. Incivek Package insert 2011 [Internet]. 2011 [cité 15 mars 2013]. Disponible sur: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/201917lbl.pdf
53. Susser S, Welsch C, Wang Y, Zettler M, Domingues FS, Karey U, et al. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology.* déc 2009;50(6):1709-1718.

54. Kuntzen T, Timm J, Berical A, Lennon N, Berlin AM, Young SK, et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology*. 2008; 48(6):1769-78.
55. Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Seko Y, Kawamura Y, et al. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J. Clin. Virol.* août 2012; 54(4):352-354.
56. Bartels DJ, Zhou Y, Zhang EZ, Marcial M, Byrn RA, Pfeiffer T, et al. Natural Prevalence of Hepatitis C Virus Variants with Decreased Sensitivity to NS3-4A Protease Inhibitors in Treatment-Naive Subjects. *J Infect Dis*. 15 sept 2008; 198(6):800-807.
57. Vallet S, Viron F, Henquell C, Le Guillou-Guillemette H, Lagathu G, Abravanel F, et al. NS3 protease polymorphism and natural resistance to protease inhibitors in French patients infected with HCV genotypes 1-5. *Antivir. Ther. (Lond.)*. 2011; 16(7):1093-1102.
58. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, et al. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatol Int*. 18 août 2011.
59. Besse B, Coste-Burel M, Bourgeois N, Feray C, Imbert-Marcille B-M, André-Garnier E. Genotyping and resistance profile of hepatitis C (HCV) genotypes 1-6 by sequencing the NS3 protease region using a single optimized sensitive method. *J. Virol. Methods*. oct 2012;185(1):94-100.
60. Sarrazin C, Hézode C, Zeuzem S, Pawlotsky J-M. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J. Hepatol*. 2012; 56 Suppl 1:S88-100.
61. Asselah T, Marcellin P. Direct acting antivirals for the treatment of chronic hepatitis C: one pill a day for tomorrow. *Liver International*. 2012; 32:88-102.
62. Friberg J, Levine S, Chen C, Sheaffer AK, Chaniewski S, McPhee F. Combinations of Interferon Lambda with Direct-Acting Antiviral Agents are Highly Efficient in Suppressing Hepatitis C Virus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother*. 28 déc 2012.
63. Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, Martorell C, Everson GT, Ghalib R, et al. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N. Engl. J. Med*. 19 janv 2012; 366(3):216-224.
64. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Symonds WT, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N. Engl. J. Med*. 3 janv 2013; 368(1):34-44.
65. André-Garnier E, Coste-Burel M, Feray C. Abstract JN1: Réactivation clinique d'une hépatite B dans le contexte des nouveaux traitements de l'hépatite C. juin 2012.

66. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 26 sept 2002; 347(13):975-982.
67. Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin. Microbiol. Rev.* janv 2007; 20(1):23-38.
68. Trimoulet P, Belzunce C, Faure M, Wittkop L, Reigadas S, Dupon M, et al. Hepatitis C virus (HCV) protease variability and anti-HCV protease inhibitor resistance in HIV/HCV-coinfected patients. *HIV Med.* Sept 2011; 12(8):506-509.
69. Kieffer TL, Sarrazin C, Miller JS, Welker MW, Forestier N, Reesink HW, et al. Telaprevir and pegylated interferon- α -2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. *Hepatology.* 2007; 46(3):631-9.
70. De Meyer S, Dierynck I, Ghys A, Beumont M, Daems B, Van Baelen B, et al. Characterization of telaprevir treatment outcomes and resistance in patients with prior treatment failure: Results from the REALIZE trial. *Hepatology.* déc 2012;56(6):2106-2115.
71. Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH, Nelson DR, Sulkowski MS, Everson GT, et al. Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 15 sept 2011;365(11):1014-1024.
72. Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, et al. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.* 30 avr 2009;360(18):1839-1850.
73. Victrelis Package Insert [Internet]. 2011 [cité 12 févr 2013]. Disponible sur: http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/v/victrelis/victrelis_pi.pdf
74. Brass C, Barnard R, Howe J. Sustained virologic response and boceprevir resistance-associated variants observed in patients infected with HCV genotype 1a/1b when treated with boceprevir plus peginterferon alfa-2b/ribavirin. *J Hepatol.* 2011; S471-S472.
75. Zhou Y, Müh U, Hanzelka BL, Bartels DJ, Wei Y, Rao BG, et al. Phenotypic and structural analyses of hepatitis C virus NS3 protease Arg155 variants: sensitivity to telaprevir (VX-950) and interferon alpha. *J. Biol. Chem.* 3 août 2007; 282(31):22619-22628.
76. Marks KM, Jacobson IM. The first wave: HCV NS3 protease inhibitors telaprevir and boceprevir. *Antivir. Ther. (Lond.).* 2012; 17(6 Pt B):1119-1131.
77. Cacoub P, Bourlière M, Lübke J, Dupin N, Buggisch P, Dusheiko G, et al. Dermatological side effects of hepatitis C and its treatment: patient management in the era of direct-acting antivirals. *J. Hepatol.* févr 2012;56(2):455-463.

Auteur : Marc PLANÇON

Titre du mémoire-thèse :

**EFFICACITÉ VIROLOGIQUE DES TRITHÉRAPIES ANTI-VHC APRÈS UN AN
D'UTILISATION AU SEIN DE LA COHORTE NANTAISE**

Résumé du mémoire-thèse :

Le virus de l'hépatite C représente un problème majeur de santé publique. Récemment, le télaprévir et bocéprévir, inhibiteurs de protéase (IP) NS3 du VHC, ont obtenu une AMM dans le traitement de l'hépatite C de génotype 1, associés à la bithérapie standard pégylée. Ils apportent un réel bénéfice en termes d'efficacité, mais des souches virales résistantes peuvent émerger lors du traitement.

L'objectif de ce travail est d'analyser les souches virales par une technique innovante de génotypage dans la région NS3, chez des patients naïfs de traitement par IP. Un suivi virologique et clinique d'une cohorte de 71 patients sous trithérapie anti-VHC est réalisé.

Les mutations de résistance retrouvées et leur prévalence ne diffèrent pas de celles décrites dans la littérature. Parmi les 71 patients sous IP, 32 ont d'ores et déjà obtenu une réponse virologique soutenue, synonyme d'éradication virale. 12 échecs virologiques ont été observés, où le génotypage de résistance retrouve toujours des mutations décrites comme associées à une résistance au télaprévir et/ou bocéprévir. Ce travail démontre l'intérêt du génotypage de résistance NS3.

**MOTS CLÉS : VIRUS DE L'HEPATITE C, INHIBITEUR DE PROTÉASE NS3,
RÉSISTANCE, BOCÉPRÉVIR, TÉLAPRÉVIR**

JURY :

Président : Mme le Pr. Virginie FERRÉ, PU-PH, Laboratoire de Virologie - Faculté de Pharmacie - Nantes

Membres du Jury : Mme le Dr. Elisabeth ANDRÉ-GARNIER, PH, Laboratoire de Virologie – Faculté de Pharmacie – Nantes (Directeur de thèse)

Mr le Dr. Jérôme GOURNAY, PH, Hépatogastro-entérologie - Faculté de Médecine - Nantes

Mr le Pr. François RAFFI, PU-PH, Maladies Infectieuses et Tropicales – Faculté de Médecine - Nantes
