

# SOMMAIRE

---

|  |    |
|--|----|
| LISTE DES ABREVIATIONS.....  | 1  |
| LISTE DES FIGURES.....   | 2  |
| LISTE DES TABLEAUX.....  | 3  |
| INTRODUCTION.....  | 4  |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE.....   | 6  |
| I- Généralités.....  | 6  |
| I-1- Le virus de l'hépatite C.....   | 6  |
| I-1-1- Découverte.....   | 6  |
| I-1-2- Taxonomie.....  | 6  |
| I-1-3- Structure.....  | 7  |
| I-1-4- L'organisation génomique et les protéines virales.....                        | 8  |
| I-1-5- Le cycle viral.....   | 9  |
| I-1-6- Variabilité génétique.....  | 11 |
| I-2- Épidémiologie .....   | 14 |
| I-2-1- Les modes de transmission.....  | 14 |
| I-2-2- Épidémiologie à l'échelle mondiale.....                                       | 16 |
| I-2-3- Épidémiologie du VHC en France.....   | 17 |
| I-3- Physiopathologie de l'infection par le VHC.....                                 | 18 |
| I-3-1- L'hépatite aiguë .....  | 18 |
| I-3-2- L'infection chronique.....  | 19 |
| I-3-3- Les manifestations extra-hépatiques .....                                     | 20 |
| I-4- Dépistage et diagnostic de l'hépatite C.....                                    | 21 |
| I-4-1- Dépistage.....  | 21 |
| I-4-2- Démarche diagnostique.....  | 22 |
| I-5- Le traitement.....  | 25 |
| I-5-1- Traitement immunomodulateur : interférons alfa-2 pegylés et ribavirine.....   | 25 |
| I-5-2- Traitement antiviral spécifique : bocéprévir et télaprévir.....               | 29 |
| I-5-3- Stratégies thérapeutiques .....   | 36 |
| I-6- Résistance aux antiviraux.....  | 38 |
| I-6-1- Le principe de la résistance virale aux "Direct-acting Antiviral Agent" ..... | 38 |
| I-6-2- La notion de barrière génétique.....  | 38 |
| I-7- Nouvelles perspectives thérapeutiques.....                                      | 39 |
| I-7-1- Les autres inhibiteurs de la protéase NS3-4A.....                             | 39 |

|   |    |
|---|----|
| I-7-2- Les inhibiteurs de NS5A.....   | 41 |
| I-7-3- Les inhibiteurs de la polymérase NS5B.....   | 41 |
| I-7-4- Les autres cibles potentielles.....  | 43 |
| I-7-5- L'amélioration des traitements non spécifiques.....  | 44 |
| II- La protéase NS3-4A et les inhibiteurs de la protéase.....   | 47 |
| II-1- La protéase NS3-4A.....   | 47 |
| II-1-1- Structure.....  | 47 |
| II-1-2- Fonction protéasique.....   | 49 |
| II-2- Le polymorphisme de la protéase du VHC et les mutations à l'origine de la<br>résistance aux inhibiteurs de la protéase..... | 51 |
| II-2-1- Polymorphisme naturel de la protéase NS3.....   | 51 |
| II-2-2- Les mutations de la protéase NS3 associées à une résistance aux inhibiteurs de la<br>protéase NS3.....                    | 52 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES.....   | 57 |
| I- Échantillons.....  | 57 |
| II- Méthode : de l'extraction de l'ARN du VHC au séquençage de la protéase NS3.....   | 59 |
| II-1- Extraction de l'ARN viral.....  | 59 |
| II-2- RT-PCR .....  | 60 |
| II-3- Électrophorèse et révélation des produits de PCR .....  | 62 |
| II-4- Purification des produits de la RT-PCR.....   | 63 |
| II-5- PCR de séquençage.....  | 63 |
| II-6- Purification des produits de la PCR de séquençage.....  | 64 |
| II-7- Séquençage.....   | 64 |
| II-8- Analyse de l'électrophorégramme et des séquences protéiques.....  | 65 |
| RÉSULTATS.....  | 66 |
| I- Les résultats du suivi biologique des patients.....  | 66 |
| II- Les résultats du séquençage de la protéase NS3.....   | 68 |
| II-1- Les séquences de la protéase NS3 obtenues.....  | 68 |
| II-1-1- Échantillons pré-thérapeutiques.....  | 68 |
| II-1-2- Échantillons des patients en échec thérapeutique.....   | 68 |
| II-2- Analyse des séquences de la protéase NS3.....   | 68 |
| II-2-1- Analyse des séquences pré-thérapeutiques.....   | 69 |
| II-2-2- Analyse des séquences chez les patients en échec thérapeutique.....   | 70 |
| DISCUSSION.....   | 72 |

|  |    |
|--|----|
| I- Les résultats du séquençage de la protéase NS3.....   | 72 |
| I-1- Les difficultés techniques.....   | 72 |
| I-1-1- La charge virale optimale et une technique optimisée.....   | 72 |
| I-1-2- La démarche qualité.....  | 73 |
| I-1-3- Les limites du séquençage direct.....   | 74 |
| I-2- L'intérêt du séquençage de la protéase NS3.....   | 76 |
| I-2-1- Suivi des patients sous trithérapie au CHU d'Angers.....  | 76 |
| I-2-2- Étude multicentrique.....   | 78 |
| I-3- Les autres facteurs d'échec thérapeutique.....  | 79 |
| II- La place du pharmacien d'officine dans la prise en charge de l'hépatite C.....   | 81 |
| II-1- Rôle du pharmacien d'officine lors de la délivrance.....   | 81 |
| II-1-1- La détection des interactions médicamenteuses.....   | 82 |
| II-1-2- Les conseils associés.....   | 83 |
| II-1-3- La gestion des effets indésirables.....  | 84 |
| II-2- Implication du pharmacien d'officine pour favoriser l'adhésion thérapeutique<br>du patient.....                          | 87 |
| II-2-1- L'évaluation de l'observance.....  | 87 |
| II-2-2- Les moyens d'aide à l'observance.....  | 88 |
| II-2-3- L'éducation thérapeutique du patient.....  | 89 |
| CONCLUSION.....  | 91 |
| BIBLIOGRAPHIE.....   | 92 |
| ANNEXE.....  | 98 |
| Alignement des séquences d'acides aminés des 28 patients inclus dans l'étude avant le<br>début du traitement et à l'échec..... | 98 |

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

|        |  |
|--------|--|
| ADN    | Acide Désoxyribonucléique  |
| AFEF   | Association Française pour l'Étude du Foie   |
| ALAT   | Alanine Amino Transférase  |
| AMM    | Autorisation de Mise sur le Marché   |
| ANRS   | Agence Nationale de Recherche sur le Syndrome de l'Immunodéficience Acquise et les Hépatites Virales |
| ARN    | Acide Ribonucléique  |
| ASAT   | Aspartate Amino Transférase  |
| CHC    | Carcinome Hépatocellulaire   |
| CYP3A  | Cytochrome P450 3A   |
| DAA    | Direct-acting Antiviral Agent  |
| dNTPs  | désoxyribo Nucléotides Tri-Phosphate   |
| DRESS  | Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms  |
| EASL   | European Association for the Study of the Liver  |
| ECG    | Électrocardiogramme  |
| EPO    | érythropoïétine  |
| ETP    | Éducation Thérapeutique du Patient   |
| GGT    | Gamma Glutamyl Transférases  |
| HAS    | Haute Autorité de Santé  |
| HSH    | Homme ayant des relations Sexuelles avec des Hommes  |
| IFN    | interféron   |
| IL28B  | interleukine 28B   |
| InVS   | Institut de Veille Sanitaire   |
| IP     | Inhibiteurs de la Protéase NS3   |
| OMS    | Organisation Mondiale de la Santé  |
| PAL    | Phosphatases Alcalines   |
| pb     | paires de base   |
| PCR    | Polymerase Chain Reaction  |
| PEG    | polyéthylèneglycol   |
| RE     | Réticulum Endoplasmique  |
| RT-PCR | Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction  |
| RVS    | Réponse Virologique Soutenue   |
| STAT-C | Specifically Targeted Antiviral Therapies for hepatitis C  |
| TP     | Taux de Prothrombine   |
| TSH    | Hormone Thyroïdienne Stimulante  |
| VHB    | Virus de l'hépatite B  |
| VHC    | Virus de l'hépatite C  |
| VIH    | Virus de l'Immunodéficience Humaine  |

## LISTE DES FIGURES

---

- Figure 1 Arbre phylogénique de la famille des Flaviviridae
- Figure 2 Organisation structurale du virus de l'hépatite C
- Figure 3 L'organisation génomique du VHC
- Figure 4 Les protéines du VHC
- Figure 5 Cycle viral du VHC
- Figure 6 Arbre évolutif des principales quasi-espèces identifiées
- Figure 7 Prévalence du VHC estimée par région en 2005 d'après l'OMS
- Figure 8 Évolution de l'hépatite C chronique
- Figure 9 Arbre décisionnel résumant la démarche diagnostique de l'hépatite C
- Figure 10 Structure des interférons pegylés alfa-2a et alfa-2b
- Figure 11 Structure chimique du bocéprévir et du télaprévir
- Figure 12 Schéma thérapeutique avec Incivo® pour les patients naïfs de traitement ou en rechute
- Figure 13 Schéma thérapeutique avec Incivo® chez les patients préalablement traités répondeurs partiels ou répondeurs nuls
- Figure 14 Classification des IP
- Figure 15 Caractéristiques des classes de DAA
- Figure 16 Les DAA en étude clinique de phase II et III
- Figure 17 Localisation de la séquence codant NS3 dans le génome du VHC
- Figure 18 Structure tridimensionnelle du complexe NS3/NS4A et de l'hélicase NS3
- Figure 19 Mécanisme d'action de la protéase
- Figure 20 Comparaison des Fold Change du bocéprévir et du télaprévir
- Figure 21 Principe du séquençage selon la méthode de Sanger
- Figure 22 Distribution des quasi-espèces du VHC et méthodes pour détecter les populations virales majoritaires (plus de 10%), intermédiaires et minoritaires (moins de 1%)

## LISTE DES TABLEAUX

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| <u>Tableau 1</u>  | Classification Métavir des lésions histologiques  |
| <u>Tableau 2</u>  | Les types de réponse en fonction des charges virales à S4, S12 et S24   |
| <u>Tableau 3</u>  | Caractéristiques du bocéprévir et du télaprévir   |
| <u>Tableau 4</u>  | Les schémas thérapeutiques du bocéprévir en fonction du profil du patient   |
| <u>Tableau 5</u>  | Substitutions de la protéase NS3-4A associées à des résistances aux IP et retrouvées lors des études in vitro (*) et/ou des études cliniques (en rouge) |
| <u>Tableau 6</u>  | Caractéristiques des échantillons des patients à l'inclusion  |
| <u>Tableau 7</u>  | Les amorces spécifiques du gène de la NS3 protéase du VHC de génotype 1   |
| <u>Tableau 8</u>  | Composition du mix de RT-PCR  |
| <u>Tableau 9</u>  | Profil de RT-PCR avec les amorces NS3-G1F1-M13 et NS3-G1R1-M13  |
| <u>Tableau 10</u> | Profil de RT-PCR avec les amorces NS3-MarsF3 et NS3-MarsR2  |
| <u>Tableau 11</u> | Composition du mix de PCR de séquençage   |
| <u>Tableau 12</u> | Profil de PCR de séquençage avec les couples d'amorce NS3-G1F1-M13/NS3-G1R1-M13 et NS3-MarsF3/NS3-MarsR2  |
| <u>Tableau 13</u> | Résultats de la trithérapie   |
| <u>Tableau 14</u> | Caractéristiques des patients en échec thérapeutique  |
| <u>Tableau 15</u> | Résultats de l'analyse des positions impliquées dans la résistance aux IP à t <sub>0</sub>  |
| <u>Tableau 16</u> | Résultats de l'analyse des positions impliquées dans la résistance aux IP chez les patients en échec thérapeutique                                      |
| <u>Tableau 17</u> | Mutations à l'origine de résistance aux IP retrouvées chez les génotypes 1 dans l'étude de S. Vallet  |

## INTRODUCTION

---

L'hépatite C est une infection virale qui touche environ 184 millions de personnes dans le monde [1]. D'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), entre 3 et 4 millions de personnes par an sont infectées par le virus de l'hépatite C (VHC) [2]. C'est une question majeure de santé publique puisque ce virus est responsable d'hépatites chroniques susceptibles d'évoluer vers une cirrhose, puis un Carcinome Hépato Cellulaire (CHC).

En France, la transmission de l'hépatite C a nettement diminué suite à la mise en place des mesures de prévention des risques de contamination. Cependant, l'hépatite C est sous diagnostiquée. Selon une étude réalisée en France, 43% des personnes séropositives vis à vis du VHC ignoraient leur statut sérologique en 2004 [3]. Or, avec les traitements actuels, l'éradication virale est possible. Même si les chances de guérison dépendent de nombreux facteurs, une prise en charge adaptée permet de contrôler l'évolution de la maladie.

Des recherches visant à améliorer la réponse au traitement ont conduit au développement de nouveaux antiviraux spécifiques du VHC. Deux inhibiteurs de la protéase NS3-4A du VHC, le bocéprévir (Victrelis®) et le télaprévir (Incivo®) ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2011. L'indication de ces antiprotéases se limite aux patients infectés par un VHC de génotype 1. Ils sont associés à la bithérapie, qui comprend un interféron pégylé et la ribavirine. Celle-ci reste actuellement le traitement de référence des génotypes non 1.

Le VHC est un virus à forte variabilité génétique, de sorte que, plusieurs souches virales, appelées quasi-espèces se retrouvent chez un même individu. Des populations virales minoritaires et dominantes coexistent. Lorsqu'une antiprotéase est administrée, cela peut induire la sélection des variants viraux résistants qui peuvent émerger et entraîner un échec thérapeutique. A l'arrêt du traitement, la pression de sélection disparaît et les variants se répartissent progressivement dans les proportions initiales.

Avant l'initiation de la trithérapie, des mutations à l'origine de résistance aux antiprotéases ont déjà été mises en évidence au niveau du gène NS3 codant la protéase virale. La détection de ces résistances se fait par séquençage de la région NS3. Le séquençage n'est pas effectué en pratique clinique alors qu'il permettrait d'identifier les substitutions d'acides aminés susceptibles d'entraîner une résistance à l'antiprotéase chez les patients traités.

Afin d'évaluer l'intérêt du séquençage de NS3 en pratique clinique, nous avons mis en œuvre cette technique chez les patients recevant une trithérapie. Dans cette étude, 28 échantillons de patients suivis au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) d'Angers ont été analysés. Le séquençage de la région NS3 a été effectué avant le début du traitement ainsi qu'au moment de l'éventuel échappement thérapeutique où les chances d'identifier les résistances sont accrues.



# INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

## I- Généralités

### I-1- Le virus de l'hépatite C

#### *I-1-1- Découverte*

Dans les années 1970, il était possible de diagnostiquer les infections par les virus des hépatites A et B. Cependant, la majorité des hépatites post-transfusionnelles étaient dues à un autre virus dit « non A, non B » [4].

Le chimpanzé a servi de modèle expérimental et les études cliniques sur des patients ayant une hépatite « non A, non B » ont permis de recueillir des données sur l'infection [4]. Ainsi, en 1989, M. Houghton et son équipe [5] ont identifié l'agent responsable par clonage et séquençage de son génome. C'est la première fois qu'un virus a été identifié grâce à des techniques de biologie moléculaire, et non pas par culture cellulaire ou par détection sérologique [3].

#### *I-1-2- Taxonomie*

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae*. Dans la *Figure 1*, les différents virus de cette famille sont classés par genre. Le VHC appartient au genre *Hepacivirus*.

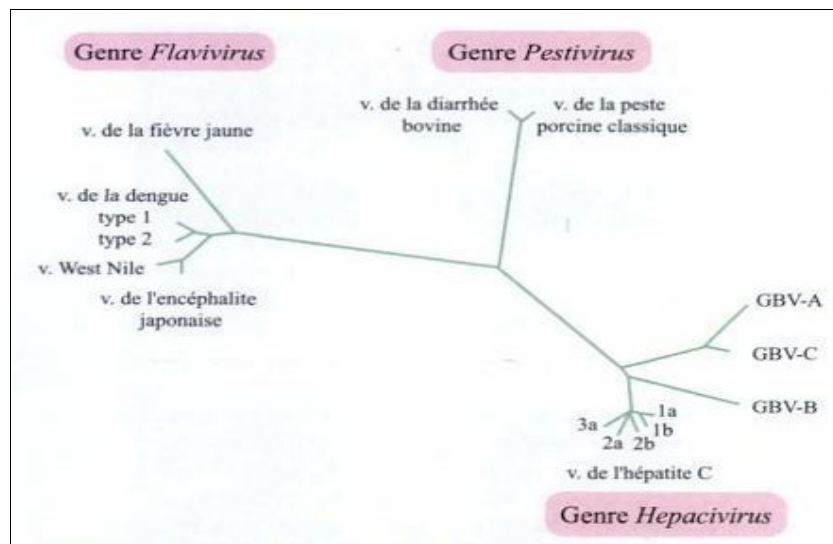


Figure 1 : Arbre phylogénétique de la famille des Flaviviridae, d'après Pawlotsky [6]

### I-1-3- Structure

Le diamètre de la particule virale, représentée Figure 2, est compris entre 55 et 65 nm. Son génome est constitué d'un acide ribonucléique (ARN) monocaténaire à polarité positive. Il est recouvert d'une capsidie protéique icosaédrique aussi appelée « core » et d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées E1 et E2, les deux types de glycoprotéines d'enveloppe [7].

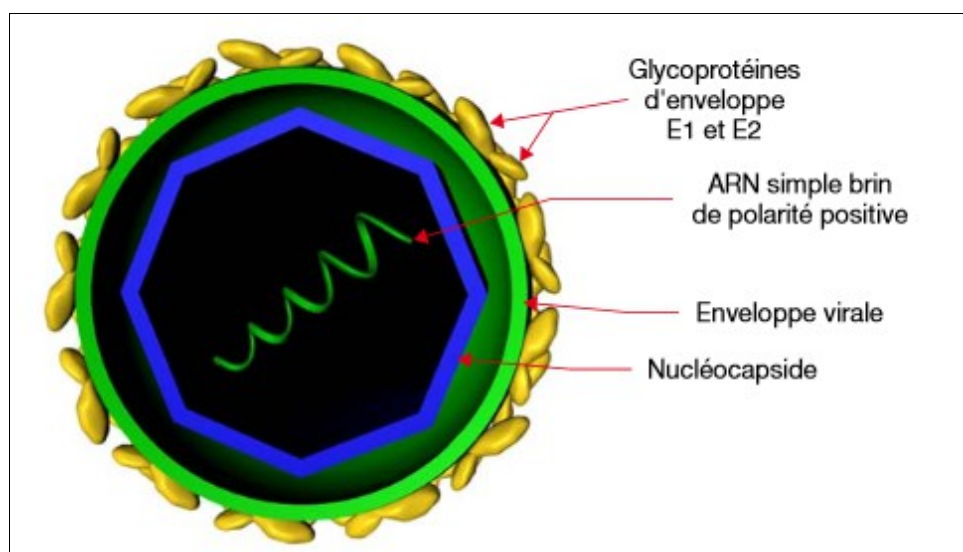


Figure 2 : Organisation structurale du virus de l'hépatite C, d'après Helle *et al.* [8]

### I-1-4- L'organisation génomique et les protéines virales

Le génome du VHC se compose de trois régions distinctes. La région 5' non codante est le site d'entrée du ribosome. La région 3' non codante est le site de l'initiation de la réplication virale. Ces deux extrémités encadrent la troisième région qui correspond au cadre de lecture.

Le cadre de lecture contient 9 600 paires de base (pb) et code pour une polyprotéine d'environ 3 000 acides aminés. Cette polyprotéine est le précurseur des protéines structurales (les protéines de capsidite et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2) et non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) du VHC [6].

La Figure 3 illustre la traduction du cadre de lecture en protéines virales.

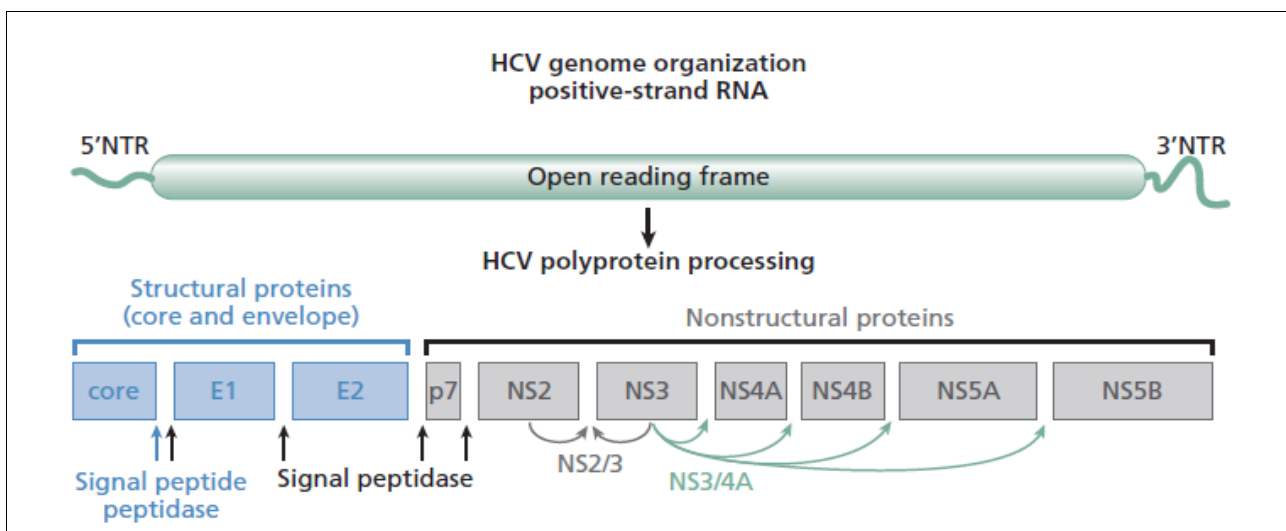


Figure 3 : L'organisation génomique du VHC, d'après Rice *et al.* [9]  
(NTR : « Non Translated Region »)

### ***I-1-5- Le cycle viral***

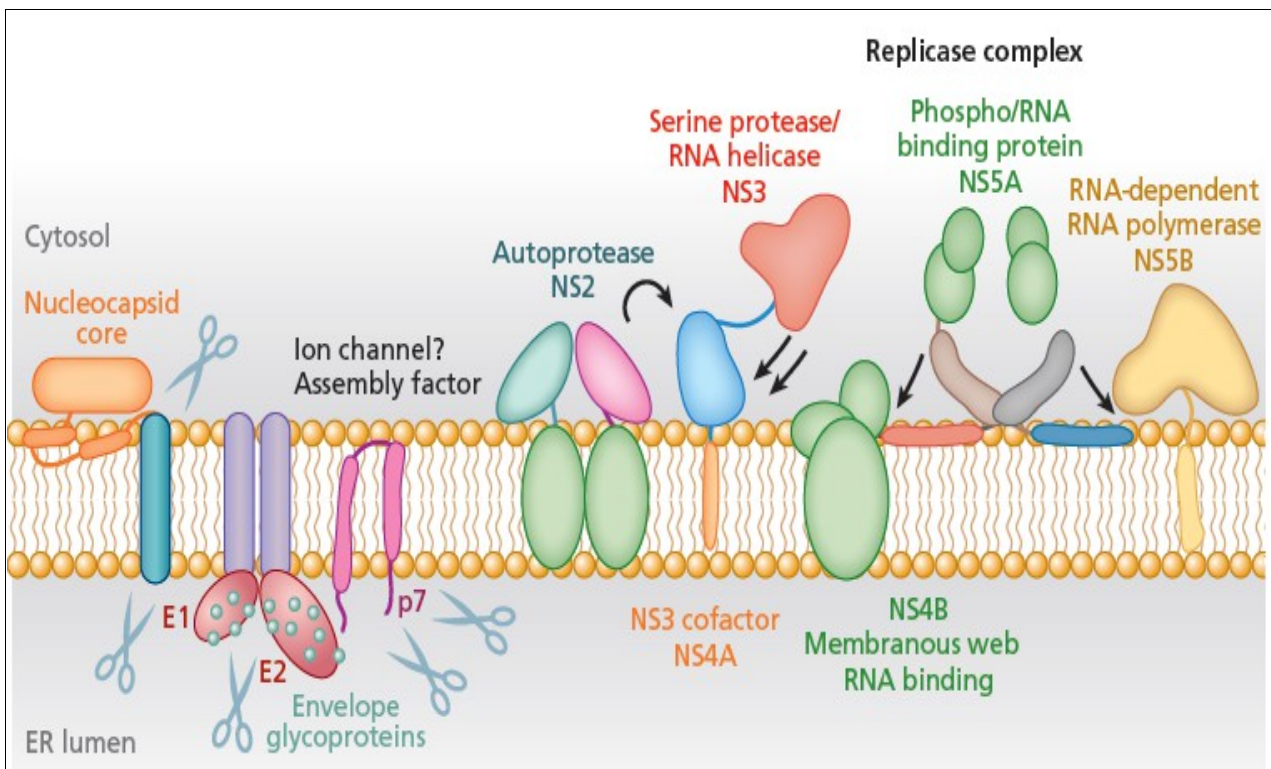
Dans la circulation sanguine, le VHC peut être soit libre, soit lié aux « Very Low Density Lipoprotein » (VLDL) ou aux « Low Density Lipoprotein » (LDL) [10]. Mais, le virus étant un parasite intracellulaire obligatoire, il doit impérativement entrer dans une cellule pour assurer sa réplication.

L'hépatocyte est la cellule cible du VHC où se déroule le cycle viral. Le VHC y entre par un processus lent et complexe. Il s'attache à la surface membranaire via les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 qui interagissent avec des récepteurs spécifiques du virus comme la protéine CD81 et la claudine-1. Puis, il est endocyté et sa membrane fusionne avec celle d'un endosome [8].

La nucléocapside est relarguée dans le cytoplasme puis décapsidée pour libérer l'ARN viral. La réplication de l'ARN génomique est réalisée au niveau du complexe de réplication, par l'ARN polymérase NS5B dépendante de l'ARN viral. Les brins d'ARN de polarité positive servent de matrice pour la synthèse de brins d'ARN de polarité négative. Ces derniers servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux brins positifs qui sont encapsidés pour former de nouveaux virions [8].

L'ARN génomique sert également d'ARN messager en permettant la traduction du cadre de lecture en polyprotéine. Ce précurseur est clivé au niveau de la membrane du Réticulum Endoplasmique (RE), pendant et après la traduction. Le clivage des protéines structurales est assuré par les peptidases cellulaires. Concernant les protéines non structurales, la métallo-protéase NS2-NS3 s'autoclive puis clive le reste des protéines non structurales : NS4A, NS4B, NS5A et NS5B [7].

La *Figure 4* illustre la maturation de la polyprotéine virale.



Légende :



clivage par les enzymes de l'hôte

ER

Endoplasmic Reticulum



clivage par les protéases virales

Figure 4 : Les protéines du VHC, d'après Rice *et al.* [9]

Pour terminer, les brins d'ARN sont encapsidés au niveau du réticulum endoplasmique. Puis, les particules virales subissent une étape de maturation dans l'appareil de Golgi avant d'être libérées dans l'espace intercellulaire par exocytose [10].

La *Figure 5* résume les étapes du cycle viral.

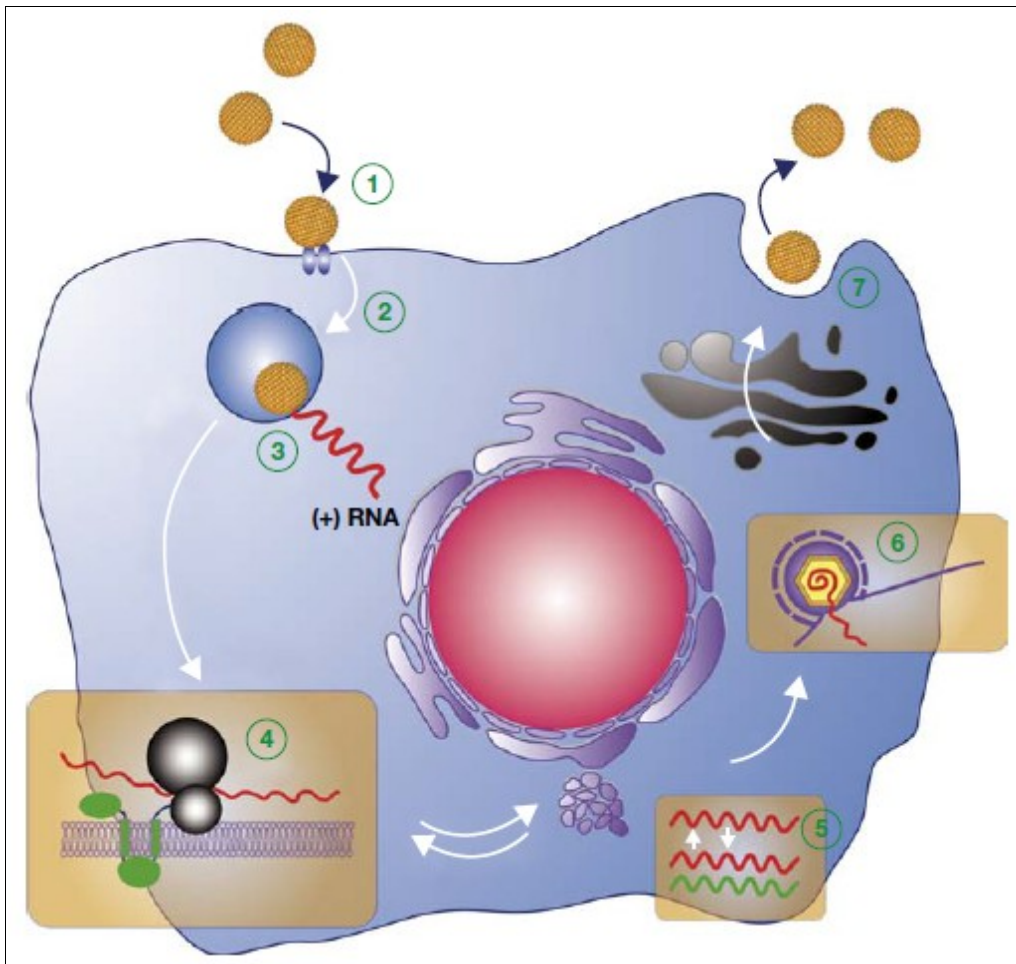


Figure 5 : Cycle viral du VHC, d'après Helle *et al.* [8]

(1)Liaison au récepteur (2)Endocytose (3)Fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des endosomes - Libération de l'ARN viral dans le cytoplasme (4)Synthèse des protéines virales dans le RE (5)Synthèse des brins d'ARN (6)Assemblage (7)Exocytose.

### I-1-6- Variabilité génétique

L'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC présente un fort taux de réplication. En moyenne,  $10^{12}$  particules virales sont produites chaque jour avec une demi-vie estimée à trois heures. Le taux d'erreur est de  $10^{-3}$  nucléotides substitués pour chaque site du génome par an [10]. Or, cette enzyme n'a pas de capacité réparatrice. Certains mutants non viables sont éliminés naturellement, mais d'autres persistent. Cela entraîne des variabilités de séquence importantes [10]. En moyenne, chaque nouveau génome produit contient une erreur.

- À l'échelle inter-individuelle : les génotypes et les sous-types.

Les souches virales sont classées en six génotypes selon le degré d'homologie de leur séquence nucléotidique. Les génotypes sont numérotés de 1 à 6. Parmi ceux-là, plus de 80 sous-types se distinguent dont les sous-types 1a et 1b [10]. Les génotypes et les sous-types diffèrent les uns des autres respectivement par 31 à 33% et 20 à 25% de leurs nucléotides [12].

Les régions les mieux conservées sont celles impliquées dans la réplication ainsi que les régions 3' et 5' non codantes. La région 5' non codante est la région du génome la plus conservée avec plus de 90% de séquence commune entre les différents génomes. La région codant pour les protéines de capsid est également très bien conservée.

A l'inverse, la région codant pour les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 est la plus variable. Le gène E2 contient deux régions hypervariables HVR1 et HVR2 où les différences entre les génomes concernent plus de 50% de la séquence [13].

Des recombinaisons entre génotypes ont également été mises en évidence. Ceci s'explique par le fait qu'un même individu peut être contaminé par différents génotypes en cas d'expositions répétées. Cependant, la détection des recombinaisons est difficile. En effet, la plupart des études sur la variabilité du VHC sont basées sur l'analyse d'une seule région du génome comme la polymérase NS5B, et non sur l'ensemble du génome [12].

Une répartition géographique des génotypes et sous-types est observée. Dans l'ouest de l'Europe, les sous-types 1a et 1b ont la prévalence la plus élevée. Le génotype 3 est plus fréquent en Inde, au Népal et au Pakistan. Le génotype 4 est plus répandu en Afrique et au Moyen-Orient. Le génotype 5 est principalement localisé en Afrique du Sud. Enfin, le génotype 6 se retrouve dans les pays du Sud-Est asiatique [10].

Les génotypes 1a, 3 et 4 sont généralement transmis suite à l'usage de drogue par voie intraveineuse alors que les génotypes 1b et 2 correspondent plutôt à une transmission par transfusion sanguine ou nosocomiale [14].

Le génotype pourrait influencer le taux de progression vers la cirrhose ou le CHC [10].

- À l'échelle intra-individuelle : les quasi-espèces.

Chez un même hôte, plusieurs sous-populations co-existent. Elles dérivent toutes de la même souche, celle qui est à l'origine de l'infection. Leurs séquences nucléotidiques restent donc proches avec une variation comprise entre 1 et 5 % d'une quasi-espèce à l'autre [10].

Ce phénomène est une stratégie de persistance virale qui permet aux virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

L'arbre évolutif de la *Figure 6* répertorie les principales quasi-espèces en fonction de leur génotype et de leur sous-type.

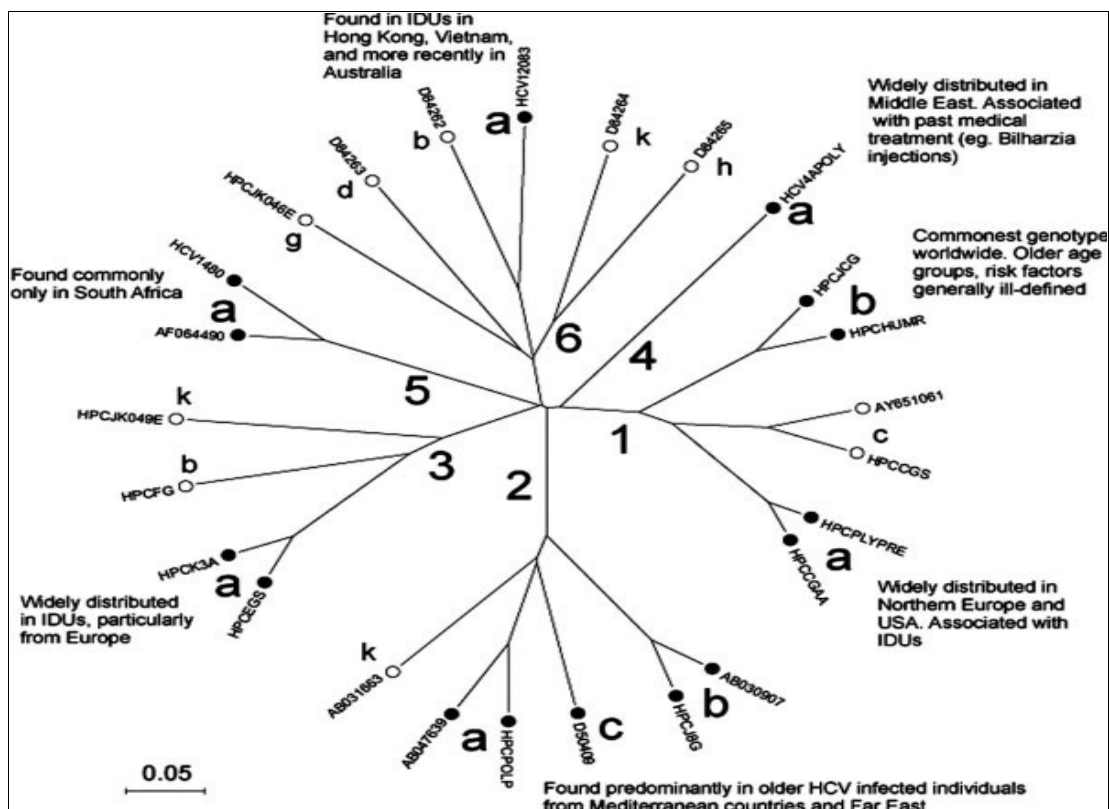


Figure 6 : Arbre évolutif des principales quasi-espèces identifiées, d'après Simmonds *et al.* [12]



## **I-2- Épidémiologie**

### ***I-2-1- Les modes de transmission***

Les expositions au sang, par voie parentérale, en grande quantité ou de façon répétée comme les transfusions ou l'usage de drogues par voie injectable sont responsables de la plupart des infections par le VHC [15].

Le VHC se transmet plus difficilement avec une dose faible et unique, par exemple une piqûre d'aiguille accidentelle. Le contact du sang avec les muqueuses lors d'un accouchement ou d'un rapport sexuel est également moins favorable à la transmission du VHC. Néanmoins, la transmission périnatale concerne 4 à 7% des grossesses lorsque l'ARN du VHC est détectable dans le sang maternel à l'accouchement. Le risque de transmission augmente en cas de co-infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [15].

Le VHC peut être responsable d'infections nosocomiales. Il existe aussi un risque accru de transmission dans les familles avec un membre séropositif au VHC [15].

D'autres modes de transmission sont possibles tels que les tatouages, les piercings, l'usage de drogue par voie nasale, l'acupuncture et la circoncision lorsque le matériel utilisé n'est pas stérilisé et est à usage multiple.

Dans les pays développés, l'usage de drogue par voie intraveineuse est la principale source de contamination actuelle. En effet, des mesures visant à réduire le risque transfusionnel ont été adoptées. Les donneurs sont sélectionnés et la recherche des anticorps anti-VHC dans le sang est obligatoire depuis 1990 en France. De plus en 2001, le dépistage du génome viral généralisé a été mis en place. Un risque résiduel de transmission persiste, il est lié à la fenêtre virologique. En effet, lorsque le prélèvement a lieu au cours de la phase précoce de l'infection, les marqueurs biologiques sont inexistantes. Pour la période de 2001 à 2003, le risque résiduel de transmission du VHC a été estimé à un pour dix millions de dons, soit un don potentiellement infecté tous les quatre ans en France [15].

Dans les pays en développement, les principales sources de contamination sont les transfusions et les injections thérapeutiques non sécurisées. D'après les estimations de l'OMS, elles étaient à l'origine de deux millions de nouvelles infections par le VHC en l'an 2000. Pour réduire ce risque, l'OMS a mis en place le « Safe Injection Global Network » (SIGN) [16].

D'après une étude réalisée en France sur les personnes diagnostiquées en 2004 [18], 36% des femmes avaient été contaminées par une transfusion avant 1991 et 46% des hommes suite à l'usage de drogue par voie intraveineuse. L'usage de drogues par voie nasale concerne 5% des femmes et 15% des hommes, dont 80% sont également usagers de drogue par voie intraveineuse (UDIV). Une exposition nosocomiale serait à l'origine de 20% des contaminations. Mis à part les transfusions sanguines avant 1991, 65% des infections nosocomiales seraient dues à une intervention chirurgicale, 12% à une endoscopie et 4% à une sclérose de varices. Chez 15% des patients, l'origine de la contamination reste inconnue.

L'étude TREND (Tendances Récentes Et Nouvelles Drogues) [19], réalisée en 2008 sur les injections à risque en milieu festif, révèle la pratique du partage des seringues, aiguilles et petits matériels (cuillère, eau, filtre). Il existe encore une méconnaissance du risque surtout en ce qui concerne le partage du petit matériel.

L'étude HEPAIG [20] a été réalisée en France chez les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH) infectés par le VIH. Cette étude fait suite à l'explosion de la transmission du VHC, en l'absence d'injection de drogue. Il s'agit d'une étude prospective sur les cas déclarés entre 2003 et 2005. Elle a permis d'établir un lien entre la contamination et des pratiques sexuelles traumatiques ou l'usage de drogues récréationnelles lors des rapports sexuels.

En l'absence de vaccin, les mesures préventives jouent un rôle essentiel dans la lutte contre de nouvelles contaminations par le VHC. Le dépistage systématique des dons du sang et les règles d'hygiène dans les établissements de santé ont permis de diminuer nettement le risque de transmission dans la population générale. De plus, des mesures de réduction des

risques ont été mises en place pour les usagers de drogues comme la délivrance en pharmacie des seringues et des Stéribox®. En France, la première salle de shoot devrait ouvrir à l'automne 2013 à titre expérimental. Les « salles de shoot » visent à encadrer l'injection de drogues par des professionnels de santé dans un lieu où des bonnes conditions d'hygiène sont assurées. Plusieurs salles d'injection existent déjà dans d'autres pays européens, notamment en Suisse, en Allemagne et aux Pays-Bas. La sensibilisation du public, notamment des groupes à risque et des jeunes joue également un rôle important dans la prévention des risques.

### ***1-2-2- Épidémiologie à l'échelle mondiale***

Selon l'OMS, 3 à 4 millions de personnes par an sont infectées par le VHC. La prévalence mondiale est de l'ordre de 2 à 3%. Environ 184 millions de personnes sont atteintes d'hépatite C chronique [1].

Les pays d'Amérique du Nord, d'Europe de l'ouest et du nord et l'Australie ont les prévalences les plus faibles. À l'inverse, les pays d'Asie et d'Afrique présentent les plus fortes prévalences. En Égypte, où la prévalence est la plus importante, celle-ci s'élève à 22% [17]. La *Figure 7* montre la prévalence dans les pays du monde.

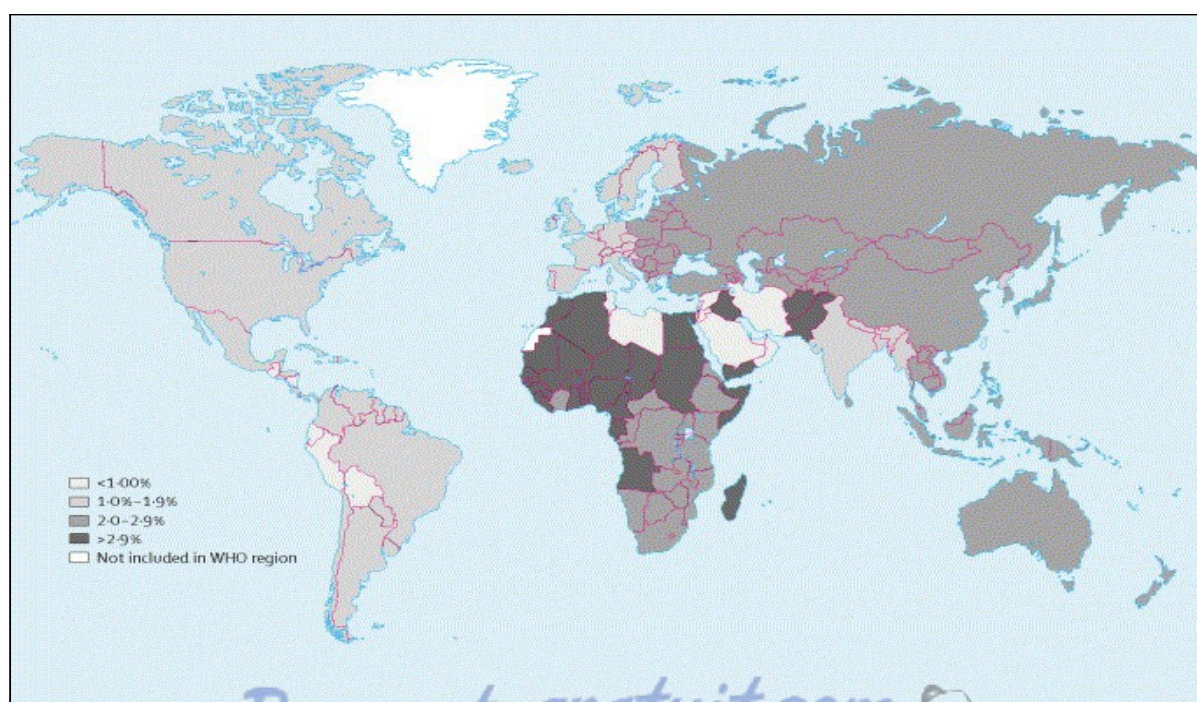


Figure 7 : Prévalence du VHC estimée par région en 2005, d'après l'OMS [17]

### ***1-2-3- Épidémiologie du VHC en France***

- Prévalence :

Selon une étude de 2004 réalisée chez les assurés sociaux [3], la prévalence des anticorps anti-VHC est de 0,84% chez les personnes de 18 à 80 ans. L'ARN viral est détecté chez 65% d'entre eux. Cela signifie que 0,53% de la population générale a une infection active par le VHC. Mais, 40% des personnes séropositives pour le VHC l'ignorent

Chez les femmes, la prévalence s'élève à 1,02% alors que chez les hommes elle est de 0,66%. Elle est la plus élevée entre 45 et 49 ans (2,28 %) et la plus faible chez les jeunes de 18 à 24 ans (0,04%). Elle varie selon les régions de résidence, de 0,35% dans le Nord-Ouest à 1,10% en Île-de-France. Chez les usagers de drogues, une séroprévalence de 59,8% est retrouvée, mais chez les usagers de drogue de moins de 30 ans, elle est de 28% [21].

- Incidence :

L'incidence est difficile à estimer puisque l'infection par le VHC est souvent asymptomatique et par conséquent, sous diagnostiquée. En l'an 2000, un système de surveillance du dépistage par un réseau de laboratoires d'analyse de biologie médicale privés et hospitaliers (« Rena-VHC ») a été mis en place par l'institut de veille sanitaire (InVS) [21]. Par ailleurs, dans le cadre du programme national de lutte contre l'hépatite C de 1999, l'InVS a mis en place un système de surveillance de l'hépatite C par les pôles de référence. Vingt-six services d'Hépatogastro-Entérologie des CHU de France ont participé au recueil des données chez les nouveaux patients pris en charge sur la période de 2001 à 2007 [17].

En 2001, 3 901 personnes ont été diagnostiquées, 4 259 en 2002. Ce nombre a diminué à partir de 2003 et en 2004, 3 417 personnes ont été diagnostiquées. Parmi les nouveaux patients diagnostiqués en 2004, il y avait 1 509 femmes avec un âge médian de 48 ans et 1 908 hommes avec un âge médian de 42 ans. Parmi les personnes diagnostiquées, 10,2% des femmes et 35,8% des hommes avaient une consommation excessive d'alcool. De plus, 88,9% des patients étaient virémiques. Une cirrhose ou un CHC étaient retrouvés chez 11,7% des patients diagnostiqués.

- Mortalité :

D'après une étude réalisée en France à partir des certificats de décès [23], 3 618 décès étaient associés à une infection par le VHC en 2001 dont 2 646 étaient imputables à cette infection. Le taux de décès imputables au VHC est égal à 4,5 pour 100 000 habitants. Quatre vingt-quinze pour cent des cas imputables au VHC avaient une cirrhose, associée à un CHC dans un tiers des cas. Dix pour cent des cas étaient co-infectés par le VIH [23].

En moyenne, les personnes avaient 66 ans lors du décès mais cet âge moyen s'élevait à 73 ans chez les personnes sans co-infection par le virus de l'hépatite B (VHB) ou le VIH et sans consommation excessive de boissons alcoolisées [23].

### **I-3- Physiopathologie de l'infection par le VHC**

#### ***I-3-1- L'hépatite aiguë***

L'hépatite C aiguë est asymptomatique chez 90% des personnes infectées [6]. Dans certains cas, une asthénie, une fièvre et des douleurs musculo-articulaires peuvent apparaître. Il est rare de voir des signes d'ictère.

L'hépatite C aiguë se caractérise par une élévation transitoire et modérée du taux de transaminases sériques. Le premier marqueur détectable est l'ARN qui apparaît une à deux semaines après l'exposition. Puis, les anticorps anti-VHC apparaissent dans un délai de sept à huit semaines après la contamination [24]. Dans 20% des cas, l'hépatite C se résout spontanément grâce à l'immunité innée et acquise [25]. L'ARN devient alors indétectable dans les trois à quatre mois qui suivent la contamination. Divers facteurs favoriseraient la clairance virale. Ainsi, celle-ci serait deux fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes, probablement en raison d'un taux d'œstrogène plus élevé. De même, une hépatite aiguë symptomatique serait le reflet d'une réponse immunitaire importante de l'hôte. Le polymorphisme du gène de l'interleukine 28B (IL28B) influencerait également la réponse immunitaire de l'hôte [26].

Les hépatites C fulminantes sont exceptionnelles voire inexistantes.

### ***1-3-2- L'infection chronique***

La réponse immunitaire n'est souvent pas suffisante et le virus y échappe. Ainsi, l'infection aiguë devient chronique dans environ 80% des cas [6]. L'hépatite C est dite chronique lorsque la réplication virale persiste plus de six mois après la contamination puisque la clairance virale spontanée ultérieure est très faible.

Au stade d'hépatite chronique, la plupart des patients sont asymptomatiques. Ils peuvent avoir des symptômes non spécifiques comme une asthénie, des arthralgies ou des myalgies. Au niveau virologique, le taux de transaminases peut être modérément augmenté ou normal [6].

L'évolution à long terme de l'infection chronique est variable. Des facteurs accélèrent la progression de la maladie comme l'acquisition à plus de 40 ans, le sexe masculin, la co-infection par le VIH, l'indice de masse corporelle élevé, la stéatose hépatique et la consommation d'alcool [24].

Une fibrose due à l'accumulation de la matrice extra-cellulaire dans le foie peut apparaître. Après 10 à 30 ans, 20 à 30% des patients développent une cirrhose. La cirrhose peut être associée à une insuffisance hépato-cellulaire. Elle peut décompenser suite à une hypertension portale (ascite, hémorragies digestives...). Chez les patients cirrhotiques, le risque de mortalité par complications est de 4% par an et le risque qu'ils développent un CHC est de 1 à 5% par an. Trente-trois pour cent des patients atteints d'un CHC décèdent dans l'année qui suit le diagnostic [27]. Au total, en cas de cirrhose, la survie à 5 ans est de 50%. La cirrhose décompensée est la première cause de transplantation hépatique [24].

L'histoire naturelle de l'hépatite C chronique est résumée dans la *Figure 8*.

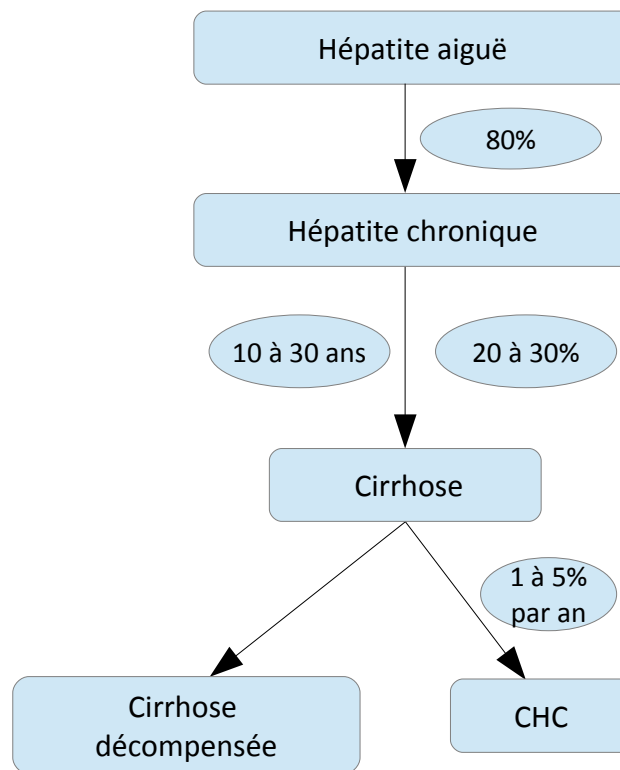


Figure 8 : Évolution de l'hépatite C chronique

### ***1-3-3- Les manifestations extra-hépatiques***

Au moins une manifestation extrahépatique apparaît chez 40 à 74% des patients atteints. C'est parfois le signal qui permet de révéler une hépatite C [28].

La cryoglobulinémie mixte est la plus fréquente de ces manifestations. Elle apparaît chez 19 à 50% des patients, parmi eux moins de 15% ont des symptômes. Les cryoglobulines sont des immunoglobulines qui précipitent à une température inférieure à 37°C. Elles sont produites suite à l'activation des lymphocytes B par le VHC. Leur dépôt au niveau des petits et moyens vaisseaux est à l'origine d'une vascularite systémique qui peut se manifester au niveau articulaire, cutané, rénal ou des nerfs périphériques notamment [28].

D'autres manifestations extrahépatiques telles que le lymphome, les troubles thyroïdiens, le diabète, la xérostomie et la xérophtalmie peuvent survenir.

## I-4- Dépistage et diagnostic de l'hépatite C

### I-4-1- Dépistage

Le dépistage consiste à détecter les anticorps anti-VHC grâce à un test « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » (ELISA) de 3<sup>ème</sup> génération.

Cette sérologie doit être réalisée chez les personnes à risque : antécédents de transfusion, de toxicomanie intraveineuse, d'acte médical ou chirurgical invasif, entourage familial d'un sujet atteint, enfant né de mère infectée par le VHC, patient hémodialysé, sujet infecté par le VIH, HSH, patient présentant une cytolyse hépatique ou une altération de l'état général. Elle est également réalisée chez les donneurs de sang [29]. Le dépistage peut être proposé ou réalisé de façon systématique lors de certaines consultations comme la médecine du travail par exemple.

En fonction du résultat au test, les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) [29] sont les suivantes :

- *Anticorps anti-VHC négatifs :*

Le résultat du dépistage doit être annoncé de la façon suivante : « absence de contact avec le VHC sauf infection récente avant séroconversion ou immunodépression sévère ».

En cas de suspicion d'infection récente, il faut refaire le dosage des anticorps anti-VHC trois mois après.

Chez une personne très immunodéprimée, il faut réaliser une recherche de l'ARN du VHC par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) sur le premier prélèvement.

- *Anticorps anti-VHC positifs :*

Il faut réaliser un nouveau test immuno-enzymatique avec un autre réactif sur un deuxième prélèvement.

Si la sérologie de contrôle est positive, le résultat à annoncer est « contact avec le VHC ». De plus, il faut rechercher l'ARN du VHC par PCR sur le deuxième prélèvement.



#### ***1-4-2- Démarche diagnostique***

Une fois que le patient a été dépisté, un bilan général est réalisé. Il permet de préciser le diagnostic, d'évaluer le niveau d'atteinte hépatique, de connaître l'environnement du patient et d'envisager la possibilité de traitement.

L'*interrogatoire* du patient renseigne sur divers éléments importants pour sa prise en charge tels qu'une toxicomanie, un abus d'alcool, une co-infection par le VIH ou le VHB.

L'*examen clinique* recherche des signes éventuels de cirrhose ou des manifestations extra-hépatiques.

Ensuite, les *examens complémentaires* suivants sont effectués :

- Le bilan virologique permet de déterminer la charge virale par PCR quantitative en temps réel et le génotype par séquençage de la région NS5B, 5'NC ou NS3.
- Le bilan biologique : Numération Formule Sanguine (NFS), Taux de Prothrombine (TP), dosages de l'Alanine Amino Transférase (ALAT), de l'Aspartate Amino Transférase (ASAT), de la Bilirubine, des Phosphatases Alcalines (PAL), des Gamma Glutamyl Transférases (GGT) et de l'alphafoetoprotéine.
- L'échographie hépatique est réalisée pour rechercher un CHC.
- La fibrose hépatique peut être évaluée par :
  - la ponction biopsie hépatique (PBH) ;
  - des méthodes plus récentes, dites « non invasives » qui regroupent les marqueurs sanguins de fibrose (Fibrotest®, Fibromètre®...) et l'élastographie impulsionnelle ultrasonore qui rend compte de l'élasticité du tissu hépatique (Fibroscan®) [30].

Le choix de la méthode d'évaluation de la fibrose hépatique dépend du profil du patient. Il est possible d'associer plusieurs méthodes. La classification des lésions histologiques en fonction du score Métavir qui prend en compte le stade de fibrose (F) et le grade de l'activité nécrotico-inflammatoire (A) est présentée dans le *Tableau 1*.

**Tableau 1** : Classification Métavir des lésions histologiques, d'après le Vidal Recos [31]

| <b>Activité nécrotico-inflammatoire</b> | <b>Degré de fibrose</b>                  |
|---|--|
| A0 : Absence d'activité                 | F0 : Absence de fibrose                  |
| A1 : Activité minimale                  | F1 : Fibrose portale sans septa          |
| A2 : Activité modérée                   | F2 : Fibrose portale avec quelques septa |
| A3 : Activité sévère                    | F3 : Fibrose septale sans cirrhose       |
|   | F4 : Cirrhose                            |

D'autres examens permettent de *rechercher des comorbidités* : les sérologies du VIH, du VHB et du VHA, un bilan immunologique recherchant la présence d'auto-anticorps, le dosage de l'hormone thyroïdienne (TSH), la glycémie, le bilan lipidique et l'évaluation de la fonction rénale [31].

De plus, si le patient est infecté par le génotype 1, le *génotypage de l'IL28B* est réalisé afin de prédire la réponse à la bithérapie. Le gène de l'IL28B code pour l'IFN- $\lambda$ 3 impliqué dans l'inhibition de la réplication virale. Ce gène se situe sur le chromosome 19 à proximité d'un des « Single Nucleotide Polymorphisms » (SNPs) qui est un facteur prédictif important de la réponse à la bithérapie. Ainsi, les porteurs de l'allèle C sur le SNP RS12979860, le plus fréquent chez les Caucasiens, ont plus de chance d'obtenir une réponse virologique soutenue (RVS) que les porteurs de l'allèle T [32,33].

La Figure 9 ci-dessous résume la démarche diagnostique.

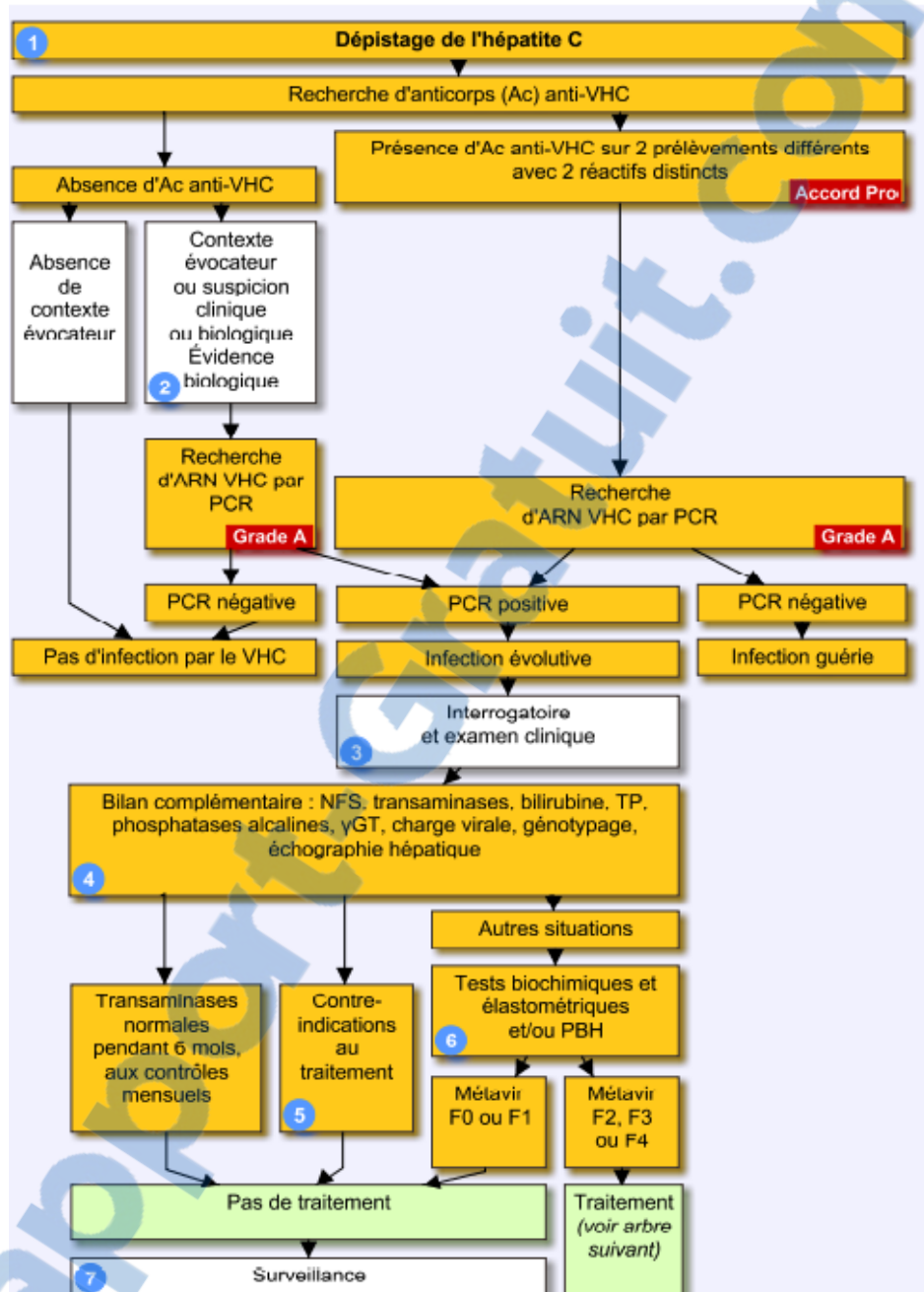


Figure 9 : Arbre décisionnel résumant la démarche diagnostique de l'hépatite C, d'après Vidal Recos [31]\*

\*Cet arbre décisionnel n'est pas conforme aux recommandations de l'AFEF.

## **I-5- Le traitement**

L'hépatite C est une infection curable, l'éradication virale est donc l'objectif majeur du traitement. Mais, le traitement permet également de ralentir l'évolution de la fibrose et de prévenir l'apparition d'une cirrhose ou d'un CHC.

Actuellement, le traitement des génotypes non 1 repose sur une bithérapie comprenant un peginterféron et la ribavirine. En 2011, les inhibiteurs de la protéase NS3 (IP) sont arrivés sur le marché. Ce sont les premiers inhibiteurs spécifiques de la réplication du VHC. Ils augmentent les chances de guérison des patients infectés par le VHC de génotype 1 lorsqu'ils sont associés à la bithérapie [11]. De nombreuses autres molécules qui possèdent une activité antivirale directe sont en cours de développement pour les différents génotypes.

### ***I-5-1- Traitement immunomodulateur : interférons alfa-2 pegylés et ribavirine***

La bithérapie par interféron alfa-2 pegylé et ribavirine constitue le "Standard Of Care" (SOC). La durée de traitement est comprise entre 12 et 72 semaines en fonction du génotype et de la réponse au traitement [27]. Lorsqu'ils sont associés à un inhibiteur spécifique du VHC, le bocéprévir ou le télaprévir, pour le traitement des génotypes 1, la durée de traitement est de 24 à 48 semaines [34].

#### **1-5-1-1- Propriétés et posologies**

- **Interférons alfa-2 pégylés :**

Les interférons ont une activité antivirale, antiproliférative et immunomodulatrice. Les interférons de la classe alpha sont produits par les cellules leucocytaires, c'est-à-dire les monocytes et les lymphocytes B, en réponse à une infection virale. Les sous-types recombinants alfa-2a et alfa-2b sont utilisés en thérapeutique. Ce sont des polypeptides de 165 acides aminés qui se distinguent par un acide-aminé différent en position 23 [35].

Les polypeptides alfa-2a et alfa-2b sont fixés à du polyéthylène glycol (PEG), respectivement ramifié ou linéaire. Les premiers ont une élimination hépatique et les seconds une élimination rénale majoritaire [34]. Cette forme pegylée permet d'allonger la demi-vie d'élimination et améliore les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'interféron. Ainsi, la fréquence des injections est réduite à une fois par semaine et l'efficacité est meilleure.

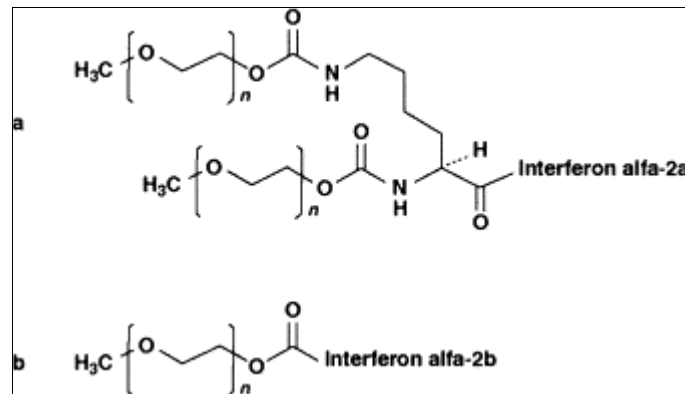


Figure 10 : Structure des interférons pegylés alfa-2a et alfa-2b, d'après K. Rajender Reddy *et al.* [36]

Ils sont commercialisés sous forme de solutions injectables par voie sous-cutanée et aux posologies usuelles suivantes :

- Interféron PEG alfa-2a (Pegasys®) : 180 µg/semaine
- Interféron PEG alfa-2b (Viraferonpeg®) : 1,5 µg/Kg/semaine

L'interféron peut être utilisé en monothérapie chez les patients dialysés, en cas d'hépatite C aiguë ou de contre-indication à la ribavirine [37].

- **Ribavirine :**

La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanine qui potentialise l'effet de l'interféron. La ribavirine est toujours utilisée en association avec un interféron.

La ribavirine est administrée par voie orale, à une posologie comprise entre 800 et 1200 mg par jour répartie en deux prises, au cours d'un repas. La dose est adaptée en fonction du poids et du génotype [27].

### **1-5-1-2- Contre-indications et effets secondaires**

- **Interférons alfa-2 pégylés :**

Les interférons sont contre-indiqués en cas d'affection cardiaque sévère, d'insuffisance rénale, hépatique ou médullaire sévère, d'épilepsie, d'atteinte des fonctions du système nerveux central, de troubles thyroïdiens non contrôlés, de grossesse et d'allaitement.

Les effets indésirables fréquemment rapportés sont les suivants : syndrome pseudogrippal, asthénie, anorexie, perte de poids et troubles digestifs. Au niveau cutané, ils peuvent provoquer des rashes, une alopecie ainsi qu'une inflammation au point d'injection. Au niveau du système nerveux central, leur effet va d'une irritabilité à un syndrome dépressif sévère.

De plus, ils présentent un risque de neutropénie et de thrombopénie. Il faut donc surveiller l'hémogramme et adapter les posologies en cas d'anomalie [27].

- **Ribavirine :**

La prise de ribavirine peut entraîner une anémie hémolytique. Il est possible d'administrer de l'érythropoïétine (EPO) lorsque le taux d'hémoglobine est inférieur à 10g/dL [27].

De plus, la ribavirine a un effet tératogène, elle provoque notamment une hémolyse chez le foetus au cours du 2<sup>ème</sup> et du 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse. Une contraception efficace est donc nécessaire pendant le traitement. Elle est à poursuivre pendant quatre mois après l'arrêt du traitement pour les patientes et pendant sept mois après l'arrêt du traitement pour les partenaires des patients de sexe masculin [38].

### 1-5-1-3- L'évaluation de la réponse virologique à la bithérapie

La charge virale est déterminée au début du traitement pour servir de valeur de référence au suivi de l'évolution de la quantité d'ARN du VHC. Pendant le traitement, la charge virale doit être déterminée à S4, S12 et toutes les douze semaines jusqu'à l'arrêt du traitement.

Il existe différents types de réponse virale au traitement en fonction de la diminution ou non de la charge virale et de sa rapidité. Celles-ci sont répertoriées dans le *Tableau 2*.

**Tableau 2** : Les types de réponse en fonction des charges virales à S4, S12 et S24, d'après l'EASL [27]  
D=DéTECTABLE ; I= IndéTECTABLE (charge virale inférieure à 50 UI/mL)

| Type de Réponse                        | Charge Virale |   |   |     |
|--|---------------|---|---|-----|
|  | S4            | S12   |   | S24 |
|  |               | Diminution inférieure à 2 log <sub>10</sub> | Diminution supérieure à 2 log <sub>10</sub> |     |
| Réponse nulle                          | D             | D   |   |     |
| Non réponse partielle                  | D             |   | D   | D   |
| DVR (« Delayed Virological Response ») | D             |   | D   | I   |
| EVR (« Early Virological response »)   | D             |   | I   | I   |

Vingt-quatre semaines après l'arrêt du traitement, la charge virale est à nouveau déterminée. Si l'ARN du VHC est :

- détectable alors qu'il était indétectable en fin de traitement, le patient est dit rechuteur.
- indétectable, la RVS est obtenue. Elle est associée à la guérison dans plus de 99% des cas [11]. La guérison se traduit par l'éradication du VHC avec la disparition de l'activité nécrotico-inflammatoire et une diminution de moitié de la fibrose en l'absence de cirrhose [27].

Divers facteurs influencent la réponse au traitement : la charge virale initiale, le degré de fibrose hépatique, le sexe et l'âge.

Le taux d'éradication virale dépend également du génotype. Par exemple, le traitement par bithérapie conduit à la guérison chez 42% des patients infectés par le génotype 1, versus 76% des patients infectés par le génotype 2. De même, le taux de guérison est de 46% avec le génotype 1, versus 82% avec le génotype 3 [11]. Pour le génotype 1, le taux de RVS obtenu au cours des essais variait de 42 à 52% [13].

De plus, la détermination du polymorphisme dans la région proche du gène IL28B est un facteur prédictif reconnu de la réponse au traitement. En effet, une étude parmi des Caucasiens infectés par le VHC de génotype 1 a montré que la RVS obtenue suite à une bithérapie est de 69%, 33% et 27% chez les patients respectivement porteurs des allèles CC, CT et TT [34].

#### ***I-5-2- Traitement antiviral spécifique : bocéprévir et télaprévir***

Le bocéprévir et le télaprévir sont les premiers inhibiteurs spécifiques du VHC. Ils sont dits "Specifically Targeted Antiviral Therapies for hepatitis C" (STAT-C) ou "Direct-acting Antiviral Agent" (DAA).

Le bocéprévir et le télaprévir sont des inhibiteurs de la sérine protéase NS3-4A du VHC de première génération. Ils sont utilisés en association au peginterféron-alfa et à la ribavirine, en raison du risque important de résistance associé à la monothérapie.

Ces nouveaux IP permettent d'augmenter les chances de guérison des patients atteints par le VHC de génotype 1, le plus fréquent dans le monde. D'après l'étude clinique de phase 3 ADVANCE, l'addition de douze semaines de télaprévir à une bithérapie de 24 à 48 semaines permet d'augmenter le taux de RVS de 44% à 75% chez les patients naïfs. De même, d'après l'étude clinique de phase 3 SPRINT-2 ("Serine PRotease INhibitor Therapy 2"), l'ajout de bocéprévir pendant 32 semaines à une bithérapie de 48 semaines permet d'augmenter le taux de RVS de 38% à 66% chez les patients naïfs [34].



### 1-5-2-1- Structure chimique et mécanisme d'action

- **Structure chimique :**

Les antiprotéases ont été développées en se basant sur la structure du peptide amino-terminal relargué lors du clivage par la protéase NS3-4A du VHC. En effet, des observations ont montré que ce peptide était capable d'inhiber l'activité enzymatique de la protéase NS3 [39].

Le télaprévir et le bocéprévir sont des peptidomimétiques linéaires avec une fonction alpha-kétoamide [10]. Leurs structures chimiques sont présentées dans la *Figure 11*.

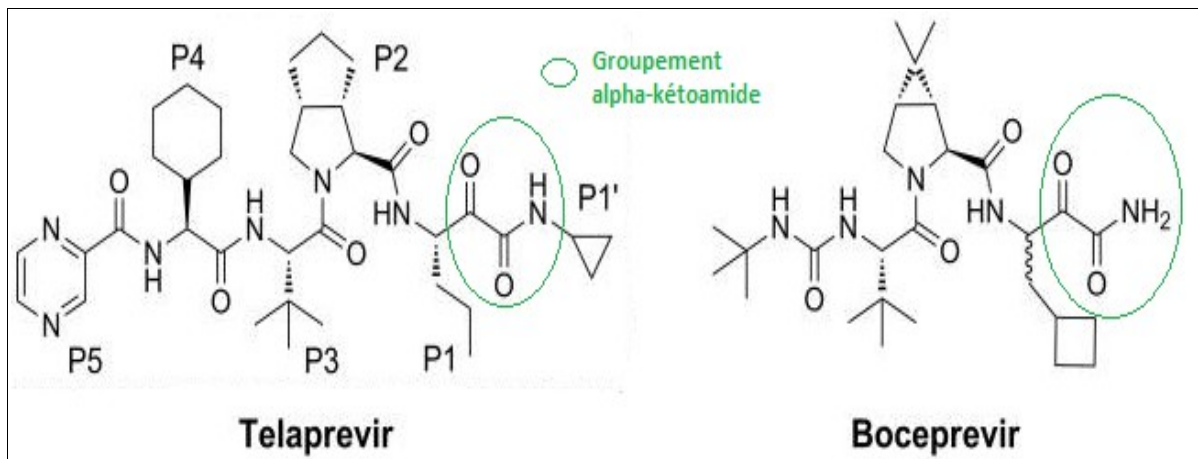


Figure 11 : Structure chimique du bocéprévir et du télaprévir, d'après KP. Romano *et al.* [40]

La forme administrée du bocéprévir se compose d'un mélange de diastéréoisomères en proportion égale. Dans le plasma, le diastéréoisomère inactif est converti en diastéréoisomère actif. Ainsi, la forme active est en quantité deux fois plus importante que la forme inactive à l'état d'équilibre [41].

- **Mécanisme d'action**

Le bocéprévir et le télaprévir entrent en compétition avec la polyprotéine précurseur au niveau du site de liaison au substrat de la protéase NS3-4A. Ils se lient à la protéine NS3

de façon covalente et réversible. La liaison se fait entre leur groupement alpha-kétoamide et la sérine du site actif de la protéase NS3-4A, en position 139 [41].

Les antiprotéases inhibent la maturation de la polyprotéine précurseur, une étape essentielle de la réplication du VHC.

### **1-5-2-2- Caractéristiques des deux spécialités**

Le bocéprévir et le télaprévir sont des médicaments de liste I soumis à prescription hospitalière et réservée aux spécialistes en hépato-gastro-entérologie, en médecine interne ou en infectiologie.

Avant juillet 2012, ces deux antiviraux étaient uniquement disponibles en rétrocession hospitalière. Ils sont maintenant délivrés en pharmacie d'officine [41,42].

Tableau 3 : Caractéristiques du bocéprévir et du télaprévir, d'après les RCP [41,42]

| Dénomination commune internationale | Nom commercial | Forme galénique      | Dosage | Date de l'AMM | Fabricant                        | Excipient à effet notoire               |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|--------|---------------|----------------------------------|---|
| bocéprévir                          | Victrelis®     | gélules              | 200 mg | 18/07/11      | Merck Sharp & Dohme Ltd.         | 56 mg de lactose monohydraté par gélule |
| télaprévir                          | Incivo®        | comprimés pelliculés | 375 mg | 19/09/11      | Janssen-Cilag International N.V. | 2,3 mg de sodium par comprimé pelliculé |

### **1-5-2-3- Schéma thérapeutique**

- **Bocéprévir :**

La durée de la thérapie varie en fonction du profil du patient et du taux d'ARN du VHC à la 8<sup>ème</sup> semaine de traitement. Les différents schémas thérapeutiques sont présentés dans le *Tableau 4*.

Tableau 4 : Les schémas thérapeutiques du bocéprévir en fonction du profil du patient, d'après le RCP [41]

| Profil du patient               | Taux d'ARN-VHC à S8 | Schéma thérapeutique   |   | Durée de traitement |
|---------------------------------|---------------------|--|---|---------------------|
| premier traitement              | indélectable        | « Lead in phase »<br><br>Bithérapie avec le peginterféron alfa et la ribavirine pendant 4 semaines | Trithérapie pendant 24 semaines.  | 28 semaines         |
|                                 | délectable          |  | Trithérapie pendant 32 semaines.<br>Puis, bithérapie avec le peginterféron alfa et la ribavirine pendant 12 semaines. | 48 semaines         |
| échec à un précédent traitement | indélectable        |  |   |                     |
|                                 | délectable          |  |   |                     |
| cirrhose et/ou répondeur nul    | indélectable        | Trithérapie pendant 44 semaines.   |   |                     |
|                                 | délectable          |  |   |                     |

Si les patients présentent une intolérance au bocéprévir, une anémie par exemple, il est possible de remplacer les douze dernières semaines de trithérapie par une bithérapie.

La trithérapie est arrêtée si le patient a un taux d'ARN du VHC supérieur ou égal à 100 UI/mL à la 12<sup>ème</sup> semaine de traitement ou un taux d'ARN du VHC détectable à la 24<sup>ème</sup> semaine de traitement [41]. Pour le suivi des trithérapies, le seuil de détection doit être inférieur ou égal à 25 UI/mL [43].

- **Télaprévir :**

Le télaprévir est administré en association avec un interféron alfa-2 pegylé et la ribavirine pendant les douze premières semaines de traitement.

La trithérapie est suivie d'une bithérapie d'une durée de :

- Douze semaines pour les patients naïfs ou en rechute de traitement dont l'ARN du VHC est indélectable à la 4<sup>ème</sup> et à la 12<sup>ème</sup> semaine de traitement. La durée totale de traitement est égale à 24 semaines (*Figure 12*).
- Trente-six semaines pour les patients naïfs de traitement ou en rechute de traitement dont l'ARN du VHC est détectable à la 4<sup>ème</sup> et à la 12<sup>ème</sup> semaine de traitement, pour les patients cirrhotiques et pour les patients répondeurs partiels ou nuls au précédent traitement. La durée totale de traitement est alors de 48 semaines (*Figures 12 et 13*).

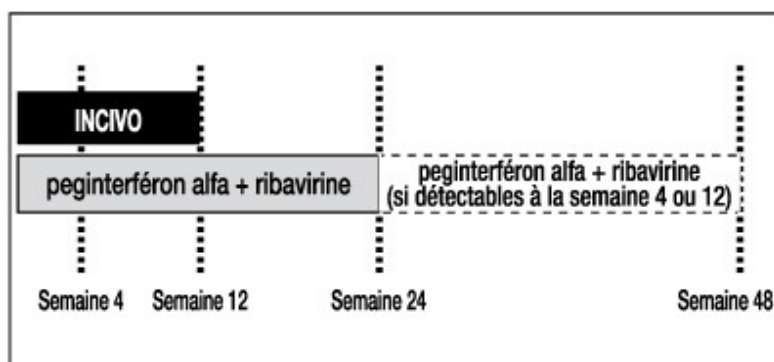


Figure 12 : Schéma thérapeutique avec Incivo® pour les patients naïfs de traitement ou en rechute, d'après le RCP [42]

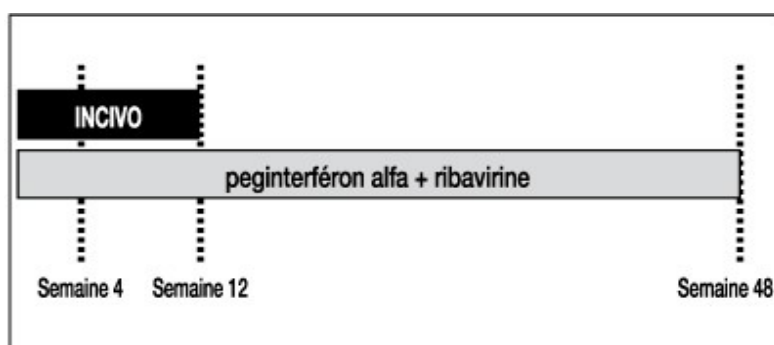


Figure 13 : Schéma thérapeutique avec Incivo® pour les patients préalablement traités répondeurs partiels ou répondeurs nuls, d'après le RCP [42]

Si les taux d'ARN du VHC sont supérieurs à 1 000 UI/mL à la 4<sup>ème</sup> ou à la 12<sup>ème</sup> semaine de traitement, il est recommandé d'arrêter la trithérapie. De même, si l'ARN du VHC est détectable à la 24<sup>ème</sup> ou à la 36<sup>ème</sup> semaine de traitement chez les patients dont la durée de traitement est de 48 semaines, il faut arrêter le peginterféron et la ribavirine [42]. En effet chez ces patients, les chances d'obtenir une RVS sont très faibles.

#### 1-5-2-4- Posologie et moment de prise

- **Bocéprévir** : quatre gélules de 200 mg trois fois par jour.
- **Télaprévir** : deux comprimés de 375 mg trois fois par jour.

Le bocéprévir et le télaprévir sont à administrer par voie orale toutes les huit heures avec un repas ou un en-cas afin d'améliorer l'absorption orale. Aucun ajustement thérapeutique n'est nécessaire en cas d'insuffisance rénale ou hépatique [41,42].

### **1-5-2-5- Contre-indications et interactions médicamenteuses**

Comme tout médicament, le télaprévir et le bocéprévir sont contre-indiqués en cas d'hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients. De plus, ils ne doivent pas être utilisés au cours de la grossesse ou de l'allaitement.

Ces deux médicaments sont des inhibiteurs des isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 du cytochrome P450. Ils peuvent donc ralentir l'élimination des médicaments métabolisés par ces isoenzymes et augmenter leurs effets indésirables. C'est pourquoi, ils sont contre-indiqués avec ceux qui exposent à des effets indésirables graves. Il existe un risque de dépression respiratoire avec le midazolam (Buccolam® ou Hypnovel®), un antiépileptique et le pimozide (Orap®), un neuroleptique ; un risque de rhabdomyolyse avec les statines, notamment avec la simvastatine et la lovastatine et un risque d'ergotisme avec les dérivés de l'ergot de seigle. Cette liste n'est pas exhaustive [44].

Ces molécules sont aussi des substrats des isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 du cytochrome P450. Les inducteurs du CYP3A comme le millepertuis et certains antiépileptiques tels que la carbamazépine (Tégréto®), la phénytoïne (Di-Hydan®) et le phénobarbital (Gardéna®) peuvent diminuer l'efficacité des IP. Ils sont contre-indiqués avec le télaprévir et déconseillés avec le bocéprévir. Au contraire, les inhibiteurs des isoenzymes CYP3A4 (les macrolides sauf la spiramycine, la cimétidine, le jus de pamplemousse....) et CYP3A5 (kétoconazole...) peuvent augmenter la toxicité du bocéprévir et du télaprévir [44].

Enfin, le télaprévir et le bocéprévir sont des substrats de la glycoprotéine P, un transporteur membranaire qui expulse ses substrats hors des cellules. Par conséquent, la glycoprotéine P diminue l'absorption intestinale et augmente l'élimination rénale et hépatique des médicaments. En présence d'inhibiteurs de la glycoprotéine P (atorvastatine, clarithromycine, érythromycine, kétaconazole...), les concentrations plasmatiques de bocéprévir et de télaprévir augmentent. Inversement, leurs concentrations plasmatiques diminuent en présence d'inducteurs de la glycoprotéine P (millepertuis, carbamazépine...) [45].

En raison du risque de bradycardie, le télaprévir est contre-indiqué avec les antiarythmiques de classe 1a comme le disopyramide (Rythmodan®) ou de classe 3 (amiodarone, sotalol...), à l'exception de la lidocaïne par voie intraveineuse [41,42].

#### **1-5-2-6- Effets secondaires et précautions d'emploi :**

Le risque d'anémie chez les patients sous trithérapie est plus important qu'avec la bithérapie. L'hémoglobinémie doit donc être contrôlée régulièrement.

Une numération des neutrophiles est à réaliser avant l'initiation du traitement et régulièrement par la suite car le risque de neutropénie est accru. Il est important d'évaluer et de traiter les infections rapidement [41].

Le bocéprévir et le télaprévir peuvent provoquer des hypokaliémies. Les troubles électrolytiques doivent donc être corrigés avant et pendant le traitement [44]. De plus, ces IP peuvent allonger l'intervalle QT et nécessite une surveillance cardiaque par ECG en raison du risque de torsades de pointe.

Des éruptions cutanées sévères ont été observées avec le télaprévir. Dans la plupart des cas, elles sont de type eczémateux et prurigineux avec une atteinte de plus de 50% de la surface corporelle. Plus rarement, des syndromes de Stevens-Johnson et des « Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms » (DRESS) peuvent apparaître. Le DRESS se manifeste par une éruption cutanée associée à une éosinophilie avec éventuellement de la fièvre, une lymphadénopathie, un oedème du visage ainsi qu'une atteinte du foie, des reins et des poumons. Dans la majorité des cas, il apparaît entre la sixième et la dixième semaine de traitement [42].

D'autres effets indésirables communs au bocéprévir et au télaprévir sont connus : fatigue, céphalées, nausées, troubles du goût et hypothyroïdies [44].

De plus, des troubles anorectaux de type prurit, hémorroïdes ou proctalgies peuvent survenir avec le télaprévir [44].

Sous trithérapie, les chances de guérison augmentent au détriment de la potentialisation des effets indésirables. Par conséquent, il est important d'informer le patient de ces effets indésirables.

Le suivi thérapeutique permet d'adapter le traitement pour assurer son efficacité tout en limitant ses effets indésirables. Au cours du traitement, le rapport bénéfice-risque est donc réévalué en fonction de la réponse virale et de la tolérance du traitement.

### ***I-5-3- Stratégies thérapeutiques***

À ce jour, les recommandations de l'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) prennent en compte les IP [34]. Les recommandations de l'European Association for the Study of the Liver (EASL) sont en cours de mise à jour [27]. L'Association Française pour l'Étude du Foie (AFEF) a publié une prise de position, suite à la mise à disposition des IP en pratique clinique [43].

- **Pour le génotype 1 :**

Selon l'AFEF, un traitement peut être envisagé pour tous les malades qui ont une hépatite C chronique, sauf en cas de cirrhose décompensée.

La décision de traiter ou non dépend du degré de fibrose. Si elle est :

- Sévère, le traitement doit être rapidement commencé. Mais, chez les répondeurs nuls à la bithérapie, seulement 40% des malades au stade F3 et 15% des malades au stade F4 obtiendront une RVS avec le télaprévir.
- Modérée, le traitement est indiqué chez les patients naïfs et rechuteurs. Il est discuté chez les répondeurs partiels et nuls.
- Non sévère, le traitement est discuté en fonction des facteurs de progression (âge, sexe, syndrome métabolique, activité nécrotico-inflammatoire), les symptômes et la motivation du patient.

La trithérapie est le traitement de référence des malades avec des facteurs prédictifs de mauvaise réponse tels qu'une fibrose sévère ou un échec suite à un traitement antérieur. Elle est à l'étude chez les personnes transplantées, dialysées ou co-infectées par le VIH.

La bithérapie pourrait être suffisante chez les malades avec des facteurs prédictifs de bonne réponse à la bithérapie comme les porteurs des allèles CC du gène IL28B.

- **Pour les génotypes non 1 :**

L'AMM du bocéprévir et du télaprévir est réservée au traitement du VHC de génotype 1. En effet, la variabilité génétique du VHC, notamment dans la région NS3 entraîne une diminution de l'efficacité de ces molécules sur les autres génotypes. À part le génotype 2, les autres génotypes présentent une résistance naturelle au bocéprévir et au télaprévir [46].

Les génotypes 2, 3, 4, 5 et 6 sont donc traités par la bithérapie comprenant la ribavirine et un interféron alfa-2 pégylé.

Quel que soit le génotype, en cas de cirrhose sévère ou de CHC, la transplantation hépatique est indiquée [37]. Quant aux patients non traités, ils sont suivis tous les six mois pour un contrôle de leurs fonctions hépatiques [37].



## **I-6- Résistance aux antiviraux**

### ***I-6-1- Le principe de la résistance virale aux “Direct-acting Antiviral Agent”***

La résistance virale est le phénomène de sélection des variants viraux porteurs des substitutions d'acides aminés qui entraînent une diminution de l'activité inhibitrice du médicament antiviral. En général, les variants résistants ont une capacité de réplication réduite par rapport aux variants sensibles. Mais, l'antiviral inhibe fortement la réplication du virus sensible et il inhibe de façon moins importante, voire nulle celle des variants présentant des résistances. S'ils ont une capacité de réplication suffisante ou si la concentration inhibitrice est insuffisante, les variants résistants peuvent se développer.

### ***I-6-2- La notion de barrière génétique***

La barrière génétique correspond au nombre de mutations nécessaires à un variant pour qu'il soit capable d'échapper à l'action d'un traitement donné. Si une mutation de résistance survient rapidement et diminue légèrement la capacité de réplication virale, la barrière génétique est faible. Au contraire, si une mutation de résistance entraîne une forte diminution de la capacité de réplication et qu'elle doit s'accompagner d'une ou de plusieurs autres mutations soit pour obtenir une résistance complète, soit pour récupérer sa fonction, la barrière génétique est élevée. Plus il faut de mutations à un variant résistant pour se développer en présence d'un antiviral spécifique, plus la barrière génétique est importante [46].

Pour les IP, la barrière génétique est variable en fonction du génotype et du sous-type. En effet, les résistances sont plus fréquentes avec le sous-type 1a qu'avec le sous-type 1b [47]. Par exemple, il faut deux mutations au sous-type 1b pour convertir, en position 155, le codon arginine en lysine alors que pour le sous-type 1a, une seule mutation suffit pour transformer l'arginine en lysine responsable de la résistance [48].

## **I-7- Nouvelles perspectives thérapeutiques**

Si les deux premiers inhibiteurs spécifiques du VHC, le télaprévir et le bocéprévir marquent une avancée majeure dans le traitement de l'hépatite C, ils ne sont pas efficaces à 100% sur tous les génotypes et sur tous les patients. De plus, le risque d'effets indésirables et de résistance n'est pas négligeable.

C'est pourquoi, d'autres DAA sont en développement. L'objectif est d'améliorer l'efficacité, la tolérance et la pharmacocinétique tout en diminuant les résistances au traitement. De plus, une action pangénotypique, c'est-à-dire sur tous les génotypes du VHC est recherchée.

En plus de la protéase NS3, d'autres cibles sont étudiées actuellement. Il s'agit notamment de la protéine NS5A et de la polymérase NS5B. Outre les protéines virales, les protéines cellulaires humaines impliquées dans le cycle viral comme la cyclophyline sont des cibles potentielles.

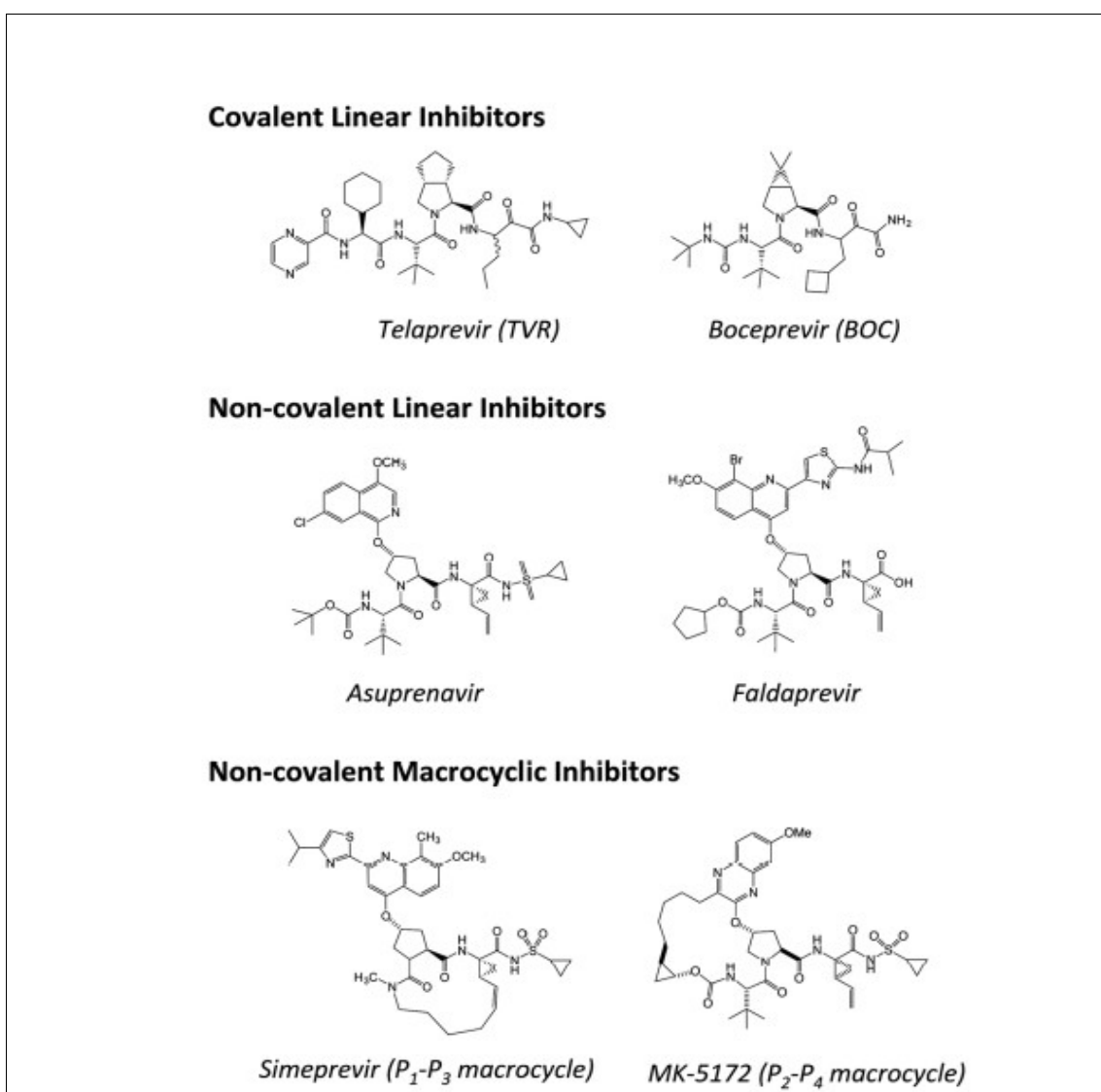
L'action des antiviraux à différents stades de la réplication du VHC permet d'obtenir une synergie et d'éviter les résistances croisées entre les molécules. Ainsi, un traitement de l'hépatite C par voie orale sans interféron serait envisageable [46].

### ***I-7-1- Les autres inhibiteurs de la protéase NS3-4A***

Les IP de première génération ont une action surtout sur le génotype 1. Ils ont un effet inhibiteur puissant mais une barrière génétique faible. Les IP dits de deuxième vague ont une efficacité équivalente à celle du bocéprévir et du télaprévir, mais leur pharmacocinétique et leur tolérance sont meilleures [49]. Les IP de deuxième génération ont une barrière génétique élevée et ils sont actifs sur tous les génotypes. Si le profil de résistance des IP de deuxième génération est amélioré, il existe toujours des résistances croisées communes à tous les IP [46].

Le ritonavir à faible dose est parfois utilisé comme booster des IP, comme cela est largement réalisé dans le traitement du VIH. En effet, cet antirétroviral est un puissant inhibiteur du métabolisme induit par le CYP3A. Il permet de potentialiser l'action de certains IP, d'espacer les administrations et de réduire les effets secondaires [49,50].

Les deux premiers inhibiteurs linéaires covalents, bocéprévir et télaprévir, ont été suivis des inhibiteurs linéaires non covalents et des inhibiteurs macrocycliques. Les IP macrocycliques ont l'avantage de mieux s'adapter à la structure de la protéase NS3 [46]. Les IP non covalents sont mieux tolérés et leur spectre d'action est élargi [51]. La *Figure 14* montre la classification des IP en fonction de leur structure chimique.



**Figure 14** : Classification des IP, d'après Aghemo *et al.* [51]

### ***I-7-2- Les inhibiteurs de NS5A***

NS5A forme le complexe de réplication avec NS3 et NS5B [52]. Les inhibiteurs de NS5A se lient au domaine I de NS5A pour inhiber la synthèse d'ARN viral [49].

La molécule la plus avancée dans les études est le daclatasvir. Elle présente une forte activité anti-VHC contre tous les génotypes. Cependant, sa barrière génétique est faible et les variants sélectionnés ont une bonne capacité de réplication. La résistance virale s'est révélée plus fréquente avec le sous-type 1a qu'avec le sous-type 1b [49]. D'autres molécules qui présentent une barrière génétique plus élevée ont été découvertes depuis [51].

### ***I-7-3- Les inhibiteurs de la polymérase NS5B***

- **Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques :**

Ils miment les substrats naturels de la polymérase au niveau du site actif. Lorsque la polymérase les incorpore, la synthèse de l'ARN se termine. Ils sont actifs sous forme triphosphate. Les kinases cellulaires effectuent trois phosphorylations pour les inhibiteurs nucléosidiques et deux phosphorylations pour les inhibiteurs nucléotidiques qui ont déjà un groupement phosphate dans leur structure [49].

Le site actif est hautement conservé parmi les différents génotypes, ce qui confère aux analogues nucléosidiques et nucléotidiques une activité pangénotypique. Leur barrière génétique est considérée comme élevée. Bien qu'une seule substitution suffise à entraîner une résistance, les variants résistants se développent lentement en présence de l'antiviral [49].

La molécule la plus avancée est le sofosbuvir, un analogue nucléotidique de l'uridine, actuellement en étude clinique de phase III [51]. Des analogues de la cytidine et de la guanosine sont également en développement.

- **Les inhibiteurs non nucléosidiques :**

L'ARN polymérase NS5B ARN-dépendante possède quatre sites allostériques sur sa surface. Lorsque les inhibiteurs non nucléosidiques se lient à l'un de ces sites, ils induisent des modifications structurelles qui inhibent la polymérase avant l'élongation.

Si l'enzyme est représentée sous forme d'une main, le pouce et la paume portent chacun deux sites de liaison. Il existe une grande variabilité des acides aminés à ce niveau, ces inhibiteurs ont donc un spectre d'action étroit. Les molécules actuellement en développement ciblent le génotype 1 ou plus spécifiquement le sous-type 1b [49].

Les inhibiteurs non nucléosidiques ont une barrière génétique faible et les variants résistants s'adaptent rapidement en présence de l'antiviral.

Plusieurs inhibiteurs non nucléosidiques sont actuellement en étude clinique de phase II. En raison de leur barrière génétique faible, les résultats des études les associant à un IFN pegylé étaient décevants [51]. Cependant, ces molécules pourraient être utiles dans des quadrithérapies [53].

la *Figure 15* ci-dessous compare les principales caractéristiques des classes de STAT-C.

|                              | Efficacy | Genotype dependency | Barrier to resistance |
|------------------------------|----------|---------------------|-----------------------|
| NS3/4A (protease inhibitors) | +++      | +++                 | ++                    |
| NS5A                         | +++      | +++                 | ++                    |
| NS5B (nucleos(t)ides)        | +++      | +++                 | +++                   |
| NS5B (nonnucleosides)        | ++       | +                   | +                     |

Figure 15 : Caractéristiques des classes de DAA, d'après Asselah *et al.* [54]

#### ***1-7-4- Les autres cibles potentielles***

- **NS4B :**

NS4B est une protéine membranaire qui se lie à l'ARN pour former le complexe de réplication. Le clémizole, un antihistaminique et la silibinine, une molécule présente dans l'extrait de chardon-marie ciblent NS4B [51].

- **p7 :**

Il s'agit d'une viroporine qui relargue les virions. Lorsqu'elle est bloquée, la production virale diminue. L'amantadine et la rimantadine sont des inhibiteurs de la p7 mais leur activité n'a pas été démontrée [51].

- **Inhibiteur de l'entrée cellulaire du VHC :**

Ils ont une action pangénotypique. Ils seraient particulièrement intéressants après une transplantation hépatique ou en cas de multirésistance [53].

La ferroquine est un antipaludéen qui inhibe la fusion des membranes cellulaires et virales. Cette molécule pourrait être utilisée dans les thérapies orales [51].

- **Les inhibiteurs de la cyclophiline :**

Les cyclophilines sont des protéines cellulaires humaines impliquées dans le repliement des protéines. La cyclophiline A interagit avec les protéines virales non structurales comme NS5A et NS5B pour réguler la réplication [49].

Les inhibiteurs de la cyclophiline ont une barrière génétique élevée. L'alisporivir, un analogue de la cyclophiline A sans effet immunosuppresseur a montré son efficacité sur les génotypes 1 à 4 chez les patients naïfs, non-répondeurs et co-infectés par le VIH [53]. L'alisporivir entraîne une potentialisation des effets secondaires lorsqu'il est associé à la bithérapie par IFN alfa-2 pegylé et ribavirine mais il pourrait avoir un intérêt dans les thérapies sans IFN [53].

La Figure 16 répertorie les molécules en étude clinique par classe de DAA.

|                                     | Phase 2   | Phase 3   | Licensed                 |
|-------------------------------------|---|---|--------------------------|
| <b>NS3/NS4A protease inhibitors</b> |   |   |                          |
| First generation                    | Danoprevir/r* (RG7227)<br>Sovaprevir (ACH-1625)<br>GS-9256<br>GS-9451<br>ABT-450/r*<br>Vaniprevir (MK7009)                              | Simeprevir (TMC435)<br>Faldaprevir (BI201335)<br>Asunaprevir (BMS-650032) | Boceprevir<br>Telaprevir |
| Second generation                   | MK-5172   |   |                          |
| <b>NS5B polymerase inhibitors</b>   |   |   |                          |
| Nucleos(t)ide analogs               | Mericitabine (RG7128);<br>IDX-184<br>PSI-7851   | Sofosbuvir (GS-7977)  | —                        |
| Non-nucleos(t)ide analogs           | VX-222<br>BMS-791325<br>ABT-333<br>ABT-072<br>Setrobuvir(ANA598)<br>BI207127<br>Filibuvir<br>IDX375<br>VCH-916<br>[tegobuvir (GS-9190)] | —   | —                        |
| NS5A inhibitors                     | ABT-267<br>GSK2336805<br>GS-5885  | Daclatasvir (BMS-790052)  | —                        |
| Cyclophilin                         | NIM-811; SCY-635  | [Alisporivir]   | —                        |

Figure 16 : Les DAA en étude clinique de phase II et III, d'après Stedman [55]

(r\* : associé au ritonavir ; [ ] : arrêt du développement)

### I-7-5- L'amélioration des traitements non spécifiques

Les interférons présentent certains avantages par rapport aux DAA. En effet, ils n'entraînent pas de résistance virale et bénéficient d'un important recul clinique. Ils sont aussi moins onéreux [53].

- **Analogues de l'interféron :**

L'interféron alfa-2B-XL, l'interféron oméga, l'albinterféron, le CR2b et l'interféron pegylé lambda-1 (IL-29) présentent un meilleur profil d'effets secondaires que les interférons pegylés alfa-2a et alfa-2b utilisés actuellement.

Les récepteurs à l'IFN pegylé lambda-1 sont plus spécifiques des hépatocytes que ceux des IFN pegylés alfa-1. Les études de phase 2b sur cet interféron montrent une meilleure efficacité avec une augmentation de la réponse virologique rapide. Parallèlement, les effets indésirables tels que le syndrome pseudogrippal, les symptômes musculo-squelettiques, l'anémie et la thrombocytopenie sont moins fréquents [52].

- **Analogues de la ribavirine :**

Le principal effet indésirable de la ribavirine est l'anémie qui concerne un tiers des patients traités. C'est l'accumulation de son métabolite dans les globules rouges qui entraîne une hémolyse.

La taribavirine est une prodrogue avec un groupement amidine qui inhibe l'entrée de la molécule dans les hématies. Elle a une meilleure spécificité hépatique, mais la diminution du risque d'anémie n'était pas significative d'après les études cliniques de phase III [52].

Il existe d'autres moyens d'améliorer l'efficacité antivirale de la bithérapie conventionnelle. Par exemple, des vaccins à base de la protéine NS3 permettraient d'augmenter le taux de RVS. De plus, des immunomodulateurs pourraient renforcer l'action de l'interféron en améliorant la réponse des lymphocytes T. Enfin, la diffusion virale pourrait être freinée par des inhibiteurs de la métalloprotéase, une enzyme qui dégrade la matrice extracellulaire [52].



Mais avec l'arrivée des STAT-C, des thérapies orales, c'est-à-dire sans interféron sont attendues. Ces thérapies associent au minimum deux DAA. Elles permettent d'éliminer la voie injectable et de diminuer les effets secondaires liés à l'interféron. Selon les cas, la ribavirine pourra être associée ou non [51].

De nouveaux DAA, actuellement en étude clinique, devraient être disponibles dans les prochaines années. Des IP plus efficaces pourront remplacer le bocéprévir et le télaprévir. Par ailleurs, d'autres molécules, qui agissent sur des cibles différentes vont apparaître. Par exemple, les inhibiteurs de NS5B pourront constituer une alternative aux IP dans des trithérapies ou être associés à ces derniers dans des quadrithérapies [51].

Le traitement optimal comprend une molécule à forte activité antivirale telle qu'un IP ou un inhibiteur de NS5A associé à une molécule à barrière génétique élevée telle qu'un inhibiteur nucléosidique ou nucléotidique de NS5B [51].

La sécurité d'utilisation, la tolérance et l'émergence de résistances restent à évaluer sur les molécules en développement. De plus, leur efficacité chez les patients à profil particulier tels que les cirrhotiques ou les transplantés est à démontrer. Sans oublier que le rapport coût/efficacité est aussi à prendre en compte dans les stratégies thérapeutiques [51].

## II- La protéase NS3-4A et les inhibiteurs de la protéase

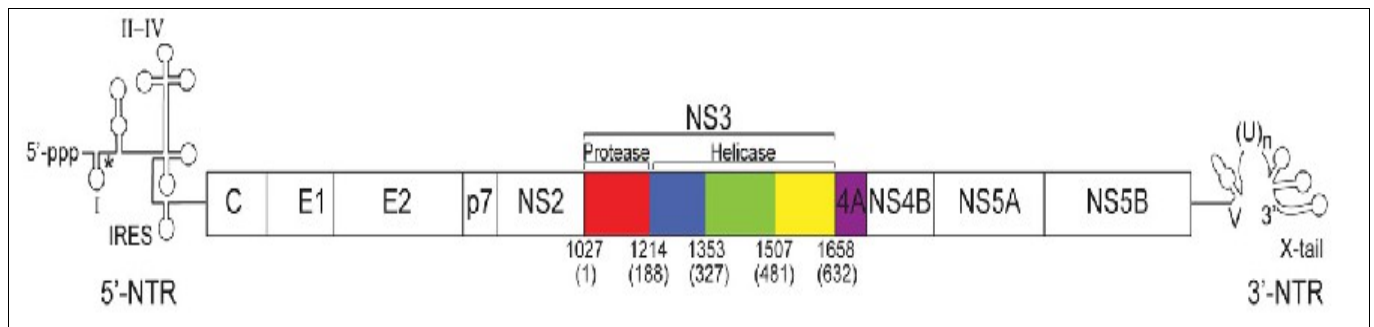
### II-1- La protéase NS3-4A

#### II-1-1- Structure

- **La protéine NS3 :**

La protéine NS3 a une masse de 67 kilodalton. Elle présente un domaine protéase dans le tiers amino-terminal et un domaine NTPase/hélicase dans les deux tiers carboxy-terminaux [56].

La *Figure 17* montre la place qu'occupe NS3 dans le génome du VHC.



*Figure 17* : Localisation de la séquence codant NS3 dans le génome du VHC, d'après Raney *et al.* [57]

- **Le complexe NS3/NS4A :**

La protéase NS3 présente deux domaines comprenant six feuillets bêta chacun [56]. Elle interagit avec la région centrale de NS4A, une petite protéine transmembranaire de 54 acides aminés, pour former le complexe NS3/NS4A. Les 22 derniers acides aminés de la partie amino-terminale de NS3 sont le site de fixation de NS4A [7].

La partie centrale de NS4A forme un feuillet bêta supplémentaire dans la partie amino-terminale de NS3 afin d'assurer le bon repliement de l'hétérodimère.

La partie amino-terminale hydrophobe de NS4A forme une hélice alpha qui permet l'intégration membranaire du complexe en coopération avec l'hélice alpha<sub>0</sub> de NS3. En effet, comme tous les virus à ARN à brin positif, le VHC a besoin d'un complexe membranaire pour la réplication de son génome.

La partie carboxy-terminale de NS4A joue un rôle dans la réplication de l'ARN du VHC et l'assemblage des protéines [39].

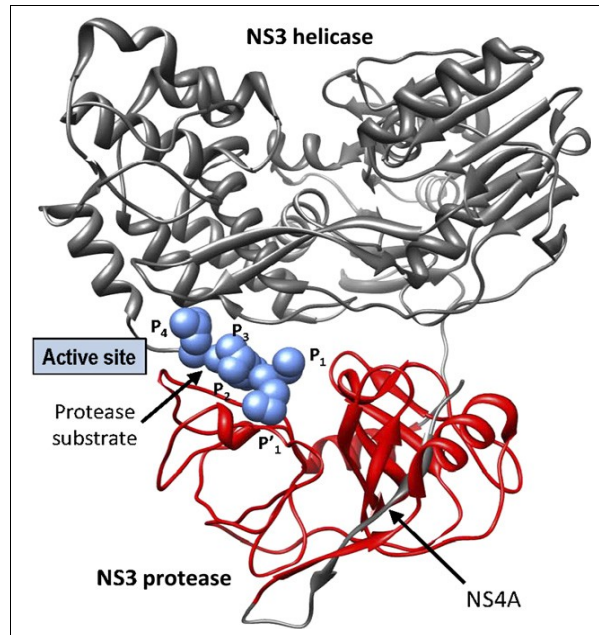


Figure 18 : Structure tridimensionnelle du complexe NS3/NS4A et de l'hélicase NS3, d'après Welsch *et al.* [58]

La protéase NS3 appartient à la famille des sérine protéases. Elle se compose de 189 acides aminés. Sa structure tridimensionnelle (Figure 18) a été établie par cristallographie aux rayons X [46].

La triade catalytique est constituée des acides aminés His-1083, Asp-1107 et Ser-1165 selon la numérotation du génome entier du VHC, soit Ser-139, His-57 et Asp-81 selon la numérotation du gène de la protéase NS3. Le site catalytique se situe en surface.

Le site de liaison au substrat se compose des acides aminés S6, S5, S4, S3, S2, S1, S1', S2', S3' et S4' selon la nomenclature de Schechter et Berger [59]. Dans la structure tridimensionnelle, les poches S1-S3 et S2-S4 sont proches [46].

L'enzyme présente également un site de fixation du zinc qui permet de stabiliser la structure.

## II-1-2- Fonction protéasique

La sérine protéase a un rôle dans la réplication virale, plus précisément au niveau de la maturation de la polyprotéine précurseur.

Elle clive le site NS3/NS4A en *cis*, elle présente donc une activité autocatalytique. Une fois que le domaine de la sérine protéase est associé au cofacteur NS4A, la protéase est stabilisée et active. Elle peut alors cliver les jonctions NS5A/NS5B, NS4A/NS4B et NS4B/NS5A en *trans* cette fois [56]. La *Figure 19* illustre le mécanisme d'action de la protéase NS3.

Les acides aminés du substrat sont numérotés de P6 à P4'. Ils sont clivés en deux peptides entre P1 et P1'. Le premier peptide, de P6 à P1 correspond à la partie carboxy-terminale et le second, de P1' à P4' correspond à la partie amino-terminale.

Le site de liaison au substrat peut contenir six acides aminés de P4 à P2' mais le clivage est plus efficace avec les substrats de dix acides aminés de P6 à P4' [57].

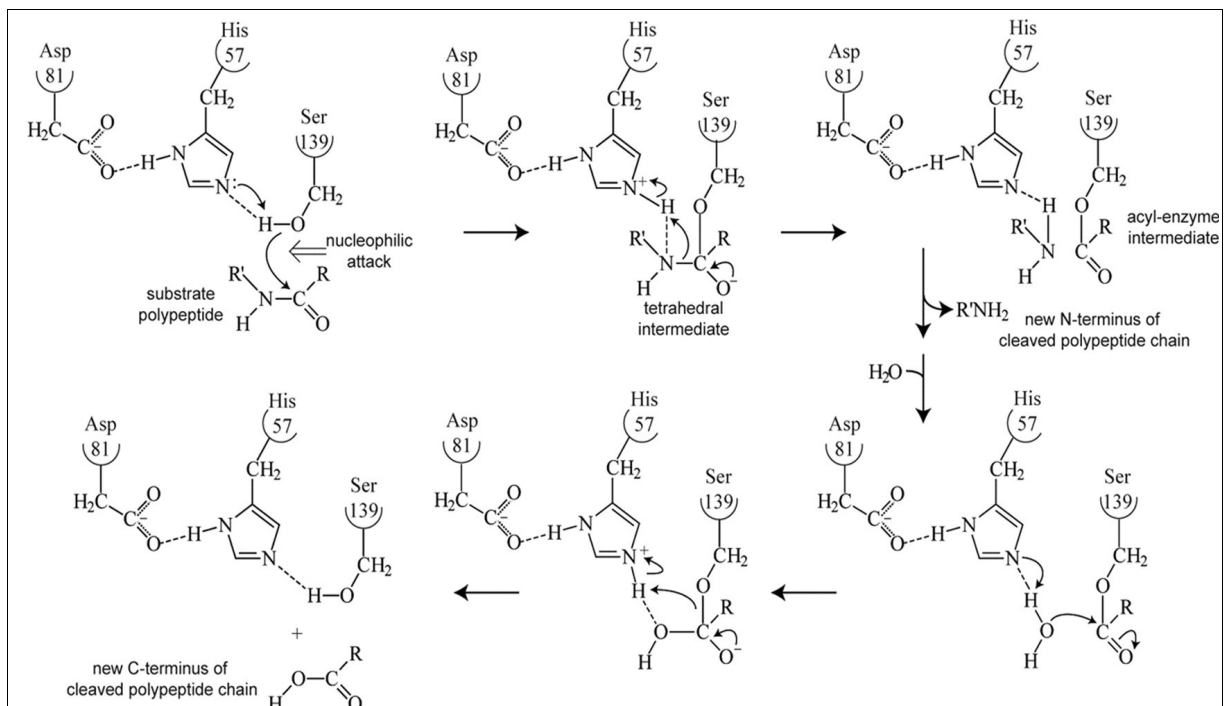


Figure 19 : Mécanisme d'action de la protéase, d'après Raney *et al.* [57]

Par ailleurs, la protéase NS3-4A clive et rend ainsi inactives des protéines impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte. Elle pourrait donc avoir un rôle dans la persistance de l'infection [39].

## **II-2- Le polymorphisme de la protéase du VHC et les mutations à l'origine de la résistance aux inhibiteurs de la protéase**

### ***II-2-1- Polymorphisme naturel de la protéase NS3***

Un individu infecté par le VHC a plusieurs variants génétiquement très proches, appelés quasi-espèces. Chez un patient naïf de traitement antiviral, le type sauvage est prépondérant. Il représente environ 95% de la population virale [4].

La protéase NS3 présente une séquence et une structure tridimensionnelle qui sont nécessaires à son fonctionnement. Ses domaines dits majeurs sont la triade catalytique ainsi que les sites de liaison au substrat, au cofacteur NS4A et au zinc. Le gène codant la protéase NS3 fait partie des régions les moins variables du génome du VHC.

Malgré tout, NS3 présente des mutations au niveau de sa séquence de nucléotides. Il existe deux types de mutation des acides nucléiques. Les mutations silencieuses sont celles qui ne changent pas la séquence d'acides aminés de la protéine virale. Les autres mutations modifient la séquence d'acides aminés de la protéine virale et entraînent donc l'apparition de variants.

La persistance des variants dépend de la tolérance de la protéase. En effet, elle doit absolument conserver sa fonction. Les régions les plus variables de NS3 sont les boucles situées entre les hélices et les feuillettes. Des mutations sporadiques ont été observées au niveau de la triade catalytique mais celles-ci sont probablement léthales puisqu'elles entraînent une perte de l'activité enzymatique [13].

## II-2-2- Les mutations de la protéase NS3 associées à une résistance aux inhibiteurs de la protéase NS3

### II-2-2-1- Les substitutions identifiées au niveau de la protéase NS3

Les substitutions d'acides aminés à l'origine de la résistance aux IP se trouvent à plusieurs positions dans la séquence protéique. Les profils de résistance varient d'un IP à l'autre.

Une revue de la littérature incluant tous les génotypes sur la résistance aux IP linéaires et macrocycliques a identifié 14 positions impliquées dans la résistance aux IP [46]. Le *Tableau 5* répertorie les substitutions qui ont été mises en évidence avec le génotype 1.

Tableau 5 : Substitutions de la protéase NS3-4A associées à des résistances aux IP et retrouvées lors des études in vitro (\*) et/ou des études cliniques (en rouge), d'après Halfon *et al.* [46]

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

- **Substitution de V36 et T54 :**

La valine (V) en position 36 et la thréonine (T) en position 54 ne sont pas directement en contact avec les IP. Leur substitution entraîne une modification de la structure secondaire de la poche de liaison au substrat P1', qui serait responsable de la résistance [60].

La valine-36 forme des liaisons de van der Waals avec un acide-aminé qui interagit avec un autre acide-aminé en contact direct avec la partie P1' de l'IP. Cette structure est déstabilisée lorsque la valine est remplacée par une méthionine, ce qui diminue la liaison hydrogène avec le bocéprévir ou le télaprévir. Ce sont les interactions indirectes non covalentes de l'étape de reconnaissance qui sont perturbées, avant la formation du complexe covalent entre la protéase NS3 et l'IP [46].

La thréonine-54, par l'intermédiaire de sa chaîne latérale et de la leucine-44, est en contact avec la sérine (S) en 139. Cette sérine est un acide-aminé du site actif impliqué dans la formation du complexe avec les IP de type ketoamide comme le télaprévir et le bocéprévir. La substitution de la thréonine en position 54 par une alanine (A) ou une sérine entraîne donc une résistance au bocéprévir et au télaprévir. La résistance est plus élevée lorsque la thréonine est substituée par l'alanine. Cette dernière substitution affecte plus le bocéprévir que le télaprévir. Ces substitutions n'influencent pas de façon significative sur les IP macrocycliques qui ne forment pas de liaison covalente avec la sérine-139 [46].

- **Substitution de A156 et R155 :**

L'alanine en position 156 et l'arginine (R) en position 155 sont proches du site actif. Leurs substitutions perturbent directement le contact entre la protéase et l'IP. Ce sont des résistances croisées entre les IP macrocycliques et linéaires [46,61].

- **Substitution de D168 :**

Les substitutions de l'acide aspartique (D) en position 168 par une alanine ou une valine sont plutôt associées à la résistance aux IP macrocycliques qui ont une grande poche P2, contrairement au bocéprévir et au télaprévir qui ont une petite poche P2. L'acide aspartique est chargé négativement alors que l'alanine et la valine sont apolaires et hydrophobes. Ces derniers empêchent la formation des ponts salins avec les acides aminés en position 123 et 155, qui correspondent respectivement aux parties S4 et S2 du site de liaison au substrat de la protéase. L'acide aspartique-155 est alors plus flexible et son interaction avec la large poche P2 des IP macrocycliques diminue.

En résumé, les IP linéaires sélectionnent les variants avec les mutations en position 36 et 54 alors que les IP macrocycliques sélectionnent plutôt ceux avec les mutations en position 168. Les substitutions en positions 155 et 156 sont responsables des résistances croisées communes à tous les IP. Au total, six positions sont à l'origine d'une résistance au télaprévir ou au bocéprévir : V36, T54, V55, R155, A156 et V170 [62].

Il est possible qu'il existe d'autres mutations qui n'ont pas encore été identifiées. En effet, les études ont été réalisées uniquement sur les 181 premiers acides aminés de la protéase. Il serait intéressant de rechercher d'autres mutations au niveau du cofacteur NS4A, du domaine hélicase de la protéase et des sites de clivage de la protéase [60]. De plus, avec l'utilisation des antiprotéases, d'autres résistances pourront survenir [13].

#### **II-2-2-2- Les niveaux de résistance**

La concentration efficace médiane (CE50) ou la concentration inhibitrice médiane (CI50) correspondent à la concentration de drogue requise pour inhiber la réplication virale à 50%. Pour chaque substitution, la mesure de la CE50 *in vitro* permet d'évaluer le niveau de perte de sensibilité d'un variant à un IP. Le « Fold Change » (FC) ou « Fold Resistance » (FR) est le rapport de la CE50 mesurée sur la CE50 de référence du type sauvage. Ce rapport reflète le niveau de résistance d'un variant.

Ainsi, les variants porteurs de la substitution T54A/M, V36A/M, R155K/T ou A156S ont une résistance faible au télaprévir puisque leur FC est inférieur à 25. Par contre, la résistance est élevée, avec un FC supérieur à 25, pour A156T/V et lorsque les substitutions V36M et R155K sont combinées [42].

De même, les variants porteurs de la substitution V36M, T54A/S, R155K, A156S ou V170A divisent la puissance du bocéprévir par deux à seize alors que ceux porteurs de la substitution A156T divisent la puissance du bocéprévir par cinquante [41].



Il existe des différences entre les niveaux de résistance du bocéprévir et du télaprévir pour une même substitution. La *Figure 20* compare l'effet des substitutions sur l'activité du télaprévir et du bocéprévir. T54A, V55A et V170A sont plus fréquentes et elles entraînent un niveau de résistance plus élevé avec le bocéprévir. Au contraire, A156S entraîne un niveau de résistance plus élevé avec le télaprévir [62].

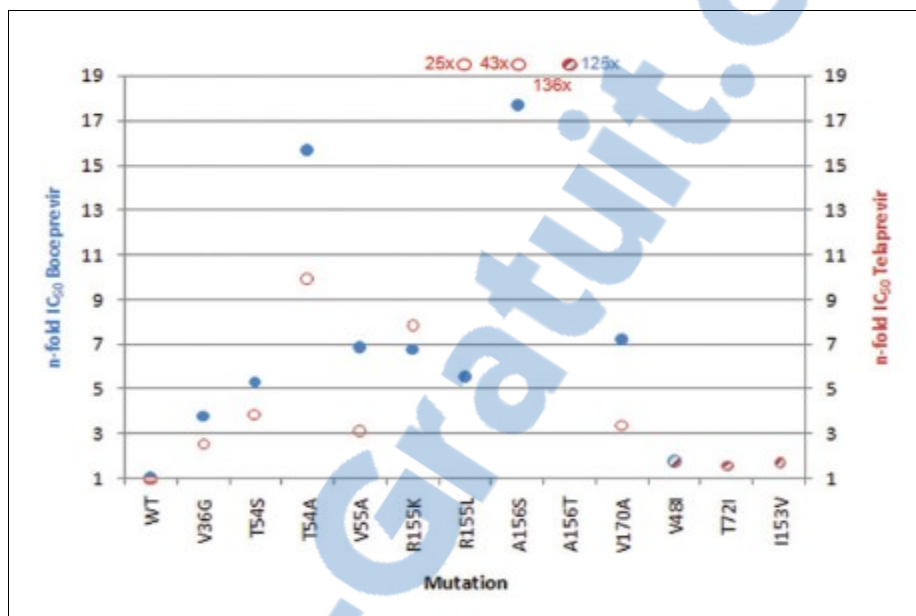


Figure 20 : Comparaison des Fold Change du bocéprévir et du télaprévir, d'après Susser *et al.* [62]

Ces résistances ont été mises en évidence lors des études cliniques de phase 1b au cours desquelles les IP étaient utilisés en monothérapie. En cas d'échec au bocéprévir ou au télaprévir, les plus communes sont V36M, T54S, R155K pour le sous-type 1a et T54A/S, V55A, A156S et V170A pour le sous-type 1b [47].

Par ailleurs, il a été démontré que la probabilité de résistance et de rechute augmente chez les patients porteurs de la substitution Q80K avec le simeprévir, un autre IP actuellement en étude clinique de phase 3. Cette substitution est fréquente dans le génome du VHC 1a [63].

Actuellement, le séquençage de la protéase NS3 n'est pas recommandé en routine. Dans le cadre de notre étude, nous l'avons réalisé avant la trithérapie et au moment d'un éventuel échec thérapeutique. Le profil de résistance des patients qui n'ont jamais reçus de traitement antiviral spécifique du VHC sert de référence en ce qui concerne les mutations présentes dans la population virale en pré-thérapeutique. À l'échec thérapeutique, le séquençage a pour but de rechercher la ou les substitutions qui sont présentes dans la population virale résistante à la trithérapie.

À plus large échelle, l'identification des résistances au niveau de la protéase NS3 permet de surveiller l'émergence de résistances liée à l'utilisation des IP. Les données recueillies en pratique s'ajoutent à celles des études cliniques pour améliorer les connaissances. Avec le recul acquis sur le long terme, les IP pourront être utilisés raisonnablement.

De plus, de nouveaux IP avec des profils de résistance différents devraient faire partie de l'arsenal thérapeutique dans les années à venir. D'autres DAA seront aussi prochainement disponibles. Dans ce contexte, le choix de l'association thérapeutique la plus judicieuse pourrait s'appuyer sur l'analyse des séquences. Le séquençage est d'ailleurs réalisé de façon systématique en ce qui concerne l'infection par le VIH.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

## I- Échantillons

Nous avons inclus dans notre étude 28 patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C de génotype 1 suivis au laboratoire de virologie du CHU d'Angers. Neuf patients étaient infectés par le sous-type 1a, quinze par le sous-type 1b et quatre pour qui le sous-type n'était pas déterminé. Le génotypage avait été réalisé au moment du diagnostic soit par la technique de génotypage par hybridation moléculaire INNO-LiPA (qui ne permet pas toujours de définir le sous-type), soit par séquençage de la région NS5B (polymérase) ou parfois de la région 5' non codante.

Tous les patients étaient suivis en hépato-gastro-entérologie au CHU d'Angers. À l'inclusion, certains patients étaient en échec d'une bithérapie antérieure, mais ils étaient tous naïfs de traitement par anti-protéase. Ils ont reçu un inhibiteur de la protéase : huit ont été traité par le bocéprévir et vingt par le télaprévir. Pour tous les patients, un séquençage de la protéase a été réalisé sur un échantillon pré-thérapeutique (échantillon issu du dosage de la charge virale pré-thérapeutique). Chez les patients présentant un échec thérapeutique, un deuxième séquençage a été réalisé sur un échantillon à l'échappement.

Les caractéristiques des patients à l'inclusion, issues des données disponibles au laboratoire de virologie, sont présentées dans le *Tableau 6*.

Tableau 6 : Caractéristiques des échantillons des patients à l'inclusion

| Identification | Age (ans) | Sexe | Génotype | Bithérapie dans le passé | Inhibiteur de la protéase |
|----------------|-----------|------|----------|--------------------------|---------------------------|
| 1              | 54        | H    | 1a/1b    | oui                      | Télaprévir                |
| 2              | 68        | H    | 1b       | non                      | Télaprévir                |
| 3              | 49        | H    | 1a/1b    | oui                      | Bocéprévir                |
| 4              | 62        | F    | 1b       | oui                      | Télaprévir                |
| 5              | 54        | H    | 1a       | non                      | Télaprévir                |
| 6              | 54        | H    | 1a       | oui                      | Bocéprévir                |
| 7              | 59        | H    | 1b       | oui                      | Télaprévir                |
| 8              | 78        | F    | 1b       | oui                      | Télaprévir                |
| 9              | 65        | H    | 1a       | non                      | Bocéprévir                |
| 10             | 59        | H    | 1b       | non                      | Bocéprévir                |
| 11             | 52        | H    | 1a       | oui                      | Bocéprévir                |
| 12             | 54        | F    | 1a       | non                      | Télaprévir                |
| 13             | 52        | H    | 1b       | non                      | Bocéprévir                |
| 14             | 56        | H    | 1b       | non                      | Télaprévir                |
| 15             | 75        | F    | 1b       | non                      | Télaprévir                |
| 16             | 57        | H    | 1a       | non                      | Télaprévir                |
| 17             | 47        | F    | 1b       | oui                      | Télaprévir                |
| 18             | 45        | F    | 1a       | non                      | Télaprévir                |
| 19             | 56        | H    | 1a       | non                      | Télaprévir                |
| 20             | 57        | H    | 1b       | oui                      | Télaprévir                |
| 21             | 63        | F    | 1b       | oui                      | Télaprévir                |
| 22             | 70        | H    | 1a/1b    | oui                      | Télaprévir                |
| 23             | 41        | H    | 1b       | non                      | Télaprévir                |
| 24             | 41        | H    | 1a/1b    | oui                      | Télaprévir                |
| 25             | 41        | H    | 1b       | oui                      | Télaprévir                |
| 26             | 57        | H    | 1a       | oui                      | Bocéprévir                |
| 27             | 56        | H    | 1b       | non                      | Télaprévir                |
| 28             | 60        | F    | 1b       | non                      | Bocéprévir                |

## **II- Méthode : de l'extraction de l'ARN du VHC au séquençage de la protéase NS3**

Les analyses des échantillons des 28 patients inclus dans notre étude ont été réalisées au laboratoire de virologie du CHU d'Angers. L'extraction de l'ARN viral, la préparation des réactifs pour la PCR, et le mélange réactif PCR/matériel génomique ont été effectués dans chacune des trois salles de la zone de pré-amplification du Département des Agents Infectieux. Une fois la PCR effectuée, la suite des manipulations s'est déroulée en zone de post-amplification sur le plateau technique de biologie moléculaire commun au pôle de biologie. Cette organisation permet de contrôler les risques de contamination des réactifs par les produits d'extraction et la contamination de la zone de pré-amplification par les produits de PCR.

### **II-1- Extraction de l'ARN viral**

L'ARN est extrait manuellement à l'aide du kit « QIAamp viral RNA Mini Spin» (Qiagen®).

Un millilitre de sérum est centrifugé pendant une heure à 19 980g et à 4°C. L'extraction est réalisée après avoir éliminé 860 µL de surnageant. Le culot remis en suspension dans les 140 µL restant est introduit dans un tube contenant le carrier et le tampon « Viral Lysis Buffer » (AVL), tampon de lyse qui permet de désactiver les RNases. Le carrier améliore la liaison de l'ARN à la QIAamp mini membrane et limite la dégradation par des RNases qui n'auraient pas été dénaturées. La lyse des particules virales nécessite dix minutes d'incubation à température ambiante.

Ensuite, l'éthanol absolu est ajouté afin d'obtenir une solution homogène qui est déposée sur une colonne de silice et centrifugée. Un premier lavage est effectué avec le tampon « Wash Buffer 1 » (AW1), puis un second avec le tampon « Wash Buffer 2 » (AW2).

Enfin, l'ARN viral est élué avec 60 µL de tampon « Viral Elution Buffer » (AVE). Cela permet de récupérer au moins 90% de l'ARN fixé sur la colonne [64].

## II-2- RT-PCR

La « Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction » (RT-PCR) est la transcription inverse de l'ARN en Acide Désoxyribonucléique (ADN) par une transcriptase inverse, suivie de l'amplification en chaîne de l'ADN par une *Taq* polymérase. Nous avons mis en œuvre une technique de RT-PCR conventionnelle, décrite par S. Vallet *et al.* [48].

Nous avons utilisé le kit Invitrogen™ « SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* High Fidelity» [65]. Ce kit comprend :

- la *SuperScript® III One-Step Reverse Transcriptase* : elle synthétise de l'ADN à des températures comprises entre 45 et 60°C. Elle permet d'obtenir une meilleure spécificité et un meilleur rendement que les autres transcriptases inverses.
- la *Platinum® Taq DNA polymerase* : il s'agit d'une *Taq* DNA polymérase complexée avec un anticorps qui bloque l'activité de la polymérase à température ambiante. Après l'étape de dénaturation dans le cycle de PCR, son activité est restaurée. De plus, une enzyme, la *Pyrococcus GB-D polymérase*, permet de corriger les erreurs de synthèse.
- le *2X Reaction Mix* : le mélange contient un tampon adapté à la reverse transcription et à la PCR, du  $Mg^{2+}$  et des dNTPs (désoxyribonucléotides Tri-Phosphate) nécessaires à la synthèse d'ADN.
- le *MgSO<sub>4</sub> [5 mM]* : il permet d'optimiser la concentration en  $Mg^{2+}$ .

Les amorces sens *NS3-G1FI-M13* et anti-sens *NS3-G1RI-M13* ont été utilisées, et si le signal était insuffisant, nous les avons remplacées par les amorces sens *NS3-MarsF3* et anti-sens *NS3-MarsR2*. Toutes les amorces ont été reconstituées à une concentration de 100 pmol/μL. La localisation de ces amorces est indiquée dans le *Tableau 7* [48].

**Tableau 7** : Les amorces spécifiques du gène de la NS3 protéase du VHC de génotype 1, d'après S. Vallet *et al.* [48] (H77 : séquence de référence)

| Amorce    | H77 localisation |
|-----------|------------------|
| G1F1-M13  | 3357-3390        |
| G1-R1-M13 | 4035-4071        |
| MarsF3    | 3309-3328        |
| MarsR2    | 4035-4054        |

La composition du mélange réactionnel pour la RT-PCR est indiquée dans le *Tableau 8*. Le volume total de chaque tube est de 20  $\mu\text{L}$  auquel 5  $\mu\text{L}$  d'ARN extrait sont ajoutés. Un puit est rempli avec de l'eau stérile. Celui-ci sert de contrôle négatif afin de s'assurer de l'absence de contamination.

Tableau 8 : Composition du mix de RT-PCR

| Composition  | Volume pour 1 tube |
|--|--------------------|
| Eau PPI  | 5,5 $\mu\text{l}$  |
| 2X Reaction Mix  | 12,5 $\mu\text{l}$ |
| MgSO <sub>4</sub> (5mM)  | 0,5 $\mu\text{l}$  |
| Amorce sens (10 $\mu\text{M}$ )  | 0,5 $\mu\text{l}$  |
| Amorce anti-sens (10 $\mu\text{M}$ )   | 0,5 $\mu\text{l}$  |
| Superscript®III Reverse Transcriptase avec Platinum® <i>Taq</i> DNA polymérase | 0,5 $\mu\text{l}$  |

Les barrettes sont placées dans un thermocycleur VERITY (Applied Biosystems) lorsque celui-ci a atteint la température de 50°C. Les différentes phases de la RT-PCR sont :

- la dénaturation de l'ARN suivie de la transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) ;
- la dénaturation du brin d'ARN et d'ADNc suivie de la synthèse du second brin d'ADNc ;
- les réactions d'amplification : chaque cycle comprend la dénaturation de l'ADN double brin, l'hybridation des amorces sens et anti-sens aux matrices d'ADN et l'élongation par la *Taq* polymérase à partir des DNTP libres du milieu réactionnel ;
- le cycle d'élongation finale à 68°C ;
- la conservation des amplicons à 4°C.

Les profils de RT-PCR avec chacun des couples d'amorces sont présentés dans les *Tableaux 9 et 10*.

Tableau 9 : Profil de RT-PCR avec les amorces NS3-G1F1-M13 et NS3-G1R1-M13

| Étape | Durée  | Température | Nombre de cycle |
|-------|--------|-------------|-----------------|
| 1     | 30min  | 55°C        | 1 cycle         |
| 2     | 2min   | 94°C        | 1 cycle         |
| 3     | 30sec  | 94°C        | 40 cycles       |
|       | 45sec  | 58°C        |                 |
|       | 1min30 | 68°C        |                 |
| 4     | 5min   | 68°C        | 1 cycle         |
| 5     | infini | 4°C         |                 |

Tableau 10 : Profil de RT-PCR avec les amorces NS3-MarsF3 et NS3-MarsR2

| Étape | Durée       | Température | Nombre de cycle |
|-------|-------------|-------------|-----------------|
| 1     | 30min       | 55°C        | 1 cycle         |
| 2     | 2min        | 94°C        | 1 cycle         |
| 3     | 30sec       | 94°C        | 40 cycles       |
|       | <b>1min</b> | <b>59°C</b> |                 |
|       | <b>1min</b> | 68°C        |                 |
| 4     | 5min        | 68°C        | 1 cycle         |
| 5     | infini      | 4°C         |                 |

### II-3- Électrophorèse et révélation des produits de PCR

Les produits de RT-PCR sont déposés sur un gel d'agarose standard Sigma® à 2% au bromure d'éthidium. Un mélange de bleu de bromophénol et de glycérol est ajouté à chaque produit de PCR afin de s'assurer que l'échantillon a bien migré. Un marqueur de poids moléculaire est aussi déposé dans chaque gel pour vérifier la taille des amplicons qui est de 680 paires de base (pb) avec les amorces G1F1/R1 et de 745 pb avec les amorces MarsF3/F2. La migration par électrophorèse s'effectue pendant 30 min à 135 Volts dans du tampon Tris Borate EDTA 0,5X. Ensuite, la révélation se fait sous la lampe aux ultraviolets.



## II-4- Purification des produits de la RT-PCR.

Cette première purification vise à purifier les produits de la RT-PCR par élimination des restes de réactifs (enzymes, dNTPs...). Nous avons suivi le protocole *NucleoSpin® Extract II*. Un éluat purifié est obtenu grâce à des lavages successifs. La concentration en produit est ensuite déterminée par une mesure au Nanodrop ND-1000, un spectrophotomètre UV/visible qui permet d'obtenir la quantité d'ADN à partir d'un très faible volume d'échantillon. En fonction des concentrations mesurées, des dilutions sont effectuées afin d'obtenir des concentrations proches de 10 ng/μL.

Les produits purifiés se conservent au congélateur à -20°C.

## II-5- PCR de séquençage

La PCR de séquençage est réalisée avec le kit *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. Le *Big Dye v3.1* est un mélange réactionnel comprenant la *Taq* polymérase, les quatre désoxynucléotides et les quatre didésoxynucléotides. Ces derniers sont des désoxynucléotides sans groupement 3'OH et ils sont marqués avec une molécule fluorescente spécifique de chaque nucléotide. Les couples d'amorce sont identiques à ceux de la RT-PCR.

La composition du mélange réactionnel pour la PCR de séquençage est indiquée dans le *Tableau 11*. Le volume total de chaque tube est de 10 μL dont 1 μL d'ADN purifié et dilué à 10 ng/μL.

Tableau 11 : Composition du mix de PCR de séquençage

| Composition    | Volume pour 1 tube |
|----------------|--------------------|
| Eau PPI        | 5,85 μl            |
| Tampon 5X      | 1 μl               |
| Big Dye v3.1   | 2 μl               |
| Amorce (10 μM) | 0,15 μl            |

Le profil de PCR de séquençage est présenté dans le *Tableau 12*. Il est le même, quelque soit le couple d'amorce utilisé. Cette PCR est effectuée dans un thermocycleur VERITY (Applied Biosystems). Les différentes étapes sont la dénaturation initiale, puis les cycles d'amplification comprenant la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

Les produits de PCR sont conservés à 4°C.

Tableau 12 : Profil de PCR de séquençage avec les couples d'amorce NS3-G1F1-M13/NS3-G1R1-M13 et NS3-MarsF3/NS3-MarsR2

| Étape | Durée  | Température | Nombre de cycle |
|-------|--------|-------------|-----------------|
| 1     | 1min   | 96°C        | 1               |
| 2     | 20sec  | 96°C        | 25              |
|       | 5sec   | 50°C        |                 |
|       | 4min   | 60°C        |                 |
| 3     | infini | 4°C         | 1               |

## II-6- Purification des produits de la PCR de séquençage

Dans chaque tube, 80 µL d'isopropanol est ajouté. Après 15 minutes d'incubation et 45 minutes de centrifugation à 1 800g, les impuretés sont éliminées par retournement des barrettes et l'ADN est récupéré sous forme de précipité. Ensuite du formamide est ajouté au culot pour dénaturer l'ADN. Les échantillons se conservent à 4°C jusqu'au passage dans le séquenceur.

## II-7- Séquençage

Le séquençage est réalisé avec un séquenceur ABI 3130 (Applied Biosystems) selon la méthode de Sanger (*Figure 21*).

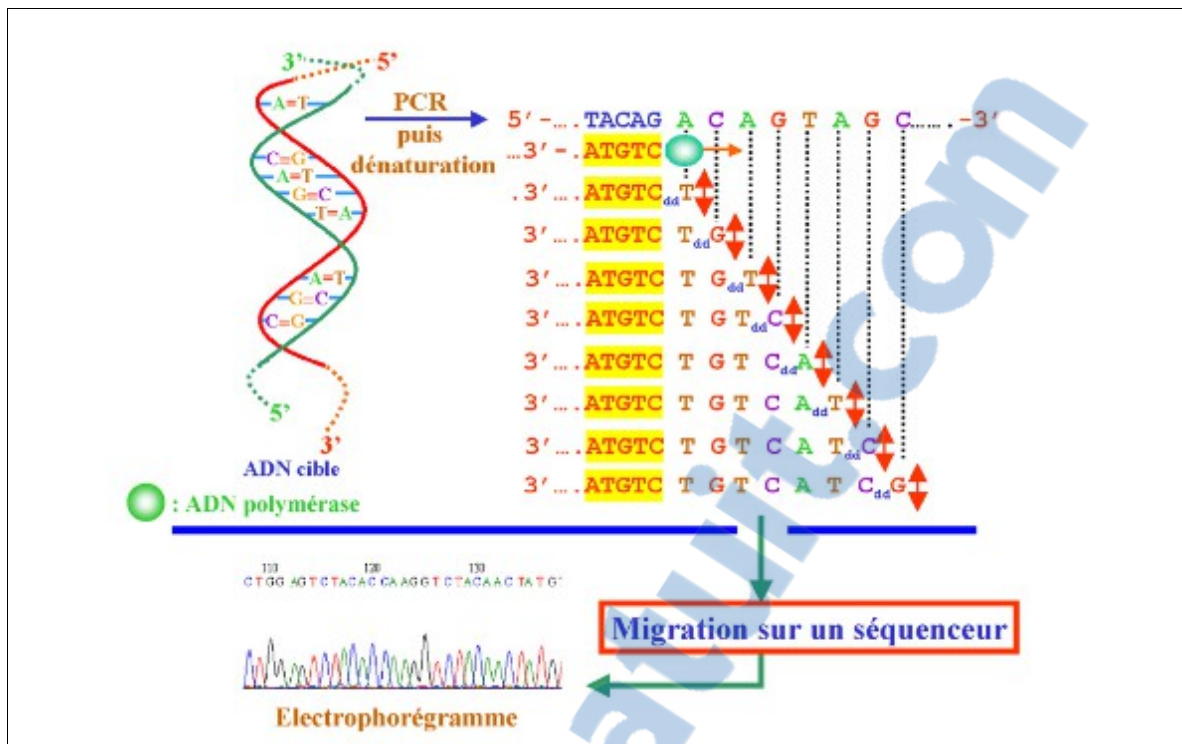


Figure 21 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger [66]

Cette méthode utilise des didésoxyribonucléotides marqués par des fluorochromes spécifiques de chaque nucléotide. Lorsque ces didésoxyribonucléotides sont incorporés, la synthèse de l'ADN est interrompue. Des fragments d'ADN de différentes tailles avec une base marquée à leur extrémité sont alors obtenus. L'électrophorèse capillaire sépare ces fragments en fonction de leur taille. Le passage de chaque taille de fragment sous un détecteur de fluorescence permet la détermination de la séquence.

## II-8- Analyse de l'électrophorégramme et des séquences protéiques

La lecture est effectuée sur le logiciel SeqScope®. Les séquences de nucléotides sont traduites en séquences d'acides aminés. Puis, les séquences de la protéase NS3 sont alignées par CLUSTALW® à l'adresse suivante <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>.

# RÉSULTATS

---

## **I- Les résultats du suivi biologique des patients**

Le suivi de la charge virale s'effectue avant, pendant le traitement et jusqu'à six mois après l'arrêt du traitement. Cela permet, soit de repérer les échecs thérapeutiques, soit de conclure qu'une RVS a été obtenue lorsque l'ARN du VHC reste indétectable jusqu'à la fin du suivi thérapeutique. Avec le matériel utilisé au laboratoire de virologie du CHU d'Angers, le seuil de détection est de 12 UI/mL.

Parmi les 28 patients que nous avons inclus, trois patients identifiés 9, 16 et 24 ont été perdus de vue. Parmi les 25 patients restants, les résultats sont les suivants :

- Dix patients ont obtenu une RVS ;
- Huit patients ont un ARN viral indétectable à ce jour mais ils sont toujours en cours de suivi, à un mois ou à trois mois du suivi post-thérapeutique ;
- Sept patients sont en échec de la trithérapie.

Le bilan des résultats chez l'ensemble des patients inclus dans cette étude est présenté dans le *Tableau 13*.

Le *Tableau 14* rappelle les caractéristiques des sept patients actuellement en échec.

Tableau 13 : Résultats de la trithérapie

| Identification | Génotype | Bithérapie dans le passé | Inhibiteur de la protéase | Réponse au traitement                |
|----------------|----------|--------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| 1              | 1a/1b    | oui                      | Télaprévir                | RVS                                  |
| 2              | 1b       | non                      | Télaprévir                | RVS                                  |
| 3              | 1a/1b    | oui                      | Bocéprévir                | RVS                                  |
| 4              | 1b       | oui                      | Télaprévir                | RVS                                  |
| 5              | 1a       | non                      | Télaprévir                | RVS                                  |
| 6              | 1a       | oui                      | Bocéprévir                | échec thérapeutique                  |
| 7              | 1b       | oui                      | Télaprévir                | RVS                                  |
| 8              | 1b       | oui                      | Télaprévir                | échec thérapeutique                  |
| 9              | 1a       | non                      | Bocéprévir                | Perdu de vue                         |
| 10             | 1b       | non                      | Bocéprévir                | RVS                                  |
| 11             | 1a       | oui                      | Bocéprévir                | échec thérapeutique                  |
| 12             | 1a       | non                      | Télaprévir                | échec thérapeutique                  |
| 13             | 1b       | non                      | Bocéprévir                | RVS                                  |
| 14             | 1b       | non                      | Télaprévir                | RVS                                  |
| 15             | 1b       | non                      | Télaprévir                | RVS                                  |
| 16             | 1a       | non                      | Télaprévir                | Perdu de vue                         |
| 17             | 1b       | oui                      | Télaprévir                | Indétectable 3 mois après l'arrêt    |
| 18             | 1a       | non                      | Télaprévir                | échec thérapeutique                  |
| 19             | 1a       | non                      | Télaprévir                | Indétectable 3 mois après l'arrêt    |
| 20             | 1b       | oui                      | Télaprévir                | Indétectable à l'arrêt du traitement |
| 21             | 1b       | oui                      | Télaprévir                | échec thérapeutique                  |
| 22             | 1a/1b    | oui                      | Télaprévir                | Indétectable 3 mois après l'arrêt    |
| 23             | 1b       | non                      | Télaprévir                | Indétectable 3 mois après l'arrêt    |
| 24             | 1a/1b    | oui                      | Télaprévir                | Perdu de vue                         |
| 25             | 1b       | oui                      | Télaprévir                | Indétectable 1 mois après l'arrêt    |
| 26             | 1a       | oui                      | Bocéprévir                | échec thérapeutique                  |
| 27             | 1b       | non                      | Télaprévir                | Indétectable 3 mois après l'arrêt    |
| 28             | 1b       | non                      | Bocéprévir                | Indétectable 3 mois après l'arrêt    |

Tableau 14 : Caractéristiques des patients en échec thérapeutique

| Identification | Age (ans) | Sexe | Génotype | Bithérapie dans le passé | Inhibiteur de la protéase |
|----------------|-----------|------|----------|--------------------------|---------------------------|
| 6              | 54        | H    | 1a       | oui                      | Bocéprévir                |
| 8              | 78        | F    | 1b       | oui                      | Télaprévir                |
| 11             | 52        | H    | 1a       | oui                      | Bocéprévir                |
| 12             | 54        | F    | 1a       | non                      | Télaprévir                |
| 18             | 45        | F    | 1a       | non                      | Télaprévir                |
| 21             | 63        | F    | 1b       | oui                      | Télaprévir                |
| 26             | 57        | H    | 1a       | oui                      | Bocéprévir                |

## **II- Les résultats du séquençage de la protéase NS3**

### **II-1- Les séquences de la protéase NS3 obtenues**

#### ***II-1-1- Échantillons pré-thérapeutiques***

L'ARN du VHC a été extrait et la région NS3 a été amplifiée puis séquencée pour les vingt-huit échantillons pré-thérapeutiques. Toutes les séquences ont pu être analysées, soit un taux de succès de la technique de 100%.

#### ***II-1-2- Échantillons des patients en échec thérapeutique***

Nous avons également analysé sept échantillons correspondant aux patients en échec de la trithérapie identifiés 6, 8, 11, 12, 18, 21 et 26. Nous avons réussi à amplifier et séquencer trois échantillons parmi les sept. Notre technique ne nous a pas permis d'amplifier quatre échantillons que nous avons alors adressés au laboratoire de virologie du CHU de Nantes. En effet, ce laboratoire a développé récemment une autre technique de séquençage de NS3 permettant aussi le génotypage du VHC. Ces quatre échantillons (11, 12, 21 et 26) ont été amplifiés et séquencés avec succès à Nantes. L'ensemble des séquences a ensuite été analysé.

### **II-2- Analyse des séquences de la protéase NS3**

La recherche des substitutions d'acides aminés impliquées dans la résistance aux IP a été effectuée au niveau de huit positions : 36, 54, 55, 80, 155, 156, 168 et 170.

## II-2-1- Analyse des séquences pré-thérapeutiques

Les résultats sont présentés dans le *Tableau 15*.

**Tableau 15** : Résultats de l'analyse des positions impliquées dans la résistance aux IP à  $t_0$   
 (\* = absence de mutation ; L = Leucine ; S = Sérine ; I = Isoleucine ; C = Cystéine)

|    | Charge virale<br>(log UI/mL) | Génotype | V36 | T54 | V55 | Q80 | R155 | A156 | D168 | V170 |
|----|------------------------------|----------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| 1  | 7,01                         | 1a/1b    | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 2  | 6,72                         | 1b       | L   | S   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 3  | 5,86                         | 1a/1b    | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 4  | 6,49                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | C    |
| 5  | 7,02                         | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 6  | 5,56                         | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 7  | 6,3                          | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 8  | 6,91                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 9  | 7,05                         | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 10 | 6                            | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 11 | 6,29                         | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 12 | 6,51                         | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 13 | 6,51                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 14 | 6,35                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 15 | 7,64                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 16 | 6,84                         | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 17 | 5,63                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 18 | 6,36                         | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 19 | 6,78                         | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 20 | 6,33                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 21 | 5,94                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 22 | 6,92                         | 1a/1b    | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 23 | 4,74                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 24 | 5,83                         | 1a/1b    | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 25 | 5,08                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 26 | 5,06                         | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |
| 27 | 6,81                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 28 | 6,34                         | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | I    |

Parmi les vingt-huit séquences analysées, les positions 55, 80, 155, 156 et 168 sont majoritairement conservées.

La valine (V) en position 170 est remplacée par une isoleucine chez 16 patients et par une cystéine chez un patient. L'isoleucine à cette position est la signature du sous-type 1a alors que la valine est en général conservée avec le sous-type 1b. Il existe peu de données sur les effets de ces substitutions [48].

La valine en position 36 est remplacée par une leucine chez le patient identifié 2. Cette substitution entraîne une résistance faible au bocéprévir et au télaprévir. C'est en général la signature du génotype non 1 [48].

De plus, pour le patient identifié 2, la thréonine (T) en position 54 est remplacée par une sérine. La substitution T54S entraîne une résistance légère au télaprévir et au bocéprévir. C'est la seule substitution impliquée dans la résistance aux IP à avoir été retrouvée en pré-thérapeutique et uniquement chez un patient.

### **II-2-2- Analyse des séquences chez les patients en échec thérapeutique**

Les résultats sont présentés dans le *Tableau 16*.

**Tableau 16** : Résultats de l'analyse des positions impliquées dans la résistance aux IP chez les patients en échec thérapeutique (\* = absence de mutation ; M = Méthionine ; K = Lysine)

|    | Charge virale (log UI/mL) | Génotype | V36 | T54 | V55 | Q80 | R155 | A156 | D168 | V170 |
|----|---------------------------|----------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| 6  | 3,76                      | 1a       | M   | *   | *   | *   | K    | *    | *    | I    |
| 8  | 6,06                      | 1b       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |
| 11 | 3,22                      | 1a       | M/V | *   | *   | *   | K    | *    | *    | *    |
| 12 | 2,47                      | 1a       | M   | *   | *   | *   | K    | *    | *    | *    |
| 18 | 6,21                      | 1a       | M   | *   | *   | *   | K    | *    | *    | *    |
| 21 | 1,99                      | 1b       | M/V | *   | *   | *   | K/R  | *    | *    | *    |
| 26 | 3,42                      | 1a       | *   | *   | *   | *   | *    | *    | *    | *    |



Chez les patients identifiés 6, 11, 12, 18 et 21, l'arginine (R) en position 155 est remplacée par une lysine et la valine en position 36 est remplacée par une méthionine. Lorsque ces deux substitutions sont combinées chez un même variant, elles entraînent une résistance élevée au télaprévir et au bocéprévir. Lorsque celles-ci sont présentes chez deux variants distincts, elles entraînent une résistance légère au bocéprévir et au télaprévir.

Chez les patients identifiés 11 et 21, les variants résistants et sauvages coexistent.

Chez les patients identifiés 8 et 26, aucune substitution à l'origine de résistance aux IP n'a été retrouvée.

## DISCUSSION

---

### **I- Les résultats du séquençage de la protéase NS3**

#### **I-1- Les difficultés techniques**

##### ***I-1-1- La charge virale optimale et une technique optimisée***

En l'absence de traitement antiviral, la charge virale est toujours assez élevée. Cela ne pose que peu de problème en pratique au laboratoire pour obtenir un séquençage correct de la région cible. Par contre, chez les patients en échec, le choix de l'échantillon est plus délicat. C'est un compromis entre la charge virale qui doit être suffisamment élevée et le laps de temps après l'identification de l'échec qui doit être le plus court possible.

La charge virale doit être suffisamment élevée pour extraire suffisamment d'ARN et obtenir une amplification par RT-PCR. De plus, un échantillon de sérum prélevé le plus tôt après l'échec contient une plus forte proportion de variants résistants. Les chances de détecter les résistances sont alors maximales.

Pour sélectionner les échantillons de sérum des patients en échec, nous avons donc tenu compte de ces deux critères afin de pouvoir identifier les résistances avant que la population virale redevienne proche de l'état initial. Nous avons en outre parfois pas le choix de l'échantillon en fonction des visites ou de la quantité de sérum disponible.

Nous avons été confronté à des échecs d'amplification et de séquençage pour quatre échantillons à l'échec. Nous les avons envoyé au laboratoire de virologie du CHU de Nantes. Ce laboratoire a développé une technique de séquençage de NS3 pangénomique [67]. Grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques de chaque génotype et sous-type, cette technique peut être utilisée en routine pour le génotypage du VHC. Elle permet dans le même temps de déterminer le profil de résistance aux IP. Ainsi, les résistances pré-existantes peuvent être détectées et l'émergence de variants résistants est surveillée tout au long du traitement.

De plus, cette méthode apparaît plus sensible que la technique que nous avons utilisée, elle permet de travailler sur des charges virales plus faibles qui sont retrouvées à l'échec, notre période d'intérêt pour l'identification des mutants résistants. La sensibilité peut être expliquée en partie par le protocole : ainsi la RT-PCR est partagée en deux étapes, la transcription inverse est suivie de la PCR et une PCR « nichée » est effectuée si nécessaire. Enfin, cette analyse unique est réalisable à partir d'un faible volume de sérum ou de plasma. Le coût du suivi n'est pas augmenté si le génotypage et la recherche de mutant en pré-thérapeutique sont combinés.

### ***I-1-2- La démarche qualité***

Comme le séquençage n'est pas réalisé en pratique clinique actuellement, il n'existe pas de méthode consensuelle validée qui décrit précisément le protocole à utiliser. Cependant, le groupe virologie de l'AC33-ANRS a proposé d'utiliser les couples d'amorces NS3G1 et Mars F3R2 pour la PCR. Ce protocole a été évalué comme technique de référence pour le premier contrôle de qualité interlaboratoire de recherche des mutations de NS3.

Cette étude multicentrique [63], a été réalisée dans 29 laboratoires français afin d'évaluer la fiabilité de leurs résultats. Chaque laboratoire avait douze échantillons à analyser. Deux échantillons correspondaient à des types sauvages, neuf à des mutants et un était négatif.

Sur les 23 laboratoires retenus, le pourcentage d'erreur était de 0,7%. D'une part, les établissements qui ne suivaient pas le protocole AC33 ont rendu des faux négatifs. D'autre part, une contamination, éventuellement croisée avec d'autres échantillons du panel a entraîné des faux positifs et des résultats discordants.

Au total, 60% des laboratoires ont obtenu 100% de résultats corrects. Cela prouve qu'une bonne qualité est possible lorsque le protocole AC33 et les précautions contre le risque de contamination sont respectées.

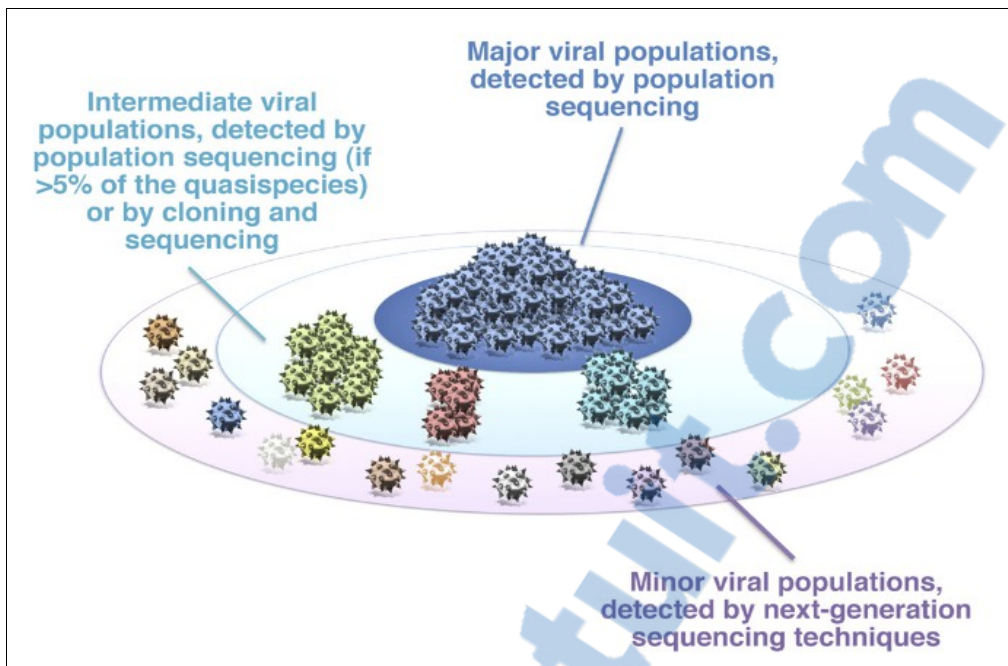
Le contrôle qualité permet d'identifier les sources d'erreur afin de les minimiser grâce à l'adoption d'une méthode standardisée fiable. Des précisions supplémentaires seraient nécessaires. Il faudrait notamment définir sur quels prélèvements effectuer la recherche des résistances et déterminer les positions à analyser lors de la lecture des séquences obtenues.

### ***I-1-3- Les limites du séquençage direct***

Nous avons utilisé le séquençage direct avec la méthode de Sanger. C'est la technique la plus souvent utilisée dans les laboratoires de virologie qui sont équipés de ce type de séquenceur. Cependant, cette méthode n'est pas capable de détecter les variants qui représentent moins de 20% de la population virale. Or, avant le traitement par un IP, les variants résistants sont minoritaires dans la population virale. Leur faible proportion est donc inférieure au seuil de détection. De même, en cas d'échec, la quantité de variants responsables de la résistance diminue rapidement.

Le séquençage à haut débit ou de dernière génération a une sensibilité supérieure. Il peut détecter les variants qui représentent seulement 0,1% de la population virale. Il existe différents types de séquençage de dernière génération comme le pyroséquençage. Le principe repose sur la détection d'un signal lorsqu'une base est incorporée pendant la polymérisation. En raison d'un grand nombre de séquences analysées, la composition précise de la population virale peut être évaluée. Si les séquences sont suffisamment longues, il est possible de différencier les mutations multiples combinées dans un même variant, de celles issues de variants distincts [68].

La *Figure 22* représente la distribution en quasi-espèces du VHC. Elle montre l'intérêt du séquençage de dernière génération pour détecter les mutations des variants résistants dont la quantité est souvent faible.



**Figure 22** : Distribution des quasi-espèces du VHC et méthodes de détection des populations virales majoritaires (plus de 10%), intermédiaires et minoritaires (moins de 1%), d'après Chevaliez *et al.* [68]

Lors du séquençage, des erreurs dues à la polymérase peuvent se produire. La précision des méthodes de séquençage de dernière génération serait comparable à celle de la méthode de Sanger. Elle est comprise entre 97 et 100% [68].

L'analyse et l'interprétation des nombreuses séquences obtenues avec le séquençage à haut débit est complexe. Elle nécessite l'intervention de bioinformaticiens et le développement d'outils qui permettraient de simplifier les données obtenues. C'est pourquoi, l'intérêt du séquençage à haut débit en pratique clinique reste actuellement discuté pour l'identification des résistances virales.

Par conséquent, il est probable que certaines mutations n'aient pas pu être détectées avec la méthode de séquençage direct que nous avons utilisée. Des méthodes de séquençage plus sensibles pourraient permettre d'obtenir des résultats plus complets. Elles pourraient être utiles pour suivre l'évolution de la population résistante suite à un échec thérapeutique ainsi que pour détecter les populations virales minoritaires en pré-thérapeutique. Cependant, ces nouvelles méthodes sont encore à améliorer afin d'obtenir des données pertinentes. De plus, le rapport bénéfice/coût est aussi à prendre en compte car ces méthodes sont plus coûteuses.

Le séquençage de NS3 implique l'utilisation d'une méthode suffisamment sensible pour que les variants résistants puissent être rapidement identifiés, même si la charge virale est faible. La méthode de séquençage direct que nous avons utilisée est capable de détecter les mutations en l'absence de pression de sélection si le variant représente une part suffisamment importante de la population. À l'avenir, le séquençage ultra-sensible pourra être utilisé, mais pour l'instant l'analyse et l'interprétation ne sont pas maîtrisées.

## **I-2- L'intérêt du séquençage de la protéase NS3**

Le séquençage de la protéase NS3 vient compléter le suivi biologique des patients. Leur profil de résistance peut être intéressant notamment pour identifier l'origine des échecs thérapeutiques. L'objectif est d'améliorer leur prise en charge ultérieure.

### ***I-2-1- Suivi des patients sous trithérapie au CHU d'Angers***

Pour la lecture des séquences, nous avons recherché les résistances au niveau des positions où des mutations ont été mises en évidence *in vivo* avec le génotype 1 [48]. Parmi les huit positions analysées, les substitutions Q80R et D168A/V concernent uniquement les IP macrocycliques. Il est malgré tout intéressant de les identifier puisque des IP macrocycliques sont susceptibles d'être utilisés à l'avenir.

Une étude multicentrique de l'ANRS [48] a été réalisée sur 233 séquences afin d'identifier les résistances naturelles du VHC des génotypes 1 à 5, en l'absence de pression de sélection par un DAA. Les substitutions R155K/T/M, A156S/V/T et V170A qui entraînent une résistance élevée au bocéprévir et au télaprévir n'ont pas été retrouvées. Sur les 81 patients infectés par le génotype 1, 95% avaient le virus sauvage qui ne porte pas de mutations responsables de résistance au bocéprévir et au télaprévir.

| V36L         | T54S            | Q80K            | Q80R        | D168E       | V170T       |
|--------------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| 2 sous-types | 2 sous-types 1a | 3 sous-types 1a | 1 sous-type | 1 sous-type | 1 sous-type |
| 1a           | 2 sous-types 1b | 2 sous-types 1b | 1b          | 1a          | 1b          |

Tableau 17 : Mutations à l'origine de résistance aux IP retrouvées chez les génotypes 1 dans l'étude de S. Vallet [48]

Dans notre étude, seules les mutations V36L et T54S ont été retrouvées en pré-thérapeutique. Elles étaient associées chez un même patient. Celui-ci a malgré tout obtenu une RVS. Cette population virale qui pré-existait en quantité suffisamment importante pour être détectée en séquençage direct n'a donc pas été sélectionnée sous la pression d'un inhibiteur de la protéase.

En position 170, un polymorphisme naturel est observé, sans impact sur l'efficacité des IP. Certaines mutations n'ont pas été retrouvées en pré-thérapeutique, cela peut s'expliquer par le faible nombre de patients inclus dans cette étude par rapport à l'étude de l'ANRS.

L'association des mutations V36M et R155K a été retrouvée chez cinq patients parmi les sept échantillons de patients en échec analysés. Cette association est responsable d'une résistance élevée au bocéprévir et au télaprévir. Cela explique donc l'échec thérapeutique. Pour les deux autres patients, aucune substitution n'a été identifiée. Il est possible que la proportion de variant résistant était trop faible dans les échantillons prélevés pour pouvoir mettre les substitutions en évidence avec notre technique de séquençage ou que notre échantillon était trop éloigné du début de l'échec.

Les causes de résistance ont pu être identifiées par le séquençage sur le prélèvement correspondant à la mise en évidence de l'échec thérapeutique chez cinq patients parmi les sept patients en échec thérapeutique. Cependant, ces résistances n'avaient pas pu être détectées avant le début du traitement. Inversement, la détection des résistances avant le début du traitement n'exclut pas le succès de la trithérapie, en particulier si le niveau de résistance est faible.

Actuellement, les mutations identifiées en pré-thérapeutique, ne permettent pas de prédire la réponse au traitement par un IP. Il faudrait pouvoir évaluer l'impact clinique des mutations en fonction du niveau de résistance qu'elles induisent. Un recul clinique est nécessaire pour que les cliniciens puissent orienter leur choix thérapeutique en fonction du profil de résistance des patients.

Si l'identification d'une mutation à l'échec thérapeutique n'a pas d'impact sur la décision clinique d'arrêt du traitement, il peut être utile d'identifier l'origine de l'échec pour adapter un traitement ultérieur.

De plus, un meilleur recul d'utilisation pourrait contribuer à l'amélioration de la prise en charge des patients infectés par le VHC. L'objectif est d'éviter le développement des résistances au traitement qui rendrait les DAA inefficaces.

### ***1-2-2- Étude multicentrique***

Comme nous avons effectué cette étude sur un petit échantillon, il serait intéressant de regrouper les données recueillies pour en faire une analyse multicentrique. D'autres centres ont en effet effectué des études similaires. C'est pourquoi, un projet d'étude multicentrique est en cours (projet ANRS NRMUT, S. Larrat et S. Vallet, groupe Virologie AC33-ANRS).

Avec l'apparition récente des IP dans le traitement de l'hépatite C, la mise en commun de ces données permettrait d'améliorer les connaissances sur la résistance du VHC aux IP. Il serait aussi intéressant de confronter nos résultats à ceux obtenus dans des centres comme Paris ou Bordeaux qui disposent d'un séquenceur de dernière génération. Les résultats obtenus sont certainement plus complets et plus précis. Ainsi, une coopération avec les autres centres permettrait une meilleure compréhension de la réponse du VHC aux trithérapies.

D'autre part, les études multicentriques permettent de confronter les résultats des études cliniques à ceux de la pratique. L'objectif est d'évaluer l'intérêt du séquençage en pratique clinique.



### **I-3- Les autres facteurs d'échec thérapeutique**

Dans notre étude, des patients sont en échec thérapeutique alors qu'aucune mutation n'avait été détectée en pré-thérapeutique. La pré-existence de variants résistants n'est pas la seule cause d'échec thérapeutique. D'autres facteurs liés au médicament ou au patient influencent la réponse au traitement.

- **L'efficacité du traitement :**

La probabilité de sélectionner des variants résistants dépend de l'efficacité du traitement. En effet, plus l'activité antivirale est élevée, plus le risque de sélection est faible.

Ainsi, l'association de plusieurs drogues antivirales qui agissent en synergie permet d'augmenter les chances de guérison. C'est pourquoi le taux de guérison avec la trithérapie est plus faible chez les patients en échec d'une bithérapie antérieure.

De plus, l'observance des patients est déterminante.

- **L'atteinte hépatique :**

L'émergence des variants résistants est facilitée par le renouvellement des hépatocytes et leur prolifération. Normalement, la demi-vie des hépatocytes est de cent jours. Mais, elle peut être réduite à moins de dix jours en cas de nécrose, d'inflammation ou de toxicité hépatique associée.

La proportion de cellules hépatiques infectées par le VHC a également une influence sur le pronostic [46].

- **Les autres facteurs :**

L'âge, les traitements antérieurs, le métabolisme, la réponse immunitaire, la présence de sites de réplication virale isolés et le polymorphisme génétique influencent également la réponse au traitement.

Pour conclure, les virologues sont partagés sur l'utilité du séquençage de la protéase NS3 en pratique clinique. En effet, le profil de résistance ne modifie pas la stratégie thérapeutique car il n'est pas considéré comme un facteur pronostic pour l'instant.

Dans notre étude, une population virale résistante a été détectée en pré-thérapeutique alors que le patient a obtenu une RVS. Inversement, aucune population virale résistante n'avait été détectée avant traitement chez les patients en échec thérapeutique. La probabilité de voir une population virale résistante émerger n'est visiblement pas proportionnelle à la proportion de variant résistant présent en pré-thérapeutique. Le séquençage direct que nous avons utilisé, a un seuil de détection trop élevé pour détecter les populations virales résistantes minoritaires en pré-thérapeutique, qui peuvent émerger sous la pression de sélection.

Si la méthode de séquençage direct n'est pas la plus sensible, elle est quand même capable de mettre en évidence les mutations à l'origine de la plupart des échecs thérapeutiques.

Il semble important de suivre l'évolution des profils de résistance sur le long terme afin d'éviter l'émergence de variants résistants aux IP. De plus, lorsque d'autres DAA seront disponibles pour traiter l'hépatite C, le profil de résistance pourra être pris en compte pour le choix du traitement optimal qui offre les meilleures chances de guérison.

## **II- La place du pharmacien d'officine dans la prise en charge de l'hépatite C**

Nous avons vu qu'une activité antivirale élevée permet d'assurer l'efficacité du traitement en évitant le développement des résistances du VHC aux IP. En effet, les IP ont une barrière génétique faible. Cela signifie qu'une mutation suffit pour entraîner une résistance. C'est pourquoi, ils sont associés à la bithérapie conventionnelle.

Une bonne observance du traitement est donc nécessaire pour garantir l'efficacité du traitement. Le pharmacien d'officine qui délivre le traitement mensuellement occupe une place de choix pour évaluer l'observance.

Si la trithérapie a nettement augmenté les chances de guérison, elle s'accompagne d'une augmentation du risque d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses. Là aussi, le pharmacien d'officine peut orienter et conseiller les patients dans la gestion de leur traitement.

### **II-1- Rôle du pharmacien d'officine lors de la délivrance**

L'hépatite C est une affection longue durée appartenant au groupe des maladies chroniques actives du foie et des cirrhoses. À ce titre, les patients bénéficient d'une prise en charge à 100% par la sécurité sociale pour le traitement relatif à cette affection.

Le pharmacien a un rôle à jouer dans le suivi du patient à l'officine. Lors de la première délivrance, il explique les enjeux du traitement à son patient et l'informe des effets indésirables possibles. À l'occasion de chaque renouvellement, il le questionne sur la tolérance de ses médicaments. De plus, le fichier informatique du patient permet la centralisation des ordonnances émanant de prescripteurs multiples. Il peut ainsi repérer la prise d'autres médicaments qui ne seraient pas compatibles avec le traitement antiviral. Enfin, ses conseils contribuent au bon usage des médicaments par le patient.

### ***II-1-1- La détection des interactions médicamenteuses***

Le pharmacien effectue une analyse pharmaceutique afin de détecter d'éventuelles interactions médicamenteuses. Il peut proposer au patient de créer un dossier pharmaceutique qui sera consulté et alimenté à chaque délivrance afin de sécuriser la délivrance.

De manière générale, il faut évaluer le rapport bénéfice/risque de la co-prescription des médicaments qui interagissent avec le CYP450.

Les inducteurs puissants du CYP3A diminuent l'efficacité des IP. C'est le cas du millepertuis, contenu dans certains médicaments de phytothérapie.

Les inhibiteurs enzymatiques comme le kétoconazole, la cimétidine et le jus de pamplemousse exposent les patients à un surdosage en IP. La cimétidine qui peut être proposée en conseil officinal est donc à écarter. Le jus de pamplemousse est également à déconseiller.

Les IP ont un effet inhibiteur enzymatique. Il faut être particulièrement prudent avec les médicaments à marge thérapeutique étroite en raison du risque de toxicité important. La surveillance sera renforcée afin d'adapter les posologies si besoin. Par exemple, les patients sous antivitamine K doivent effectuer un contrôle rapproché de leur « International Normalized Ratio » (INR), en particulier au début du traitement, afin d'éviter le risque hémorragique [43].

Par ailleurs, la trithérapie peut entraîner une fatigue, des étourdissements, des syncopes et une vision trouble [41,42]. Les médicaments à effet sédatif sont déconseillés car ils potentialisent le risque d'inaptitude à conduire ou à utiliser des machines.

En cas de cirrhose, le métabolisme hépatique est diminué, il peut donc être nécessaire d'adapter les posologies de certains médicaments.

Les interactions médicamenteuses avec le bocéprévir et le télaprévir sont nombreuses. Elles concernent aussi bien les médicaments sous prescription médicale que les médicaments non listés. C'est pourquoi, il est essentiel de sensibiliser les patients aux risques de l'automédication.

### ***II-1-2- Les conseils associés***

- *Règles hygiéno-diététiques [69]:*

Certains des facteurs qui accélèrent l'évolution de la maladie peuvent être corrigés. Par exemple, la surcharge pondérale peut entraîner une stéatose qui accélère la progression de la fibrose hépatique. Ainsi, le pharmacien peut encourager le patient à adopter une alimentation équilibrée et à pratiquer une activité physique régulière.

De même, en cas d'abus d'alcool, de tabagisme ou de toxicomanie, le pharmacien recommande au patient de se sevrer et l'oriente vers une prise en charge spécialisée.

- *Contraception :*

Les précautions à prendre chez la femme en âge de procréer avec la bithérapie s'appliquent également à la trithérapie. Lors de la mise en place du traitement, les patients doivent signer un formulaire d'accord de soins qui les informe du risque tératogène de la ribavirine.

Les patientes doivent effectuer un test de grossesse mensuel pendant le traitement et jusqu'à quatre mois après l'arrêt du traitement. La partenaire d'un patient traité doit quant à elle effectuer un test de grossesse mensuel jusqu'à sept mois après l'arrêt du traitement de son partenaire [70].

Pendant cette période, il faut utiliser deux méthodes contraceptives efficaces. Pour les patientes qui prennent du télaprévir, la contraception hormonale ne constitue pas une méthode efficace pendant le traitement et les deux mois qui suivent son arrêt [42].

- *Vaccination :*

Le vaccin de l'hépatite B est recommandé si la sérologie du VHB est négative. Concernant le vaccin de l'hépatite A, les recommandations sont celles de la population générale [69].

- *Prévention des risques :*

Les personnes infectées par le VHC ne doivent pas partager d'objet susceptible d'être en contact avec le sang comme leur brosse à dent, leur coupe ongle et leur matériel d'épilation ou de rasage.

Les usagers de drogues ne doivent pas partager leur matériel d'injection par voie intraveineuse ou nasale.

Le risque de transmission lors des rapports sexuels est très faible. L'utilisation d'un préservatif est recommandé en cas de lésion au niveau des organes génitaux et pendant les règles si la femme est infectée par le VHC.

### ***II-1-3- La gestion des effets indésirables***

En cas de survenue d'effets indésirables, le pharmacien représente souvent le premier recours du patient. Il doit être à même d'évaluer la gravité, d'orienter le patient et de contacter le médecin prescripteur selon le besoin.

- *Le syndrome pseudo-grippal [27]:*

Un syndrome pseudo-grippal peut survenir sous interféron alfa-2 pegylé, en particulier pendant le premier mois de traitement. Le paracétamol peut être conseillé au patient afin de le soulager.

- *Les troubles de l'humeur [71]:*

Avec la bithérapie, des troubles de l'humeur peuvent apparaître. Une consultation psychiatrique s'impose pour diagnostiquer une dépression ou des troubles bipolaires. Si nécessaire, un traitement adapté peut être prescrit afin de poursuivre la trithérapie.

- *L'anémie [43]:*

Le risque d'anémie est augmenté de 20% avec la trithérapie par rapport à la bithérapie. L'anémie correspond à une concentration en hémoglobine inférieure à 10g/dL. Elle survient chez environ 50% des patients traités par bocéprévir et chez 40% des patients traités par téléprévir. L'EPO peut être prescrite si la virémie est encore détectable. Si elle est indétectable, la dose de ribavirine peut être diminuée par paliers de 200mg.

- *Les manifestations cutanées [43]:*

Avec l'interféron, il existe un risque de réaction cutanée due à l'injection. De plus, dans 10% des cas, la peau peut devenir érythémateuse, sèche et prurigineuse. Cela peut conduire à l'apparition de lésions de grattage eczématiformes diffuses. Ces lésions sont réversibles et n'imposent pas l'arrêt du traitement.

Avec la ribavirine, une dermatite eczématiforme plus sévère survient chez 30% des patients. Une prise en charge par un dermatologue peut être nécessaire.

Chez 54% des patients sous trithérapie à base de téléprévir, des manifestations cutanées surviennent. Dans 90% des cas, il s'agit d'une dermatite eczématiforme. Elle survient au cours du premier mois de traitement dans 50% des cas. Le grade 1 et 2 qui correspondent respectivement à une atteinte localisée et diffuse inférieure à 50% de la surface corporelle représentent 90% des cas. Le grade 3 qui correspond à une atteinte diffuse de plus de 50% de la surface corporelle représente 10% des cas. Un examen clinique et si besoin un avis dermatologique permettront de voir s'il est possible de poursuivre le traitement. Un syndrome de Stevens-Johnson ou un DRESS doit être suspecté en présence de vésicules, de pustules, d'un décollement cutané ou muqueux, d'un purpura ou d'ulcérations. Le patient doit alors être hospitalisé en urgence.

Il est donc important d'informer les patients du risque d'éruptions cutanées sévères. Ils doivent consulter leur médecin immédiatement en cas d'apparition d'une nouvelle éruption cutanée ou d'aggravation d'une éruption cutanée existante.

- *Les autres effets indésirables :*

Au cours du traitement par un IP, des effets indésirables comme de la fatigue, des nausées, une dysgueusie peuvent également apparaître.

De manière générale, le pharmacien rappelle au patient l'importance du suivi biologique pour le contrôle des effets indésirables. Le pharmacien d'officine conseille au patient de signaler tout effet indésirable afin de garantir une prise en charge adaptée. Il orientera son patient vers une consultation médicale s'il le juge nécessaire. Les infections doivent être évaluées et traitées rapidement et il faut être particulièrement vigilant en cas de fièvre.

Des fiches conseil sur le traitement peuvent être élaborées par l'équipe officinale et données aux patients. Elles permettent au patient de disposer d'un support écrit avec les points importants à retenir.



## **II-2- Implication du pharmacien d'officine pour favoriser l'adhésion thérapeutique du patient**

La trithérapie nécessite une bonne observance pour atteindre les concentrations plasmatiques efficaces. Si le patient n'est pas observant, le risque d'apparition des résistances est augmenté, d'autant que les IP ont une barrière génétique faible.

Le pharmacien d'officine recommande donc aux patients de suivre le schéma thérapeutique prescrit. Le respect des posologies de bocéprévir ou de télaprévir, de peginterféron alfa et de ribavirine sur toute la durée de traitement prescrite est essentiel.

La trithérapie est contraignante pour le patient car elle nécessite une certaine rigueur au quotidien. La guérison n'est pas assurée même si le patient fait preuve d'une bonne observance. Le pharmacien d'officine doit savoir motiver son patient. Les efforts sont à fournir sur une durée limitée et les chances de guérison sont relativement importantes. Au cours du traitement, le pharmacien peut demander la valeur de la dernière charge virale. Si celle-ci est indétectable, c'est un résultat encourageant. Le patient peut ainsi se rendre compte de l'effet thérapeutique et cela renforce son adhésion au traitement.

De plus, le pharmacien peut aussi proposer des moyens d'aide à l'observance et des entretiens d'éducation thérapeutique du patient (ETP) pour participer à une prise en charge pluridisciplinaire.

### **II-2-1- L'évaluation de l'observance**

L'observance du traitement peut être définie comme l'adéquation entre le comportement du patient et la prescription médicale.

Le pharmacien d'officine apprécie l'observance de son patient à partir de la régularité de ses renouvellements d'ordonnance. Pour l'évaluer plus précisément, il pose les questions suivantes :

- « Ce matin avez-vous oublié de prendre votre traitement ?
- Depuis la dernière consultation, avez-vous manqué de médicament ?
- Vous est-il arrivé de prendre votre traitement avec retard par rapport à l'heure habituelle ?
- Vous est-il arrivé de ne pas prendre votre médicament parce que certains jours votre mémoire vous fait défaut ?
- Vous est-il arrivé de ne pas prendre votre médicament parce que, certains jours, vous avez l'impression que votre traitement vous fait plus de mal que de bien ?
- Pensez-vous que vous avez trop de comprimés à prendre ? » [72]

En fonction du nombre de réponses positives au questionnaire, le pharmacien peut estimer le degré d'observance de son patient. Si le patient répond « oui » une ou deux fois, il est considéré comme non observant mineur. S'il répond « oui » trois fois ou plus, il est alors considéré comme non observant.

Lorsqu'une inobservance est constatée, le pharmacien discute avec le patient pour rechercher l'origine du problème d'observance et lui proposer des solutions adaptées.

### ***II-2-2- Les moyens d'aide à l'observance***

Pour faciliter l'observance, le pharmacien suggère au patient d'utiliser un pilulier. Il permet de s'organiser, d'éviter les oublis et les erreurs de prise. Il est aussi pratique lorsque le patient est en déplacement. Le pharmacien peut réaliser un plan de prise afin de clarifier l'ordonnance pour le patient et de l'aider à remplir son pilulier. Si nécessaire, une infirmière peut venir préparer les médicaments à domicile chaque semaine.

Pour éviter les oublis, le pharmacien conseille au patient de mettre un réveil aux heures de prise ou de mettre ses médicaments en évidence. Pour penser à ses rendez-vous médicaux, le patient peut s'aider d'un calendrier, d'un agenda ou d'un smartphone.

Si le patient est isolé, des appels téléphoniques réguliers permettent de lui assurer un soutien moral.

Enfin, le pharmacien rappelle la conduite à tenir en cas d'oubli d'une prise d'un IP.

*Si l'oubli de Victrelis® est constaté :*

- moins de six heures après l'horaire de la prise habituelle, alors le patient doit prendre ses comprimés immédiatement avec de la nourriture.
- plus de six heures après l'horaire de la prise habituelle, alors le patient ne doit pas prendre les comprimés oubliés.

*Si l'oubli d'Incivo® est constaté :*

- moins de quatre heures après l'horaire de la prise habituelle, alors le patient doit prendre ses comprimés immédiatement avec de la nourriture.
- plus de quatre heures après l'horaire de la prise habituelle, alors le patient ne doit pas prendre les comprimés oubliés.

### ***II-2-3- L'éducation thérapeutique du patient***

L'ETP fait partie des nouvelles missions du pharmacien d'après l'article 38 de la loi Hôpital Patient Santé Territoire [73]. L'ETP vise à améliorer les connaissances du patient sur sa maladie et son traitement. Elle est centrée sur le patient pour une prise en charge personnalisée du patient sur le long terme. Elle permet au patient de mieux vivre avec sa maladie.

De manière générale, les programmes d'ETP se déroulent en plusieurs phases. Tout d'abord, le diagnostic éducatif vise à faire le point avec le patient sur son mode de vie, ses connaissances, ses craintes et ses motivations. Ensuite des objectifs sont fixés en accord avec le patient. Pour y répondre, des séances éducatives en groupe ou individualisées sont mises en place. À la fin, le pharmacien évalue les connaissances acquises et la satisfaction du patient.

Lors des entretiens avec le patient, le pharmacien adopte une posture éducative qui repose sur l'écoute active, l'empathie, la reformulation et les questions ouvertes. Le pharmacien s'exprime avec un vocabulaire adapté et utilise par exemple des supports visuels ou des jeux pour faciliter la compréhension et l'apprentissage du patient.

Ainsi, l'ETP s'appuie à la fois sur les difficultés rencontrées par le patient et sur ses ressources. Il permet au patient d'être actif dans sa prise en charge grâce à l'acquisition de compétences d'auto-soin.

Les programmes d'ETP doivent être autorisés par l'agence régionale de santé (ARS) pour être mis en place. L'éducation thérapeutique implique une équipe pluridisciplinaire qui comprend un médecin. Le pharmacien d'officine doit se former pour pouvoir s'engager dans ce type de programmes.

À l'officine, le pharmacien peut déjà adopter une démarche éducative, c'est-à-dire accompagner le patient pour favoriser son apprentissage dans la prise en charge de sa maladie. Pour cela, il faut se décentrer de la maladie et du traitement et être plus attentif à l'état émotionnel du patient. Ensuite, il est possible de discuter des avantages et des inconvénients du comportement de la personne et d'évaluer la volonté du patient à en changer. Le pharmacien s'efforce d'être le moins suggestif possible en s'appuyant sur les mots du patient [74].

Le pharmacien d'officine peut donc proposer des moyens d'aide à l'observance et participer à l'ETP. Il peut aussi être impliqué dans des réseaux hôpital-ville qui se développent actuellement afin d'assurer la continuité des soins entre l'hôpital et l'ambulatoire. Par ailleurs, le pharmacien peut orienter les patients vers des associations comme SOS hépatites. Celles-ci permettent aux patients de s'informer sur leur maladie et d'échanger avec d'autres personnes sur le vécu de leur maladie.

## CONCLUSION

---

Pour les patients atteints d'hépatite C, la trithérapie a nettement augmenté les chances de guérison. Dans les années à venir, des thérapies associant plusieurs DAA permettront certainement d'atteindre des taux de guérison proches de 100%. De plus, des thérapies sans interféron ont donné des résultats prometteurs lors des essais cliniques.

L'utilisation du bocéprévir et du télaprévir ne peut se faire sans évaluer les effets de la trithérapie sur l'évolution de la population virale des patients. Notre étude a montré que le séquençage direct de la protéase NS3 ne permet pas d'identifier toutes les populations virales résistantes pré-existantes avant le début du traitement puisqu'elles sont alors minoritaires. Par contre, l'émergence de variants résistants à l'origine des échecs thérapeutiques a pu être mise en évidence chez la plupart des patients. L'identification des mutations à l'origine de l'échec thérapeutique fait partie du suivi virologique du patient sous trithérapie et permet de surveiller l'émergence des populations virales résistantes liée à l'utilisation de DAA.

Le télaprévir, le bocéprévir, la ribavirine, le peginterféron alfa-2a et le peginterféron alfa-2b sont des médicaments disponibles en officine. Le pharmacien d'officine a un rôle de conseil et d'accompagnement du patient pour faciliter la gestion de son traitement. Ces médicaments peu communs à l'officine constituent un véritable challenge à relever pour le pharmacien d'officine qui n'est pas habitué à délivrer ces molécules. L'actualisation de ses connaissances et l'intérêt porté au patient permettront au pharmacien d'être acteur dans la prise en charge des patients infectés par le VHC.

Le risque de transmission de l'hépatite C a nettement diminué au cours de ces dernières années. Cependant, l'hépatite C reste sous diagnostiquée alors que des traitements efficaces existent. Il est donc essentiel de développer le dépistage. Aux Etats-Unis, l'OraQuick® HCV Rapid Antibody Test est notamment effectué dans les pharmacies. Des tests rapides d'orientation diagnostique réalisables par exemple au cabinet médical, aux urgences ainsi que dans les Centres d'information et de dépistage anonyme et gratuit (CIDAG) pourraient être mis en place en France.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- [1] K. Mohd Hanafiah, J. Groeger, A.D. Flaxman et al. « Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence ». *Hepatology*. 2013. Vol. 57, n°4, p. 1333-1342.
- [2] OMS. *Hépatite C*. [En ligne]. 2012. Disponible sur : < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/fr/index.html> > (consulté le 6 janvier 2013)
- [3] Institut de veille sanitaire. *Maladies infectieuses : Prévalence des hépatites B et C en France en 2004*. Paris : Labrador, 2007. 112 p.
- [4] Q.L. Choo, G. Kuo, A.J. Weiner et al. « Milestones in liver disease ». *Journal of Hepatology*. 2002. Vol. 36, p. 582-585.
- [5] Q.L. Choo, G. Kuo, A.J. Weiner et al. « Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.[Abstract] ». *Science*. 1989. Vol. 244, n°4902, p. 359-362.
- [6] JM. Pawlotsky. « Flaviviridae-Virus de l'hépatite C et virus GB-C ». In : *Traité de virologie médicale*. Paris : Editions ESTEM, 2003. p. 699.
- [7] F.Penin, J. Dubuisson, F.A. Rey et al. « Structural biology of hepatitis C virus ». *Hepatology*. 2004. Vol. 39, n°1, p. 5-19.
- [8] F. Helle et L. Cocquerel. « L'entrée du virus de l'hépatite C dans ses cellules cibles ». *Virologie*. 2008. Vol. 12, n°2, p. 105-116.
- [9] C.M. Rice. « New insights into HCV replication : potential antiviral targets ». 2011. Vol. 19, n°3, p. 117-120.
- [10] U.A. Ashfaq, T. Javed, S. Rehman et al. « An overview of HCV Molecular biology, replication and immune responses ». *Virology journal*. 2011. Vol. 8, n°161, p. 1-10.
- [11] S. Chevaliez. « Antiviral Activity of the new DAAs for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection : Virology and Resistance ». *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2011. Vol. 35 (Suppl. 2), p. S46-S51.
- [12] P. Simmonds, J. Bukh, C. Combet et al. « Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes - ». *Hepatology*. 2005. Vol. 42, n°4, p. 962-973.
- [13] H. Le Guillou-Guillemette, S. Vallet, C. Gaudy-Graffin et al. « Genetic diversity of the hepatitis C virus : Impact and issues in the antiviral therapy ». *World Journal of Gastroenterology*. 2007. Vol. 13, n°17, p. 2416-2426.

- [14] M. Rantala et M.J. van de Laar. « Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe ». *Eurosurveillance*. 2008. Vol. 13, n°21, p. 1-8.
- [15] M.J. Alter. « Epidemiology of hepatitis C virus infection ». *World Journal of Gastroenterology*. 2007. Vol. 13, n°17, p. 2436-2441.
- [16] J. Pillonel, N. Le Marrec, A. Girault et al. « Surveillance épidémiologique des donneurs de sang homologues et risque résiduel en France entre 2001 et 2003 ». *Transfusion Clinique et Biologique*. 2005. Vol. 12, n°3, p. 239-246.
- [17] C.W. Shepard, L. Finelli et M.J. Alter. « Global epidemiology of hepatitis C virus infection ». *THE LANCET Infectious Diseases*. 2005. Vol. 5, n°9, p. 558-567.
- [18] E. Delarocque-Astagneau, C. Pioche et J.C. Desenclos. « Surveillance nationale de l'hépatite C à partir des pôles de référence volontaires : années 2001-2004 ». *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*. 2006. n°51-52, p. 414-418.
- [19] G. Girard et G. Boscher. *Les pratiques d'injection en milieu festif : état des lieux en 2008. Données issues du dispositif TREND de l'OFDT*. [En ligne]. 2009. Disponible sur : < <http://www.ofdt.fr/BDD/publications/docs/epfxggpc.pdf> > (consulté le 11 avril 2013)
- [20] C. Larsen, M-L. Chaix, Y. Le Strat et al. « Gaining greater insight into HCV emergence in HIV-Infected Men Who Have Sex with Men : The HEPAIG Study ». *PLoS One*. 2011. Vol. 6, n°12, p. e29322.
- [21] M. Jauffret-Roustide, E. Couturier, Y. Le Strat et al. « Estimation de la séroprévalence du VIH et du VHC et profils des usagers de drogues en France, étude InVS-ANRS Coquelicot, 2004 ». *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*. 2006. n°33, p. 244-247.
- [22] Institut de Veille Sanitaire. *Surveillance de l'activité de dépistage de l'hépatite C en France, réseau de laboratoires RENA-VHC/B*. [En ligne]. 2011. Disponible sur : < <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatitis-virales/Hepatitis-C/Surveillance-de-l-activite-de-depistage-de-l-hepatite-C-en-France-reseau-de-laboratoires-Rena-VHC-B/Contexte-objectifs-et-partenaires-de-la-surveillance> > (consulté le 17 mars 2013)
- [23] F. Péquignot, P. Hillon, D. Antona et al. « Estimation nationale de la mortalité associée et imputable à l'hépatite C et à l'hépatite B en France métropolitaine en 2001 ». *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*. 2008. n°27, p. 237-40.
- [24] A.A. Modi et T.J. Liang. « Hepatitis C: a clinical review ». *Oral Diseases*. 2008. Vol. 14, n°1, p. 10-14.
- [25] A.W. Tarr, R.A. Urbanowicz et J.K. Ball. « The role of humoral innate immunity in hepatitis C virus infection ». *Viruses*. 2012. Vol. 4, p. 1-27.
- [26] B. Maasoumy et H. Wedemeyer. « Natural history of acute and chronic hepatitis C ». *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2012. Vol. 26, n°4, p. 401-412.

- [27] EASL. « EASL Clinical Practice Guidelines : Management of hepatitis C virus infection ». *Journal of Hepatology*. 2011. Vol. 55, n°2, p. 245–264.
- [28] A. Galossi, R. Guarisco, L. Bellis et al. « Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection ». *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2007. Vol. 16, n°1, p. 65-73.
- [29] HAS. *Stratégies de dépistage biologique des hépatites virales B et C*. [En ligne]. 2011. Disponible sur : < [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-01/strategies\\_de\\_depistage\\_biologique\\_des\\_hepatites\\_virales\\_b\\_et\\_c\\_-\\_synthese.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-01/strategies_de_depistage_biologique_des_hepatites_virales_b_et_c_-_synthese.pdf) > (consulté le 28 décembre 2012)
- [30] HAS. *Méthodes d'évaluation de la fibrose hépatique au cours des hépatopathies chroniques*. [En ligne]. 2006. Disponible sur : < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211570613000490> > (consulté le 29 avril 2013)
- [31] VIDALrecos. *Hépatite C*. [En ligne]. 2012. Disponible sur : < [http://www.vidalrecos.fr/pages/reco.php?idfiche=1746&arbre=1&titre=Hepatite\\_C&numimg=1&page=pcharge](http://www.vidalrecos.fr/pages/reco.php?idfiche=1746&arbre=1&titre=Hepatite_C&numimg=1&page=pcharge) > (consulté le 2 janvier 2013)
- [32] A. Balagopal, DL. Thomas et CL. Thio. « IL28B and the control of hepatitis C virus infection ». *Gastroenterology*. 2010. Vol. 139, n°6, p. 1865-1876.
- [33] D. Ge, J. Fellay, A.J. Thompson et al. « Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance ». *Nature*. 2009. Vol. 461, n°7262, p. 399-401.
- [34] M.G. Ghany, D.R. Nelson, D.B. Strader et al. « An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases ». *Hepatology*. 2011. p. 1433-1444.
- [35] G. Gorochov et T. Papo. « Interférons ». In : *Immunologie*. France : Wolters Kluwer, 2000. p. 487.
- [36] K. Rajender Reddy, M.W. Modi et S. Pedder. « Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys®) for the treatment of hepatitis C ». *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002. Vol. 54, n°4, p. 571-586.
- [37] HAS. *Guide-ALD Hépatite chronique C*. [En ligne]. 2006. Disponible sur : < [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/06-072\\_hepat-c\\_internet\\_sans\\_liste.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/06-072_hepat-c_internet_sans_liste.pdf) > (consulté le 17 janvier 2013)
- [38] Thériaque. *RIBAVIRINE MYL 200MG GELULE - Monographie*. [En ligne]. 2011. Disponible sur : < <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=26797&info=GROSSESSE> > (consulté le 25 mars 2013)
- [39] K.Morikawa, C.M. Lange, J. Gouttenoire et al. « Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus ». *Journal of Viral Hepatitis*. 2011. n°18, p. 305-315.



- [40] K.P. Romano, A. Ali, C. Aydin et al. « The molecular basis of drug resistance against hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors ». *PLoS Pathogens*. 2012. Vol. 8, n°7, p. 1-15.
- [41] EMEA. *RCP Victrelis\**. [En ligne]. Disponible sur : < [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002332/WC500109786.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002332/WC500109786.pdf) > (consulté le 2 janvier 2013)
- [42] EMEA. *RCP Incivo\**. [En ligne]. Disponible sur : < [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002313/WC500115529.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002313/WC500115529.pdf) > (consulté le 2 janvier 2013)
- [43] AFEF. *Prise de position de l'AFEF sur les trithérapies dans la prise en charge des malades atteints d'hépatite chronique C*. [En ligne]. Disponible sur : < [http://www.hepatoweb.com/Documents\\_PDF/POSITION\\_AFEF%20TRITHERAPIE\\_VHC.pdf](http://www.hepatoweb.com/Documents_PDF/POSITION_AFEF%20TRITHERAPIE_VHC.pdf) > (consulté le 3 janvier 2013)
- [44] Prescrire. « Patients infectés par le virus de l'hépatite C. » *La Revue Prescrire*. 2012. n°350 (Supplément interactions médicamenteuses), p. 264-277.
- [45] Prescrire. « La glycoprotéine P en bref ». *La Revue Prescrire*. 2012. n°350 (Supplément interactions médicamenteuses), p. 529.
- [46] P. Halfon et S. Locarnini. « Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors ». *Journal of Hepatology*. 2011. Vol. 55, n°1, p. 192-206.
- [47] V. Cento, C. Mirabelli, R. Salpini et al. « HCV genotypes are differently prone to the development of resistance to linear and macrocyclic protease inhibitors ». *PLoS One*. 2012. Vol. 7, n°7, p. 1-19.
- [48] S. Vallet, F. Viron, C. Henquell et al. « NS3 protease polymorphism and natural resistance to protease inhibitors in French patients infected with HCV genotypes 1-5 ». *Antiviral Therapy*. 2011. n°16, p. 1093-1102.
- [49] C. Sarrazin, C. Hézode, S. Zeuzem et al. « Antiviral strategies in hepatitis C virus infection ». *Journal of Hepatology*. 2012. Vol. 56, Supplément 1, p. S88-S100.
- [50] Thériaque. *Monographie NORVIR 100MG CPR*. [En ligne]. Disponible sur : < <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=25426&info=CLASS> > (consulté le 20 mai 2013)
- [51] A. Aghemo et R. De Francesco. « New horizons in Hepatitis C antiviral therapy with direct-acting antivirals ». *Hepatology*. 2013. Vol. 58, n°1, p. 428-438.
- [52] L.Y. Lee, C.Y.W. Tong, T. Wong et al. « New therapies for chronic hepatitis C infection: a systematic review of evidence from clinical trials ». *The international journal of clinical practice*. 2012. Vol. 66, n°4, p. 342-355.

- [53] EASL/AASLD Special Conference. *Therapy of Hepatitis C : Clinical Application and Drug Development*. [En ligne]. 14 septembre 2012. Disponible sur : < [http://www.easl.eu/assets/application/files/943174ce631ce55\\_file.pdf](http://www.easl.eu/assets/application/files/943174ce631ce55_file.pdf) > (consulté le 23 mars 2013)
- [54] T. Asselah et P. Marcellin. « Interferon free therapy with direct acting antivirals for HCV. » *Liver International*. 2013. n°33 Suppl 1, p. 93-104.
- [55] C. A. M. Stedman. « Current prospects for interferon-free treatment of hepatitis C in 2012 ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012. Vol. 28, n°1, p. 38-45.
- [56] J.M. Pawlotsky et D. Dhumeaux. « Le virus de l'hépatite C ». In : *Hépatite C*. Paris : EDK, 2004. p. 479.
- [57] K.D. Raney, S. D. Sharma, I. M. Moustafa et al. « Hepatitis C Virus Non-structural Protein 3 (HCV NS3) : A Multifunctional Antiviral Target ». *The journal of biological chemistry*. 2010. Vol. 285, n°30, p. 22725-22731.
- [58] C. Welsch, A. Jesudian, S. Zeuzem et al. « New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives ». *Gut*. 2012. Vol. 61 (Suppl 1), p. 36-46.
- [59] H.Y. Wei, C.S. Lu et T.H. Lin. « Exploring the P2 and P3 ligand binding features for Hepatitis C virus NS3 protease using some 3D QSAR techniques ». *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2008. Vol. 26, n°7, p. 1131-1144.
- [60] C. Sarrazin, T.L. Kieffer, D. Bartels et al. « Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir ». *Gastroenterology*. 2007. Vol. 132, n°5, p. 1767-1777.
- [61] J. Courcambeck, M. Bouzidi, R. Perbost et al. « Resistance of hepatitis C virus to NS3-4A protease inhibitors : mechanisms of drug resistance induced by R155Q, A156T, D168A and D168V mutations [Abstract] ». 2006. Vol. 11, n°7, p. 847-855.
- [62] S. Susser, C. Welsch, Y. Wang et al. « Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients ». *Hepatology*. 2009. Vol. 50, n°6, p. 1709-1718.
- [63] S. Vallet, S. Larrat, S. Laperche et al. « Multicenter quality control of hepatitis C virus protease inhibitor resistance genotyping. » *Journal of Clinical Microbiology*. 2013. Vol. 51, n°5, p. 1428-1433.
- [64] QIAGEN. *QIAamp\* Viral RNA Mini Handbook*. [En ligne]. 2010. Disponible sur : < [http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/RapidTranslationSystem/QIAGEN\\_EasyXpressInsect\\_Handbook.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/RapidTranslationSystem/QIAGEN_EasyXpressInsect_Handbook.pdf) > (consulté le 29 avril 2013)
- [65] Invitrogen. *SuperScript\*III One-Step RT-PCR System with Platinum\*Taq DNA Polymerase*. [En ligne]. Disponible sur : < [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscriptIII\\_onestepRTPCR\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscriptIII_onestepRTPCR_man.pdf) > (consulté le 30 octobre 2012)

- [66] J. Lamoril, N. Ameziane, J.C. Deybach et al. « Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 2008. Vol. 23, n°5, p. 260-279.
- [67] B. Besse, M. Coste-Burel, N. Bourgeois et al. « Genotyping and resistance profile of hepatitis C (HCV) genotypes 1-6 by sequencing the NS3 protease region using a single optimized sensitive method ». *Journal of Virological Methods*. 2012. n°185, p. 94-100.
- [68] S. Chevaliez, C. Rodriguez et JM. Pawlotsky. « New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C ». *Gastroenterology*. 2012. Vol. 142, n°6, p. 1303-1313.
- [69] ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé). *Conférence de consensus Traitement de l'hépatite C*. [En ligne]. 2002. Disponible sur : < [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/hepatite\\_C.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/hepatite_C.pdf) > (consulté le 18 février 2013)
- [70] VIDALpro. *RCP Copegus\**. [En ligne]. Disponible sur : < <http://www.vidalpro.net/medicaments/front/RechercheMedic.asp?site=2&cartouche=17&id=44405&lib=COPEGUS+200+mg+cp+pellic+%3A+B%2F42&type=spe> > (consulté le 10 février 2013)
- [71] C. Wartelle-Bladou, E. Rosenthal, V. Ratzu et al. « Adhésion à la bithérapie pegylée au cours de l'hépatite C. Importance du trio hépatologue, médecin généraliste, infirmière. » *Gastroentérologie clinique et biologique*. 2008. Vol. 32, p. S96-S108.
- [72] L'Assurance Maladie. *Evaluation de l'observance*. [En ligne]. 2007. Disponible sur : < [http://www.ameli.fr/fileadmin/user\\_upload/documents/Respect-traitement-2007.pdf](http://www.ameli.fr/fileadmin/user_upload/documents/Respect-traitement-2007.pdf) > (consulté le 22 avril 2013)
- [73] Legifrance. *LOI n° 2009-879 du 21 juillet 2009 portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires*. [En ligne]. Disponible sur : < <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000020879475&categorieLien=id#JORFARTI000020879490> > (consulté le 27 juillet 2013)
- [74] V. Brunie et L.Spiesser-Robelet. *Cours 5AHU filière officine : Education thérapeutique du patient*. 2012.



XX2409 TRTIASSKGPVIQMYTNVEQDLVGWPAPQGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX2607 TRTIASSKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPQGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
**XX4807 TRTIASSKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPQGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG**  
 XX1107 TRTIASSKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPQGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX7008 TRTIASSKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPQGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX4508 TRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLIGWPAPQGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVVPVRRRG  
 XX6005 TRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPQGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVVPVRRRG  
 XX2907 TRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPQGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX4907 TRTIASPKGPVVQMYTNVDQDLVGWPAPQGS RSLTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX6304 TRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX4805 TKTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX2608 TRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX5807 TKTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAP QGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX8408 TRTLASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAP QGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
**XX2908 SKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG**  
 XX9609 SKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX4608 SKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX2610 TKTLAGPKGPIIQMYTNVDQDLVGWQAPP GSRSLTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
**XX6608 TKTLAGPKGPIIQMYTNVDQDLVGWQAPP GSRSLTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG**  
 XX3907 SKTLAGPKGPIIQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX9307 SKTLAGPKGPIIQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX4306 SKTLAGPKGPIIQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX7302 SKTLAGSKGPVQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LKPC TCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX7804 SKSLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX0108 SKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGWLAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX2108 SKTLAGPKGPVTQMYTNVDQDLVGWPAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX6404 SKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX2309 SRTLAGPKGPVTQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX5312 SKTLAGPKGPITQMYTNVDQDLVGWQAPP GARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
 XX7503 TKYLAGLKG PVTQMYTNVDQDLVGWQAP QGARS LTPCTCGSADLYLVTRHADVVPVRRRG  
**XX12E3 TRTIASSKGPVIQMYTNVEQDLVGWPAP QGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG**  
**XX21E0 TRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPP GXRSLTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG**  
**XX11E0 TRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAP QGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG**  
**XX26E1 TRTXASSKGPXIQMYTNXXQDLVGWPAP QGAXSXT PCTCGSSDLYXVTRHADVIPVRRRG**

XX2409 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESL-ETTM  
 XX2607 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESL-ETTM  
**XX4807 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFKAAICTRGVAKAVDFIPVESL-ETTM**  
 XX1107 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESL-ETTM  
 XX7008 DNRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESL-ETTM  
 XX4508 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVEGL-ETTM  
 XX6005 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVEGL-ETTM  
 XX2907 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVEGL-ETTM  
 XX4907 DTRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVENL-ETTM  
 XX6304 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESL-DTTM  
 XX4805 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVENL-ETTM  
 XX5807 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGLFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESL-ETTM  
 XX8408 DNRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVENL-ETTM  
**XX5208 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFKAAVCTRGVAKAVDFVPPVENL-ETTM**  
 XX2908 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
 XX9609 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESM-ETTM  
 XX4608 DNRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
 XX2610 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
**XX6608 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM**  
 XX3907 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
 XX9307 DGRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
 XX4306 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
 XX7302 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGDAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
 XX7804 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
 XX0108 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
 XX2108 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPPVESM-ETTM  
 XX6404 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPNPSSLWETTM  
 XX2309 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAAGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESM-ETTM  
 XX5312 DSRGSLSPRPVSYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESM-ETTM  
**XX12E2 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFKAAVCTRGVAKAVDFIPVESL**  
**XX21E0 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFKAAVCTRGVAKAVDFIPVESL**  
**XX11E0 DSRGSLSPRPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFKAAVCTRGVAKAVDFIPVEGL**  
**XX26E1 DSRGSLSPXPISYLYKSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPXVESL**

**Étude du polymorphisme de la protéase NS3 du virus de l'hépatite C de génotype 1 par séquençage direct avant initiation et après échec de la trithérapie antivirale comprenant une antiprotéase (bocéprévir ou télaprévir) chez les patients suivis au CHU d'Angers.**

Résumé :

L'hépatite C concerne près de 184 millions de personnes dans le monde. Environ 80% des hépatite C aiguës deviennent chroniques et peuvent évoluer en cirrhose, voire en carcinome hépatocellulaire. Récemment, deux nouvelles molécules, bocéprévir et télaprévir, ont reçues l'AMM pour traiter les patients infectés par le VHC de génotype 1. Ces inhibiteurs spécifiques de la protéase NS3 du VHC doivent être associés à un interféron pegylé alfa-2a ou alfa-2b et à la ribavirine. L'utilisation de "Direct Acting Antiviral" implique le suivi de la charge virale pour évaluer la réponse au traitement et surveiller le risque d'échappement viral due aux mutations. Le séquençage de NS3 en pré-thérapeutique et à l'échec, qui n'est pas recommandé actuellement en pratique clinique, devrait être évalué. Dans cette étude, nous avons inclus 28 patients avec une infection chronique par le VHC de génotype 1 recevant une trithérapie avec bocéprévir (n=8) ou télaprévir (n=20), suivis au CHU d'Angers. Nous avons réalisé le séquençage direct de la protéase NS3 en pré-thérapeutique et à l'échec. Les positions 36, 54, 55, 80, 155, 156, 168 et 170 ont été étudiées.

Résultats : V36L et T54S ont été retrouvées chez 1 seul patient en pré-thérapeutique. Parmi les 7 patients en échec thérapeutique, 5 ont les mutations V36M et R155K. Ce travail a montré l'intérêt du génotypage de NS3 lors de l'échappement viral. Nous avons constaté que le protocole de l'ANRS a une sensibilité plus faible que la méthode développée au laboratoire de virologie de Nantes. Le pharmacien a un rôle auprès du patient sous trithérapie, vis à vis des interactions médicamenteuses, des effets indésirables et de l'observance du traitement.

Mots clés : Virus de l'hépatite C, Inhibiteurs spécifiques du VHC, Protéase NS3, Séquençage direct, Résistance, Observance

**Study of genotype 1 HCV NS3 protease polymorphism by direct sequencing before starting therapy and in case of therapeutic failure of the antiviral therapy including antiprotease (boceprevir or telaprevir) for the patients followed in Angers hospital.**

Background :

Hepatitis C virus (HCV) affects about 184 million people worldwide. Hepatitis C leads to a chronic infection in about 80% of the cases; then it can cause cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Recently, two new antiviral drugs have been allowed to treat patients infected by HCV genotype 1 : boceprevir and telaprevir. These specific inhibitors target the HCV NS3 protease and need to be used in combination with pegylated interferon alfa 2a or 2b and ribavirin. The use of a Direct Acting Antiviral requires a viral load follow-up to evaluate the therapeutic response and survey a risk of virological escape associated with mutations. The NS3 sequencing is not currently recommended in clinical practice, but should be evaluated.

Study design : We included 28 patients chronically infected by HCV genotype 1 that received a tritherapy with boceprevir (n=8) or telaprevir (n=20), they were followed in the University Hospital of Angers. We performed a protease NS3 direct-sequencing in pre-therapeutic and therapeutic failure samples. Positions 36, 54, 55, 80, 155, 156, 168 and 170 were studied.

Results : In the pre-therapeutic samples, the V36L and T54S mutations were found in only 1 patient. Of 7 patients in therapeutic failure, the V36M and R155K mutations were identified in 5 samples. Our work showed the potential interest of the NS3 genotyping to explore viral escape. We also identified a weakest sensibility of the ANRS protocol compared to the method developed in the laboratory of virology in Nantes.

The role of the pharmacist in helping patients to manage their tritherapy has been investigated : detect drug-drug interactions and side effects. Patient compliance is also required.

Keywords : Hepatitis C virus, HCV specific inhibitors, NS3 protease, Direct sequencing, Resistance, Compliance

