HAL
open science

Etude de la prévalence du virus de l'hépatite B et de sa variabilité génomique chez le patient co-infecté par le virus de l'immunodéficience humaine

Bénédicte Bloquel

To cite this version:

Bénédicte Bloquel. Etude de la prévalence du virus de l'hépatite B et de sa variabilité génomique chez le patient co-infecté par le virus de l'immunodéficience humaine. Sciences pharmaceutiques. 2010. hal-01734331

HAL Id: hal-01734331

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734331v1

Submitted on 14 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

NANCY UNIVERSITE – Université Henri Poincaré – 2010
FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de Biologie Médicale

Soutenu devant le Jury Interrégional
le 16 juin 2010

par **Bénédicte BLOQUEL**
née le 18 mars 1980

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Etude de la prévalence du Virus de l'Hépatite B et de sa variabilité génomique chez le patient co-infecté par le Virus de l'Immunodéficience Humaine

---

Membres du Jury

Président :	Madame le Professeur Chantal FINANCE	
Juges :	Monsieur le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI	
	Monsieur le Professeur Christian RABAUD	
	Madame le Docteur Véronique VENARD	(Directeur de Thèse)

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN
Francine PAULUS
Vice-Doyen
Francine KEDZIEREWICZ
Président du Conseil de la Pédagogie
Bertrand RIHN
Commission de la Recherche
Christophe GANTZER
Mobilité ERASMUS et Communication
Francine KEDZIEREWICZ
Hygiène Sécurité
Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :	Francine PAULUS
Responsables de la filière Industrie :	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable du Collège d'Enseignement : Pharmaceutique Hospitalier	Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE
Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES
Jeffrey ATKINSON
Marie-Madeleine GALTEAU
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES
Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES
Gérald CATAU
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE
Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER ..... Pharmacie clinique
Alain BAGREL..... Biochimie
Jean-Claude BLOCK ..... Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON ..... Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE..... Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL ..... Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER ..... Microbiologie environnementale
Max HENRY ..... Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU ..... Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE..... Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD ..... Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR ..... Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER ..... Biochimie
Pierre LEROY ..... Chimie physique générale
Philippe MAINCENT ..... Pharmacie galénique
Alain MARSURA ..... Chimie thérapeutique
Patrick MENU ..... Physiologie
Jean-Louis MERLIN ..... Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS ..... Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN ..... Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON ..... Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Monique ALBERT ..... Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS ..... Parasitologie
Mariette BEAUD ..... Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT ..... Communication et santé
Isabelle BERTRAND ..... Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN ..... Chimie thérapeutique
François BONNEAUX ..... Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER..... Chimie Physique
Cédric BOURA ..... Physiologie
Jean-Claude CHEVIN ..... Chimie générale et minérale
Igor CLAROT ..... Chimie analytique
Joël COULON..... Biochimie
Sébastien DADE ..... Bio-informatique
Dominique DECOLIN ..... Chimie analytique
Béatrice DEMORE ..... Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU ..... Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY ..... Chimie thérapeutique
François DUPUIS ..... Pharmacologie
Raphaël DUVAL ..... Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE ..... Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ ..... Biophysique-acoustique
Luc FERRARI ..... Toxicologie
Stéphane GIBAUD ..... Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT ..... Chimie organique

Frédéric JORAND .....Santé et environnement
Olivier JOUBERT .....Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ .....Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT .....Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....Hématologie biologique
Christophe MERLIN .....Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU .....Pharmacognosie
Maxime MOURER.....Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS .....Informatique
Christine PERDICAKIS .....Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO .....Pharmacologie
Virginie PICHON .....Biophysique
Anne SAPIN .....Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER .....Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY .....Santé publique
Gabriel TROCKLE .....Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIOU .....Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI .....Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER .....Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD .....Anglais

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET ..... Directeur

SERMENT DES APOTHICAIRES

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

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

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

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

A notre Directeur

Madame le Docteur Véronique VENARD
Maître de conférences, Faculté de Médecine de Nancy
Praticien Hospitalier au Laboratoire de Virologie du CHU de Nancy

Nous sommes sensibles à l'aide que vous nous avez apportée dans la réalisation de ce travail et de notre projet professionnel. Nous vous remercions pour les précieuses connaissances que vous nous avez fait partager.

Veuillez trouver ici, le témoignage de notre reconnaissance et notre profond respect.

A notre Président

Madame le Professeur Chantal FINANCE
Doyen honoraire, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Nancy
Praticien Hospitalier au Laboratoire de Virologie du CHU de Nancy

Nous sommes sensibles à l'honneur que vous nous faites d'assurer la présidence de notre jury.

Veuillez trouver ici, l'expression de notre sincère respect et de notre reconnaissance pour votre soutien durant notre parcours universitaire.

A nos Juges

Monsieur le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
Professeur des Universités, Faculté de Médecine de Nancy
Chef du service d'Hépato-gastro-entérologie du CHU de Nancy

Cher Professeur, vous avez bien voulu nous honorer de votre présence dans ce jury, soyez assuré de notre gratitude et notre profond respect.

Monsieur le Professeur Christian RABAUD
Professeur des Universités, Faculté de Médecine de Nancy
Praticien Hospitalier en Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Nancy

Cher Professeur, vous avez collaboré à l'étude menée au sein de votre service, ainsi qu'à la rédaction de l'article la décrivant.

Vous avez accepté de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

Je saisis l'occasion qui m'est donnée de remercier tous ceux qui m'ont soutenue de leur mieux durant mon long apprentissage de la vie. J'espère vous rendre fiers de moi comme je le suis de vous.

Papa, Maman, merci pour votre amour et votre appui de chaque instant. Ça y est, vous n'avez plus à vous tourmenter, votre « petite » dernière est tirée d'affaire.

Sandrine, même si on ne se comprend pas toujours et si je ne sais pas toujours te le dire, saches que je serai toujours là pour vous.

Bisous à Marceline.

A ma petite marraine et à mémère pour leur soutien de près ou de plus loin.

A Anne et Muriel, pour m'avoir supportée…dans les deux sens du terme, merci les filles pour votre bonne humeur.

A Hélène, pour tous tes bons conseils, ton expérience et le temps que tu as su m'accorder.

A Kiko, avec tout mon amour.

Etude de la prévalence du Virus de l'Hépatite B et de sa variabilité génomique chez le patient co-infecté par le Virus de l'Immunodéficience Humaine

A INTRODUCTION 1

I. Virus de l'hépatite B 1

1 Un peu d'histoire 1

2 Le virus et son génome 1

2.1 Les particules virales du virus de l'hépatite B 1

2.2 Le génome 3

2.3 Les protéines virales 5

2.3.1 La protéine du gène P 5

2.3.2 Les protéines du gène S 6

2.3.3 La protéine du gène X 7

2.3.4 Les protéines du gène C 7

2.4 Le cycle cellulaire du virus de l'hépatite B 8

II. Hépatite B 11

1 Epidémiologie 11

2 Prévention 13

2.1 Les mesures préventives générales 13

2.2 L'immunothérapie 14

2.3 La vaccination contre l'hépatite B 14

III. Histoire de la maladie 16

1 Le contage dans l'enfance 16

2 Le contage à l'âge adulte 16

3 L'histoire naturelle de la maladie 17

3.1 La relation hôte-virus 17

3.1.1 La réponse immunitaire à médiation cellulaire 18

3.1.2 La réponse immunitaire à médiation humorale 18

3.2 Physiopathologie 20

3.2.1 Les manifestations cliniques 20

3.2.2 La primo-infection 21

3.2.3 L'infection chronique 21

3.2.4 L'infection occulte à VHB 23

IV. Diagnostic biologique 24

1 Le diagnostic direct 24

1.1 L'AgHBs 24

1.2 L'AgHBe 26

1.3 L'ADN viral 27
2 Le diagnostic indirect 29
2.1 Les anticorps anti-HBs 29
2.2 Les anticorps anti-HBc 30
2.2.1 Les anticorps anti-HBc totaux 30
2.2.2 Les immunoglobulines M anti-HBc 30
2.3 Les anticorps anti-HBe 31
3 La variabilité du génome du VHB 31
3.1 Le gène S : génotypes et sérotypes, mutants S 31
3.1.1 Les génotypes 31
3.1.2 Les sérotypes 33
3.1.3 L'impact de la variation du gène S 34
3.2 Le gène Pré-C/C : mutant du précore 35
3.3 Le gène Pol : polymérase et résistance au traitement 36
V. Prise en charge 37
1 Traitement 37
1.1 Les objectifs du traitement 37
1.2 Les réponses au traitement 38
1.3 Les molécules actives contre le VHB 38
1.3.1 Les Immunomodulateurs 39
1.3.2 Les analogues nucléos(t)idiques 41
1.4 Le traitement des hépatites B 49
1.4.1 Le patient mono-infecté 49
1.4.2 Le patient co-infecté 51
2 L'évolution sous traitement anti-VHB 54
2.1 L'histoire d'une quasi-espèce VHB 54
2.2 L'histoire de la résistance du VHB 54
2.3 Mutations de la polymérase virale et résistance du VHB 56
2.3.1 La résistance à la lamivudine 58
2.3.2 La résistance à l'adéfovir 59
2.3.3 La résistance à l'entécavir 60
2.3.4 La résistance à l'emtricitabine 60
2.3.5 La résistance au ténofovir 60
2.4 La résistance chez le patient naïf de traitement antiviral 61
3 Les Patients co-infectés 62
3.1 La co-infection du patient infecté par le VHB 62
3.2 La co-infection VIH-VHB 62
3.3 Les perspectives de recherche chez le patient co-infecté 64
4 Les hépatites B occultes 65

B TRAVAIL PERSONNEL 70

VI. Exploration de la variabilité du VHB dans une population co-infectée par le VIH et le VHB 70

1 Matériel et méthode 71

1.1 Patients 71

1.2 Méthode 71

1.2.1 Les marqueurs sérologiques de l'infection 71

1.2.2 Détection du génome viral 71

1.2.3 Le génotypage : recherche de mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques par séquençage du gène POL (région Pré-S2/S) 72

2 Résultats 77

2.1 La cohorte nancéienne 77

2.1.1 Prévalence de l'infection par le VHB 77

2.1.2 Prévalence de l'infection par le VHC 81

2.1.3 Génotypage du virus de l'hépatite B 81

VII. Réactivation de l'infection VHB chez le patient co-infecté 83

1 Descriptions de cas 83

1.1 Patient 1 83

1.2 Patient 2 85

1.3 Patient 3 87

2 Discussion 90

VIII. Antigène HBs et hépatite occulte 94

1 Etude de l'expression de l'antigène S dans des systèmes d'expression in vitro et ex vivo construits par génie-génétique 94

1.1 Matériel et méthode 94

1.1.1 Amplification du gène S et clonage dans le vecteur pCR4-TOPO 94

1.1.2 Echantillons 95

1.2 Résultats 95

2 Perspectives 96

2.1 Construction pcDNA3-geneS 96

2.2 Transfection de cellules Huh7 par des constructions plasmidiques exprimant l'ADN du gène S sauvage et/ou muté. 96

2.3 Etude de l'expression des protéines S en cellule Huh7 97

2.4 Etude de l'antigénicité des clones de protéine S versus la protéine «S prototype » 97

IX. Conclusions 98

C ANNEXES 100

Annexe 1 Génotypage HBV détection de résistances aux antiviraux 101

Annexe 2 Amorces de la région Pré-S2-S 107

Annexe 3 Réalisation d'une cellulothèque 108

Annexe 4 Publication 110

BIBLIOGRAPHIE 111

Table des illustrations

Figure 1 : Structure du virus de l'hépatite B 1

Figure 2 : Particules virales sériques circulantes du virus de l'hépatite B 2

Figure 3 : Les cadres ouverts de lecture du génome viral du virus de l'hépatite B 3

Figure 4 : Les protéines virales du virus de l'hépatite B 4

Figure 5 : La polymérase du virus de l'hépatite B 5

Figure 6 : Les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B 6

Figure 7 : Cycle de réplication intracellulaire du virus de l'hépatite B 8

Figure 8 : Prévalence mondiale de l'antigène HBs 12

Figure 9 : Sources de transmission des hépatites virales chroniques (B et C) 13

Figure 10 : Evolution de l'infection à VHB selon l'âge du contage 17

Figure 11 : Mécanismes physiologiques et pathologiques de l'immunité hépatique 19

Figure 12 : Histoire naturelle de l'hépatite B 20

Figure 13 : Immuno-microscopie électronique d'un sérum de patient virémique à VHB 25

Figure 14 : Algorithme décisionnel du diagnostic des hépatites B 27

Figure 15 : Limites de détection de l'ADN du virus de l'hépatite B (copies/mL) 28

Figure 16 : Evolution des marqueurs sériques de l'hépatite B au cours de l'hépatite aiguë ou chronique 29

Figure 17 : Distribution géographique des génotypes de l'hépatite B 32

Figure 18 Principales mutations décrites sur le déterminant «a» de la protéine S du virus de l'hépatite B 33

Figure 19 : Cadre de lecture C ; protéines C, E et mutant du pré-core 35

Figure 20 : Prise en charge et traitement de l'hépatite B 37

Figure 21 : Options thérapeutiques anti-VHB : immunomodulateurs et antiviraux 39

Figure 22 : Inhibiteurs de l'ADN polymérase ; activité / toxicité 41

Figure 23 : Lamivudine 42

Figure 24 : Adéfovir ; mécanismes d'action 43

Figure 25 : Structure de l'adéfovir et du ténofovir 44

Figure 26 : Structure de l'entécavir 45

Figure 27 : Structure de la telbivudine 46

Figure 28 : Les traitements et associations thérapeutiques, actuels et futurs anti-VHB (Stanislas Pol) 49

Figure 29 : Impact des mutations de résistance de la polymérase sous analogues nucléosidiques, sur le gène S 56

Figure 30 : Mutations de résistance primaire aux antiviraux 57

Figure 31 : Incidence de la résistance aux analogues nucléos(t)idiques chez le patient naïf 61

Figure 32 : Prévalence croisée de l'infection à VHB (portage de l'AgHBs) et de l'infection à VIH 63

Figure 33 : Réactivation et réservoirs - Mécanisme de sélection et émergence de mutant de résistance 66

Figure 34 : Schéma réactionnel de la technique de génotypage du virus de l'hépatite B 76

Figure 35 : Génotype et mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques dans une cohorte nancéienne de patients co-infectés AgHBs ⊕ ou porteur d'hépatite occulte 82

Figure 36 : Patient 1; suivi sérologique VHB et contrôle de l'infection VIH lors de la réactivation virale VHB chez le patient co-infecté sous HAART 85

Figure 37 : Patient 2 ; suivi sérologique VHB et contrôle de l'infection VIH lors de la réactivation virale VHB chez le patient co-infecté sous HAART 86

Figure 38 : Patient 3 ; suivi sérologique VHB et contrôle de l'infection VIH lors de la réactivation virale VHB chez le patient co-infecté sous HAART 87

Figure 39 : Alignement comparatif des séquences génomiques des souches majoritaires du Patient 3 en 2008 sous pression de sélection du ténofovir et 2010 sous pression de sélection de la lamivudine 89

Figure 40 : Alignement comparatif des séquences génomiques des souches de la quasi-espèce VHB infectant le Patient 3 sous pression de sélection de la lamivudine (2010) clonées dans pCR4-Topo 95

Table des illustrations

Tableau 1 : Impact phénotypique des mutations de résistance aux analogues nucléosidiques 58

Tableau 2 : Mutations décrites comme potentiellement impliquées dans l'absence de détection de l'épitope (par ordre de fréquence dans la littérature) 68

Tableau 3 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées lors de l'amplification initiale 73

Tableau 4 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées lors de la PCR nichée 74

Tableau 5 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées lors de la PCR de séquençage 74

Tableau 6 : Profils sérologiques et prévalence de l'infection à VHB selon l'origine ethnique 77

Tableau 7 : Description de la cohorte nancéienne de 383 patients séropositifs pour le VIH lors de leur inclusion dans l'étude. 78

Tableau 8 : Caractéristiques biologiques et cliniques des patients infectés par le VIH selon leur profil sérologique pour le VHB 80

Tableau 9 : Pression de sélection et mutations de résistance 88

Tableau 10 : Patients présentant une charge virale VHB détectable : profil sérologique et traitement 90

Liste des abréviations

AA	Acide aminé
Ac	Anticorps
Ac anti-HBc	Anticorps dirigés contre la protéine C du virus de l'hépatite B
Ac anti-HBe	Anticorps dirigés contre la protéine E du virus de l'hépatite B
Ac anti-HBs	Anticorps dirigés contre la protéine S du virus de l'hépatite B
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADV	Adéfovir
AgHBc	Déterminant antigénique de la protéine C du virus de l'hépatite B
AgHBe	Déterminant antigénique de la protéine E du virus de l'hépatite B
AgHBs	Déterminant antigénique de la protéine S du virus de l'hépatite B
ALT	Alanine aminotransférase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ADNccc	ADN circulaire fermé totalement double brin
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CMIA	Chimiluminescence microparticule immuno-analyse
CV	Charge virale
ETV	Entécavir
FTC	Emtricitabine
HAART	Thérapie anti-rétrovirale de haute activité
HBc	Protéine C du virus de l'hépatite B
HBe	Protéine E du virus de l'hépatite B
IC50	Concentration inhibitrice 50%
IFN	Interféron
IgM	Immunoglobuline de classe M
INRT	Inhibiteur nuléosidique de la transcriptase inverse
IP	Anti-protéase
LMV	Lamivudine
IV	Intraveineuse
MEIA	Microparticule enzymo-immuno-analyse
MU	(Million d'unités) IFN
N	Normale
NK	Natural killer
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Cadre ouvert de lecture ou Open Reading Frame
pb	Paire de bases
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG-IFNα	Interféron α pegylé
PT	Protéine terminale
RE	Réticulum endoplasmique
RT	Transcriptase inverse
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SVF	Sérum de veau fœtal
UI	Unité internationale
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHD	Virus de l'hépatite Delta
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
YMDD	Tyrosine (Y) Méthionine (M) Acide Aspartique (D) Acide Aspartique (D)
®	Enregistré
⊖	Négatif
⊕	Positif

A Introduction

I. Virus de l'hépatite B

1 Un peu d'histoire

L'antigène « Australia », découvert en 1964 par Blumberg dans le sérum d'un donneur de sang aborigène australien, n'a été décrit que trois ans plus tard par Prince, comme l'agent infectieux responsable d'une hépatite virale post-transfusionnelle, dite hépatite B (Escuret *et al.*, 2006).

2 Le virus et son génome

Le virus de l'hépatite B (VHB) appartient à la famille des *Hepadnaviridae*, qui ont en commun, outre leur tropisme hépatique et leur structure génomique caractéristique, une étroite spécificité d'hôte. Cette famille est ainsi scindée en deux genres : les *Orthohepadnavirus* qui regroupent des espèces infectant des mammifères, primates supérieurs (gorille) et rongeurs (marmotte), alors que les *Avihepadnavirus* ont pu être mis en évidence chez le canard de Pékin et le héron cendré (A. Mammette, 2002; Mammette *et al.*, 2002). Néanmoins, la grande similitude de leur séquence génomique, confirme l'idée d'un ancêtre commun et semble faire remonter l'origine des *Hepadnaviridae* avant la spéciation mammifère-oiseaux.

2.1 Les particules virales du virus de l'hépatite B

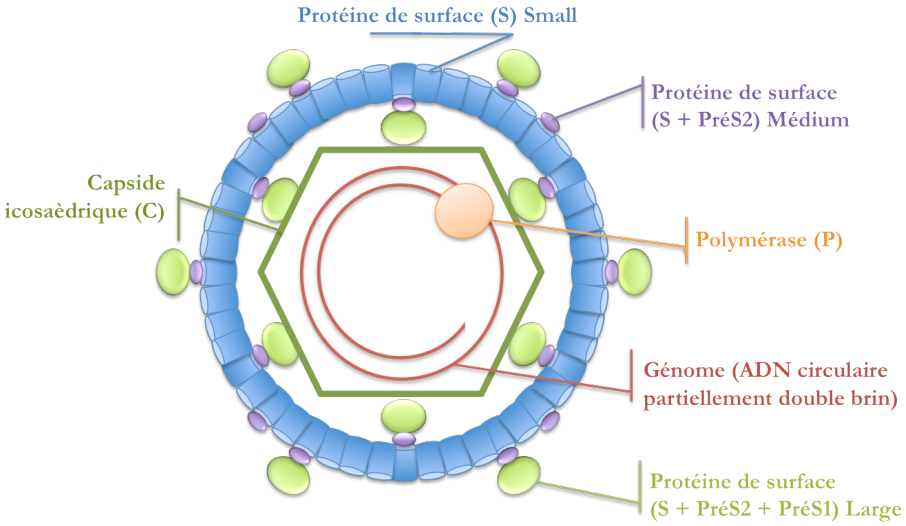

Figure 1 : Structure du virus de l'hépatite B

L'agent de l'hépatite B est un virus enveloppé à ADN, dont la nucléocapside est icosaédrique *(Fig. 1)*. Extrêmement résistant en milieu sérique, où différentes structures virales sont observées, il demeure infectieux malgré des années de conservation à -20°C, mais il est inactivé par chauffage à 100°C ou au contact de l'hypochlorite de sodium ; les particules de Dane, particules virales complètes, sont infectieuses, par opposition aux particules virales vides, dépourvues de génome et non infectieuses. Celles-ci, sphériques ou en bâtonnets, sont uniquement formées d'une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique, dans laquelle sont encrées des protéines de surface *(Fig. 2)*. Sécrétées en large excès (1000 particules vides pour une particule de Dane), elles pourraient leurrer le système immunitaire et sont colonisées par le virus de l'hépatite Delta (VHD), parasite du VHB (Mammette *et al.*, 2002).

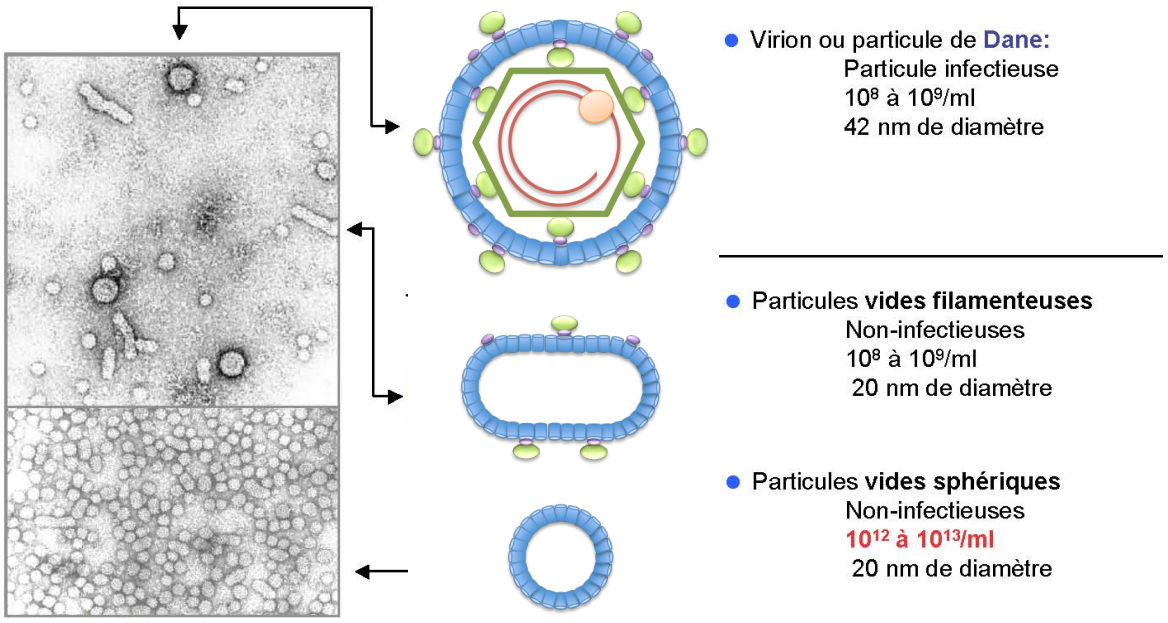

Figure 2 : Particules virales sériques circulantes du virus de l'hépatite B

2.2 Le génome

Le VHB est caractérisé par un génome de petite taille (3200 paires de bases), circulaire mais non fermé de manière covalente, car bicaténaire sur une portion variable de sa longueur. Le brin long (complet, L ou négatif ⊖) présente en 5' une courte zone de redondance, liée de façon covalente à une protéine virale codée par le gène P, la protéine terminale (PT), tandis que l'extrémité 3' est libre. Le brin court (S ou positif ⊕) possède une extrémité 5' fixe, qui chevauche les deux extrémités du brin long et assure ainsi la circularisation du génome, alors que l'extrémité 3' est libre et variable, de sorte que la longueur du brin court atteint 40 à 90% de celle du brin long.

Le brin génomique court comprend quatre cadres ouverts de lecture (ORF : open reading frame ou cadre ouvert de lecture) : P, C, S et X codant quatre ARNm (ARN messager) et sept protéines virales (Locarnini, 2004) *(Fig. 3)*.

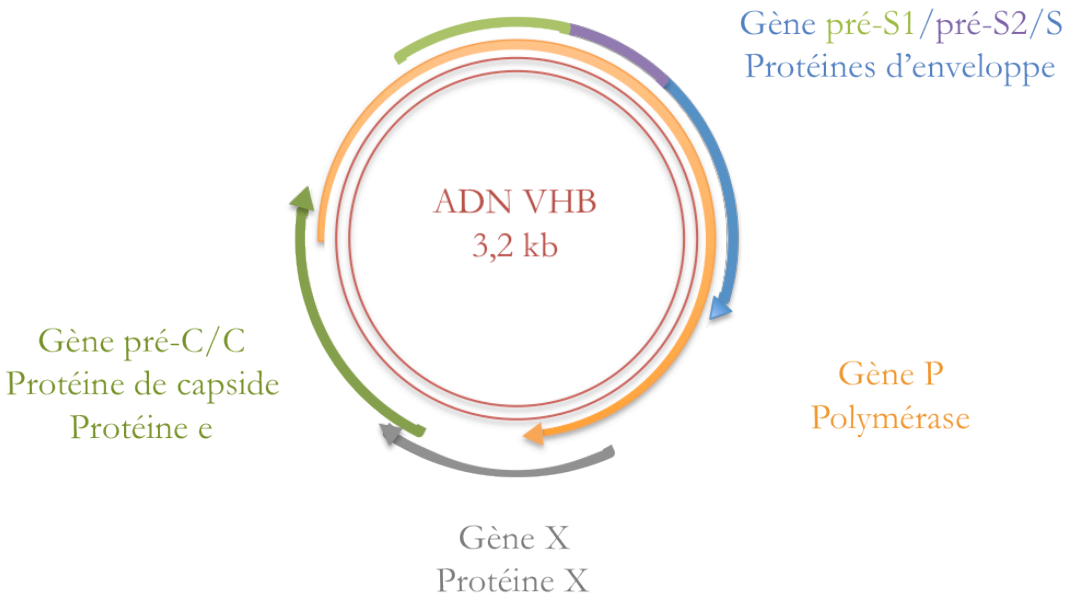

Figure 3 : Les cadres ouverts de lecture du génome viral du virus de l'hépatite B

Ces ORF se chevauchant, elles couvrent l'ensemble du génome et chaque nucléotide code au moins une protéine virale (certains codant quatre protéines virales) ; les séquences codantes et de régulation étant étroitement intriquées *(Fig. 4)*. Le cadre P représente 80% du génome et recouvre au moins partiellement tous les autres cadres de lecture. Les quatre ARN possèdent le même site de terminaison, caractérisé par une séquence de polyadénylation. Enfin, le génome viral possède un site unique de restriction EcoRI, choisi comme origine pour la numérotation des bases dans le sens des aiguilles d'une montre.

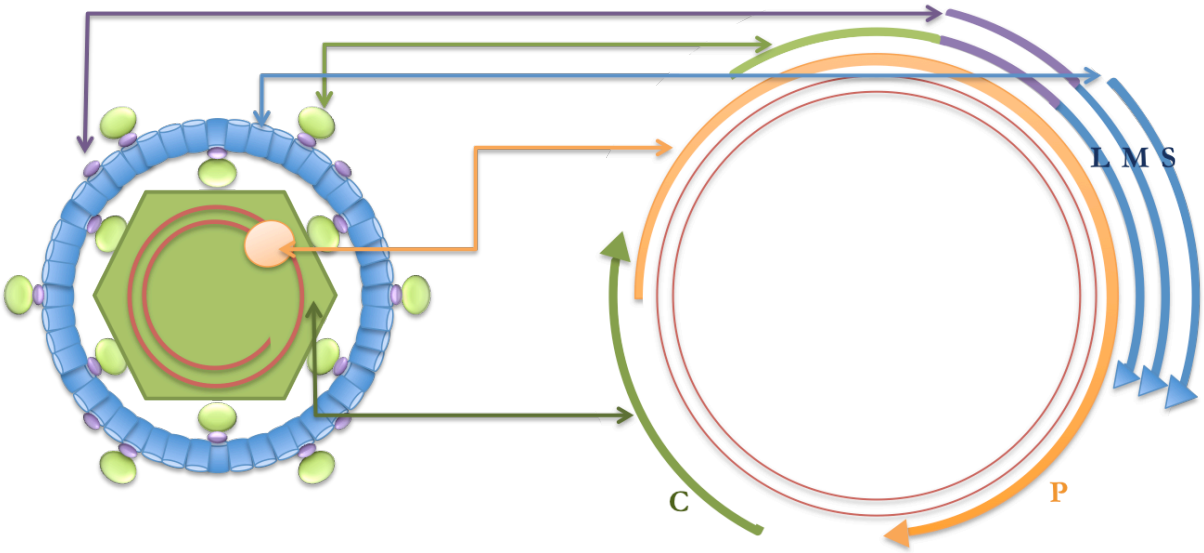

Figure 4 : Les protéines virales du virus de l'hépatite B

2.3 Les protéines virales

2.3.1 La protéine du gène P

Le gène P code les activités polymérase et RnaseH, enzymes indispensables à la synthèse du génome viral à partir de l'ARN pré-génomique, la protéine terminale (PT) et une région non codante (spacer ou espaceur) *(Fig. 5)*.

a. La polymérase virale

La polymérase (Pol) est une protéine de grande taille, 832 à 845 acides aminés (AA) selon le génotype, soit près de 2500 paires de bases (pb) sur les 3200 du génome du VHB et la quasi-totalité du cadre de lecture P. La polymérase des *Hepadnaviridae*, en plus d'une activité ADN-polymérase ARN-ADNdépendante, possède une activité transcriptase inverse (RT), qui permet l'initiation de la synthèse du brin long d'ADN.

Le motif YMDD constitue le site actif de la polymérase ; très conservé au sein des *Hepadnaviridae*, il est également retrouvé dans la séquence de la transcriptase inverse des *Retroviridae*. Le domaine RT/Pol est soumis, comme la RT des rétrovirus, à l'apparition de mutations susceptibles d'induire des résistances aux antiviraux. Afin de mieux caractériser ces dernières et de s'affranchir des nombreuses mutations (insertions, délétions) du domaine charnière et des variations génotypiques, une numérotation propre à la RT, ayant pour origine le motif conservé EDWGPCDEHG (avec E en rt1) a été adoptée. Le résidu M du motif YMDD se trouve dès lors en position rt204 (Huraux *et al.*, 2003).

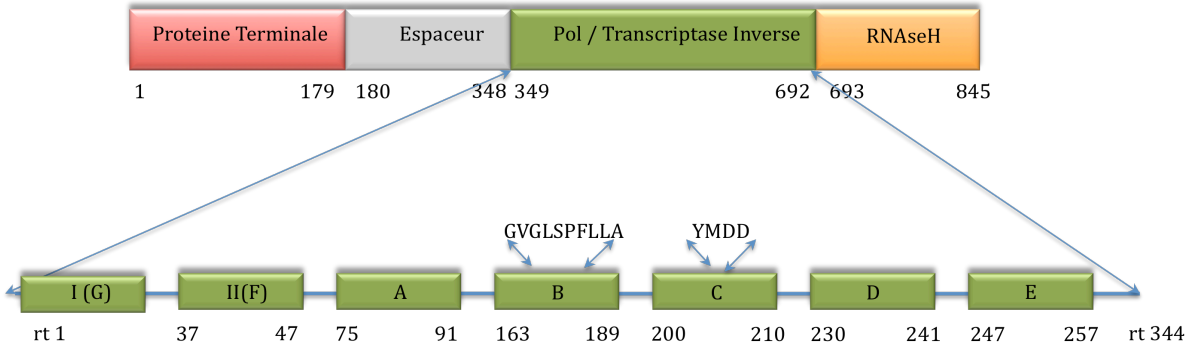

Figure 5 : La polymérase du virus de l'hépatite B

Quatre domaines différents ont été identifiés : depuis N-terminal, la protéine terminale contenant l'amorce Y96, l'espaceur, la transcriptase inverse et la RNase H. La transcriptase inverse comporte différents domaines (Soriano *et al.*) impliqués dans l'activité enzymatique. On trouve dans le domaine catalytique C, le motif YMDD commun au VIH et dont la mutation confère la résistance à la lamivudine.

b. La RNaseH

Le dernier domaine du gène P porte l'activité RNaseH, qui dégrade l'ARN impliqué dans la double hélice ADN-ARN à l'issue de la synthèse du long brin d'ADN génomique par la RT virale.

2.3.2 Les protéines du gène S

Le cadre de lecture S code trois protéines de surface du VHB : les protéines S, Pré-S2/S et Pré-S1/Pré-S2/S.

a. La protéine S

La protéine S est la plus petite des trois protéines de surface (226 acides aminés), mais constitue le composant majeur de l'enveloppe virale, l'antigène HBs (AgHBs). L'AgHBs, exposé à la surface de la particule virale, est la cible d'une majorité d'anticorps neutralisants (Ac). La persistance de l'AgHBs sérique au delà de six mois, constitue le critère permettant de qualifier l'hépatite B d'hépatite chronique.

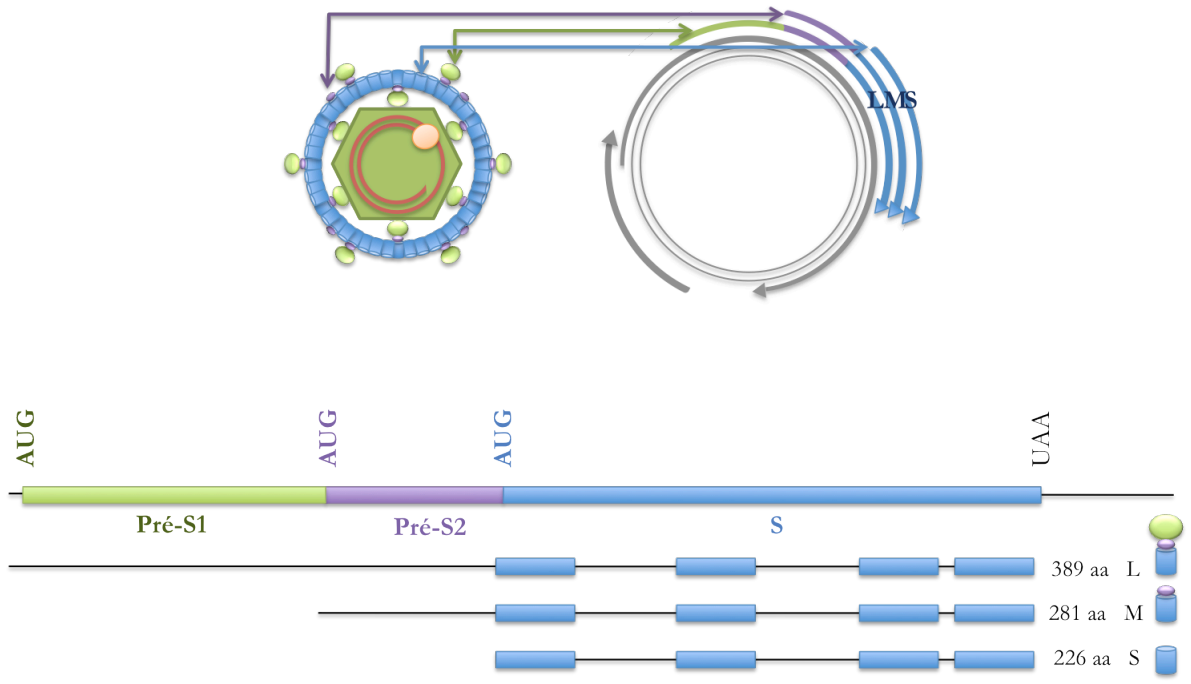

Figure 6 : Les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B

b. Le Pré-S1 / Pré-S2

Les régions Pré-S1 et Pré-S2 sont situées en amont du gène S et codent les protéines M et L qui, ancrées dans l'enveloppe (d'origine cellulaire), lui permettent de recouvrir la capside virale *(Fig. 6)*.

La région Pré-S des protéines M et L du gène S, serait impliquée dans le processus d'entrée du VHB. En effet, des expériences de mutagénèse dirigée ou un défaut de myristoylation de la région Pré-S entraînent une perte d'infectiosité du VHB en culture cellulaire (Gripon *et al.*, 2005).

2.3.3 La protéine du gène X

Le cadre de lecture X recouvre en partie le gène de la polymérase (cadre P), ainsi que la région Pré-C (cadre C) et code une protéine unique de taille variable (146 à 154 AA), à la séquence très conservée *(Fig. 3)*. Cette protéine serait associée à la cancérogénèse VHB-induite du patient chroniquement infecté, par trans-activation de gènes viraux et cellulaires, interactions avec la protéine p53 ou les systèmes de réparation-excision des nucléotides (Koike, 1995).

2.3.4 Les protéines du gène C

Les protéines de capside, protéine C du VHB (HBc) et l'antigène HBe (AgHBe) de la protéine E du VHB (HBe), sont exprimées par le cadre ouvert de lecture C.

La protéine C de 183 à 185 AA (selon le génotype), non glycosylée, s'associe sous forme de dimère à l'ARN pré-génomique, pour former la nucléocapside. Non soluble et situé à l'intérieur de la particule virale, l'antigène HBc (AgHBc) n'est pas détectable au niveau sérique, par opposition à l'AgHBe, issu de la maturation de la région Pré-C, par clivage du peptide signal et protéolyse carboxy-terminale (élimination de la zone hydrophobe riche en arginine), qui lui est excrété sous forme soluble. La fonction précise de l'AgHBe n'est pas connue, mais il pourrait être impliqué dans la tolérance immunologique (à l'encontre de l'AgHBc et l'AgHBe), indispensable à l'installation de la persistance virale.

2.4 Le cycle cellulaire du virus de l'hépatite B

Même si du fait de son tropisme, le cycle cellulaire du VHB est essentiellement hépatique, des sites extra-hépatiques de persistance virale, comme les cellules mononucléées sanguines, ont été décrits (Pontisso *et al.*, 2008). Contrairement aux autres virus à ADN infectant l'homme, le VHB s'appuie sur un intermédiaire de réplication d'ARN pré-génomique et possède une activité de transcription inverse qui le rapproche des rétrovirus *(Fig. 7)*.

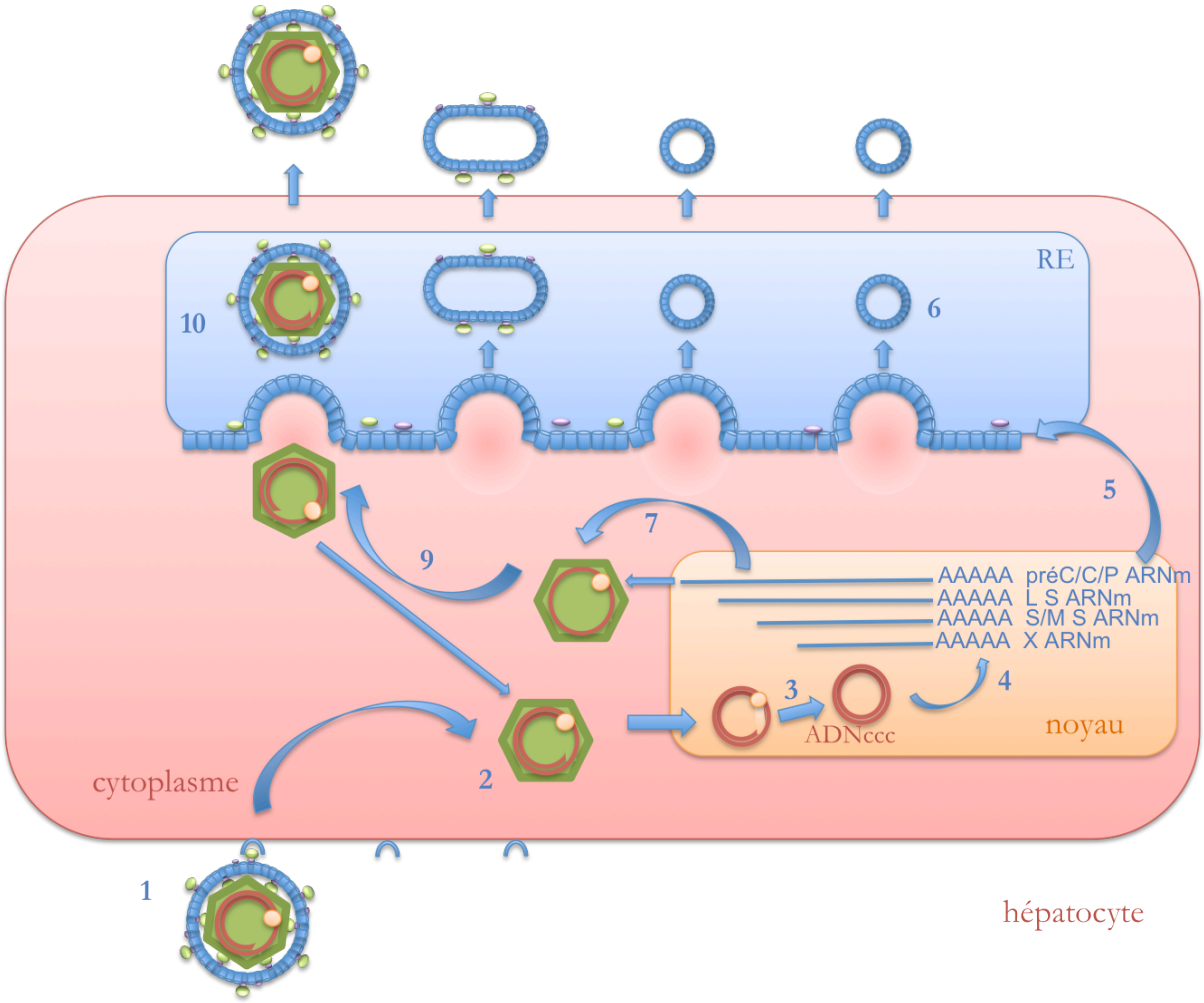

Figure 7 : Cycle de réplication intracellulaire du virus de l'hépatite B

1 Adhésion à la surface des hépatocytes

Après fixation via les protéines HBs virales à un récepteur cellulaire dont la nature est en discussion, l'enveloppe virale et la membrane cytoplasmique fusionnent.

2 Décapsidation du génome virale

Après libération dans le cytoplasme, la nucléocapside migre vers le noyau. Lors de la translocation nucléaire, la stimulation d'un signal sur le peptide du core induit la décapsidation du génome viral.

3 Synthèse de l'ADN proviral

Dans le noyau, la transcriptase inverse achève la synthèse du brin court d'ADN. La PT, la séquence redondante en 3' du brin long, ainsi que l'oligo-ARN en 5' du brin court sont éliminés pour permettre la circularisation des deux brins. Une ligase assure la circularisation en un ADN circulaire, fermé, totalement double brin et super-enroulé qui pourra être transcrit (ADNccc ou covalently closed circular DNA).

4 Transcription

La transcription de l'ADNccc en ARNm et ARN pré-génomique (3,5 kb) est assurée par l'ARN polymérase II cellulaire.

5 Traduction des différentes protéines virales

Les ARNm transcrits sont traduits en protéines dans le cytoplasme de l'hépatocyte.

6 Transport des protéines d'enveloppe

Les protéines d'enveloppe L, M et S transitent par le Golgi et s'expriment à la surface du réticulum endoplasmique (RE).

7 Encapsidation de l'ARN pré-génomique

Les protéines de core forment la capside et recrutent l'ARN pré-génomique, qui sera encapsidé associé à la polymérase et à une kinase cellulaire.

8 Synthèse du brin long d'ADN

L'activité RT de la polymérase réalise la synthèse du brin long ⊖ d'ADN, à partir du brin matrice ⊕ d'ARN pré-génomique. Puis le brin matrice d'ARN est dégradé par l'activité RNaseH virale.

9 La synthèse partielle du brin court d'ADN

La polymérase virale entreprend la synthèse du brin court ⊕ d'ADN ; cette synthèse sera interrompue de façon aléatoire, à la sortie du virion de la cellule. La zone redondante de 224 pb en 3' permet, par chevauchement des extrémités, la circularisation du génome viral.

10 La libération de virions

Les nucléocapsides matures vont former des particules virales complètes par bourgeonnement à la surface du RE, à travers une membrane porteuse de l'AgHBs. D'autres nucléocapsides réintègrent le noyau et contribuent à augmenter la synthèse d'ADN viral (Beck *et al.*, 2007).

Les virions s'accumulent dans le Golgi et sont excrétés, probablement par le biais de vésicules d'exocytose.

II. Hépatite B

1 *Epidémiologie*

Dès 1975, le premier vaccin repose sur l'utilisation, après purification, de l'Ag « Australia » extrait du plasma de porteurs chroniques de l'infection. Le premier vaccin obtenu par génie génétique ne fut commercialisé qu'en 1986. Or, malgré l'efficacité vaccinale et même si une diminution de la transmission est observée depuis la généralisation de la vaccination (Wasley *et al.*, 2007), le VHB demeure un problème majeur de santé publique.

Même si l'infection n'évolue vers la chronicité que dans 5 à 10% des cas, les sources de l'organisation mondiale de la santé (OMS) recensent néanmoins, deux milliards de sujets infectés et 350 millions de porteurs chroniques de l'infection à VHB, dont le stade ultime est le carcinome hépatocellulaire (CHC). Dans le monde, l'infection par le VHB est à l'origine d'un million de décès par an (World Health Organization. July 17, 2007), pour la plupart dans les pays en voie de développement. En effet, dans ces régions à forte incidence de portage de l'AgHBs, l'infection acquise par transmission materno-fœtale est associée à un risque élevé de passage à la chronicité *(Fig. 8)*. En France, les porteurs chroniques seraient 100 000 et l'incidence annuelle atteindrait toujours 10 cas pour 100 000 habitants.

Si le virus est présent à forte concentration dans le sang du patient atteint d'une hépatite aigüe ou chronique, il est également retrouvé dans de nombreux liquides biologiques, les sécrétions génitales, la salive, le lait, les larmes et les urines (contaminés par du sang). Même si la transmission sexuelle joue un rôle important, notamment dans les pays riches où elle représente un mode croissant de transmission, l'exposition au sang constitue le principal mode de transmission. Le risque d'infection par piqûre dépend directement du niveau de réplication virale (charge virale, CV) et atteindrait de 20 à 30%. La contagiosité sanguine du VHB est donc considérée comme 10 fois supérieure à celle du virus de l'hépatite C (VHC) et 100 fois plus élevée que celle du virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

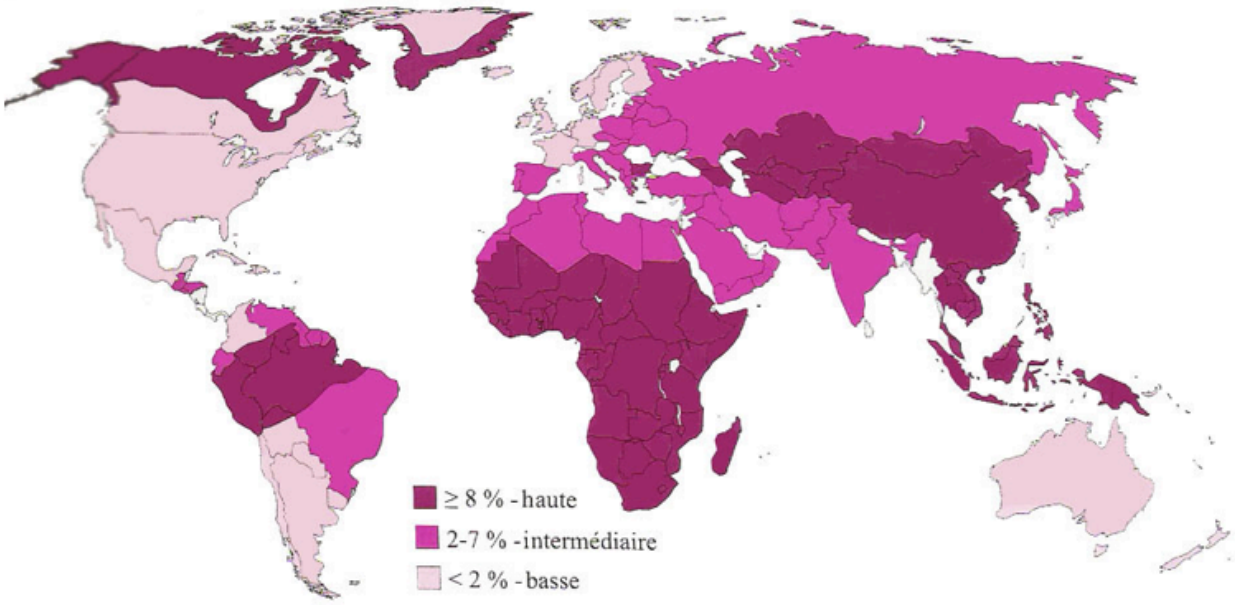

Figure 8 : Prévalence mondiale de l'antigène HBs

La transmission verticale est un facteur très important de dissémination virale dans les régions de forte prévalence, à bas niveau d'hygiène. Le risque de transmission est majeur lors de l'accouchement, notamment si la réplication virale est active. Même si le taux de transmission à la naissance est de 90 à 100% lorsque la mère présente une hépatite réplicative, ce risque est ramené à 10-20% en l'absence de marqueur de réplication.

La présence de virus dans la salive du patient infectieux, a pu être mise en évidence (Chen *et al.*, 2009), sans qu'un risque important de transmission n'ait été prouvé. La transmission horizontale n'est pas négligeable, dans les pays en voie de développement comme dans les pays riches ; elle serait la source d'infections de transmission inexpliquée (un tiers des cas).

Sources de transmission	Probabilité de transmission		
	Probable	Rare	Suspecte
Transmission intrafamiliale	VHB		VHC
AES (Accident d'exposition au sang)	VHB VHC		
Effraction cutanée	VHB VHC		
Drogue IV	VHB VHC		
Transfusion	VHB VHC		
Hémodialyse	VHB VHC		
Orale		VHB VHC	
Sexuelle	VHB	VHC	
Sexualité oro-anale	VHB		VHC
Maternofoetale		VHC	
Percing - tatouage	VHB VHC		
Acuponcture	VHB VHC		

Figure 9 : Sources de transmission des hépatites virales chroniques (B et C)

www.hivandhepatitis.com/images2006/pg28-lrg.gif

2 *Prévention*

2.1 Les mesures préventives générales

Les modalités de transmission du VHB étant connues, la prévention repose sur des mesures générales visant à prévenir les maladies sexuellement transmises et les expositions au sang et produits biologiques *(Fig. 9)*. Chez le toxicomane (IV), le matériel à usage unique doit être favorisé. De plus, des mesures spécifiques consistent à exclure du don de sang, de tissus ou d'organes les sujets porteurs d'au moins un marqueur sérique de contage viral (en dehors des anticorps anti-HBs (Ac anti-HBs)). Actuellement, la recherche de l'ADN viral n'est pas réalisée dans ce contexte (sauf exception), d'où la nécessité d'exclure du don les donneurs porteurs d'un anticorps anti-HBc (Ac anti-HBc) isolé (core-isolé). Enfin, le respect des règles d'hygiène doit être scrupuleux, non seulement en milieu médical afin de limiter le risque professionnel d'exposition au sang, mais aussi dans l'entourage du patient infecté, afin de prévenir le risque de transmission horizontale.

2.2 L'immunothérapie

Les immunoglobulines spécifiques anti-HBs proviennent de donneurs immunisés par vaccination contre le VHB et sont utilisées pour l'immunisation passive post-expositionnelle. L'immunothérapie passive fait partie intégrante de la prise en charge de tout nouveau-né de mère positive pour l'AgHBs, des victimes d'accident d'exposition au sang (AES) ou d'exposition virologique non vaccinés. Chez le nouveau-né de mère porteuse de l'AgHBs (recherche obligatoire au cours du 6ème mois de grossesse dans les pays occidentaux), la sérovaccination consiste en l'injection de 100 UI (unités internationales) d'immunoglobulines spécifiques anti-HBs, administrées en deux sites différents dans les 12 à 14 heures suivant la naissance. Après transplantation hépatique, chez un sujet porteur du VHB, l'immunothérapie permet de prévenir la réinfection du greffon, en neutralisant les particules virales circulantes.

Cependant, ces immunoglobulines anti-HBs ne confèrent qu'une protection transitoire et doivent être relayées par une immunisation active induite par vaccination (dès la naissance).

Gripon *et al.*, en décrivant l'implication du Pré-S2 dans l'entrée du VHB dans l'hépatocyte, ont ouvert une nouvelle voie prophylactique post-expositionnelle via l'utilisation d'Ac anti-Pré-S2 en immunothérapie, voire l'utilisation de la protéine Pré-S2 en vaccinothérapie, notamment en post-greffe (Gripon *et al.*, 2005).

2.3 La vaccination contre l'hépatite B

Les premiers essais cliniques de vaccination furent pratiqués en France dès 1976 (Maupas *et al.*, 1976), puis aux USA en 1979 (Szmuness, 1979). Le vaccin consistait en une préparation purifiée inactivée de particules virales vides (ne contenant que les protéines d'enveloppe), issue du sérum de patients chroniquement infectés par le VHB. Très efficace (plus de 90% des sujets protégés) et inoffensif (30 millions des doses ont été utilisées sans troubles particuliers), il obtint l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1981. Une nouvelle génération de vaccins produits par génie génétique, par expression des gènes codant les protéines d'enveloppe S ou Pré-S/S en levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ou cellules de mammifères (Chinese Hamster Ovary : CHO), s'avéra plus facile et moins coûteuse à produire.

Deux schémas vaccinaux sont actuellement préconisés : l'un à quatre injections, avec trois injections distantes d'un mois et un rappel au bout d'un an (schéma 0-1-2-12) ; l'autre à trois injections seulement, avec deux injections distantes d'un mois et un rappel à six mois (schéma 0-1-6) (INVS, 2008).

Afin de combattre l'extension de l'hépatite B, après avoir préconisé la vaccination ciblée de certaines populations : les sujets à risques (professionnels de santé, familles de porteurs chroniques du virus, toxicomanes IV), les nouveau-nés de mère porteuse d'AgHBs, les experts recommandent désormais une vaccination systématique de l'ensemble des nourrissons et préadolescents (11–13 ans) avant l'âge des premiers rapports sexuels.

La vaccination induit une immunité protectrice chez 95 à 98 % des sujets vaccinés immunocompétents. L'immunité humorale peut être vérifiée et quantifiée par dosage des Ac anti-HBs. On considère classiquement qu'un titre supérieur à 10 UI/L est protecteur, mais la mémoire immunitaire permet de protéger le sujet répondeur même après disparition de ces anticorps circulants.

Des facteurs de mauvaise réponse à la vaccination sont décrits comme l'âge (l'immunogénicité diminue nettement après 40 ans), le sexe (les hommes répondent moins bien que les femmes), l'obésité, le tabagisme et le traitement par hémodialyse. L'immunité conférée est de longue durée : prouvée sur 10-15 ans, elle pourrait atteindre, voire dépasser 40 ans, d'après certaines modélisations. L'innocuité de ce vaccin est remarquable, malgré sa mise en cause en France, sans fondement scientifique, dans la survenue de cas de sclérose en plaque (Ascherio *et al.*, 2001; Confavreux *et al.*, 2001).

III. Histoire de la maladie

Au total, le nombre de porteurs infectés par le VHB dans le monde est estimé à deux milliards (C. Trepo, 2006).

Deux grandes situations coexistent :

1 Le contage dans l'enfance

Le contage dans l'enfance est le mode de transmission majoritaire dans les pays endémiques (Afrique subsaharienne, Asie du Sud-Est), où le portage de l'AgHBs touche plus de 10% de la population générale *(Fig. 8)*. La contamination se fait de la mère infectée chroniquement à l'enfant, lors de l'accouchement ou en périnatal (le virus est excrété dans le lait et la salive). Ce contage précoce est responsable d'une forte tendance au passage à la chronicité *(Fig. 10)*. De plus, l'important portage chronique explique le risque accru de transmission par voie sexuelle.

2 Le contage à l'âge adulte

Dans les pays de faible endémie, où moins de 0,5% de la population est porteuse de l'AgHBs, le mode de transmission majoritaire est la voie « sanguine ». En France, depuis 1970 et la mise en œuvre du dépistage systématique de l'AgHBs dans les dons de produits sanguins, la transmission sanguine ne survient plus qu'en contexte à risque (transfusions multiples et fenêtre virologique, patient hémodialysé et/ou greffé, recours à la toxicomanie IV…). La transmission sexuelle correspond à un nombre modéré de cas (second mode de transmission). Chez le personnel soignant, le risque de contamination éventuelle doit être prévenu grâce au recours à la vaccination ; en l'absence d'immunisation passive, le risque de transmission par piqûre est estimé entre 10 et 30%, selon la nature de la piqûre et la CV du patient « source ». La transmission horizontale, plus faible qu'en zone endémique, est difficile à estimer.

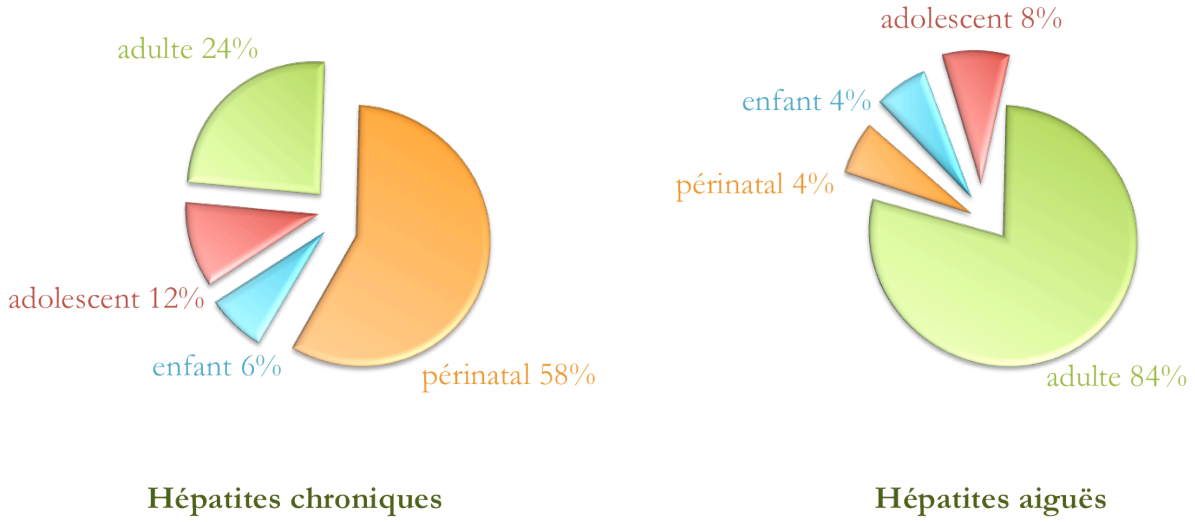

Figure 10 : Evolution de l'infection à VHB selon l'âge du contage

3 *L'histoire naturelle de la maladie*

3.1 La relation hôte-virus

L'homme est le seul hôte naturel du VHB. Après pénétration par voie sanguine ou sexuelle, le VHB gagne le foie par voie sanguine. Le sang peut être infectieux pendant plusieurs semaines avant l'apparition des symptômes et le demeure pendant la phase clinique et chez le porteur chronique ; le degré d'infectiosité des porteurs chroniques varie proportionnellement à la CV sérique. Le sérum de sujets infectés peut renfermer jusqu'à 10^{10} virions infectieux par mL.

Les marqueurs de l'infection apparaissent bien avant les signes cliniques. L'effet cytopathogène est limité et la réplication virale ne s'accompagne pas de lésions cellulaires. L'expression de certaines protéines virales (AgHBs, AgHBc) à la surface des cellules hépatocytaires induit une réaction immunitaire de l'hôte. L'AgHBs est détectable après deux semaines ou, dans de rares cas, après six à neuf mois selon la dose infectieuse, le mode de transmission et l'hôte.

Le VHB étant peu cytolytique, c'est du conflit entre le virus et les défenses immunitaires que naissent la gravité et le polymorphisme de l'infection.

3.1.1 La réponse immunitaire à médiation cellulaire

La réponse immunitaire à médiation cellulaire met en jeu les lymphocytes T qui attaquent et détruisent les cellules infectées. En effet, les épitopes viraux portés par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, présents à la surface des hépatocytes, seraient reconnus par les lymphocytes T-CD8 spécifiques, entraînant la lyse cellulaire. Cette immunité est dirigée contre les antigènes (Ag) de la protéine du core (AgHBc).

Les protéines d'enveloppe, éventuellement présentes à la surface de la cellule, seraient plutôt quant à elles, la cible de l'ADCC (antibody dependant cellular cytotoxicity) médiée par les lymphocytes « Natural Killer » (NK).

3.1.2 La réponse immunitaire à médiation humorale

La réponse immunitaire humorale est médiée par les lymphocytes B et leurs Ac spécifiques, neutralisant les virus circulants.

Alors qu'une réponse immunitaire coordonnée via la neutralisation des virions par les anticorps circulants et la destruction des cellules infectées par les cellules cytotoxiques, permet la résolution de l'infection aiguë, une réponse non coordonnée est la source de complications infectieuses majeures. Ainsi, en cas de réponse immunitaire à médiation cellulaire excessive, une hépatite fulminante pourra survenir tandis qu'une réponse immunitaire non adaptée favorisera un passage à la chronicité *(Fig. 11)*.

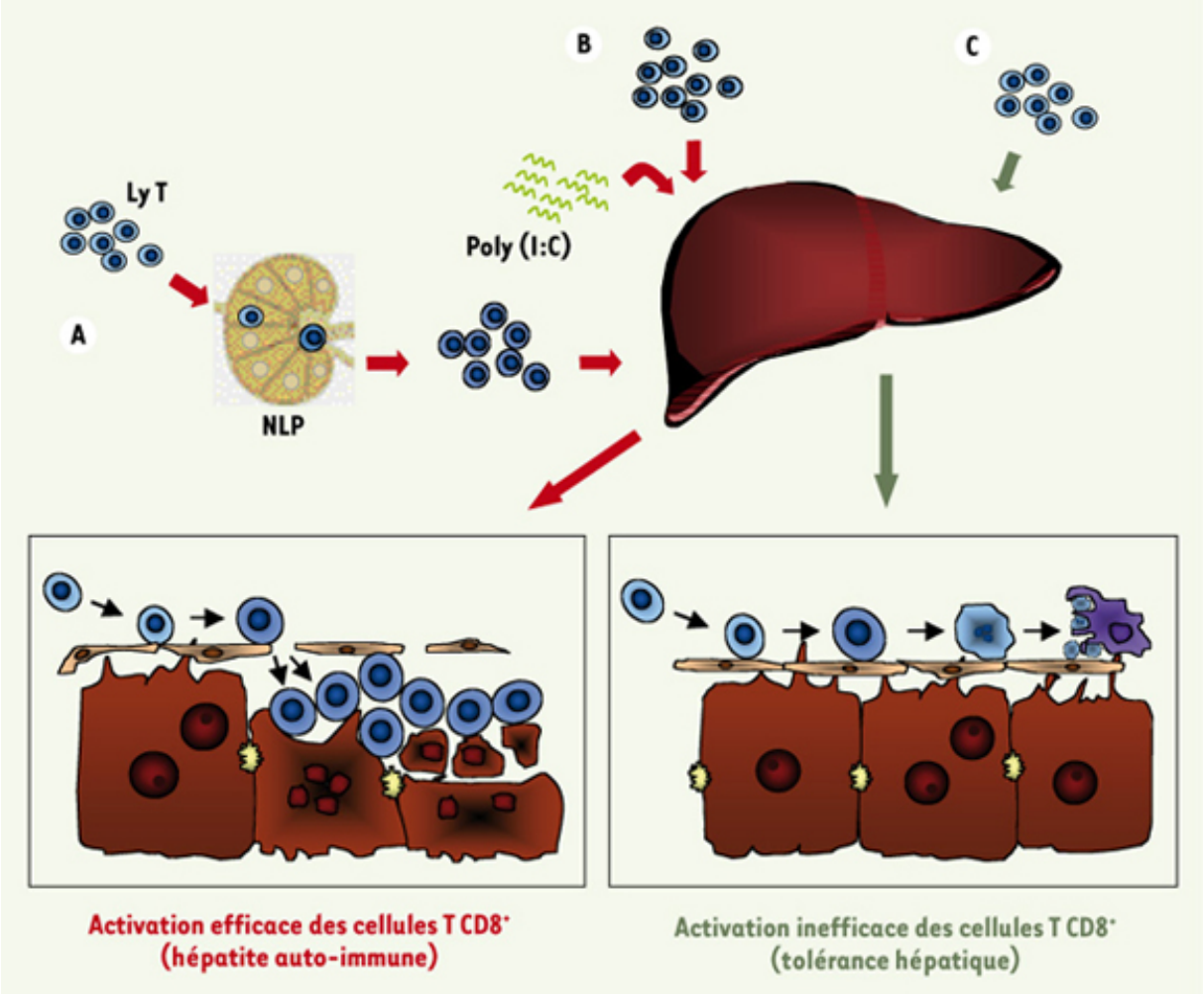

Figure 11 : Mécanismes physiologiques et pathologiques de l'immunité hépatique

A. Lorsque des lymphocytes T (Ly T) autoréactifs CD8 ⊕ naïfs (en bleu), spécifiques des antigènes hépatiques, sont activés dans les nodules lymphatiques périphériques (NLP) (en beige), cette activation est efficace et provoque une hépatite auto-immune.

B. Après une exposition à des motifs viraux entraînant une activation du système immunitaire inné, comme, par exemple, la liaison du poly (I - C) (en vert) avec les TLR3 des cellules endothéliales, les cellules endothéliales des sinusoïdes sont aptes à activer les lymphocytes T CD8 ⊕ naïfs spécifiques des antigènes hépatiques. Cette activation, indépendante de l'aide des lymphocytes T CD4 ⊕, permet la survie des lymphocytes T CD8 ⊕ et l'élimination de cellules infectées ou le développement d'une hépatite auto-immune.

C. En situation physiologique, les lymphocytes T CD8 ⊕ naïfs spécifiques des antigènes hépatiques reconnaissent les antigènes présentés par les cellules endothéliales des sinusoïdes, *via* le CMH I, ou par les hépatocytes eux-mêmes. L'expression de molécules de co-stimulation par les cellules endothéliales (CD80 et CD86) permet ensuite l'activation des lymphocytes T CD8 ⊕ mais l'absence de signaux de survie (IL-2, par exemple) entraîne leur mort par apoptose. Ce mécanisme de délétion de lymphocytes T CD8 ⊕ serait central dans le développement de la tolérance hépatique. Les flèches rouges représentent les mécanismes (A et B) d'activation efficace, tandis que les flèches vertes représentent le mécanisme (C) d'activation inefficace. Le foie : un organe du système immunitaire ?

Pascal Lapierre, Fernando Alvarez MEDECINE/SCIENCES *2007 ; 23 : 985-90*

3.2 Physiopathologie

3.2.1 Les manifestations cliniques

Après le contage et une période d'incubation de 30 à 120 jours, inconstamment marquée de manifestations pseudo-grippales et/ou de troubles digestifs, la phase d'état est symptomatique dans 20 à 30 % des cas. Au cours de l'infection aiguë, l'ADN et l'ARN viral peuvent être détectés dans différents organes (pancréas, rein, peau) et des symptômes extra-hépatiques observés (pancréatites, glomérulonéphrites, neuropathies, anomalies du sperme). Alors que dans l'infection chronique, le virus est presque exclusivement hépatique, même si les lymphocytes B présentant un récepteur pour le virus peuvent servir de réservoir. Ces réservoirs pourront être le nid de réactivations, lors d'une transplantation hépatique ou sous traitement antiviral.

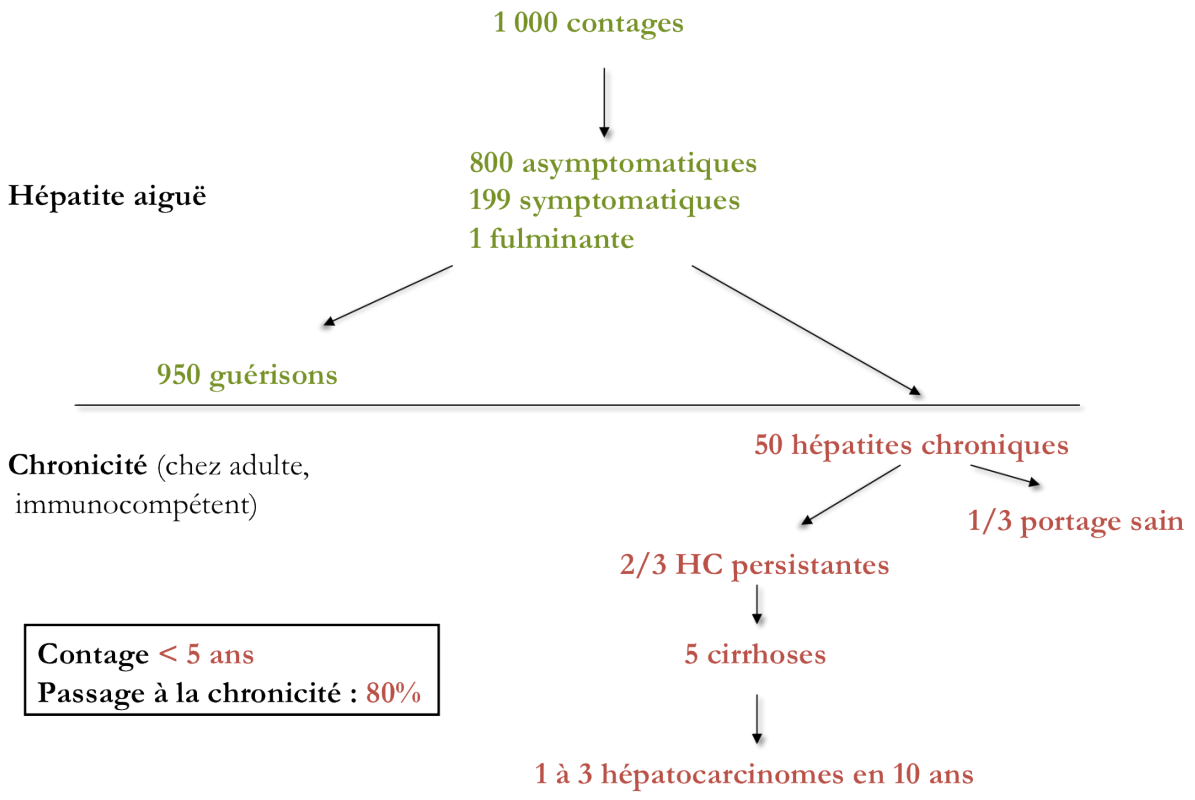

Figure 12 : Histoire naturelle de l'hépatite B

3.2.2 La primo-infection

Lors du contage, 80% des primo-infections (hépatites aiguës) demeurent cliniquement asymptomatiques *(Fig. 12)*. Après une incubation de 60 à 90 jours en moyenne, la maladie clinique, qui survient dans 20% des cas, traduit l'inflammation aiguë du foie (cytolyse hépatique). La symptomatologie, directement liée à l'âge, est moindre chez le jeune enfant. Elle découle d'une cholestase, marquée par un ictère, des urines foncées et peu abondantes, des selles décolorées et un prurit inconstants ; associée à une nécrose hépatocytaire, qui se traduit biologiquement, par une élévation des transaminases hépatiques. L'hépatomégalie est généralement minime et l'ictère régresse progressivement en 2 à 6 semaines.

Le taux de létalité faible à court terme chez le malade hospitalisé, 95 % des infections de l'adulte sont spontanément résolutives, atteindrait 2-3 % à long terme, attribuable à des complications cancéreuses ou cirrhotiques *(Fig. 12)*.

Dans les formes graves d'hépatite fulminante, la mortalité atteint 70% en l'absence de greffe hépatique, dans un tableau de nécrose hépatique avec ictère à bilirubine conjuguée et syndrome hémorragique par défaut de synthèse des facteurs de coagulation et phénomène de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Le VHB serait l'agent de 70% des hépatites fulminantes virales.

Le diagnostic de l'infection aiguë reposera sur l'association AgHBs ⊕, immunoglobulines de type M anti-HBc positives (IgM anti-HBc ⊕). En cas d'évolution favorable, la disparition de l'AgHBs intervient en quelques semaines (à quelques mois), avant l'apparition dans un délai variable des Ac anti-HBs.

3.2.3 L'infection chronique

Le risque de passage à la chronicité varie en fonction de l'âge et dépend du statut immunitaire du patient. Le taux d'évolution vers la chronicité, qui n'est que de 5 à 10% chez l'adulte immunocompétent, est plus élevé chez l'adulte immunodéprimé ou souffrant d'affections débilitantes (Syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA, cancer) et atteint 90 % chez le nouveau-né. L'infection chronique se développe au décours d'une hépatite aiguë symptomatique ou non. Elle correspond à la persistance de marqueurs

antigéniques viraux, associés ou non à la persistance d'anomalies cliniques et biologiques, six mois après le début de l'hépatite aiguë.

Après quelques mois, trois quarts des hépatites chroniques évoluent vers une forme chronique persistante. Seul le quart restant présente une forme cytolytique, menaçant d'évoluer vers la cirrhose. Des études longitudinales de patients présentant une hépatite B chronique (AgHBe ⊕ dans la majorité des cas), montrent une incidence annuelle de cirrhose comprise entre 2 et 5,4% par an, avec une incidence cumulée à cinq ans de 5 à 20%. Il semble que cette incidence soit plus importante chez les sujets AgHBe ⊖, entre 8 et 10% par an. Parmi les facteurs de risque de développer une cirrhose due au VHB figurent (EASL, Genève, 13-14 septembre 2002 - G. Pialoux, V. Sitruk) :

- âge avancé
- pics intermittents de CV (ADN-VHB) ;
- surinfection Delta ;
- co-infection VIH ;
- co-infection VHC ;
- consommation d'alcool ;
- génotype C ;
- normalisation des alanine aminotransférase (ALT) ;
- activité inflammatoire.

Il n'est pas rare que le diagnostic soit posé à l'apparition des complications cliniques de la cirrhose (ascite, ictère, hypertension portale et hémorragie digestive). A un stade plus avancé, l'insuffisance hépatocellulaire s'installe, le foie ne remplit plus son rôle de synthèse et d'épuration, conduisant au décès du malade en l'absence de transplantation. Le CHC vient compliquer 3 à 5% des hépatites chroniques actives, par an. La survenue de cancer primitif du foie serait due à l'apparition de réarrangements génétiques, au sein des nodules de régénération du foie cirrhotique et au VHB lui-même. La protéine X est incriminée ; elle serait responsable, lors de l'intégration du génome viral, d'une activation en *trans* de certains oncogènes cellulaires et de l'inhibition de la protéine p53 (Koike, 1995).

3.2.4 L'infection occulte à VHB

Si les Ac anti-HBc sont dépistés de façon isolée, lors de la première évaluation, ceci peut être le signe d'une infection « occulte » à VHB. Une infection à VHB occulte est habituellement évoquée lorsque l'ADN-VHB est détecté à des taux faibles, par des techniques très sensibles, chez des patients négatifs pour l'AgHBs. Ce type d'infection est plus souvent retrouvé chez les patients infectés par le VIH, que chez les patients mono-infectés par le VHB. Cependant, la signification clinique de l'hépatite B occulte est inconnue. Actuellement, on ne dispose d'aucune preuve attestant de la nécessité de détecter ou de traiter systématiquement l'infection « occulte » à VHB. Cependant, il est important de dépister l'infection « occulte » à VHB dans certaines situations cliniques spécifiques, d'immuno-modération subite ou chimio-induite, dans lesquelles un risque de réactivation de l'hépatite B existe et un traitement préemptif anti-VHB doit être envisagé. Des travaux de recherches sont nécessaires afin de déterminer la signification clinique de l'infection occulte par le VHB.

IV. Diagnostic biologique

Les Ag et les Ac induits lors de l'infection ont été rapidement caractérisés, permettant la mise au point de tests performants pour l'ensemble des marqueurs de l'infection à VHB, afin de diagnostiquer les différents stades de l'infection.

1 Le diagnostic direct

Le diagnostic direct repose sur la mise en évidence du virus ou de ses constituants antigéniques.

L'AgHBc n'étant exprimé qu'au niveau hépatique, il n'est mis en évidence que sur biopsies hépatiques en immuno-histochimie, par immunofluorescence ou en immuno-peroxydase.

En pratique, les AgHBs et HBe sont détectés dans le sérum du sujet contaminé, en techniques ELISA. Au laboratoire de virologie du CHU de Nancy, le diagnostic primaire est réalisé en MEIA, microparticule enzymo-immuno-analyse (Axsym-Abbott®) et/ou CMIA, chimiluminescence microparticule immuno-analyse (Architect-Abbott®), techniques immuno-enzymatiques automatisables.

1.1 L'AgHBs

L'Ag de surface HBs, ou Ag Australia, est présent dans de nombreux liquides biologiques (sang, salive, selles, bile, urine, lait), potentiellement contaminant ainsi que dans le cytoplasme et à la surface des hépatocytes infectés. Les particules de Dane et les enveloppes vides peuvent être mises en évidence au niveau sérique en microscopie ou immuno-microscopie électronique, par mise en évidence des antigènes d'enveloppe produits en excès *(Fig. 13)*.

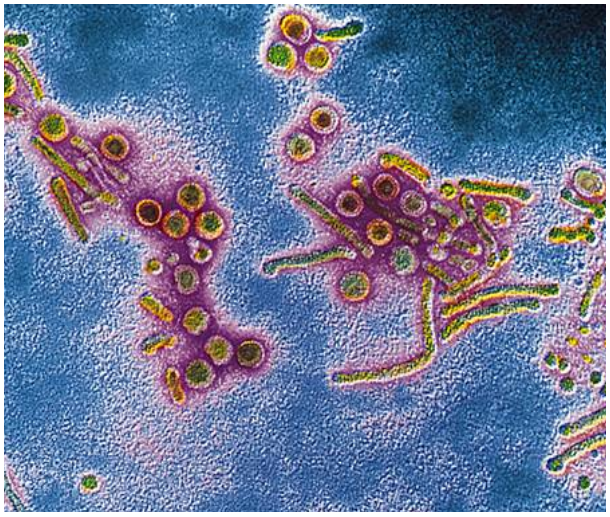

Figure 13 : Immuno-microscopie électronique d'un sérum de patient virémique à VHB

web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hbv3b.gif

L'AgHBs est le meilleur marqueur de l'infection ; précoce, il se positive 2 à 4 semaines après le contage, avant tout signe de cytolyse hépatique (élévations des transaminases). Il peut persister au niveau sérique durant quelques semaines. Sa négativation, après normalisation des transaminases, signe l'évolution favorable de l'hépatite B aiguë. On parlera d'hépatite B chronique, dès lors que l'AgHBs persiste au delà de six mois.

Les tests commerciaux de détection de l'AgHBs reposent sur des techniques d'immuno-enzymologie. Ces tests font l'objet d'un marquage CE et sont encadrés par des normes AFSSAPS qui exigent une sensibilité de 0,5 ng/mL et une spécificité de 99,8%. L'existence de faux positifs (souvent de bas niveau) amène à pratiquer des tests de neutralisation. La neutralisation de l'AgHBs, par un Ac anti-HBs calibré de référence, permet de vérifier la spécificité de la réaction Ag/Ac et les sérums non neutralisables doivent être considérés comme négatifs (il est nécessaire de diluer les sérums donnant un signal fortement positif, afin de faciliter la neutralisation) (Pasteur-Cerba, 2003).

L'AgHBs doit être recherché en première intention, devant toute suspicion d'hépatite aiguë ou chronique et de manière systématique au cours du sixième mois de grossesse, ou dans le cadre d'un don de produits dérivés du sang ou d'une qualification d'organes. La positivité de l'AgHBs doit conduire à la recherche de marqueurs complémentaires (Ac anti-HBc et marqueurs HBe, Ag et Ac). Cette positivité devra être systématiquement contrôlée sur un second prélèvement, afin d'éliminer toute contamination accidentelle du prélèvement lors de l'analyse.

La positivité de l'AgHBs de manière isolée (ou associée uniquement à l'AgHBe) peut se rencontrer dans trois contextes :

- l'hépatite aiguë débutante, avant l'apparition des Ac anti-HBc (IgM), confirmée par détection de l'ADN-VHB et l'apparition rapide d'IgM anti-HBc

- le patient porteur chronique immunodéprimé (patient co-infecté par le VIH ou greffé)

- le patient porteur chronique immunocompétent, contaminé le plus souvent in utero et immunotolérant.

1.2 L'AgHBe

L'AgHBe, marqueur de la réplication virale, n'est détecté dans le sérum qu'en présence de particules virales complètes. Il n'est retrouvé que chez le patient positif pour l'AgHBs. Présent à la phase aiguë, l'AgHBe ne persiste que chez le porteur chronique. La disparition de l'AgHBe, suivie de la séroconversion Ag/Ac anti-HBe, précède la séroconversion HBs. En présence d'AgHBe, l'hépatite B est dite réplicative ; la négativation de cet Ag est typique de l'hépatite résolutive, mais s'observe aussi chez le mutant du pré-core.

En effet, chez le patient infecté par une souche majoritaire mutée dans le pré-core, on observe une pseudo séroconversion, liée à un défaut de détection de l'épitope HBe, avant l'apparition d'anticorps anti-HBe (Ac anti-HBe) et bien que l'hépatite soit réplicative. Ainsi, lors de la séroconversion HBe, l'extinction de la réplication devra être confirmée par négativation de la CV-VHB *(Fig. 14)*. Une CV élevée devra alors faire évoquer un mutant du pré-core, confirmé par séquençage du cadre de lecture C *(Fig. 19)*.

L'AgHBe est détecté par des techniques d'enzymo-immuno analyse (EIA) ; les faux positifs sont rares, mais ne peuvent être négativés par un test de neutralisation et ne sont pas toujours reproductibles d'un réactif à l'autre.

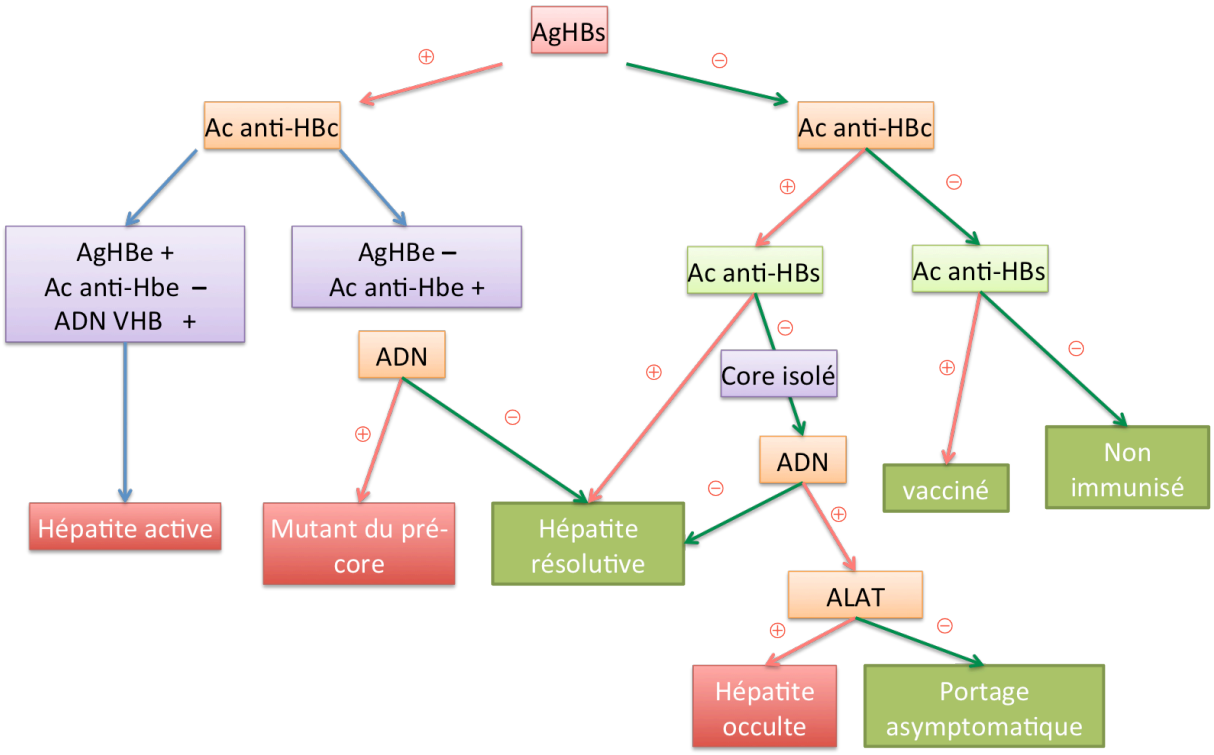

Figure 14 : Algorithme décisionnel du diagnostic des hépatites B

1.3 L'ADN viral

Tout diagnostic primaire pourra être étayé d'une recherche d'ADN-VHB. Néanmoins, si la mesure de la CV est indispensable au suivi du patient porteur d'une hépatite B chronique (traitée ou non), elle n'est pas obligatoire au diagnostic. Cependant, une CV détectable à huit semaines des premiers signes cliniques, constituerait un marqueur d'évolution vers la chronicité (Pasteur-Cerba, 2003).

La détection de l'ADN-VHB dans le sérum a été la première application de biologie moléculaire au diagnostic de maladies infectieuses. Les techniques d'hybridation à une sonde radio-marquée, après dépôt des protéines sériques sur membrane de nitrocellulose, ont peu à peu fait place à des techniques quantitatives très sensibles de « Polymerase Chain Reaction » (PCR) en temps réel.

La PCR, technique de réplication ciblée *in vitro*, permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre.

Les amorces ou «primers» définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. Les produits de chaque étape de synthèse servent de matrices pour les étapes suivantes ; au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle. Imaginée par K. Mullis en 1985 (Prix Nobel 1993), cette technique connaît un essor considérable en 1988, grâce à la mise sur le marché d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase), permettant une automatisation de la technique.

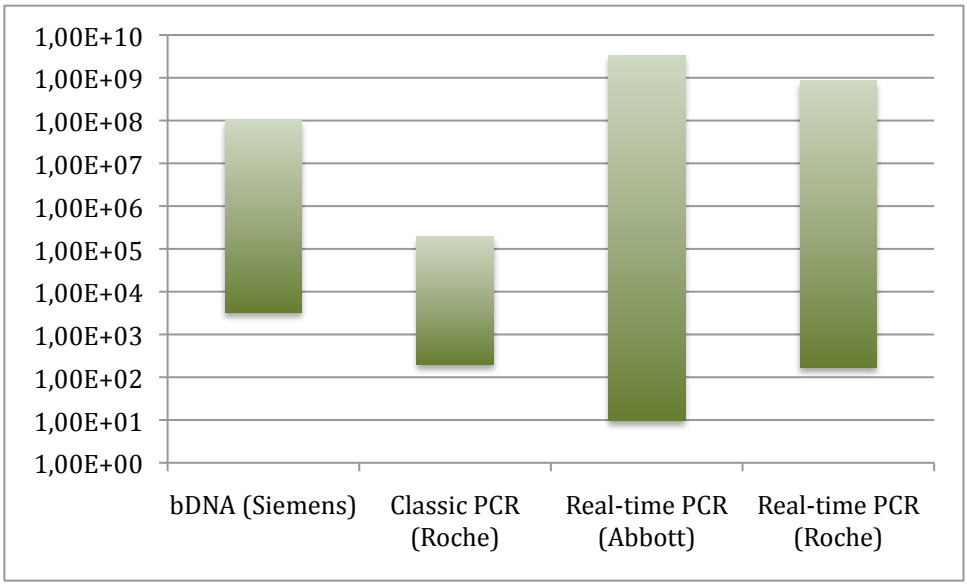

Figure 15 : Limites de détection de l'ADN du virus de l'hépatite B (copies/mL)

Les seuils de sensibilité varient selon les techniques (10 UI/mL en technique Abbott Real Time HBV®) *(Fig. 15)*. Longtemps exprimés en copies de génomes, les résultats étaient difficilement comparables entre les différentes techniques. Désormais exprimés selon un standard commun, l'unité internationale par millilitre de sérum (UI/mL), les résultats sont exprimés de manière comparable et le suivi virologique se trouve facilité. Une variation de CV est considérée comme significative si elle est supérieure à 0,5 log en base 10.

La diminution des seuils de détection a permis de mettre en évidence la persistance de faibles CV, chez des porteurs chroniques sains (AgHBs ⊕ ou hépatite occulte).

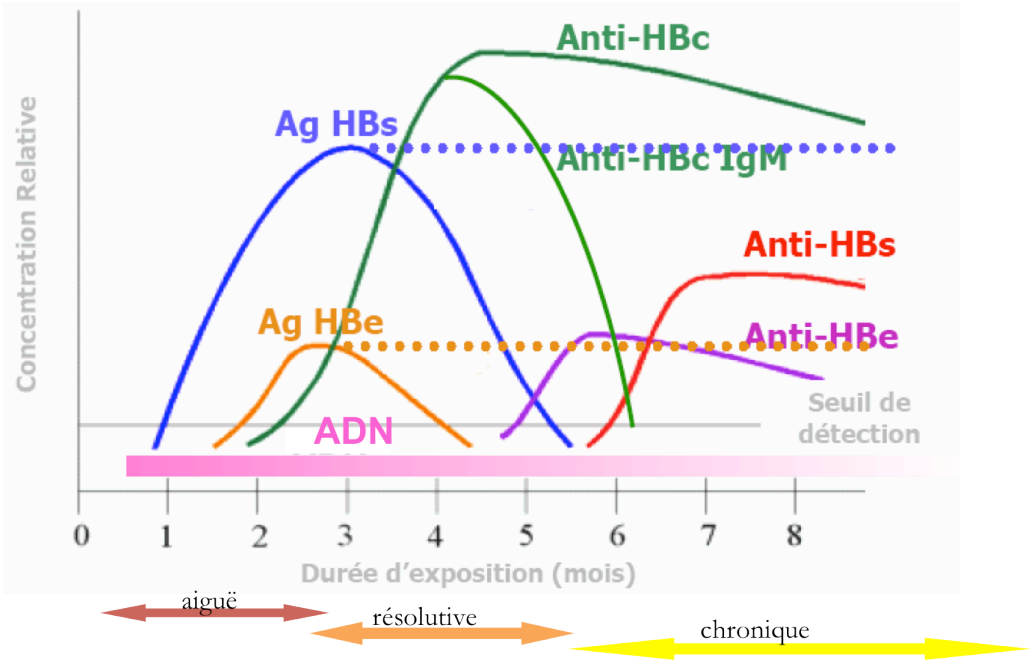

Figure 16 : Evolution des marqueurs sériques de l'hépatite B au cours de l'hépatite aiguë ou chronique

2 *Le diagnostic indirect*

2.1 Les anticorps anti-HBs

Les Ac anti-HBs sont spécifiques du types et sous-types d'AgHBs. Ils sont recherchés et titrés en techniques EIA. Ils apparaissent après guérison ou après vaccination efficace et sont protecteurs par inhibition de la fixation du virus à son récepteur cellulaire. Les résultats sont exprimés en UI/L et le seuil de protection défini par l'OMS est de 10 UI/L pour la population générale (ce seuil étant fixé à 50 UI/L pour les populations à risque et 100 UI/L pour les personnels hospitaliers). Détectables dans le sérum deux semaines à quatre mois après la négativation de l'AgHBs, ils n'apparaissent que lors de la convalescence *(Fig. 15)*. Dans de rares cas, Ag et Ac anti-HBs peuvent coexister ; au cours de l'hépatite fulminante, où la réponse sérologique intense est responsable de la lyse hépatique ; chez l'enfant né de mère infectée, bien que vacciné, pouvant être porteur d'une souche au déterminant antigénique « a » muté, transmise par sa mère et résistant à la vaccination ; en cas de co-infection par des sous-types différents, voire en cas de réactivation virale chez le patient immunodéprimé. Ils sont retrouvés associés aux Ac anti-HBc et disparaissent à plus ou moins long terme, chez le patient présentant une cicatrice sérologique d'hépatite ancienne. Néanmoins, leur production peut être réduite ou absente après contage chez le patient immunodéprimé ou le mauvais répondeur vaccinal.

2.2 Les anticorps anti-HBc

2.2.1 Les anticorps anti-HBc totaux

L'AgHBc, non soluble, n'est pas détectable au niveau sérique, mais grâce à sa forte immunogénicité, son expression hépatique se manifeste via la synthèse précoce et prolongée d'Ac anti-HBc. Les Ac anti-HBc totaux constituent le meilleur marqueur sérologique du contage par le VHB. En effet, d'apparition précoce, ils sont détectés quelque soit la symptomatologie initiale et l'évolution de l'infection. De plus, ils peuvent constituer le seul marqueur d'un contage avant l'apparition (fenêtre sérologique) ou à la négativation des Ac anti-HBs (ou en cas de mutation dans la région S/Pré-S). Le pouvoir protecteur des Ac anti-HBc n'est pas certain ; le patient porteur d'un core-isolé n'est donc pas à l'abri d'une réinfection (la vaccination doit être préconisée) ou d'une réactivation hépatique au décours d'une immunodépression (greffe, SIDA). Leur recherche s'effectue en EIA, il existe de nombreux faux positifs malgré des techniques en compétition de bonne spécificité, mais les fausses réactivités sont le plus souvent levées en changeant de réactif (Pasteur-Cerba, 2003).

2.2.2 Les immunoglobulines M anti-HBc

Les IgM anti-HBc sont détectables dès les premiers signes cliniques et l'élévation des transaminases et persistent à titre élevé durant toute la phase aiguë. La positivité des IgM anti-HBc permet le plus souvent de poser le diagnostic d'hépatite aiguë, même si elles peuvent de nouveaux être positives (faiblement) lors d'un épisode de réactivation aiguë d'une hépatite B chronique, compliquant ainsi le diagnostic en l'absence de données anamnestiques.

Leur absence, en présence d'AgHBs, est quant à elle, fortement évocatrice d'une hépatite B chronique.

2.3 Les anticorps anti-HBe

Les Ac anti-HBe apparaissent secondairement à la négativation de l'AgHBe, à l'arrêt de la réplication virale. Leur apparition signe donc une évolution favorable. Ils persistent peu de temps après l'apparition des Ac anti-HBs. Au cours de l'hépatite chronique, la séroconversion HBe n'est pas toujours synonyme d'un arrêt de la réplication virale ; en effet, elle peut correspondre à la sélection d'un mutant Pré-C, caractérisée par la persistance d'une CV détectable *(Fig. 14)*.

3 La variabilité du génome du VHB

3.1 Le gène S : génotypes et sérotypes, mutants S

Le gène S code trois protéines de surface : la petite protéine codée par la région S, la protéine moyenne par la région Pré-S2/S et la grande protéine par la région Pré-S1/Pré-S2/S du gène S. Ces protéines sont glycosylées et possèdent toutes la spécificité antigénique HBs. L'épitope HBs est porté par une séquence hydrophile correspondant aux acides aminés 121 à 150 de la protéine S *(Fig. 18)*.

3.1.1 Les génotypes

Le génome du VHB présente des variations de séquences importantes, induites par des erreurs de la RT lors de la synthèse de l'ADN génomique (Girones *et al.*, 1989) et responsables d'une hétérogénéité de la population virale. Les évolutions indépendantes du virus, au sein de populations bien établies ont abouti à une différenciation en génotypes. Aussi la population du VHB, agent de l'hépatite B humaine, est divisée en différents génotypes. Définis comme possédant entre eux au moins 8% de divergence dans leur séquence nucléotidique complète (Magnius *et al.*, 1995), ils sont le plus souvent classifiés selon la nature de leur région Pré-S2. Actuellement, huit génotypes sont décrits dans le monde et identifiés de A à H ; à ceux-ci s'est très récemment ajouté un neuvième (génotype I), qui vient d'être caractérisé. La forte prévalence de l'infection et la transmission, tant verticale qu'horizontale, au sein d'une population "homogène" font qu'au sein de chacun de ces génotypes, les variations de séquence sont fréquentes mais ne remettent pas en cause la classification des génotypes.

Le génotype A est ubiquitaire mais prédomine en Europe du Nord-Ouest, en Amérique du Nord et en Afrique Centrale *(Fig. 17)*. Les génotypes B et C sont essentiellement retrouvés en Asie (Indonésie, Chine, Japon, Corée, Vietnam). Le génotype D est fréquent sur le pourtour du bassin méditerranéen et au Moyen-Orient. L'Afrique de l'Ouest est le foyer principal du génotype E (Andernach *et al.*, 2009). Le génotype F est prédominant en Amérique Latine et Centrale et en Polynésie (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002; Magnius *et al.*, 1995). Le génotype G a été identifié aux Etats-Unis et en France (Stuyver *et al.*, 2000). C'est le seul génotype qui semble ne pas être associé à un foyer principal. Le génotype H a été récemment décrit chez les Amérindiens en Amérique centrale et aux USA (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002). La présence de plusieurs génotypes dans une population s'explique par les migrations de ces populations. En effet, la plupart des régions comportant plusieurs génotypes sont des régions cosmopolites.

Figure 17 : Distribution géographique des génotypes de l'hépatite B

Adapté de Fung SK, Lok AS. Hepatitis B virus génotypes : do they play a role in the outcome of HBV infection? - Hepatology. 2004;40 : 790-792.

3.1.2 Les sérotypes

Le déterminant « *a* » de l'AgHBs *(Fig. 18)*, commun à toutes les souches du VHB, est un épitope conformationnel. L'AgHBs existe sous deux formes i/t, selon que l'AA isoleucine (I) ou thréonine (T) est retrouvé en position 126. Le déterminant « *a* » est associé à deux autres déterminants, sous deux formes mutuellement exclusives *d/y* (Le Bouvier, 1971) et *w/r* (Bancroft *et al.*, 1972) dont la nature détermine le sous-type d'AgHBs. La substitution d'une lysine en une arginine convertit « *d* » en « *y* » en position 122 et « *w* » en « *r* » en position 160 (Okamoto *et al.*, 1987). Quatre sous-types principaux sont ainsi décrits : *ayr*, *ayw*, *adr*, *adw*. Ces sérotypes caractérisés au contact d'Ac monoclonaux, ne semblent pas liés à une propriété biologique de ces souches et leur étude n'a qu'un intérêt épidémiologique.

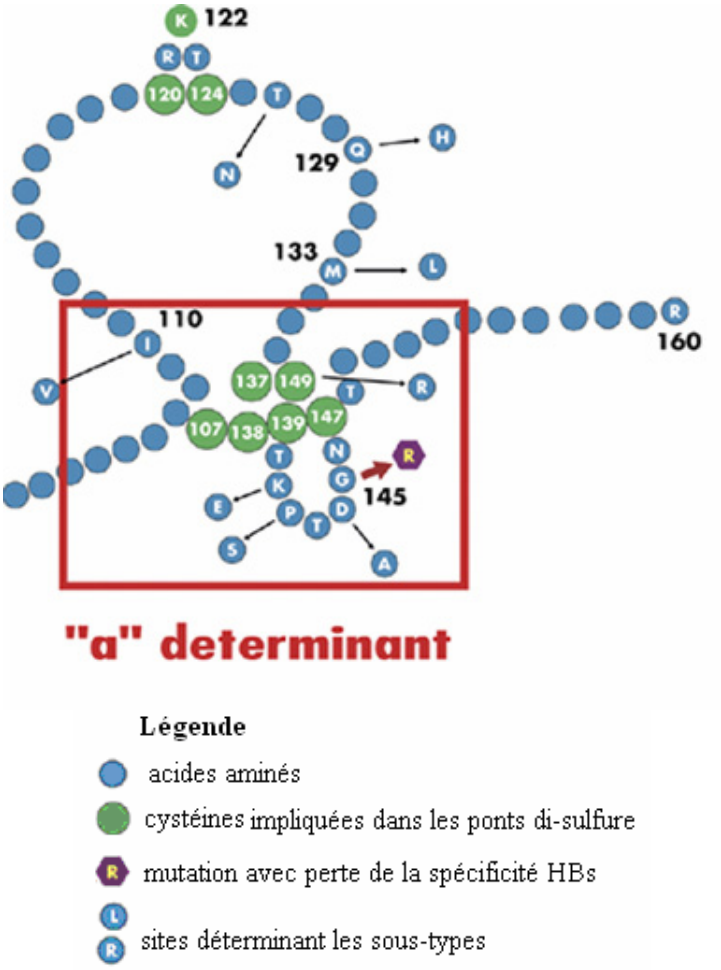

Figure 18 Principales mutations décrites sur le déterminant «a» de la protéine S du virus de l'hépatite B

La région portant le déterminant «a» a été détaillée et les différentes mutations décrites sont indiquées. La mutation G145R est la plus fréquente. Les acides aminés apparaissant en vert sont impliqués dans des ponts di-sulfure. (Carman et al., 1990).

3.1.3 L'impact de la variation du gène S

Les gènes Pré-S1 et Pré-S2 sont le siège de délétions, dont certaines sont stables et associées à des génotypes. Ainsi les souches du VHB de génotype D présentent une délétion des 11 premiers acides aminés de Pré-S1. Toutes ces délétions sont en phase, mais certaines peuvent inclure le codon UAG de Pré-S2, qui n'est alors pas exprimé. Cette variabilité de la région Pré-S1 pourrait avoir des conséquences sur l'échappement du virus aux défenses immunitaires de l'hôte (Brind *et al.*, 1997 ; Gunther, 2006). Le génotype de la souche du VHB affecterait la réponse clinique de l'hépatite chronique. Bien que le taux de clairance de l'AgHBs serait plus important pour le génotype A versus le génotype D (Sanchez-Tapias *et al.*, 2002), certaines études européennes montrent que le génotype A serait plus souvent impliqué dans un passage à la chronicité, tandis que le génotype D serait propice aux hépatites résolutives aiguës (Mayerat *et al.*, 1999). Le segment S est le plus important, puisqu'il porte un épitope majeur de la protection contre l'infection.

L'hépatite B occulte est définie par la persistance d'ADN-VHB dans le sang et/ou le tissu hépatique de patients AgHBs ⊖ ; elle est la conséquence, selon certains auteurs, d'un défaut de détection de l'AgHBs par les tests commerciaux ; d'autres décrivent des mutations qui touchent directement l'épitope ou modifient sa conformation et le rendent inaccessible à l'Ac. Plusieurs mutations dans la région correspondant au déterminant "*a*" ont été décrites, dont la plupart sont uniques. La variation la plus fréquente est le changement d'acide aminé G145R qui abolit la spécificité antigénique et entraîne l'absence de détection de l'AgHBs par les tests diagnostiques, alors pris en défaut *(Tab. 2)*.

De plus, ces souches sont résistantes à la vaccination ; ainsi chez la mère infectée, les souches portant cette mutation coexistent souvent avec les souches sauvages. La vaccination néonatale favoriserait alors l'infection de l'enfant par une souche mutée, qui aurait conservé son pouvoir infectieux. Il est donc vraisemblable que leur prévalence augmentera au fil du temps. De même, chez les patients infectés par le VHB, il existe un risque de recolonisation du greffon, au décours d'une greffe hépatique, par des souches échappant aux immunoglobulines spécifiques administrées lors de l'immunothérapie massive.

3.2 Le gène Pré-C/C : mutant du précore

L'expression du gène C se traduit par la détection de deux protéines antigéniques, l'AgHBc de 22 kDA et l'AgHBe de 18 kDA. Contrairement à l'AgHBe, l'AgHBc n'est codé que par le gène C et n'est pas soumis à maturation post-traductionnelle. Les mutations décrites sur l'ORF du gène C apparaissent dans le pré-core et n'affectent que l'expression de l'AgHBe. En effet, les mutations A1762T et G1764A du promoteur diminuent, sans l'inhiber, l'expression de l'AgHBe tandis que l'apparition d'un codon « stop » en 1896 l'abolit *(Fig. 19)*. L'AgHBe n'est alors plus exprimé par le virus « mutant Pré-C » réplicatif. Chez le patient infecté par ce mutant, on détecte la présence d'Ac anti-HBe du fait de la pré-existence ou co-existence de virus sauvage, ou d'épitopes communs aux protéines HBc et HBe. De nombreux travaux s'attachent à préciser l'existence d'un pouvoir pathogène accru (résistance au traitement par l'IFNα ?).

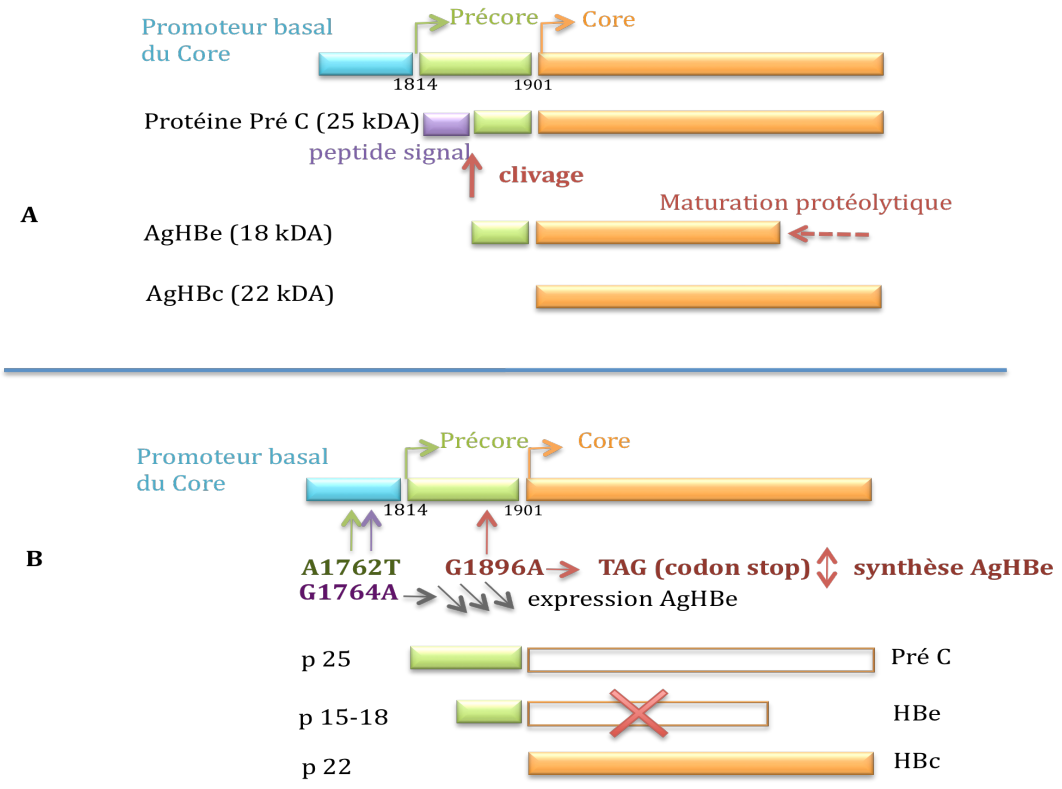

Figure 19 : Cadre de lecture C ; protéines C, E et mutant du pré-core

Structure du gène codant les protéines HBc et HBe et émergence des mutants pré-core. A : virus « sauvage » qui produit les deux protéines ; B : la mutation principale G1896A qui entraîne l'apparition d'un codon stop (Lok *et al.*; Mammette *et al.*, 2002) et abolit la synthèse de la protéine HBe et les deux mutations A1762T et G1764A du promoteur basal du core qui diminuent l'expression de l'AgHBe. (D'après E. Gordien, Cours Virus de l'hépatite B : Actualités virologiques, Institut Pasteur, Paris. Mai 2006).

3.3 Le gène Pol : polymérase et résistance au traitement

Le gène de la polymérase est soumis à des variations importantes ; du fait de sa longueur, les mutations qui le touchent, peuvent souvent retentir non seulement sur l'activité polymérase, mais aussi sur l'expression des gènes dont il partage la séquence génomique. Contrairement au "spacer" qui peut subir d'importantes variations ou délétions sans dommage apparent, une perte de fonction du gène de la polymérase, indispensable à la réplication virale, n'étant pas viable, les mutations observées sont moindres.

En revanche, la pression de sélection de certaines chimiothérapies entraîne très rapidement une modification du site actif de l'enzyme. Le motif YMDD constitue le site actif commun à toutes les transcriptases inverses. L'émergence de mutations YVDD ou YIDD en position rt204, n'empêche pas l'activité polymérase, mais s'oppose à l'efficacité antivirale de l'inhibiteur. Celle-ci a un impact important, puisqu'elle entraîne une résistance croisée à tous les analogues nucléosidiques. Lorsque la pression de sélection est levée, une réversion vers le motif YMDD est observée. D'autres mutations de la polymérase du VHB ont été observées durant un traitement par analogues nucléosidiques, comme la mutation rtL80V/I (chez les patients n'étant pas porteur du VHB de génotype A), rtI169T, rtV173L, rtS202I et rtT184S/G. Toutes ces mutations ne semblent être observées qu'en présence de la mutation rtM204V/I (YMDD).

Les analogues nucléotidiques comme l'adéfovir, le ténofovir et l'entécavir, qui sont des répliques parfaites des substrats naturels (dATP et dGTP), présentent une barrière génétique plus élevée et la résistance survient de manière plus tardive. Ainsi 65% des patients présentent des mutations après cinq ans de traitement par lamivudine contre 29% sous adéfovir (Liaw *et al.*, 2009a) et 0,8% à 1,2% sous entécavir (Tenney *et al.*, 2009).

L'échec du traitement par l'adéfovir résulte de l'expression des mutations rtN236T et/ou rtA181T/V perturbant la liaison des trois phosphates aux domaines A et D de la polymérase. Cette dernière entraîne également une résistance à la lamivudine, de même que la rt194 décrite sous ténofovir.

V. Prise en charge

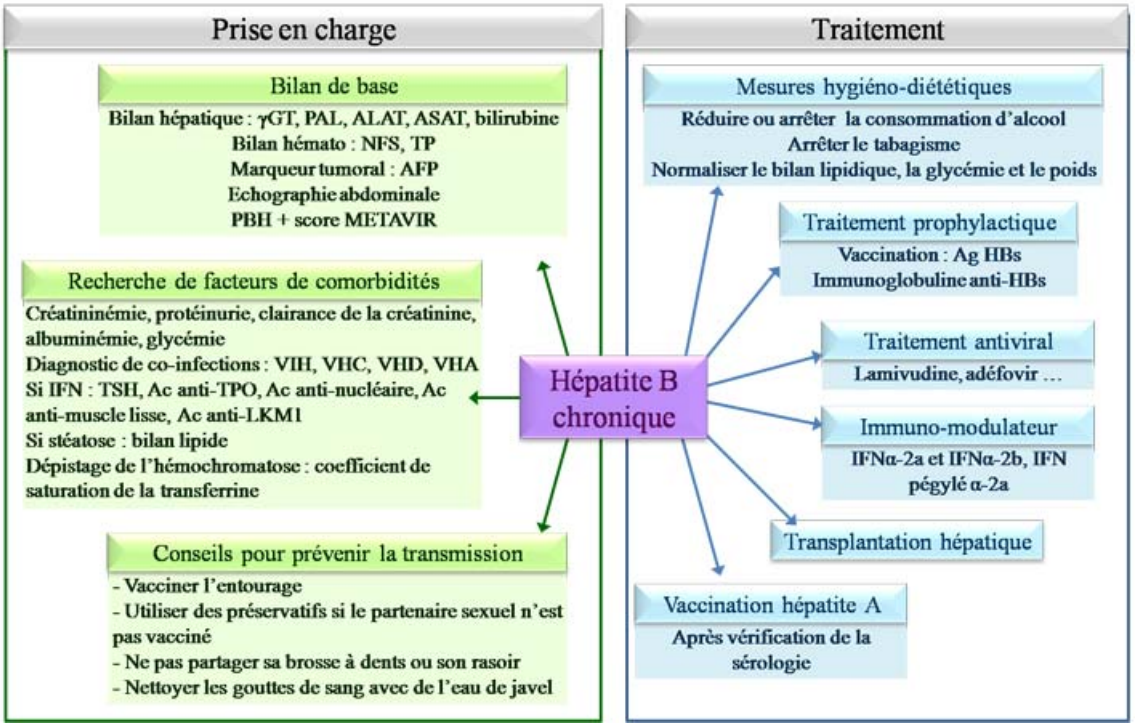

Figure 20 : Prise en charge et traitement de l'hépatite B

MemoBio©

1 *Traitement*

1.1 Les objectifs du traitement

L'objectif le plus ambitieux du traitement anti-VHB est d'obtenir une clairance de l'AgHBs et une séroconversion anti-HBs. Cependant, la séroconversion n'est obtenue que dans une minorité de cas. Par conséquent, un objectif plus réaliste est de supprimer la réplication VHB efficacement et durablement, afin de réduire l'inflammation hépatique et d'arrêter ou de retarder la progression de la fibrose (Chen *et al.*, 2005) et ce faisant d'empêcher le développement de cirrhose, décompensation, CHC et le décès d'origine hépatique. Les patients ne devenant symptomatiques qu'au stade cirrhotique, la difficulté repose en partie sur le dépistage des patients devant bénéficier d'un traitement. Les indications thérapeutiques sont généralement indépendantes du statut HBe et reposent sur le taux de transaminases (> aux normales biologiques (N) durant plus de six mois), la CV-VHB (> 2000 UI/mL) ainsi que le statut histologique et le stade de la fibrose *(Fig. 20)*.

1.2 Les réponses au traitement

La réponse au traitement repose donc sur la réponse biochimique, la réponse histologique et la réponse virologique ; *la réponse biochimique* est définie comme la normalisation du taux de transaminases (ALT) ; *la réponse histologique* est définie par la réduction de deux points de l'index d'activité histologique, sans évolution de la fibrose après instauration du traitement ; *la réponse virologique* est définie par une CV inférieure à 2000 UI/mL à S24 d'un traitement par l'interféron α pégylé (PEG-IFNα), ou une CV indétectable (PCR temps réel) à S48 de l'instauration d'un traitement par analogues nucléos(t)idiques. On parlera de *non-réponse primaire* lorsque la décroissance de la CV-VHB n'atteint pas 1 $\log_{10}$ UI/mL à trois mois de l'initiation du traitement, alors que la réponse sera dite *partielle* si la réponse initiale est supérieure à 1 $\log_{10}$ UI/mL, tout en restant détectable à S48 sous analogues nucléos(t)idiques. La réponse virologique est qualifiée de *soutenue*, si la CV-VHB demeure inférieure à 2000 UI/mL six mois après l'arrêt du traitement. Enfin la négativation de l'AgHBs avec ou sans apparition d'Ac anti-HBs est définie comme correspondant à une réponse *complète*. A l'inverse, on qualifie de *rebond virologique*, une augmentation de 1 $\log_{10}$ de la CV, celui-ci étant évocateur d'une résistance au traitement anti-VHB (Takkenberg *et al.*, 2009).

1.3 Les molécules actives contre le VHB

La prise en charge thérapeutique de l'hépatite B chronique a considérablement progressé ces dix dernières années, permettant d'éteindre la réplication virale VHB chez un grand nombre de patients, qualifiés porteurs d'une hépatite B chronique inactive. Deux stratégies thérapeutiques sont couramment adoptées : le recours au PEG-IFNα ou aux analogues nucléos(t)idiques afin de supprimer la réplication virale et le développement d'atteintes hépatiques secondaires (cirrhoses ou CHC) *(Fig. 21)*. Néanmoins, l'importance des effets secondaires induits sous IFNα et les résistances induites aux analogues nucléos(t)idiques conduisent à rechercher sans cesse de nouvelles molécules anti-VHB.

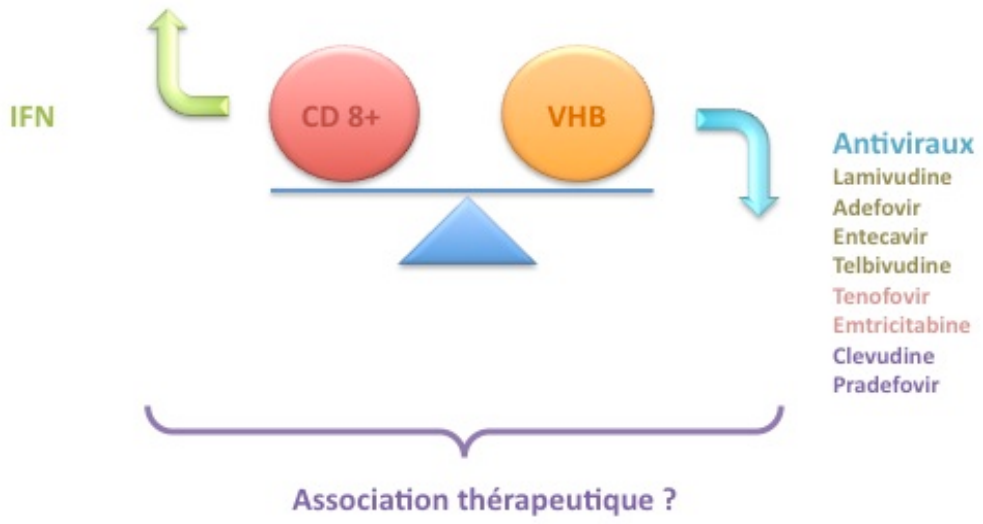

Figure 21 : Options thérapeutiques anti-VHB : immunomodulateurs et antiviraux

Journée Mondiale des Hépatites (19 mai 2008)

1.3.1 Les Immunomodulateurs

a. L'interféron alpha (IFNα)

L'IFNα, molécule antivirale physiologique, possède une place de choix dans la prise en charge des hépatites chroniques, grâce à ses propriétés immunomodulatrices et antiprolifératives (Korenman *et al.*, 1991; Niederau *et al.*, 1996; Tine *et al.*, 1993). Cette molécule, qui stimule la réponse antivirale cellulaire, est dotée de propriétés immunomodulatrices pléiotropes. Via la voie Jak/STAT, l'IFNα stimule l'expression d'Ag de l'hôte à la surface des cellules infectées, tels que des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), tout en favorisant la maturation des cellules T cytotoxiques et l'activation des cellules NK. De plus, l' IFNα active la réponse des cellules immunitaires, en induisant l'expression des IFNβ et γ par les lymphocytes T CD4 ⊕ et CD8 ⊕, ainsi que les cellules dendritiques et l'activité phagocytaire des macrophages, tout en inhibant l'expression l'interleukine 12 (IL12) (Takkenberg *et al.*, 2009). Le recours à l'IFNα permettrait, par la lyse des cellules infectées par le VHB, de limiter le stockage du génome viral sous forme d'ADNccc impliqué dans la persistance de l'infection virale VHB (Katze *et al.*, 2002). L'INF α n'induisant pas de mutations de résistance, il pourra être poursuivi à long terme chez les patients le tolérant. Le traitement par l'interféron

permet d'obtenir une négativation de la CV dans 37% des cas et une séroconversion dans le système « e » dans 33 % des cas, voire dans le système « s » dans 5 à 10% des cas, un an après l'arrêt du traitement (Korenman *et al.*, 1991; Perrillo, 1990). Différentes études rapportent une réponse significativement supérieure chez le sujet AgHBe ⊕ versus AgHBe ⊖ (Wong *et al.*, 1993). L'efficacité antivirale de l'IFNα est reconnue sur l'infection récente, cytolytique (les transaminases > 3N) et à réplication virale modérée. Néanmoins, environ la moitié des patients présentant une réponse virologique initiale rechutent à l'arrêt du traitement, nécessitant une réintroduction thérapeutique. Enfin, l'IFNα n'est plus recommandé en cas de contage durant l'enfance, de co-infection VIH, ou chez le patient infecté par une souche mutant du pré-core.

b. L'interféron pégylé ou Pegasys®

L'IFNα pégylé est un IFNα conjugué à du polyéthylène glycol (PEG), qui permet de prolonger la demi-vie de l'IFNα, en retardant son élimination rénale, allégeant ainsi la prescription à une seule injection sous-cutanée hebdomadaire (à raison de 180 µg/semaine pour une durée de 48 semaines). Le traitement par IFNα classique doit être interrompu chez 30% des patients, suite à l'apparition d'effets secondaires mal tolérés. Le PEG-IFNα, en réduisant les effets adverses observés (fatigue, syndrome pseudo-grippal, thrombopénie, lymphopénie), tout en améliorant l'activité antivirale, constitue le traitement immunomodulateur de choix. En effet, certaines équipes ont rapporté une efficacité accrue du PEG-IFNα-2a versus l'IFNα, en terme de séroconversion HBe et de négativation des charges virales (Janssen *et al.*, 2005; Marcellin *et al.*, 2004). Chez le patient AgHBe ⊕, la séroconversion HBe initiale est soutenue à cinq ans chez 81% des patients et une augmentation de 37% du taux de séroconversion HBe est obtenue. De plus, une négativation de l'AgHBs est observée chez 11% des patients à cinq ans et atteint 30% chez des patients ayant présenté une réponse initiale (buster flink peginterferon 2008). Chez le patient AgHBe ⊖, bien qu'une réponse virologique soutenue soit obtenue chez 36% de patients à S24 d'un traitement de 48 semaines, cette réponse ne semble pas perdurer. En effet, le taux de réponse soutenue n'est plus que de 25%, un an après l'arrêt du traitement. Néanmoins, et de manière inattendue, le taux de négativation de l'AgHBs atteindrait 12% après cinq ans de suivi (Moucari *et al.*, 2009), versus 11% chez le patient AgHBe ⊕.

1.3.2 Les analogues nucléos(t)idiques

Les analogues nucléos(t)idiques entravent la multiplication du virus en inhibant la transcriptase inverse du VHB, mais ils n'ont qu'une action « suspensive » sur la réplication virale. Ainsi, toute suspension thérapeutique ou défaut d'observance amène une reprise de la réplication virale ; le rebond virologique peut être sévère et une insuffisance hépatique doit être redoutée. Le traitement par analogues nucléos(t)idiques, après instauration, doit donc être maintenu à long terme. Cependant, le risque d'émergence d'une souche VHB mutée, résistante à l'analogue nucléos(t)idique, s'accroît irrémédiablement après l'introduction de l'antiviral, plus ou moins rapidement selon la molécule et sa barrière génétique. De plus, une toxicité cellulaire peut apparaître, l'action inhibitrice des analogues nucléos(t)idiques agissant non seulement sur la polymérase virale, mais aussi sur les polymérases cellulaires *(Fig. 22)*.

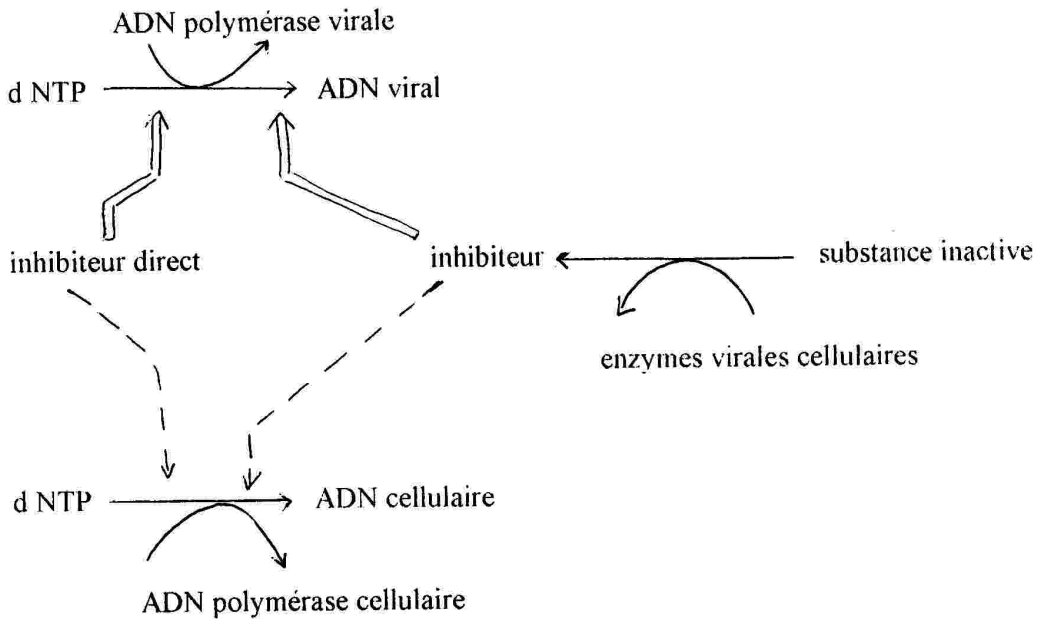

Figure 22 : Inhibiteurs de l'ADN polymérase ; activité / toxicité

Pr. Colimon - Département de Virologie CHU de Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex

a. Lamivudine ou 3TC (Zeffix®)

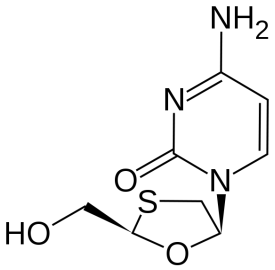

Figure 23 : Lamivudine

La lamivudine est un analogue nucléosidique de la cytosine *(Fig. 23)*, inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase virale. Initialement développée dans le traitement de l'infection par le VIH (Epivir®), elle s'est révélée avoir une activité antivirale sur le VHB (Benhamou *et al.*, 1995; Liaw *et al.*, 2004b). Administrée par voie orale, la lamivudine jouit d'un excellent profil de tolérance (contrairement à la vidarabine ou l'IFNα). Prodrogue activée par une triphosphorylation médiée par des kinases cellulaires, elle s'insère dans l'ADN en cours de synthèse, venant bloquer son élongation.

Son efficacité quasi constante assure une réponse virologique chez 95% des sujets, dans les trois mois suivant l'initiation du traitement à la posologie de 100 mg/j. Une amélioration histologique est également notée dès les premiers mois de traitement, avec réduction de l'inflammation et de la fibrose à trois mois, dans respectivement environ 56% et 35% des cas. A un an, une séroconversion HBe est observée chez 16% des patients AgHBe ⊕, parfois associée une séroconversion HBs dans 0 à 9% des cas (Dienstag *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 1997).

b. Adéfovir dipivoxyl (Hepsera®)

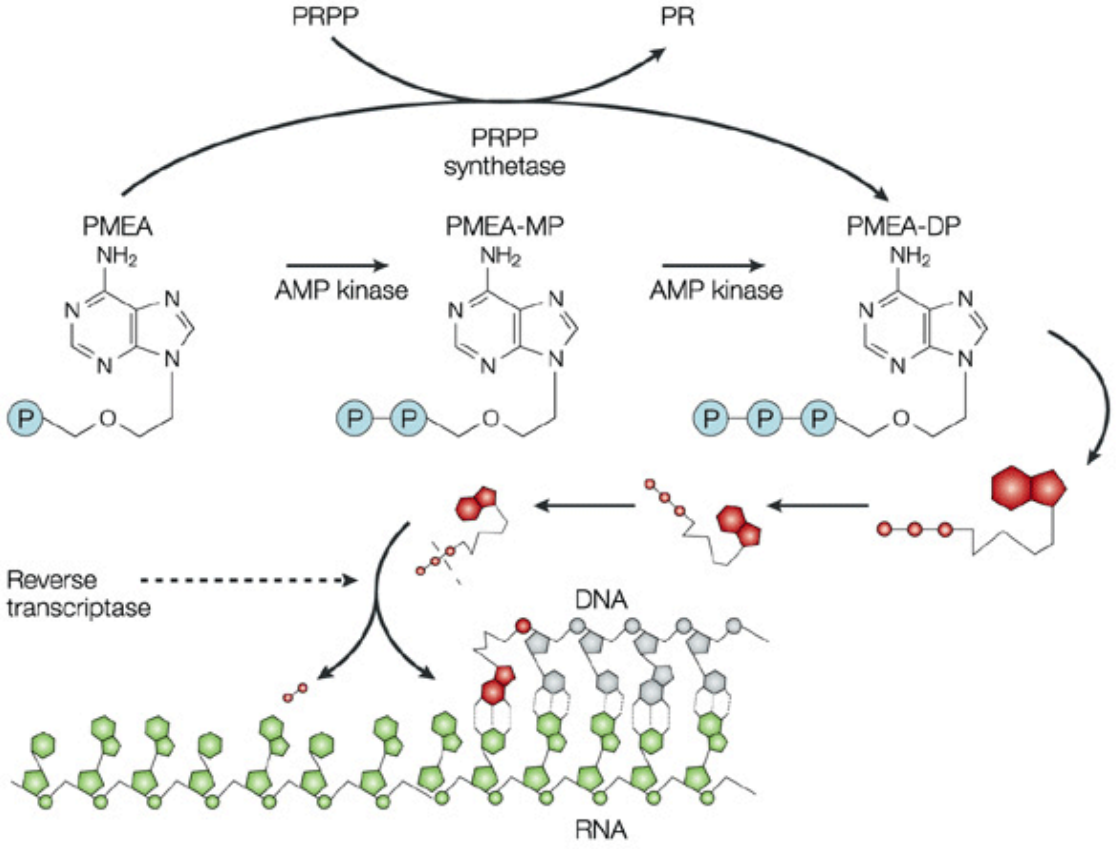

Figure 24 : Adéfovir ; mécanismes d'action

Erik De Clercq - The mechanism of action of adefovir (PMEA). Nature Reviews Microbiology 2, 704-720 (September 2004) doi : 10.1038/nrmicro975

L'adéfovir dipivoxyl, prodrogue de l'adéfovir, est le premier analogue nucléotidique (9-(2- phosphonylméthoxyéthyl) adénine ou PMEA) à avoir été développé dans le traitement de l'hépatite B chronique. Phosphonate acyclique d'analogue nucléotidique, il agit après phosphorylation comme inhibiteur compétitif du substrat naturel (désoxyadénosine triphosphate) de la polymérase virale, en bloquant l'élongation de la chaîne d'ADN, après incorporation dans l'ADN viral *(Fig. 24)*. L'adéfovir constitue une alternative à la lamivudine (Hadziyannis *et al.*, 2003). Il permet de diminuer la réplication du VHB à la posologie de 10 mg/j, dans les quatre semaines suivant l'introduction du traitement et induit une importante séroconversion dans le système « e ». Son efficacité est prouvée tant chez l'immunocompétent que chez l'immunodéprimé, notamment co-infecté par le VIH, en situation d'échappement à la lamivudine (Peters *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 1998). L'effet secondaire principal de l'adéfovir étant la survenue d'une insuffisance rénale dans 20% des cas, son utilisation est limitée en cas de néphropathie.

c. Ténofovir (Viread®)

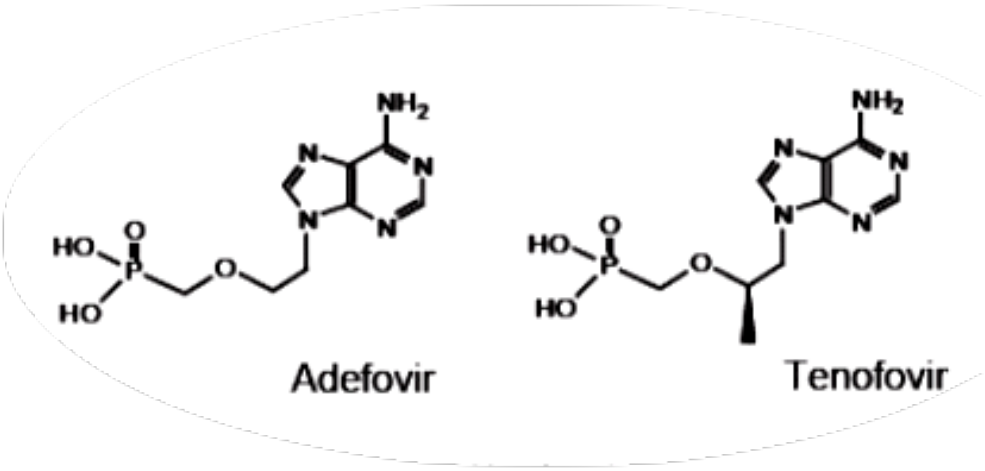

Figure 25 : Structure de l'adéfovir et du ténofovir

Cet analogue nucléotidique de la guanidine (fumarate disoproxil), apparenté à l'adéfovir *(Fig. 25)*, développé dans le traitement de l'infection à VIH (Gallant *et al.*, 2004), apparaît comme un excellent candidat pour le traitement de la co-infection VHB/VIH (Nelson *et al.*, 2003). Le ténofovir a montré une efficacité dans le contrôle de la réplication des mutants d'échappement à la lamivudine (réduction de 4 $\log_{10}$ de la CV à S48) (Lacombe *et al.*, 2005). Cette efficacité est supérieure à celle de l'adéfovir dans les mêmes circonstances (100% de patients avec ADN indétectable sous ténofovir, contre 44% sous adéfovir) (van Bommel *et al.*, 2004). Alors que chez le patient AgHBe ⊕, 2 ans après introduction du traitement, on rapporte une séroconversion HBe et HBs chez respectivement 27% et 6% des sujets (Marcellin *et al.*, 2008), aucune séroconversion HBs n'est objectivée chez les patients AgHBe ⊖. De rares cas de néphrotoxicité tubulaire et hypophosphatémie sont observés, nécessitant une adaptation de la posologie à 10 mg/jour, la posologie habituelle de 30 mg/jour augmentant le risque d'insuffisance rénale. Il est appelé à court terme à remplacer l'adéfovir pour le traitement de l'hépatite B du fait de son activité antivirale supérieure et de sa forte barrière génétique (aucune résistance phénotypique à trois ans).

d. Entécavir (Baraclude®)

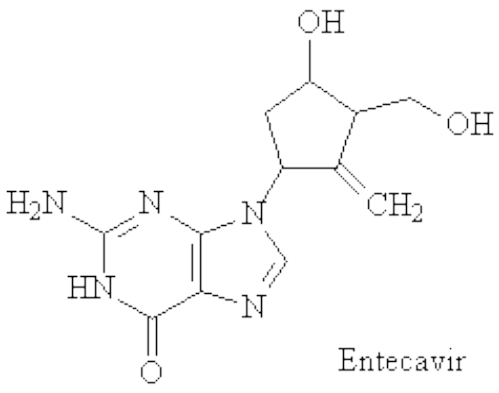

Figure 26 : Structure de l'entécavir

L'entécavir est un analogue structural de la guanosine (cyclopentyl) *(Fig. 26)*, qui inhibe la transcriptase inverse. Des essais cliniques de phase II et III ont conduit à une AMM en Europe en juillet 2006, sous le nom de Baraclude®. L'efficacité antivirale, l'amélioration biochimique, la séroconversion anti-HBe et la réponse histologique sont supérieures à ce qui est observé sous lamivudine (Chang *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2006). L'entécavir (0,5 à 1 mg par jour) est efficace sur le VHB, mais a un effet antiviral partiel sur le VIH. Il pourrait conférer au VIH une résistance à la lamivudine (Chang *et al.*, 2006). Le processus d'échappement à l'entécavir est lent et le mécanisme de résistance à cet antiviral s'avère plus complexe, car plusieurs mutations seraient nécessaires à l'apparition d'une résistance. Cependant, l'administration antérieure de lamivudine et la présence concomitante dans le génome viral de mutations de résistance à la lamivudine, accélèrent la survenue d'une résistance complète à l'entécavir par addition de mutations de type S202G/I dans le domaine C ou M250V dans le domaine D de l'ADN polymérase. Les résistances sont observées chez 6% des patients traités pour une résistance à la lamivudine, après un an de traitement. Les posologies suggérées sont de 0,5 mg/j chez le patient naïf et de 1 mg/j pour celui présentant une résistance à la lamivudine.

e. Telbivudine

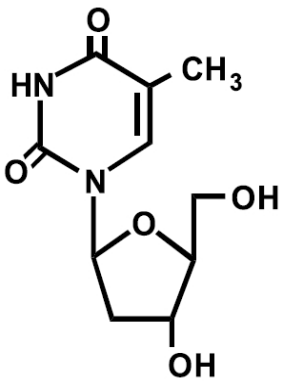

Figure 27 : Structure de la telbivudine

La telbivudine est un analogue nucléosidique de la thymidine doté d'un effet terminateur de chaine *(Fig. 27)*, qui présente l'avantage de n'être actif que sur le VHB. L'étude clinique de phase III incluait 1 367 patients Ag HBe ⊕ (à forte multiplication virale) ou AgHBe ⊖ et comparait la telbivudine, à la dose de 600 mg, à la lamivudine (Lai *et al.*, 2007).

La telbivudine avait permis d'obtenir, chez le patients AgHBe ⊕, une réponse virologique plus marquée que la lamivudine (6,4 versus 5,5 $\log_{10}$ copies/mL) avec d'avantage de patients présentant une CV indétectable à S52 (60% versus 40%), ainsi qu'une amélioration histologique (65% versus 56%). Néanmoins, aucune amélioration significative n'avait été observée en terme de réponse biochimique, ainsi que de séroconversion HBe.

De même, dans le groupe de patients AgHBe ⊖ qui mis à part une moindre réponse histologique sous telbivudine, ont une réponse équivalente à celle des patients AgHBe ⊕.

Alors que les premiers résultats semblaient encourageants, 5% des patients AgHBe ⊕ traités par telbivudine ont présenté un échappement virologique après un an de traitement, ce chiffre atteignant 25% à 2 ans de traitement (Liaw *et al.*, 2009b). Etant donnée l'existence possible de résistance croisée avec la lamivudine et l'émergence rapide de mutation de résistance, la telbivudine ne constitue pas une molécule de choix, notamment dans la prise en charge des patients AgHBe ⊕ ou traités par lamivudine.

f. Nouveaux analogues nucléosidiques

De nombreux autres analogues nucléosidiques sont en cours de développement. (Takkenberg *et al.*, 2009).

f.1. Emtricitabine (FTC)

Dérivé fluoré de la lamivudine, l'emtricitabine est un analogue de la désoxycytidine triphosphate, mimant la lamivudine ; il est efficace pour inhiber les réplications du VIH et du VHB. Son efficacité et le risque d'émergence de résistance sont parallèles à ceux de la lamivudine (Gish *et al.*, 2005), néanmoins, elle est couramment utilisée en combinaison avec le ténofovir chez le patient co-infecté.

f.2. Clévudine (L-FMAU)

La clévudine, analogue nucléosidique de la pyrimidine, présente un effet antiviral potentiel sur le VHB. De récents essais cliniques de phase III ont montré à un an, une réduction de la CV (< 2000 UI/mL) chez 71% des patients AgHBe ⊕ et 92% des patients AgHBe ⊖, associée à une réponse biochimique chez 86% des patients. Si une séroconversion HBe est acquise chez 22% des sujets AgHBe ⊕, 0,4% des sujets ont présenté un rebond virologique sous traitement par la clévudine (Lee *et al.*, 2009).

Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer la survenue de résistance chez les patients traités. De plus, des sujets traités au long cours ont développé des signes de toxicité mitochondriale, après une durée médiane de 32 semaines de traitement (myopathie et myonécrose mitochondriale) (Seok *et al.*, 2009).

f.3. Pradéfovir (Remofovir®)

Le pradéfovir est une prodrogue de l'adéfovir, qui à l'avantage d'être activée par le cytochrome CYP3A4, principalement exprimé au niveau hépatique. Le métabolite actif n'est alors présent à forte concentration qu'au niveau hépatique, limitant ainsi les effets adverses systémiques de l'adéfovir. Des essais de phase I prometteurs ont confirmé une bonne tolérance au pradéfovir. Il semble que la concentration en substance active soit accrue sur le site de l'infection, et moindre au niveau rénal, suggérant une moindre néphrotoxicité. Des essais de phase II sont actuellement en cours de randomisation.

f.4. Valtorcitabine (Monoval®)

Prodrogue de la telbivudine, la valtorcitabine est actuellement en cours d'évaluation de phase II. La valtorcitabine (900 mg/jour) permet d'obtenir une réduction moyenne de la CV de 3 $\log_{10}$ après quatre semaines de traitement. Cette prodrogue qui semble bien tolérée est encore en cours d'évaluation.

f.5. Inhibiteurs d'entrée, l'avenir ?

Gripon *et al.* ayant mis en évidence le rôle des régions Pré-S dans l'infectiosité virale (Gripon *et al.*, 2005), de nouveaux antiviraux lipopeptidiques, analogues de la L protéine S, inhibiteur spécifique du récepteur du Pré-S1 du VHB sont en cours de développement (Petersen *et al.*, 2008). De premiers essais prometteurs ont confirmé la capacité d'un lipopeptide (Myrcludex B) à inhiber l'entrée du VHB ainsi que du VHD, *in vivo* et *in vitro*, à concentration picomolaire. Ses propriétés pharmacologiques et son faible potentiel toxique (à six mois), font du Myrcludex B une option thérapeutique prometteuse dans le traitement des hépatites aigues et chroniques, B et Delta (Preclinical studies on Myrcludex B, a novel entry inhibitor for hepatitis B and HDV infections - S. Urban – 4TH European Congress of Virology).

g. Les associations thérapeutiques

L'efficacité partielle de la plupart des molécules et l'apparition de résistances sous monothérapie suggèrent que des associations thérapeutiques pourraient être bénéfiques dans le traitement de l'hépatite virale B chronique, comme elles l'ont été dans les infections par le VIH *(Fig. 28)*. Il peut s'agir d'une combinaison de plusieurs analogues nucléosidiques ou d'une association analogues nucléosidiques - immunomodulateurs. L'association lamivudine-adéfovir (add on) a montré sa supériorité versus le switch de la lamivudine par l'adéfovir. L'association lamivudine - IFNα ne semble pas plus efficace que la lamivudine seule, l'IFNα ne diminue pas le risque de réactivation après l'arrêt du traitement, mais réduit le risque de résistance virale aux analogues nucléosidiques comme la lamivudine. Une combinaison séquentielle pourrait être plus efficace qu'une introduction simultanée (Janssen *et al.*, 2005).

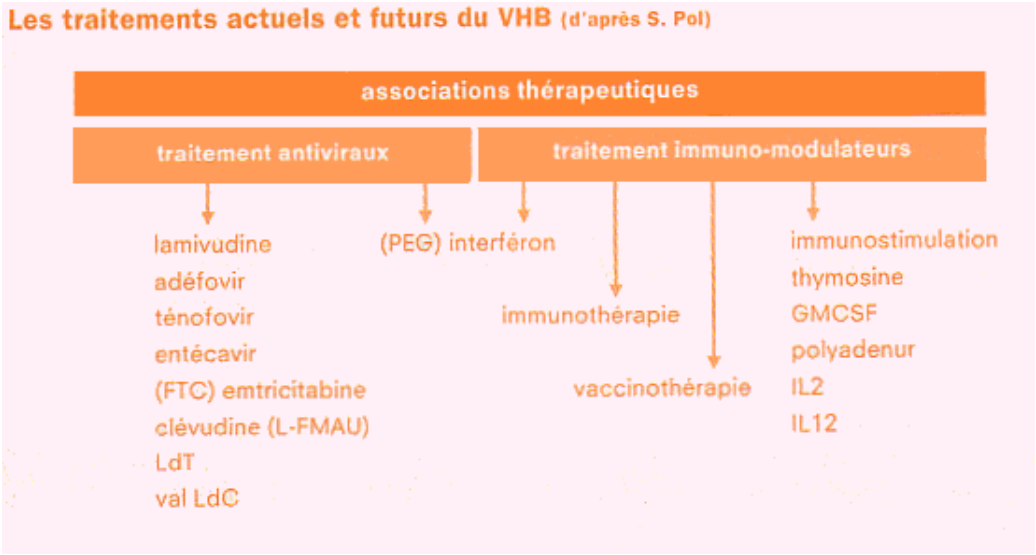

Figure 28 : Les traitements et associations thérapeutiques, actuels et futurs anti-VHB (Stanislas Pol)

1.4 Le traitement des hépatites B

1.4.1 Le patient mono-infecté

a. L'hépatite aiguë

Bien que la majorité des hépatites B aiguës soit spontanément résolutive, l'hépatite B aiguë fulminante nécessite de recourir en urgence à un traitement par la lamivudine. En effet, la dysfonction hépatique étant souvent accompagnée d'une dysfonction rénale, le ténofovir ou l'adéfovir sont à éviter.

b. L'hépatite chronique

Il n'existe pas de consensus relatif à la prise en charge optimale des hépatites B chroniques. Après évaluation globale des paramètres diagnostiques ;

- virologiques (CV, marqueurs sériques),

- biochimiques (transaminases),

- et hépatiques (nécro-inflammation, fibrose, fibrotest, score METAVIR),

un traitement devra être instauré chez le sujet porteur d'une hépatite B chronique active, contrairement au porteur asymptomatique, immunotolérant, sous peine de rompre cette tolérance.

b.1. Le traitement de l'hépatite B chronique active

Jusqu'en 2009, il était conseillé de traiter tout patient présentant un taux de transaminases supérieur à deux fois la normale, associé à une CV-VHB supérieure à 20 000 UI/ml chez le patient AgHBe ⊕, ou 2000 UI/ml chez le patient négatif pour l'AgHBe (porteurs d'anti-HBe). Selon les guidelines éditées par l'EASL en 2009, il est désormais préconisé d'initier un traitement antiviral pour toute CV-VHB supérieure à 2000 UI/mL, quelque soit le statut HBe. Une biopsie hépatique ou un fibrotest reste indispensable chez le patient dont la CV est supérieure au seuil décisionnel, sans qu'une élévation importante du taux de transaminases sériques soit observée.

Les patients, ne requérant pas une mise sous traitement antiviral, feront l'objet d'un suivi étroit.

Les cliniciens disposent actuellement de sept molécules ayant reçu une AMM pour la prise en charge de l'hépatite B chronique : l'IFNα standard ou PEG-IFNα, antiviraux et immunomodulateurs, et les analogues nuléos(t)idiques, lamivudine, adéfovir, entécavir, telbivudine et ténofovir. Un an de traitement par l'IFNα permet, dans 30% des cas, d'obtenir une réponse virologique soutenue chez les patients AgHBe ⊕, la réponse des patients AgHBe ⊖ (mutant pré-core) étant moindre. Il est actuellement préconisé de traiter par immunomodulation (IFNα), des patients présentant une CV faible et une élévation des transaminases. Chez les patients mono-infectés par le VHB, la présence de l'AgHBe, un taux élevé d'ALT et/ou une infection par un virus de génotype A ou B sont prédictifs d'une meilleure réponse au traitement par IFNα.

Tandis qu'il sera préférable d'avoir recours aux analogues nucléos(t)idiques chez les sujets présentant une cytolyse modérée (transaminases peu augmentées) et une CV élevée, afin d'inhiber la réplication virale. Néanmoins, alors qu'on parle de rémission à l'issue d'un traitement d'un an par IFNα, le traitement par analogue nucléosidique devra être maintenu sur plusieurs années, d'où un risque non négligeable d'émergence de résistance, parfois lié à une compliance plus incertaine par voie orale. L'entécavir et le ténofovir sont à présent reconnus comme des molécules de première ligne, à l'instauration du traitement de l'hépatite B chronique active.

1.4.2 Le patient co-infecté

a. L'hépatite aiguë

Dans le cadre d'une surinfection aiguë par le VHB d'un patient infecté par le VIH, un traitement par la lamivudine devra être envisagé, malgré le risque de sélection de virus VIH résistant à la lamivudine. Lorsque d'autres molécules uniquement actives contre le VHB seront disponibles, elles représenteront probablement l'option thérapeutique de choix.

b. L'hépatite chronique

Chez les patients co-infectés par le VIH et le VHB, le seuil d'ADN-VHB à partir duquel le traitement doit être initié n'est pas défini ; en pratique le seuil défini chez le patient mono-infecté pourra être transposé aux patients co-infectés.

b.1. Le traitement de l'hépatite chronique active du patient co-infecté

Les options thérapeutiques diffèrent selon le contexte clinique et tiennent compte du profil des infections VHB et VIH, des indications et contre-indications au traitement anti-rétroviral et des lignes antérieures de traitement anti-VHB. Aucun essai clinique randomisé à grande échelle n'ayant été effectué, les données cliniques manquent pour certaines molécules chez la population co-infectée. Par conséquent, les recommandations établies pour le traitement de l'hépatite B chez le patient co-infecté par le VIH, reposent sur les quelques données acquises au sein de cette population, mais surtout sur les données obtenues chez les patients mono-infectés par le VHB.

b.1.1 *Scénario 1 : Pas d'indication immédiate au traitement anti-VIH.*

En l'absence d'indication à débuter un traitement antirétroviral, la décision d'introduire un traitement anti-VHB doit être prise après avoir documenté l'activité histologique et le risque de progression de la maladie hépatique.

Lorsque l'infection à VHB est à l'origine de lésions hépatiques minimes non progressives, en l'absence de molécule dénuée d'activité anti-VIH, la meilleure stratégie est actuellement de ne pas traiter, mais d'opter pour un suivi hépatique étroit. De nouvelles molécules anti-VHB dépourvues d'activité documentée sur le VIH (valtorcitabine ?), constitueront une avancée clinique importante et l'option thérapeutique de choix dans ce contexte.

Néanmoins, les patients présentant des taux élevés d'ADN-VHB (> 2000 UI/ml), et des preuves histologiques d'infection active et/ou avancée (inflammation modérée à sévère et/ou une fibrose septale – Metavir A2 et/ou F2) doivent bénéficier de l'instauration d'un traitement. Lorsqu'il n'y a pas d'indication à débuter une thérapie anti-rétrovirale de haute activité (HAART) (CD4 > 500 cellules/mm3), on pourra avoir recours à l'IFNα. En raison du manque de données sur les effets de l'IFNα chez les patients co-infectés VIH/VHB, les recommandations sont largement issues des données obtenues chez les patients mono-infectés par le VHB. La posologie et la durée du traitement par l'IFNα sont alors dictées, comme chez le patient mono-infecté, par le statut HBe. Bien que l'IFNα soit surtout bénéfique aux patients AgHBe ⊕, les patients AgHBe ⊖ peuvent, en particulier lorsque la cytolyse reste importante et même si la probabilité d'avoir une réponse soutenue est plus faible, être traités par l'IFNα. Pour l'IFNα standard (non pegylé), la dose recommandée est 10 millions d'unités (MU) trois fois par semaine pendant quatre à six mois, chez les patients Ag HBe ⊕. La réponse attendue consiste alors en une séroconversion HBe, maintenue après arrêt du traitement. Chez les patients AgHBe ⊖, la dose d'IFNα recommandée est de 3 à 6 MU, trois fois par semaine pendant au moins 12 mois. Le PEG-IFNα- 2a (180 µg une fois par semaine) doit être poursuivi pendant 48 semaines quelque soit le statut HBe. La réponse biochimique et virologique à l'IFNα consiste alors en une normalisation des transaminases et la suppression de l'ADN sérique du VHB (< 2000 UI/ml), chez le patient initialement AgHBe ⊖.

En cas de contre-indication (cirrhose), d'intolérance ou de non réponse à l'IFNα, en l'absence de molécules ayant une activité anti-VHB exclusive, l'adéfovir à la dose de 10 mg/j, supposée non active contre le VIH reste une option controversée, le risque d'induire des mutations de résistance du VIH demeurant.

Enfin, chez les patients présentant un taux de CD4 < 500/mm^3, un recours anticipé à un traitement anti-rétroviral, comprenant deux molécules à double activité anti-VHB et anti-VIH (ténofovir et lamivudine ou emtricitabine) devra être envisagé. Les associations thérapeutiques réduisant le risque d'émergence de résistance, la bithérapie anti-VHB devra être favorisée et la monothérapie reconsidérée.

b.1.2 Scénario 2 : Indication au traitement anti-VIH.

Chez les sujets dont l'infection à VIH requiert un traitement HAART, la décision de traiter l'infection à VHB repose sur le taux d'ADN-VHB sérique (même si la biopsie demeure utile au suivi de la réponse hépatique au traitement anti-VHB). Ainsi lorsque le sujet présente une CV qui atteint 20 000 UI/ml, un traitement anti-rétroviral, comprenant deux molécules à double activité anti-VHB et VIH est recommandé. En deçà de 2000 UI/ml, le choix de débuter un traitement antiviral anti-VHB est laissé au clinicien (le recours à la bithérapie avec double activité est optionnel).

b.1.3 Scénario 3 : Résistance du VHB à la lamivudine et nécessité d'un traitement anti-VHB

En cas de suspicion de résistance du VHB à la lamivudine, celle-ci devra dans la mesure du possible être confirmée par génotypage de la région Pré-S2/S. Si la suspicion est avérée, le ténofovir demeurant actif contre le VHB résistant à la lamivudine, son introduction dans l'HAART est recommandée. Si la CV-VIH est contrôlée, l'un des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INRT) pourra être remplacé par le ténofovir, si cela est approprié au maintien sous contrôle de la réplication du VIH ; tandis que si la CV-VIH n'est pas contrôlée, le ténofovir pourra être ajouté, tout en respectant les recommandations de prise en charge des patients en échecs de HAART.

b.1.4 Scénario 4 : Cirrhose

Dans le cadre d'une atteinte hépatique sévère, comme la cirrhose, l'initiation d'un traitement anti-VHB doit être entreprise dès 2000 UI/ml. Le traitement par IFNα est rarement indiqué, voir souvent contre-indiqué en raison de sa mauvaise tolérance.

b.2. La réactivation sévère de l'hépatite B

La reconstitution immunitaire, initialement souhaitée à l'instauration d'un traitement antirétroviral de type HAART, peut conduire à la survenue d'une réactivation d'hépatite B potentiellement fatale. Celle-ci est d'autant plus à craindre et potentiellement marquée, que le taux de CD4 est bas à l'initiation du traitement (< 200/mm^3). Même si une réduction initiale de la CV-VHB pourrait être envisagée, afin de diminuer le risque d'hépatite de reconstitution immunitaire, cette stratégie demeure à risque en l'absence de molécules à activité anti-VHB exclusive, n'exposant pas à la sélection de VIH résistant. L'instauration d'emblée d'un traitement de type HAART constitue donc l'approche préférée, à moins de recourir à une transplantation hépatique, lorsqu'elle est disponible.

b.3. L'interruption du traitement

Les résistances du VIH et du VHB sont indépendantes. L'évolution génotypique du VIH peut amener à interrompre un traitement anti-VIH, comportant une activité anti-VHB. Selon le statut VHB du sujet, cette interruption peut entraîner une poussée d'hépatite potentiellement fatale et doit être considérée avec prudence. Un soin particulier devra être apporté à l'éducation des patients, afin d'éviter l'interruption des médicaments efficaces contre le VHB.

2 *L'évolution sous traitement anti-VHB*

2.1 L'histoire d'une quasi-espèce VHB

Le génome viral est soumis, au cours de sa réplication, à la survenue de mutations spontanées. La transcriptase inverse du VHB, responsable d'erreurs durant la transcription, est dépourvue d'activité correctrice. L'accumulation de ces erreurs lors de la réplication, induit l'émergence de quasi-espèces co-infectant le patient porteur chronique d'une hépatite B. On estime qu'une souche de VHB connaît 1,4 à $3{,}2.10^{-5}$ substitutions nucléotidiques par cycle, soit 10^4 fois plus qu'un virus à ADN classique (dépourvue de transcriptase inverse) mais 100 fois moins qu'un rétrovirus (VIH). Sachant qu'en phase chronique, 10^{13} virions sont produits chaque jour et que le génome du VHB ne compte que 3200 paires de bases, la totalité des nucléotides du génome pourraient théoriquement être substituée chaque jour (Glebe, 2007). La quasi-espèce dominante est, par définition, la mieux adaptée à l'hôte et son environnement (traitement), tout en jouissant de la meilleure capacité réplicative (fitness). En effet, malgré un fort taux de mutations, seules certaines mutations conférant un avantage sélectif à la quasi-espèce perdurent.

2.2 L'histoire de la résistance du VHB

Les principaux facteurs impliqués dans la sélection de mutants d'échappement sont la demi-vie longue des hépatocytes infectés renfermant des ADNccc et la grande variabilité du génome du VHB, à l'origine de l'apparition de nombreuses quasi-espèces et mutants, archivés sous forme de ADNccc. La nature des quasi-espèces évolue en fonction du temps passé sous pression de sélection du traitement antiviral et de la réponse immunitaire. En situation d'échappement, sous traitement mal conduit ou de défaut

d'observance, l'émergence d'un mutant d'échappement dépend de son « fitness » et de sa capacité à dominer la souche sauvage sous pression antivirale. La succession des différentes lignes de traitements favorise l'apparition de mutations de résistance, qui peuvent être croisées.

Sous analogues nucléotidiques et nucléosidiques actifs contre le VHB, le suivi virologique repose sur un contrôle trimestriel de la CV. L'étendue de l'efficacité du traitement est mesurée par la réduction de l'ADN-VHB ou par sa négativation en deçà du seuil de détection de la technique. En l'absence de réponse virologique, trois mois après instauration du traitement (diminution < 1 $\log_{10}$ UI/mL), ou en cas de rebond de la CV (augmentation > 1 $\log_{10}$ UI/mL) par rapport au nadir, on parlera respectivement de résistance primaire ou secondaire. Celles-ci signent la sélection d'une quasi-espèce, qui présentait d'emblée ou a acquis, une ou des mutations lui conférant une résistance au traitement (Locarnini *et al.*, 2004). L'émergence de cette résistance se traduit d'abord biologiquement, par une restriction du taux de séroconversion HBe sous traitement (Da Silva *et al.*, 2001), puis virologiquement avant d'être biochimique et histologique (Wright, 2004). Les résistances secondaires sont associées à long terme à un pronostic péjoratif (Lok *et al.*, 2003) (Liaw *et al.*, 2004a; Liaw *et al.*, 2004b). Il est donc primordial de détecter et de typer les échappements thérapeutiques, afin de limiter leur risque d'exacerbation aigüe (Yuen *et al.*, 2003).

Grâce à la mise au point d'approches génotypiques et phénotypiques, des mutations de résistance ont pu être caractérisées (Zoulim, 2006) et des stratégies, minimisant leur survenue et leur impact, définies. Néanmoins, ces mutations ont un impact non négligeable sur le fitness viral et certaines doivent être associées pour conférer une résistance (Sheldon *et al.*, 2006).

De plus, du fait de la structure du génome viral du VHB, les cadres de lecture étant au moins en partie superposés, un nucléotide code au moins deux protéines. Ainsi, les mutations de la polymérase virale, induites sous traitement, peuvent notamment perturber l'expression du gène S codant les protéines d'enveloppe. Ces mutations peuvent alors être impliquées dans un échappement aux Ac anti-HBs, ou une infectivité et une sécrétion virale altérées (Zoulim *et al.*, 2009). Certaines mutations du gène S, induites sous pression antivirale, pourraient en modifiant l'épitope ou en perturbant sa conformation, mettre à défaut des tests ELISA de détection de l'AgHBs, dans certaines hépatites occultes *(Fig. 29)*.

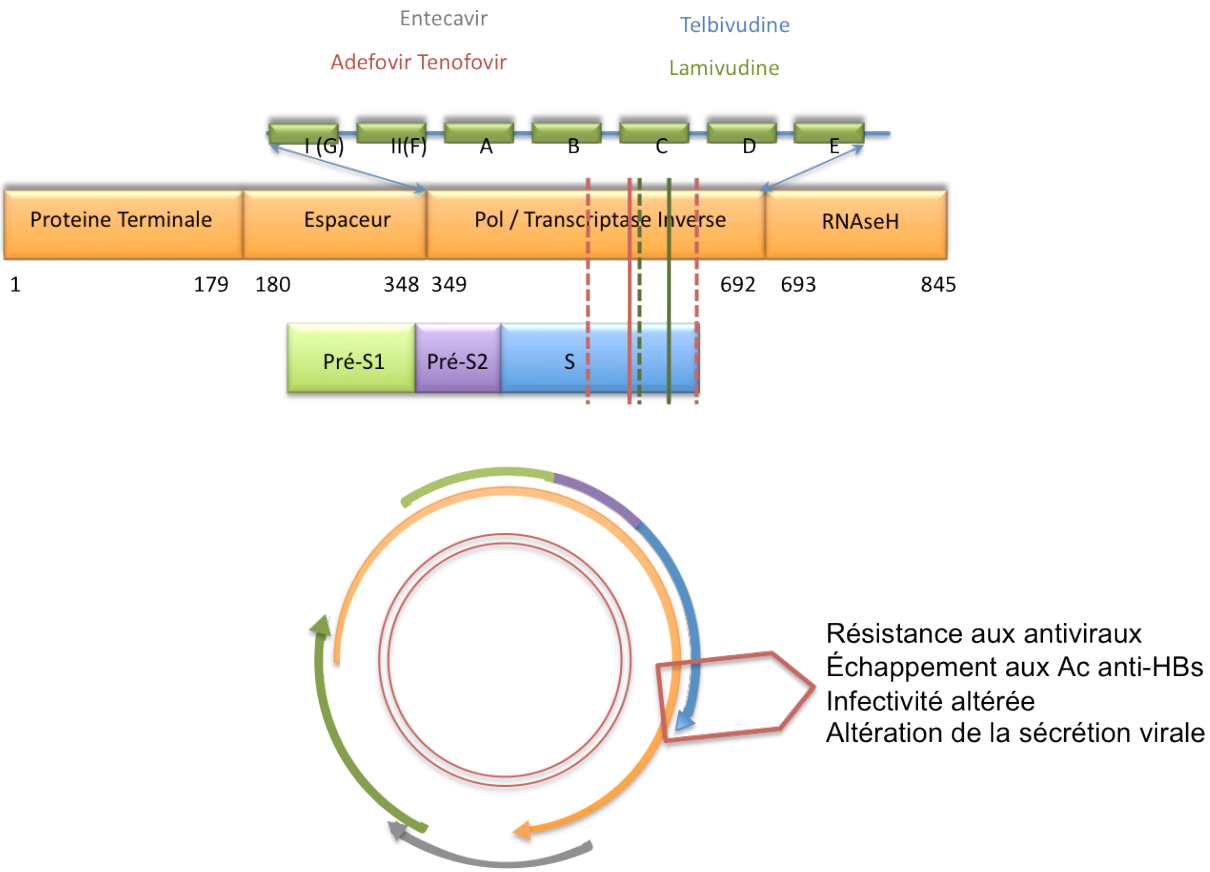

Figure 29 : Impact des mutations de résistance de la polymérase sous analogues nucléosidiques, sur le gène S

Echappement aux Ac anti-HBs, altération de l'infectiosité et de la sécrétion virale. F. Zoulim - Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues - Gastroenterology - Nov 2009

2.3 Mutations de la polymérase virale et résistance du VHB

Les mutations de résistance, décrites sous traitement antiviral comme responsables de phénomènes de résistance secondaire, touchent essentiellement le gène de la polymérase, cible des analogues nucléosidiques et –tidiques. La plupart de ces mutations touchent les domaines fonctionnels A à E de la polymérase du VHB (Zoulim, 2004) *(Fig. 30)*.

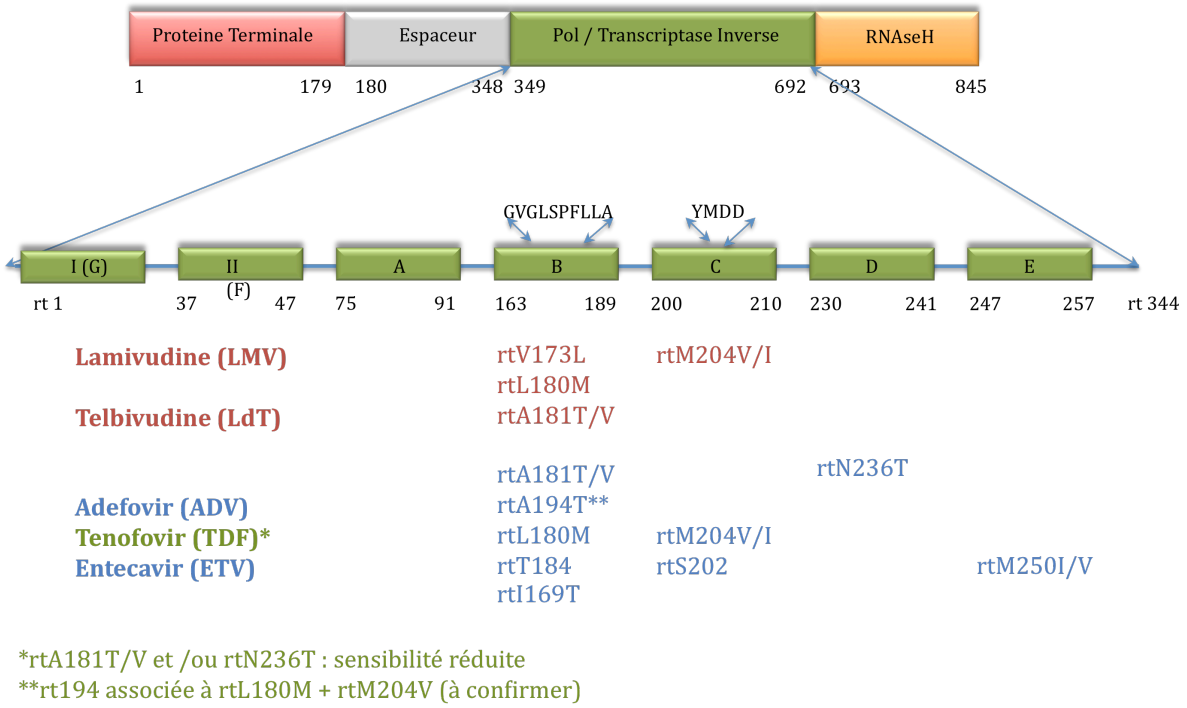

Figure 30 : Mutations de résistance primaire aux antiviraux

Mutations du gène de la polymérase décrites comme induisant une résistance aux analogues nucleos(t)idiques. Des mutations dans le motif YMDD du domaine C de la polymérase, rtM204V ou rtM204I induisent une résistance à la lamivudine (LMV) et la telbivudine (LdT) ; souvent associées à des mutations compensatoires du domaine B restaurant la capacité réplicative virale, rtL180M et/ou rtV173L. Une résistance à l'adéfovir (ADV) est conférée par les mutations de substitution A181V ou rtA181T ou la rtN236T. La substitution rtA181V/T peut conférer une susceptibilité diminuée à LMV et la LdT. La résistance à l'entécavir (ETV) est conférée par une combinaison de mutations au sein des domaines B, C, ou D de la polymérase virale, associées à une substitution préexistante en position rt204. Une substitution en position rt194 conférerait une résistance au ténofovir (TDF). D'après F. Zoulim - Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues - Gastroenterology – Nov 2009

Le génotypage du gène codant pour la transcriptase inverse virale permet, lors d'un échec thérapeutique, de mettre en évidence l'apparition de mutations décrites dans la littérature comme induisant une résistance virale et de procéder aux adaptations thérapeutiques qui s'imposent. Tandis que le phénotypage permet *in vitro,* par infection en cellules hépatiques, de mettre en évidence le phénomène de résistance par augmentation de la concentration inhibitrice 50% (IC50) des analogues nucléosidiques. (Villet *et al.*, 2008; Zoulim, 2007; Zoulim *et al.*, 2006). Toutes les mutations n'ont pas le même impact, alors que certaines induisent seules la résistance, d'autres ne sont actives qu'en association (M204V+/-I169T+/-M250V). Enfin d'autres sont dites compensatrices (L180M ou V173L) et associées aux mutations de résistance (M204V), elles réduisent leur impact sur la processivité de la polymérase virale et le fitness viral *(Tab. 1).*

Tableau 1 : Impact phénotypique des mutations de résistance aux analogues nucléosidiques

Fabien Zoulim - Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues - Gastroenterology - Nov 2009

Substitution domaine de la RT	Lamivudine	Telbivudine	Entécavir	Adéfovir	Ténofovir
Souche sauvage	S	S	S	S	S
M204V	R	R	I	S	S
L180M+ M204V	R	R	I	S	S
N236T	S	S	S	R	I
A181T/V	I/R	R	S	R	I
L180M+ M204V+/-I169T+/-V173L+/-M250V	R	R	R	S	S
L180M+ M204V+/-T184G+/-S202I	R	R	R	S	S

2.3.1 La résistance à la lamivudine

La lamivudine est un analogue nucléosidique de la désoxycytidine triphosphate, elle agit comme un inhibiteur compétitif de l'activité transcriptase inverse. L'apparition sous traitement d'une mutation rtM204V/I/S en position 204 de la RT (reverse-tanscriptase), au sein du site actif YMDD, induit d'emblée une résistance de haut niveau à la lamivudine (Allen *et al.*, 1998). Néanmoins, les variants mutés présentent une activité transcriptase inverse et une capacité de réplication réduites. Mais sont décrites chez les variants mutés, des mutations additionnelles dites compensatrices, rtV173L et/ou rtL180M, capables de restaurer le fitness du mutant (Delaney *et al.*, 2003). De nombreuses études prospectives ont mis en évidence une incidence élevée de mutations de résistance (documentées) dès la première année de traitement (23%), leur prévalence atteignant 70% à cinq ans *(Fig. 31)*. De plus, le suivi des patients présentant une résistance secondaire à la lamivudine a confirmé une augmentation significative du nombre de décompensation hépatique à quatre ans (Lok *et al.*, 2003).

2.3.2 La résistance à l'adéfovir

L'adéfovir agit par inhibition de l'élongation, mais aussi de l'initiation de la reverse transcription en empêchant l'incorporation de la désoxyadenosine triphosphate. Les analogues nucléotidiques comme l'adéfovir, le ténofovir et l'entécavir, qui sont des répliques parfaites des substrats naturels (dATP et dGTP), présentent une barrière génétique plus élevée que les analogues nucléosidiques. Le taux initial de résistance virale à l'adéfovir est très faible. L'émergence de mutations de résistance a été décrite au décours d'un traitement prolongé.

L'adéfovir dipivoxyl et la lamivudine appartenant à des familles chimiques différentes, les mutations induites sous traitement, apparaissent dans d'autres régions de la polymérase (domaines B et D). Les mutations rtN236T (domaine B) et rtA181V (domaine D) induisent une réduction d'un facteur 5 à 10 de la sensibilité de la souche à l'adéfovir (Zoulim, 2004). Cette diminution peu importante de la sensibilité *in vitro* au médicament, serait lié à l'homologie importante de l'adéfovir pour le substrat naturel.

L'adéfovir constitue une alternative thérapeutique de choix chez le patient porteur d'une souche majoritaire devenue résistante à la lamivudine, chez qui l'adéfovir permet d'atteindre une réponse virologique et biochimique soutenue (Peters *et al.*, 2004). Néanmoins, l'existence d'une mutation rtL180M, induite sous lamivudine, favorise la survenue de la mutation rtA181V, responsable d'une résistance à l'adéfovir. Des études récentes montrent une réponse virologique accrue à la bithérapie (ou add-on lamivudine-adéfovir), versus la monothérapie (ou switch lamivudine/adéfovir) (Vassiliadis *et al.*, 2009). En effet, la lamivudine agirait en réduisant le risque d'apparition de mutation de résistance à l'adéfovir, favorisant une réponse virologique et biochimique soutenue à cinq ans.

Trois autres régions de mutations ont été décrites en l'absence de la mutation rtN236T, seules ou en association, chez des patients non-répondeurs ou en rechute virologique sous adéfovir : dans le domaine A, rtV84M et rtS85A, l'interdomaine C-D en rtV214A et rt Q215S ou le domaine D, rtP237H et rtN238T (Bartholomeusz *et al.*, 2006). Or Borroto-Esoda *et al.* ont observé le polymorphisme rtV214A et/ou rtN238T, sans pour autant observer de signes de résistance sous adéfovir (Borroto-Esoda *et al.*, 2007).

2.3.3 La résistance à l'entécavir

L'entécavir, analogue de la désoxyguanosine, possède en culture une activité antivirale 100 fois plus élevée sur le VHB, que la lamivudine ou l'adéfovir (Langley *et al.*, 2007). Mais contrairement à l'adéfovir, même si l'entécavir présente un spectre de résistance différent de celui de la lamivudine et demeure actif sur les souches résistantes, cette molécule ne constitue pas une option judicieuse, pour cette catégorie de patients. En effet, il semblerait que l'existence d'une résistance à la lamivudine, constitue un prérequis et un facteur favorisant de l'émergence de mutations de résistance à l'entécavir (Vassiliadis *et al.*, 2009). Les mutations décrites (T184, S202 et/ou M250) ne sont observées qu'après traitement par la lamivudine (Tenney *et al.*, 2007), alors que l'incidence cumulée de résistance, chez le patient naïf de traitement par les analogues nucléosidiques, ne serait que de 0,8 % versus 39% à quatre ans (Colonno *et al.*, 2007) *(Fig. 31)*.

2.3.4 La résistance à l'emtricitabine

L'emtricitabine est active en monothérapie dans le traitement de l'hépatite B chronique, mais agissant sur la même cible thérapeutique que la lamivudine, elle présente le même spectre de résistance et est soumise à l'émergence précoce (9 à 16% dès 48 semaines) des mêmes mutations de résistance (M204V + L180M et/ou V173L) *(Fig. 31)*.

2.3.5 La résistance au ténofovir

Analogue nucléotidique acyclique, le ténofovir conserve une activité antivirale et constitue l'alternative thérapeutique de choix, chez le patient infecté par une souche possédant une résistance secondaire à la lamivudine et à l'adéfovir. Non seulement aucune mutation de résistance au ténofovir n'est à ce jour formellement décrite, mais en plus, le spectre de résistance au ténofovir ne semble pas croiser avec le spectre déjà décrit d'autres antiviraux actifs sur le VHB. Néanmoins, des auteurs s'accordent pour décrire des mutations impliquées dans une moindre réponse au ténofovir de l'infection à VHB chez le patient VIH ⊕ (Sheldon *et al.*, 2005).

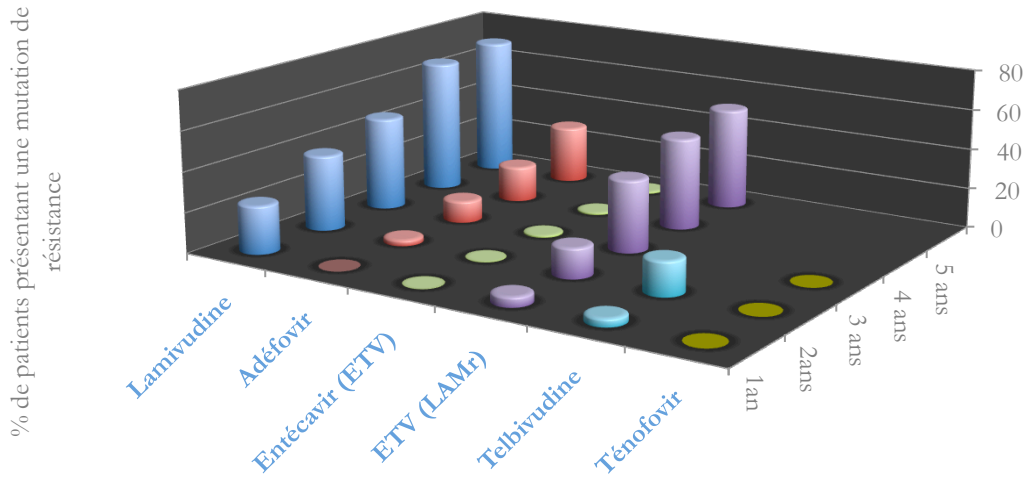

Figure 31 : Incidence de la résistance aux analogues nucléos(t)idiques chez le patient naïf

D'après Lai et al. CID 2003 ; Hadzyiannis et al. Gastroenterology 2006 ; Colonno et al. AASLD 2006 ; Di Bisceglie et al. AASLD 2006 ; Marcellin et al. New England Journal of Medecine en décembre 2008 ; Takkenberg et al. Vox Sanguinis 2009

2.4 La résistance chez le patient naïf de traitement antiviral

Certains auteurs émettent l'hypothèse de l'existence, avant traitement, de mutants résistants à la lamivudine, qui seraient sélectionnés à l'instauration du traitement. En effet, la probabilité de sélectionner des mutants résistants est décrite comme proportionnelle à la pression de sélection et à la diversité des quasi espèces (Bartholomeusz *et al.*, 2006). En l'occurrence, en l'absence de traitement, la seule pression pesant sur la population virale est la réponse immunitaire du patient. Ainsi le polymorphisme résultant de la chronicité de l'infection prédispose naturellement le patient chronique à la résistance primaire aux antiviraux (Pastor *et al.*, 2009). Déjà en 2001, Kobayashi *et al.* décrivaient, chez des patients atteints d'une hépatite chronique asymptomatique n'ayant nécessité aucun recours aux antiviraux, l'expression après sous-clonage de quasi espèces YIDD ou YVDD (Kobayashi *et al.*, 2001). De même, le polymorphisme de résistance « secondaire » rtV214A- rtN238T, a été observé chez des patients chroniques, naïfs de traitement antiviral (Pastor *et al.*, 2009).

La question d'un recours au génotypage des mutations de résistance, avant toute initiation de traitement, devra être considérée et des études menées sur l'impact de ces mutations prétraitement (Wu *et al.*, 2007).

3 *Les Patients co-infectés*

3.1 La co-infection du patient infecté par le VHB

Peu de données existent sur la co-infection entre le VHB et d'autres virus. Des auteurs rapportent un lien entre la présence du VHB de génotype D et l'hépatite Delta en Russie (Flodgren *et al.*, 2000). Koibuchi *et al.* décrivent une prédominance du génotype A, chez les patients japonais co-infectés VIH/VHB, comparés aux patients séronégatifs pour le VIH (Koibuchi *et al.*, 2001). Des études récentes montrent également une prédominance du génotype A, chez les camerounais co-infectés VHB/VIH, dans une population VIH ⊕ où la prévalence d'hépatite B chronique atteint 80% (Mulders *et al.*, 2004).

Enfin des études suggèrent que les co-infections VHB sont largement sous estimées et participent de manière prédominante à l'évolution du VHB (Chen *et al.*, 2004).

La co-infection est un prérequis aux phénomènes de recombinaison, qui doivent être envisagés au cours de l'hépatite B chronique.

3.2 La co-infection VIH-VHB

Ces patients présentent une tendance accrue à évoluer vers la chronicité et donc la cirrhose et l'hépato-carcinome (Bodsworth *et al.*, 1991). Pour mieux comprendre cette tendance, il serait indispensable de cloner la population VHB sérique de patients co-infectés, afin de pouvoir en séquencer l'ensemble des quasi-espèces, et d'étudier ainsi les recombinaisons susceptibles d'induire un passage à la chronicité. La prévalence de l'infection (AgHBs) est très inégale, de 0,1-0,2 % dans les pays occidentaux, elle peut atteindre 40 % dans les pays d'endémie, comme l'Asie du Sud-Est et l'Afrique Subsaharienne (Mulders *et al.*, 2004). Or ces pays sont aussi ceux qui présentent la plus forte densité de population infectée par le VIH *(Fig. 32)*.

Les patients atteints d'une infection à VIH sont, du fait de sources de contamination croisées, particulièrement à risque de contracter une hépatite virale (B, C, et/ou Delta) et jusqu'à 68% de la population VIH ⊕ présenterait une cicatrice sérologique de contage par le VHB (Lo Re *et al.*, 2007; Nunez *et al.*, 2002).

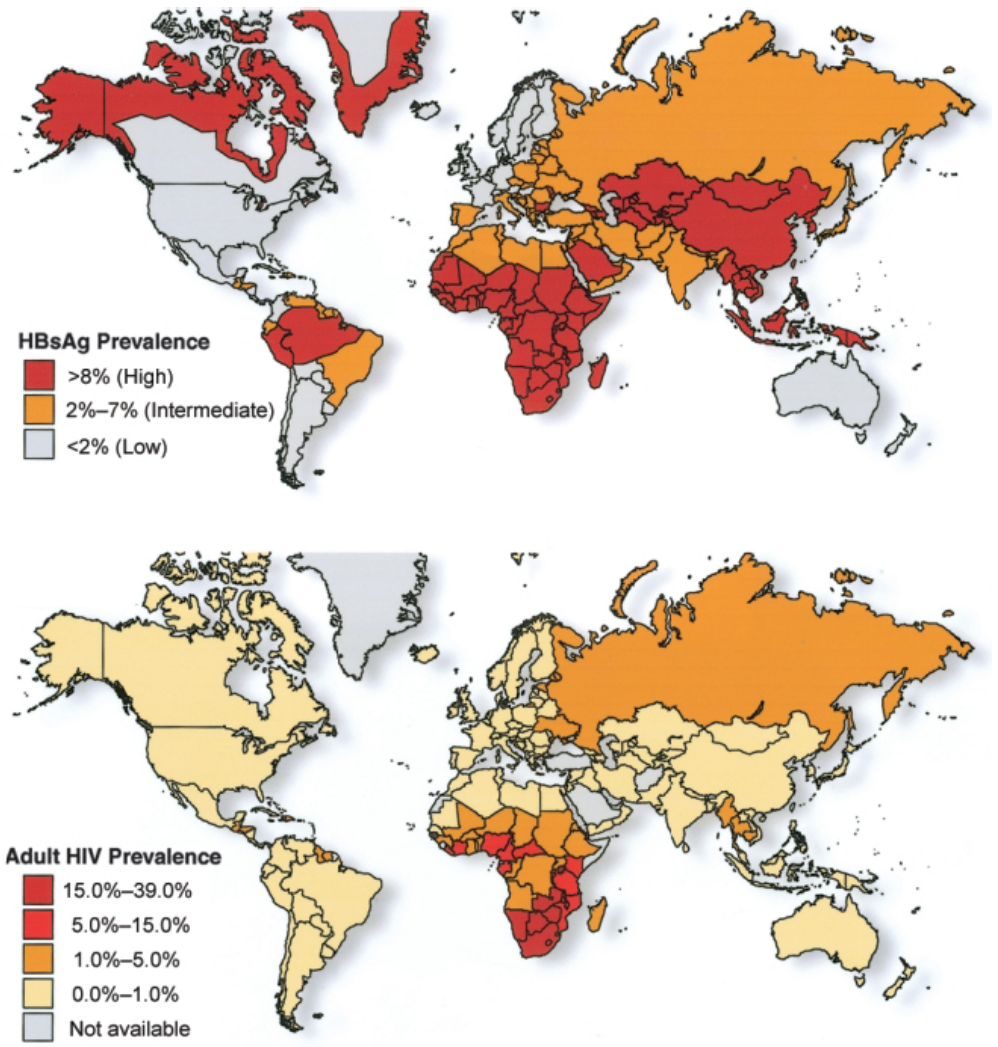

Figure 32 : Prévalence croisée de l'infection à VHB (portage de l'AgHBs) et de l'infection à VIH

La prévalence de l'hépatite B au sein de cette population est estimée selon les études entre 14% et 80%, en Europe et en Afrique respectivement (Mulders *et al.*, 2004; Neau *et al.*, 2005; Olinger *et al.*, 2008; Thio, 2003) .

Depuis la généralisation des HAART, les études récentes montrent chez les patients VIH ⊕, une augmentation de la morbidité hépatique (Thio, 2003), la mortalité hépatique étant 19 fois supérieure chez les patients co-infectés, versus les patients VHB ⊕ / VIH ⊖ (Peters, 2007). Leur profil sérologique est fréquemment marqué par la présence d'un core isolé (Hofer *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2003), potentiellement associé à une hépatite B occulte (Kao *et al.*, 2002; Piroth *et al.*, 2002).

Le génome du VHB est soumis à des variations de séquences importantes, liées notamment à son mode de réplication impliquant une activité transcriptase inverse (Girones *et al.*, 1989). Les mutations, survenant au cours du portage chronique, peuvent

influer sur le devenir de l'infection. Ainsi la survenue d'exacerbation et de décompensation d'hépatique aiguë sont rapportées chez le patient co-infecté, lors de l'émergence d'une souche résistante à un antiviral (Bruno *et al.*, 2001).

Les mutations de résistance à la lamivudine, décrites chez le patient co-infecté, sont identiques à celles décrites chez le patient séronégatif pour le VIH (Thibault *et al.*, 1999).

Une récente étude prospective, sur une cohorte française porteuse du VIH, a montré l'importance du génotypage VHB, dans la prise en charge des patients à risque accru de fibrose que sont les patients VIH ⊕, en mettant en évidence une tendance à l'évolution péjorative du génotype G (Lacombe *et al.*, 2006).

3.3 Les perspectives de recherche chez le patient co-infecté

Une meilleure compréhension de la pathogénie et des mécanismes de lésions hépatiques dues au VHB, chez des patients co-infectés VIH, est nécessaire. L'intérêt est donc majeur d'initier des études destinées à mettre en évidence des variations génomiques, leurs facteurs favorisant, ainsi que leur impact phénotypique et clinique chez les patients co-infectés VIH-VHB.

Actuellement, nous ne disposons que de peu de données sur l'activité, la progression de la maladie hépatique et leur corrélation avec le taux d'ADN sérique du VHB, chez les patients co-infectés par le VIH, auquel est soumis le seuil d'initiation du traitement anti-VHB.

L'efficacité et la tolérance des associations thérapeutiques doivent être comparées à la monothérapie. L'efficacité du traitement anti-VHB, sur la clairance de l'AgHBs et des ADNccc intra-hépatique, le recul de la maladie hépatique, la morbidité et la mortalité doivent être étudié sur biopsies hépatiques ou par recherche de marqueurs non invasifs.

La prévalence et l'histoire naturelle de l'hépatite B chronique AgHBe ⊖ et de l'infection VHB occulte, chez des patients co-infectés par le VIH doivent encore être investigués.

Des molécules, strictement anti-VHB, constitueront une avancée thérapeutique très attendue (inhibiteur d'entrée, nouveaux analogues en cours de développement).

4 *Les hépatites B occultes*

L'ensemble des auteurs s'accordent pour qualifier d'infection occulte par le VHB, la détection persistante du génome du VHB, dans le sang et/ou le tissu hépatique, de patients AgHBs ⊖ (Raimondo *et al.*, 2007). La sensibilité grandissante des techniques de biologie moléculaire a permis de mettre en évidence une expression virale à bas bruit, en l'absence de détection de l'AgHBs. Dans la majorité des cas, les Ac anti-HBc sont alors les seuls marqueurs sérologiques présents (Raimondo *et al.*, 2007; Torbenson *et al.*, 2002). L'absence de détection de l'AgHBs, par les tests diagnostics, résulte selon les auteurs de la survenue de mutation(s) s'opposant à la détection de l'épitope « a » de la boucle hydrophylique du gène S (Datta *et al.*, 2006; Pollicino *et al.*, 2007), ou plus fréquemment à une faible réplication virale et une expression de l'Ag à des taux inférieurs au seuil de détection des tests actuellement disponibles (Jeantet *et al.*, 2004). Il est important de noter que 20% des hépatites occultes pourraient, de façon intermittente, être non détectable pour l'ensemble des marqueurs (Hofer *et al.*, 1998). Mais la persistance du génome viral sous forme d'épisomes (Ganem *et al.*, 2004) ou d'ADNccc (Wursthorn *et al.*, 2006) fait des hépatocytes infectés, voir des cellules sanguines périphériques mononuclées (PBMC), des réservoirs impliqués dans la réactivation virale de l'hépatite occulte *(Fig. 33)*.

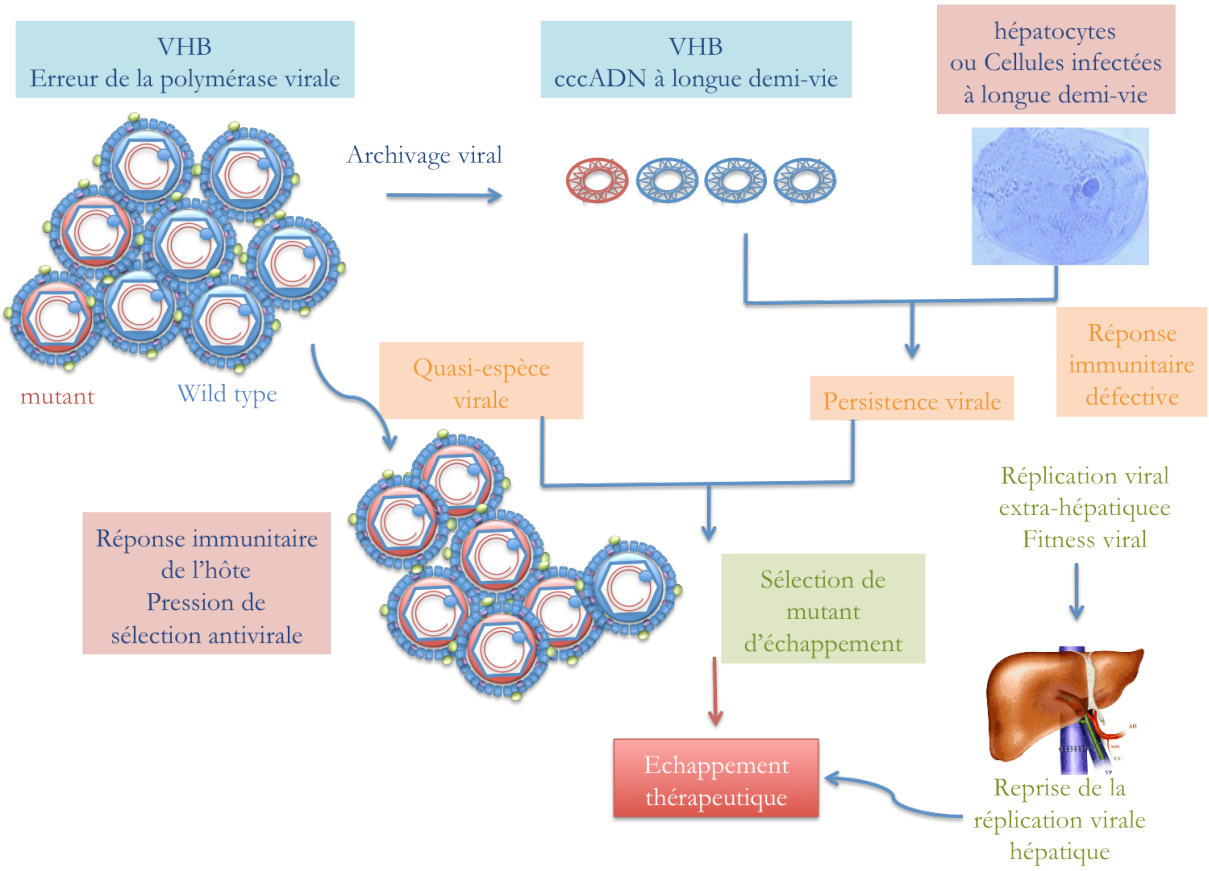

Figure 33 : Réactivation et réservoirs - Mécanisme de sélection et émergence de mutant de résistance

D'après Fabien Zoulim - Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues
Gastroenterology - Nov 2009

La prévalence des infections occultes varie de 0 à 89% selon les études, les populations cibles et les techniques virologiques utilisées (Cohen Stuart *et al.*, 2009; Filippini *et al.*, 2006; Hofer *et al.*, 1998; Lukhwareni *et al.*, 2009; Nunez *et al.*, 2002; Piroth *et al.*, 2002). Dans les cohortes françaises de patients VIH ⊕, la prévalence des infections occulte à VHB reste faible, de l'ordre de 0,6 à 1%, en raison du nombre important de patients traités par des HAART, incluant des molécules antivirales actives sur le VHB (Neau *et al.*, 2005; Piroth *et al.*, 2008).

Chez le patient co-infecté VIH-VHB présentant un core isolé, le risque de réactivation virale est majeur et doit être soigneusement pris en considération dans le management du traitement antirétroviral intégrant des molécules actives sur le VHB (Bloquel *et al.*; Clark *et al.*, 2006; Gartner *et al.*, 2007).

Récemment, des auteurs ont décrit six hépatites occultes, au sein d'une cohorte de 43 patients co-infectés VIH /VHB et négatifs pour l'AgHBs. Après clonage et expression en cellule Huh7, la non détection de l'AgHBs était confirmée en ELISA Axsym-Abbott® et les clones AgHBs ⊖ séquencés. Or, parmi les trois patients clonés, deux demeuraient négatifs après clonage (le troisième patient devait présenter une expression à bas niveau de l'AgHBs) et présentaient des mutations potentiellement impliquées dans l'absence d'expression de l'épitope HBs. Le premier patient présentait une mutation induisant l'expression d'un codon stop, en position 216 du gène S. Tandis que le second traité par stavudine, efavirenz et lamivudine présentait une rare triple mutation de résistance à la lamivudine rtV173L, rtL180M et rtM204V (Araujo *et al.*, 2008). Les mutations rtV173L et rtL180M viennent restaurer le fitness, amoindri par la mutation rtM204V et se traduisent par les substitutions E164D, I195M dans l'ORF du gène S. Or ces substitutions sont décrites comme réduisant l'affinité de l'AgHBs pour les Ac anti-HBs *in vitro* (Torresi *et al.*, 2002) et seraient responsable d'une moindre sensibilité diagnostique et d'une prévalence faussement augmentée d'hépatite occulte, sous traitement HAART anti-VHB.

De nombreuses autres mutations de l'épitope HBs, portées par une séquence hydrophile correspondant aux acides aminés 121 à 195 de la protéine S, seraient impliquées dans le défaut de détection de l'AgHBs. De même, des mutations situées en dehors de l'épitope pourraient induire des modifications de sa conformation, le rendant inaccessible aux Ac. Les mutations les plus couramment retrouvées dans la littérature sont listées dans le *Tab. 2*.

Tableau 2 : Mutations décrites comme potentiellement impliquées dans l'absence de détection de l'épitope (par ordre de fréquence dans la littérature)

SHBs141	SHBs123	SHBs122	SHBs118	SHBs144	SHBs134	SHBs127	SHBs120	SHBs126	SHBs131	SHBs145	SHBs143	
	insertion		T 118 A-K				P 120 S			G 145 R	S 143 L	**Hamkar 2009**
				D 144 E-G-A	F 134 Y			T 126 A		G 145 R-A	S 143 L	**Roque-Afonso 2005**
											T - M	**Pichoud 1999**
						P 127 S					T 143 M	**Kumar 2008**
		R 122 K				P 127 L			N 131 T		T 143 S	**Iris 2009**
L 141 A					P 134 S	P 127 S			T 131 I	G 145 A	T 143 M	**Kreutz 2002**
				N 144 E			P 120 S/Q				S/Y 143 L	**Wallace 1994**
	T123 N						P 120 S			G 145 R	S/Y 143 L	**Ireland 2000**
											S/Y 143 L	**Levicnic 2004**
K 141 E				N 144 A					T 131 I	G 145 K/R		**Coleman 1999**
				N 144 A				T126 S		G 145 R		**Moerman 2004**
K 141 E	T 123 A	R 121 N			F 134 N			T 126 N	T 131 I	G 145 K		**Hou 2001**
								T 126 I	N 131 K			**Jantet 2004**
			T 118 S		F 134 L		P 120 T	T 126 I	T 131 I			**Carman 1997**
						L 127 P						**Olinger 2007**
			dbl substitution									**Tang 1998**
												Araujo 2008

Mutations de résistance impliquées

SHBs195	SHBs164	SHBs147	SHBs135	SHBs130	SHBs128	SHBs125	SHBs142	SHBs133	
									Hamkar 2009
I 195 M	E 164 V-D							M 133 I-L	**Roque-Afonso 2005**
									Pichoud 1999
					A 128 V	M 125 T			**Kumar 2008**
									Iris 2009
									Kreutz 2002
									Wallace 1994
									Ireland 2000
									Levicnic 2004
			P 135 S				P 142 L		**Coleman 1999**
							P 142 S/L		**Moerman 2004**
		C 147 F/R		G 130 R			P 142 S	M 133 T	**Hou 2001**
				G 130 S	A 128 T	T 125 M			**Jantet 2004**
			P 135 S					M 133 I/T	**Carman 1997**
									Olinger 2007
									Tang 1998
I 195 M	E 164 D								**Araujo 2008**

B Travail personnel

VI. Exploration de la variabilité du VHB dans une population co-infectée par le VIH et le VHB

L'impact de l'immunodépression sur la variabilité génomique du virus, ainsi que les conséquences cliniques de cette variabilité, peuvent être explorés chez les patients co-infectés. En pratique, il est actuellement primordial, au regard de l'évolution clinique rapidement défavorable, d'être en mesure de tester *in vitro* la sensibilité génotypique aux molécules antivirales, des souches de VHB (majoritaires) des patients co-infectés dont la CV est supérieure à 100 UI/mL. Néanmoins, les charges virales observées chez ces patients étant généralement faibles, l'exploration de ces deux aspects reste actuellement limitée à certains profils de patients et nécessitera à terme le développement des techniques moléculaires ultrasensibles.

Par ailleurs, la variabilité génomique de l'épitope de la protéine S et la proportion accrue d'hépatites occultes chez le patient co-infecté, laissent envisager une moindre reconnaissance de son AgHBs, par les tests sérologiques de routine. Afin d'étudier les mutations retentissant directement (mutation de l'épitope) ou indirectement (modification de la conformation), sur la détection de l'épitope de l'AgHBs, il est envisagé d'exprimer en cellule eucaryote, les protéines S du virus prototype de génotype A (adw), et de souches issues de patients porteurs d'hépatite occulte. Après génotypage, leur réactivité vis à vis d'Ac anti-HBs commerciaux sera testée, afin de caractériser les mutations induisant une moindre réactivité ; l'objectif de ces travaux étant de contribuer à l'amélioration constante de la sensibilité des techniques de dépistage de l'hépatite B.

1 Matériel et méthode

1.1 Patients

A l'échelon local, une étude prospective fut menée au sein d'une ligne nancéienne de 780 patients porteurs du VIH, pris en charge au sein du service de Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Nancy.

Une cohorte nancéienne de 383 patients fut investiguée et nos travaux ont porté sur des patients qui, lors de leur inclusion, présentaient une CV détectable ou une cicatrice sérologique d'hépatite ancienne.

1.2 Méthode

1.2.1 Les marqueurs sérologiques de l'infection

Lors de leur inclusion, l'ensemble des patients recrutés pour l'étude a bénéficié d'un bilan sérologique développé, incluant la quantification de l'AgHBs, des Ac anti-HBs et des Ac anti-HBc totaux, ainsi que des Ac anti-VHC totaux, en immuno-analyse par chimiluminescence (Architect, Abbott®, France). Et l'AgHBe a été recherché grâce à un kit commercial d'enzymo-immuno-analyse sur microparticules paramagnétiques (Axsym, Abbott®, France).

1.2.2 Détection du génome viral

Dans le cadre de cette étude, une recherche des génomes viraux du VIH, VHB, VHC a été réalisée en parallèle du bilan sérologique, par PCR en temps réel sur m2000 RealTime™ Abbott®. Cette technique possède des bornes de quantification comprises entre 1,8 et 7,2 $\log_{10}$ UI/mL (soit 1,6 et 7 $\log_{10}$ copies/mL) pour les charges virales VIH, entre 1 à 9 $\log_{10}$ UI/mL (soit 1,53 et 9,53 $\log_{10}$ copies/mL) pour le VHB et entre 1,08 et 8,0 $\log_{10}$ UI/mL pour le VHC.

Le m2000 Abbott® est constitué de deux sous unités permettant la gestion du prélèvement depuis le prétraitement de l'échantillon et jusqu'à la quantification de la CV par PCR en temps réel (Ciotti *et al.*). Un premier module, le m2000sp assure l'extraction automatisée de l'acide nucléique viral, tandis que le module m2000rt assure la quantification de l'ADN-VHB ou de l'ARN-VIH ou – VHC, par PCR et détection en temps réel de l'amplification en fluorescence (dosage de l'ADN du VHB standardisé sur la base des standards de l'OMS). L'extraction sur m2000sp a pour objectif d'extraire et de

concentrer l'ADN cible et d'éliminer de l'extrait les inhibiteurs potentiels de l'amplification. La protéinase K permet la lyse du virion et la digestion des protéines associées aux acides nucléiques. La purification des acides nucléiques des échantillons est obtenue sur microparticules magnétiques. Les acides nucléiques capturés sur microparticules magnétiques, sont élués après lavage et transférés dans une plaque à puits profonds. Les acides nucléiques extraits sont additionnés au mix de PCR dans une microplaque. L'ADN-VHB est amplifié grâce aux amorces spécifiques du VHB du kit Abbott Real Time HBV®. L'utilisation de sondes oligonucléotidiques marquées d'un fluorochrome, spécifiquement liées au produit amplifié, permet de quantifier à chaque cycle d'amplification l'ADN-VHB cible. Le cycle d'amplification (CT), au cours duquel le signal fluorescent est détecté par l'analyseur m2000rt est proportionnel au $\log_{10}$ de la CV de l'échantillon.Les charges virales détectables, mais non quantifiables (< 10 UI/mL) ont été considérées comme positives et furent confirmées en technique Cobas Taqman VHB de Roche®.

1.2.3 Le génotypage : recherche de mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques par séquençage du gène POL (région Pré-S2/S)

Chez les patients présentant des charges virales le permettant, un génotypage a été réalisé. Après extraction automatisée de l'ADN-VHB, la région Pré-S2/S a été amplifiée, séquencée et analysée, d'après une technique adaptée d'une technique publiée (Olinger *et al.*, 2006). L'étude phylogénétique a reposé sur l'analyse de 845 nucléotides du gène Pré-S2/S, couvrant 30% du gène de la polymérase. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été alignées sur une séquence consensus, dérivant de 50 séquences issues des neuf génotypes connus du VHB, sur SeqScape®Software version 2.5 (Applied Biosystems®). Après relecture de l'ensemble des séquences, le génotype et les mutations de résistance décrites dans la littérature ont été recherchés.

a. En pratique

On procède par amplification sélective, par PCR nichée, de la région rt80 – rt280 du cadre de lecture P du génome VHB. Les amplicons obtenus sont purifiés, avant une ultime PCR de séquençage et le séquençage à proprement parler.

a.1. Extraction ADN m2000RT

L'extraction de l'ADN-VHB sérique a été réalisée de manière automatisée sur m2000sp, lors de la quantification de l'ADN-VHB, effectuée en parallèle du génotypage. L'acide nucléique du VHB (20µL), élué après purification est recueilli et conservé congelé, en vue du génotypage.

a.2. PCR

La Phusion™ Hot Start - Finnzim®, polymérase de *Pyrococcus*, est couplée à un domaine de fixation aspécifique à l'ADN et à un peptide de type Affibody®. A température ambiante, ce peptide de forte affinité, se fixe sur le site actif de la polymérase et bloque son activité. Durant l'amplification, à la faveur d'une augmentation cyclique de la température, le peptide Affibody® se décroche de la polymérase, qui peut alors jouer son rôle.

Les mutations du gène Pol, actuellement décrites dans la littérature comme susceptibles d'induire une résistance aux antiviraux sont référencées entre les acides aminés situés en position 80 et 250 de la RT (transcriptase inverse). Les amorces sont choisies de manière à permettre le séquençage de l'ensemble de la région d'intérêt du génome.

Les premiers couples d'amorces sont constitués de l'amorce antisens 979 et des amorces sens S2 et 455 *(Tab. 3 - Fig. 34)*.

Tableau 3 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées lors de l'amplification initiale

Amorces utilisées	Séquences nucléotidiques
S2 sens 455 sens	5' CAT CTT CTT GTT GGT TCT TCT G 3' 5' CAA GGT ATG TTG CCC GTT T 3'
979 antisens	5' ATT GGA AAG TAT GTC AAA GAA TTG GTC TTT TG 3'

a.3. PCR nichée

A l'issue de la première PCR, afin d'augmenter la sensibilité de la technique d'amplification, on a recours à une PCR nichée. Les amorces de la PCR nichée sont situées en position interne relativement au premier couple d'amorces et construites afin d'être spécifiques du fragment de 800 pb issu de la première PCR, tout en optimisant la taille du fragment séquencé *(Tab. 4 - Fig. 34)*.

Tableau 4 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées lors de la PCR nichée

Amorces utilisées	Séquences nucléotidiques
455 sens	5' CAA GGT ATG TTG CCC GTT T 3'
979 antisens RV2 antisens	5' ATT GGA AAG TAT GTC AAA GAA TTG GTC TTT TG 3' 5' TGG AAG TTG GGG ATC ATT GCC 3'

a.4. PCR de séquençage

Le séquençage de l'ADN se fait selon la méthode de Sanger. Après purification des amplicons, une ultime PCR faisant appel à une seule amorce (amorces utilisées pour l'amplification *Tab. 5*), permet d'amplifier et de lire des fragments d'ADN simple brin.

Tableau 5 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées lors de la PCR de séquençage

Amorces utilisées	Séquences nucléotidiques
455 sens 696 sens	5' CAA GGT ATG TTG CCC GTT T 3' 5' TCA GTG GTT CGT AGG GCT TTC C 3'
979 antisens RV2 antisens	5' ATT GGA AAG TAT GTC AAA GAA TTG GTC TTT TG 3' 5' TGG AAG TTG GGG ATC ATT GCC 3'

Le mélange réactionnel BigDyeTerminator® contient (entre autres) des di-désoxyribonucléotides (ddNTP) marqués selon la base par un fluorochrome différent, en plus des désoxyribonucléotides (dNTP) et d'une Taq polymérase. La polymérase peut ainsi incorporer de manière aléatoire un ddNTP ou un dNTP. L'incorporation d'un

ddNTP aboutit à un arrêt de la synthèse, ces nucléotides n'étant pas capables, en l'absence du groupement hydroxyle sur leur carbone 3, de former des liaisons phospho-diesther avec d'autres.

En fin de réaction, le milieu réactionnel contient l'ensemble des amplicons néo-synthétisés possibles, de toutes tailles. Ces molécules sont dénaturées et analysées en électrophorèse. La séquence nucléotidique de ces fragments simple brin, pourra alors être reconstituée, après purification par précipitation dans l'éthanol à froid, par séquençage automatique sur séquenceur ABI-3100® (Applied Biosystems®, France). Les séquences obtenues sont alignées sur la séquence de référence et analysées sur ABI Prism® SeqScape®Software 2.X.

b. La recherche de sites sanctuaires du VHB

Les PBMC ont été décrits comme constituant un site potentiel de persistance du VHB, sous forme d'ADNccc. Ceux-ci sont recherchés après recueil du sang total sur tube EDTA ; les cellules nucléées du sang total sont lavées et culotées conformément à la procédure portée en annexe. Les cellules mononucléées sont purifiées et les contaminants sériques éliminés, après trypsination, par lavages au PBS - sérum de veau fœtal 5% (SVF). L'ADN viral, potentiellement présent dans les PBMC, est extrait sur colonne de silice et l'ADN-VHB est amplifié et séquencé, selon la technique décrite pour l'ADN sérique du VHB.

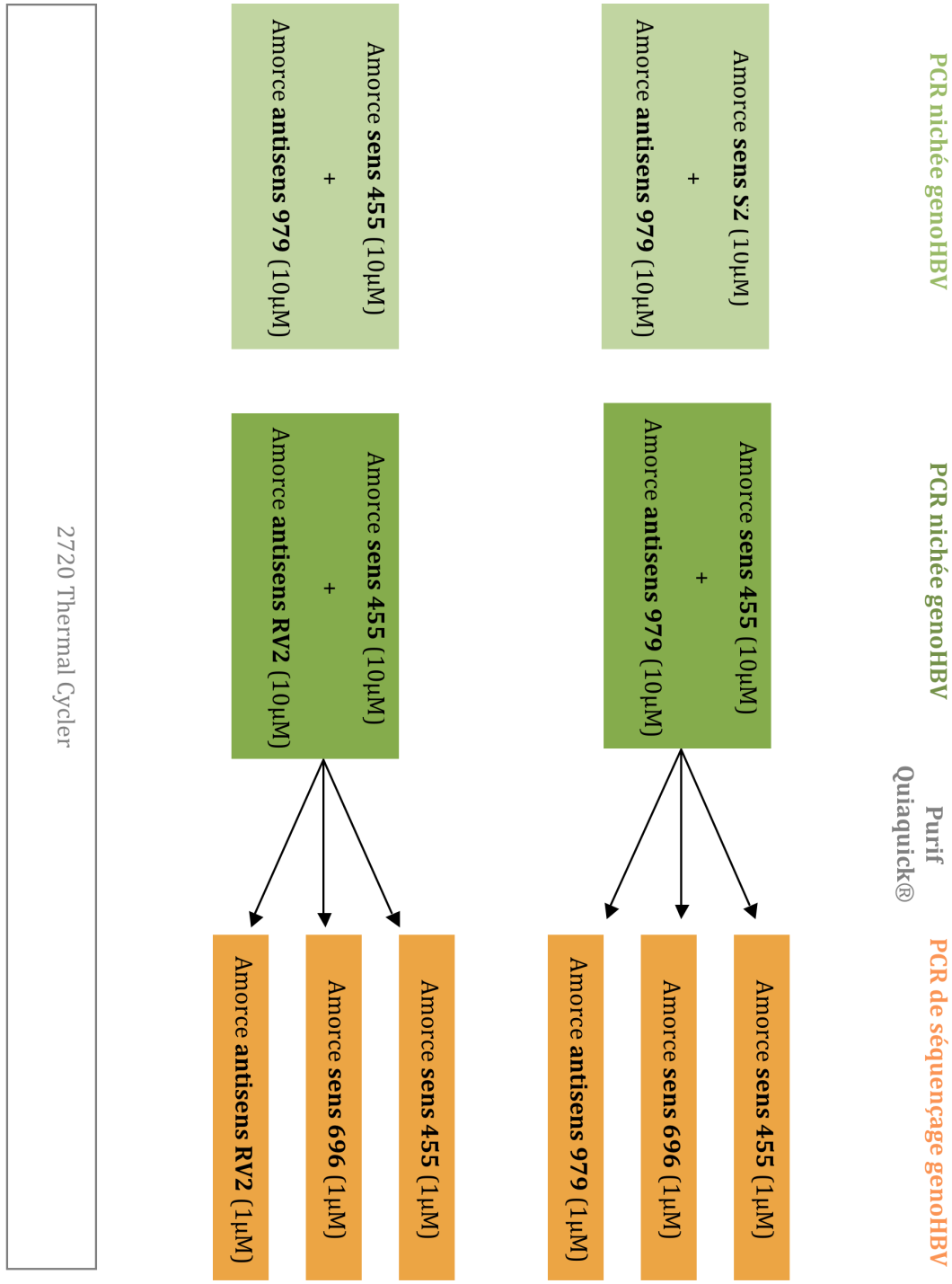

Figure 34 : Schéma réactionnel de la technique de génotypage du virus de l'hépatite B

2 Résultats

2.1 La cohorte nancéienne

Entre octobre 2007 et mai 2008, 383 patients séropositifs pour le VIH, suivis en consultation de Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Nancy, ont été inclus (383/780 patients). L'ensemble des patients ayant consulté durant la période d'inclusion ayant été retenu pour l'étude, la cohorte décrite était représentative de la population séropositive pour le VIH, suivie au CHU de Nancy (caractéristiques démographiques, statut virologique et immunitaire).

2.1.1 Prévalence de l'infection par le VHB

A l'inclusion, un recueil de données cliniques fut réalisé par le clinicien et un bilan sérologique complet pour les hépatites virales chroniques B et C prescrit. La cohorte étudiée présentait un âge médian de 46 ans (7 à 78 ans) et un sexe ratio de 2,58 (masculin/féminin). L'évolution de l'hépatite B étant largement conditionnée par l'âge de survenu du contage, il semblait intéressant de recueillir des données concernant l'origine ethnique de la population suivie dans cette consultation. Le recueil de ces données avait permis de noter, que 20% de la population étudiée était originaire de régions à forte prévalence de portage de l'AgHBs. Nous nous sommes donc attachés à étudier l'influence de l'origine ethnique, sur le profil sérologique des patients VIH ⊕ *(Tab. 6)*. Comme on pouvait s'y attendre, alors que 60% des patients européens n'avaient pas rencontré le VHB, 70% des patients originaires d'Afrique avaient subi un contage par le VHB.

Tableau 6 : Profils sérologiques et prévalence de l'infection à VHB selon l'origine ethnique

	Hépatite chronique	Patient vacciné	Hépatite ancienne	Profil HBc isolé	Patients VHB séronégatif
Afrique	5,8 %	1,9 %	38,5 %	26,9 %	26,9 %
Asie	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3
Europe	5,3 %	15,9 %	25,6 %	8,2 %	44,0 %

Cette cohorte nancéienne était constituée de patients, dont le diagnostic de l'infection par le VIH, remontait à une ancienneté médiane de 12 ans. Une large majorité (88%) des patients pris en charge recevait un traitement HAART et présentaient, pour 65% d'entre eux, une CV-VIH non détectable (< 1,6 log soit 40 copies/mL) *(Tab. 7)*. Parmi les patients dont l'infection à VIH avait nécessité une mise sous traitement, 85% recevaient une molécule antirétrovirale décrite comme étant dotée d'une activité anti-VHB (soit 75% de la cohorte).

Tableau 7 : Description de la cohorte nancéienne de 383 patients séropositifs pour le VIH lors de leur inclusion dans l'étude.

Population		383 patients
Age median (min-max)		46 (7 – 78)
Sex ratio (homme/femme)		2.58
Origine géographique		
Européens (%)		302 (80%)
Africains (%)		74 (19%)
Autres (%)		7 (1%)
Nb d'années médian depuis le diagnostic VIH		12 (1 – 25)
Charge virale VIH, mediane log_{10} UI/ml (min-max)		0,53 (<1.07– 8.37)
Patients sous HAART (%)		336 (87.7%)
Patients sous HAART à activité anti-VHB (%)		288 (75.2%)
CD4, mediant cellules/mm^3 (min-max)		461 (4 – 1522)
distribution CD4 cellules/mm^3	0-199	48 (4-199)
	200-349	89 (204-398)
	350-499	108 (250-495)
	≥ 500	138 (193-1522)

Les molécules anti-VHB prescrites étaient exclusivement des analogues nucléos(t)idiques, dotés d'une double activité anti VIH-VHB. La lamivudine était de loin la molécule la plus prescrite (180 /288, 62%) au sein de cette cohorte de patients, co-infectés ou non, suivi par l'association ténofovir-emtricitabine (95/288, 33%), notamment prescrite chez le patient présentant une résistance, documentée ou non, à la lamivudine.

La mesure du taux de lymphocytes T CD4⊕ a permis d'estimer le statut immunitaire de la cohorte, la numération médiane observée à l'inclusion était de 461 lymphocytes T CD4⊕/mm^3 ; 64% des patients présentaient un statut immunitaire relativement préservé et une numération supérieure à 350 cellules/mm^3. Les caractéristiques des patients de la cohorte lors de leur inclusion sont résumées ci-dessous *(Tab. 7)*.

Les investigations sérologiques, menées chez les 383 patients inclus, mirent en évidence la positivité d'au moins un marqueur VHB chez 227 patients (59%), dont 55 ne présentaient que des Ac anti-HBs (vaccinaux), à un taux protecteur supérieur à 10 UI/mL. Alors qu'une cicatrice sérologique de contage par le VHB était retrouvée chez 39% (151/383) des patients *(Tab. 8)*.

a. Les patients AgHBs positifs *(Tab. 8)*

A l'inclusion, 5% (18/383) des patients étaient co-infectés et présentaient une antigénémie HBs. A l'exception d'une patiente, les patients AgHBs ⊕ présentaient des Ac anti-HBc détectables. Neuf d'entre eux, dont la patiente Ac anti-HBc ⊖, présentaient une CV-VHB détectable par PCR temps réel (m2000sp). Parmi ces neuf patients, six étaient également positifs pour l'AgHBe et présentaient une infection à VHB réplicative, qualifiée d'hépatite B chronique active.

Tableau 8 : Caractéristiques biologiques et cliniques des patients infectés par le VIH selon leur profil sérologique pour le VHB

	HBs Ag ⊕		HBs Ag ⊖		Aucun marqueur VHB	Anti-HBs ⊕
	Anti-HBc ⊕ Anti-HBs ⊖	Anti-HBc ⊖ Anti-HBs ⊖	Anti-HBc ⊕ Anti-HBs ⊕	Anti-HBc ⊕ Anti-HBs ⊖		
Nombre	17	1	105	48	157	55
Age moyen (min-max)	48 (29 - 72)	54	47 (21 - 75)	45 (27 - 56)	46 (18 - 78)	42 (7 - 77)
Sex ratio (homme/femme)	7.5	0	2.5	0.9	2.8	3.5
Européens (302)	15	0	76	27	136	48
Africains (74)	2	1	28	19	20	4
Autres (7)	0	0	1	2	1	3
CD4 cellules/ mm^3 moyen (min-max)	487 (115 - 1246)	275	472 (39 - 1320)	458 (39 - 1262)	435 (4 - 1520)	496 (188 - 1522)
Nombre de patients avec CD4 < 350 cellules/ mm^3	7	1	30	20	61	18
ADN-VHB positif (molécule anti-VHB)	8[a] (6)	1	0	2[b] (0)	1(1)	0
ADN-VHB étendue (log_{10} UI/mL)	ND - 8.37	1.37	/	ND - 2.46	ND - détectable	/
AgHBe positif	5	1	0	0	0	0
Patients traits par HAART	17 (100%)	1 (100%)	92 (87%)	45 (93%)	137 (87%)	44 (80%)
Molecule anti-VHB	15	1	79 (75%)	43 (90%)	112 (71%)	38 (69%)
Lamivudine	1	0	54	26	77	22
Tenofovir	0	0	0	0	2	1
Tenofovir + lamivudine	1	1	1	2	3	2
Tenofovir + emtricitabine	13	0	24	15	30	13
Anticorps anti-VHC	2 (12%)	0	16 (15%)	16 (33%)	14 (9%)	2 (3.6%)
Charge virale VHC positive	0	0	6	8	6	2

ND: non détectable; a: dont le patient 1; b: dont le patient 2; [#]ADN-VHB seuil : 1 à 9 log_{10} copies/mL
HAART : Highly active antiretroviral therapy;

L'ensemble des patients positifs pour l'AgHBs était traité par HAART et 16 sur 18 bénéficiaient d'une thérapeutique active sur le VHB. Les patients de ce groupe, ne recevant pas de molécule anti-VHB, avaient une CV détectable. Sur les neuf patients chez lesquels de l'ADN-VHB sérique était détecté, sept bénéficiaient donc d'un traitement anti-VHB, six recevaient du ténofovir, le dernier de la lamivudine. Les patients traités pour l'infection à VHB avaient une CV faible (< 2,4 log_{10} UI/mL) mis à part un patient qui présentait une CV-VHB très élevée (8,9 log_{10} copies/mL ou 8,37 log_{10} UI/mL) sous une HAART, incluant de la lamivudine à l'inclusion.

b. Les patients AgHBs négatifs *(Tab. 8)*

Parmi les 365 patients négatifs pour l'AgHBs, 29% (105/365) présentaient un profil d'hépatite B résolutive avec Ac anti-HBc et anti-HBs ⊕, tous avaient une CV non détectable, mais 75% recevaient un traitement à activité anti-VHB.

De même chez les 55 patients présentant un profil vaccinal, 69% recevaient un traitement potentiellement actif sur le VHB et aucun ADN-VHB sérique n'était détecté.

Mais 48 patients (12%) présentaient un core isolé (Ac anti-HBc isolé), donc une infection à VHB susceptible de se réactiver lors d'une défaillance immunitaire. Chez ces patients, dont 90% recevaient une molécule active sur le VHB, deux parmi les cinq ne bénéficiant pas d'anti-VHB, avaient une CV sérique détectable et présentaient une hépatite B occulte.

Enfin la détection d'ADN-VHB, chez une patiente sous lamivudine, du groupe des 157 patients ne présentant aucun marqueur sérique VHB, fut confirmée par différentes techniques de PCR en temps réel.

La prévalence de l'infection occulte par le VHB dans cette cohorte nancéienne était donc de 0,8% (3/383).

2.1.2 Prévalence de l'infection par le VHC

Treize pourcent des patients de la cohorte présentaient une sérologie anti-VHC positive, synonyme d'un contage par le VHC. Mais aucun patient de la cohorte présentant une hépatite B chronique, ne présentait une CV-VHC détectable. Vingt-deux patients AgHBs ⊖ avaient une CV-VHC, dont 16% (8/48) des patients présentant un core isolé pour le VHB *(Tab. 8)*.

2.1.3 Génotypage du virus de l'hépatite B

Seuls sept patients, sur les 12 présentant une CV-VHB détectable, avaient une CV suffisante pour procéder au séquençage de la région Pré-S2/S (> 100 UI/mL). L'analyse phylogénétique des séquences obtenues avait permis de génotyper les sept souches, dont trois appartiennaient au génotype E (dont le Patient 1) et quatre au génotype A (dont les Patients 2 et 3).

Les génotypages, réalisés lors de l'inclusion, ne permirent pas de mettre en évidence de mutations de résistance *(Fig. 35)*, bien que trois des sept patients génotypés soient sous traitement anti-VHB à l'inclusion et présentaient des charges virales persistantes sous traitement (dont le patient 3), malgré une bonne compliance, objectivée par des CV-VIH non détectables.

Position	VHB complete genome	gène S	gène P	Patient 1 genoE	Patient 2 genoA		Patient 3 genoA - 2008		Patient 4 genoE		Patient 5 genoE		Patient 6 genoA		Patient 7 genoA		Lamivudine	Adéfovir	Entecavir	Tenofovir
367	T				T		T		C		C		T		T					
368	T		P428		T	L	T	L	T	L	T	L	T	L	T	L	L80V/I			
369	A	SHBs72			A		A		A		A		A		A					
379	G				G		G		G		G		G		G					
380	T		P432		T	V	T	V	T	V	T	V	T	V	T	V		V84M		
381	G	SHBs76			G		G		G		G		G		G					
634	A			A	A		A		A		A		A		A					
635	T		P517	T	T	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T	I			I169T	
636	A	SHBs161		T	A		A		T		T		A		A					
646	G			G	G		k		G		G		G		G					
647	T		P521	T	T	V	T	VL	T	V	T	V	T	V	T	V	V173L			
648	G	SHBs165		G	G		G		G		G		G		G					
667	T			C	T		A		C		T		T		C					
668	T		P528	T	T	L	w	LM	T	L	T	L	T	L	T	L	L180M			
669	G	SHBs172		G	G		G		G		G		G		G					
670	G			G	G		G		G		G		G		G					
671	C		P529	C	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	A181T/V	A181T/V		
672	T	SHBs173		T	T		T		T		T		T		T					
679	A			A	A		A		A		A		A		A					
680	C		P532	C	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T			S184G	
681	T	SHBs176		T	T		T		T		T		T		T					
709	G			G	G		G		G		G		G		G					
710	C		P542	C	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A				A194T
711	T	SHBs186		T	T		T		T		T		T		T					
733	A			A	A		A		A		A		A		A					
734	G		P550	G	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S			S202I/G	
735	C	SHBs194		T	C		C		T		T		C		C					
736	T			T	T		T		T		T		T		T					
737	A		P551	A	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	A	Y	Y			
738	T	SHBs195		T	T		T		T		T		T		T					
739	A			A	A		A		A		A		A		A					
740	T		P552	T	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	M204V/I/S			
741	G	SHBs196		G	G		G		G		G		G		G					
742	G			G	G		G		G		G		G		G					
743	A		P553	A	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	D			
744	T	SHBs197		T	T		T		T		T		T		T					
745	G			G	G		G		G		G		G		G					
746	A		P554	A	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	D			
747	T	SHBs198		T	T		T		T		T		T		T					
769	G			G	G		G		G		G		G		G					
770	T		P562	T	T	V	T	V	T	V	T	V	T	V	T	V		V214A		
771	A	SHBs206		A	A		A		A		A		A		A					
772	C			C	C		C		C		C		C		C					
773	A		P563	A	A	Q	A	Q	A	Q	A	Q	A	Q	A	Q		Q215S		
774	G	SHBs207		A	G		G		A		A		G		G					
835	A			A	A		A		A		A		A		A					
836	A		P584	A	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N		236T		
837	C			T	C		C		T		T		C		C					
877	A			A	A		A		A		A		A		A					
878	T		P598	T	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M			M250V	
879	G			G	G		G		G		G		G		G					

Figure 35 : Génotype et mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques dans une cohorte nancéienne de patients co-infectés AgHBs ⊕ ou porteur d'hépatite occulte

L'analyse ciblée des séquences génomiques des sites de mutations de résistances aux analogues nucléos(t)idiques, n'avait pas permis de dépister de mutation à l'inclusion.
Néanmoins en janvier 2008, des doubles populations rtV173VL et rtL180LM sont observées en l'absence de mutation rtM204 chez le Patient 3

VII. Réactivation de l'infection VHB chez le patient co-infecté

1 *Descriptions de cas*

Lors de l'étude menée sur une cohorte de patients séropositifs pour le VIH, des cas de réactivation d'infection par le VHB ont été décrits, au décours d'une modulation de l'HAART.

1.1 Patient 1

Un premier cas de réactivation fut observé, chez une patiente d'origine africaine, âgée de 25 ans. Suite au diagnostic d'une infection par le VIH (sous type non-B), posé au Burkina-Faso en 2003, Madame M. faisait l'objet d'un suivi en consultation de Maladies Infectieuses et Tropicales, depuis son arrivée en France. En septembre 2004, un traitement de première ligne par stavudine (antirétroviral, inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (NRTI) commercialisé sous le nom de Zerit®), lamivudine et efavirenz (antirétroviral, analogue non-nucléosidique, inhibiteur de la transcriptase inverse (nNRTI) utilisé pour le traitement de l'infection par le VIH, commercialisé sous le nom de Sustiva®) avait été initié. Un défaut de compliance ayant conduit à une rechute virologique, le traitement avait du être adapté (stavudine, lamivudine, lopinavir/ritonavir : antirétroviraux, inhibiteurs de protéase (IP), Kaletra®). A son arrivée en France en juillet 2007, son statut VHB n'était pas connu. Le 25 juillet 2007, le génotypage VIH prouva l'émergence d'une résistance, que laissait craindre la CV-VIH à 4,15 $\log_{10}$ UI/mL. Un décompte des CD4 à 220 cellules/mm^3, confirma la rechute immuno-virologique. Dans ce contexte, le premier bilan sérologique d'infection par le VHB mit en évidence la persistance isolée d'Ac anti-HBc. Devant ce profil sérologique la CV-VHB pratiquée, ne détecta pas d'ADN-VHB. Après analyse du profil génotypique de résistance du VIH, le traitement fut adapté en août 2007 et associait ténofovir/emtricitabine au T20 (enfuvirtide, inhibiteur de fusion du VIH), toujours complété par du Kaletra®. Lors de son inclusion, en janvier 2008, sous la pression de sélection imposée par le traitement, on avait observé la sélection de nouvelles mutations, conférant à la souche VIH majoritaire une résistance supplémentaire à la lamivudine, l'emtricitabine et le ténofovir.

La souche, hébergée par la patiente, présentait dès lors, un profil de résistance à l'ensemble des antirétroviraux à l'exception de l'etravirine (nNRTI, ou TMC-125 ou Intelence®), le lopinavir, le darunavir (antirétroviral, IP, ou Prezista®) et le raltégravir (inhibiteur de l'intégrase du VIH (II) ou Isentress®). La décision de « switcher » pour une HAART intégrant le raltégravir, l'etravirine associés au darunavir (boosté par ritonavir), avait alors permis d'obtenir une réponse virologique VIH soutenue. En juin 2008, six mois après l'instauration du nouveau traitement et l'arrêt de la combinaison ténofovir-emtricitabine, la patiente présenta des signes cliniques d'hépatite (sans étiologie médicamenteuse ou alcoolique retrouvée). Le 12 juin 2008, un bilan hépatique montra une élévation du taux des transaminases hépatiques, confirmant biologiquement la cytolyse hépatique (alanine amino-transférase : 868 UI/L et aspartate amino-transférase : 1495 UI/L). Les investigations virologiques menées le 19 juin, détectaient un AgHBs ⊕ et la CV-VHB, initialement indétectable, atteignait 8,3 $\log_{10}$ UI/mL *(Fig. 37)*. L'analyse rétrospective, d'un sérum prélevé en consultation de Maladies Infectieuses et Tropicales le 20 mars 2008, montra une CV-VHB quantifiée à 2,3 $\log_{10}$ UI/mL, prémice d'une réactivation, associée à un AgHBs ⊖. L'association ténofovir-emtricitabine réintroduite dans l'HAART, dès le 19 juin 2008, avait permis une négativation de la CV-VHB et de l'AgHBs après deux mois *(Fig. 37)*. Dès le 27 juin, les Ac anti-HBs détectables signaient la résolution de l'épisode de réactivation. Le génotypage, réalisé en juin 2008, avait caractérisé le génotype E, de la souche majoritairement exprimée, aucunes mutations de résistance aux analogues nucléosidiques, décrites à ce jour, n'avait été retrouvées.

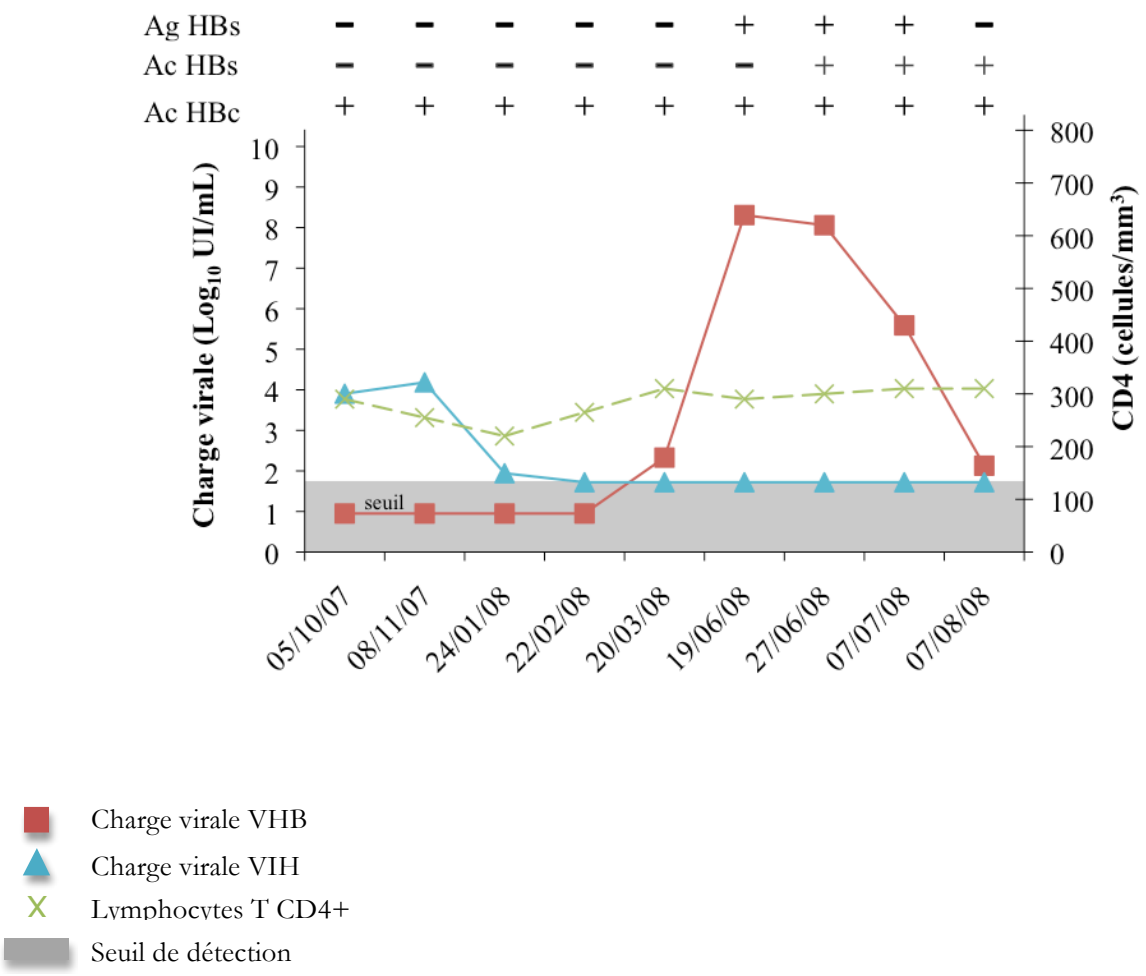

Figure 36 : Patient 1; suivi sérologique VHB et contrôle de l'infection VIH lors de la réactivation virale VHB chez le patient co-infecté sous HAART

1.2 Patient 2

Monsieur C., patient âgé de 42 ans, était suivi en consultation de Maladies Infectieuses et Tropicales, depuis le dépistage de son infection par le VIH (sous-type B) en 1992. En septembre 2006, Monsieur C. présentait une cicatrice sérologique d'hépatite B ancienne résolutive, associant Ac anti-HBc et Ac protecteurs anti-HBs (> 10 mUI/mL). Après de multiples lignes de traitement depuis 1995, le patient connu comme peu compliant, était traité par trithérapie de didanosine (antirétroviral INTI ou Videx®), stavudine et lopinavir. Depuis novembre 2006 et la perte des Ac anti-HBs, un traitement intégrant la lamivudine, associée au fosamprenavir (IP), boosté par ritonavir, abacavir (INTI) et le T20 avait été initié. Mais suite à une rechute virologique de l'infection par le VIH (4,65 $\log_{10}$ copies/mL), une nouvelle ligne de traitement fut initiée, tenant compte du génotypage VIH réalisé en septembre 2007, qui montrait une résistance aux analogues

nucléosidiques. Celle-ci consistait donc en une association de darunavir boosté par le ritonavir, etravirine et raltegravir, dénuée d'activité anti-VHB. En octobre 2007, après un mois d'interruption de la lamivudine, on mesurait d'emblée une élévation de la CV-VHB (2,5 $\log_{10}$ UI/mL), qui atteignait 3,5 $\log_{10}$ UI/mL en novembre *(Fig. 38)*. Aucune élévation des taux de transaminases n'avait été mise en évidence, malgré la réplication marquée du VHB.

L'adaptation thérapeutique de septembre 2007, a permis d'atteindre rapidement une réponse virologique VIH soutenue sous HAART. La négativation de la CV-VIH dès octobre 2007 avait permis une restauration immunitaire suffisante, pour inhiber la réplication du VHB dès décembre, sans avoir nécessité l'introduction d'une molécule anti-VHB *(Fig. 38)*.

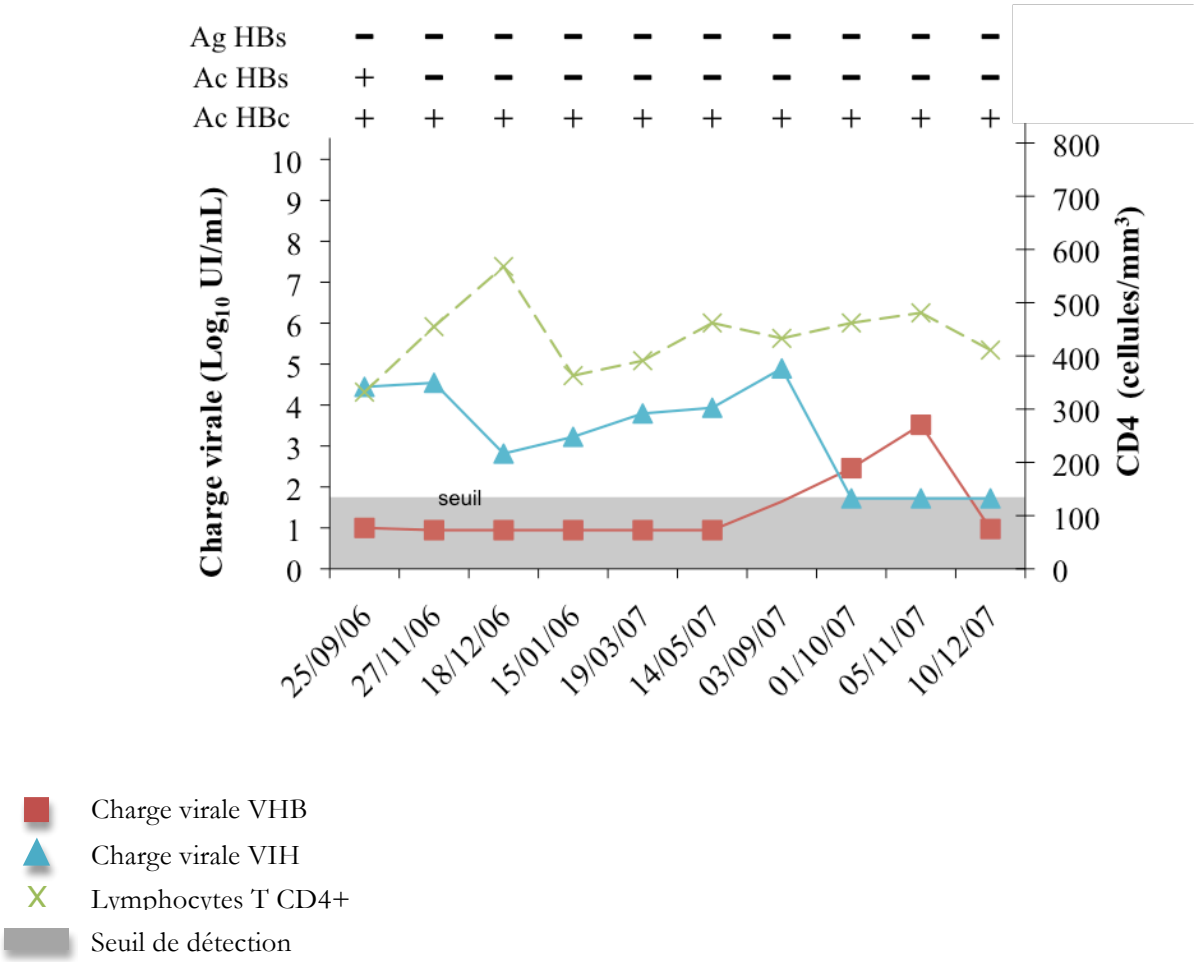

Figure 37 : Patient 2 ; suivi sérologique VHB et contrôle de l'infection VIH lors de la réactivation virale VHB chez le patient co-infecté sous HAART

1.3 Patient 3

Lors de son dépistage en 1987, Monsieur B. présentait une sérologie VIH positive, ainsi qu'un profil sérologique VHB évocateur d'une hépatite chronique. Actuellement âgé de 54 ans et après de multiples lignes de traitement, Monsieur B. présente une infection VIH contrôlée et une hépatite B chronique active (AgHBs ⊕ et AgHBe ⊕), en voie de résolution sous ténofovir. En mars 2006, Monsieur B. présentait une CV-VHB très importante, de l'ordre de 8,5 $\log_{10}$ UI/mL ; après arrêt de la combinaison zidovudine, lamivudine (Combivir®), efavirenz (Sustiva®), en raison de l'apparition d'une « toxicité hépatique », le ténofovir associé à l'emtricitabine (Truvada®) avait été introduit, en lieu et place du Combivir®. La négativation de la CV-VHB ne fut obtenue qu'en septembre 2009, après plus de trois ans de traitement.

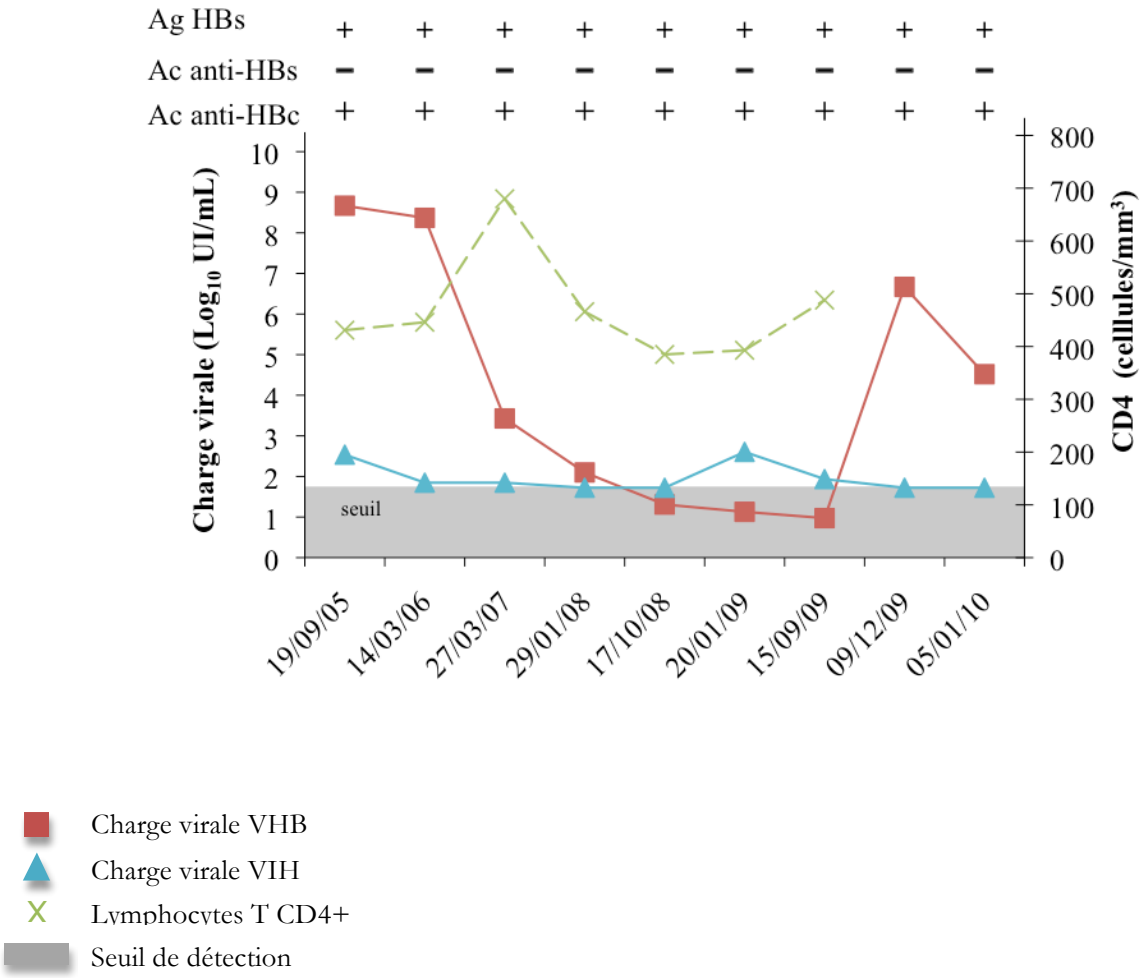

Figure 38 : Patient 3 ; suivi sérologique VHB et contrôle de l'infection VIH lors de la réactivation virale VHB chez le patient co-infecté sous HAART

Un premier génotypage du VHB, réalisé au laboratoire sur un prélèvement sérique de janvier 2008, alors que la souche majoritaire s'exprimait sous la pression de sélection du ténofovir, n'avait pu mettre en évidence de mutations de résistance. En septembre 2009, un défaut de tolérance au traitement amena le clinicien, à opter pour une modification de la combinaison antirétrovirale. Ainsi, après étude du génotype de résistance du VIH, le patient fut placé sous une trithérapie, associant de nouveau la lamivudine (Combivir®) et l'étravirine (Intelence®), sans que soit prise en compte la forte CV-VHB présentée sous Combivir®, lors d'une précédente phase de traitement. En décembre 2009, malgré l'efficacité persistante de l'HAART, le patient ressent une altération de son état général, faisant craindre une rechute de son infection hépatique chronique. Les transaminases étaient très augmentées et la recherche d'ADN-VHB sérique montrait une CV de 6,5 $\log_{10}$ UI/mL, du même ordre que celle précédemment relevée sous lamivudine *(Fig. 39)*. La réalisation d'un second génotypage, effectué cette fois sous pression de sélection de la lamivudine mettait en évidence l'expression d'une souche majoritaire possédant des mutations incriminées dans la résistante à la lamivudine (et l'emtricitabine) en position M204V et L180M *(Tab. 9 – Fig. 39)*.

Tableau 9 : Pression de sélection et mutations de résistance

Date	Traitement	CV-VIH (copies/mL)	CV-VHB (copies/mL)	Génotypage VHB
14 mars 2006	Combivir, Sustiva	40	8,9 $\log_{10}$	_
29 janv 2008	Truvada, Sustiva	<40	2,63 log10	Absence de mutation
15 sept 2009	Truvada, Sustiva	<40	détectable	_
9 dec 2009	Combivir, Intelence	<40	7,2 $\log_{10}$	M204V et L180M

L'étude comparative des séquences génomiques *(Fig. 40)*, confirma des variations entre des souches majoritaires séquencées en 2008, sous pression de sélection du ténofovir après une première exposition à la lamivudine, et des souches sous pression de sélection de la lamivudine en janvier 2010. Sous ténofovir, une double population rt173 et rt180, en l'absence de mutation M rt204, était observée ; celle-ci ne s'exprimant qu'en janvier 2010, après réintroduction de la lamivudine.

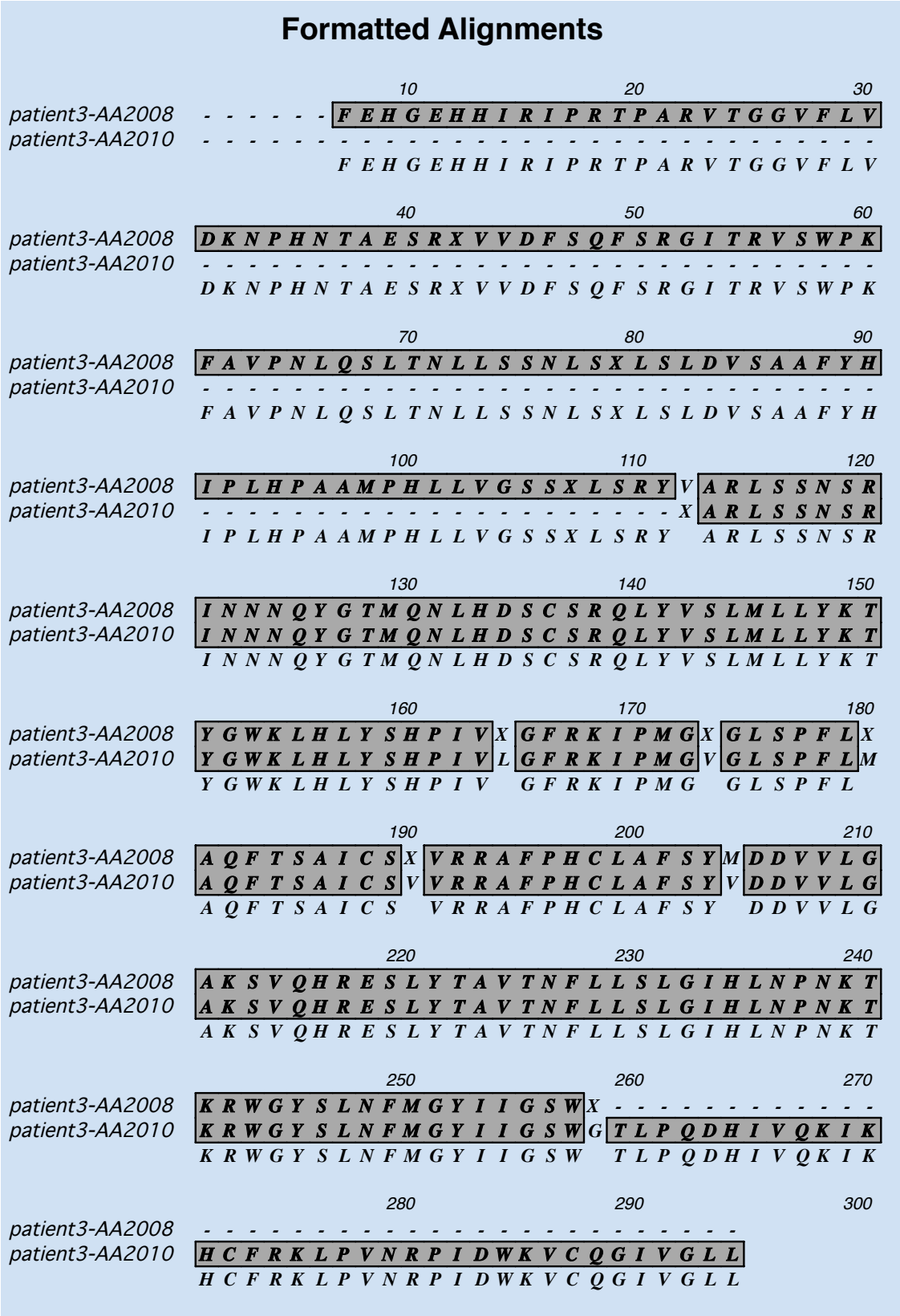

Figure 39 : Alignement comparatif des séquences génomiques des souches majoritaires du Patient 3 en 2008 sous pression de sélection du ténofovir et 2010 sous pression de sélection de la lamivudine

2 Discussion

L'étude d'une cohorte nancéienne de patients infectés par le VIH, a permis de détecter la présence d'ADN-VHB chez 12 patients co-infectés par le VHB. Parmi ces patients, trois avaient un profil VHB dépourvu d'AgBHs détectable et présentaient donc une hépatite qualifiée d'occulte. Chez un de ces patients, comme le décrit Hofer *et al.* dans 20% des hépatites occultes, l'ADN-VHB constituait de façon intermittente, le seul marqueur de l'infection (Hofer *et al.*, 1998) ; tandis que les deux autres patients présentaient un profil sérologique « core isolé », typique de l'infection occulte. La prévalence de l'infection occulte dans la cohorte nancéienne était donc de 0,8% (3/383). La prévalence observée était du même ordre que celle rapportée au sein de la cohorte Aquitaine (0,6%), ou d'une cohorte ANRS française de patients VIH (1,4%)(Neau *et al.*, 2005; Piroth *et al.*, 2008), mais inférieure à celle de cohorte de patients naïfs de traitement antirétroviral (4,7%) (Cohen Stuart *et al.*, 2009). La faible prévalence d'infection occulte, dans notre population VIH nancéienne, serait donc liée à la forte proportion de patients sous HAART présentant une activité anti-VHB. En effet, une très large majorité des patients de la cohorte, dont 89% des patients AgHBs ⊕, 90% des patients « core isolé » et 69% des patients vaccinés, recevaient une molécule anti-VHB au sein de leur HAART. La lamivudine représentait les 2/3 des prescriptions, alors que la combinaison ténofovir-emtricitabine était choisie chez 1/3 des patients, quelque soit leur profil sérologique, mis à part les patients AgHBs ⊕. Dans cette population, le ténofovir était prescrit à 15 patients sur les 18 que comptait la cohorte ; un seul patient était sous lamivudine lors de l'inclusion et présentait une CV détectable (génotypage non réalisable).

Tableau 10 : Patients présentant une charge virale VHB détectable : profil sérologique et traitement

Profil sérologique VHB		AgHBs⊕/ AcHBc⊕ (17)		AgHBs⊖/AcHBc⊕ (153)	
Traitement anti-VHB	Lamivudine	6/15 40%	1/1	0/122	0/80
	Ténofovir		5/15 33%		0/42
Sans traitement anti-VHB		2/2		2/31 – 6,4%	

La taille des populations étudiées n'étant pas suffisantes, on ne notait pas de différence significative, dans l'impact des différentes molécules anti-VHB, sur la négativation des CV des patients AgHBs ⊕ ou « core isolé » *(Tab. 10)* ; on observait néanmoins, que même si le ténofovir était préféré à la lamivudine chez le patient AgHBs ⊕, celle-ci était maintenue chez les patients « core isolé » et ne serait impliquée dans aucun cas d'hépatite occulte (sur 79 patients). Enfin, il est important de noter l'apport des molécules anti-VHB chez ces patients à risque élevé de réactivation du VHB ; en effet, deux hépatites occultes sur les trois mises en évidence durant l'étude (manque d'observance évoqué dans le troisième cas), étaient observées chez des patients ne recevant aucun traitement VHB efficace ; de plus, l'ensemble des patients AgHBs ⊕ ne recevant aucun traitement à activité anti-VHB, présentait une CV-VHB détectable.

Parmi les douze patients porteurs chroniques d'AgHBs et co-infectés par le VIH, huit présentaient une CV persistante, alors que six recevaient un traitement anti-VHB initié il y a 25 mois en moyenne (1 à 60 mois), ce qui était comparable à ce que décrivaient des études antérieures (Bani-Sadr *et al.*, 2004; Stephan *et al.*, 2005). Chez ces patients, la réponse virologique soutenue pour le VIH permettait d'exclure tout problème d'observance. De plus, la réalisation du génotypage à la recherche de mutations de résistance (CV > 100 copies/mL ou 29,4 UI/mL), n'ayant permis de déceler aucune des mutations décrites comme impliquées dans des phénomènes de résistance, la réponse incomplète au traitement anti-VHB reste inexpliquée, mais pourrait être liée aux perturbations immunitaires induites par le VIH.

A l'inclusion dans l'étude, 13% des patients VIH de la cohorte nancéienne présentaient une cicatrice sérologique de comptage par le VHC, ce taux était relativement plus faible que ceux observés par d'autres auteurs (Hofer *et al.*, 1998; Nunez *et al.*, 2002). Cependant, les pratiques à risques de notre cohorte n'étant pas étudiées, on peut difficilement trancher sur l'implication de mode de transmission croisée des infections VIH, VHB et VHC, au sein de la population étudiée. Néanmoins, les co-infections VIH-VHB étant plus représentées que la co-infection VIH-VHC, on peut émettre l'hypothèse que la transmission ait été majoritairement sexuelle. Par ailleur, 22 patients AgHBs ⊖ présentaient une CV-VHC, dont 16% (8/48) des patients « core isolé », alors que, surement du fait de phénomènes de compétition intervenant entre les réplications virales des virus à tropisme hépatique, aucune hépatite C active n'était mise en évidence chez les patients AgHBs ⊕. En revanche, comme le décrit Nebbia (Nebbia *et al.*, 2007), on ne

notait aucune différence de statut VHC, entre les patients présentant une hépatite occulte et les autres patients « core isolé ».

La généralisation des HAART, incluant notamment des molécules ayant fait la preuve d'une double activité anti-VIH et anti-VHB, permet chez une majorité de patients d'atteindre une réponse virologique et une suppression prolongée de la réplication VHB (Benhamou, 2007). L'expérience a montré, qu'une interruption thérapeutique de ces molécules était propice à la réactivation d'une hépatite B, chez le patient co-infecté (AgHBs ⊕ ou core isolé) (Chamorro *et al.*, 2005). Ces réactivations sont tout particulièrement à craindre lors d'ajustements thérapeutiques chez le patient VIH, présentant une sérologie VHB dite « core isolé » (Clark *et al.*, 2006). Ainsi, il semble indispensable de tenir compte d'une potentielle co-infection par le VHB, chez le patient séropositif (VIH ⊕), dès le diagnostic de l'infection par le VIH. De même, le statut VHB devra être pris en compte lors de toute modulation de l'HAART, mettant en jeu une molécule active sur le VHB. Ces molécules devront être maintenues en l'absence de résistance du VHB et ce, même si une résistance VIH était documentée (en association d'une HAART efficace). De plus un monitorage étroit de la CV-VHB devra être instauré, afin de détecter toute réactivation éventuelle. En effet, au cours de notre étude, le Patient 1 « core isolé » présentait, après de multiples lignes de traitement, une souche VIH majoritaire résistante à de nombreux antirétroviraux, dont le ténofovir, la combinaison ténofovir-emtricitabine avait été supprimée, sans qu'un suivi de la charge viral VHB n'ai été entrepris ; les signes cliniques évocateurs d'une réactivation de l'hépatite B, n'étaient apparus qu'après six mois d'évolution à bas bruit. Une recherche d'ADN-VHB sur un sérum prélevé un mois après l'arrêt du traitement VHB, montrait *a posteriori* une élévation de la CV supérieure à 1 $\log_{10}$ UI/mL *(Fig. 37)*. La réintroduction de la combinaison ténofovir-emtricitabine, en association à l'HAART anti-VIH, avait permis une négativation de la CV-VHB et de l'AgHBs à deux mois, validant l'implication de cette combinaison anti-VHB dans le contrôle de l'infection VHB. Aucun génotypage n'ayant pu être réalisé lors de la primo-infection, il est impossible de trancher définitivement entre réinfection (Hino *et al.*, 2002) et réactivation, néanmoins, l'histoire de la maladie est fortement en faveur de la réactivation.

Le Patient 2 illustrait le rôle important, joué par la restauration immunitaire dans le contrôle de l'hépatite B chronique (Clark *et al.*, 2006; Manegold *et al.*, 2001) sous HAART efficace. Ce cas mettait également en évidence, la possibilité d'une réactivation de

l'infection à VHB, chez un patient VIH ⊕ présentant un profil d'hépatite B résolutive, avec séroconversion HBs. En effet, dans le cadre d'une immunodépression, la négativation des Ac anti-HBs en situation d'échappement virologique VIH, pourrait favoriser la reprise de la réplication virale du VHB, en l'absence de traitement anti-VHB. Le génotypage VHB effectué lors de la réactivation, un mois après modification de l'HAART et arrêt de la lamivudine, n'avait pas mis en évidence de mutation de résistance aux analogues nucléosidiques *(Fig. 35)*, la réactivation semblerait donc induite par une fenêtre thérapeutique en situation d'échappement immun (anti-VHB).

Le troisième cas illustrait l'émergence précoce d'une souche résistante qui, sélectionnée au décours d'une ligne de traitement antérieure, aurait persistait dans un site sanctuaire comme les PBMC *(Fig. 33)*. La persistance d'une expression minoritaire des mutations en rt173 et rt180, décrites comme n'induisant pas d'emblée de résistance à la lamivudine, mais compensant une perte de fitness engendrée par la mutation rtM204, ne s'observent théoriquement qu'en association avec celle-ci. La coexistence d'une double population *(Fig. 35)* suggère la pré-existence d'une population mutée en rt204 devenue minoritaire sous ténofovir et responsable de l'échappement sous lamivudine. En effet, en 2008 sous ténofovir, la mutation du site actif de la polymérase virale n'apportant plus d'avantage sélectif et le fitness des quasi-espèces mutées étant amoindri, seules les mutations compensatrices, moins délétères à la réplication, restaient exprimées par la souche majoritaire séquencée. Alors qu'en 2010 sous pression de sélection de la lamivudine, la mutation rtM204V constituait un avantage sélectif supérieur à celui des mutations compensatrices associées, dont seule la mutation rt180 restait exprimée par la souche majoritaire. Afin de conforter cette hypothèse, le recueil des PBMC de patients co-infectés présentant un AgHBs détectable a été entrepris et le séquençage d'éventuelles souches présentes dans les PBMC a été débuté.

La rare triple mutation de résistance à la lamivudine rt173, rt180 et rtM204V, exprimée à bas niveau et de façon séquentielle (sous ténofovir puis lamivudine) chez le Patient 3 *(Fig. 40)*, était décrite par Araujo *et al* comme impliquée dans une moindre détection de l'AgHBs en pratique courante (Araujo *et al.*, 2008). Or, la quantification de l'AgHBs en technique Abbott-Axsym® et Architect®, n'était pas mise à défaut par l'épitope muté du Patient 3. Il est donc important de compléter l'exploration de l'impact des mutations de résistance sur la détection de l'AgHBs, après clonage et expression en cellule eucaryote.

VIII. Antigène HBs et hépatite occulte

1 *Etude de l'expression de l'antigène S dans des systèmes d'expression in vitro et ex vivo construits par génie-génétique*

1.1 Matériel et méthode

1.1.1 Amplification du gène S et clonage dans le vecteur pCR4-TOPO

Après amplification (p2F – RV2), les amplicons d'environ 680 pb, issus du gène S des différentes souches, sont purifiés après migration sur gel d'agarose. Les amplicons HBs sont intégrés dans un vecteur pCR4-TOPO doté d'une activité topoisomérase dans un plasmide [pCR4-TOPO-HBs] (Invitrogen®, Cergy Pontoise, France). Les cellules chimio-compétentes Top10 *E. coli* sont transformées avec le plasmide [pCR4-TOPO-HBs]. Après induction en milieu SOC, les cellules compétentes en phase exponentielle de croissance sont cultivées sur milieu solide LBagar et sélectionnées en présence d'ampicilline (Bacto-trypton 16 g/L, Yeast-extract 5 g/L, NaCl 5 g/L, Agar agar 1,5%, Ampicilline 50 mg/mL). L'analyse des clones obtenus sur milieu sélectif est réalisée par PCR sur colonie. Après amplification faisant appel aux amorces M13forward et M13reverse, situées sur le vecteur de part et d'autre du site d'insertion, une migration sur gel d'agarose permet d'estimer la taille de l'insert et de retenir les clones transformés par le plasmide [pCR4-TOPO-HBs]. Le séquençage bidirectionnel des clones obtenus permettra de sélectionner des clones du gène S d'intérêt.

1.1.2 Echantillons

En plus de contrôles antigéniques issus des différents génotypes, la quasi-espèce hébergée par le Patient 3, dont la souche majoritaire mutée en rt173, rt180 et rtM204V est décrite comme impliquée dans une moindre détection de l'AgHBs (Araujo et al., 2008), sont clonés dans pCR4-TOPO.

1.2 Résultats

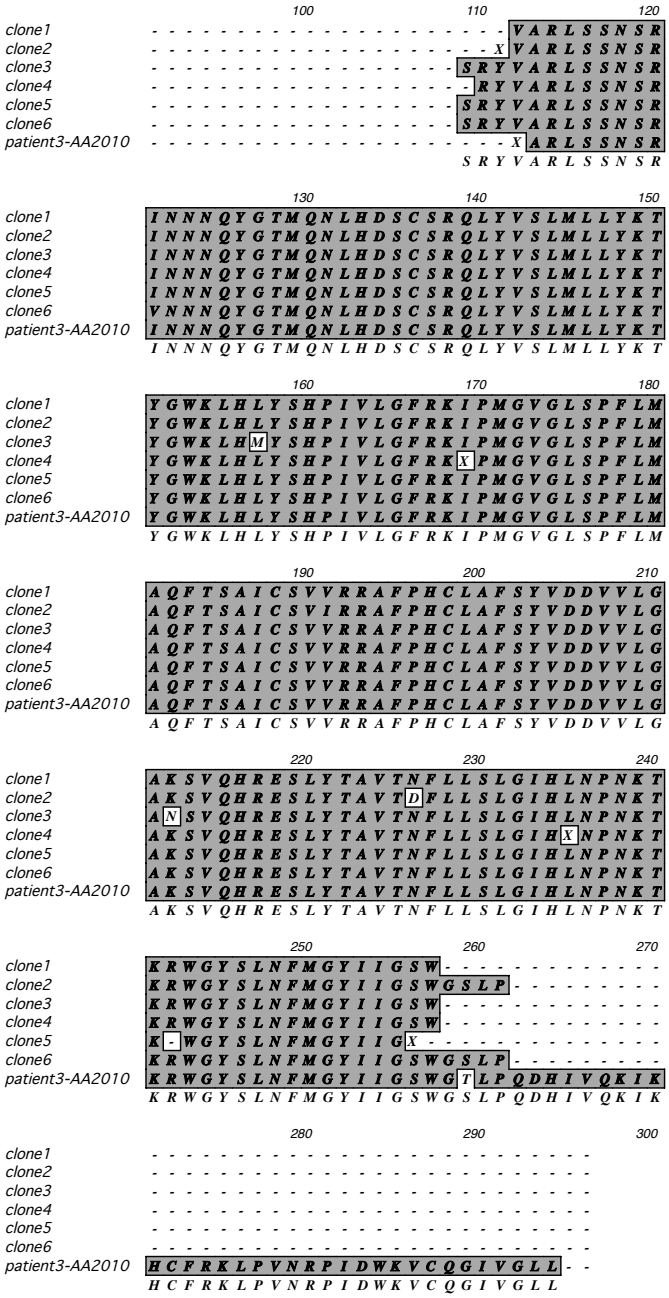

Figure 40 : Alignement comparatif des séquences génomiques des souches de la quasi-espèce VHB infectant le Patient 3 sous pression de sélection de la lamivudine (2010) clonées dans pCR4-Topo

2 *Perspectives*

2.1 Construction pcDNA3-geneS

Le vecteur pcDNA3 permet la transcription et l'expression en cellule eucaryote des plasmides produits chez la bactérie. A partir des produits clonés et séquencés dans les vecteurs TOPO, une PCR permettra l'adjonction de sites *Eco*RI et *Not*I (Invitrogen®, Cergy Pontoise, France) de part et d'autre de l'insert. Ainsi après digestion en parallèle des produits de PCR insert et du plasmide vecteur pcDNA3 par *Eco*RI et *Not*I, une ligation, (à température ambiante en tampon de ligation rapide) par la T4-DNA® ligase (Invitrogen®, Cergy Pontoise, France) permet d'obtenir le plasmide d'expression [pcDNA3-HBs]. Les clones obtenus en milieu sélectif (kanamycine) sont sélectionnés grâce à l'étude de leur profil de restriction *(BamHI ou XbaI, site unique dans le vecteur ainsi que dans l'insert, permettant de contrôler l'orientation de l'insert).* Les midi-préparations d'ADN plasmidique des clones retenus sont transfectées et le gène S transcrit en milieu eucaryote (site ATG).

2.2 Transfection de cellules Huh7 par des constructions plasmidiques exprimant l'ADN du gène S sauvage et/ou muté.

La culture des cellules Huh7 (lignée hépatocytaire humaine) est effectuée en milieu D-MEM/F-12 (Gibco®), supplémenté en SVF 10%, L-glutamine (200mM), pénicilline (100 U/ml), streptomycine (100 µg/ml), pyruvate de sodium (110 µg/ml soit 1 mM) et acides aminés non essentiels (1%). La veille de la transfection, les cellules Huh7 sont ensemencées en plaques six puits à raison de $5x10^5$ cellules par puits (incubées à 37°C sous atmosphère à 5% de CO2). Le jour de la transfection (J0), les cellules étant confluentes à 70%, après renouvellement du milieu par du milieu dépourvu de SVF, la transfection est réalisée en présence de $CaCl_2$. Différentes constructions plasmidiques d'expression du gène S, le plasmide prototype de S (adw, génotype A), ainsi que les plasmides d'expression de gène S négatif en ELISA, sont exprimés par transfection de cellule Huh7 à 1 µg/puits.

2.3 Etude de l'expression des protéines S en cellule Huh7

La transcription-traduction sera caractérisée à J3 et J6 par l'expression en culture cellulaire de la protéine antigénique S native. L'expression protéique des constructions de gènes S est comparée à la l'expression des plasmides S de patient cloné dans pcDNA3 en cellules Huh7 à J3. L'expression protéique est mise en évidence après extraction et dépôt sur gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie.

2.4 Etude de l'antigénicité des clones de protéine S versus la protéine «S prototype »

La transfection des cellules Huh7 permet l'expression des clones de protéines S dans le surnageant de culture. Les protéines S issues de l'expression en milieu eucaryote des clones de plasmides du gène S, sélectionnés après séquençage dans pCR4-TOPO, sont soumis aux tests commerciaux de détection de l'AgHBs (MEIA, Axsym®, ou CMIA; Architect®; Abbott Laboratories, Rungis, France).

En confrontant l'antigénicité de chaque protéine à sa séquence nucléotidique, on pourra mettre en évidence des mutations touchant l'épitope, ou modifiant sa conformation, impliquées dans une moindre détection de l'AgHBs.

IX. Conclusions

L'ensemble de ces observations devrait inciter cliniciens et biologistes à généraliser l'exploration virologique complète du statut VHB, lors de la prise en charge de tout nouveau patient VIH ⊕. Le bilan initial devrait ainsi inclure en première ligne une quantification de l'AgHBs, ainsi que des Ac anti-HBc et anti-HBs.

Ceci permettrait de mettre en place une vaccination anti-VHB chez les patients séronégatifs le souhaitant, afin de limiter tout risque de surinfection par le VHB ; cette mesure devrait concerner 40% des patients nouvellement diagnostiqués pour le VIH au CHU de Nancy.

Alors que les patients présentant une cicatrice de contage par le VHB feront l'objet d'un suivi (en parallèle du monitoring de leur infection VIH), intégrant un dosage de l'AgHBs, des Ac anti-HBc et Ac anti-HBs.

Enfin le patient AgHBs ⊕ (Patient 1 et 3), « core isolé » (Patient 1 et 2) ou négativant l'Ac anti-HBs (Patient 2), des mesures de la CV-VHB ainsi que de l'AgHBe et des Ac anti-HBe devront être associées.

Chez le patient ayant connu un contage par le VHB, dès lors qu'un traitement anti-VIH est instauré, il est primordial de prendre en compte le VHB lors de l'instauration de toute nouvelle ligne de traitement (Patient 3). L'objectif étant d'éviter toute fenêtre thérapeutique après instauration d'une HAART intégrant une molécule anti-VHB, il sera indispensable de recourir à un suivi régulier de la CV-VHB, afin de détecter toute émergence d'une souche résistante. Toute altération de l'état général malgré une réponse virologique VIH conservée, devra faire évoquer une réactivation VHB et devra conduire à une exploration génotypique de la souche sérique majoritaire. Le dépistage précoce de la réactivation du VHB, permettra une adaptation thérapeutique de l'HAART, basée sur les recommandations émanant de l' « European Consensus Conference on the treatment of chronic hepatitis B in HIV co-infected patients » (Alberti *et al.*, 2005).

Même si la signification clinique de l'hépatite occulte est soumise à controverse, de même que l'impact d'une CV persistante sous traitement, la mortalité étant 19 fois plus élevée chez le co-infecté versus le patient VIH (Peters, 2007) ; un suivi prospectif étendu à l'ensemble de la ligne de patient suivie en consultations de Maladies Infectieuses et

Tropicales au CHU de Nancy est souhaitable à court terme, afin de mettre en évidence à plus grande échelle de nouveaux facteurs génomiques ou immunologiques potentiellement péjoratifs et associés à une surmortalité hépatique chez le patient co-infecté.

Enfin, l'impact multiple des mutations, notamment induites sous analogues nucléos(t)idiques, sur la réplication et la résistance virales, ainsi que sur l'antigénicité HBs et le caractère occulte de l'hépatite, reste largement à explorer *in vivo*.

C Annexes

Annexe 1 Génotypage HBV détection de résistances aux antiviraux

MOTS CLES :

Amplification de l'ADN viral, Hépatite B, génotypage, recherche des résistances aux antiviraux, faibles charges virales

OBJET

Après l'extraction de l'ADN par la méthode Qiagen®, on procède par amplification sélective d'une séquence d'ADN HBV double brin d'une partie de la région polymérase, effectuée in vitro par PCR avec une nouvelle Taq polymérase plus sensible : la « Phusion® » sur 2720 THERMAL CYCLER (Applied Biosystems®, France).

L'amplicon obtenu après la PCR est purifié, puis la PCR de séquençage est réalisé avec la trousse Big Dye® sequencing cycle Applied Biosystem® v1.1. Les produits de la PCR de séquençage sont purifiés par précipitation dans l'éthanol à froid, puis le séquençage automatique est réalisé sur séquenceur ABI 3100 (Applied Biosystems®, France) et les séquences obtenues sont alignées sur Seqcape® Software 2.X

EQUIPEMENT

– Pipettes automatiques (10, 20, 100, et 1000 µL)

– Glace

– 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®, France)

– Tubes « Eppendorf » de 1,5 ml pour mix PCR

– Barrette + bouchons

– ABI Prism® SeqScape®

Réactifs pour les réactions de PCR

– H_2O distillée stérile

– 2x PHUSION Master mix (contient dNTPs, Phusion® ADN polymérase, $MgCl_2$, Tampon)

– Amorce sens S2, 455 à 10 µM

– Amorce antisens 979, RV2 à 10 µM

– ADN à amplifier (extrait selon procédure VCA014)

MODE OPERATOIRE

> *Première PCR*

Préparation du Mix (mélange réactionnel) pour une réaction de PCR (sur glace)

Réactifs	Volume pour une réaction (µL)
H_2O	6.5
Master mix Phusion 2X	12.5
Amorce sens à 10 µM	0.5
Amorce antisens à 10 µM	0.5
ADN (HBV)	5
Volume final	25

•En pièce propre

Faire un mix **S2/979** et un mix **455/979**

Distribuer 20 µL de mix par cupule

•En pièce de distribution des échantillons

Ajouter 5 µL d'ADN à amplifier

Centrifuger brièvement la barrette

•2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®, France)

Programme de PCR amplification sur 2720 Thermal cycler

Etapes	**Température**	**Durée**	**Nombre de cycles**
Activation	98°C	5 min	1
Dénaturation	98°C	20 sec	40
Hybridation	50°C	20 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	5 min	1

> *PCR nichée*

Préparation du Mix (mélange réactionnel) pour PCR nichée (sur glace)

Réactifs	**Volume pour une réaction (µL)**
H_2O	13
Master mix SBG 2X	25
Amorce sens à **10 µM**	1
Amorce antisens à **10 µM**	1
Produit de la 1ère PCR	10
Volume final	**50**

•En pièce propre

Faire 1 mix 455/979 pour le produit de première PCR S2/979 et 1 mix 455/RV2 pour le produit de première PCR 455/979

Distribuer 40 µL de mix par cupule

•En pièce d'amplification génique

Distribuer 10 µL d'ADN issu de la première PCR (quelque soit la CV) après avoir centrifuger brièvement la barrette

•PCR sur 2720 Thermal cycler

Programme 2720 Thermal cycler

Etapes	**Température**	**Durée**	**Nombre de cycles**
Activation	98°C	5 min	1
Dénaturation	98°C	20 sec	40
Hybridation	50°C	20 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	10 min	1

Dépôt des produits de PCR sur gel d'agarose 2 %

L'électrophorèse permet de visualiser la présence d'amplicons à l'issue de la 2nde PCR.

L'amplification d'un produit de 550 pb environ indique la présence d'un ADN spécifique de la polymérase de l'HBV dans l'échantillon analysé.

Pour le mode opératoire et la lecture du gel se référer à la procédure VCA147.

Purification des produits de PCR avec la trousse Qiaquick® PCR purification kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France) pour la réalisation de la PCR de séquençage

Le principe de cette technique repose sur la séparation de l'ADN sur une résine échangeuse d'ions : l'ADN (amplicons) est mis en contact avec la résine fixée sur une colonne (chargée positivement) et reste accroché à celle-ci par sa charge négative.

Des rinçages avec de l'Ethanol permettent de débarrasser l'ADN des excès de dNTPS et des amorces. L'ADN est ensuite élué avec de l'eau distillée stérile, récupéré après une centrifugation et conservé à +4°C (2 semaines) ou à –20°C pour le séquençage.

Mode opératoire

Travailler en pièce d'amplification génique

– Dans un tube « Eppendorf » de 1,5 ml ajouter dans l'ordre : 250 µL de tampon PBI et le produit de PCR (50 µL)

– Agiter au vortex et centrifugation rapide

– Déposer ce mélange sur une colonne QIAGEN®

– Centrifuger à 17900 g pendant 1 minute

– Placer la colonne sur un nouveau tube vide (jeter les tubes contenant les filtrats)

– Ajouter 750 µL de tampon PE (ce tampon PE doit être reconstitué avec 24 ml d'éthanol à 95° avant la première utilisation)

– Centrifuger à 17900 g pendant 1 minute

– Placer la colonne sur un nouveau tube vide (jeter les tubes contenant les filtrats)

- Centrifuger à 17900 g pendant 1 minute

– Placer la colonne sur un tube « Eppendorf » de 1.5 ml identifié

– Pour éluer l'ADN, ajouter 100 µL de tampon EB sur le centre de la membrane

– Centrifuger à 17900 g pendant 1 minute

– Conserver l'ADN purifié à – 20°C pour la PCR de séquençage (jeter la colonne)

> *PCR de séquençage*

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. La méthode utilisée dérive de celle de F. SANGER qui repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés **didésoxyribonucléotides triphosphates** (ddNTPs), marqués chacun par un fluorochrome différent.

L'ADN polymérase peut, au niveau de chaque nucléotide de l'ADN matrice, incorporer un dNTP ou un ddNTP. Dans le cas où elle incorpore un dNTP, la synthèse peut continuer, dans le cas contraire elle s'arrête. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont les ddNTPs de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'.

L'insertion des ddNTP est aléatoire, si bien que le milieu réactionnel contient l'ensemble des molécules néo-synthétisées possibles (de différentes tailles). Ces molécules sont ensuite dénaturées puis migrées dans un gel d'électrophorèse afin d'être séparées selon leur taille. On peut ainsi reconstituer la séquence en analysant la nature du fluorochrome terminant chacun de ces fragments néo-synthétisés, du plus petit (premier nucléotide de la matrice) au plus grand (dernier nucléotide de la matrice).

Annexe 2 Amorces de la région Pré-S2-S

P2f

1 ctccacaaca tttcatcaag ctctgcagga tcccagagta agaggcctgt attttcctgc

61 tggtggctcc agttccggaa cagtgaaccc tgt geneS gcctcac tcatctcgtc

121 aatcttctcg aggattgggg accctgcacc gaacatggaa agcatcacat caggattcct

PreS-R

181 aggacccctg ctcgtgttac aggcggggtt tttcttgttg acaaaaatcc tcacaatacc

241 gcagagtcta gactcgtggt ggacttctct caattttcta gggggagctc ccgtgtgtct

301 tggccaaaat tcgcagtccc caacctccaa tcactcacca acctcttgtc ctccaatttg

361 tcctggctat cgctggatgt gtctgcggcg ttttatcatc ttcctcttca tcctgctgct

455

421 atgcctcatc ttcttgttgg ttcttctgga ctatcaaggt atgttgcccg tttgtcctct

481 aattccagga tcatcaacca ccagcacggg accctgccga acctgcatga ctcttgctca

541 aggaacctct atgtttccct catgttgctg ttcaaaacct tcggacggaa attgcacttg

601 tattcccatc ccatcatcat gggctttcgg aaaattccta tgggagtggg cctcagcccg

696

661 tttctcctgg ctcagtttac tagtgc YMDD ttcagtgg ttcgccgggc tttccccccac

721 tgtctggctt tcagttatat ggatgatgtg gtattggggg ccaagtctgt acgacatctt

781 gagtcccttt atacctctgt taccaatttt cttttgtctt tgggtataca tttaaatccc

RV2

841 aacaaaacaa aaagatgggg atattcccta aatttcatgg gttatgtaat tggaagttgg

901 gggtcattac cacaggaaca catcatacaa aaaatgaaac actgttttgg aaaactccct

979

961 gttaaccggc ctattgattg gaaagtatgt caaggaattg tgggtctttt gggctttgct

021 gccccttta cacaatgtgg gtatcctgct ttaatgcctc tgtatacgtg tattcaatct

081 aagcaggctt tcactttctc gccaacttac aaggcctttc tgtgtaaaca atacctgaac

141 ctttaccccg ttgcccggca acggccaggt ctgtgccaag tgtttgctga tgcaaccccc

201 actggctggg gcttggccat aggcattcag cgcatgcgcg gaacctttgt ggctcctctg

261 ccgatccata ctgcggaact cctagccgct tgttttgctc gcagcaggtc tgga geneX

321 cttatcggga ccgataattc tgtcgttctc tcccggaaat atacatcctt tccatggctg

381 ctaggctgtg ctgccaactg gatcctgcga gggacgtcct ttgtctacgt cccgtcagcg

441 ctgaatcctg cggacgaccc gtctcggggt cgcttgggga tctttcgtcc ccttctccgt

501 ctgcggttcc ggccgaccac ggggcgcacc tctctttacg cggtctcccc gtctgtgcct

Annexe 3 Réalisation d'une cellulothèque

Objet : préparation de culots secs de cellules à partir de tubes de sang total prélevé sur EDTA.

Champ d'application : Virologie, secteur Biologie Moléculaire

MODE OPERATOIRE

Prélèvement : 2 tubes de sang total prélevé sur EDTA

Matériel requis: PBS stérile dilué au 1/10ème (ou 1X)

FICOLL® : Milieu de séparation des Lymphocytes – Eurobio

Tubes gradués LEUCO SEP®

Tubes coniques type SARSTEDT®

Poubelle à déchet

Récipient à eau de javel

Réalisation :

Centrifuger les tubes de sang total 15min. à 1000 g soit 2500 T/min.

Après avoir décanté le plasma, diluer le culot globulaire, volume à volume, avec du PBS stérile, dilué 1/10 (ou 1X).

Distribuer 3,5 ml de solution de FICOLL® dans chaque tube LEUCO SEP®.

Déposer délicatement à la surface du FICOLL® 5ml de culot globulaire dilué et homogénéisé.

Remarque : veiller à ne pas mélanger les 2 phases.

Centrifuger à 400 g pendant 30 min, à température ambiante.

Recueillir l'anneau de lymphocytes avec une pastette fine et le déposer dans une nouvelle série de tubes LEUCO SEP®.

Ajouter 7ml de PBS stérile dilué 1/10, vortexer et centrifuger à 500 g pendant 10 min.

Eliminer le surnageant (dans un récipient contenant de l'eau de Javel), rassembler les 5 culots cellulaires et effectuer un second lavage avec 7ml de PBS stérile dilué 1/10 et une centrifugation à 500 g pendant 10 min.

Après avoir éliminé le surnageant, ajouter 1ml de PBS stérile dilué 1/10. Vortexer.

Répartir la cellulothèque en culots de concentration identique (petits tubes coniques SARSTEDT) et centrifuger à 12000 g pendant 5 min.

Eliminer le surnageant.

Conservation :

Congeler les 2 culots secs de cellules obtenus dans le congélateur à -80°C dans les boîtes adéquates.

Annexe 4 Publication

Bloquel, B., H. Jeulin, C. Burty, L. Letranchant, C. Rabaud and V. Venard Occult hepatitis B infection in patients infected with HIV: report of two cases of hepatitis B reactivation and prevalence in a hospital cohort. *J Med Virol* **82**(2): 206-12.

BIBLIOGRAPHIE

A. Mammette, P.D. (2002). Virologie médicale, Presses universitaires de Lyon.

Alberti, A., N. Clumeck, S. Collins, W. Gerlich, J. Lundgren, G. Palu, P. Reiss, R. Thiebaut, O. Weiland, Y. Yazdanpanah and S. Zeuzem (**2005**). Short statement of the first European Consensus Conference on the treatment of chronic hepatitis B and C in HIV co-infected patients. *J Hepatol* **42**(5): 615-24.

Allen, M.I., M. Deslauriers, C.W. Andrews, G.A. Tipples, K.A. Walters, D.L. Tyrrell, N. Brown and L.D. Condreay (**1998**). Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* **27**(6): 1670-7.

Andernach, I.E., J.M. Hubschen and C.P. Muller (**2009**). Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. *Rev Med Virol* **19**(4): 231-40.

Araujo, N.M., M. Branco-Vieira, A.C. Silva, J.H. Pilotto, B. Grinsztejn, A.J. de Almeida, C. Trepo and S.A. Gomes (**2008**). Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients: Evaluation of biochemical, virological and molecular parameters. *Hepatol Res* **38**(12): 1194-203.

Arauz-Ruiz, P., H. Norder, B.H. Robertson and L.O. Magnius (**2002**). Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* **83**(Pt 8): 2059-73.

Ascherio, A., S.M. Zhang, M.A. Hernan, M.J. Olek, P.M. Coplan, K. Brodovicz and A.M. Walker (**2001**). Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis. *N Engl J Med* **344**(5): 327-32.

Bancroft, W.H., F.K. Mundon and P.K. Russell (**1972**). Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* **109**(4): 842-8.

Bani-Sadr, F., P. Palmer, C. Scieux and J.M. Molina (**2004**). Ninety-six-week efficacy of combination therapy with lamivudine and tenofovir in patients coinfected with HIV-1 and wild-type hepatitis B virus. *Clin Infect Dis* **39**(7): 1062-4.

Bartholomeusz, A. and S. Locarnini (**2006**). Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *J Med Virol* **78 Suppl 1**: S52-5.

Beck, J. and M. Nassal (**2007**). Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* **13**(1): 48-64.

Benhamou, Y. (**2007**). Hepatitis B in the HIV-coinfected patient. *J Acquir Immune Defic Syndr* **45 Suppl 2**: S57-65; discussion S66-7.

Benhamou, Y., E. Dohin, F. Lunel-Fabiani, T. Poynard, J.M. Huraux, C. Katlama, P. Opolon and M. Gentilini (**1995**). Efficacy of lamivudine on replication of hepatitis B virus in HIV-infected patients. *Lancet* **345**(8946): 396-7.

Bloquel, B., H. Jeulin, C. Burty, L. Letranchant, C. Rabaud and V. Venard Occult hepatitis B infection in patients infected with HIV: report of two cases of hepatitis B reactivation and prevalence in a hospital cohort. *J Med Virol* **82**(2): 206-12.

Bodsworth, N.J., D.A. Cooper and B. Donovan (**1991**). The influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the development of the hepatitis B virus carrier state. *J Infect Dis* **163**(5): 1138-40.

Borroto-Esoda, K., M.D. Miller and S. Arterburn (**2007**). Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials. *J Hepatol* **47**(4): 492-8.

Brind, A., J. Jiang, D. Samuel, M. Gigou, C. Feray, C. Brechot and D. Kremsdorf (**1997**). Evidence for selection of hepatitis B mutants after liver transplantation through peripheral blood mononuclear cell infection. *J Hepatol* **26**(2): 228-35.

Bruno, R., P. Sacchi, A. Malfitano and G. Filice (**2001**). YMDD-mutant HBV strain as a cause of liver failure in an HIV-infected patient. *Gastroenterology* **121**(4): 1027-8.

C. Trepo, P.M., F. Zoulim (2006). Hépatites virales B et C.

Chamorro, A.J., J.L. Casado, D. Bellido and S. Moreno (**2005**). Reactivation of hepatitis B in an HIV-infected patient with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**(7): 492-4.

Chang, T.T., R.G. Gish, R. de Man, A. Gadano, J. Sollano, Y.C. Chao, A.S. Lok, K.H. Han, Z. Goodman, J. Zhu, A. Cross, D. DeHertogh, R. Wilber, R. Colonno and D. Apelian (**2006**). A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **354**(10): 1001-10.

Chen, B.F., J.H. Kao, C.J. Liu, D.S. Chen and P.J. Chen (**2004**). Genotypic dominance and novel recombinations in HBV genotype B and C co-infected intravenous drug users. *J Med Virol* **73**(1): 13-22.

Chen, K., Y. Wei, A. Alter, G.C. Sharp and H. Braley-Mullen (**2005**). Chemokine expression during development of fibrosis versus resolution in a murine model of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *J Leukoc Biol* **78**(3): 716-24.

Chen, L., F. Liu, X. Fan, J. Gao, N. Chen, T. Wong, J. Wu and S.W. Wen (**2009**). Detection of hepatitis B surface antigen, hepatitis B core antigen, and hepatitis B virus DNA in parotid tissues. *Int J Infect Dis* **13**(1): 20-3.

Ciotti, M., F. Marcuccilli, T. Guenci, M.G. Prignano and C.F. Perno (**2008**). Evaluation of the Abbott RealTime HBV DNA assay and comparison to the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 48 assay in monitoring patients with chronic cases of hepatitis B. *J Clin Microbiol* **46**(4): 1517-9.

Clark, S.J., S. Creighton, M. Horner, H.M. Smith, B. Portmann, C. Taylor and M.E. Cramp (**2006**). Reactivation of latent hepatitis B virus infection with HIV-related immunosuppression. *Int J STD AIDS* **17**(1): 67-9.

Cohen Stuart, J.W., M. Velema, R. Schuurman, C.A. Boucher and A.I. Hoepelman (**2009**). Occult hepatitis B in persons infected with HIV is associated with low CD4 counts and resolves during antiretroviral therapy. *J Med Virol* **81**(3): 441-5.

Colonno, R., R. Rose and K. Pokornowski (**2007**). Four years assessment of entecavir resistance in nucleoside-naive and lamivudine refractory patients. *J Hepatol.* **suppl. 1**: S294.

Confavreux, C., S. Suissa, P. Saddier, V. Bourdes and S. Vukusic (**2001**). Vaccinations and the risk of relapse in multiple sclerosis. Vaccines in Multiple Sclerosis Study Group. *N Engl J Med* **344**(5): 319-26.

Da Silva, L.C., J.R. Pinho, R. Sitnik, L.E. Da Fonseca and F.J. Carrilho (**2001**). Efficacy and tolerability of long-term therapy using high lamivudine doses for the treatment of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* **36**(7): 476-85.

Datta, S., A. Banerjee, P.K. Chandra, A. Chowdhury and R. Chakravarty (**2006**). Genotype, phylogenetic analysis, and transmission pattern of occult hepatitis B virus (HBV) infection in families of asymptomatic HBsAg carriers. *J Med Virol* **78**(1): 53-9.

Delaney, W.E.t., H. Yang, C.E. Westland, K. Das, E. Arnold, C.S. Gibbs, M.D. Miller and S. Xiong (**2003**). The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol* **77**(21): 11833-41.

Dienstag, J.L., J. Cianciara, S. Karayalcin, K.V. Kowdley, B. Willems, S. Plisek, M. Woessner, S. Gardner and E. Schiff (**2003**). Durability of serologic response after lamivudine treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* **37**(4): 748-55.

Escuret, V., A. Martin, D. Durantel, R. Parent, O. Hantz, C. Trepo, T. Menguy, E. Bottius, J. Dardy, J. Maral, J.L. Escary and F. Zoulim (**2006**). Novel alpha interferon (IFN-alpha) variant with improved inhibitory activity against hepatitis C virus genotype 1 replication compared to IFN-alpha2b therapy in a subgenomic replicon system. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(12): 3984-91.

Filippini, P., N. Coppola, R. Pisapia, C. Scolastico, C. Marrocco, A. Zaccariello, C. Nacca, C. Sagnelli, G. De Stefano, T. Ferraro, C. De Stefano and E. Sagnelli (**2006**). Impact of occult hepatitis B virus infection in HIV patients naive for antiretroviral therapy. *Aids* **20**(9): 1253-60.

Flodgren, E., S. Bengtsson, M. Knutsson, E.A. Strebkova, A.H. Kidd, O.A. Alexeyev and K. Kidd-Ljunggren (**2000**). Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains. *J Clin Microbiol* **38**(9): 3311-6.

Gallant, J.E., S. Staszewski, A.L. Pozniak, E. DeJesus, J.M. Suleiman, M.D. Miller, D.F. Coakley, B. Lu, J.J. Toole and A.K. Cheng (**2004**). Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a 3-year randomized trial. *JAMA* **292**(2): 191-201.

Ganem, D. and A.M. Prince (**2004**). Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* **350**(11): 1118-29.

Gartner, B.C., W. Jung, C. Welsch, J. Fischinger, J. Schubert, S. Zeuzem, N. Mueller-Lantzsch, U.C. Wend and W.H. Gerlich (**2007**). Permanent loss of anti-HBc after reactivation of hepatitis B virus infection in an anti-HBs and anti-HBc-positive patient after allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Virol* **38**(2): 146-8.

Girones, R. and R.H. Miller (**1989**). Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* **170**(2): 595-7.

Gish, R.G., H. Trinh, N. Leung, F.K. Chan, M.W. Fried, T.L. Wright, C. Wang, J. Anderson, E. Mondou, A. Snow, J. Sorbel, F. Rousseau and L. Corey (**2005**). Safety and antiviral activity of emtricitabine (FTC) for the treatment of chronic hepatitis B infection: a two-year study. *J Hepatol* **43**(1): 60-6.

Glebe, D. (**2007**). Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view. *World J Gastroenterol* **13**(1): 8-13.

Gripon, P., I. Cannie and S. Urban (**2005**). Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* **79**(3): 1613-22.

Gunther, S. (**2006**). Genetic variation in HBV infection: genotypes and mutants. *J Clin Virol* **36 Suppl 1**: S3-S11.

Hadziyannis, S.J., N.C. Tassopoulos, E.J. Heathcote, T.T. Chang, G. Kitis, M. Rizzetto, P. Marcellin, S.G. Lim, Z. Goodman, M.S. Wulfsohn, S. Xiong, J. Fry and C.L. Brosgart (**2003**). Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **348**(9): 800-7.

Hino, K., A.A. Basuni, J. Ireland, A. Newell, J. Mphahlele, E.J. Smit, S.L. Ngui, C.G. Teo and W.F. Carman (**2002**). Reappearance of hepatitis B surface antigen in immunocompromised individuals: reinfection or reactivation? *Dig Dis Sci* **47**(2): 415-8.

Hofer, M., H.I. Joller-Jemelka, P.J. Grob, R. Luthy and M. Opravil (**1998**). Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. Swiss HIV Cohort Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**(1): 6-13.

Huraux, J.-M., J.-C. Nicolas, H. Agut and H. Peigue-Lafeuille (2003). Traité de virologie médicale

INVS (2008). Calendrier vaccinal 2008 - Avis du Haut conseil de la santé publique

Janssen, H.L., M. van Zonneveld, H. Senturk, S. Zeuzem, U.S. Akarca, Y. Cakaloglu, C. Simon, T.M. So, G. Gerken, R.A. de Man, H.G. Niesters, P. Zondervan, B. Hansen and S.W. Schalm (**2005**). Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* **365**(9454): 123-9.

Jeantet, D., I. Chemin, B. Mandrand, A. Tran, F. Zoulim, P. Merle, C. Trepo and A. Kay (**2004**). Cloning and expression of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays. *J Med Virol* **73**(4): 508-15.

Kao, J.H., P.J. Chen, M.Y. Lai and D.S. Chen (**2002**). Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Microbiol* **40**(11): 4068-71.

Katze, M.G., Y. He and M. Gale, Jr. (**2002**). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* **2**(9): 675-87.

Kobayashi, S., T. Ide and M. Sata (**2001**). Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* **34**(4): 584-6.

Koibuchi, T., A. Hitani, T. Nakamura, N. Nojiri, K. Nakajima, T. Jyuji and A. Iwamoto (**2001**). Predominance of genotype A HBV in an HBV-HIV-1 dually positive population compared with an HIV-1-negative counterpart in Japan. *J Med Virol* **64**(4): 435-40.

Koike, K. (**1995**). Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology* **38**(3-4): 134-42.

Korenman, J., B. Baker, J. Waggoner, J.E. Everhart, A.M. Di Bisceglie and J.H. Hoofnagle (**1991**). Long-term remission of chronic hepatitis B after alpha-interferon therapy. *Ann Intern Med* **114**(8): 629-34.

Lacombe, K., J. Gozlan, P.Y. Boelle, L. Serfaty, F. Zoulim, A.J. Valleron and P.M. Girard (**2005**). Long-term hepatitis B virus dynamics in HIV-hepatitis B virus-co-infected patients treated with tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS* **19**(9): 907-15.

Lacombe, K., V. Massari, P.M. Girard, L. Serfaty, J. Gozlan, G. Pialoux, P. Mialhes, J.M. Molina, C. Lascoux-Combe, D. Wendum, F. Carrat and F. Zoulim (**2006**). Major role of hepatitis B genotypes in liver fibrosis during coinfection with HIV. *Aids* **20**(3): 419-27.

Lai, C.L., C.K. Ching, A.K. Tung, E. Li, J. Young, A. Hill, B.C. Wong, J. Dent and P.C. Wu (**1997**). Lamivudine is effective in suppressing hepatitis B virus DNA in Chinese hepatitis B surface antigen carriers: a placebo-controlled trial. *Hepatology* **25**(1): 241-4.

Lai, C.L., E. Gane, Y.F. Liaw, C.W. Hsu, S. Thongsawat, Y. Wang, Y. Chen, E.J. Heathcote, J. Rasenack, N. Bzowej, N.V. Naoumov, A.M. Di Bisceglie, S. Zeuzem, Y.M. Moon, Z. Goodman, G. Chao, B.F. Constance and N.A. Brown (**2007**). Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **357**(25): 2576-88.

Lai, C.L., D. Shouval, A.S. Lok, T.T. Chang, H. Cheinquer, Z. Goodman, D. DeHertogh, R. Wilber, R.C. Zink, A. Cross, R. Colonno and L. Fernandes (**2006**). Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **354**(10): 1011-20.

Langley, D.R., A.W. Walsh, C.J. Baldick, B.J. Eggers, R.E. Rose, S.M. Levine, A.J. Kapur, R.J. Colonno and D.J. Tenney (**2007**). Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol* **81**(8): 3992-4001.

Le Bouvier, G.L. (**1971**). The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis* **123**(6): 671-5.

Lee, J.S., E.T. Park, S.S. Kang, E.S. Gu, J.S. Kim, D.S. Jang, K.S. Lee, N.H. Park, C.H. Bae, S.K. Baik, B.J. Yu, S.H. Lee, E.J. Lee, S.I. Park, M. Bae, J.W. Shin, J.H. Choi, C. Gu, S.K. Moon, G.J. Chun, J.H. Kim, H.S. Kim and S.K. Choi (**2009**). Clevudine demonstrates potent antiviral activity in naive chronic hepatitis B patients. *Intervirology* **53**(2): 83-6.

Liaw, Y.F., R.N. Chien and C.T. Yeh (**2004a**). No benefit to continue lamivudine therapy after emergence of YMDD mutations. *Antivir Ther* **9**(2): 257-62.

Liaw, Y.F. and C.M. Chu (**2009a**). Hepatitis B virus infection. *Lancet* **373**(9663): 582-92.

Liaw, Y.F., E. Gane, N. Leung, S. Zeuzem, Y. Wang, C.L. Lai, E.J. Heathcote, M. Manns, N. Bzowej, J. Niu, S.H. Han, S.G. Hwang, Y. Cakaloglu, M.J. Tong, G. Papatheodoridis, Y. Chen, N.A. Brown, E. Albanis, K. Galil and N.V. Naoumov (**2009b**). 2-Year GLOBE trial results: telbivudine Is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **136**(2): 486-95.

Liaw, Y.F., J.J. Sung, W.C. Chow, G. Farrell, C.Z. Lee, H. Yuen, T. Tanwandee, Q.M. Tao, K. Shue, O.N. Keene, J.S. Dixon, D.F. Gray and J. Sabbat (**2004b**). Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* **351**(15): 1521-31.

Lo Re, V., 3rd, I. Frank, R. Gross, J. Dockter, J.M. Linnen, C. Giachetti, P. Tebas, J. Stern, M. Synnestvedt, A.R. Localio, J.R. Kostman and B.L. Strom (**2007**). Prevalence, risk factors, and outcomes for occult hepatitis B virus infection among HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* **44**(3): 315-20.

Locarnini, S. (**2004**). Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* **24 Suppl 1**: 3-10.

Locarnini, S., A. Hatzakis, J. Heathcote, E.B. Keeffe, T.J. Liang, D. Mutimer, J.M. Pawlotsky and F. Zoulim (**2004**). Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther* **9**(5): 679-93.

Lok, A.S., C.L. Lai, N. Leung, G.B. Yao, Z.Y. Cui, E.R. Schiff, J.L. Dienstag, E.J. Heathcote, N.R. Little, D.A. Griffiths, S.D. Gardner and M. Castiglia (**2003**). Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **125**(6): 1714-22.

Lukhwareni, A., R.J. Burnett, S.G. Selabe, M.O. Mzileni and M.J. Mphahlele (**2009**). Increased detection of HBV DNA in HBsAg-positive and HBsAg-negative South African HIV/AIDS patients enrolling for highly active antiretroviral therapy at a Tertiary Hospital. *J Med Virol* **81**(3): 406-12.

Magnius, L.O. and H. Norder (**1995**). Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* **38**(1-2): 24-34.

Mammette, A. and P. Dény (2002). Virologie médicale, Presses universitaires de Lyon.

Manegold, C., C. Hannoun, A. Wywiol, M. Dietrich, S. Polywka, C.B. Chiwakata and S. Gunther (**2001**). Reactivation of hepatitis B virus replication accompanied by acute hepatitis in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* **32**(1): 144-8.

Marcellin, P., E.J. Heathcote, M. Buti, E. Gane, R.A. de Man, Z. Krastev, G. Germanidis, S.S. Lee, R. Flisiak, K. Kaita, M. Manns, I. Kotzev, K. Tchernev, P. Buggisch, F. Weilert, O.O. Kurdas, M.L. Shiffman, H. Trinh, M.K. Washington, J. Sorbel, J. Anderson, A. Snow-Lampart, E. Mondou, J. Quinn and F. Rousseau (**2008**). Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **359**(23): 2442-55.

Marcellin, P., G.K. Lau, F. Bonino, P. Farci, S. Hadziyannis, R. Jin, Z.M. Lu, T. Piratvisuth, G. Germanidis, C. Yurdaydin, M. Diago, S. Gurel, M.Y. Lai, P. Button and N. Pluck (**2004**). Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **351**(12): 1206-17.

Maupas, P., A. Goudeau, P. Coursaget, J. Drucker and P. Bagros (**1976**). Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet* **1**(7974): 1367-70.

Mayerat, C., A. Mantegani and P.C. Frei (**1999**). Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* **6**(4): 299-304.

Moucari, R., V. Mackiewicz, O. Lada, M.P. Ripault, C. Castelnau, M. Martinot-Peignoux, A. Dauvergne, T. Asselah, N. Boyer, P. Bedossa, D. Valla, M. Vidaud, M.H. Nicolas-Chanoine and P. Marcellin (**2009**). Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology* **49**(4): 1151-7.

Mulders, M.N., V. Venard, M. Njayou, A.P. Edorh, A.O. Bola Oyefolu, M.O. Kehinde, J.J. Muyembe Tamfum, Y.K. Nebie, I. Maiga, W. Ammerlaan, F. Fack, S.A. Omilabu, A. Le Faou and C.P. Muller (**2004**). Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis* **190**(2): 400-8.

Neau, D., M. Winnock, A.C. Jouvencel, M. Faure, L. Castera, E. Legrand, D. Lacoste, J.M. Ragnaud, M. Dupon, H. Fleury, M.E. Lafon and F. Dabis (**2005**). Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients with isolated antibodies to hepatitis B core antigen: Aquitaine cohort, 2002-2003. *Clin Infect Dis* **40**(5): 750-3.

Nebbia, G., A. Garcia-Diaz, U. Ayliffe, C. Smith, S. Dervisevic, M. Johnson, R. Gilson, R. Tedder and A.M. Geretti (**2007**). Predictors and kinetics of occult hepatitis B virus infection in HIV-infected persons. *J Med Virol* **79**(10): 1464-71.

Nelson, M., S. Portsmouth, J. Stebbing, M. Atkins, A. Barr, G. Matthews, D. Pillay, M. Fisher, M. Bower and B. Gazzard (**2003**). An open-label study of tenofovir in HIV-1 and Hepatitis B virus co-infected individuals. *AIDS* **17**(1): F7-10.

Niederau, C., T. Heintges, S. Lange, G. Goldmann, C.M. Niederau, L. Mohr and D. Haussinger (**1996**). Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **334**(22): 1422-7.

Nunez, M., P. Rios, M. Perez-Olmeda and V. Soriano (**2002**). Lack of 'occult' hepatitis B virus infection in HIV-infected patients. *Aids* **16**(15): 2099-101.

Okamoto, H., M. Imai, F. Tsuda, T. Tanaka, Y. Miyakawa and M. Mayumi (**1987**). Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* **61**(10): 3030-4.

Olinger, C.M., N.V. Lazouskaya, V.F. Eremin and C.P. Muller (**2008**). Multiple genotypes and subtypes of hepatitis B and C viruses in Belarus: similarities with Russia and western European influences. *Clin Microbiol Infect*.

Olinger, C.M., V. Venard, M. Njayou, A.O. Oyefolu, I. Maiga, A.J. Kemp, S.A. Omilabu, A. le Faou and C.P. Muller (**2006**). Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol* **87**(Pt 5): 1163-73.

Pasteur-Cerba (2003). Guide des Analyses Spécialisées.

Pastor, R., F. Habersetzer, S. Fafi-Kremer, M. Doffoel, T.F. Baumert, J.P. Gut, F. Stoll-Keller and E. Schvoerer (**2009**). Hepatitis B virus mutations potentially conferring adefovir/tenofovir resistance in treatment-naive patients. *World J Gastroenterol* **15**(6): 753-5.

Perrillo, R.P. (**1990**). Factors influencing response to interferon in chronic hepatitis B: implications for Asian and western populations. *Hepatology* **12**(6): 1433-5.

Peters, M.G. (**2007**). Diagnosis and management of hepatitis B virus and HIV coinfection. *Top HIV Med* **15**(5): 163-6.

Peters, M.G., H. Hann Hw, P. Martin, E.J. Heathcote, P. Buggisch, R. Rubin, M. Bourliere, K. Kowdley, C. Trepo, D. Gray Df, M. Sullivan, K. Kleber, R. Ebrahimi, S. Xiong and C.L. Brosgart (**2004**). Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **126**(1): 91-101.

Petersen, J., M. Dandri, W. Mier, M. Lutgehetmann, T. Volz, F. von Weizsacker, U. Haberkorn, L. Fischer, J.M. Pollok, B. Erbes, S. Seitz and S. Urban (**2008**). Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol* **26**(3): 335-41.

Piroth, L., C. Binquet, M. Vergne, A. Minello, C. Livry, J.B. Bour, M. Buisson, M. Duong, M. Grappin, H. Portier and P. Chavanet (**2002**). The evolution of hepatitis B virus serological patterns and the clinical relevance of isolated antibodies to hepatitis B core antigen in HIV infected patients. *J Hepatol* **36**(5): 681-6.

Piroth, L., M.E. Lafon, C. Binquet, P. Bertillon, A. Gervais, E. Lootvoet, J.M. Lang, J.P. De Jaureguiberry, G. Chene and C. Leport (**2008**). Occult hepatitis B in HIV-HCV coinfected patients. *Scand J Infect Dis* **40**(10): 835-9.

Pollicino, T., G. Raffa, L. Costantino, A. Lisa, C. Campello, G. Squadrito, M. Levrero and G. Raimondo (**2007**). Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **45**(2): 277-85.

Pontisso, P., L. Vidalino, S. Quarta and A. Gatta (**2008**). Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells. *Autoimmun Rev* **8**(1): 13-7.

Raimondo, G., T. Pollicino, I. Cacciola and G. Squadrito (**2007**). Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* **46**(1): 160-70.

Sanchez-Tapias, J.M., J. Costa, A. Mas, M. Bruguera and J. Rodes (**2002**). Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* **123**(6): 1848-56.

Santos, E.A., C.F. Yoshida, V.C. Rolla, J.M. Mendes, I.F. Vieira, J. Arabe and S.A. Gomes (**2003**). Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**(2): 92-8.

Seok, J.I., D.K. Lee, C.H. Lee, M.S. Park, S.Y. Kim, H.S. Kim, H.Y. Jo and D.S. Kim (**2009**). Long-term therapy with clevudine for chronic hepatitis B can be associated with myopathy characterized by depletion of mitochondrial DNA. *Hepatology* **49**(6): 2080-6.

Sheldon, J., N. Camino, B. Rodes, A. Bartholomeusz, M. Kuiper, F. Tacke, M. Nunez, S. Mauss, T. Lutz, G. Klausen, S. Locarnini and V. Soriano (**2005**). Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir Ther* **10**(6): 727-34.

Sheldon, J., B. Rodes, F. Zoulim, A. Bartholomeusz and V. Soriano (**2006**). Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* **13**(7): 427-34.

Soriano, V., J. Sheldon, P. Garcia-Gasco and E. Vispo (**2007**). Lack of anti-HIV activity of entecavir in an HIV patient coinfected with hepatitis B and delta viruses. *AIDS* **21**(16): 2253-4.

Stephan, C., A. Berger, A. Carlebach, T. Lutz, M. Bickel, S. Klauke, S. Staszewski and M. Stuermer (**2005**). Impact of tenofovir-containing antiretroviral therapy on chronic hepatitis B in a cohort co-infected with human immunodeficiency virus. *J Antimicrob Chemother* **56**(6): 1087-93.

Stuyver, L., S. De Gendt, C. Van Geyt, F. Zoulim, M. Fried, R.F. Schinazi and R. Rossau (**2000**). A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* **81**(Pt 1): 67-74.

Szmuness, W. (**1979**). Large-scale efficacy trials of hepatitis B vaccines in the USA: baseline data and protocols. *J Med Virol* **4**(4): 327-40.

Takkenberg, R.B., C.J. Weegink, H.L. Zaaijer and H.W. Reesink (**2009**). New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Vox Sang.*

Tenney, D.J., R.E. Rose, C.J. Baldick, S.M. Levine, K.A. Pokornowski, A.W. Walsh, J. Fang, C.F. Yu, S. Zhang, C.E. Mazzucco, B. Eggers, M. Hsu, M.J. Plym, P. Poundstone, J. Yang and R.J. Colonno (**2007**). Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(3): 902-11.

Tenney, D.J., R.E. Rose, C.J. Baldick, K.A. Pokornowski, B.J. Eggers, J. Fang, M.J. Wichroski, D. Xu, J. Yang, R.B. Wilber and R.J. Colonno (**2009**). Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* **49**(5): 1503-14.

Thibault, V., Y. Benhamou, C. Seguret, M. Bochet, C. Katlama, F. Bricaire, P. Opolon, T. Poynard and H. Agut (**1999**). Hepatitis B virus (HBV) mutations associated with resistance to lamivudine in patients coinfected with HBV and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* **37**(9): 3013-6.

Thio, C.L. (**2003**). Hepatitis B in the human immunodeficiency virus-infected patient: epidemiology, natural history, and treatment. *Semin Liver Dis* **23**(2): 125-36.

Tine, F., A. Liberati, A. Craxi, P. Almasio and L. Pagliaro (**1993**). Interferon treatment in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis of the published literature. *J Hepatol* **18**(2): 154-62.

Torbenson, M. and D.L. Thomas (**2002**). Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* **2**(8): 479-86.

Torresi, J., L. Earnest-Silveira, G. Deliyannis, K. Edgtton, H. Zhuang, S.A. Locarnini, J. Fyfe, T. Sozzi and D.C. Jackson (**2002**). Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* **293**(2): 305-13.

van Bommel, F., T. Wunsche, S. Mauss, P. Reinke, A. Bergk, D. Schurmann, B. Wiedenmann and T. Berg (**2004**). Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology* **40**(6): 1421-5.

Vassiliadis, T.G., O. Giouleme, G. Koumerkeridis, H. Koumaras, K. Tziomalos, K. Patsiaoura, N. Grammatikos, A. Mpoumponaris, D. Gkisakis, K. Theodoropoulos, A. Panderi, P. Katsinelos and N. Eugenidis (**2009**). Adefovir plus lamivudine are more effective than adefovir alone in lamivudine-resistant HBeAg chronic hepatitis B patients: A 4-year study. *J Gastroenterol Hepatol.*

Villet, S., C. Pichoud, G. Billioud, L. Barraud, S. Durantel, C. Trepo and F. Zoulim (**2008**). Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J Hepatol* **48**(5): 747-55.

Wasley, A., J.T. Miller and L. Finelli (**2007**). Surveillance for acute viral hepatitis--United States, 2005. *MMWR Surveill Summ* **56**(3): 1-24.

Wong, D.K., A.M. Cheung, K. O'Rourke, C.D. Naylor, A.S. Detsky and J. Heathcote (**1993**). Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med* **119**(4): 312-23.

Wright, T.L. (**2004**). Clinical trial results and treatment resistance with lamivudine in hepatitis B. *Semin Liver Dis* **24 Suppl 1**: 31-6.

Wu, G.Y. and H.S. Chen (**2007**). Novel approaches towards conquering hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* **13**(6): 830-6.

Wursthorn, K., M. Lutgehetmann, M. Dandri, T. Volz, P. Buggisch, B. Zollner, T. Longerich, P. Schirmacher, F. Metzler, M. Zankel, C. Fischer, G. Currie, C. Brosgart and J. Petersen (**2006**). Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* **44**(3): 675-84.

Xiong, X., C. Flores, H. Yang, J.J. Toole and C.S. Gibbs (**1998**). Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology* **28**(6): 1669-73.

Yuen, M.F., T. Kato, M. Mizokami, A.O. Chan, J.C. Yuen, H.J. Yuan, D.K. Wong, S.M. Sum, I.O. Ng, S.T. Fan and C.L. Lai (**2003**). Clinical outcome and virologic profiles of severe hepatitis B exacerbation due to YMDD mutations. *J Hepatol* **39**(5): 850-5.

Zoulim, F. (**2004**). Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* **64**(1): 1-15.

Zoulim, F. (**2006**). In vitro models for studying hepatitis B virus drug resistance. *Semin Liver Dis* **26**(2): 171-80.

Zoulim, F. (**2007**). Emerging drugs for hepatitis B. *Expert Opin Emerg Drugs* **12**(2): 199-217.

Zoulim, F. and S. Locarnini (**2009**). Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* **137**(5): 1593-608 e1-2.

Zoulim, F., T. Poynard, F. Degos, A. Slama, A. El Hasnaoui, P. Blin, F. Mercier, P. Deny, P. Landais, P. Parvaz and C. Trepo (**2006**). A prospective study of the evolution of lamivudine resistance mutations in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine. *J Viral Hepat* **13**(4): 278-88.

Journal of Medical Virology 82:206–212 (2010)

Occult Hepatitis B Infection in Patients Infected With HIV: Report of Two Cases of Hepatitis B Reactivation and Prevalence in a Hospital Cohort

B. Bloquel,[1] H. Jeulin,[1,2] C. Burty,[3] L. Letranchant,[3] C. Rabaud,[3] and V. Venard[1,2]*

[1]*Laboratory of Virology, CHU Nancy Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[2]*EA RHEM 4369, Faculty of Medicine, UHP Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[3]*Department of Infectious Diseases, CHU Nancy Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

Patients co-infected with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV) are particularly at risk of hepatitis B reactivation. Two cases of patients infected with HIV with isolated anti-HBc antibodies who had experienced an HBV reactivation are described. In the two cases HBV reactivation occurred after withdrawal of antiretroviral treatment with anti-HBV activity from the patients' highly active antiretroviral therapy (HAART), in accordance with HIV genotypic resistance profiles. Consequently, plasma samples from 383 patients infected with HIV were tested to assess the prevalence of occult HBV infection in the Infectious Diseases Department Unit of Nancy Hospital by investigating serological patterns and HBV replication. Forty-five percent (172/383) of patients had had previous contact with HBV. Isolated anti-HBc antibodies were observed in 48 patients (48/383, 12%) and, among these, 2 were HBV-DNA positive. Since 75% (288/383) of the patients were treated with HAART, including at least one drug active against HBV, occult HBV infection was perhaps unrecognized. In cases of HIV infection, all patients should be screened for HBV infection and the knowledge of HBV status as well as the monitoring of HBV viral load are essential in preventing HBV reactivation. Consideration should be given to the continuation of drugs with anti-HBV activity in co-infected patients receiving HAART, as cessation of therapy is associated with a risk of HBV reactivation. At least, close monitoring of the HBV viral load is warranted in such situations. ***J. Med. Virol. 82:206–212, 2010.*** © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: hepatitis B virus; human immunodeficiency virus; hepatitis B viral load; occult hepatitis; isolated anti-HBc antibodies

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) is an important cause of mortality and morbidity among human immunodeficiency virus (HIV) infected persons [Thio, 2003]. In these patients, the mortality rate is 19 times higher than in HIV mono-infected patients [Peters, 2007]. Excessively high incidence rates of serological markers of prior or active HBV infection have been reported in HIV populations and can be as high as 68% [Hofer et al., 1998; Nunez et al., 2002; Piroth et al., 2002; Filippini et al., 2006; Lo Re et al., 2007]. Among different serological patterns, the isolated hepatitis B core (anti-HBc) antibodies are predominant [Hofer et al., 1998; Santos et al., 2003] and have been found to be associated with occult HBV infection [Kao et al., 2002; Piroth et al., 2002].

Occult hepatitis B infection is defined as the presence of HBV-DNA in blood and/or in liver tissue in HBs antigen (HBsAg) negative individuals and is in many cases associated with the presence of anti-HBc antibodies [Toro et al., 2006; Raffa et al., 2007; Raimondo et al., 2007]. The definition does not include the detection threshold of the assay used, but most occult HBV carriers have very low viremia levels. The prevalence of occult HBV infection in HIV positive patients varies widely from 0% to 89.5% [Hofer et al., 1998; Nunez et al., 2002; Piroth et al., 2002; Filippini et al., 2006; Cohen Stuart et al., 2009; Lukhwareni et al., 2009]. Nevertheless, more than 20% of occult carriers are intermittently negative for all HBV serum markers [Hofer et al., 1998]. The reason for HBsAg negativity in occult infections still remains an unsolved question, although in most cases it is thought to be a result of strong suppression of viral replication. It may also be the result of the host immune response as well as the

*Correspondence to: V. Venard, Laboratoire de Virologie, CHU de Nancy Brabois route de Neufchâteau, 54511Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail: v.venard@chu-nancy.fr

Accepted 10 September 2009
DOI 10.1002/jmv.21685
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

© 2009 WILEY-LISS, INC.

increased frequency of mutations in the major hydrophilic loop of the S gene [Datta et al., 2006]. Virus interference is also an important aspect that has a negative influence on HBV replication [Chemin and Trepo, 2005; Benhamou, 2007; Raimondo et al., 2007].

Lamivudine or emtricitabine are now included in most highly active antiretroviral therapy (HAART) regimens. Both of these drugs, often associated with tenofovir, have anti-HBV effects reducing HBV replication [Stephan et al., 2005]. Monotherapy with lamivudine for chronic HBV infection in patients infected with HIV is often associated with a rapid appearance of lamivudine resistance. The efficacy of tenofovir in lamivudine-resistant HBV strains is now well documented [Benhamou, 2007; Gutierrez et al., 2008] and tenofovir is a possible rescue therapy for patients co-infected with HIV and HBV [Miailhes et al., 2007]. Given the wide use of emtricitabine and/or tenofovir as a part of the treatment of HIV, patients' follow-up should be re-evaluated, particularly where patients with anti-HBc antibodies with or without an HBV viral load are concerned. For patients infected with HIV who present with isolated anti-HBc antibodies, the risk of HBV reactivation when discontinuing an anti-HBV drug should be reconsidered carefully in order to prevent HBV reactivation [Clark et al., 2006; Gartner et al., 2007].

These are some of the questions that will be addressed in the current study by describing two characteristic cases of HBV reactivation and by investigating markers of HBV infection and routine clinical care for HBV in patients infected with HIV.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study population comprised 383 consecutive patients out of the 780 patients attended in the Infectious Diseases Department of the "Centre Hospitalier Régional et Universitaire" Nancy Brabois. The sera were collected between 2007 and 2008.

Serological and Molecular Assays

Serological markers (HBsAg, total anti-HBc, anti-HBs) and total anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies were determined by automated chemiluminescence microparticle immuno-assay (Architect, Abbott Laboratories, Rungis, France). HBe antigen (HBeAg) was screened by a commercial enzyme immunoassay (EIA) (Axsym, Abbott Laboratories).

The HIV, HBV, and HCV viral loads were measured by the Abbott m2000 RealTime™ system using the reagents RealTime™ HIV, HBV, and HCV, respectively (Abbott Laboratories). Ranges were from 1.6 to 7 $\log_{10}$-copies/ml for HIV quantification; 1.53–9.53 $\log_{10}$ copies/ml for HBV; and 1.08–8.0 $\log_{10}$ UI/ml for HCV. Serum samples with HBV-DNA below the assay quantification limit were considered to have HBV-DNA if positive and confirmed by another test using the Cobas Taqman HBV test (Roche Diagnostics Corporation, Meylan, France).

Sequence Comparison and Phylogenetic Analysis

DNA was extracted and the complete PreS1/PreS2/S gene was amplified, sequenced, and analyzed as described in the literature [Olinger et al., 2006].

For the phylogenetic study, the 845-nucleotide region corresponding to the PreS2/S gene, which covers approximately 30% of the HBV polymerase fragment, was retained. The nucleotide sequences were aligned and compared with 44 reference strains representing all nine known HBV genotypes [Olinger et al., 2008] using the SeqScape software version 2.5 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with manual correction by visual inspection. Sequences were analyzed using the Phylogenetic Inference Package (PHYLIP) version 3.5.

RESULTS

Description of Hepatitis B Reactivation in Two Adults Infected With HIV

Case 1. Patient 1, a 25-year-old sub-Saharan female, first received a diagnosis of HIV (subtype non-B) infection in 2003 in Burkina Faso. Therapy with stavudine, lamivudine, and efavirenz was started on September 4, 2004. The patient experienced virological failure because of inadequate compliance. The HAART regimen was changed to stavudine, lamivudine, and lopinavir/ritonavir. She came to France in July 2007 with few informative medical documents; HBV infection status was not specified.

In France, on July 25, 2007, the patient had no anti-HCV antibodies and presented anti-HBc antibodies. HBV-DNA was undetectable at this date. The HIV viral load was 4.68 $\log_{10}$ copies/ml and the $CD4^+$ count was 220 cells/mm^3 displaying immuno-virological failure. In August, antiretroviral treatment was changed to tenofovir/emtricitabine, lopinavir/ritonavir, and T20, based on her HIV genotypic resistance profile.

In January 2008, the treatment was adapted according to HIV mutations conferring resistance to lamivudine/emtricitabine and tenofovir. Since the virus was resistant to all available drugs, except etravirine, lopinavir, darunavir, and raltegravir, the HAART was switched to raltegravir, etravirine, and darunavir boosted with ritonavir, and permitted a sustained HIV response. In June 2008, the patient also presented clinical signs of hepatitis 6 months after the switch. She did not take any other medication and did not consume alcohol. Tests for HCV were still negative. On June 12, 2008, the following laboratory values were noted: alanine aminotransferase levels: 868 UI/L and aspartate aminotransferase levels: 1,495 UI/L. HBsAg was detected positive on June 19, 2008 and serum HBV-DNA load, initially undetectable, reached 8.84 $\log_{10}$ copies/ml. Retrospectively, a serum sample from March 20, 2008, recovered during HBV reactivation presented a

positive HBV-DNA load (2.86 $\log_{10}$ copies/ml) associated with negative HBsAg. The tenofovir/emtricitabine association was added to the antiretroviral treatment on June 19, 2008 and serum HBV-DNA became undetectable 2 months later. The HIV and HBV loads remained undetectable and the patient was still positive for anti-HBc antibodies whereas HBsAg became negative (Fig. 1a). The HBV strain infecting the patient belonged to genotype E and remained anti-HBV drug sensitive.

Case 2. Patient 2 is a 42-year-old European male infected with HIV (subtype B) since 1992. He experienced HBV resolved infection with the presence of anti-HBc and hepatitis B surface antibodies (anti-HBs) (>10 mUI/ml) detected on September 25, 2006, and was thus registered as a patient with resolved hepatitis B. This patient had received multiple antiretroviral treatments since 1995. The latest combination associated didanosine, stavudine, and lopinavir. Treatment failures were related to poor compliance during this period. On November 27, 2006, analysis of HBV serum markers displayed the loss of anti-HBs. At this date, a new HAART regimen, including lamivudine, fosamprenavir boosted with ritonavir, abacavir, and T20, was started. The antiretroviral therapy was modified on September 3, 2007 because of virological failure (HIV viral load up to 4.65 $\log_{10}$ copies/ml) without taking care of the isolated anti-HBc antibodies. The $CD4^+$ count was 433 cells/mm^3. The HIV resistance to nucleoside analog was demonstrated by genotypic resistance analysis. The patient was then given another type of treatment, in accordance with his HIV genotyping multiresistance profile, including darunavir boosted with ritonavir, etravirine, and raltegravir. This therapy, without a nucleoside analog, was available in an expanded access program. On October 1, 2007, 1 month after the withdrawal of lamivudine, the HBV-DNA load was 2.99 $\log_{10}$ copies/ml. The HBV viral load increased up to 4.05 $\log_{10}$ copies/ml (November 2007). During this period, transaminase values were within the normal limits. Then, the patient attained a sustained undetectable plasma HIV RNA load under this effective HAART and the serum HBV-DNA at the same time also became undetectable, without the inclusion of any anti-HBV drugs (Fig. 1b).

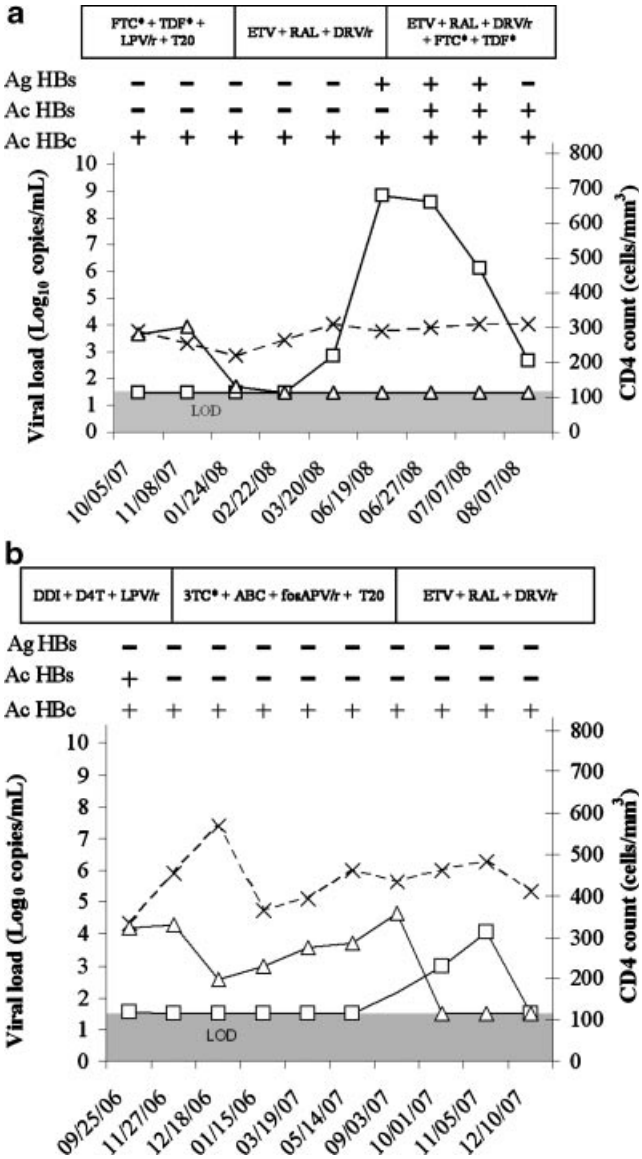

Fig. 1. Follow-up of Patient 1 (**a**) and Patient 2 (**b**) with regard to serial changes in HBV and HIV viral load and CD4 count (Δ = HIV viral load; □ = HBV viral load; × = CD4 count) during hepatitis B reactivation in HIV co-infected patients undergoing HAART and course of HBsAg, anti-HBc, and anti-HBs antibodies (open squares). LOD: limit of HIV and HBV-DNA detection (M2000RT, Abbott Laboratories). Treatment with HBV active drugs, lamivudine (3TC), emtricitabine (FTC) and tenofovir (TDF) are indicated (*) as well as other anti-HIV drugs, etravirine (ETV), raltegravir (RAL), boosted lopinavir (LPV/r), boosted darunavir (DRV/r), enfuvirtide (T20), abacavir (ABC), didanosine (DDI), stavudine (D4T), boosted fosamprenavir (fosAPV/r).

Prevalence of Hepatitis B Serological Markers and HBV Viral Load in a Cohort of 383 Patients Infected With HIV

Characteristics of the cohort. A total of 383 patients entered the study. There were no significant differences in demographic characteristics and baseline clinical, virological, and immunological data between patients who were enrolled and the entire cohort of patients infected with HIV monitored in the hospital (data not shown). Eighty-eight percent of patients were treated with antiretroviral drugs; among them, 288 patients (75%) received antiviral therapy active against HBV, including lamivudine alone (180/288, 62%), tenofovir alone (3/288, 1%), lamivudine + tenofovir (10/288, 3.5%), or tenofovir/emtricitabine (95/288 patients, 33%). The patients' characteristics at the date of inclusion are shown in Table I.

Prevalence of HBV Serological and Molecular Markers

Among the 383 patients included, 227 patients (59%) had at least one HBV marker, including 55 (14%) who were positive for anti-HBs only (>10 mUI/ml), following

TABLE I. Characteristics of a Cohort of 383 Patients Infected With HIV at the Time of Enrolment

Population	383 patients	
Age, median years (range)	46 (7–78)	
Sex ratio (male/female)	2.58	
Ethnicity		
Europeans (%)	302 (80%)	
Africans (%)	74 (19%)	
Others (%)	7 (1%)	
Median duration of HIV diagnosis in years (range)	12 (1–25)	
HIV viral load, median $\log_{10}$ copies/ml (range)	1.06 (<1.6–6.23)	
Current HAART use (%)	336 (87.7%)	
Current anti-HBV antiretroviral use (%)	288 (75.2%)	
CD4 count, median cells/mm^3 (range)	461 (4–1522)	
CD4 count distribution details	0–199	48 (4–199)
	200–349	89 (204–349)
	350–499	108 (250–495)
	≥500	138 (193–1522)

vaccination (Table II). At the date of inclusion, the majority of patients had an undetectable HBV viral load (371/383, 97%). Twelve patients (12/383, 3%) had a positive HBV viral load (1.53–9.53 $\log_{10}$ copies/ml).

Patients with positive HBsAg. Seventeen patients were HBsAg and anti-HBc antibodies positive, including eight (8/17, 47%) who were also positive for HBV-DNA by real-time PCR (including case report patient 1). Among these eight patients, five were e HBeAg positive and three were HBeAg negative. Only one patient who was HBsAg positive but anti-HBc antibodies negative was also HBV-DNA positive.

In this HBsAg positive group, seven were treated with tenofovir-containing HAART (6/7) or with lamivudine-containing HAART (1/7). All seven treated patients presented a low HBV viral load < 2.9 $\log_{10}$ copies/ml, except one patient (8.9 $\log_{10}$ copies/ml) for whom the treatment was initiated with HAART, including lamivudine at the time of inclusion. The antiretroviral therapy was then modified and the switch from lamivudine to tenofovir/emtricitabine led the HBV viral

TABLE II. Clinical and Biological Characteristics of a Cohort of Patients Infected With HIV According to HBV Serological Profile

	HBs Ag (+)		HBs Ag (−)			
	Anti-HBc (+), anti-HBs (−)	Anti-HBc (−), anti-HBs (−)	Anti-HBc (+), anti-HBs (+)	Anti-HBc (+), anti-HBs (−)	No HBV marker	Anti-HBs (+)
Number	17	1	105	48	157	55
Mean age years (range)	48 (29–72)	54	47 (21–75)	45 (27–56)	46 (18–78)	42 (7–77)
Sex ratio (male/female)	7.5	0	2.5	0.9	2.8	3.5
European (302)	15	0	76	27	136	48
African (74)	2	1	28	19	20	4
Others (7)	0	0	1	2	1	3
Mean CD4 cells/mm^3 (range)	487 (115–1246)	275	472 (39–1320)	458 (39–1262)	435 (4–1520)	496 (188–1522)
Number of patients with CD4 count < 350 cells/mm^3	7	1	30	20	61	18
HBV-DNA-positive (treated with HBV drug)	8[a] (6)	1 (1)	0	2[b] (0)	1 (1)	0
HBV-DNA range ($\log_{10}$ copies/ml)[c]	ND–8.9	1.9	—	ND–2.99	ND–detectable	—
Positive HBe Ag	5	1	0	0	0	0
Patients treated with HAART	17 (100%)	1 (100%)	92 (88%)	45 (94%)	137 (87%)	44 (80%)
Anti-HBV drugs	15	1	79 (75%)	43 (90%)	112 (71%)	38 (69%)
Lamivudine	1	0	54	26	77	22
Tenofovir	0	0	0	0	2	1
Tenofovir + lamivudine	1	1	1	2	3	2
Tenofovir + emtricitabine	13	0	24	15	30	13
Positive anti-HCV antibodies	2 (12%)	0	16 (15%)	16 (33%)	14 (9%)	2 (3.6%)
Positive HCV viral load	0	0	6	8	6	2

ND: not detected; HAART, highly active antiretroviral therapy.
[a]Including case report patient 1.
[b]Including case report patient 2.
[c]HBV-DNA range from 1.53 to 9.53 $\log_{10}$ copies/ml.

load to decline from 8.9 to 1.84 $\log_{10}$ at week 48. This patient was no longer considered.

Patients with negative HBsAg. Among HBsAg negative patients, 105 (105/383, 27%) were anti-HBc and anti-HBs positive and 48 (48/383, 12%) had isolated anti-HBc antibodies. Fifty-five (55/383, 14%) were positive for anti-HBs only.

In the anti-HBc and anti-HBs antibodies-positive patients (105/383), only 25% of patients did not receive a HAART containing an active anti-HBV therapy and all were HBV-DNA negative.

Among the 48 patients with isolated anti-HBc antibodies HBV-DNA was detected positive in two patients who were not under anti-HBV drugs (including case report patient 2).

None of the isolated anti-HBs positive patients (55/383) presented HBV-DNA positivity. Sixty-nine percent were under HAART including anti-HBV therapy.

HBV-DNA was detected in one patient (1/157) without any other serological HBV markers and the presence of HBV-DNA was confirmed by repetitive and different real-time PCR tests. This patient received HAART including lamivudine.

Altogether, HBV-DNA was detected in 2 of the 48 patients with isolated anti-HBc antibodies. In addition, HBV-DNA was detected in one patient without any other serological HBV markers, corresponding to a prevalence of occult HBV of 0.8% (3/383) in the entire cohort (Table II).

Prevalence of HCV Serological Markers and HCV Viremia

Fifty (50/383, 13%) patients were positive for total anti-HCV antibodies, 22 (22/50, 44%) presenting an HCV-positive viral load. In this study, all patients positive for HCV were HBV-DNA negative.

Sequence Analysis and Genotyping

In most patients, determination of the HBV genotype was not performed due to the low HBV viral load.

Sequences of the PreS2/S gene were obtained and analyzed for only 7 out of 12 HBV-DNA. Phylogenetic comparison of all sequenced DNA with reference strains assigned five of the seven strains to genotype E (including case report patient 1) and two sequences to genotype A (including case report patient 2).

No mutations in the HBV polymerase protein, which are known to be significantly associated with drug resistance to HBV treatment with lamivudine and tenofovir, were observed. Thus, none of the seven strains presented resistance to anti-HBV drugs. Among these seven sequenced strains, three HBV-DNA positive patients were under effective anti-HBV therapy. No compliance problems were noted for these three patients who maintained a sustained negative HIV viral load. Pharmacological data were not available.

DISCUSSION

HAART, especially including drugs active against HBV, could contribute to a prolonged suppression of HBV replication [Benhamou, 2007]. In contrast, it is now well known that withdrawal of theses drugs has been associated with reactivation of HBV infection [Chamorro et al., 2005; Puoti et al., 2006]. One should keep in mind that, in patients infected with HIV with isolated anti-HBc antibodies, high viremic reactivation may occur [Clark et al., 2006; Gartner et al., 2007; Schnepf et al., 2007]. When anti-HIV treatments are changed because of intolerance or lack of efficacy due to HIV strain resistance to nucleoside analog, anti-HBV treatment can be continued or the HBV viral load should at least be closely monitored to prevent or detect HBV reactivation. This is highlighted by the case of Patient 1; lamivudine or tenofovir should be used in patients infected with HIV as part of HAART regardless of their HBV status and because of its favorable safety profile. In addition, the treatment established in accordance with HIV response should not be stopped without considering HBV infection. Unfortunately, HBV-DNA was not tested immediately in this patient when the anti-HIV treatment was changed because of lack of virological response confirmed by genotype resistance of the HIV strain. Furthermore, in the case of Patient 1 as well as in other cases of apparent HBV reactivation, the hypothesis of a reinfection by another HBV strain could be considered [Hino et al., 2002]. But in regards to the history of the disease for Patient 1, a new acquisition of HBV is not very probable, even if the comparison of the HBV genotype through sequencing methods could not be performed since the sample from the first hepatitis episode was not available.

The findings in Patient 2 may suggest that immunorestoration during HAART, even without lamivudine, played a major role in controlling chronic hepatitis B [Manegold et al., 2001; Clark et al., 2006]. In addition, the presence of anti-HBs in a case of resolved hepatitis B does not protect completely against reactivation (case report patient 2). These data illustrate that an HBV infection might reactivate despite the presence of anti-HBs at the time of HIV diagnosis and that the HBV serological profile should be controlled regularly. In Patient 2, no lamivudine-resistant strains had been selected even when the HBV-DNA load reached 2.7 $\log_{10}$ copies/ml only 1 month after lamivudine treatment interruption; it is likely that the viral HBV-DNA breakthrough was related to the withdrawal of the drug. In accordance with previous studies where HBV reactivation could be attributed to the withdrawal of lamivudine, it is obvious that the loss of anti-HBs antibodies and increasing HBV viral load reinforces this hypothesis.

In the cohort described in the current study, the use of a sensitive PCR (lower limit 35 copies/ml or 1.53 $\log_{10}$ copies/ml) has only identified three patients presenting HBV-DNA: two patients presented positive anti-HBc antibodies as the only virological marker, along with one patient having positive DNA without any other marker. The prevalence of occult HBV in this cohort reached 0.8% (3/383). This prevalence was close to that of two other French studies, the Aquitaine cohort

(0.6%) and the ANRS HC02 RIBAVIC cohort (1.4%) [Neau et al., 2005; Piroth et al., 2008], but less than in antiretroviral naïve patients (4.7%) [Cohen Stuart et al., 2009]. There are several possible explanations for the low prevalence of HBV-DNA among the anti-HBc antibodies-positive subjects in this study. This low rate might be explained by the fact that a significant proportion of the patients received antiretroviral therapy: 75–90% of patients with anti-HBc and/or anti-HBs antibodies were under HAART regimens containing anti-HBV activity, including drugs such as lamivudine, tenofovir, or tenofovir/emtricitabine, which have an effect on HBV replication [Dore et al., 1999].

In addition, 7 out of 12 patients (all HBsAg positive), showed a suboptimal response characterized by low-level HBV replication while receiving tenofovir or lamivudine-containing HAART after an average of 25 months (1–60 months) of treatment. In these seven patients, the sustained undetectable HIV viral load could exclude compliance problems. In the absence of genotype resistance, the reason for this incomplete virus suppression was unknown, but suboptimal virus response in a proportion of patients has been reported in previous studies [Dore et al., 1999; Bani-Sadr et al., 2004; Stephan et al., 2005]. This could also be explained by different treatment schedules.

The overall prevalence of HCV (13%) was lower than the one reported in other populations infected with HIV [Hofer et al., 1998; Nunez et al., 2002; Piroth et al., 2002] but close to a recent study where occult HBV infections in patients infected with HIV were described to be independent of HCV serostatus [Nebbia et al., 2007].

The cohort study and the two cases described above have several important consequences for the care of patients infected with HIV. First, on initial evaluation patients should be screened for HBsAg, anti-HBc, and anti-HBs antibodies. If patients are negative for HBV markers they should be vaccinated against HBV. Second, it is necessary to monitor HIV patients with HBV positive markers, especially anti-HBc antibodies-positive patients, by quantifying either HBsAg, HBV-DNA or even anti-HBs, if present (case of patient 2). Third, if patients are positive only for anti-HBc antibodies, the follow-up should be based on HBV-DNA levels. If patients present a high viral HBV-DNA load at the initiation of HAART, management and therapeutic options should follow the guidelines and criteria established during the first European Consensus Conference on the treatment of chronic hepatitis B in HIV co-infected patients [Alberti et al., 2005]. In fact, the serological pattern of Patient 1 confirmed the necessity to identify patients infected with HIV with previous HBV infection and to maintain effective HIV and HBV antiviral therapy in such patients. As an example of the risk posed by uncontrolled disease, the withdrawal of these drugs leads to active HBV replication. Furthermore, patients treated with HAART, including anti-HBV drugs without knowledge of HBV status prior to treatment initiation, should be strictly monitored for HBV-DNA and discontinuation of anti-HIV drugs with activity against HBV must be approached with caution.

In conclusion, a serological profile of isolated anti-HBc antibodies is seldom associated with occult HBV infection in patients infected with HIV in this study, perhaps in relation to the high proportion of patients under dual HIV-HBV HAART regimens. Further studies should examine the long-term clinical implications of occult HBV in patients infected with HIV, notably in cases of a light HBV viral load. The clinical significance of this occult hepatitis is still a matter of controversy.

REFERENCES

Alberti A, Clumeck N, Collins S, Gerlich W, Lundgren J, Palu G, Reiss P, Thiebaut R, Weiland O, Yazdanpanah Y, Zeuzem S. 2005. Short statement of the first European Consensus Conference on the treatment of chronic hepatitis B and C in HIV co-infected patients. J Hepatol 42:615–624.

Bani-Sadr F, Palmer P, Scieux C, Molina JM. 2004. Ninety-six-week efficacy of combination therapy with lamivudine and tenofovir in patients coinfected with HIV-1 and wild-type hepatitis B virus. Clin Infect Dis 39:1062–1064.

Benhamou Y. 2007. Hepatitis B in the HIV-coinfected patient. J Acquir Immune Defic Syndr 45:S57–S65; discussion S57–S66.

Chamorro AJ, Casado JL, Bellido D, Moreno S. 2005. Reactivation of hepatitis B in an HIV-infected patient with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24:492–494.

Chemin I, Trepo C. 2005. Clinical impact of occult HBV infections. J Clin Virol 34:S15–S21.

Clark SJ, Creighton S, Horner M, Smith HM, Portmann B, Taylor C, Cramp ME. 2006. Reactivation of latent hepatitis B virus infection with HIV-related immunosuppression. Int J STD AIDS 17:67–69.

Cohen Stuart JW, Velema M, Schuurman R, Boucher CA, Hoepelman AI. 2009. Occult hepatitis B in persons infected with HIV is associated with low CD4 counts and resolves during antiretroviral therapy. J Med Virol 81:441–445.

Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Chowdhury A, Chakravarty R. 2006. Genotype, phylogenetic analysis, and transmission pattern of occult hepatitis B virus (HBV) infection in families of asymptomatic HBsAg carriers. J Med Virol 78:53–59.

Dore GJ, Cooper DA, Barrett C, Goh LE, Thakrar B, Atkins M. 1999. Dual efficacy of lamivudine treatment in human immunodeficiency virus/hepatitis B virus-coinfected persons in a randomized, controlled study (CAESAR). The CAESAR Coordinating Committee. J Infect Dis 180:607–613.

Filippini P, Coppola N, Pisapia R, Scolastico C, Marrocco C, Zaccariello A, Nacca C, Sagnelli C, De Stefano G, Ferraro T, De Stefano C, Sagnelli E. 2006. Impact of occult hepatitis B virus infection in HIV patients naive for antiretroviral therapy. AIDS 20:1253–1260.

Gartner BC, Jung W, Welsch C, Fischinger J, Schubert J, Zeuzem S, Mueller-Lantzsch N, Wend UC, Gerlich WH. 2007. Permanent loss of anti-HBc after reactivation of hepatitis B virus infection in an anti-HBs and anti-HBc-positive patient after allogeneic stem cell transplantation. J Clin Virol 38:146–148.

Gutierrez S, Guillemi S, Jahnke N, Montessori V, Harrigan PR, Montaner JS. 2008. Tenofovir-based rescue therapy for advanced liver disease in 6 patients coinfected with HIV and hepatitis B virus and receiving lamivudine. Clin Infect Dis 46:28–30.

Hino K, Basuni AA, Ireland J, Newell A, Mphahlele J, Smit EJ, Ngui SL, Teo CG, Carman WF. 2002. Reappearance of hepatitis B surface antigen in immunocompromised individuals: Reinfection or reactivation? Dig Dis Sci 47:415–418.

Hofer M, Joller-Jemelka HI, Grob PJ, Luthy R, Opravil M. 1998. Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. Swiss HIV Cohort Study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17:6–13.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. 2002. Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. J Clin Microbiol 40:4068–4071.

Lo Re, V III, Frank I, Gross R, Dockter J, Linnen JM, Giachetti C, Tebas P, Stern J, Synnestvedt M, Localio AR, Kostman JR, Strom BL. 2007. Prevalence, risk factors, and outcomes for occult hepatitis B virus infection among HIV-infected patients. J Acquir Immune Defic Syndr 44:315–320.

Lukhwareni A, Burnett RJ, Selabe SG, Mzileni MO, Mphahlele MJ. 2009. Increased detection of HBV DNA in HBsAg-positive and HBsAg-negative South African HIV/AIDS patients enrolling for highly active antiretroviral therapy at a Tertiary Hospital. J Med Virol 81:406–412.

Manegold C, Hannoun C, Wywiol A, Dietrich M, Polywka S, Chiwakata CB, Gunther S. 2001. Reactivation of hepatitis B virus replication accompanied by acute hepatitis in patients receiving highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 32:144–148.

Miailhes P, Trabaud MA, Pradat P, Lebouche B, Chevallier M, Chevallier P, Zoulim F, Trepo C. 2007. Impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on the natural history of hepatitis B virus (HBV) and HIV coinfection: Relationship between prolonged efficacy of HAART and HBV surface and early antigen seroconversion. Clin Infect Dis 45:624–632.

Neau D, Winnock M, Jouvencel AC, Faure M, Castera L, Legrand E, Lacoste D, Ragnaud JM, Dupon M, Fleury H, Lafon ME, Dabis F. 2005. Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients with isolated antibodies to hepatitis B core antigen: Aquitaine cohort, 2002–2003. Clin Infect Dis 40:750–753.

Nebbia G, Garcia-Diaz A, Ayliffe U, Smith C, Dervisevic S, Johnson M, Gilson R, Tedder R, Geretti AM. 2007. Predictors and kinetics of occult hepatitis B virus infection in HIV-infected persons. J Med Virol 79:1464–1471.

Nunez M, Rios P, Perez-Olmeda M, Soriano V. 2002. Lack of 'occult' hepatitis B virus infection in HIV-infected patients. AIDS 16:2099–2101.

Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, Yousukh A, Samountry B, Thammavong T, Toriyama K, Muller CP. 2008. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. Emerg Infect Dis 14: 1777–1780.

Olinger CM, Venard V, Njayou M, Oyefolu AO, Maiga I, Kemp AJ, Omilabu SA, le Faou A, Muller CP. 2006. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: New subtypes, mixed infections and recombinations. J Gen Virol 87:1163–1173.

Peters MG. 2007. Diagnosis and management of hepatitis B virus and HIV coinfection. Top HIV Med 15:163–166.

Piroth L, Binquet C, Vergne M, Minello A, Livry C, Bour JB, Buisson M, Duong M, Grappin M, Portier H, Chavanet P. 2002. The evolution of hepatitis B virus serological patterns and the clinical relevance of isolated antibodies to hepatitis B core antigen in HIV infected patients. J Hepatol 36:681–686.

Piroth L, Carrat F, Larrat S, Goderel I, Martha B, Payan C, Lunel-Fabiani F, Bani-Sadr F, Perronne C, Cacoub P, Pol S, Morand P. 2008. Prevalence and impact of GBV-C, SEN-V and HBV occult infections in HIV-HCV co-infected patients on HCV therapy. J Hepatol 49:892–898.

Puoti M, Torti C, Bruno R, Filice G, Carosi G. 2006. Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. J Hepatol 44:S65–S70.

Raffa G, Maimone S, Cargnel A, Santantonio T, Antonucci G, Massari M, Schiavini M, Caccamo G, Pollicino T, Raimondo G. 2007. Analysis of occult hepatitis B virus infection in liver tissue of HIV patients with chronic hepatitis C. AIDS 21:2171–2175.

Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. 2007. Occult hepatitis B virus infection. J Hepatol 46:160–170.

Santos EA, Yoshida CF, Rolla VC, Mendes JM, Vieira IF, Arabe J, Gomes SA. 2003. Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22:92–98.

Schnepf N, Sellier P, Bendenoun M, Zini JM, Sanson-le Pors MJ, Mazeron MC. 2007. Reactivation of lamivudine-resistant occult hepatitis B in an HIV-infected patient undergoing cytotoxic chemotherapy. J Clin Virol 39:48–50.

Stephan C, Berger A, Carlebach A, Lutz T, Bickel M, Klauke S, Staszewski S, Stuermer M. 2005. Impact of tenofovir-containing antiretroviral therapy on chronic hepatitis B in a cohort co-infected with human immunodeficiency virus. J Antimicrob Chemother 56:1087–1093.

Thio CL. 2003. Hepatitis B in the human immunodeficiency virus-infected patient: Epidemiology, natural history, and treatment. Semin Liver Dis 23:125–136.

Toro C, Jimenez V, Rodriguez C, Del Romero J, Rodes B, Holguin A, Alvarez P, Garcia-Campello M, Gomez-Hernando C, Guelar A, Sheldon J, de Mendoza C, Simon A, Soriano V. 2006. Molecular and epidemiological characteristics of blood-borne virus infections among recent immigrants in Spain. J Med Virol 78:1599–1608.

FACULTE DE PHARMACIE UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 16 juin 2010

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par Bénédicte BLOQUEL

Sujet :

Hépatite B et variabilité du génome du virus de l'hépatite B

Etude de la prévalence, chez le patient co-infecté par le virus de l'immunodéficience humaine

Jury :
Président : Pr. Chantal FINANCE

Juges : Dr. Véronique VENARD (Directeur)
Pr. Jean-Pierre BRONOWICKI
Pr. Christian RABAUD

Vu,

Nancy, le 29 avril 2010

Le Président du Jury — Le Directeur de Thèse

Mme Finance — **Mme Venard**

Vu et approuvé,

Nancy, le 30 AVR. 2010

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 7.05.2010

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY 1 LE PRÉSIDENT

Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement : 3283

Résumé

Le virus de l'hépatite B (VHB) est le vecteur d'une infection hépatique persistante, susceptible de se réactiver au décours d'une défaillance immunitaire, quelle qu'ait été sa forme clinique initiale.

Ainsi, le patient séropositif pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) à risque accru de contage par le VHB, présente d'emblé un sur-risque de réactivation de l'hépatite B et une co-morbidité hépatique non négligeable sous « highly active antiretroviral therapy » (HAART).

Une étude menée au sein d'une cohorte nancéienne de 383 patients VIH⊕, suivis en consultation de Maladies Infectieuses et Tropicales, montra que la prévalence de contage par le VHB atteignait 45% de la population étudiée. Un « core isolé » (Ac anti-HBc) était retrouvé chez 12% des patients, dont deux présentaient une hépatite occulte, alors que 75% des patients recevaient une HAART intégrant au moins une molécule active sur le VHB.

Durant cette étude, trois cas de réactivations furent observés, à l'occasion d'une fenêtre thérapeutique en situation d'échappement virologique. Ces réactivations aiguës illustrent l'intérêt d'une prise en charge spécifique de l'infection par le VHB du patient VIH⊕, reposant sur un bilan sérologique initial, qui devrait être répété associé à une mesure régulière de charge virale VHB, avant et dans le mois suivant l'instauration de toute nouvelle ligne de traitement.

De plus, les variations génomiques induites sous traitement devront être étudiées et des mutations de résistance recherchées en situation d'échappement virologique, afin d'optimiser la prise en charge du patient et de mieux comprendre l'impact de cette variabilité sur la morbidité hépatique et la survenue d'hépatite occulte chez le patient co-infecté.

Mots clés : virus de l'hépatite B (VHB) ; co-infection VIH-VHB ; hépatite occulte ; core isolé ; réactivation.