

Influence des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur la disparition de l'antigène HBs circulant lors du traitement de l'hépatite chronique B par analogues nucléos(t)idiques : mécanismes moléculaires impliqués et développement d'un traitement immunomodulateur à base d'anticorps monoclonaux

Aurélie Rusch-Velay

▶ **To cite this version:**

Aurélie Rusch-Velay. Influence des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur la disparition de l'antigène HBs circulant lors du traitement de l'hépatite chronique B par analogues nucléos(t)idiques : mécanismes moléculaires impliqués et développement d'un traitement immunomodulateur à base d'anticorps monoclonaux. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0284 . tel-01754577

HAL Id: tel-01754577
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754577

Submitted on 30 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.

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Aurélie Velay-Rusch**

Influence des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur la disparition de l'antigène HBs circulant lors du traitement de l'hépatite chronique B par analogues nucléos(t)idiques: Mécanismes moléculaires impliqués et développement d'un traitement immunomodulateur à base d'anticorps monoclonaux

Thèse soutenue publiquement le 7 décembre 2015

Membres du jury :

Rapporteurs :	**Mme Heïdi Barth**	MCU-PH, UMR 1109, Strasbourg
	Mr Gilles Prévost	MCU-PH, EA 7290, Strasbourg
Examinateurs :	**Mr Jean Pierre Bronowicki** "Président du jury"	PU-PH, UMR 954, Vandoeuvre-lés-Nancy
	Mme Anne Marie Roque-Afonso	PU-PH, UMR 1193, Université Paris Sud, Villejuif
	Mme Evelyne Schvoerer	PU-PH, EA 7300, Vandoeuvre-lés-Nancy **Directrice de thèse**
	Mme Hélène Jeulin	MCU-PH, EA 7300, Vandoeuvre-lés-Nancy **Co-directrice de thèse**

EA 7300, Stress Immunité et Pathogènes
Faculté de médecine
9 avenue de la Forêt de Haye
F-54500 Vandoeuvre-lés-Nancy

Préambule

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les membres de ce jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse :

Madame le Docteur Heidi Barth,
Je te remercie d'avoir accepté d'être rapporteur externe et de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse. Ton parcours et tes qualités scientifiques sont pour moi un exemple.

Monsieur le Docteur Gilles Prévost,
Vous m'avez fait l'honneur de suivre ce travail au cours de mes deux comités de suivi de thèse. Je vous remercie une nouvelle fois d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur externe. Merci pour votre disponibilité et votre bienveillance à ces différentes étapes de mon parcours.

Madame le Professeur Anne Marie Roque-Afonso,
Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinateur externe. Veuillez accepter l'assurance de mon profond respect et de ma gratitude.

Monsieur le Professeur Jean Pierre Bronowicki,
Soyez assuré de ma sincère reconnaissance pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider ce jury de thèse.

Madame le Professeur Evelyne Schvoerer,
Je te remercie pour m'avoir offert l'opportunité de travailler sur un sujet aussi passionnant que celui-ci et d'avoir dirigé ce travail. Et enfin, merci pour avoir pris le temps de corriger ce manuscrit.

Madame le Docteur Hélène Jeulin,
Je te remercie d'avoir co-encadré ce travail de thèse et pour tes conseils dans la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier monsieur le Professeur Jean Pol Frippiat, directeur de l'EA 7300, de m'avoir accueillie dans son équipe au cours de ses trois années.

Je tiens également à adresser mes remerciements aux personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail :

Monsieur le Professeur Fabien Zoulim, directeur de l'unité Inserm UI 1052 de Lyon et son équipe en particulier Monsieur le Docteur David Durantel et Dulce Alfaïate pour leur accueil à Lyon et leurs nombreux conseils pour l'implantation du modèle fonctionnel.

Marine Eschlimann, pour son aide précieuse, sa gentillesse. Ce fût un très grand plaisir de travailler avec toi. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton parcours et j'espère que nos chemins professionnels se croiseront à nouveau.

Madame Myriam Bronner, Madame Sibel Berger, pour leur aide précieuse dans la mise au point et la réalisation de l'ultra-deep sequencing et du séquençage direct.

Madame Christine Legrand-Frossi, pour son aide et ses conseils dans la mise au point du Western Blot. Merci pour tes conseils avisés et ta disponibilité lors de mon passage nancéen.

Mesdames les Professeurs Françoise Stoll-Keller et Samira Fafi-Kremer, pour m'avoir permis de mener à terme ce travail de thèse. Merci pour la bienveillance dont vous avez fait preuve à mon égard depuis mon retour dans votre équipe.

Madame le Docteur Véronique Venard, madame le Professeur Chantal Finance, pour leur accueil et leurs conseils lors de mon passage au laboratoire de Virologie du CHU de Nancy.

Les techniciennes des plateformes d'immuno-diagnostique, de génomique microbienne et de culture. Merci à toutes pour votre très grande gentillesse, votre disponibilité et vos témoignages d'amitié lors de ces trois années parfois difficiles.

Les membres de l'EA 7300, Anne Marie, Lysiane, Fanny, Nassima, Stéphanie, Guillaume, Armelle, Sandra, Marie et Anne.

Mes collègues du laboratoire de virologie du CHU de Strasbourg, pour votre soutien dans cette épreuve et votre accueil chaleureux lors de mon retour à Strasbourg : Morgane, Véronique, Rachel, Éric, Pierre, Charlotte et Quentin. Plus particulièrement merci Marie Jo

pour ton accueil, ta disponibilité, tes conseils avisés et la très grande bienveillance dont tu as toujours fait preuve envers moi. C’est un plaisir de travailler à tes côtés.

A ma fille Mathilde qui vaut toutes les thèses du monde

Et à mon mari Alain, merci pour ton soutien sans faille dans cette épreuve.

Table des matières

Préambule **2**

Remerciements 4

Table des matières 8

Liste des principales abréviations 12

Table des figures 16

Table des tableaux 18

Table des annexes 20

Données bibliographiques **22**

1. Le Virus de l'Hépatite B **24**

1.1. Historique et découverte du virus 24

1.2. Taxonomie 26

1.3. Les caractéristiques structurales du virus 30

1.3.1. La particule de Dane 31

1.3.2. Les particules subvirales 35

1.4. Le cycle réplicatif du VHB 36

1.4.1. Entrée du virus dans les cellules permissives 37

1.4.2. Transport des nucléocapsides vers le noyau 40

1.4.3. Conversion du brin d'ADNrc en ADNccc 40

1.4.4. Transcription du génome viral 41

1.4.5. Réplication du génome viral 41

1.4.6. Sécrétion des virions 43

2. La variabilité génétique du virus **47**

2.1. Notion de quasi-espèce virale 47

2.2. Variabilité génotypique 48

2.3. Variabilité phénotypique 52

2.3.1. Les mutants préC/C 52

2.3.2. Les mutants de la polymérase 56

2.3.3. Les mutants préS1 et préS2 56

2.3.4. Les mutants de la protéine S 57

3. L'infection par le virus de l'hépatite B **60**

3.1. Epidémiologie 60

3.2. Modes de transmission 64

3.3. Histoire naturelle de l'infection 65
3.3.1. L'infection aiguë 66
3.3.2. L'infection chronique 67
3.3.3. Les complications de l'infection chronique 72
3.4. Physiopathologie et réponse immunitaire 75
3.4.1. La réponse immune innée 75
3.4.2. La réponse immune adaptative 76
3.5. Prise en charge et traitement de l'infection chronique 79
3.5.1. Les molécules antivirales 79
3.5.2. But(s) et indications du traitement antiviral 86
3.5.3. Evaluation de la réponse thérapeutique 89
3.5.4. Les molécules en développement 91
3.5.5. Prévention de l'infection par le VHB 94
4. Les modèles d'étude du VHB 96
4.1. Etude du fitness viral *in vivo* : les modèles animaux 96
4.1.1. Les modèles animaux infectés par d'autres *Hepadnaviridae* 96
4.1.2. Modèles animaux infectés par le VHB 98
4.2. Etude du fitness viral *in vitro* 101
4.2.1. Les lignées cellulaires 101
4.2.2. Etude de la réplication 105
4.2.3. Tests d'assemblage et d'infection 106
5. Les protéines d'enveloppe du VHB 108
5.1. Structure des glycoprotéines d'enveloppe 108
5.2. Fonctions des glycoprotéines d'enveloppe 111
Objectifs 116
Partie 1 : *Analyses in silico* 122
1. Matériels et méthodes 124
1.1. Constitution de la cohorte : 124
1.2. Volet 1 : étude *In Silico* 126
1.2.1. Séquençage direct : 126
1.2.2. Analyse des séquences par bioinformatique 133
1.3. Ultra-Deep Sequencing (UDS) 135
1.3.1. Amplification du génome viral 136

1.3.2. Préparation de la librairie 137
1.3.3. Amplification clonale des fragments d'ADN 140
1.3.4. Enrichissement 141
1.3.5. Réaction de séquençage 141
1.3.6. Analyse des résultats bruts sur le logiciel NextGEne V2.34 141
2. Résultats 142
2.1. Constitution de la cohorte 142
2.2. Résultats du séquençage direct 145
2.2.1. Variabilité intragroupe et intra-génotypique 145
2.2.2. Comparaison des séquences aa entre groupes R et NR 146
2.2.3. Analyse de covariance 149
2.2.4. Prédiction de l'antigénicité 149
2.3. Ultra-Deep sequencing 152
2.3.1. Performances analytiques obtenues 152
2.3.2. Analyses des variants identifies en UDS 152
2.3.3. Analyse de la diversité génétique 153
2.3.4. Evaluation de l'antigénicité prédite 154
3. Discussion 154
3.1. Constitution de la cohorte 154
3.2. Analyses *in silico* 155
4. Article 157
Partie 2 : Tests fonctionnels *in vitro* 158
1. Matériel et méthodes 160
1.1. Lignées cellulaires utilisées 160
1.2. Description et amplification des plasmides 160
1.2.1. Description des plasmides 160
1.2.2. Amplification des plasmides : 160
1.2.3. Extraction et purification des ADNs plasmidiques. 161
1.2.4. Mutagénèse dirigée : 161
1.3. Production des particules VHB/Delta 162
1.3.1. Transfection des cellules Huh7 162
1.3.2. Récolte des productions particulaires 163
1.3.3. qRT-PCR Delta 163

1.3.4. Dosage par Chimioluminescent Assay (CMIA) Architect Abbott 164
1.4. Tests d'infection 165
1.4.1. Différenciation des cellules HepaRG. 165
1.4.2. Protocole d'infection 165
1.4.3. Lyse et récolte du tapis cellulaire infecté 166
1.4.4. qRT-PCR Delta 166
2. Résultats 166
2.1. Obtention des plasmides 166
2.1.1. Séquençage direct du plasmide pT7HB2.7 166
2.1.2. Vérification du plasmide pSLVD3 167
2.1.3. Obtention et vérification des plasmides mutés 167
2.2. Production des particules virales 167
2.2.1. Qualification des productions 168
2.3. Tests d'infection 172
3. Discussion : 172
3.1. Choix des variants à tester 172
3.2. Choix du modèle cellulaire 172
3.3. Qualification des productions particulaires par qRT-PCR et par CMIA. 173
3.4. Les tests d'infection 174
Perspectives et conclusions générales 178
Références bibliographiques 184

Liste des principales abréviations

aa : acide aminé

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNccc : ADN super-enroulé, (covalently closed circular)

ADNrc : ADN relâché circulaire

ADV : Adéfovir dipivoxil

Ag : Antigène

Ag HBs : Antigène HBs

ALAT : Alanine Amino transférase

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNm PC : ARNm précore

ARNpg : ARN pré-génomique

ARNsg : ARN sub-génomique

ASHV : Arctic Squirrel

Au : Australia antigen

BCP : Promoteur Basal du Core

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMIA : Chimiluminescent Immuno Assay

DC : Dendritic Cell

DHBV : Duck Hepatitis B Virus

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DR : Direct Repeat

EASL : European Association for the Study of the Liver

ETV : Entécavir

GSHV : Ground Squirrel Hepatitis Virus

HBc : Hepatitis B core

HBe : Hepatitis B e

HBs : Hepatitis B surface

HBSP : Hepatitis B Splice Protein

HSPG : Héparanes Sulfates Protéoglycanes

IFN : Interféron

ISG : Interferon Stimulated Genes

InVS : Institut national de Veille Sanitaire

LdT : Telbivudine

LMV : Lamivudine

LTc : Lymphocytes T cytotoxiques

LTh : Lymphocytes T helper

MHR : Major Hydrophilic region

NK : Natural Killer

NTCP : Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide

NUC : Nucleoside/Nucleotide Analog

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : Open Reading Frame

pb : paire de base

PBH : Ponction Biopsie Hépatique

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : Polyéthylène Glycol

Peg IFN : Interféron pégylé

PHH : Primary Human Hepatocyte

PTH : Primary Tupaïa Hepatocyte

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RBS : Receptor Binding Site

RE : Réticulum Endoplasmique

SCID : Severe Combined Immunodeficiency

SVF : Serum de veau foetal

SVP : Subviral Particle

TDF : Ténofovir disoproxil fumarate

TLM : Translocation Motif

TP : Terminal Protein

UDIV : Usagers de Drogues par voie Intraveineuse

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VHD : Virus de l'Hépatite Delta

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WHV : Woodchuck Hepatitis Virus

WMHBV : Wooly Monkey Hepatitis B Virus

Table des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des orthohepadnavirus (Schaefer, 2007). 28
Figure 2 : Représentation schématique de la particule de Dane (Pollicino *et al.*, 2014). 32
Figure 3 : Organisation génomique du VHB, adapté de Wei *et al.*, 2010. 34
Figure 4 : Morphologie des particules virales et subvirales visibles au microscope électronique dans le sérum d'un patient infecté (Wei *et al.*, 2010). 36
Figure 5 : Modèle proposé pour le déroulement des étapes précoces de l'entrée virale (Xiao *et al.*, 2013). 40
Figure 6 : Initiation de la rétro-transcription de l'ARN pré-génomique (Beck et Nassal, 2007). 42
Figure 7 : Représentation schématique de la formation d'ADNrc à partir de l'ARN pré-génomique (Beck et Nassal, 2007). 43
Figure 8 : Topologie transmembranaire des protéines d'enveloppe du VHB et représentation schématique des interactions nucléocapside mature/ protéine d'enveloppe (Bruss, 2007). 44
Figure 9 : Représentation schématique du cycle réplicatif du VHB (Urban, 2010). 45
Figure 10 : Représentation schématique de la mutation G1896A du promoteur BCP (Tong *et al.*, 2013). 54
Figure 11 : Prévalence de l'infection par le VHB (Dawson, 2005). 61
Figure 12 : Estimation du taux de prévalence du portage de l'Ag HBs en France d'après un recueil de données issues des laboratoires privés participant à l'étude Labohep entre 2010 et 2012 (Enquête InVS Labohep, 2010). 62
Figure 13 : Répartition mondiale des différents génotypes du VHB (d'après Kurbanov *et al.*, 2010). 63
Figure 14 : Histoire naturelle de l'infection par le VHB (Pol, 2006). 66
Figure 15 : Les différentes phases de l'histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB (Dény et Zoulim, 2010). 68
Figure 16 : Evolution des marqueurs biologiques au cours des phases de l'histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB. 70
Figure 17 : Mécanismes impliqués dans l'hépatocarcinogénèse virale B (Pol, 2006). 75
Figure 18 : Mécanismes non cytopathiques des LT $CD8^+$ participant à la clairance virale (Chisari *et al.*, 2010). 78
Figure 19 : Chronologie d'apparition des principales molécules utilisées dans le traitement de l'hépatite B chronique (Trepo, 2014). 79
Figure 20 : Structure chimique des analogues nucléos(t)idiques (Delaney, 2013). 81
Figure 21 : Mécanismes d'action des analogues nucléos(t)idiques (Grimm *et al*., 2011). 82
Figure 22 : Pourcentages d'isolats du VHB résistants après plusieurs années de traitement (Dény et Zoulim, 2010). 84

Figure 23 : Localisations des mutations de résistance du VHB aux NUCs (Dény et Zoulim, 2010)... 86
Figure 24 : Efficacité thérapeutique des molécules utilisées dans le traitement de l'hépatite B chronique (Gish *et al*., 2012). ... 91
Figure 25 : Les agents thérapeutiques interférant avec le cycle viral (Grimm *et al.*, 2011)... 94
Figure 26 : Photo de *Tupaïa belangeri*... 99
Figure 27 : Observation au microscope électronique de cellules HepaRG différenciées en cellules « hepatocyte-like » (h) et « epithelium-like » (e) (Gripon *et al.*, 2002). ... 103
Figure 28 : Topologie membranaire des protéines d'enveloppe du VHB (Le Duff *et al.*, 2009)... 109
Figure 29 : Les protéines d'enveloppe du VHB (Glebe et Urban, 2007). ... 111
Figure 30 : Représentation schématique des zones fonctionnelles impliquées dans le pouvoir infectieux du VHB (Urban *et al.*, 2014). ... 113
Figure 31 : Cartographie fonctionnelle des zones impliquées dans le pouvoir infectieux du VHB... 113
Figure 32 : Cartographie fonctionnelle des zones impliquées dans la réponse immunitaire contre le VHB ... 114
Figure 33 : Connexion des volets expérimentaux de l'étude. ... 120
Figure 34 : Protocole de réalisation du séquençage direct. ... 127
Figure 35 : Positionnement des amorces choisies pour le séquençage direct. ... 130
Figure 36 *:* Représentation graphiques de paramètres physico-chimiques évalués sur le Logiciel Antheprot. ... 135
Figure 37 : Arbre phylogénétique regroupant les séquences (gène S) des variants majoritaires isolés chez les patients de l'étude. ... 144
Figure 38 : Réseaux de covariance d'acides aminés identifiés. ... 149
Figure 39 : Profils d'antigénicité prédite obtenus à partir de la séquence consensus de génotype D. 151
Figure 40 : Profils Antheprot des variants majoritaires isolés chez les patients infectés par du VHB génotype A. ... 152
Figure 41 : Variabilité génétique évaluée par séquençage direct et UDS au niveau du gène S. ... 153
Figure 42 : Vérification des mutations introduites par mutagénèse dirigée. ... 167
Figure 43 : Comparaison des valeurs (en Log Cp/ml) obtenues en qRT-PCR Delta pour les variants 1 et 2. ... 169
Figure 44 : Comparaison des valeurs (en Log Cp/ml) obtenues en qRT-PCR Delta pour les variants 1 et 3. ... 169
Figure 45 : Comparaison des valeurs (en S/Co) obtenues avec le test HBsAg Qualitative II assay pour chacune des productions réalisées. ... 170
Figure 46 : Comparaison des valeurs (en UI/ml) obtenues avec le test HBsAg Quantitative assay pour chacune des productions réalisées ... 171

Table des tableaux

Tableau 1 : Quelques découvertes majeures concernant le virus de l'hépatite B. 26
Tableau 2 : Les principaux virus de la famille des *Hepadnaviridae* d'après Schaefer, 2007. 30
Tableau 3 : Principales protéines proposées comme récepteur spécifique du VHB à la surface des hépatocytes (d'après Glebe et Urban, 2007). 39
Tableau 4 : La classification en sérotypes du VHB (Kay et Zoulim, 2007). 49
Tableau 5 : Caractéristiques des génotypes et sous-types du VHB (D'après Kay et Zoulim, 2007)..... 50
Tableau 6 : Fréquence des mutants BCP et précore en fonction du génotype viral (d'après Kay et Zoulim, 2007) 55
Tableau 7 : Mutations retrouvées sur des épitopes de reconnaissance des lymphocotes B (B cell Epitope), T helper (Th Epitope) et cytotoxiques (CTL Epitope) (Ramezani *et al*., 2013).59
Tableau 8 : Techniques de Biologie moléculaire utilisées et leurs seuils de détection respectifs..... 125
Tableau 9 : Techniques sérologiques utilisées et leurs seuils de positivité respectifs 125
Tableau 10 : Liste et caractéristiques des amorces utilisées pour le séquençage direct des gènes préS1, préS2 et S. 129
Tableau 11 : Nombre de séquences utilisées pour établir les séquences consensus d'après l' HBVdb release 24.0 (mise à jour le 01/10/2015) (Lyon, http://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/) (Hayer J. *et al.,* 2013). 134
Tableau 12 : Temps de fragmentation en fonction de la région génomique. 138
Tableau 13 : Tailles optimales des fragments sélectionnés pour l'analyse. 139
Tableau 14 : Appariement des patients selon l'âge, le sexe et le génotype viral. 142
Tableau 15 : Données clinico-biologiques des patients infectés par du VHB génotype D... 143
Tableau 16 : Données clinico-biologiques des patients infectés par du VHB génotype A... 144
Tableau 17 : Variabilité intragroupe observée pour chacun des génotypes étudiés. 145
Tableau 18 : Comparaison des séquences aa par paire de patient, génotype D, gène S. 147
Tableau 19 : Comparaison des séquences aa par paire de patient, génotype A, gène S. 148
Tableau 20 : Impact des variants minoritaires identifiés en UDS sur l'antigénicité prédite. 154
Tableau 21 : Amorces utilisées pour les PCR de mutagénèse dirigée. 161
Tableau 22 : Amorces utilisées pour la qRT-PCR VHD (Scholter *et al.*, 2012) 164

Tableau 23 : Descriptif des anticorps utilisés dans les trousses commerciales Architect Abbott. 165
Tableau 24 : Productions particulaires exprimées en copies par ml (Cp/ml) de surnageant et en log Cp/ml. 168

Table des annexes

Annexe 1 : Séquences consensus VHB de génotype D 202
Annexe 2 : Séquences consensus VHB de génotype A 203
Annexe 3 : Séquences aa VHB des patients resolver 204
Annexe 4 : Séquences aa VHB des patients non resolver 207
Annexe 5 : Evaluation de la pression de sélection 210
Annexe 6 : Séquences (acide nucléique et aa) du plasmide pT7HB2.7 correspondant à l'ORF S 212
Annexe 7 : Protocole provisoire du Western Blot 213

Données bibliographiques

1. Le Virus de l'Hépatite B

1.1. Historique et découverte du virus

Le « premier traité de médecine » datant de 3000 ans avant Jésus Christ décrivait déjà les symptômes associés à une jaunisse (Trepo, 2014). Le développement de pratiques telles que la vaccination et la transfusion (de la fin du 18ème siècle au milieu du 19ème siècle) a permis l'émergence des concepts d'hépatite sérique puis d'hépatite B. En effet en 1885, Lührman et Jehn observèrent des épidémies de « jaunisse » au sein de populations ayant récemment été immunisées contre la variole à l'aide d'un vaccin consistant en une préparation de lymphe humaine. A partir de ces observations, Lührman suspecta le vaccin comme source de la maladie, observant pour la première fois des « hépatites sériques », aujourd'hui connues sous le nom d'hépatites B et C (Trepo, 2014). En 1908, Mc Donald émit l'hypothèse de la nature infectieuse virale des « hépatites sériques » ; un virus étant considéré à l'époque comme un agent subcellulaire infectieux pouvant être filtré. Des cas similaires furent rapportés jusque dans les années 40, renforçant l'idée d'une transmission des « hépatites sériques » provoquée par des aiguilles contaminées par du sang, l'administration de vaccins dérivés de tissus humains et enfin l'administration de produits sanguins.

Durant la seconde guerre mondiale, la propagation des hépatites virales chez de nombreux sujets transfusés motiva la réalisation d'études aux Etats-Unis et en Angleterre, basées sur la transmission d'hépatites infectieuses à des sujets volontaires. (Havens, 1946 ; Thomas, 2013 ; MacCallum, 1947). Ainsi, en 1947, MacCallum proposa une distinction claire entre les infections aiguës transmises par des aliments souillés par le virus (transmission oro-fécale), ou « hépatites A », et les hépatites sériques, ou « hépatites B », dont le temps d'incubation est de plusieurs mois et qui conduisent parfois à la chronicité (MacCallum, 1947).

En 1965, Blumberg *et al*. étudièrent le polymorphisme génétique des lipoprotéines sériques en détectant la précipitation d'anticorps (Acs) contre certains antigènes. En recherchant de façon systématique des anticorps dirigés contre différentes formes de protéines sériques chez des patients polytransfusés, ils identifièrent un anticorps réagissant contre le sérum d'un patient australien. Ce nouvel antigène présent dans le sérum d'un patient aborigène ciblé par l'anticorps présent dans le sérum du patient transfusé fut appelé « Australia antigen » (Au) (Blumberg, 2002 ; Blumberg *et al.*, 1965). Plusieurs études permirent par la suite de relier la présence de cet antigène avec le développement d'hépatites. Il fut ainsi identifié comme un constituant du virus responsable des hépatites sériques B alors appelé virus de l'hépatite B (VHB) (Blumberg *et al.*, 1967 ; Giles *et al.*, 1969 ; Gocke et Kavey, 1969 ; London *et al.*,

1969 ; Prince, 1968). L'analyse systématique des dons de sang à la recherche de l'antigène (Au) aussi appelé antigène HBs (Ag HBs), entrainant l'exclusion des lots contaminés, permit de réduire de façon significative l'incidence des hépatites « post-transfusion » (Blumberg, 1977 ; Senior *et al*., 1974).

A partir d'échantillons sériques issus de patients porteurs de l'Ag HBs, les premières images de virus en microscopie électronique furent obtenues (Bayer *et al.*, 1968 ; Dane *et al.*, 1970). Dane *et al.* observèrent trois types de particules virales : des petites sphères et des bâtonnets de 20 nm de diamètre environ, ainsi que des particules plus grosses de 45 nm, connues depuis sous le nom de particules de Dane, correspondant au virus complet et infectieux. Dans les années 70, des travaux ont permis d'établir la structure des virions et d'aboutir à l'identification de la structure du génome viral (Robinson *et al.*, 1974 ; Summers *et al.*, 1975) (tableau 1). La première séquence complète du génome du VHB a été publiée en 1979 (Galibert *et al*., 1979).

Grâce à ces découvertes le premier vaccin testé chez l'homme et efficace contre le VHB fut mis au point en 1976, puis développé à grande échelle par l'institut Pasteur et commercialisé sous le nom « Hevac B » en 1981 (Maupas *et al.*, 1976 ; Maupas *et al.*, 1978). La première génération de vaccins a été obtenue à partir de plasmas riches en Ag HBs. Grâce au développement des techniques de clonage, les vaccins obtenus par recombinaison génétique firent ensuite leur apparition. Le premier vaccin basé sur l'utilisation de protéines recombinantes de l'enveloppe virale, « Engerix B », fut développé en 1985 et mis sur le marché en 1989.

A partir de 1976, les traitements à base d'interféron furent utilisés chez les patients infectés chroniquement permettant ainsi de réduire la réplication du VHB (Desmyter *et al.*, 1976 ; Greenberg *et al.*, 1976 ; Purcell *et al.*, 1976). Suite à la découverte de l'activité reverse transcriptase, ou transcriptase inverse, de la polymérase virale par Summers *et al.* en 1982, les inhibiteurs de polymérase virale firent leur apparition (Summers et Mason, 1982). Ces deux catégories d'antiviraux, interféron et analogues nucléos(t)idiques, sont toujours utilisés à ce jour dans la prise en charge thérapeutique des malades atteints d'une hépatite B chronique.

Date	Références bibliographiques	Description de la découverte
1971	Almeida *et al.*, 1971	Description de **l'antigène de capside (HBc)**
1972	Magnius et Espmark, 1972a Magnius et Espmark, 1972b	Découverte de **l'antigène e (HBe)** : soluble présent dans le sérum des patients infectés par le VHB ; la présence d'anticorps anti-HBe est corrélée à un bon pronostic concernant l'évolution de la maladie
	Le Bouvier *et al.*, 1972	Identification des déterminants immunogéniques **a, d et y**
	Bancroft *et al.*, 1972	Identification des déterminants immunogéniques **w et r**
	Premier système de classification du virus : 4 sous-types majeurs **adw, ayw, adr et ayr**	
1973	Kaplan *et al.*, 1973	Découverte d'une **activité ADN polymérase** dans les capsides des particules de Dane
1974	Robinson *et al.*, 1974	Découverte de la molécule d'**ADN circulaire double brin**, substrat de l'ADN polymérase
1975	Summers *et al.*, 1975	Environ 20% de la molécule d'ADN existe sous une forme simple brin
1976	Maupas *et al.*, 1976 Maupas *et al.*, 1978	Mise au point chez l'homme du premier **vaccin** efficace contre le VHB
	Desmyter *et al.*, 1976 Greenberg *et al.*, 1976 Purcell *et al.*, 1976	Un traitement à base d'**interféron** permet de réduire la réplication du VHB chez les porteurs chroniques
1982	Summers et Mason, 1982	Découverte de l'activité **reverse transcriptase** de la polymérase virale
1979	Galibert *et al.*, 1979	Première **séquence complète** du génome du VHB
1988	Gripon *et al.*, 1988 Gripon *et al.*, 1995	Premier modèle d'**infection *in vitro*** par le VHB
2002	Gripon *et al.*, 2002	**Lignée HepaRG** : première lignée hépatocytaire infectable par le VHB
2005	Gripon *et al.*, 2005	Mise au point d'un peptide inhibiteur de l'entrée virale *in vitro*
2012	Yan *et al.*, 2012	Découverte du **récepteur hNTCP** comme l'un des récepteurs spécifiques du VHB

Tableau 1 : Quelques découvertes majeures concernant le virus de l'hépatite B.

1.2. Taxonomie

Les virus appartenant à la famille des *Hepadnaviridae* (*Hepatotropic DNA virus*), tel que le VHB, possèdent un certain nombre de caractéristiques communes concernant :

- leur structure : les particules virales sont sphériques, de petite taille et enveloppées ; les particules subvirales, correspondant à des enveloppes vides, sont produites en grande quantité ;

- leur génome : il est constitué d'une molécule d'ADN « relaxée » circulaire partiellement bicaténaire dont la taille et l'organisation génétique sont peu variables ;
- le mode de réplication de leur génome : il implique une étape de transcription inverse à partir de leur ARN viral ;
- leur tropisme essentiellement hépatocytaire : les hepadnavirus sont considérés comme des virus hépatotropes bien que de l'ADN viral soit aussi retrouvé dans plusieurs tissus (Korba *et al.*, 1990 ; Korba *et al.*, 1989 ; Korba *et al.*, 1986 ; Lew et Michalak, 2001) ;
- leur étroite spécificité d'hôte : le VHB n'infecte que l'homme et les primates.

Cette famille comprend deux genres distincts selon l'espèce hôte du virus : les avihepadnavirus infectant les oiseaux et les orthohepadnavirus infectant les mammifères. Le représentant type de la famille des orthohepadnavirus est le VHB, infectant naturellement l'homme mais aussi expérimentalement d'autres primates (chimpanzé, gibbon, orang-outan, gorille) ainsi que le *Tupaïa belangeri*. Cependant des souches virales infectant naturellement les primates ont été mises en évidence (HBV cpz, HBV gbn, HBV oru). Les virus isolés chez les primates sont regroupés à proximité des différents génotypes du virus humain sur les arbres phylogénétiques (Schaeffer, 2007) (figure 1). Les génomes des virus infectant le chimpanzé et le gorille présentant moins de 5 % de différences sont regroupés sous le même génotype, HBV cpz. Le premier hepadnavirus non humain, le WHV (*Woodchuck Hepatitis Virus*) fut découvert chez les marmottes américaines (Summers *et al.*, 1978 ; Schaeffer, 2007). Ultérieurement, toute une série de virus homologues (tableau 2) furent mis en évidence tels que : le GSHV (*Ground Squirrel Hepatitis Virus*), le WMHBV (*Wooly Monkey Hepatitis B Virus*), l'ASHV (*Arctic Squirrel Hepatitis Virus*).

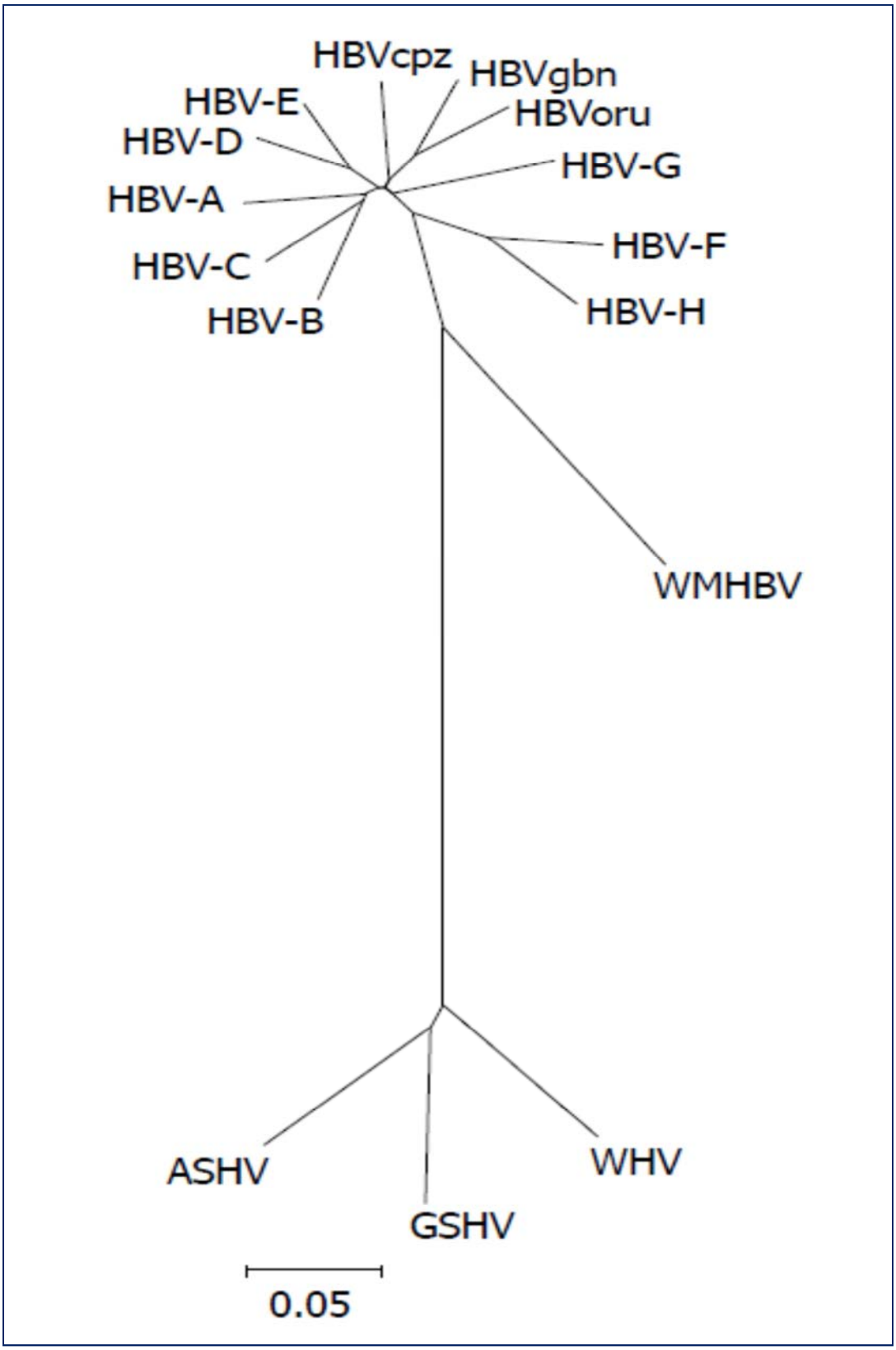


Figure 1 : Arbre phylogénétique des orthohepadnavirus (Schaefer, 2007).

Les virus aviaires sont les plus divergents par rapport aux autres *Hepadnaviridae*, présentant une faible homologie de séquence avec les orthohepadnavirus, notamment 40 % d'homologie avec le VHB (Schaefer, 2007). Leurs génomes légèrement plus courts, possèdent une organisation particulière, puisqu'ils ne codent que deux protéines d'enveloppe (L et S) et ne comportent pas de gène X individualisé. De nombreuses connaissances sur la biologie du VHB ont été obtenues en utilisant le modèle animal du canard infecté par son virus spécifique (DHBV, *Duck Hepatitis B Virus*) (Glebe, 2007 ; Seeger et Mason, 2000 ; Glebe et Urban, 2007).

Genre	Virus	Hôte naturel	Hôte expérimental
Orthohepadnavirus	HBV *Hepatitis B Virus*	Homme Dane *et al.*, 1970	*Tupaïa belangeri* Walter *et al.*, 1996
	HBV cpz *Chimpanzee Hepatitis B Virus*	Chimpanzé Vaudin *et al.*, 1988 Gorille Grethe *et al.*, 2000	/
	HBV gbn *Gibbon Hepatitis B Virus*	Gibbon Norder *et al.*, 1996	/
	HBV oru *Orangutan Hepatitis B Virus*	Orang-outan Warren *et al.*, 1999	/
	WMHBV *Wooly Monkey Hepatitis B Virus*	Singe laineux Lanford *et al.*, 1998	/
	WHV *Woodchuck Hepatitis Virus*	Marmotte américaine Summers *et al.*, 1978	/
	GSHV *Ground Squirrel Hepatitis Virus*	Ecureuil fouisseur Marion *et al.*, 1980	/
	ASHV *Arctic Squirrel Hepatitis Virus*	Ecureuil terrestre arctique Testut *et al.*, 1996	/
Avihepadnavirus	DHBV *Duck Hepatitis B Virus*	Canard de Pékin Mason *et al.*, 1980	/
	GTHBV *Grey Teal Hepatitis B Virus*	Sarcelle australienne Li *et al.*, 1998	/
	HHBV *Heron Hepatitis B Virus*	Héron cendré Sprengel *et al.*, 1988.	/
	MDHBV *Maned Duck Hepatitis B Virus*	Canard à crinière Li *et al.*, 1998	/
	RGHV *Ross Goose Hepatitis Virus*	Oie de Ross Naumann *et al.*, 1993	/
	SGHBV *Snow Goose Hepatitis B Virus*	Oie des neiges Chang *et al.*, 1999	/
	STHBV *Stork Hepatitis B Virus*	Cigogne blanche Grue demoiselle Pult *et al.*, 1998	/
	CHBV *Crane Hepatitis B Virus*	Grue royale Prassolov *et al.*, 2003	/

Tableau 2 : Les principaux virus de la famille des *Hepadnaviridae* d'après Schaefer, 2007.

1.3. Les caractéristiques structurales du virus

Trois types de particules virales de morphologie distincte sont observés en microscopie électronique dans le sérum de patients infectés par le VHB : les particules de

Dane ou particules virales complètes et les particules dites subvirales (SVPs) correspondant à des sphères et des bâtonnets (Dane *et al.*, 1970).

1.3.1. La particule de Dane

1.3.1.1. Structure générale

Le virion infectieux, appelé particule de Dane, du nom de son découvreur (Dane *et al.*, 1970) est une petite particule sphérique de 45 nm de diamètre. Elle circule dans le sang à une concentration pouvant atteindre 10^{10} particules par ml chez certains patients. Le génome de ces particules est constitué d'une molécule d'ADN circulaire partiellement bicaténaire d'environ 3200 nucléotides sur laquelle est fixée de manière covalente une polymérase virale, ainsi que des protéines d'origine cellulaire dont une sérine/thréonine kinase phosphorylant la protéine HBc (Albin et Robinson, 1980 ; Bruss, 2007). La polymérase virale comprend quatre domaines de N terminal en C terminal :

- une protéine N-terminale (TP) ou primase, contenant le site d'attachement à la partie 5' du brin d'ADN en cours de synthèse
- une région intermédiaire ou spacer
- un domaine requis pour l'activité transcriptase inverse dont le site catalytique comprend une séquence en acides aminés (aa) très conservée YMDD
- et un domaine RNase H qui dégrade la matrice ARN lors de la synthèse du brin négatif d'ADN viral (Seeger *et al.*, 2000 ; Wei *et al.*, 2010).

Le génome est entouré d'une capside protéique icosaédrique, appelée « core », d'environ 30 nm de diamètre. Elle est formée par l'auto-assemblage d'environ 200 antigènes HBc (Ag HBc) ou protéines C (21 kDa) selon une symétrie icosaédrique T3 ou T4 (Seeger *et al.*, 2000 ; Bruss, 2007). L'antigène HBc est une protéine de 183 à 185 aa en fonction du génotype viral, relativement conservée parmi les différents génotypes viraux (Bruss, 2007). Elle comprend deux régions :

- une région N-terminale (149-151 aa) qui possède un motif leucine zipper permettant la dimérisation de l'Ag HBc et son assemblage en une structure capsidique
- une région C-terminale basique de 34 résidus qui contient quatre domaines riches en arginine n'intervenant pas dans la formation de la nucléocapside : le premier est nécessaire à l'encapsidation de l'ARN pré-génomique (matrice pour la synthèse de l'ADN viral) associé à la polymérase virale alors que les trois autres sont susceptibles d'interagir avec l'ADN viral (Bruss, 2007).

La nucléocapside virale est enveloppée par une bicouche lipidique d'origine cellulaire dans laquelle sont enchâssées des glycoprotéines de surface virales. L'exacte composition en

lipides de l'enveloppe est inconnue, mais la présence de cholestérol semble indispensable au processus d'infection, lors des étapes suivant la fixation des virus à la surface des cellules (Bremer *et al.*, 2009). L'enveloppe lipoprotéique est acquise lors du bourgeonnement à partir du réticulum endoplasmique cellulaire. Les glycoprotéines de taille variable sont les suivantes : la protéine L (« Large »), la protéine M (« Middle ») et la protéine S (« Small »). Ces protéines L, M et S sont présentes dans l'enveloppe du virus selon un ratio 1:1:4 (Heermann *et al.*, 1984). Les protéines M et L sont présentes en quantités équivalentes sur la particule de Dane et représentent environ 30 % des protéines d'enveloppe, la protéine S étant majoritaire (Seeger *et al.*, 2000 ; Bruss, 2007). Ces trois protéines partagent une région commune correspondant à l'antigène HBs. Elles sont étroitement associées les unes avec les autres via la mise en place de ponts disulfures intra- et inter-chaînes (Mangold *et al.*, 1995).

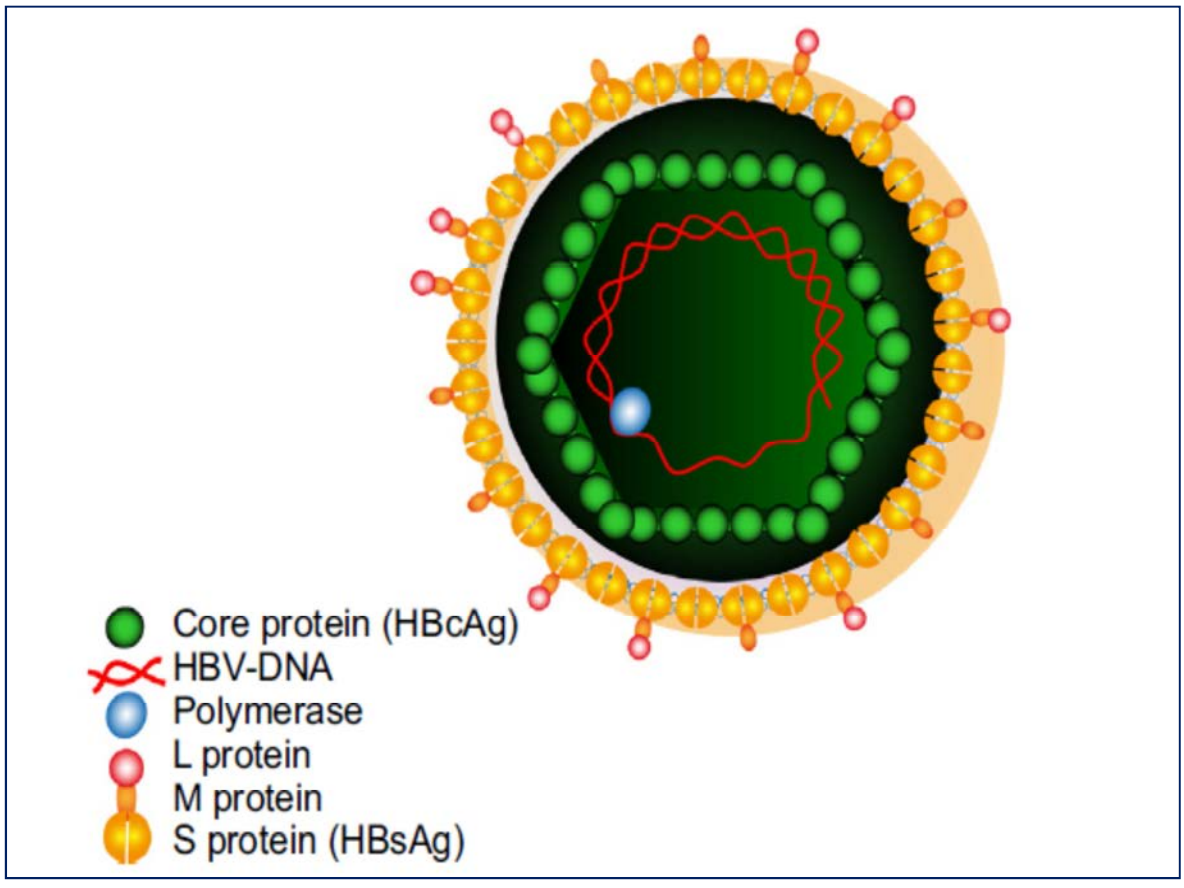


Figure 2 : Représentation schématique de la particule de Dane (Pollicino *et al.*, 2014).

1.3.1.2. Organisation génomique

Le génome du VHB est constitué d'une petite molécule d'ADN d'environ 3200 nucléotides (Robinson *et al.*, 1974 ; Summers *et al.*, 1975). L'ADN viral est partiellement bicaténaire, sur

les ¾ de sa circonférence, adoptant ainsi une conformation circulaire relâchée (ADNrc). Le brin long ou brin codant, de polarité négative et de taille constante, comporte quatre cadres de lecture ou « open reading frame » (ORF) disposés selon la même orientation transcriptionnelle. Le brin court non codant, de polarité positive, possède une extrémité 5' fixe comportant une courte séquence d'ARN et une extrémité 3' variable (Galibert *et al.*, 1979). L'ADN est maintenu sous forme circulaire grâce à l'appariement des extrémités 5' des deux brins au niveau d'une région longue d'environ 200 nucléotides dite « région cohésive » (Sattler et Robinson, 1979). Cette région est encadrée par deux séquences répétées, « Direct Repeat » (DR) de 11 nucléotides, DR1 (à l'extrémité 5' du brin long) et DR2 (à l'extrémité du brin court) jouant un rôle majeur dans l'initiation de la synthèse de chacun des deux brins d'ADN. La polymérase virale est liée de façon covalente à l'extrémité 5' du brin (-), par un lien phospho-tyrosine (Bosch *et al.*, 1988 ; Gerlich et Robinson, 1980), alors que l'extrémité 5' du brin (+) comporte un oligo-ribonucléotide servant d'amorce lors de la réplication virale (Seeger *et al.*, 1986 ; Will *et al.*, 1987).

Le génome du VHB est le plus petit parmi les génomes des virus humains à ADN. Malgré sa petite taille, son organisation génétique compacte lui permet de coder sept protéines différentes. Le génome est entièrement codant et tous les signaux de régulation (quatre promoteurs, deux enhancers, activateurs et sites d'initiation de la transcription, le signal de poly-adénylation) sont intégrés dans les régions codantes (Wei *et al.*, 2010). Tous les gènes du VHB ont un ou plusieurs promoteurs régulant leur activité et ces promoteurs sont eux même régulés par un ou les deux éléments enhancers viraux En1 et En2 situés en amont du promoteur core (Seeger *et al.*, 2000).

Quatre cadres de lecture chevauchant sont ainsi définis sur le brin négatif.

L'ORF préC/C comporte deux codons initiateurs fonctionnels et code :

- la protéine précore (ou p25), précurseur de l'antigène HBe (ou p17) sécrété dans le sérum. L'antigène HBe, protéine non structurale, semble impliqué dans les phénomènes de persistance virale et d'évasion à l'immunité de l'hôte.
- la protéine core (183-195 aa), élément structural de base de la capside, portant l'antigène HBc.

L'ORF P s'étend sur 80 % du génome et chevauche au moins partiellement les autres cadres de lecture. Il code une protéine multifonctionnelle, la polymérase virale, possédant plusieurs activités impliquées dans la réplication virale (Wei *et al.*, 2010).

L'ORF X code une petite protéine (145-154 aa) régulatrice non structurale : la protéine X. Elle est conservée chez tous les hepadnavirus de mammifères (Seeger *et al.*, 2000 ; Wei *et al.*,

2010). Cette protéine, essentielle pour la réplication virale, est un transactivateur transcriptionnel capable d'activer un grand nombre de promoteurs viraux et cellulaires (Wei *et al.*, 2010). Son interaction avec des facteurs de transcription cellulaires permet d'augmenter l'expression des gènes du VHB lors de la réplication. Elle semble intervenir également dans la régulation du cycle cellulaire, les voies de dégradation des protéines, les voies de signalisation cellulaires pro-apoptotiques et la stabilité génétique. Un rôle dans l'oncogenèse lui est donc aussi attribué (Seeger *et al.*, 2000 ; Wei *et al.*, 2010).

L'ORF préS/S code les protéines d'enveloppe virales S, M et L. Cette région comprend trois gènes préS1, préS2 et S et trois codons initiateurs dans une même phase ouverte de lecture (Bruss, 2007). Deux transcrits ARNms, PréS1 et PréS2/S, sont générés et la transcription initiée au niveau d'un promoteur en amont de l'ORF pour l'ARNm préS1 et au niveau d'un promoteur interne en amont du second site d'initiation de la traduction pour l'ARNm préS2/S (Bruss, 2007). La traduction de l'ARNm le plus long aboutit à la synthèse de la protéine L (389 à 400 aa) et celle du transcrit le plus court à la protéine M (281 aa) ou à la protéine S (226 aa).

La protéine S est codée par le gène S, la protéine M par les gènes préS2 et S et la protéine L par les gènes préS1, préS2 et S. Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes d'attachement/entrée cellulaire et dans la réponse immunitaire.

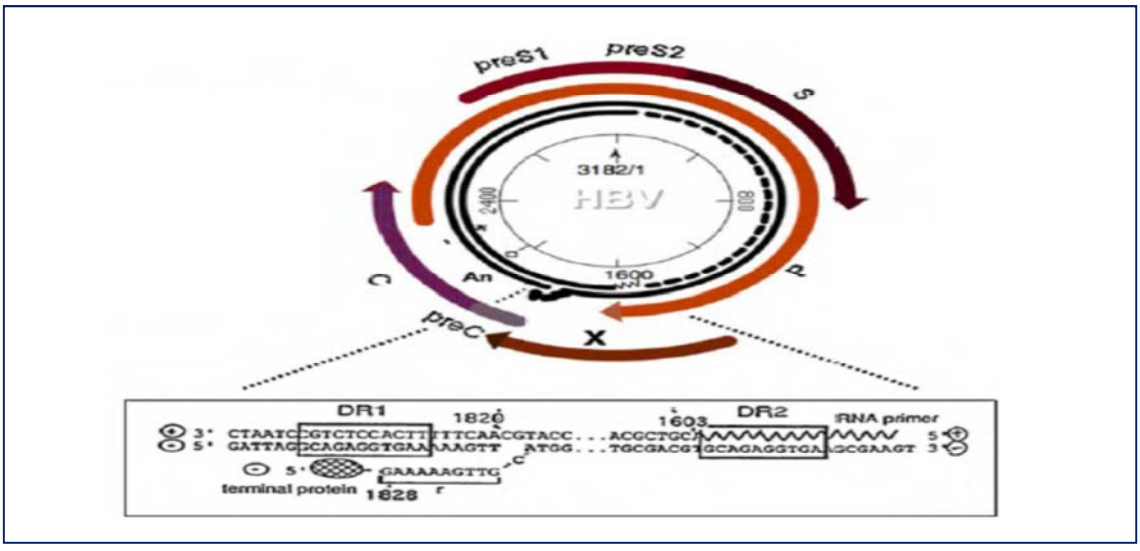


Figure 3 : Organisation génomique du VHB, adapté de Wei *et al.*, 2010.

La protéine HBSP (hepatitis B splice protein) est une protéine de 93 aa codée par un ARN épissé à partir du codon d'initiation de la polymérase. Elle inclut les 46 premiers aa de la

polymérase, 47 aa d'une nouvelle séquence due à un changement de cadre de lecture généré par l'épissage. Cette protéine aurait un rôle dans la persistance de l'infection virale (Wei *et al.*, 2010).

1.3.2. Les particules subvirales

Les infections à hepadnavirus sont caractérisées par la production en large excès de particules subvirales non infectieuses (SVP). Les particules vides, dépourvues de génome et de nucléocapside, ne contiennent que les protéines de surface du VHB. L'auto-assemblage de ces particules résulte de l'accumulation des protéines d'enveloppe virale produites en excès. Elles peuvent atteindre une concentration de 10^{12} particules par ml et être jusqu'à 1000 fois plus nombreuses que les particules virales infectieuses chez un individu infecté (Bruss, 2007 ; Patient *et al.*, 2007). Ces SVP peuvent être de forme sphérique de 22 nm de diamètre (billes ou sphères) ou filamenteuse (bâtonnets). Le type de particules formées dépend du ratio protéine S / protéine L. Les protéines S, M et L sont présentes dans des proportions variables dans les trois types de particules virales (particule de Dane, sphère ou bâtonnet), mais la protéine S est toujours majoritaire (Wei *et al.*, 2010).

Ces SVP s'auto-assemblent dans un compartiment post-RE et pré-Golgi (Patient *et al.*, 2007). Les formes sphériques sont majoritaires. Les formes filamenteuses, moins représentées, peuvent atteindre une longueur de plusieurs centaines de nanomètres (Bruss, 2007 ; Patient *et al.*, 2007). Elles sont plus riches en protéines L (10 à 30 %) que les sphères ce qui leur confère leur aspect allongé (Glebe et Urban, 2007 ; Patient *et al.*, 2007). Leur rôle exact dans le cycle de réplication du virus n'est pas connu. Elles pourraient faciliter la dissémination du virus et sa persistance dans l'organisme en réduisant le pool d'anticorps neutralisants, en jouant un rôle de leurre pour l'immunité humorale. En effet, même si elles n'ont pas de potentiel infectieux, ces particules suscitent une réponse antigénique importante (Chisari *et al.*, 2010).

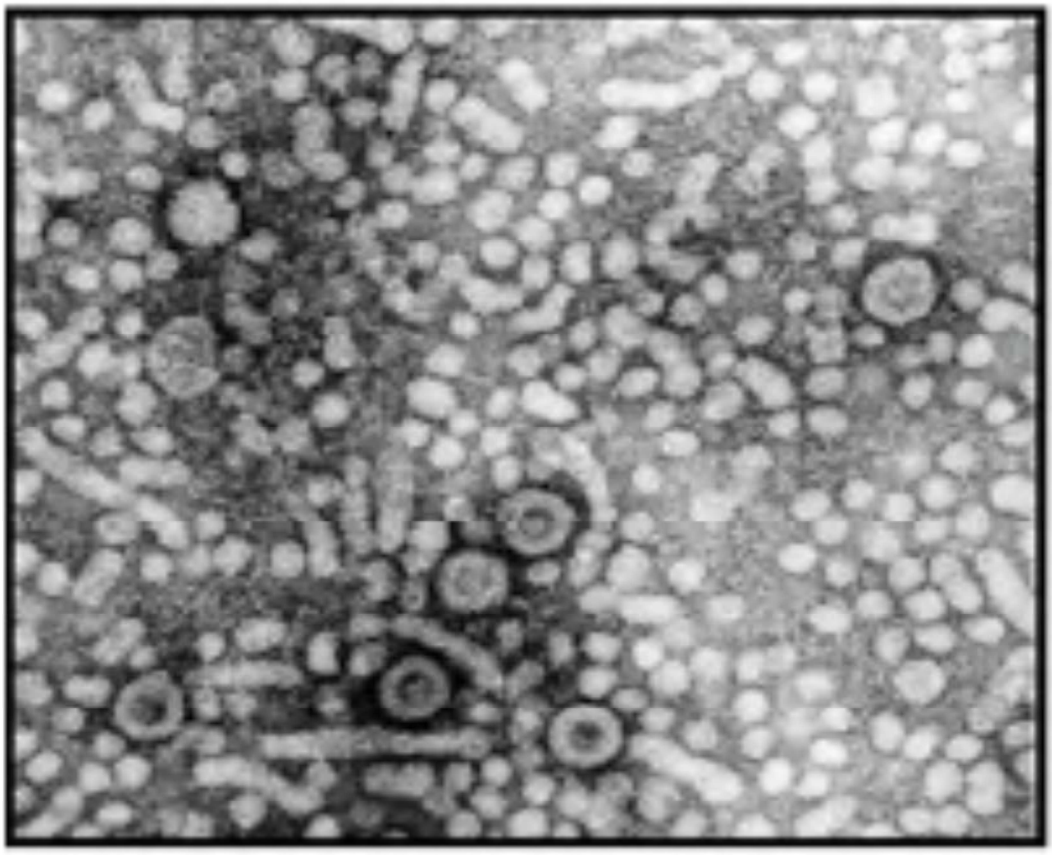


Figure 4 : Morphologie des particules virales et subvirales visibles au microscope électronique dans le sérum d'un patient infecté (Wei *et al*., 2010).

1.4. Le cycle réplicatif du VHB

Le VHB est un virus hépatotrope. Bien que de l'ADN viral VHB ait été retrouvé dans les cellules épithéliales des canaux biliaires, les cellules du système lymphoïde, les cellules mononuclées du sang périphérique (monocytes, lymphocytes B et T), au niveau du pancréas et du rein, la réplication a lieu exclusivement dans l'hépatocyte (Seeger *et al.*, 2000). Cependant, ces « réservoirs extrahépatiques » de virus, persistant à long terme, pourraient être la source de réactivation virale (Ciesek *et al.*, 2008 ; Loustaud-Ratti *et al.*, 2013).

La principale originalité du cycle de réplication de ce virus à ADN est le recours à une étape de transcription inverse à partir d'un ARN pré-génomique (ARNpg) pour la réplication de son génome. Pendant longtemps aucun système cellulaire permettant la culture du virus n'était disponible. Les études menées sur des virus animaux proches du VHB, comme ceux du canard (DHBV) et de la marmotte (WHV) ont permis d'acquérir les premières connaissances

sur le cycle viral, enrichies par la suite des données acquises grâce notamment à l'utilisation de la lignée cellulaire HepaRG (Guidotti *et al.*, 2006 ; Xie *et al*., 2010).

1.4.1. Entrée du virus dans les cellules permissives

A ce jour, les données disponibles ne permettent pas de définir avec précision le déroulement des étapes précoces de l'infection virale VHB conduisant à la libération du génome viral dans le noyau hépatocytaire. La restriction d'espèce des hepadnavirus ainsi que leur hépatotropisme suggèrent la reconnaissance par les particules infectieuses d'un ou de plusieurs récepteurs cellulaires spécifiques lors du processus d'entrée virale (Xie *et al.*, 2010). De nombreuses protéines cellulaires ont été proposées comme candidates potentielles (parmi lesquelles l'annexine V, le récepteur des immunoglobulines A, l'apolipoproteine H) mais aucune ne semblait réellement essentielle pour l'infection (tableau 3) (Glebe et Urban, 2007 ; Xie *et al.*, 2010). En 2012, Yan *et al.*, identifièrent le « Sodium Taurochlorate Cotransporting Polypeptide » ou NTCP comme l'un des récepteurs spécifiques du VHB à la surface des hépatocytes. Cette protéine transmembranaire présente sur la partie basolatérale des hépatocytes est en conditions physiologiques impliquée dans le transport des sels biliaires. (Yan *et al.*, 2012).

L'entrée virale débute avec l'attachement de la particule virale aux protéoglycanes héparanes sulfates exposées en surface de la membrane cellulaire (figure 9, point 1). Le degré de sulfatation semble être un facteur plus important que le squelette du polysaccharide sur l'attachement à la surface des hépatocytes des virions (Leistner *et al.*, 2008 ; Schulze *et al*., 2007). Cette liaison de faible affinité, de type interaction électrostatique, est non spécifique et réversible (Glebe et Urban, 2007). Le site de liaison fut d'abord localisé au niveau du domaine pré-S1 des protéines L (Schulze *et al*., 2007). Sureau et Salisse ont mis en évidence une liaison aux héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs) par l'intermédiaire d'un site de liaison (HS binding site) localisé en surface de la protéine S au niveau du déterminant « a » de la Major Hydrophilic Region (MHR). Cette région, la MHR (aa 99-169), est la cible privilégiée de la réponse humorale notamment son déterminant « a » (124-147) qui regroupe la plupart des épitopes reconnus par les anticorps neutralisants. Les HSPGs étant des molécules chargées négativement, les acides aminés de la boucle antigénique chargés positivement sont impliqués dans ces interactions, notamment les résidus R122 et K141. Ces acides aminés doivent donc se trouver en surface ce qui nécessite un respect de la conformation de la boucle MHR (Sureau et Salisse, 2013). Le Glypican 5 (GPC5) faisant

partie de la famille des HSPG a tout récemment été identifié comme l'un de ces facteurs d'attachement (Verrier *et al.*, 2015).

A l'étape d'attachement réversible, succède une fixation de haute spécificité, probablement irréversible, au récepteur NTCP présent à la surface des hépatocytes (figure 9, point 2). Cette fixation s'effectue par l'intermédiaire d'un domaine nommé Receptor Binding Site (RBS) situé dans la région PréS1 (aa 9-15) (Xiao *et al.*, 2013 ; Yan *et al.*, 2012). Le NTCP est un membre de la famille 10 des récepteurs solubles (SLC10), système de transport principal des acides biliaires du sang vers le foie. C'est une glycoprotéine de 349 aa comprenant sept à neuf domaines transmembranaires.

Yan *et al.,* ont identifié ce récepteur en utilisant un peptide synthétique modifié à partir du lipopeptide natif 2-48 aa (Myr-47/WT), comme sonde sur une lignée cellulaire d'hépatocytes primaires de *Tupaïa belangeri* (l'un des modèles d'études du VHB). Puis, ils ont démontré le rôle du NTCP en transfectant un plasmide codant le récepteur des lignées cellulaires (293T, HepG2, Huh7) n'exprimant pas habituellement la protéine. Ils ont également démontré le rôle probable des acides aminés 157 à 165 du NTCP dans la fixation. En réalisant des tests de silencing de l'expression du NTCP sur des lignées cellulaires hépatocytaires (PHH, PTH, HepaRG), ils ont obtenu une réduction de l'infection. Cependant, le fait que l'infection ne soit pas totalement supprimée dans les lignées cellulaires sans NTCP suggère l'intervention d'autres facteurs d'hôte dans l'entrée du virus expliquant le tropisme hépatique et la spécificité d'espèce du VHB (Yan *et al.*, 2012 ; Xiao *et al.*, 2013).

Les phases suivantes d'internalisation et de libération de la capside protéique sont encore mal connues. Deux mécanismes sont envisagés. Le premier étant la fusion de l'enveloppe du virus à la membrane cellulaire après un changement conformationnel permettant la libération directe de la nucléocapside dans le cytoplasme (Urban *et al.*, 2010) (figure 9, point 3B). Le second correspond à l'endocytose de la particule virale par l'hépatocyte (figure 9, point 3A). Dans le deuxième cas, après interaction avec la membrane, le virus pénètrerait dans la cellule par un mécanisme d'endocytose pH indépendant (Kock *et al.*, 1996). Un clivage des protéines d'enveloppe aurait lieu à l'intérieur de l'endosome permettant de démasquer des motifs peptidiques nommes TLM (translocation motif) situé en région C-terminale de la région préS2. L'exposition des TLM permet ensuite la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome et donc le transfert de la nucléocapside vers le cytoplasme (Stoeckl *et al.*, 2006). Cette endocytose pourrait dépendre de protéines telles que la clathrine et/ou la cavéoline.

Protéine	Site de fixation (VHB)	Localisation subcellulaire	Spécificité hépatique
IL-6	PreS1 21–47	Sérum	Non
SCAA1	PreS1 21–47	Membranaire	Non
***Lipoprotein lipase* (LPL)**	PreS1 21–47	Sérum	Adressée aux hépatocytes au cours du métabolisme lipidique
lgA receptor	PreS1 21–32	Membranaire	Non
***Asialoglycoprotein receptor* (ASGPR)**	PreS1	Membranaire	Oui
Transferrin receptor	PreS2	Membranaire	Non
***Apolipoprotein H* (ApoH)**	PreS1	Phospholipides sériques, associés aux Chylomicrons et HDLs	Adressée aux hépatocytes au cours du métabolisme lipidique
***Polymerized serum albumin* (pHSA)**	PreS2	Sérum	Non
***Annexin* V**	S	Membranaire	Non
Fibronectin	PreS2	Matrice extracellulaire	Non
p31	PreS1 21–47	Intracellulaire	n.d.
50-kDa serum glycoprotein	PreS1 and PreS2	Sérum	n.d.
p80 82–90	PreS1 12–20,	Membranaire	Non

Tableau 3 : Principales protéines proposées comme récepteur spécifique du VHB à la surface des hépatocytes (d'après Glebe et Urban, 2007).

n.d.: non défini

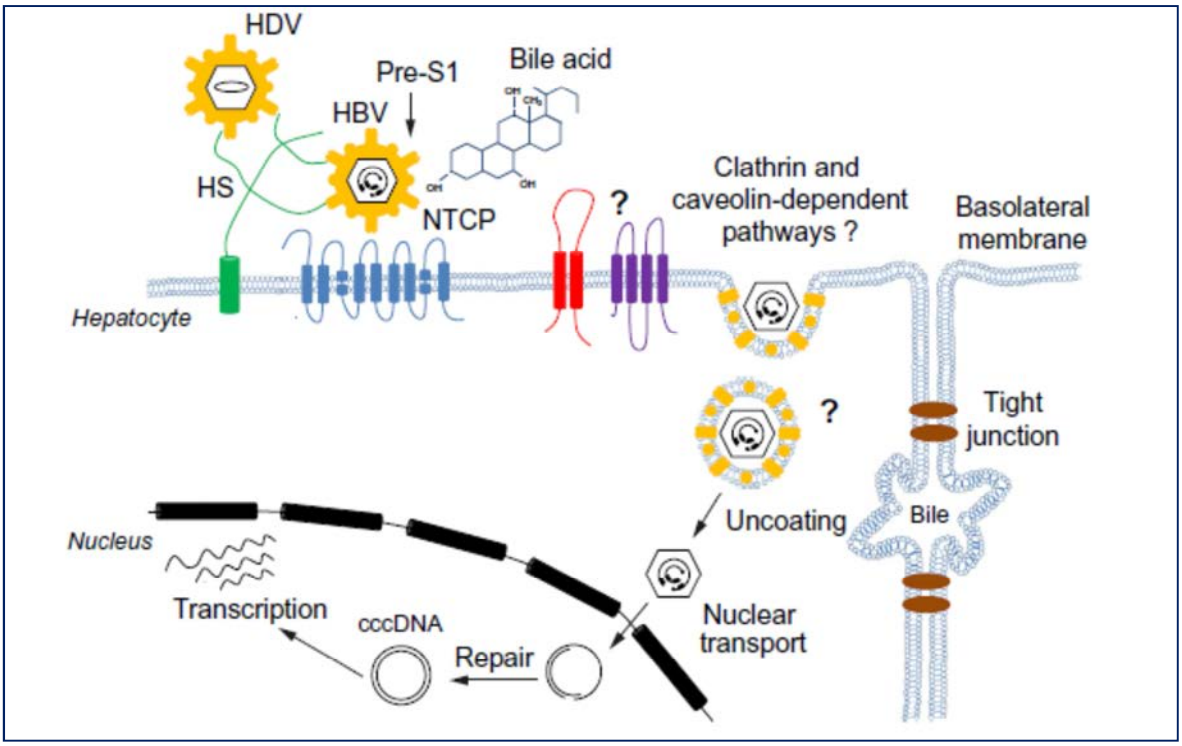


Figure 5 : Modèle proposé pour le déroulement des étapes précoces de l'entrée virale (Xiao *et al.*, 2013).

1.4.2. Transport des nucléocapsides vers le noyau

Les nucléocapsides libérées dans le cytoplasme vont emprunter le réseau de microtubules et rejoindre le centre organisateur des microtubules (MOCT) à proximité du noyau et des pores nucléaires (figure 9, points 4 et 5). L'accumulation de capsides au niveau de l'enveloppe nucléaire facilite les interactions entre les protéines du Nuclear Pore Complex (NPC) et la séquence Nuclear Localization Signal (NLS) présentes en C-terminale de la protéine C. Les nucléocapsides vont ensuite se « désassembler » en dimères de protéine C au sein du pore nucléaire et libérer l'ADN viral, sous forme d'ADN relâché circulaire (ADNrc), dans le noyau cellulaire par des mécanismes encore inconnus (Urban *et al.*, 2010) (figure 9, point 6).

1.4.3. Conversion du brin d'ADNrc en ADNccc

Dans le noyau, la polymérase virale fixée de manière covalente à l'ADNrc va compléter la séquence du brin court, dit de polarité positive (+) (figure 9, point 7). Des enzymes cellulaires vont ensuite permettre la ligation des extrémités du brin (+), le détachement de la polymérase virale du brin long (-) et la dégradation de l'amorce d'ARN utilisée pour la synthèse du brin (+) (Urban *et al.*, 2010).

La molécule double brin est super-enroulée et compactée à l'aide de protéines histones et grâce à l'intervention de topoisomérases cellulaires, en une molécule d'ADN, appelée ADNccc pour « covalently closed circular DNA » (figure 9, point 8). Cette conformation assimilable à un « mini-chromosome » non intégré est très stable et persistante dans le noyau cellulaire. La persistance de l'ADNccc dans le noyau des hépatocytes pendant toute la durée de vie de la cellule joue un rôle dans le portage chronique du virus. Il existerait dans les noyaux des hépatocytes infectés un stock de 10 à 50 copies d'ADNccc par noyau (Urban *et al.*, 2010).

1.4.4. Transcription du génome viral

L'ADNccc va servir de matrice pour la transcription des gènes viraux par l'ARN polymérase II cellulaire et ainsi produire tous les ARN viraux nécessaires à la synthèse protéique et à la réplication virale (figure 9, point 9). Cette étape est régulée par des facteurs de transcription de l'hôte comme le C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) ou les HNF (Hepatocyte Nuclear Factors), des protéines virales (core, protéine X) connues pour moduler l'expression des gènes en interagissant avec les quatre promoteurs des ORFs et les deux enhancers, ainsi que des phénomènes épigénétiques tels que le statut d'acétylation des histones H3 et H4 liés à l'ADNccc et l'inhibition du recrutement d'histone déacetylase (Pollicino *et al.*, 2006 ; Urban *et al.*, 2010).

Les ARN viraux sont ensuite transportés vers le cytoplasme (figure 9, point 10). Ils sont de deux types.

Les trois ARNm sub-génomiques (ARNsg) sont traduits en protéines virales dans le cytoplasme. Un ARNm de 2,1 kb est le transcrit principal du gène S codant l'antigène de surface (protéine S et M), un ARNm de 2,4 kb code la grande protéine d'enveloppe L et un ARNm de 0,8 kb code la protéine X (Wei *et al.*, 2010) (figure 9, point 11).

L'ARN pré-génomique (ARNpg) une fois dans le cytoplasme, est lié à la polymérase virale au niveau du signal d'encapsidation epsilon situé à son extrémité 5' (Bartenschlager et Schaller, 1992). Cet ARNpg s'auto-assemble aux protéines C et à la polymérase pour former la nucléocapside. En plus de son rôle d'ARNm pour la synthèse de la protéine core et de la polymérase virale, l'ARNpg est aussi la matrice nucléotidique (figure 9, point 12).

1.4.5. Réplication du génome viral

L'ARNpg sert de matrice pour la rétro-transcription en brin d'ADN négatif (figure 9, point 13). Cet ARNm de 3,5 kb est légèrement plus grand que l'ADNrc des virions matures, il

contient une région redondante terminale de 120 nucléotides comprenant une deuxième copie de la séquence DR1, le signal d'encapsidation ε en épingle à cheveux et une queue de polyA. L'étape de transcription inverse est initiée par la formation d'une liaison phosphodiester entre un acide aminé Tyrosine du domaine TP de la polymérase virale et une courte amorce d'ADN située au sommet de la boucle centrale de la structure ε, le « RNA packaging signal » (Beck et Nassal, 2007 ; Sohn *et al.*, 2008). Le complexe polymérase/amorce est transféré au niveau de la région DR1 en 3' de l'ARNpg qui a une séquence identique à celle de la région ε (Beck et Nassal, 2007 ; Sohn *et al.*, 2008).

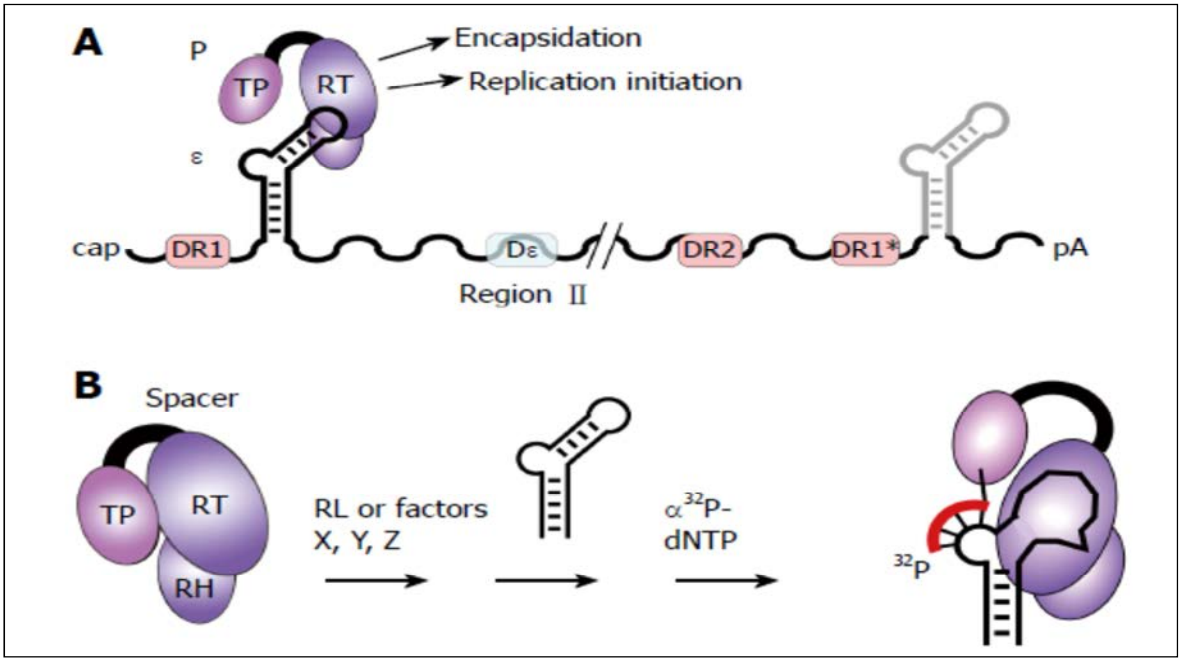


Figure 6 : Initiation de la rétro-transcription de l'ARN pré-génomique (Beck et Nassal, 2007).
A : Organisation structurale de l'ARN pré-génomique ; B : Formation du complexe polymérase/amorce, initiant la transcription inverse.

Au cours de la synthèse du brin (-), l'ARNpg est dégradé simultanément par l'activité RNAse H de la polymérase à l'exception de la séquence DR1 qui va être transloquée et s'apparier à la région homologue DR2 en 5'du brin (-). Elle va alors servir d'amorce pour l'élongation du brin (+) par la polymérase virale en parallèle de la circularisation du brin (-) due à l'appariement des séquences répétées DR1 en 3' et 5' (Beck et Nassal, 2007).

Au cours de la rétro-transcription, les protéines core s'auto-assemblent et forment avec la polymérase virale et l'ARN pré-génomique des capsides immatures.

Les capsides deviennent des capsides matures contenant de l'ADNrc partiellement bicaténaire. Cette maturation implique également des changements structuraux au niveau de la paroi de la capside (Bruss, 2007).

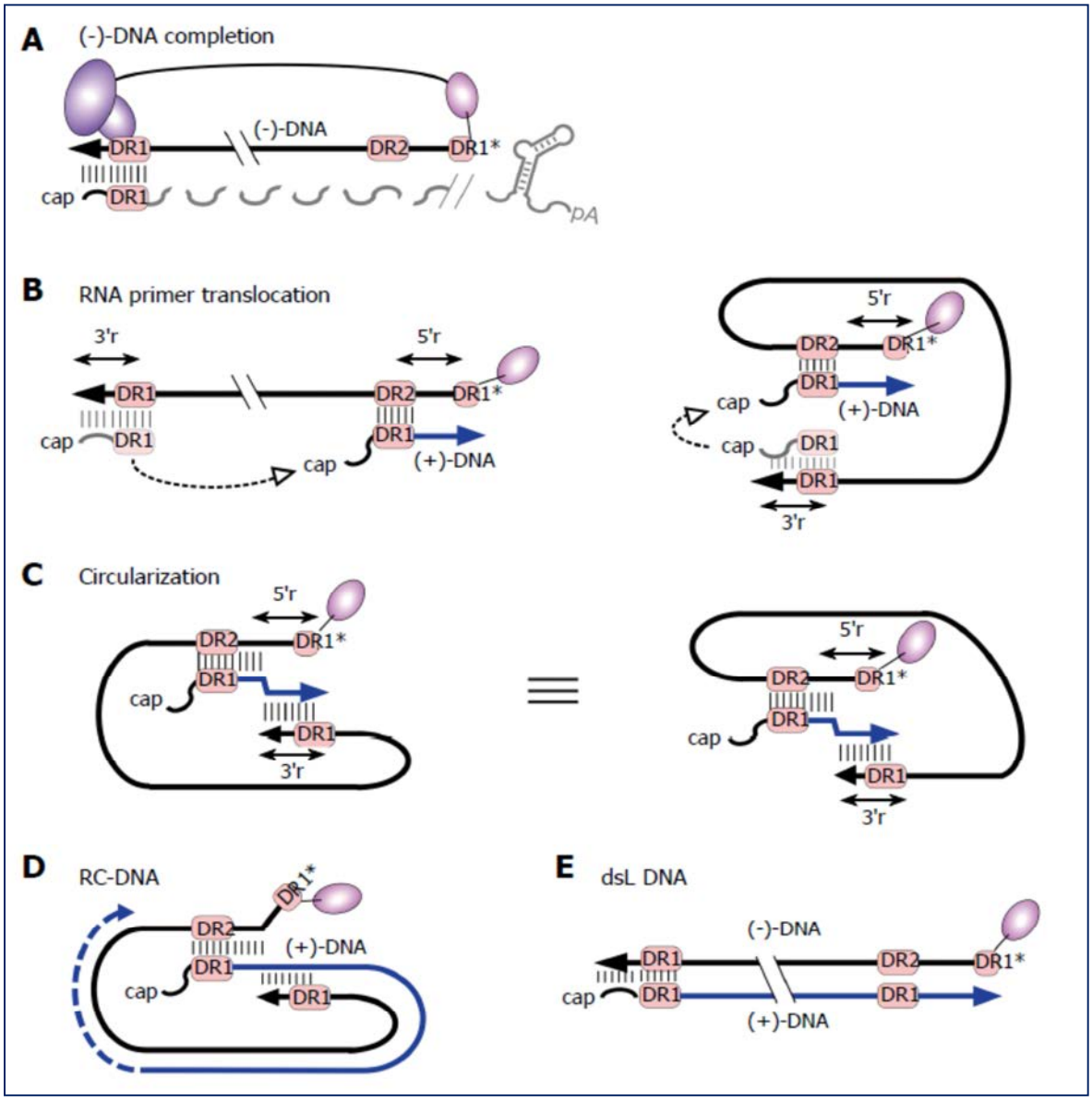


Figure 7 : Représentation schématique de la formation d'ADNrc à partir de l'ARN pré-génomique (Beck et Nassal, 2007).

1.4.6. Sécrétion des virions

Les nucléocapsides matures peuvent évoluer de deux façons différentes (figure 9, points 14A et 14B). Elles peuvent interagir avec les protéines d'enveloppe insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique où ces dernières sont synthétisées. L'enveloppement de la capside virale requiert la présence de la protéine L comme protéine matrice (Bruss, 2007) (figure 8). Les futures protéines d'enveloppe vont ensuite s'accumuler sur la membrane du compartiment pré-golgien et permettre le bourgeonnement des particules virales complètes et des particules subvirales dans la lumière de ce compartiment. L'assemblage se déroule dans des zones membranaires enrichies en protéine L par le biais d'une interaction spécifique entre une protéine de la capside mature et un domaine court de pré-S1 des protéines L cytosoliques (en conformation dite i-préS). Le virus s'entoure alors d'une enveloppe enrichie en protéines L dont la moitié va ensuite changer de conformation (conformation dite e-préS) pour devenir infectieux. Cette voie va conduire à l'exocytose de virions infectieux par la voie constitutive dans des corps multi-vésiculaires (MVB) (Urban *et al.*, 2010) (figure 9, point 16).
Lorsque les nucléocapsides sont en excès par rapport aux protéines d'enveloppe, elles peuvent aussi être recyclées vers le noyau de la cellule afin d'amplifier le nombre de copies d'ADNccc dans le noyau.

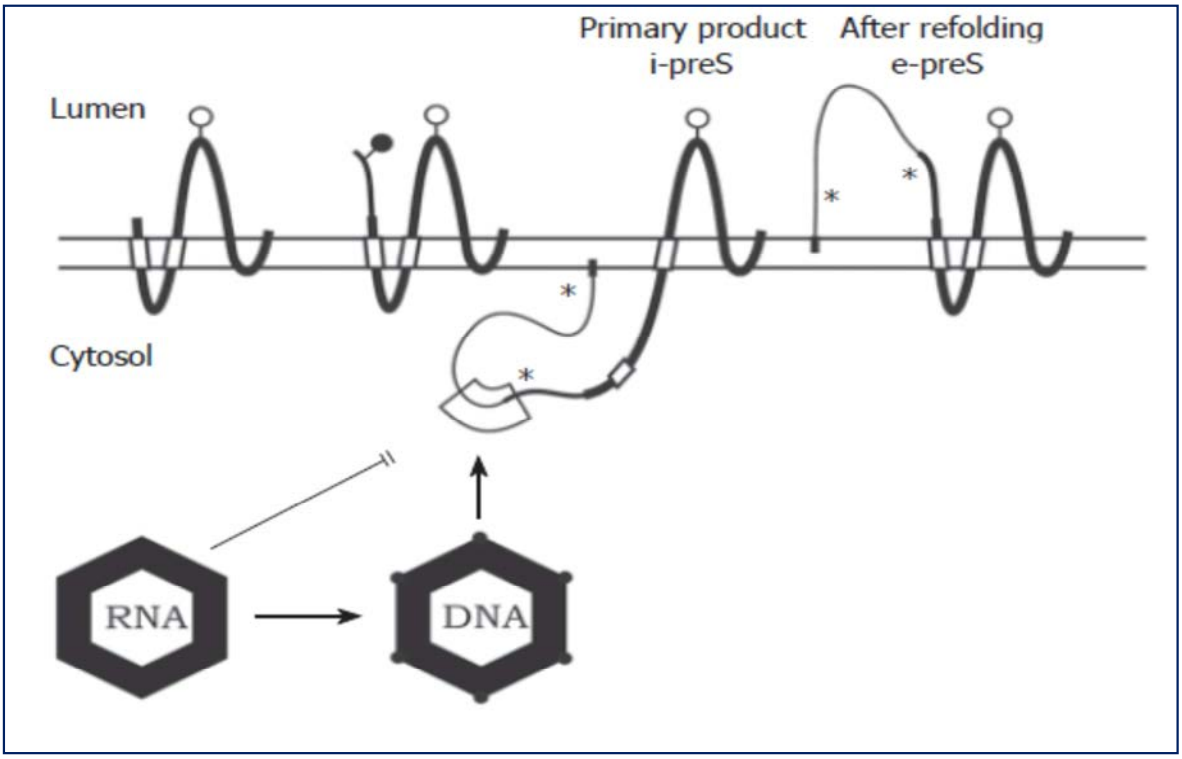


Figure 8 : Topologie transmembranaire des protéines d'enveloppe du VHB et représentation schématique des interactions nucléocapside mature/ protéine d'enveloppe (Bruss, 2007).

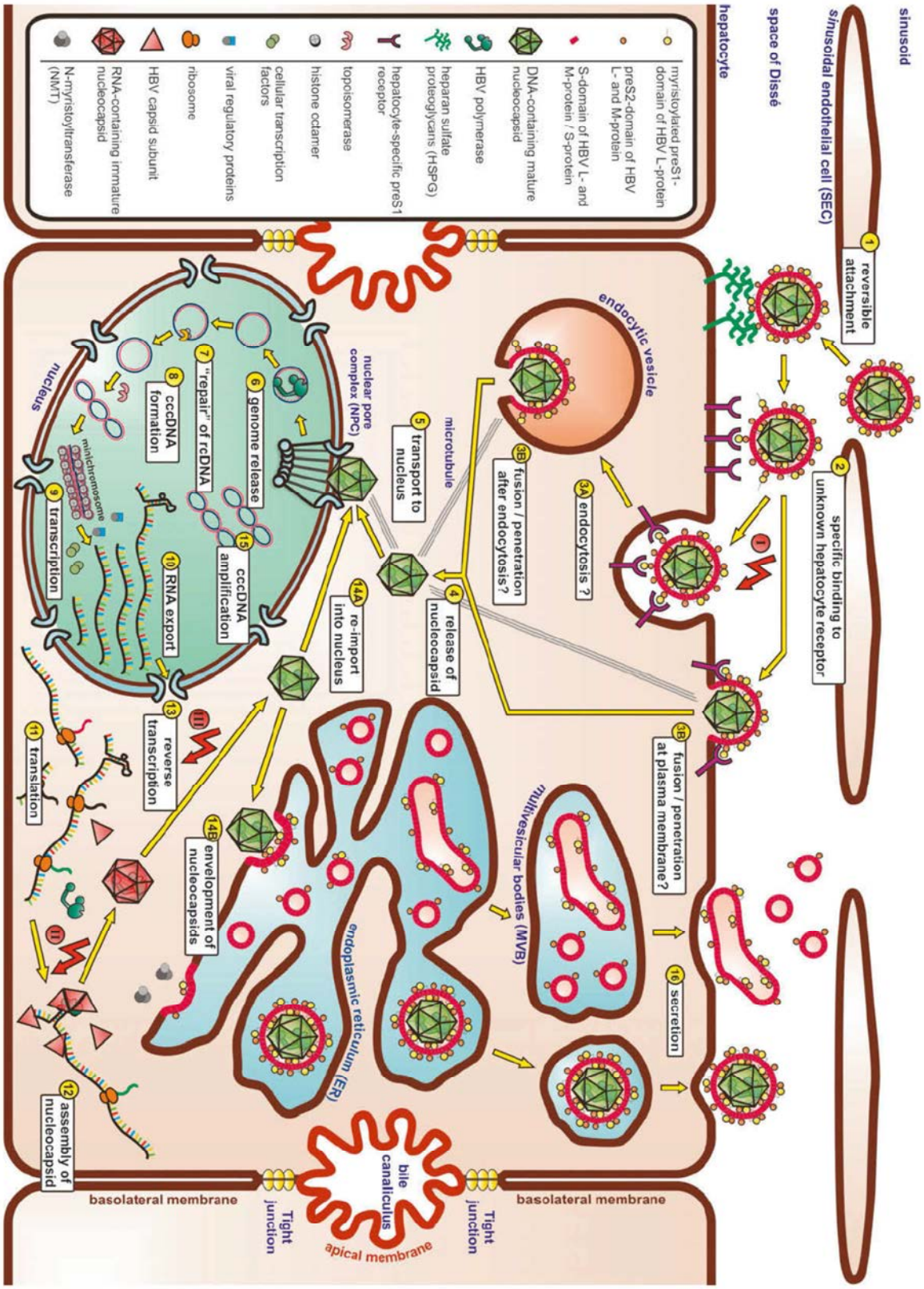


Figure 9 : Représentation schématique du cycle réplicatif du VHB (Urban, 2010).

Légende de la figure 9 :

Point 1 : attachement réversible des particules virales aux Héparanes sulfates.
Point 2 : Etape de fixation spécifique
Points 3A et 3B : Pénétration de la particule virale par endocytose (3A) ou fusionmembranaire (3B) ?
Point 4 : libération de la nucléocapside
Point 5 : transport vers le noyau
Point 6 : libération du génome
Point 7 : réparation de l'ADNrc
Point 8 : formation de l'ADNccc
Point 9 : transcription de l'ADNccc en ARNm subgénomiques et pré-génomique
Point 10 : exportation cytoplasmique des ARNm
Point 11 : traduction des ARNm
Point 12 : assemblage des nucléocapsides
Point 13 : Reverse transcription de l'ARN pré-génomique
Points 14A et 14B : recyclage des nucléocapsides vers le noyau (14A) ou enveloppement des nucléocapsides matures (14B)
Point 15 : amplification de l'ADNccc
Point 16 : Sécrétion des particules virales

2. La variabilité génétique du virus

Comme nous l'avons vu précédemment (1.2. Taxonomie), au sein de la famille des *Hepadnaviridae*, les virus humains sont très proches des virus retrouvés chez certains grands singes et présentent près de 80 % de similitude avec les virus des rongeurs. Ils sont beaucoup plus éloignés des virus aviaires avec lesquels ils ne partagent qu'environ 40 % d'homologie de séquences (Schaefer, 2007). L'existence des hepadnavirus chez un ancêtre commun a été estimée à plusieurs millions d'années. Cette longévité a favorisé l'émergence de la diversité au sein de cette famille et plus particulièrement parmi les virus humains (VHB). La variabilité génétique particulièrement élevée pour des virus à ADN peut s'explique de plusieurs façons, en commençant par le mode de réplication et l'organisation génomique particulière de ces virus.

2.1. Notion de quasi-espèce virale

La stratégie réplicative du VHB implique une étape de rétro-transcription faisant intervenir une ADN polymérase ARN dépendante virale dépourvue d'activité correctrice. Il se produit alors un grand nombre d'erreurs aléatoires se traduisant par un fort taux de mutations.

Par ailleurs, le VHB présente une importante efficacité réplicative avec plus de 10^{11} virions produits par jour chez un individu infecté de manière chronique (Nowak *et al.*, 1996). Le taux d'erreurs est estimé entre $1{,}5.10^{-5}$ et 5.10^{-5} substitution de base par site et par cycle dans le cas d'une hépatite B chronique active (De Maddalena *et al.*, 2007 ; Desmond *et al.*, 2008 ; Locarnini et Yuen, 2010). Ce taux est moindre par rapport à celui retrouvé chez certains virus à ARN (2 à 3.10^{-3} pour le VHC et 2,7 à $6{,}7.10^{-3}$ substitution / site / an pour le VIH) mais 10^4 fois plus élevé que chez les autres virus à ADN (Kramvis *et al.*, 2005).

La combinaison de ces deux facteurs implique qu'en théorie toutes les mutations ponctuelles possibles sur ce génome de 3200 nucléotides sont générées chaque jour (Glebe, 2007). Cependant la majorité des variants sont défectifs et ne peuvent se répliquer. Par ailleurs, grâce à la redondance du code génétique certaines mutations sont sans influence sur la traduction protéique.

Cela aboutit à la coexistence, à un instant donné, chez un même individu infecté de plusieurs variants viraux capables d'évoluer selon la pression de l'immunité et/ou des actions thérapeutiques ou encore des caractéristiques environnementales cellulaires (expression de récepteurs de membrane par exemple). L'ensemble de ces variants représente la quasi-espèce virale (Kramvis *et al.*, 2005).

La variabilité génomique du VHB est toutefois limitée par les contraintes sévères imposées par l'organisation très compacte du génome, en cadres de lecture chevauchants. Une mutation ponctuelle survenant dans un cadre de lecture peut en effet avoir des répercussions au sein des autres cadres de lecture chevauchants (Kay et Zoulim, 2007). L'adaptation du virus à un environnement changeant est donc très rapide, mais la variabilité est plus ou moins importante selon les segments du génome considérés, définissant des « points chauds » de mutation, tels que : le promoteur du gène C, la région pré-C, le gène de la polymérase, la région codant le déterminant « a » de la protéine S, le gène X (Desmond *et al.*, 2008 ; Glebe, 2007).

Cette dynamique est limitée par la capacité des hépatocytes à héberger de nouveaux virus. En effet, en l'absence de pression de sélection, le nombre d'hépatocytes pouvant être infectés et leurs capacités de stockage de l'ADNccc est à l'origine d'un phénomène de compétition entre souches émergentes et préexistantes. Même si une mutation est « viable », elle doit aussi se maintenir au niveau de l'ADNccc et infecter un nouvel hépatocyte ou remplacer d'anciennes molécules d'ADNccc pour émerger. Or, l'ADNccc est présent en quantité très faible dans les hépatocytes infectés (10 à 50 copies par cellule) (Glebe, 2007).

La variabilité génétique peut se traduire de deux façons différentes selon l'intervention ou non de pressions de sélection. La variabilité génotypique correspond à la plasticité génomique existant naturellement dans les populations infectées. Elle est le résultat de l'évolution progressive du génome en l'absence de pression de sélection permettant aux virus les mieux adaptés dits « robustes » de survivre. Elle se traduit par l'existence de sérotypes, génotypes, sous-types, variants de polymorphisme.

La variabilité phénotypique résulte de l'adaptation rapide du virus à diverses pressions de sélection (réponse immunitaire de l'hôte, vaccination, traitements antiviraux) (Kay et Zoulim, 2007). Elle favorise l'émergence de mutants, indépendamment de leur robustesse, mais sélectionnés par une pression de sélection (Carman, 1997).

2.2. Variabilité génotypique

La première classification des différents isolats de VHB en sérotypes était basée sur les différences de réactivité de l'Ag HBs avec des panels standards d'antisera. Le déterminant « a » (aa 124-147), composé des principaux épitopes conformationnels, est commun à tous les sérotypes. La classification repose donc sur les déterminants d/y et r/w définis par la nature des acides aminés présents :

- en positions 122, présence d'une lysine (K) pour le déterminant d ou d'une arginine (R) pour le déterminant y

- en position 160, présence d'une lysine (K) pour le déterminant w et d'une arginine (R) pour le déterminant r

Par exemple, si un isolat viral présente une lysine (K) en position 122 et une lysine en position 160, il sera défini comme un sérotype adw.

La nature des acides aminés présents en position 127, 177 et 178 permet d'affiner la séparation entre les différents sous-types. Dix sérotypes et sous-types différents de VHB sont définis (tableau 4), les quatre principaux sérotypes étant ayw, ayr, adw et adr (Kay et Zoulim, 2007).

Sérotype	Séquence (acide aminé) de l' Ag HBs
ayw1	122R + 160K + 127P + (134F et/ou 159A)
ayw2	122R + 160K + 127P
ayw3	122R + 160K +127T
ayw4	122R + 160K + 127L
ayr	122R + 160R
adw2	122K +160K + 127P
adw3	122K + 160K + 127T
adw4-	122K + 160K + 127L + 178Q
adrq+	122K + 160R + 177V + 178P
adrq-	122K + 160R + 177A

Tableau 4 : La classification en sérotypes du VHB (Kay et Zoulim, 2007).

Le séquençage complet du génome à partir de 1979 par Galibert *et al.* a permis la création de banques de données de séquences de génomes complets de différentes souches VHB à partir de la fin des années 80 (Galibert *et al.*, 1979 ; Kay et Zoulim, 2007). Une classification plus précise tenant compte de l'intégralité de la séquence nucléotidique et non plus uniquement de la variabilité de l'Ag HBs a progressivement remplacé la classification en sérotypes. Il existe une corrélation entre sérotypes et génotypes qui n'est cependant pas parfaite (tableau 5).

Génotype	Sous-type	Sérotype	Distribution géographique	Taille du génome (nucléotides)
A	A1 (Aa)	**adw2***, ayw1	Afrique, Asie	3221
	A2 (Ae)	**adw2***, ayw1	Europe du Nord, Amérique du Nord	
B	B1 (Bj)	**adw2**	Japon	3215
	B2 (Ba)	**adw2***, adw3	Asie	
	B3	**adw2***, ayw1	Indonésie, Chine	
	B4	**ayw1***, adw2	Vietnam, Cambodge	
C	C1	**adrq+***, ayr, adw2, ayw1	Asie du Sud Est	3215
	C2	**adrq+***, ayr	Asie du Sud Est	
	C3	adrq-, adrq+	Iles du pacifique	
D	D1	**ayw2***, adw1, ayw1	Europe, Moyen Orient, Egypte, Inde, Asie	3182
	D2	**ayw3***, ayw1	Europe, Japon	
	D3	**ayw3***, ayw2, ayw4	Europe, Asie, Afrique du Sud, USA	
	D4	**ayw2***, ayw3	Australie, Japon, Papouasie Nouvelle Guinée	
E	/	**Ayw4*,** ayw2	Afrique Subsaharienne, Royaume Uni, France	3212
F	FIa	**adw4***, ayw4	Amérique Centrale	3215
	FIb	**adw4**	Argentine, Japon, Venezuela, USA	
	FII	**adw4**	Brésil, Venezuela, Nicaragua	
	FIII	**adw4**	Venezuela, Panama, Colombie	
	FIV	**adw4**	Argentine, Bolivie, France	
G	/	**adw2**	USA, Allemagne, Japon, France	3248
H	/	**adw4**	USA, Japon, Nicaragua	3215

Tableau 5 : Caractéristiques des génotypes et sous-types du VHB (D'après Kay et Zoulim, 2007).

* Sérotype majoritaire

Un génotype est défini par une divergence de séquence d'au moins 8 % (voire 7,5 % selon des analyses phylogénétiques plus récentes) pour le génome complet et d'au moins 4,1 % pour le gène S (Kurbanov *et al.*, 2010). Huit génotypes sont actuellement recensés à travers le monde nommés de A à H (De Maddalena *et al.*, 2007 ; Kurbanov *et al.*, 2010). Le génotype F le semble être le plus divergent des autres génotypes connus (De Maddalena *et al.*, 2007 ; Arauz-Ruiz *et al.*, 2002). Deux autres génotypes ont récemment été proposés mais n'ont pas à ce jour encore été officialisés :

- un génotype I circulant au Vietnam, au Laos, au Nord-Ouest de la Chine, en Inde, dont l'existence est contestée, certains auteurs préférant parler d'une souche recombinante avec un « squelette de génotype C » (Tran *et al.*, 2008 ; Yu *et al.*, 2010 ; Kurbanov *et al.*, 2010).
- un génotype J retrouvé chez un patient japonais atteint d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) et ayant voyagé à Bornéo (Tatematsu *et al.*, 2009 ; Kurbanov *et al.*, 2010).

Il existe également une grande hétérogénéité intra-génotypique, les génotypes étant alors divisés en sous-types (tableau 5) (De Maddalena *et al.*, 2007 ; Kay et Zoulim, 2007). Tous les génotypes sauf les génotypes E, G et H sont subdivisés en sous-types. Au sein d'un même génotype, les sous-types viraux diffèrent au minimum de 4 % (entre 4 et 7,5 %) au niveau de la séquence nucléotidique de leur génome complet. Chaque sous-type comprend lui-même de nombreux variants de polymorphisme, répartis en clades quand l'hétérogénéité de séquence ne dépasse pas 4 % (Kurbanov *et al.*, 2010). La distance intra-génotypique est la plus forte au sein du génotype D, notamment au niveau de la région codant le déterminant « a », du cadre préS/S, du gène P (De Maddalena *et al.*, 2007). Les génotypes diffèrent par leur taille (3182 nucléotides pour le génotype D à 3248 nucléotides pour le génotype G) en raison d'insertions ou délétions (tableau 5). De plus, les différents génotypes et sous-types semblent présenter des propriétés virologiques (incidence sur la réponse au traitement antiviral et l'évolution clinique) et épidémiologiques différentes. Au fil du temps, le VHB s'est disséminé dans la population humaine. Du fait du portage chronique du virus, la distribution des génotypes reflète les flux migratoires des populations. Les différentes souches virales ont évolué indépendamment les unes des autres expliquant la répartition des génotypes et des sous-types dans différentes zones géographiques (3.1. Epidémiologie) (De Maddalena *et al.*, 2007 ; Arauz-Ruiz *et al.*, 2002 ; Kurbanov *et al.*, 2010). Le génotype D est le génotype le plus répandu à travers le monde, sa grande dispersion géographique étant une des raisons de sa phylogénie complexe (De Maddalena *et al.*, 2007).

Par ailleurs, des recombinaisons intra et inter-génotypiques ont été décrites, contribuant aussi à la variabilité du virus. Ainsi des recombinants B/C ont été décrits au Japon, C/D au Tibet et D/E au Niger (Deny *et al*., 2010).

2.3. Variabilité phénotypique

Les variants phénotypiques, ou mutants, émergent au sein de la quasi-espèce virale sous l'effet de la pression de sélection environnementale exercée par la réponse immunitaire de l'hôte et/ou les mesures thérapeutiques préventives ou curatives. Les variants phénotypiques sont moins robustes que les variants génotypiques car ces derniers deviennent majoritaires en l'absence de toute pression sélective. Les mutants dont les capacités réplicatives sont les mieux adaptées à la pression exercée, sont sélectionnés. Si certaines mutations confèrent une meilleure adaptation à l'hôte et à la pression de sélection, du fait du chevauchement des cadres de lecture elles peuvent aussi affecter potentiellement l'assemblage, la stabilité ou le pouvoir infectieux du virion. En général, les mutants de résistance aux antiviraux disparaissent rapidement au retrait de la molécule (Kay et Zoulim, 2007).

2.3.1. Les mutants préC/C

L'ORF préC/C possède deux codons d'initiations, en positions 1814 et 1901, sous le contrôle d'un promoteur commun, le promoteur basal du core (BCP). La transcription à partir du premier codon d'initiation donne naissance à un petit ARNm PC (précore) traduit en une protéine précurseur (p25) précore-core. La maturation protéolytique de cette protéine au niveau du réticulum endoplasmique aboutit à une protéine nommée antigène HBe (Ag HBe) sécrétée dans le compartiment sanguin. La transcription à partir du second codon permet la synthèse de l'ARNpg qui sert en particulier à la synthèse de la protéine de capside (protéine C) ou Ag HBc (1.4. Le cycle réplicatif du VHB).

- Les mutants préC

L'Ag HBe est impliqué dans les phénomènes de persistance virale en induisant les fonctions des cellules T helper de type II. Au début de l'infection, l'Ag HBe induirait un état d'immunotolérance en agissant comme un leurre pour les lymphocytes T et en protégeant les hépatocytes infectés qui expriment l'Ag HBc à leur surface. Dans un second temps, lors d'une phase de clairance immunitaire, il devient une cible majeure pour la réponse immunitaire. Souvent une forte réponse anti HBe est suivie d'une forte élévation des transaminases puis d'une baisse de la réplication virale. En dehors de toute mutation précore/core, la

séroconversion en anticorps anti-HBe correspond en général la fin de la réplication virale (Tong *et al.*, 2013 ; Kay et Zoulim, 2007). De plus en plus de patients porteurs chroniques du VHB, avec anticorps anti-HBe (Ac anti-HBe) positifs et Ag HBe négatifs, présentent une réplication virale. Ce phénomène s'explique par la sélection de mutants précore lors de la réponse immunitaire de l'hôte. Ces souches virales sont incapables de synthétiser l'Ag HBe (Tong *et al.*, 2013). Le risque d'hépatite chronique chez l'enfant né de mères porteuses chroniques Ag HBe négatif est généralement moins élevé que dans le cas des mères porteuses chroniques Ag HBe positif. L'absence d'Ag HBe n'induit pas la tolérance immunitaire favorable à la chronicité (Kay et Zoulim, 2007). Deux catégories de mutants affectent l'expression de l'Ag HBe : les mutants précores et ceux touchant le promoteur BCP (Kay et Zoulim, 2007).

Chez les mutants précores, l'expression de l'Ag HBe est totalement abolie. La mutation la plus fréquente, G1896A, transforme le codon 28 de la région préC en codon stop (non-sens) interrompant ainsi la transcription de l'ARNm PC. Pour des raisons structurales, cette substitution est rarement retrouvée pour les génotypes A, F et H (tableau 6). En effet, le nucléotide 1896 est localisé au niveau du signal d'encapsidation ε de l'ARNpg où il interagit avec le nucléotide 1858 pour former une structure secondaire nécessaire à l'encapsidation de l'ARNpg (figure 10). Chez les souches virales de génotypes B, D, E, C, une thréonine (T) occupe la position 1858 et elle peut parfaitement interagir avec le nucléotide 1896 muté. Ceci n'est pas le cas chez les souches de génotypes A, F, H. L'encapsidation et la réplication seraient alors déstabilisées (Kay et Zoulim, 2007). Il existe d'autres mutations de la région précore (substitutions, non-sens, décalage du cadre de lecture) qui modifient la traduction de l'ARNm PC.

Chez les mutants du promoteur basal du core (BCP), la double substitution A1762T/G1764A est le plus souvent retrouvée chez les patients Ac anti-HBe positifs/Ag HBe négatifs. Elle entraine une diminution de la synthèse de l'ARNm PC et donc de l'Ag HBe. Le BCP possédant des sites de fixation pour des facteurs nucléaires de transcription, la double mutation induirait la disparition de ces sites et secondairement une baisse de la réplication virale (ARNpg) et de l'expression de l'Ag HBe (ARNm PC). La double mutation peut aussi engendrer l'apparition d'un site pour un autre facteur de transcription (HNF1) dont l'activité est aussi associée à une diminution des ARNm PC. Paradoxalement, cette baisse de la réplication ne semble pas être observée *in vitro* en culture cellulaire (Kay et Zoulim, 2007).

L'apparition d'autres mutations (aux positions 1753, 1766 et 1768), associées à la double mutation précédente, peuvent entrainer une baisse encore plus importante de la sécrétion

d'Ag HBe et une réplication virale *in vitro* normale voire très augmentée. Ces mutants BCP ont d'ailleurs souvent été retrouvés chez des patients présentant des atteintes sévères du foie ou des tableaux d'hépatites fulminantes en raison de réponses immunitaires exacerbées (Kay et Zoulim, 2007).

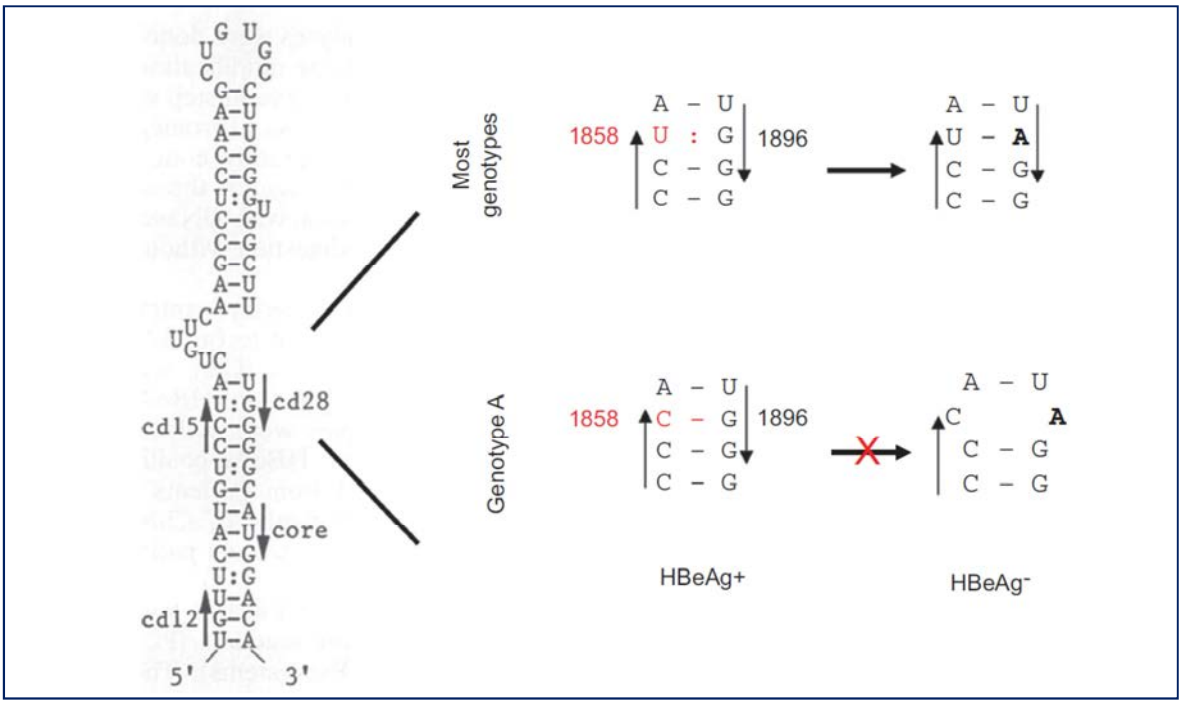


Figure 10 : Représentation schématique de la mutation G1896A du promoteur BCP (Tong *et al.*, 2013).

La fréquence des mutants préC est variable en fonction du génotype. Le génotype G possède à l'état sauvage les mutations BCP et précore ; la synthèse de l'Ag HBe étant naturellement absente. Lors d'infections aiguës par le génotype G les patients sont bien Ag HBe négatifs et Ac anti-HBe négatifs. Certains patients infectés chroniquement par le génotype G sont pourtant Ag HBe positif. Cette configuration peut s'expliquer par deux phénomènes :

- une séro-réactivité « Ag HBe-like » des 12 acides aminés supplémentaires de l'Ag HBc
- une possible co-infection avec un autre génotype (souvent de génotype A) supplémentant les souches de génotype G en Ag HBe et permettant ainsi la persistance de ce génotype (Kay et Zoulim, 2007).

Génotype	Sous-types	Absence de mutant préC	Mutation au niveau du Basal Core Promoter (BCP)	Mutation au niveau du codon 28 de la région préC	Mutation au niveau du BCP et du codon 28
A	/	56 %	38 %	1 %	
B	B1	31 %	3 %	56 %	9 %
	B2	47 %	11 %	25 %	18 %
	B3	67 %	0 %	33 %	0 %
	B4	42 %	17 %	33 %	8 %
	Moyenne	43 %	9 %	33 %	15 %
C	C1	28 %	42 %	6 %	24 %
	C2	31 %	64 %	3 %	3 %
	C3	100 %	0 %	0 %	0 %
	Moyenne	30 %	48 %	5 %	18 %
D	/	41 %	15 %	27 %	17 %
E	/	78 %	11 %	0 %	11 %
F	/	83 %	5 %	2 %	10 %
G	/	0 %	0 %	0 %	100 %
H	/	70 %	30 %	0 %	0 %
Primates	/	89 %	0 %	11 %	0 %

Tableau 6 : Fréquence des mutants BCP et précore en fonction du génotype viral (d'après Kay et Zoulim, 2007)

✓ Remarque

Le rôle des mutants préC sur l'évolution de la maladie et la sévérité des lésions hépatiques reste à préciser aujourd'hui.

Des mutants préC sont souvent retrouvés dans des tableaux d'hépatites fulminantes. La diminution de l'Ag HBe pourrait rompre la tolérance immunitaire provoquant une destruction massive des hépatocytes porteurs de l'Ag HBc.

Au cours d'infections chroniques, une association entre la présence de mutants préC et un score de fibrose élevé (F3/F4) a été observée.

Le rôle potentiel des mutations préC dans la survenue d'un carcinome hépatocellulaire a également été envisagé. (Fattovich *et al*., 2008).

❖ Les mutants de la protéine core

De nombreuses mutations (insertions, substitutions, délétions) de la protéine core (Ag HBc) s'accumulent au cours d'une infection chronique par le VHB notamment dans des régions ciblées par les lymphocytes T et B. Elles se traduisent par un échappement au système immunitaire de l'hôte. Ces mutants sont généralement défectifs et ne sont pas transmis, sauf pour ceux de génotypes A et G qui ont acquis naturellement une insertion de 2 et 12 codons dans le gène C (Kay et Zoulim, 2007).

2.3.2. Les mutants de la polymérase

Plus d'un tiers du génome code la polymérase virale. Les mutants de la polymérase émergent sous pression thérapeutique avec l'utilisation des analogues nucléos(t)idiques ciblant l'enzyme virale. Le plus souvent les mutations sont décrites au niveau du site catalytique de la transcriptase inverse surtout au niveau d'un motif peptidique, le motif YMDD. Nous reviendrons sur ces mutants dans la partie 3.5.1 les molécules antivirales (Locarnini et Yuen, 2010).

2.3.3. Les mutants préS1 et préS2

La plupart des mutations affectant la région préS sont des délétions. La région préS chevauche une région du cadre de lecture codant la polymérase appelée « spacer ». Cette région spacer peut supporter une grande variabilité (dont des insertions ou des délétions) sans que cela n'influence l'activité enzymatique de la polymérase (Kay et Zoulim, 2007).

La région préS1 est soumise à des contraintes structurales et fonctionnelles notamment au niveau de la zone codant les aa 2-75 N-terminaux (impliqués dans l'attachement à l'hépatocyte, la morphogenèse et la sécrétion du virion) et du promoteur du gène S en 3'. Les mutants préS1 constituent donc des populations virales minoritaires car bien que pouvant se répliquer, ils nécessitent la présence d'un virus « helper » leur fournissant les protéines sauvages qu'eux même ne peuvent produire (Kay et Zoulim, 2007).

Il y a moins de contraintes structurales et fonctionnelles exercées sur la région préS2. L'apparition de mutants préS2 est donc plus fréquente. Cependant la région préS2 ne semble pas indispensable à la réplication virale, à la morphogénèse des particules virales et au pouvoir infectieux. Il peut s'agir de délétions, substitutions ou mutations non-sens. Lorsque celles-ci affectent le codon d'initiation de préS2, elles vont empêcher la synthèse de la protéine ou altérer des épitopes des lymphocytes B et T. Les délétions ou substitutions

touchant les épitopes des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) ou des lymphocytes T helper (LTh) se situant sur préS1 et préS2 pourraient favoriser l'échappement immunitaire. Ces mutants sont sélectionnés par le système immunitaire de l'hôte lors d'infections chroniques et sont souvent retrouvés chez des patients traités par interféron (Kay et Zoulim, 2007).

Il existe peu de données sur la transmissibilité des mutants préS. Ils ne jouent probablement qu'un faible rôle dans l'évolution naturelle du virus si l'on excepte le génotype D. Ce génotype a pu émerger malgré une délétion de 33 nucléotides au début du domaine preS1 laissant les sites de reconnaissance hépatocytaires intacts et la protéine L produite viable (Kay et Zoulim, 2007).

2.3.4. Les mutants de la protéine S

L'antigène HBs est la cible principale de la neutralisation virale par les anticorps anti-HBs induits naturellement ou par vaccination. Cette protéine contient quatre domaines transmembranaires et une région exposée en surface des particules et la cible privilégiée de la réponse humorale, la « Major Hydrophilic Region » ou MHR (99-169) (Carman, 1997). La pression immunitaire exercée au niveau de cette région entraine l'apparition de mutants généralement au niveau de la MHR. La majorité des mutations rapportées sont de simples substitutions d'acides aminés au niveau du déterminant « a » (124-149) qui contient la plupart des épitopes pour les anticorps neutralisants (De Maddalena *et al.*, 2007). Des mutations spécifiques autour et dans le déterminant « a » de la MHR peuvent entrainer une modification de l'antigénicité (Araujo *et al.*, 2009).

Ces mutants dits « d'échappement vaccinal » peuvent aussi être retrouvés chez des personnes non vaccinées. En effet, des mutations ont été décrites au cours de l'histoire naturelle de l'infection chez certains patients, en dehors de tout contexte vaccinal (Weber, 2005). Cependant, la majorité des positions avait déjà été décrite pour les mutants d'échappement à la pression vaccinale. De plus certains de ces variants peuvent initialement être minoritaires chez les patients avant d'émerger sous pression immunitaire induite par la vaccination ou l'administration d'immunoglobulines anti-HBs (chez les transplantés hépatiques) (Kay et Zoulim, 2007).

Le premier mutant décrit, le plus étudié et le plus fréquent, comporte la substitution G145R. (Tong *et al.*, 2013). Ce mutant est stable, capable de se répliquer et de se transmettre (Weber, 2005). Du fait du chevauchement du gène S avec celui de la polymérase, la mutation G145R correspond à W153Q dans le cadre codant la polymérase. La mutation W153Q induit un produit du gène polymérase altéré, capable de réplication mais avec un taux abaissé. D'autres

mutants associés à un échappement immunitaire ont été décrits: I/T126A/N, A128V, Q129H/R, G130N, T131I, M133L/T, K141E/R, P142S, S143L, D144A/H/E, G145A (Carman, 1997 ; Kay et Zoulim, 2007). La plupart de ces variants ont une affinité réduite pour les anticorps monoclonaux dirigés contre le déterminant « a » ; il peut donc exister une diminution, voire une absence de réactivité avec certains tests commerciaux de détection de l'Ag HBs. Aujourd'hui, les tests sont très fiables et utilisent des cocktails d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux capables de reconnaitre aussi les Ag HBs mutés (Kay et Zoulim, 2007).

D'autres mutations localisées en dehors du déterminant « a » ont également été rapportées notamment au début de la MHR où les aa ont une importance conformationnelle :

- de rares cas de délétions (en 110, 111 et entre 119 et 122) ou d'insertions (entre les aa 118 et 123) dans la première boucle de l'Ag HBs (Carman, 1997 ; Weber, 2005)
- des mutations ponctuelles : P120S/T mais aussi Y100C, Q101H, S117N, T118R ou F183C qui est localisée en dehors de la MHR. (Carman, 1997 ; Weber, 2005)

Ces mutations engendrent une réduction, voire une absence de reconnaissance par des anticorps monoclonaux (anticorps vaccinaux et /ou trousses diagnostic selon les épitopes ciblés). Ainsi, même en dehors du déterminant « a », des mutations peuvent affecter la structure de l'antigène.

Certains de ces mutants se répliquent parfaitement et sont stables dans le temps (notamment sous pression immunitaire). Ils peuvent donc être transmis et la plupart des transmissions rapportées sont verticales (mère/enfant et hôte/greffe) mais certaines sont horizontales (Kay et Zoulim, 2007). Une étude a montré la transmission de variants du déterminant « a » chez des enfants nés de mères porteuses de l'Ag HBs malgré une immunisation à la naissance. Les substitutions T125M, I126T, P127T, T131N, F134Y ont notamment été retrouvées (Velu *et al.*, 2008).

Les mutants de l'Ag HBs sont essentiels à l'échappement immunitaire mais ne sont pas suffisants car ils ne peuvent émerger que chez des patients dont la réponse anti-HBs est limitée et restreinte à certains épitopes différents de celui qui est muté (Kay et Zoulim, 2007).

Par ailleurs, au cours de la réponse immunitaire, les lymphocytes T helper ($CD4^+$) ont un rôle central puisqu'ils sont capables de sécréter des cytokines et des facteurs de croissance afin d'initier la réponse humorale (Lymphocytes B et anticorps) et la réponse cellulaire (LTc-$CD8^+$). Différentes régions de la protéine S contiennent des épitopes des LTh et des LTc et de plus en plus de mutations d'échappement immunitaire sont décrites y compris sur ces épitopes (tableau 7) (Ramezani *et al.*, 2013).

		Th Epitope						CTL Epitope	B cell Epitope				
	Amino acid position	24	30	44	45	56	80	207	109	113	115	134	143
	Wild type	R	Q	G	T	P	F	S	L	S	T	Y	S
Sample code	167			E							A		P
	168								Q				
	169												
	170				K			T					
	171												
	172	K											
	174												
	176			E									
	177								Q				
	178		K				S						
	179					Q				T			
	180								Q			D	

Tableau 7 : Mutations retrouvées sur des épitopes de reconnaissance des lymphocytes B (B cell Epitope), T helper (Th Epitope) et cytotoxiques (CTL Epitope) (Ramezani *et al*., 2013).

Du fait du chevauchement des ORFs P et préS/S, les mutations survenant au niveau de la polymérase sous pression thérapeutique, peuvent avoir un impact sur l'antigène HBs. En effet, certaines mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques peuvent modifier la structure de l'Ag HBs en aval du déterminant « a ». Ces mutants sont également reconnus avec moins d'affinité par les Ac anti HBs présents dans les tests diagnostiques (Torresi, 2002).

✓ Remarque :

Les mutants des protéines d'enveloppe virale préS/S émergent donc sous la pression immuno-thérapeutique générée par la vaccination, l'utilisation d'immunoglobulines anti-HBS, les traitements antiviraux et la réponse immunitaire de l'hôte surtout lorsque celle-ci est imparfaite.

3. L’infection par le virus de l’hépatite B

3.1. Epidémiologie

Le VHB, malgré la disponibilité d’un vaccin efficace et bien toléré depuis 1986, reste un problème de santé publique majeur. Plus de 2 milliards d’individus dans le monde présentent des marqueurs sérologiques évoquant une infection ancienne ou en cours par le virus de l’hépatite B, soit environ 30 % de la population mondiale. On estime que 240 millions de personnes (données de l’OMS, mises à jour en juillet 2015), soit 5 % de la population mondiale, présentent une infection chronique et risquent de développer des pathologies hépatiques liées au virus (essentiellement cirrhose et carcinome hépatocellulaire). La majorité des porteurs chroniques du virus se trouvent en Asie (78 %) et en Afrique (16 %) (Nebbia *et al.*, 2012).

La prévalence de ce virus à travers le monde est inégale, définissant ainsi des régions de forte endémie (prévalence de l’Ag HBs dans la population ≥ 8 %), de moyenne endémie (2-8 %) et de faible endémie (< 2 %). La prévalence de l’infection varie donc de plus de 10 % de la population, en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud-Est, à moins de 1 % en Europe occidentale et en Amérique du Nord. Globalement, environ 45 % de la population mondiale vit dans des zones de haute endémicité (figure 11) (Dawson, 2005 ; Nebbia *et al.*, 2012).

Le mode de transmission, l’âge au moment de la contamination et les manifestations cliniques différent beaucoup selon la prévalence de l’infection dans une région donnée (Nebbia *et al.*, 2012). L’incidence et la prévalence de l’infection VHB semblent inversement proportionnelles au niveau socio-économique dans une région donnée.

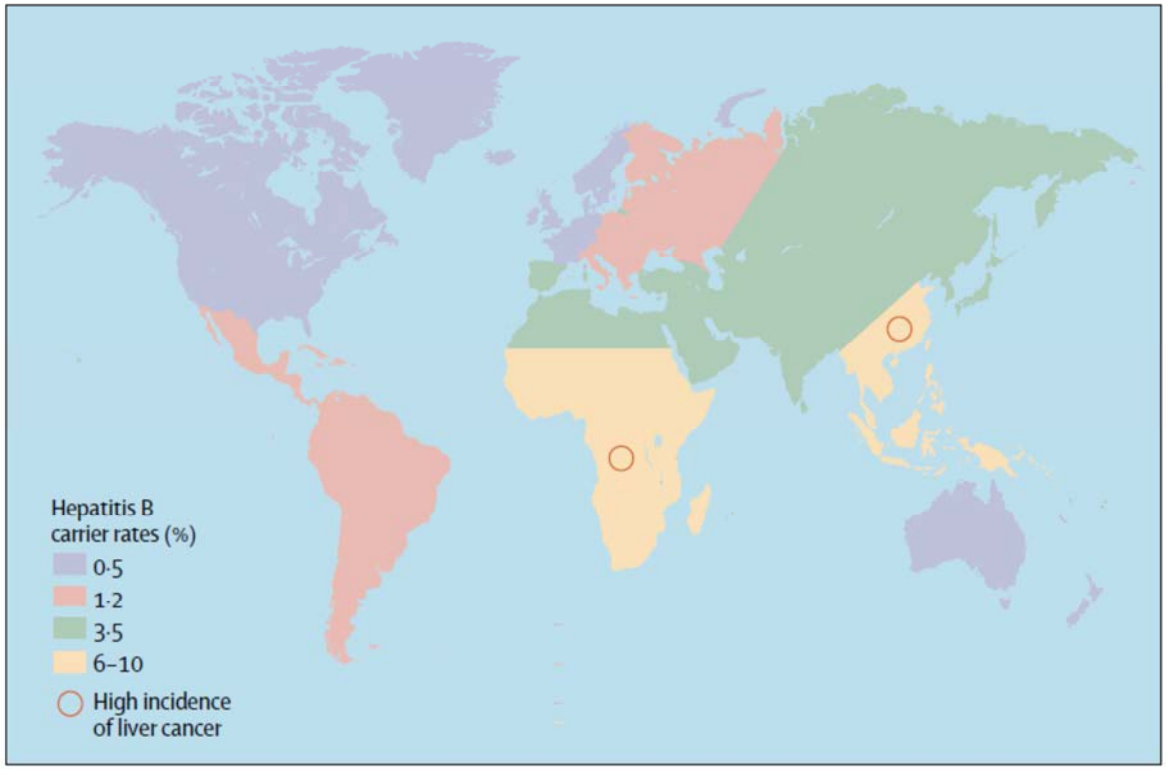


Figure 11 : Prévalence de l'infection par le VHB (Dawson, 2005).

La France se situe dans une zone de très basse endémie. Une enquête nationale menée en 2004 par l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) sur la population générale a permis d'estimer la prévalence de l'antigène HBs à 0,65 % de la population française métropolitaine âgée de plus de 18 ans. Ce taux de prévalence de l'Ag HBs correspondrait à environ 300 000 cas d'hépatite B chronique. Parmi ces personnes, 45 % seulement connaissaient leur statut sérologique Ag HBs positif. La prévalence des anticorps anti-HBc était évaluée à 7,3 % indiquant que plus de 3 millions de personnes ont été en contact avec le VHB. L'incidence en France est de 30 000 à 60 000 nouveaux cas par an chez les plus de 20 ans (Meffre *et al.*, 2010).

L'activité de dépistage de l'Ag HBs en constante augmentation en France depuis 2000, mais le taux de positivité de l'Ag HBs diminue. Il semble donc que ce dépistage reste peu ciblé sur les populations les plus à risque. Or, il est recommandé réaliser ce dépistage chez les partenaires sexuels ou les personnes cohabitant avec un sujet atteint d'une infection aigue ou chronique, ou bien avant de procéder à la vaccination chez les personnes à risque. Il est par ailleurs obligatoire chez les femmes enceintes au sixième mois de grossesse (Pioche *et al.*, 2014).

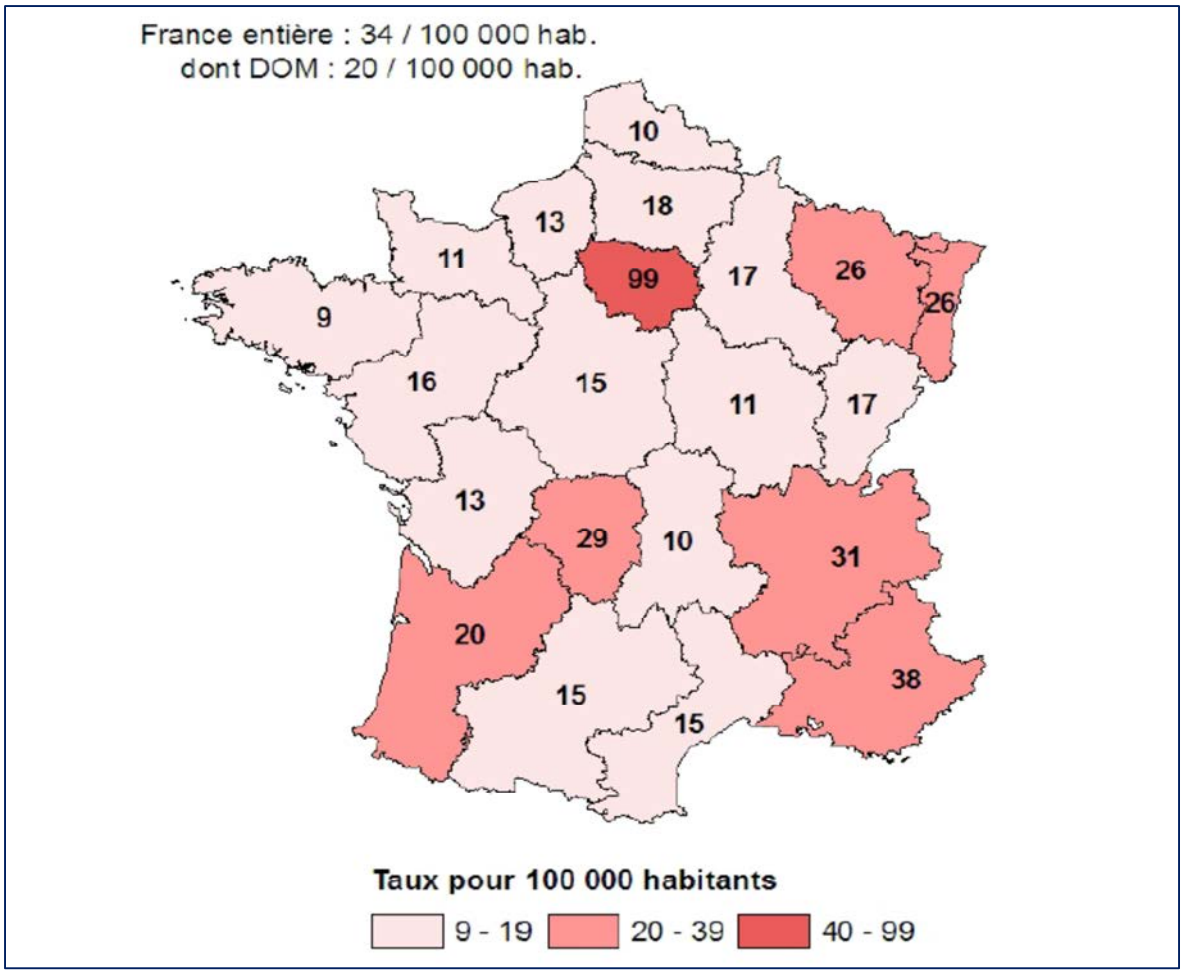


Figure 12 : Estimation du taux de prévalence du portage de l'Ag HBs en France d'après un recueil de données issues des laboratoires privés participant à l'étude Labohep entre 2010 et 2012 (Enquête InVS Labohep, 2010).

Les facteurs de risque de transmission les plus rencontrés en France sont l'usage de drogue par voie intraveineuse, la précarité, un séjour d'au moins 3 mois en institution, un pays de naissance où la prévalence de l'antigène HBs est supérieure à 2 % et le fait d'être un homme de plus de 29 ans (Meffre *et al*., 2010).

Une enquête nationale réalisée entre 2004 et 2011 sur la mortalité liée à l'hépatite B a estimé à 1507 le nombre de décès dus au virus, ce qui correspond à un taux de mortalité de 2,6 pour 100 000. Ce taux de décès est 2,5 fois plus important chez l'homme que chez la femme avec un âge moyen de 65 ans (Septfons *et al*., 2013).

Comme évoqué plus haut, le VHB présente une grande variabilité de séquence et huit génotypes sont actuellement reconnus, nommés de A à H (2.2. Variabilité génotypique). Ces huit génotypes ont une répartition géographique différente dans le monde (figure 13).

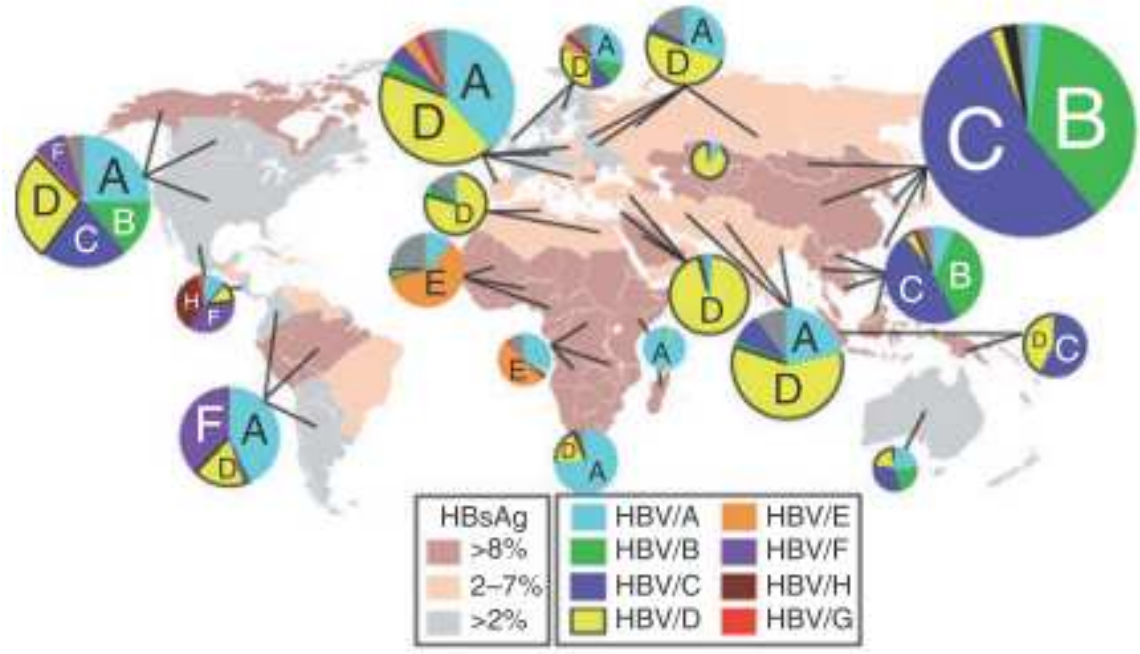


Figure 13 : Répartition mondiale des différents génotypes du VHB (d'après Kurbanov *et al*., 2010).

Le génotype A circule essentiellement en Europe Occidentale et en Amérique du Nord pour le sous-type A2 et en Afrique pour le sous-type A1. Les génotypes B et C sont particulièrement présents en Asie (Chine, Japon, Asie du Sud-Est) et en Polynésie. Le génotype D présente une répartition mondiale (Moyen-Orient, Inde, Indonésie, Australie, Afrique du Sud, Somalie et Alaska), mais prédomine dans le bassin méditerranéen. La distribution du génotype E est plus restreinte à l'Afrique de l'Ouest bien que sa prévalence augmente en France et en Grande-Bretagne, du fait de l'immigration. Le génotype F est plus caractéristique des populations autochtones d'Amérique du Sud. Polynésie et Amérique du Sud, mais est aussi présent en Alaska. Le génotype G a été retrouvé chez des patients isolés en Europe, Amérique du Nord et Japon. La répartition du génotype H est restreinte aux populations amérindiennes d'Amérique Centrale ainsi qu'à la Polynésie (Arauz-Ruiz *et al*., 2002 ; Kramvis *et al*., 2005 ; Kay et Zoulim, 2007 ; Kurbanov *et al*., 2010).

Cette distribution géographique tend à évoluer et n'est plus aussi restrictive, du fait de la mondialisation de l'économie, le développement des moyens de transport et surtout de l'augmentation des flux migratoires des pays pauvres vers les pays riches. Des souches de génotypes B et C ont été ainsi retrouvées aux USA chez des patients d'origine asiatique et des

souches de génotype H chez des patients latino-américains. Des souches de génotypes A et E co-existent dans le bassin méditerranéen avec les souches majoritairement de génotype D importées par des populations d'origine africaine (Kramvis *et al.*, 2005).

Les principaux génotypes circulant en France sont les génotypes D, A et E, le génotype D étant très largement majoritaire. Une étude menée par l'InVS entre 2008 et 2011 auprès des patients infectés nouvellement pris en charge dans les services d'Hépato-gastroentérologie en France relevait la répartition suivante : génotype D (42 %), génotype A (27 %) et génotype E (17 %) (Pioche *et al.*, 2014). Les résultats d'une enquête menée chez les donneurs de sang français entre 2005 et 2010, montraient une distribution similaire : génotype D (42,4 %), génotype A (27,7 %), génotype E (16,8 %), génotype C (6,5 %), génotype B (6,3 %), génotype F (0,7 %) (Laperche *et al.*, 2012).

Les différents génotypes et sous-types présentent des propriétés épidémiologiques, mais aussi virologiques distinctes notamment en ce qui concerne l'évolution clinique de la maladie et également la réponse au traitement. Dans les pays asiatiques, les patients infectés par un VHB de génotype C développent plus fréquemment et plus précocement des pathologies chroniques du foie (notamment carcinome hépatocellulaire) que les patients infectés par les VHB de génotypes B. Le génotype A conduit à plus d'infections chroniques que le génotype D dans des pays où coexistent les deux génotypes. Le génotype F, dans le bassin amazonien est souvent associé à des tableaux d'hépatite aigue sévère. Si des essais cliniques portant sur l'utilisation d'interféron pégylé ont montré de meilleurs taux de réponses chez les patients infectés par du VHB de génotype A ou B, aucune corrélation n'a été à ce jour définie entre le génotype du VHB et la réponse à la thérapie antivirale par analogues nucléos(t)idiques (Brunetto *et al.*, 2009 ; Dény et Zoulim, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011). Cependant d'autres facteurs d'hôte (génétiques) et / ou environnementaux sont également à prendre en compte dans l'évolution de l'infection chronique et la réponse au traitement antiviral (Kay et Zoulim, 2007 ; Dény et Zoulim, 2010).

3.2. Modes de transmission

Le virus de l'hépatite B est présent dans différents fluides corporels de patients infectés : le sang (jusqu'à 10^9 virions/ml), le sperme et les sécrétions vaginales (10^6 à 10^7 virions/ml), la salive (10^5 à 10^7 virions/ml) et le lait maternel. Le VHB est très résistant dans le milieu extérieur (il reste infectieux pendant plus de sept jours dans le milieu extérieur). Il est dix fois plus contaminant que le virus de l'hépatite C (VHC) et 100 fois plus que le virus de

l'immunodéficience humaine (VIH). La présence du VHB dans ces différents liquides biologiques reflète les différents modes de transmission de l'infection :

- contamination par voie parentérale survenant : chez les usagers de drogues par voie intraveineuse (UDIV) ou pernasale, lors de dons du sang dans certains pays, ou lors d'accidents d'exposition au sang (AES, piercing, tatouage …)
- contamination par voie sexuelle survenant : lors de rapports non protégés avec une personne porteuse de l'Ag HBs
- contamination horizontale survenant : lors d'un contact étroit (lésions cutanées, muqueuses) avec des porteurs chroniques au sein d'une collectivité ou d'un foyer
- contamination verticale ou materno-infantile, survenant : chez des mères porteuses chronique du virus, majoritairement en période périnatale (accouchement, maternage) et plus rarement *in utero*. Ce risque est d'autant plus élevé que la charge virale de la mère est plus haute.

Aucun mode de transmission ne serait identifié dans environ 30 à 35 % des cas.

Ces différents modes de transmission ont une importance variable à travers le monde. En effet, dans les zones de forte endémie, la contamination survient à un âge précoce et la transmission s'effectue par voie verticale (périnatale) ou horizontale. En Asie, où la plupart des femmes enceintes porteuses chroniques du virus ont une charge virale élevée, le risque de transmission verticale est très important. En Afrique, les charges virales élevées sont plutôt retrouvées chez les jeunes enfants nouvellement infectés lors de transmissions horizontales (Allain, 2006 ; Nebbia *et al.*, 2012). La survenue d'une contamination tôt dans l'enfance, facilitant un portage chronique, permet la pérennisation du réservoir du virus. Dans les zones de faible endémie, la contamination survient surtout à l'âge adulte par voie sexuelle et surtout par voie parentérale chez les UDIV (Allain, 2006 ; Nebbia *et al.*, 2012).

3.3. Histoire naturelle de l'infection

La sévérité de l'atteinte hépatique observée lors d'une infection par le VHB varie fortement selon les individus et notamment en fonction de l'âge au moment de la contamination. Lors d'une contamination à l'âge adulte, dans plus de 90 % des cas, les personnes infectées développent une hépatite aigue très rapidement résolutive grâce au contrôle du système immunitaire. Chez certains individus ne parvenant pas à éliminer le virus, l'infection devient chronique avec un risque accru de développer des atteintes hépatiques sévères telles que la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire. Le taux de passage à la chronicité est bien plus

important, nous le développerons par la suite, lors d'une contamination à la naissance ou très tôt dans l'enfance. Par ailleurs, dans moins de 1 % des cas, une réponse immunitaire trop intense conduit à un tableau d'hépatite fulminante (figure 14).

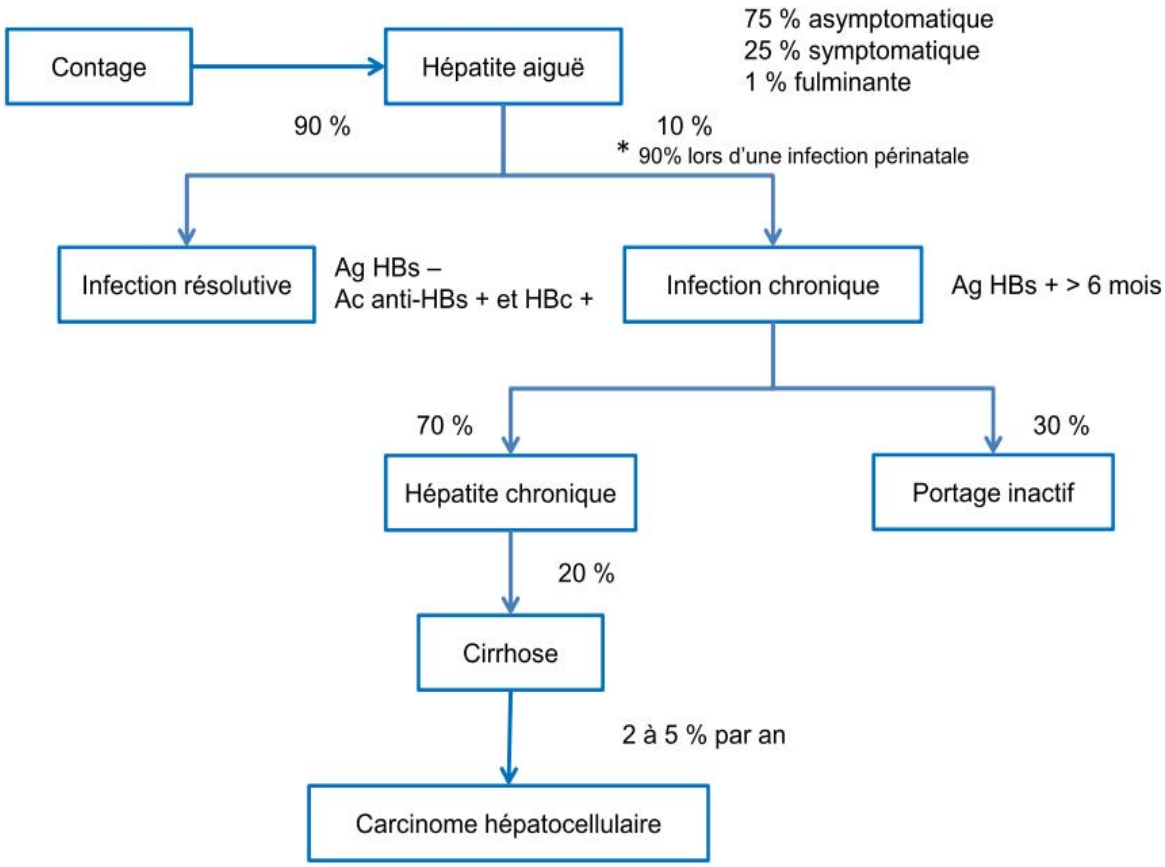


Figure 14 : Histoire naturelle de l'infection par le VHB (D'après Pol, 2006).

3.3.1. L'infection aiguë

L'intensité des symptômes d'une infection aigue varie beaucoup selon les individus. Dans 75 % des cas, l'infection aiguë est asymptomatique, passe inaperçue et n'est pas diagnostiquée. L'infection peut être symptomatique dans 25 % des cas chez les adultes, 10 % chez les enfants de moins de 5 ans et encore plus rarement chez les enfants de moins d'un an (Nebbia *et al.*, 2012). La fréquence des signes cliniques augmente avec l'âge au moment de la contamination. Après la contamination, la période d'incubation est généralement longue (1 à 6 mois) (Dény et Zoulim, 2010 ; Nebbia *et al.*, 2012). Chez les patients symptomatiques, une phase pré-ictérique (3 à 7 jours) survient, ensuite, au cours de laquelle des symptômes non

spécifiques sont observés : des nausées, une asthénie, une anorexie, plus ou moins accompagnées de fièvre, arthralgies et plus rarement de manifestations cutanées de type urticaire (Dény et Zoulim, 2010). Puis, durant au moins deux à trois semaines, les patients présentent un ictère d'intensité variable accompagné ou non d'un prurit. Le taux des transaminases et notamment l'alanine-amino-transaminase (ALAT) est également très élevé (20 à 30 fois supérieure à la normale) en raison d'une forte cytolyse hépatique. Dans le cas d'une résolution de l'infection, une disparition de l'Ag HBs et une apparition des Ac anti-HBs protecteurs sont observées dans le sérum des patients. Au cours de la phase de convalescence, l'asthénie diminue progressivement et le taux des transaminases se normalise (Dény et Zoulim, 2010).

Le tableau clinique d'hépatite fulminante est une complication rarement observée, dans moins de 1 % des hépatites aiguës. Elle correspond à une nécrose hépatocytaire massive qui est fatale dans environ 80 % des cas en l'absence d'une transplantation hépatique.

3.3.2. L'infection chronique

L'infection chronique est définie par la présence de l'antigène HBs depuis au moins 6 mois dans le sérum d'un individu. Elle fait suite à une infection aiguë, qui échappe au contrôle par le système immunitaire de l'hôte. Le principal facteur favorisant le passage à la chronicité de l'infection est l'âge au moment de la contamination. Le risque est supérieur à 90 % lors d'une infection périnatale, du fait de l'immaturité du système immunitaire. Il est de 20 à 30 % au cours de la petite enfance (entre l'âge de 1 et 5 ans), de 6 % entre l'âge de 5 et 15 ans et décroit jusqu'à 1 % chez l'adulte immunocompétent (Fattovich *et al.*, 2008 ; Nebbia *et al.*, 2012). Des facteurs immunogénétiques pouvant également favoriser le passage à la chronicité ont été évoqués, mais ils restent actuellement discutés (absence d'HLA DR2 et présence d'HLA DR7 par exemple) (Pol, 2006).

La présentation clinique d'une infection chronique par le VHB est très variable d'un patient à l'autre. Le plus souvent les patients sont asymptomatiques ou peu symptomatiques et par conséquent la découverte du portage chronique du virus se fait de façon tardive et fortuite. L'évolution naturelle de l'atteinte hépatique est la destruction plus ou moins rapide du parenchyme hépatique avec les risques associés de progression vers la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire.

L'histoire naturelle de l'infection chronique peut se décrire en cinq phases successives caractérisées par l'équilibre dynamique existant entre la réplication du virus et la réponse immunitaire de l'hôte (figure 15) (Dény et Zoulim, 2010 ; Fattovich *et al*., 2008).

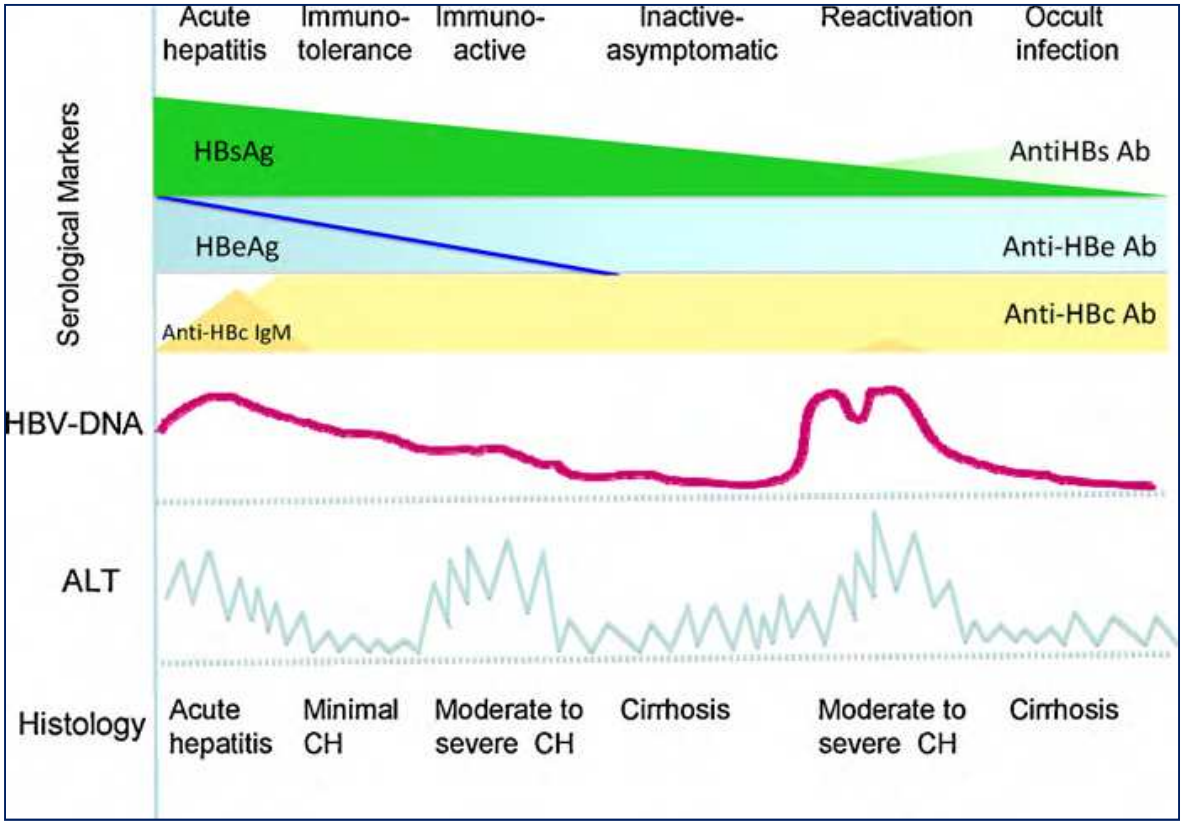


Figure 15 : Les différentes phases de l'histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB (Dény et Zoulim, 2010).

- ❖ Phase de tolérance immune

Au cours de cette phase, la réponse immunitaire est faible voire inexistante, ce qui permet une multiplication intense du virus. Les marqueurs biologiques témoignant de la réplication virale, que sont l'Ag HBe et l'ADN VHB, présentent des taux sériques élevés. En l'absence d'une réponse immunitaire vigoureuse, les taux de transaminases (marqueurs enzymatiques de cytolyse hépatiques) sont normaux ou légèrement augmentés (figure 15). L'infectiosité du malade est alors importante (Pol, 2006).

A la ponction biopsie hépatique (PBH) réalisée pour évaluer le degré de lésions nécrotico-inflammatoire hépatique, les lésions sont absentes ou très modérées.

✓ Remarque :

Quand cela est possible, des techniques non invasives d'évaluation de la sévérité histologique (Fibrotest® ou Fibroscan®) sont préférées à la réalisation de la PBH (douloureuse pour le patient et de reproductibilité médiocre).

Dans le contexte d'une infection périnatale, cette phase est généralement induite par le passage de l'Ag HBe présent dans le sang maternel à travers le placenta (Chan *et al.*, 2011). Elle peut durer 10 à 30 ans en cas d'infection périnatale ou être très courte ou absente si l'infection est acquise plus tard dans l'enfance ou à l'âge adulte (Dény et Zoulim, 2010 ; Nebbia *et al.*, 2012 ; Fattovich *et al.*, 2008 ; Chan *et al.*, 2011).

❖ Phase de clairance immune

Au cours de cette phase la réponse immunitaire adaptative se met en place ce qui conduit à la lyse des hépatocytes infectés (Fattovich *et al.*, 2008). Ce processus peut durer de plusieurs mois à plusieurs années (Dény et Zoulim, 2010). Une diminution progressive et fluctuante du taux des marqueurs de la réplication virale, l'Ag HBe et l'ADN viral, est donc observée (Dény et Zoulim, 2010 ; Nebbia *et al*., 2012 ; Fattovich *et al.*, 2008). La charge virale reste en général supérieure à 20 000 UI/ml chez les patients montrant un Ag HBe positif (Fattovich *et al*., 2008). Le taux sérique des ALAT augmente (Fattovich *et al*., 2008).

Lors de la PBH, la formation et la progression des lésions nécrotico-inflammatoires peuvent être observées. Ces lésions peuvent être de modérées à sévères (Nebbia *et al.*, 2012 ; Dény et Zoulim, 2010 ; Fattovich *et al*., 2008). Au cours de cette phase une séroconversion dans le système HBe (apparition des Ac anti-HBe et disparition de l'Ag HBe) est possible, de l'ordre de 10 à 30 % /an (Nebbia *et al*., 2012 ; Dény et Zoulim, 2010).

Lorsque la réponse immunitaire n'est pas assez vigoureuse, il se crée un état d'équilibre. Si la clairance immune est prolongée et inefficace une charge virale élevée persistante est observée, ainsi que des taux d'ALAT élevés et un risque d'évolution vers la cirrhose qui augmente (Chan *et al*., 2011).

Dans le cas des hépatites chroniques avec Ag HBe négatif, liées à la présence d'un mutant préC (2.3.1. les mutants préC/C), la réplication virale est persistante malgré la séroconversion HBe. La prévalence mondiale de ce type d'hépatite chronique a augmenté probablement avec l'âge des porteurs chroniques de l'Ag HBs (2.3.1 les mutants préC/C). Ainsi, elles représenteraient 70 à 90 % des infections chroniques au diagnostic en Italie et en France. En

général les patients sont plus âgés que ceux porteurs chroniques avec Ag HBe positif au diagnostic de l'infection et présentent plus souvent une cirrhose. Les charges virales mesurées chez ces patients sont en général plus faibles. Cependant, ils présentent souvent de grandes variations de charges virales et des taux sériques d'ALAT. Ces patients montrent une progression plus sévère de l'atteinte hépatique (Dény et Zoulim, 2010 ; Fattovich *et al*., 2008 ; Chan *et al*., 2011).

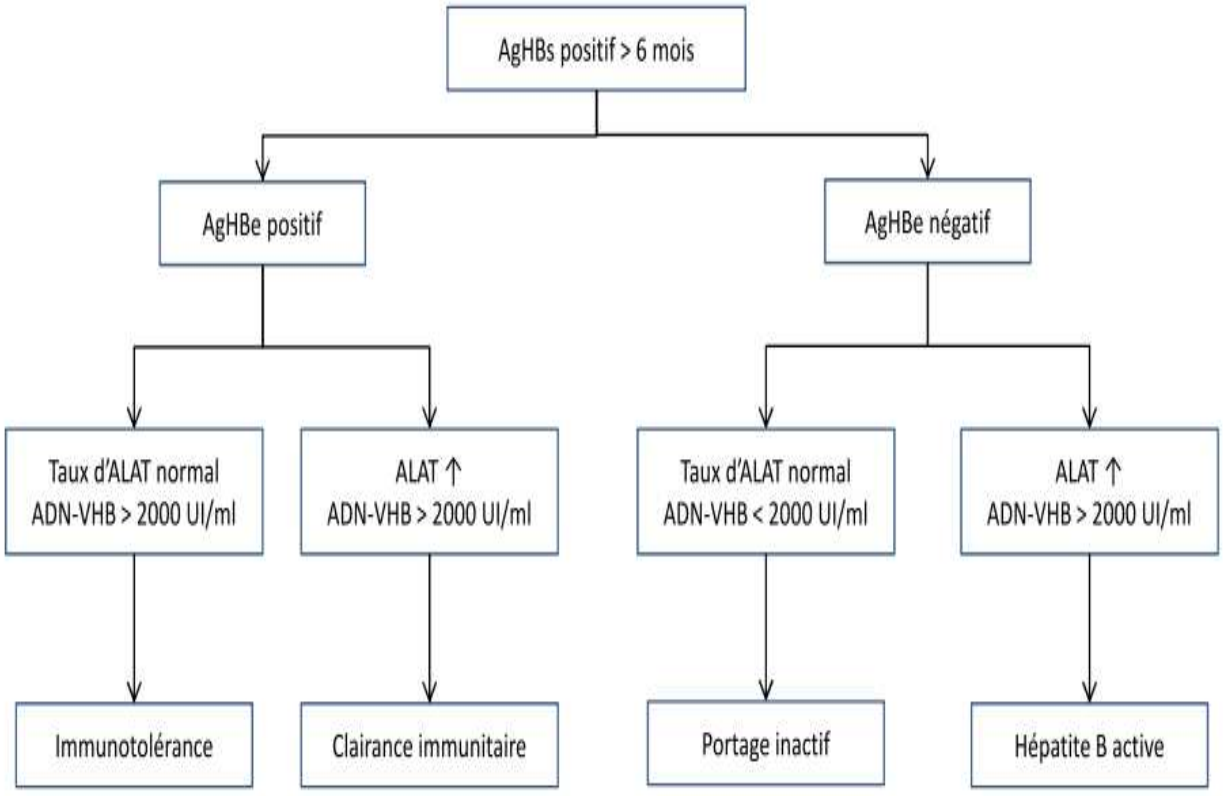


Figure 16 : Evolution des marqueurs biologiques au cours des phases de l'histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB.

✓ Remarque :

Les taux d'Ag HBs sériques mesurés chez les patients en phase de tolérance immune seraient supérieurs à ceux mesurés chez les patients en phase de clairance immune. Un taux très élevé de l'ordre de 100 000 UI/ml serait une preuve de tolérance immune. Par conséquent, la quantification de l'Ag HBs pourrait fournir une donnée supplémentaire pour différencier les phases de tolérance immune et de clairance immune lorsque la charge virale est encore élevée et que les taux d'ALAT sont normaux ou peu élevés (Chan *et al.*, 2011).

❖ Phase de portage inactif de l'Ag HBs

Au cours de cette phase, le système immunitaire contrôle l'infection, de façon spontanée ou sous l'effet conjoint d'un traitement antiviral. La réplication au sein des hépatocytes est donc minime (charge virale inférieure à 2000 UI/ml). Les antigènes viraux sont également très faiblement exprimés, réduisant ainsi la lyse des cellules infectées par les lymphocytes cytotoxiques. Le taux sérique des ALAT se normalise (Nebbia *et al*. 2012 ; Fattovich *et al.*, 2008).

La PBH montre pas ou peu d'inflammation, mais une fibrose cicatricielle peut être observée (Fattovich *et al.*, 2008). Cette phase fait suite à la séroconversion dans le système HBe (Nebbia *et al.*, 2012 ; Fattovich *et al.*, 2008).

Malgré l'absence de réplication virale mesurée, l'ADNccc persiste dans les cellules infectées et peut être source d'une réactivation virale à la faveur d'une immunosuppression (Nebbia *et al.*, 2012 ; Fattovich *et al.*, 2008).

A l'issue de cette phase, la disparition ou clairance de l'Ag HBs sérique peut survenir, accompagnée ou non de l'apparition des Ac anti-HBs. La clairance de l'Ag HBs et l'apparition des Ac anti-HBs neutralisants signent la résolution de l'infection. Cette clairance spontanée est observée chez les adultes dans 5 à 10 % des cas (de 0,5 % à 1,7 % / an) (Fattovich *et al.*, 2008 ; Gish *et al.*, 2010). Dans les cas d'infection périnatale les clairances spontanées sont rares (0,6 % / an) et dans les infections survenant dans la petite enfance les taux sont de l'ordre de 1 % /an (Fattovich *et al.*, 2008).

Plusieurs facteurs ont été associés à la clairance spontanée de l'Ag HBs parmi lesquels : un âge avancé au diagnostic, une rémission soutenue (taux d'ALAT normal et charge virale inférieure à 2000 UI/ml) au cours du suivi ou encore une amélioration de l'histologie hépatique malgré la persistance de l'ADNccc intrahépatique (Fattovich *et al.*, 2008 ; Chan *et*

al., 2011 ; Matsumoto *et al*., 2012). En revanche le sexe et le génotype viral ne semblent pas être des facteurs influençant la clairance spontanée de l'Ag HBs (Matsumoto *et al*., 2012). Il peut persister des traces d'ADN viral dans le sérum, détectées par des techniques de biologie moléculaire « ultrasensibles » (Fattovich *et al*., 2008).

✓ Remarque :

Plusieurs études longitudinales ont montré que les taux d'Ag HBs chez les patients porteurs d'une hépatite B chronique active étaient supérieurs à ceux mesurés chez les porteurs inactifs (Chan *et al*., 2011).

❖ Les réactivations virales

Une réactivation virale à partir de copies d'ADNccc persistant dans les noyaux des hépatocytes est toujours possible dans un contexte d'immunosuppression constitutionnelle ou acquise (chimiothérapies, greffes …) (Fattovitch *et al*., 2008). Elle peut se produire chez des sujets porteurs chroniques en phase de rémission (Ag HBs positifs, Ac anti HBe positifs, ADN viral faible ou indétectable) et correspond à la disparition des Ac anti HBe et à la réapparition de l'Ag HBe et de l'ADN VHB dans le sérum. Elles peuvent aussi avoir lieu chez des sujets présentant un profil sérologique d'hépatite B ancienne résolue (Ag HBs négatif, Ac anti HBc positifs, Ac anti HBs positifs). Dans ce cas, l'Ag HBe et l'ADN viral seront à nouveau détectés dans le sérum.

Ces réactivations peuvent être dues au virus sauvage avec retour à l'état Ag HBe positif (1 à 4 % des cas) et surtout à des variants n'exprimant pas l'Ag HBe (mutants précore) (Nebbia *et al*., 2012).

3.3.3. Les complications de l'infection chronique

Les complications de l'infection chronique du VHB sont liées à la progression de l'atteinte hépatique (nécrose, fibrose et inflammation) vers la cirrhose puis vers le carcinome hépatocellulaire (CHC). Le risque global de développer une cirrhose au cours d'une hépatite chronique a été évalué entre 15 et 40 %. Les complications de la cirrhose sont l'hypertension portale, l'insuffisance hépatocellulaire et le CHC. Chez les patients présentant une cirrhose, le risque d'évolution vers le CHC a été évalué entre 2 et 5 % par an (Nebbia *et al*., 2012 ; Fattovich *et al*., 2008). Les facteurs de mauvais pronostic identifiés sont des facteurs viraux (le génotype viral, la présence de mutant préC, la présence de co-infections VIH, VHC,

VHD), des facteurs liés à l'hôte (un âge avancé au diagnostic, le sexe masculin, une atteinte hépatique sévère) ou comportementaux (alcoolisme, tabagisme) (Fattovich *et al.*, 2008 ; Macmahon *et al*., 2001 ; Bréchot *et al*., 2010).

Le CHC constitue le cinquième cancer le plus fréquent au monde et la troisième cause de mort par cancer derrière les cancers du poumon et de l'estomac, notamment à cause de sa forte résistance aux traitements. Il provoque environ 1 million de décès chaque année à travers le monde (Pol, 2006). Le VHB est considéré comme la cause majeure de ce cancer (75 % des cas).

L'incidence de la cirrhose et celle du CHC (15 à 50 % pour le CHC), cumulées sur 5 ans, varient selon le statut clinique du patient (présence de l'Ag HBs, de l'Ag HBe, présence de certaines mutations (2.3.1. les mutants préC/C) et charge virale supérieure à 20 000 UI/ml) et la zone géographique concernée. En Europe et en Asie du Sud-Est, l'incidence de la cirrhose est supérieure chez les patients montrant un Ag HBe négatif par rapport aux patients avec Ag HBe positif 2 à 5 % /an). L'incidence du CHC est plus élevée an Asie du Sud-Est par rapport aux pays occidentaux (Nebbia *et al*., 2012 ; Fattovich *et al*., 2008 ; Dény et Zoulim, 2010).

L'induction du CHC est probablement un processus multifactoriel impliquant des mécanismes cellulaires (une régénération cellulaire massive suite à la lyse des hépatocytes) et des facteurs viraux, liés à l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire en particulier. Des séquences virales défectives et réarrangées peuvent s'intégrer au hasard dans le génome cellulaire. Selon le site d'intégration, le processus de cancérisation pourrait être provoqué par l'activation d'oncogènes cellulaires, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, des aberrations chromosomiques ou encore la production de protéines cellulaires altérées. Quasiment tous les cas de CHC associés au virus présentent une insertion de l'ADN viral dans un chromosome cellulaire (Bréchot *et al.*, 2010) (figure 17).

✓ Remarque :

Du fait du chevauchement des cadres de lecture, des mutations survenant sous pression thérapeutique par analogues nucléos(t)idiques, dans le gène codant la polymérase peuvent induire la synthèse de protéine S tronquée (apparition d'un codon stop). Par exemple, la mutation rtA181T correspond à la mutation sW172*. La protéine S tronquée aurait un pouvoir oncogénique (Warner et Locarnini, 2008).

❖ Le rôle de la protéine HBx

Dans la plupart des génomes viraux intégrés, le gène de la protéine X est conservé et transcrit. La protéine X, petite protéine de 154 aa, a été décrite comme un activateur transcriptionnel. Sa localisation subcellulaire est variable et elle peut se trouver soit majoritairement au niveau du cytoplasme, soit au niveau du noyau où elle exerce des fonctions différentes. Dans le cytoplasme, elle permettrait la régulation d'un grand nombre de gènes en activant des facteurs de transcription. Tandis que dans le noyau, elle pourrait interférer directement avec certains facteurs de transcription ou jouer un rôle de facteur de transcription (Bréchot *et al.*, 2010). De plus, la protéine X perturberait les mécanismes de réparation de l'ADN, augmentant ainsi le risque d'apparition de mutations impliquées dans la carcinogenèse. Par ailleurs, elle affecte l'expression d'un grand nombre de gènes cellulaires impliqués dans des mécanismes tels que la prolifération cellulaire et l'apoptose (Bréchot *et al.*, 2010).

❖ Le rôle des protéines « PréS2 activatrices »

Dans la plupart des génomes viraux intégrés, le cadre de lecture des protéines PréS2 activatrices est conservé et transcrit. Elles sont codées par des gènes des protéines d'enveloppe tronqués en 3'et correspondent à la protéine de surface M délétée d'une partie C-terminale de plus ou moins grande taille. Elles peuvent présenter deux topologies différentes : insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) ou cytoplasmiques. A ce jour, aucune différence de fonction entre les formes membranaires et cytoplasmiques n'a été mise en évidence. Elles sont capables d'interagir avec la protéine kinase C, phosphorylant le domaine PréS2 et d'activer des voies de transduction impliquant des kinases participant au contrôle de la prolifération cellulaire. Elles ont un rôle direct dans la carcinogenèse via l'activation de voies de transductions impliquées dans la prolifération des hépatocytes (Bréchot *et al*., 2010).

❖ Le rôle de la réponse immunitaire

Le système immunitaire jouerait également un rôle majeur dans le développement des CHC associés au VHB. En effet, l'inflammation chronique du tissu hépatique provoquée par le système immunitaire augmenterait le risque de cancer en induisant une forte mortalité cellulaire et donc une forte prolifération des hépatocytes (Bréchot *et al*., 2010).

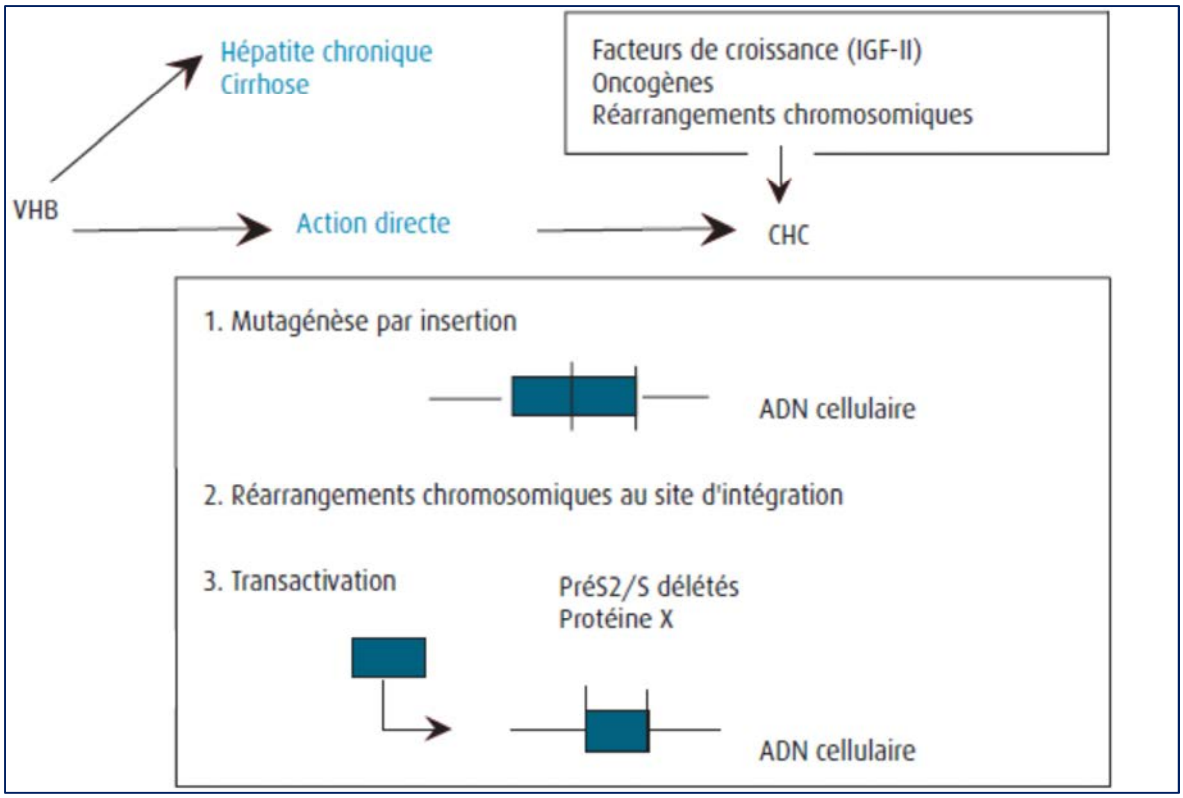


Figure 17 : Mécanismes impliqués dans l'hépatocarcinogénèse virale B (Pol, 2006).

3.4. Physiopathologie et réponse immunitaire

Le VHB n'est pas directement cytopathique pour les hépatocytes infectés et les lésions hépatiques observées sont dues à la réaction du système immunitaire de l'hôte vis-à-vis des hépatocytes infectés exprimant les antigènes viraux. La gravité des lésions dépend donc de l'intensité de la réponse immunitaire, notamment adaptative (Chisari *et al*., 2010 ; Guidotti *et al*., 2006).

3.4.1. La réponse immune innée

La production d'interféron (IFN) de type I et III constitue généralement la première ligne de défense cellulaire face à une infection virale. Au cours des premières phases de l'infection, le virus ne semble pas induire de réponse immunitaire innée. Cette « invisibilité » du virus à la réponse innée se traduit par une absence de production d'IFN α/β (IFN de type I) et donc l'absence de transcription intrahépatique des gènes inductibles par l'interféron (ISG). Les mécanismes antiviraux intracellulaires ne se mettent pas en place permettant la propagation du virus dans le foie. Ceci s'explique par la stratégie de réplication du virus faisant intervenir :

- la séquestration du génome réplicatif dans la capside virale dans le cytoplasme (cela empêche la détection des acides nucléiques viraux connus pour être généralement de forts inducteurs de la voie IFN)
- une étape transcriptionnelle dans le noyau,
- la production d'ARNm viraux gappés et polyadénylés ressemblant à la structure de transcrits cellulaires normaux (Chisari *et al.*, 2010 ; Guidotti *et al.*, 2006 ; Bertoletti et Ferrari, 2012).

Cependant, d'autres données expérimentales suggèrent que la réplication du VHB pourrait être contrôlée par une production endogène d'IFNα/β *in vivo*. En effet, en l'absence de toute stimulation, la réplication du VHB était environ trois fois supérieure dans des souris transgéniques VHB déficientes pour le récepteur aux IFN de type I, pour la Protein Kinase RNA-activated (PKR) ou pour l'interferon regulatory factor 1 (IRF1) par rapport à des souris contrôles. PKR et IRF1 sont des protéines antivirales dont la synthèse est induite par l'IFN (Bertoletti et Ferrari, 2012).

De plus, des données *in vitro* montrent que la transfection d'un plasmide contenant le génome du VHB dans des cellules HepG2 augmente l'activation de Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) (Bertoletti et Ferrari, 2012). Certains auteurs suggèrent que le VHB, plutôt que d'échapper à l'immunité innée, inhiberait celle-ci grâce à l'action de différentes protéines virales comme la polymérase ou la protéine X. Elles agiraient en empêchant l'induction d'IFN de type I et/ou en bloquant l'action antivirale de l'IFN sécrété par les cellules environnantes du parenchyme hépatique (Bertoletti et Ferrari, 2012).

3.4.2. La réponse immune adaptative

Les données acquises avec divers modèles d'étude du VHB suggèrent que la clairance virale résulte de l'action coordonnée de plusieurs composantes de la réponse immune adaptative ou spécifique :

- la lyse des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques (LT-$CD8^+$) dirigés contre les antigènes du virus et le renouvellement cellulaire,
- l'action antivirale des cytokines telles que l'IFN-γ, le Tumoror Necrosis Factor α (TNF-α) ou l'interleukine 12 (IL12)
- la neutralisation des virions circulant par les anticorps anti-VHB

❖ La réponse cellulaire

Lors d'une infection aiguë, les antigènes viraux sont la cible des réponses de type T helper (CD4+) et T-cytotoxiques (CD8+).

La réponse cellulaire T $CD4^+$ est régulée par la taille de l'inoculum viral. Elle est généralement intense, multi-spécifique (un pic est observé associé souvent à la clairance de l'Ag HBs sérique) et surtout précoce lors d'une hépatite aigue résolutive. Au contraire, elle semble relativement faible chez les patients porteurs d'une infection chronique. Elle joue un rôle important dans la clairance virale en induisant la réponse T $CD8^+$ et la réponse humorale B. Les lymphocytes T $CD4^+$ dirigés spécifiquement contre l'Ag HBc secrètent des cytokines de type TH1 : IFN-γ, TNF-α, IL12 qui inhibent directement ou non la réplication du VHB et participent à l'élimination du virus de façon non cytolytique. Ils induisent la prolifération des LT $CD8^+$ qui reconnaissent spécifiquement les déterminants antigéniques préS2 et HBc couplés au CMHI (réponse Th1). Dans le cas d'une infection résolutive, la réponse T $CD8^+$ sera intense et polyclonale, entrainant des phénomènes d'apoptose et la synthèse d'IFN γ.

La réponse T $CD4^+$ est aussi responsable de l'induction et du maintien de la réponse B spécifique avec production des Acs neutralisants contre les protéines de l'enveloppe virale.

Les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques ont un rôle central la clairance virale en détruisant les hépatocytes infectés. Ils sont donc responsables des lésions hépatiques. La lyse cellulaire directe n'est pas suffisante pour expliquer la clairance et les LT $CD8^+$ sont aussi à l'origine de mécanismes non cytopathiques comme la sécrétion d'IFN γ ou de TNF α capables d'inhiber la réplication virale et l'expression des gènes viraux (figure 18).

Chez les patients présentant une hépatite aiguë résolutive, la réponse cellulaire T $CD8^+$ est intense et polyclonale, tandis que chez les patients porteurs chroniques, elle semble faible et plus étroite. Par ailleurs, il semblerait que la fonctionnalité des cellules T $CD8^+$ spécifiques soit plus importante que le nombre de cellules T mobilisées pour contrôler la réplication virale (Chisari *et al.*, 2010 ; Guidotti *et al.*, 2006 ; Bertoletti et Ferrari, 2012).

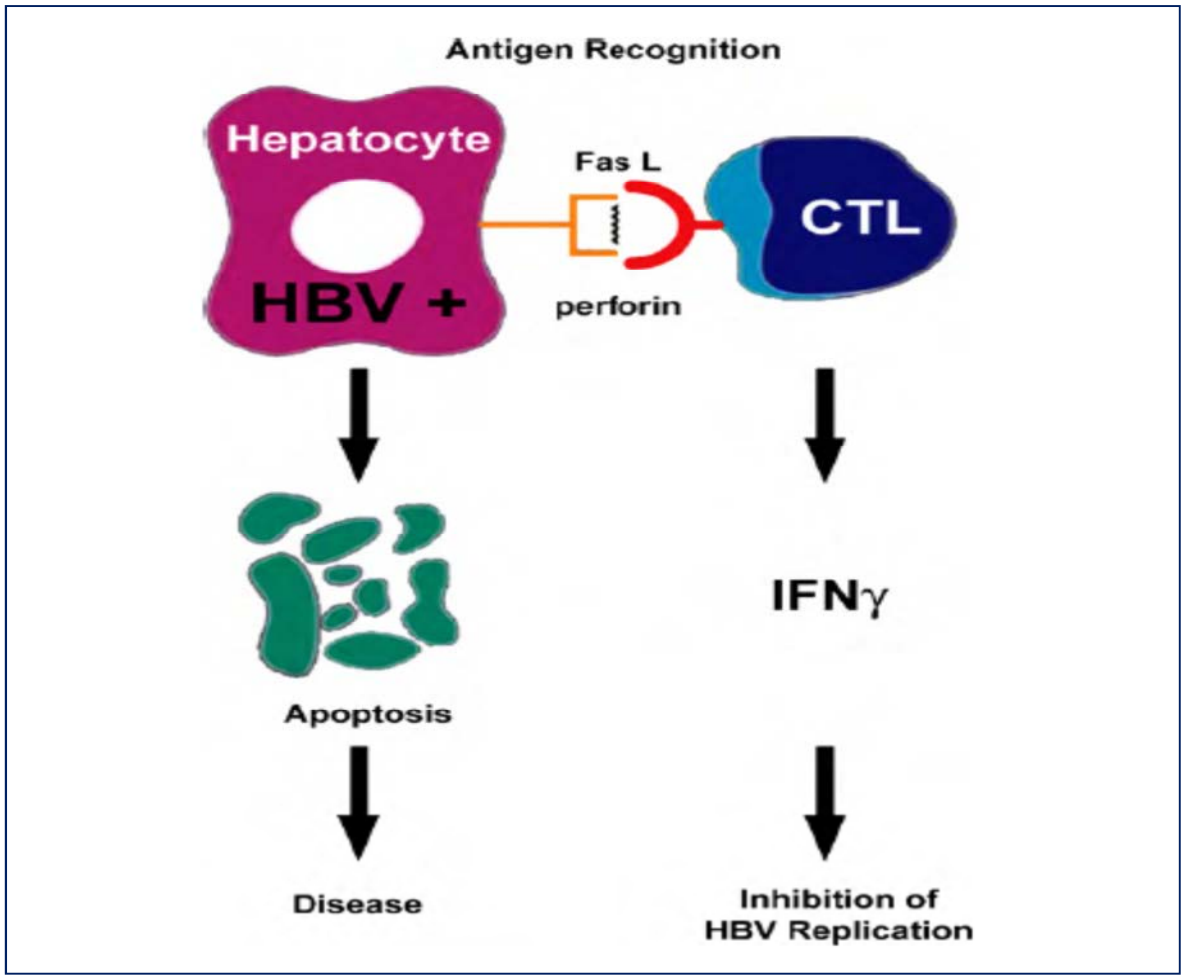


Figure 18 : Mécanismes non cytopathiques des LT $CD8^+$ participant à la clairance virale (Chisari *et al*., 2010).

- La réponse humorale

La production d'anticorps dirigés contre des épitopes du VHB varie au cours de l'histoire naturelle de l'infection, mais seuls les Acs dirigés contre les protéines d'enveloppe du virus sont neutralisants.

Ils jouent un rôle crucial dans l'élimination virale et la prévention de l'infection, en bloquant l'attachement et la fixation du virus à la surface des hépatocytes. Ils sont détectés dans le sérum des patients ayant résolu l'infection et sont au contraire indétectables chez les porteurs chroniques du virus (Chisari *et al.*, 2010 ; Guidotti *et al.*, 2006 ; Bertoletti et Ferrari, 2012).

Cependant l'apparition des Acs neutralisants survient relativement tard après l'infection et semble peu contribuer à la phase précoce de la clairance virale au cours de l'infection aiguë résolutive (Chisari *et al.*, 2010 ; Guidotti *et al.*, 2006 ; Bertoletti et Ferrari, 2012).

Les anticorps anti-HBc totaux présents dans le sérum de tous les patients ayant été exposés au VHB, ne semblent pas jouer un rôle clef dans la clairance virale. Ils sont détectables à tous les stades de la maladie. L'apparition d'anticorps anti-HBe témoigne en général de l'arrêt de la réplication du VHB, à l'exception des mutants précore (Chisari *et al.*, 2010 ; Guidotti *et al.*, 2006 ; Bertoletti et Ferrari, 2012).

3.5. Prise en charge et traitement de l'infection chronique

3.5.1. Les molécules antivirales

Deux catégories de traitement sont actuellement disponibles pour le traitement de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B. Ces classes thérapeutiques correspondent à deux stratégies différentes :

- la stimulation du système immunitaire pour accélérer l'élimination des cellules infectées
- l'inhibition de la réplication du VHB pour prévenir l'infection de cellules encore saines et aider le système immunitaire à combattre plus efficacement les cellules infectées (Brunetto *et al.*, 2008).

Actuellement, seules les monothérapies ont été bien évaluées et sont recommandées.

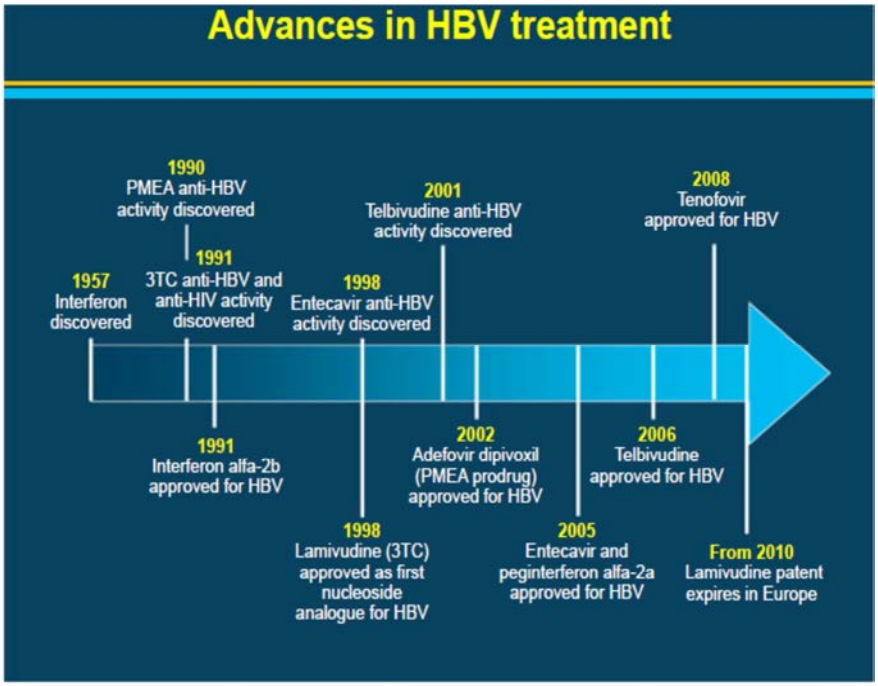


Figure 19 : Chronologie d'apparition des principales molécules utilisées dans le traitement de l'hépatite B chronique (Trepo, 2014).

❖ Les immunomodulateurs: IFN α (2a ou 2b) ou Peg IFN α-2a (Pegasys®)

L'IFN α fut le premier traitement autorisé pour le traitement de l'hépatite B chronique (Trepo, 2014). Les interférons sont des cytokines, exerçant des activités antivirale, antiprolifération et immunomodulatrice. Trois principales catégories d'IFN ont été identifiées (type I à III). Les interférons de type I comprennent entre autres les IFN α, IFN β, IFN ω, IFN ε/τ, IFN κ.

Les IFNα sont principalement d'origine leucocytaire (monocytes, macrophages et lymphocytes B). Ils sont produits en réponse à une infection virale, leur transcription est activée par l'ARN bicaténaire produit au cours d'un cycle de multiplication viral.

Chez l'homme, il existe plusieurs sous-espèces d'IFNα et seules les sous-espèces α-2a et α-2b sont utilisées en thérapeutique et produits par génie génétique : Interféron α-2a (Roferon A®), interféron α-2b (Intron A®) et PEG Interféron α-2a (Pegasys®). Dans cette dernière spécialité, l'interféron est couplé au polyéthylène glycol (PEG) pour obtenir une meilleure biodisponibilité avec des concentrations plasmatiques stables et prolongées. Cela permet notamment une injection par semaine au lieu de trois.

Les IFN de type I se fixent à des récepteurs hétérodimériques présents à la surface cellulaire et exprimés de façon ubiquitaire (Grimm *et al.*, 2011). Le mécanisme d'action de l'IFN α est donc complexe et celui-ci possède des propriétés antivirales, antiprolifératives et immunomodulatrices (Grimm *et al.*, 2011). Il active une cascade de réactions, l'activation de nombreux gènes (ISG) et la production de différentes molécules antivirales (OAS, PKR, Mx, ADAR-1). Ces protéines antivirales (PAV) ciblent les ARNm et vont respectivement les hydrolyser, bloquer la traduction, bloquer la transcription ou les modifier.

S'il exerce un effet direct sur la cellule hôte par l'induction des ISGs, produisant un état antiviral dans les cellules, il augmente également les défenses immunitaires de l'hôte, innées et adaptatives, via les processus suivants :

- la modulation fonctionnelle des cellules Natural Killer (NK)
- l'induction de molécules co-stimulantes des cellules dendritiques (DC)
- l'induction de la réponse T $CD4^+$ et l'augmentation de la production de cytokines Th1
- l'augmentation de l'expression des molécules de CMHI et la présentation des antigènes viraux aux lymphocytes T cytotoxiques (Grimm *et al.*, 2011).

❖ Les analogues nucléos(t)idiques (NUCs) :

Entre 1998 et 2008, cinq molécules ayant une action antivirale directe dirigée contre la réplication du VHB ont fait leur apparition :

- les analogues nucléosidiques : lamivudine (Zeffix®), entécavir (Baraclude®), telbivudine (Sebivo®)
- les analogues nucléotidiques : adéfovir dipivoxil (Hepsera®) et ténofovir (Viread®)

En fonction de leur structure chimique, ces molécules peuvent être classées en trois groupes :

- les nucléosides phosphonates, comprenant l'adefovir dipivoxil (ADV: alkyl phosphonate) et le ténofovir disoproxil fumarate (TDF: alkyl phosphonate très proche de l'ADV) qui sont des analogues de l'adénosine
- les Pyrimidine L-nucleosides, comprenant la lamivudine (LMV) qui est un analogue de la cytidine et la telbivudine (LdT) qui est un analogue de la thymidine
- un D-cyclopentane, l'entécavir (ETV) qui est un analogue de la guanosine (Grimm *et al.*, 2011 ; Delaney, 2013).

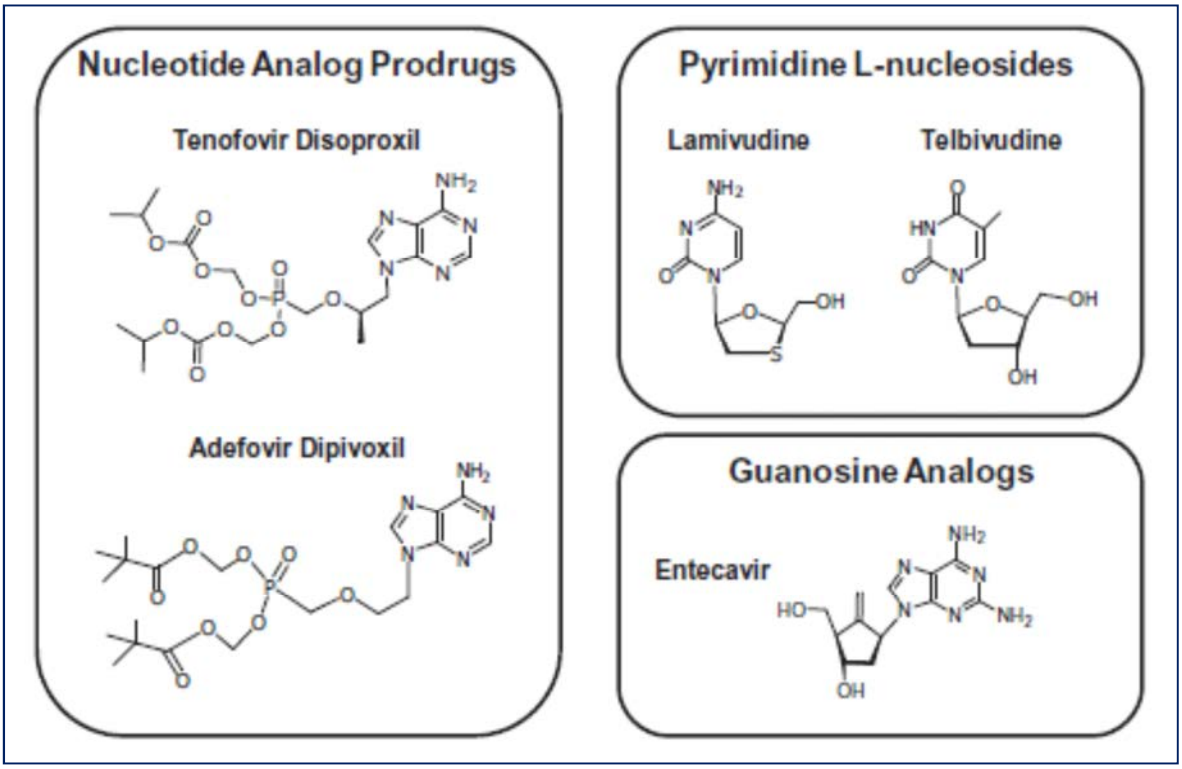


Figure 20 : Structure chimique des analogues nucléos(t)idiques (Delaney, 2013).

Ces molécules agissent en inhibant la réplication virale en s'incorporant à la place des nucléosides naturels, ce qui a pour effet de bloquer l'élongation du brin en cours de synthèse. Si leur mécanisme d'action global est identique, le site d'action de chaque molécule diffère sensiblement (figure 21). Ce sont des prodrogues qui nécessitent une double ou triple phosphorylation par des kinases cellulaires pour être actifs (Grimm *et al.*, 2011).

Drug	Structure	Base priming	(−) Strand synthesis	(+) Strand synthesis
Lamivudine	Cytidine analogue		x	x
Adefovir	Adenosine analogue		x	x
Entecavir	Guanosine analogue	x	x	x
Telbivudine	Thymidine analogue			x
Tenofovir	Adenosine analogue		x	x

Figure 21 : Mécanismes d'action des analogues nucléos(t)idiques (Grimm *et al.*, 2011).

Les analogues nucléo(s)idiques agissent sur l'étape de transcription inverse et ont peu d'impact sur l'étape de transcription à partir de l'ADNccc (forme de persistance intrahépatique du virus) et sur la synthèse des protéines virales. La concentration sérique en antigènes HBs et HBe peut d'ailleurs être très forte même si la charge virale est indétectable. Le traitement est donc généralement long afin d'éviter un rebond viral en cas d'arrêt précoce. Les critères d'arrêt de ces traitements ne font d'ailleurs pas l'unanimité des experts.

- ❖ Avantages et inconvénients de ces deux classes thérapeutiques

Le traitement par IFN α présente un certain nombre d'avantages par rapport au traitement par NUCs :

- une durée de traitement définie
- l'obtention d'une réponse prolongée (3.5.3. Evaluation de la réponse thérapeutique) après l'arrêt du traitement
- l'absence de mutations de résistance
- des taux a priori plus élevés de séroconversion dans les systèmes HBe (à court terme) et HBs (à long terme) (Dény et Zoulim, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Marcelin *et al.*, 2008).

Les principaux inconvénients du traitement par IFN sont :

- un effet antiviral (baisse de la réplication virale documentée par une diminution de la charge virale VHB dans le sérum du patient) modéré
- la nécessité d'injection sous-cutanée
- des effets indésirables importants (symptômes grippaux, cytopénie, dépression, anxiété, irritabilité et anomalies auto-immunes) (Grimm *et al.*, 2011 ; Marcellin *et al.*, 2008).

Les NUCs présentent l'avantage d'être administrés par voie orale et sont bien tolérés. Ils ont également un effet antiviral important (supérieur pour l'ETV et le TDF par rapport aux autres molécules (Marcellin *et al*., 2008). Leur durée de traitement n'est malheureusement pas définie (risque de rebond virologique à l'arrêt de la molécule). Ils montrent également des taux plus faibles de séroconversion dans les systèmes HBe et HBs par rapport au traitement par IFNα. Enfin, ces molécules exerçant une activité antivirale directe présentent un risque d'apparition de mutations de résistance (Marcellin *et al.*, 2008).

❖ Les mutations de résistance décrites aux NUCs

Les durées généralement longues de traitement par analogues nucléos(t)idiques ainsi que leur utilisation en monothérapie favorisent l'émergence de mutants de résistance au sein des quasi-espèces du VHB. Le risque de survenue de mutations de résistance n'est pas équivalent pour tous les NUCs ; il est faible pour l'ETV et le TDF, modéré pour l'ADV et élevé pour la LMV et la LdT (figure 22). De plus, des résistances croisées ont été décrites (Dény et Zoulim, 2010 ; Locarnini et Yuen, 2010 ; Grimm *et al*., 2011).

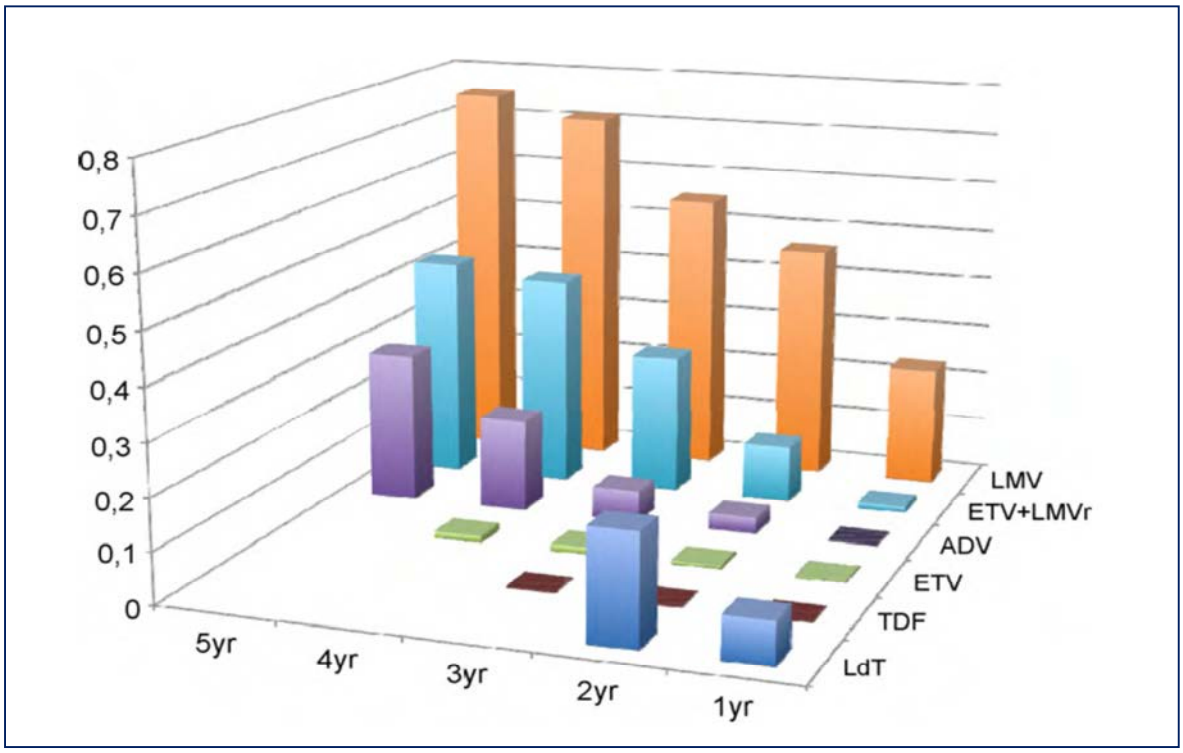


Figure 22 : Pourcentages d'isolats du VHB résistants après plusieurs années de traitement (Dény et Zoulim, 2010).

(Yr : year ; LMV : lamivudine, LMVr : LMV-resistant strain, ETV : entécavir, ADV : Adéfovir, TDF : Ténofovir, LdT : Telbivudine)

Les mutations de résistance sont surtout localisées dans le gène codant la transcriptase inverse. Du fait du chevauchement des ORFS P et préS/S, elles peuvent avoir un impact sur les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines d'enveloppe (Dény et Zoulim, 2010 ; Locarnini et Yuen, 2010).

Sous LMV, la prévalence de la résistance atteint 14 % après un an de traitement en monothérapie puis 80 % après 4 ans (Locarnini et Yuen, 2010). La substitution rtM204V/I est généralement retrouvée dans le motif YMDD du domaine C de la transcriptase inverse (figure 24). Elle entraine une diminution de l'efficacité thérapeutique de la molécule en raison de l'encombrement stérique du site catalytique de l'enzyme virale (Delaney, 2013 ; Locarnini et Yuen, 2010 ; Kay et Zoulim 2007). La substitution rtA181T/V peut également être retrouvée. Ces substitutions affectent l'activité enzymatique et les capacités de réplication du virus. Des mutations compensatoires ont été décrites comme pouvant rétablir un certain niveau de réplication (rtV173L et rtL180M) (Kay et Zoulim, 2007).

Au cours d'un traitement par ADV, l'apparition de mutation de résistance est moins rapide (environ 3 % des patients après 2 ans, 6 % après 3 ans et 30 % après 5 ans) (Locarnini et Yuen, 2010). Les positions des mutations sont les suivantes : rtN236T (domaine catalytique D de la polymérase) et rtA181V/T (domaine catalytique B de la polymérase) (figure 23).

Sous LdT, un taux de résistance élevé est retrouvé (29 % à 2 ans chez les patients avec Ag HBe positif et 11 % chez les patients avec Ag HBe négatif). Il existe une résistance croisée avec la LMV via la substitution rtM204I. D'autres substitutions comme rtL180M peuvent accompagner cette mutation signature dans 2 à 5 % des cas (Locarnini et Yuen, 2010).

L'ETV présente une barrière génétique élevée avec de rares cas de résistance ; moins de 1 % après 4 ans. Cependant, cette barrière est beaucoup plus basse chez des patients présentant déjà une résistance à la LMV (5,8 % après un an et 39 % après quatre ans) (Locarnini et Yuen, 2010 ; Kim *et al.*, 2013). Dans ce cas on observe l'apparition rapide de combinaisons de mutations rtI169T et rtM250V, ou rtT184G et rtS202I qui s'ajoutent à rtL180M et rtM204V (Kay et Zoulim, 2007 ; Delaney, 2013).

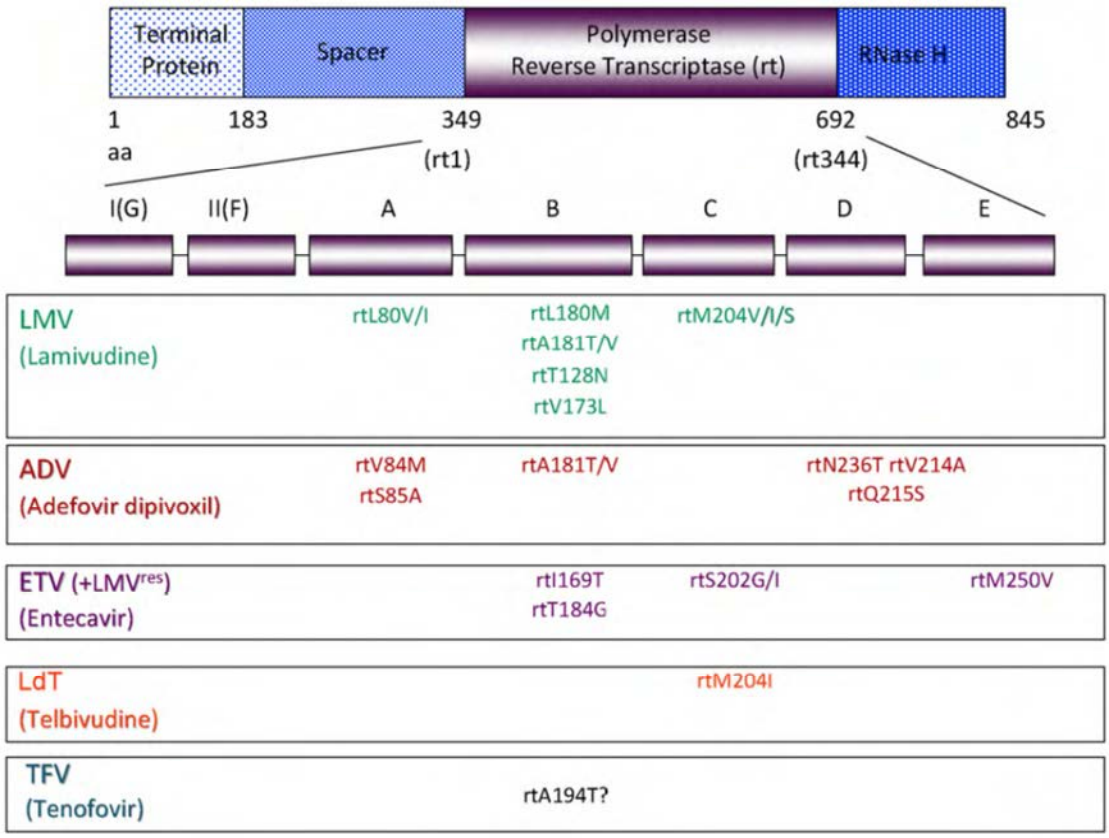


Figure 23 : Localisations des mutations de résistance du VHB aux NUCs (Dény et Zoulim, 2010).

3.5.2. But(s) et indications du traitement antiviral

L'objectif du traitement est l'amélioration de la qualité de vie et de la survie du patient en prévenant la progression de l'atteinte hépatique vers les stades les plus avancés de la maladie (cirrhose décompensée et CHC) conduisant généralement au décès du patient.

La réponse idéale à cet objectif correspond à l'élimination complète du virus, se traduisant par l'éradication de l'ADNccc.

Des études ont montré que le taux d'Ag HBs serait le reflet de la quantité d'ADNccc intrahépatique et donc de la quantité d'hépatocytes infectés. Chez les individus ayant obtenu une clairance de l'Ag HBs et une séroconversion dans le système HBs, l'infection est considérée comme résolue. Ceci fait de l'Ag HBs un bon outil de pronostic pour l'évolution clinique et l'efficacité thérapeutique (Martinot-Peignoux *et al.*, 2013 ; Moucari et Marcellin, 2011 ; Brunetto *et al.*, 2010).

Malheureusement, les molécules actuellement disponibles ne permettent pas d'obtenir l'élimination complète de l'ADNccc du noyau des hépatocytes infectés. De plus la clairance

de l'Ag HBs suivie de la séroconversion dans le système HBs est rarement obtenue (3.5.3 Evaluation de l'efficacité thérapeutique) (Grimm *et al.*, 2011).

Cependant, la résolution clinique de l'infection VHB ne requiert pas nécessairement l'éradication complète du virus du foie. Le contrôle de la réplication virale par le système immunitaire de l'hôte joue un rôle crucial. Par conséquent, une suppression soutenue de la réplication virale (contrôle virologique) améliore la clinique.

L'éradication de l'ADNccc étant un but très difficile à atteindre, l'objectif primaire du traitement devient l'obtention du contrôle virologique (Gish *et al.*, 2010). En pratique, il faut obtenir :

- une diminution de l'ADN du VHB en dessous de 3 log UI/ml
- une diminution des taux sériques des transaminases (ASAT, ALAT)
- et la stabilisation voire la régression des lésions histologiques.

Les **objectifs secondaires** sont l'obtention de l'apparition des anticorps anti-HBe (chez les patients Ag HBe positif) et la clairance de l'Ag HBs plus ou moins accompagnée de l'apparition des anticorps anti-HBs. La survenue de ces évènements beaucoup plus rares permettra d'envisager l'arrêt du traitement chez certains patients.

La réponse idéale est la clairance soutenue de l'Ag HBs après arrêt du traitement avec ou sans séroconversion anti-HBs associée à la rémission complète et soutenue des lésions histologiques du foie.

La réponse satisfaisante correspond à l'induction d'une réponse virologique (charge virale non détectable) et d'une réponse biochimique (ALAT normalisées) soutenues après arrêt du traitement, associées à une séroconversion anti-HBe chez les patients initialement Ag HBe positif.

La réponse minimale est la rémission virologique (charge virale indétectable) maintenue sous thérapie antivirale de longue durée chez les patients avec un Ag HBe négatif et chez les patients avec un Ag HBe positif qui ne réalisent pas la séroconversion.

Il existe deux stratégies thérapeutiques différentes :

- un traitement de durée limitée par Peg-IFN (48 semaines) qui peut permettre une réponse prolongée pour les patients ayant le plus de chances de faire une séroconversion anti-HBe et pour certains patients à Ag HBe négatif.
- un traitement au long cours par analogues NUCs, en privilégiant les molécules ayant la barrière génétique la plus élevée (ETV, TDF) (European Association for the Study of the Liver (EASL), 2012).

❖ Suivi de l'efficacité thérapeutique

Au cours du traitement, la charge virale VHB est contrôlée à 12 semaines et 24 semaines de traitement. Les taux d'Ag HBe, d'Ag HBs dont les décroissances sont prédictives de la séroconversion anti-HBe ainsi que, la perte de l'Ag HBs sont également mesurés. Pour les patients sous NUCs, après obtention de la viro-suppression, la charge virale et les marqueurs sérologiques précédemment cités sont contrôlés toutes les 24 semaines (Bhattacharya et Thio, 2010).

❖ Quels patients doivent être traités ?

La décision de traiter dépend de la probabilité d'obtenir une efficacité maximale avec un risque minimal d'émergence de résistance. L'efficacité thérapeutique diffère entre les groupes de patients. Généralement, les malades ayant une hépatite chronique active avec des transaminases élevées et une charge virale modérée répondent mieux au traitement et ont moins de risque de développer une résistance. L'EASL (European Association for the Study of the Liver) distingue trois groupes sérologiques de patients :

- les patients Ag HBe positif et Ag HBe négatif ayant obtenu une perte soutenue de l'Ag HBs avec ou sans séroconversion HBs (**réponse idéale**)
- les patients Ag HBe positif, ayant obtenu une séroconversion anti-HBe durable (**réponse satisfaisante**)
- les patients Ag HBe positif n'obtenant pas la séroconversion anti-HBe, mais présentant une charge virale maintenue indétectable (**réponse minimale**)

Le traitement est généralement indiqué chez :

- les patients en phase d'immunotolérance (Ag HBe positif, transaminases normales et stables, charge virale élevée) uniquement si évidence de maladie hépatique et éventuellement pour les patients âgés de plus de 30 ans avec antécédents familiaux de cirrhose ou de CHC.
- les patients porteurs d'une hépatite B chronique active Ag HBe positif ou Ag HBe négatif avec charge virale supérieure à 2000 UI/ml, des transaminases élevées et au moins un score de fibrose et/ou d'activité inflammatoire modérée à la PBH (≥ A2 et/ou ≥ F2 Metavir).
- les patients porteurs d'une hépatite B chronique active Ag HBe positif ou Ag HBe négatif avec des transaminases au moins deux fois supérieures à la normale et une charge virale supérieure à 20 000 UI/ml même sans biopsie hépatique.

- les patients avec une cirrhose compensée et une charge virale détectable quel que soit le niveau de transaminases.
- les patients avec une cirrhose décompensée et une charge virale détectable : traitement urgent par NUCs et transplantation hépatique dans certains cas

Les patients porteurs inactifs ayant une charge virale inférieure à 20 000 UI/ml ne requièrent pas de traitement mais doivent bénéficier d'une surveillance rapprochée au cours des trois premières années (transaminases, charge virale) de prise en charge.

3.5.3. Evaluation de la réponse thérapeutique

Des facteurs prédictifs de bonne réponse précédant l'initiation du traitement sont la charge virale (faible), le niveau de transaminases (élevé), le score d'activité à la biopsie hépatique (élevé) et le génotype pour le traitement par interféron. Ses facteurs de réponse aux thérapies antivirales actuelles sont utiles pour guider l'initiation d'un traitement et le choix de le maintenir ou non.

❖ Traitement par IFN-Peg :

Chez les patients porteurs chroniques Ag HBe+, une séroconversion HBe est obtenue chez un tiers des malades (Marcellin *et al.*, 2008 ; Brunetto *et al.*, 2009). Chez les porteurs chroniques, Ag HBe -, une réponse prolongée (transaminases normales et charge virale indétectable) est observée chez 25 à 30 % des malades. Enfin la clairance de l'Ag HBs est obtenue chez 40 % des malades en virosuppression après 3 ans de traitement (Sonneveld *et al.*, 2012 ; Marcellin *et al.*, 2008). Le taux de clairance de l'Ag HBs est supérieur à celui des clairances spontanées (0,5 à 1,7 % par an) (Gish *et al.*, 2010).

Les facteurs prédictifs de l'efficacité thérapeutique sont : des taux sériques pré-thérapeutiques de transaminases trois fois supérieurs à la normale et une charge virale inférieure à 7 log, un score Métavir supérieur à A2. Dans ces conditions, la probabilité de réponse prolongée est supérieure à 50 % (Marcellin *et al*., 2008 ; Dény et Zoulim, 2010).

De meilleurs taux de réponse sont observés pour les génotypes A et B par rapport aux génotype C et D (Brunetto *et al*., 2009 ; Dény et Zoulim, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011).

Si la charge virale est inférieure à 20 000 UI/ml à la semaine 12 de traitement, les patients Ag HBe positif présentent 50 % de chance de séroconversion HBe et les patients Ag HBe négatif présentent 50 % de chance d'obtenir une réponse prolongée (Dény et Zoulim, 2010). La

réponse à l'IFN peut être appréciée après 24 semaines de traitement et un échec de l'IFN ne diminue pas les chances de réponse aux NUCs (Marcellin *et al.*, 2008).

- Traitement par analogues nucléos(t)idiques :

Les analogues nucléos(t)idiques semblent avoir peu d'influence sur le taux de clairance de l'Ag HBs. Cependant tant que le traitement est maintenu, la suppression de la réplication virale par les NUCs entraine une diminution significative des taux sériques d'Ag HBs, de l'ADNccc intrahépatique et de l'ADN intracellulaire total (Gish *et al.*, 2010). Ainsi des durées prolongées de traitement par les NUCs les plus efficaces (ETV et TDF) vont permettre une suppression efficace de la réplication virale et une augmentation du taux de clairance de l'Ag HBs (Gish *et al.*, 2010 ; Gordon *et al.*, 2013).

La lamivudine (Zeffix®), présente une puissante activité antivirale (charge virale indétectable en 1 à 3 mois), mais une séroconversion HBe à 12 mois de traitement chez les patients Ag HBe positif n'est observée que dans 20 % des cas, nécessitant la poursuite du traitement (Marcellin *et al.*, 2008). Le taux de clairance de l'Ag HBs est de 2 % à un an de traitement. Il est de 11,7 % après 5 ans de traitement chez des patients porteurs chroniques Ag HBe négatif (Fasano *et al.*, 2012). Malheureusement la longue durée du traitement (plusieurs mois) favorise l'émergence de mutations de résistance.

L'adéfovir-dipivoxil (Hepsera®) présente un meilleur profil de résistance que la lamivudine. Mais son activité antivirale n'est pas optimale. La clairance de l'Ag HBs n'est observée que dans 2 % des cas après 5 ans (Gish *et al.*, 2010).

Le ténofovir et l'entécavir sont les « nouveaux » NUCs. Leur efficacité antivirale est supérieure aux NUCs dits de première génération. Ils présentent les taux de réponse virologique les plus élevés chez les patients Ag HBe positif ou négatif (charge virale VHB indétectable après un an de traitement chez 70 % des patients Ag HBe positif et 90 % des patients Ag HBe négatif) (Marcellin *et al.*, 2008 ; Gish *et al.*, 2010).

Les patients sous ETV et TDF montrent une amélioration virologique, histologique et biochimique, très supérieure à celle des patients sous LMV, chez des patients porteurs chroniques naïfs de traitement par NUCs (Zoutendijk *et al.*, 2012 ; Marcellin *et al.*, 2013).

Chez les patients sous ETV la clairance de l'Ag HBs est obtenue après 120 semaines dans 5 % des cas et dans 6 % des cas pour les patients sous TDF après 96 semaines (Gish *et al.*, 2010 ; Heathcote *et al.*, 2011 ; Marcellin(b) *et al.*, 2008). Les facteurs prédictifs de l'efficacité thérapeutique semblent être pour l'ETV : les patients caucasiens, le génotype A ou D.

❖ Conclusion

L'IFN pégylé permet d'obtenir le taux de clairance de l'Ag HBs à un an le plus élevé. Le taux de clairance de l'Ag HBs augmente après l'arrêt du traitement chez les patients ayant une réponse virologique soutenue mais aussi au cours du temps chez les patients traités par analogues de manière continue.

Les patients Ag HBe négatif ont des taux de clairance de l'Ag HBs inférieurs à ceux des patients Ag HBe positif**.** Il est très rare d'observer cette clairance au cours des 4-5 premières années chez les patients Ag HBe négatif traités par analogues (Hosaka *et al.*, 2013).

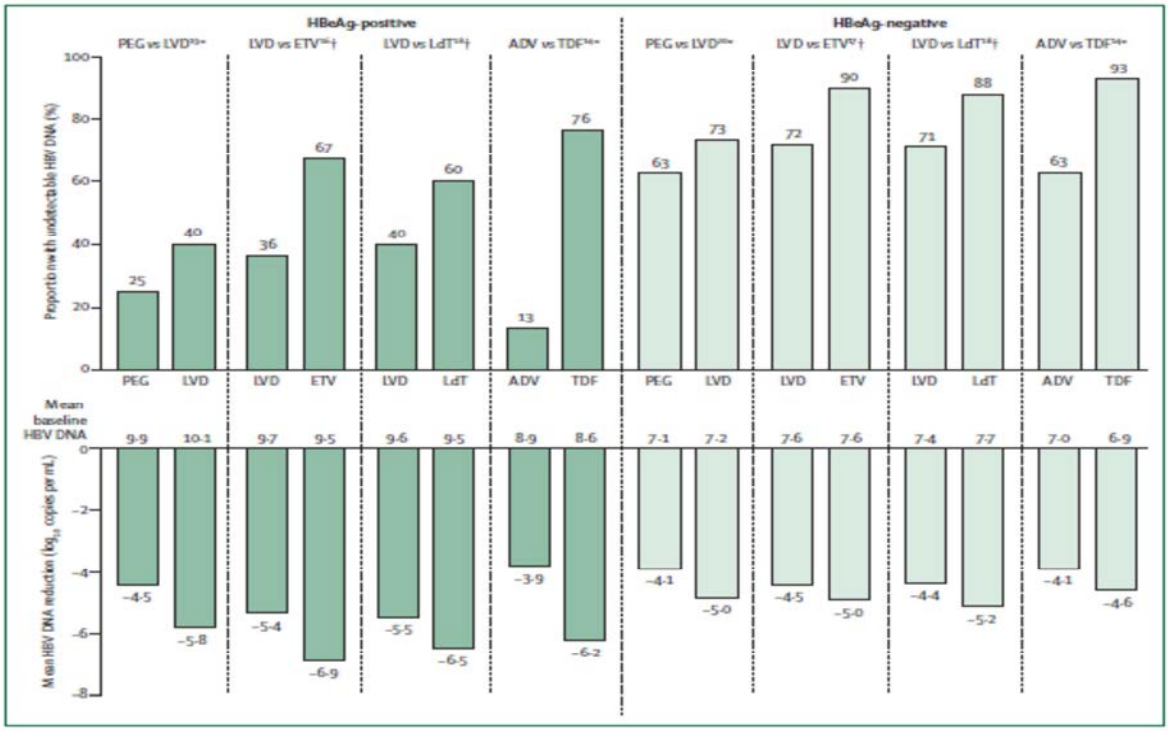


Figure 24 : Efficacité thérapeutique des molécules utilisées dans le traitement de l'hépatite B chronique (Gish *et al.*, 2012).

3.5.4. Les molécules en développement

❖ Les nouveaux analogues nucléos(t)idiques

Plusieurs NUCs sont à ce jour à différents stades de développement clinique (Grimm *et al.*, 2011). La clevudine (nucleoside pyrimidine) est un analogue nucléosidique de la thymidine. Cette molécule, approuvée dans certains pays d'Asie présente un effet antiviral prolongé à

l'arrêt du traitement. Les essais cliniques réalisés sur cette molécule ont été stoppés en 2009 (survenue de myopathies chez certains patients) (Grimm *et al.*, 2011).

D'autres molécules sont à l'étude, comme des prodrogues sélectivement métabolisées et activées dans le foie (LB 8038) ou encore un nucléoside phosphate pyrimidine acyclique (PMEO-DAPym), prototype d'une nouvelle classe de nucléosides phosphonates pyrimidine acyclique. Des tests *in vitro* ont montré que des souches multi-résistantes étaient sensibles à ce composant (Grimm *et al.*, 2011).

- Les traitements immunomodulateurs

L'IFN λ est un IFN de type III comprenant trois sous types λ1, λ2, λ3 (IL 29, IL 28A, IL 28). Ces cytokines ont été découvertes en 2003 par bio-informatique et présentent des ressemblances avec les IFNs de type I. Leur production est induite par les infections virales et elles-mêmes induisent l'expression d'ISGs par les mêmes voies de signalisation que les IFNs de type I. En revanche, elles se fixent sur un récepteur cellulaire différent (IL 28Rα/IL 10R2) de celui des IFN de type I, qui a une distribution variable selon les tissus humains (surtout présent au niveau des cellules épithéliales). L'IFN λ montre une activité antivirale, en inhibant la réplication virale, en culture cellulaire et sur modèle murin. Il interviendrait surtout dans l'immunité locale. Or, les hépatocytes humains expriment le récepteur IL 28Rα et sont sensibles à l'IFN λ (Grimm *et al.*, 2011 ; Urban *et al.*, 2014).

La thymosine α1 est une molécule immunomodulatrice, de 28 aa, qui accélère la maturation des thymocytes, stimule la différenciation et la conversion des lymphocytes en cellules T actives. Elle agirait sur l'infection VHB en restaurant la fonction des cellules T. Cette molécule est bien tolérée chez l'homme et est associée à un effet retard sur la réplication VHB (Grimm *et al*., 2011).

L'acide polyadénylic-polyuridylic stimule les réponses immunitaires humorales et cellulaires, en provoquant la libération d'IFN, d'IL-1, d'IL-2 et d'IL-6. Cette molécule est bien tolérée chez des patients porteurs chroniques et semble associée à une viro-suppression (Grimm *et al*., 2011).

- Les inhibiteurs d'entrée

Des essais ont été réalisés avec de la suramine, pour inhiber l'entrée virale VHB et VHD. Elle inhiberait la fixation aux protéoglycanes héparanes sulfates lors des premières étapes de l'entrée virale, *in vitro* (Urban *et al*., 2014).

Le Myrcludex B est un inhibiteur d'entrée dérivé des protéines de surface du VHB, découvert après l'utilisation *in vitro* de nombreux lipopeptides dérivés de préS1. Il correspond à la séquence peptidique 9-NPLGFFP-15 issue de préS1, obtenue après alignement de différents génotypes. Il bloque l'entrée virale *in vitro* et sur des modèles animaux (souris uPA/SCID, pour explication voire la partie 4. les modèles d'étude du VHB). De plus, il présentait une faible toxicité lors d'études pharmacocinétiques réalisées chez des chimpanzés et chez des volontaires sains, du fait de son hépatotropisme (Meier *et al*., 2013 ; Urban *et al*., 2014).

❖ Nouveaux axes de recherche

D'autres axes de recherche pour définir de nouvelles molécules antivirales ont été développés récemment parmi lesquels

- l'élimination et la prévention de la formation d'ADNccc (Grimm *et al.*, 2011),
- le développement d'inhibiteur de la polymérisation de la capside (activité antivirale *in vitro* et sur modèles animaux) (Urban *et al.*, 2014),
- le développement de siRNA (small interfeing RNA) ou iRNA (interference RNA) agissant sur des ARNs viraux qui sont testés sur des cultures cellulaires et des modèles animaux (Grimm *et al.*, 2011 ; Urban *et al*., 2014).
- la modulation de l'expression de l'APOBEC3 cytidine déaminase. Cette enzyme déamine les résidues déoxycytidine en déoxyuridine sur le brin court en cours de synthèse au cours de la rétro-transcription et diminue ainsi la réplication virale (Grimm *et al.*, 2011),
- des agonistes de Toll-Like Receptor notamment du TLR7 (GS-9620) (Urban *et al.*, 2014).

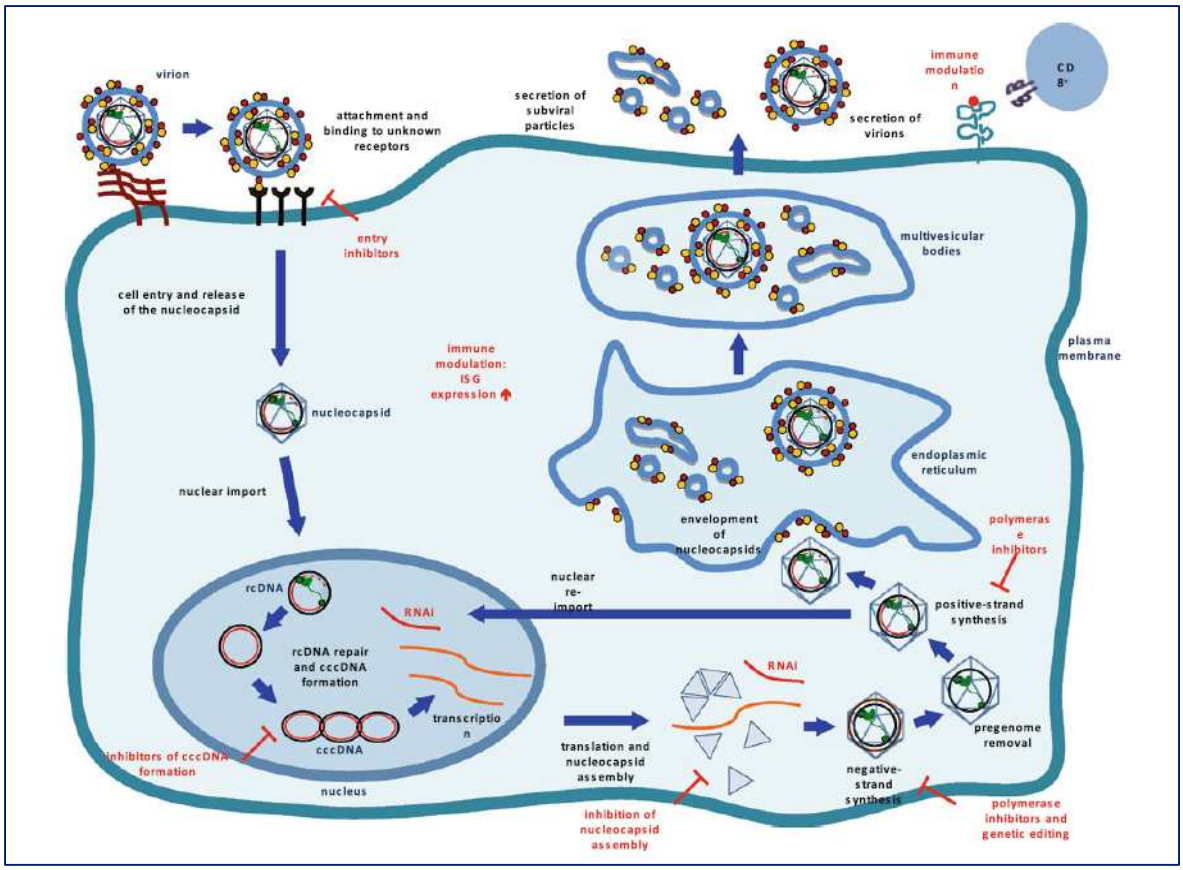


Figure 25 : Les agents thérapeutiques interférant avec le cycle viral (Grimm *et al*., 2011).

3.5.5. Prévention de l'infection par le VHB

Les premiers vaccins recombinants issus du génie génétique ont été mis au point à la fin des années 80. La vaccination constitue un moyen efficace de prévenir l'infection par le VHB et ses complications.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a lancé, en 1991, une campagne mondiale d'éradication de l'hépatite B (programme élargi de vaccination de 1991) (WHO, 1991; WHO, 1993). Depuis leur mise en place, les programmes de vaccination dans le monde n'ont pas été interrompus compte tenu de la remarquable efficacité du vaccin sur la prévalence de la maladie, notamment dans les régions de forte endémie. Ce programme, mis en place en France en 1994, a été suspendu en 1998 en raison de craintes, non confirmées, d'affections démyélinisantes centrales. Ce programme n'a pas repris aujourd'hui bien qu'aucune étude ne montre clairement l'association entre vaccination contre l'hépatite B et sclérose en plaque.

Les vaccins utilisés actuellement sont très immunogènes. Le titre minimal des anticorps considéré comme protecteur est fixé à 10 mUI/ml. Ce titre est généralement très largement obtenu chez plus de 95 % des sujets vaccinés (Locarnini et Yuen, 2010). Les facteurs de

moindre réponse à la vaccination sont l'âge (au-delà de 40 ans), le sexe (masculin), l'obésité, le tabagisme et certains groupes HLA (données INPES, 2012).

Les vaccins commercialisés actuellement contiennent des antigènes correspondant aux glycoprotéines d'enveloppe virales et surtout au déterminant « a » de l'Ag HBs (Locarnini et Yuen, 2010) :

- Genhevac B Pasteur® (suspension purifiée et inactivée de protéines S et M - épitopes des domaines S et préS),
- Engerix B® et HBVaxPro® : Ag HBs purifié (protéine S).

Aujourd'hui, la vaccination est obligatoire à la naissance chez le nouveau-né de mères porteuses chronique du virus afin de prévenir la transmission périnatale, ainsi que pour les professionnels de santé des établissements privés ou publics. Elle est recommandée en priorité chez les nourrissons ainsi que chez les personnes à risque (personnes en institutions, détenus, toxicomanes, voyageurs en zone de forte endémie, polytransfusés, greffés, dialysés, entourage d'un porteur chronique) (INPES, 2012).

L'immunisation passive par injection d'immunoglobulines spécifiques anti-HBs en association avec la vaccination est nécessaire suite à la contamination accidentelle d'un individu non immunisé et chez le nouveau-né dont la mère est porteuse du virus (INPES, 2012).

Le suivi au long cours de ces programmes de vaccination, notamment dans les pays de forte endémie comme la Chine, la Thaïlande et Taïwan, a montré leur efficacité mais a aussi permis de mettre en évidence un certain nombre d'échecs imputés à la sélection de mutants d'échappement à la vaccination. Ainsi, à Singapour, 16/41 (39 %) nouveaux nés ont été contaminés par le VHB malgré l'administration d'immunoglobulines et la réalisation de la sérovaccination. En Thaïlande, 22,4 % des enfants porteurs du virus et ayant été vaccinés sont porteurs de mutations de l'Ag HBs (Hudu *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'utilisation d'immunoglobulines à la naissance favoriserait la sélection de ces mutants (Locarnini et Yuen, 2010). Ces mutants ainsi que leur position au sein de l'Ag HBs ont été décrits dans la partie 2.3.4 les mutants de la protéine S.

4. Les modèles d'étude du VHB

Comme nous l'avons vu précédemment, bon nombre des connaissances sur la biologie du VHB, la physiopathologie de l'infection qu'il produit ont été acquises grâce à des modèles d'études animaux.

Plus récemment, le développement de modèles d'études *in vitro* a permis d'améliorer les thérapies anti-VHB avec la mise au point des analogues de nucleos(t)ides dans un premier temps, puis l'étude des mutations de résistance générées par ces traitements au long cours.

4.1. Etude du fitness viral *in vivo* : les modèles animaux

Comme nous l'avons vu précédemment, les *Hepadnaviridae* sont caractérisés par un tropisme hépatique et une grande spécificité d'hôte. Par conséquent, ceci restreint leur infection *in vivo* à leur hôte naturel ou à des espèces proches.

Les premières connaissances sur le VHB ont été obtenues en utilisant les modèles animaux de la marmotte ou du canard associés à leurs virus spécifiques : DHBV et WHV.

La plupart des découvertes sur le cycle viral, l'histoire naturelle de l'infection et notamment les phénomènes de la persistance et de la clairance virales ont été faites grâce à l'utilisation de modèles animaux supportant l'infection par le VHB : le chimpanzé, le gorille, le gibbon et le *Tupaïa belangeri*.

4.1.1. Les modèles animaux infectés par d'autres *Hepadnaviridae*

Certains orthohepadnavirus (WHV) et même certains avihepadnavirus (DHBV) partagent des propriétés structurales et fonctionnelles avec le VHB et ont l'avantage d'être facilement disponibles. Ces deux avantages en ont fait des modèles très utiles pour étudier le virus et les interactions virus/hôte, surtout en l'absence de modèles fonctionnels et de lignées cellulaires facilement infectables (Xiao *et al*., 2013).

- Le Duck Hepatitis B Virus (DHBV)

Il a été découvert en 1980 et a rapidement été utilisé pour étudier le cycle des *Hepadnaviridae* et notamment la transcription virale et la réplication virale (Glebe, 2007 ; Seeger et Mason, 2000 ; Glebe et Urban, 2007). Ce virus présente une organisation génomique et structurale similaire à celle du VHB. La réplication de son génome fait intervenir une étape intermédiaire de rétro-transcription. Il présente une étroite spécificité d'hôte et un hépatotropisme (Glebe, 2007).

Cependant, certaines différences sont à prendre en compte lorsque l'on compare le VHB et le DHBV. La transmission de l'infection est surtout verticale chez les canards (horizontale peu courante). Si l'infection conduit presque toujours à une hépatite chronique, il y a peu ou pas d'atteinte hépatique et pas de CHC. L'enveloppe du DHBV ne contient pas de protéine M (seulement S et L) et les protéines L et S du DHBV ne sont pas glycosylées. En revanche, la protéine L du DHBV est phosphorylée, ce qui n'est pas le cas chez le VHB (Glebe, 2007). La taille des particules infectieuses est identique à celles des SVPs (le ratio L/S étant identique dans les deux conformations) chez le DHBV (Glebe et Urban, 2007). Le processus d'entrée des deux virus semble différent ainsi que les récepteurs spécifiques impliqués (carboxypeptidase D pour le DHBV non confirmé pour le VHB) (Xiao *et al.*, 2013). Le DHBV possède seulement un ORF X like cryptique, apparemment sans rôle fonctionnel *in vivo*. Malgré ces limites le DHBV reste un modèle animal important pour la compréhension de la biologie des infections hepadnavirales, du fait de sa disponibilité (Glebe, 2007).

- Le Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)

L'infection par le DHBV ne permettant pas d'obtenir une forte pathogénèse induite par le système immunitaire, le WHV a donc été préférentiellement utilisé pour étudier l'histoire naturelle de l'infection (Seeger et Mason, 2000 ; Glebe, 2007 ; Urban *et al.*, 2014)

Les modes de transmission horizontale et verticale sont retrouvés dans les infections à WHV. La majorité des infections sont résolutives et seulement 5 % des infections progressent vers la chronicité. Par ailleurs, lors d'infections expérimentales réalisées sur des marmottes juste après la naissance, la proportion de passage à la chronicité mesurée atteignait 75 %, ce qui est très similaire au taux retrouvé chez l'homme lors des infections périnatales. L'infection chronique est associée à une réplication virale active de longue durée et à une progression de l'atteinte hépatique vers le CHC (Glebe, 2007).

Cependant, contrairement à l'infection chronique par le VHB, il n'y a pas de séroconversion dans le système HBe naturelle et pas de baisse de la réplication virale (Glebe, 2007).

Ce modèle a donc permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse induite par l'infection virale (aiguë et chronique). En effet, la forte réplication virale et le très fort taux d'Ag de surface et la présence continue d'Ag HBe chez les animaux infectés chroniques jouent un rôle majeur dans la progression vers le CHC (Glebe, 2007). Mais même après la résolution d'une infection aiguë chez l'animal, un fort risque de CHC demeure (supérieur à 20 %) (Glebe, 2007). De plus, des réactivations par le

WHV sont possibles, même après une résolution sérologique de longue date, en cas d'immunodépression provoquée par de la cyclosporine A chez l'animal (Glebe, 2007).
Ce modèle fut très utile pour étudier les mécanismes d'une possible persistance du VHB même après une résolution sérologique d'une hépatite aiguë. Il a également été utilisé pour les essais précliniques dans le développement d'agents antiviraux (Glebe, 2007).
Ces deux modèles animaux, DHBV et WHV, ont été utilisés dans le développement de nouveaux agents antiviraux (Seeger et Mason, 2000).

4.1.2. Modèles animaux infectés par le VHB

- Les grands primates

Les grands primates sont les animaux les plus proches de l'homme du point de vue phylogénétique. Ils sont par conséquent les modèles animaux les plus pertinents pour étudier la biologie du VHB (Glebe, 2007).
Des observations d'infections naturelles ou expérimentales de primates ont été réalisées durant les 30 dernières années et de nombreuses études datant de la fin des années 60 et du début des années 70 avaient pour but de rechercher des signes d'une infection par le VHB chez des primates de différentes espèces.
Dès le début des années 60, avant même l'identification du VHB par Blumberg, des infections de chimpanzés par un virus hépatique avaient été réalisées (Hillis, 1961). C'est le premier animal dont la sensibilité au VHB a été prouvée après injection de sera de patients contaminés par le VHB (Glebe, 2007). L'utilisation de ce modèle a permis l'étude du pouvoir infectieux de l'histoire naturelle du VHB, notamment les processus immuns impliqués dans la clairance virale (Murray *et al*., 2005 ; Urban *et al*., 2014). Il s'agit du seul modèle "immunocompétent" pour l'infection VHB ou la co-infection VHB et VHD (Urban *et al*., 2014). En effet, la réponse immunitaire chez cet animal est similaire à celle chez l'homme. Comme dans le contexte d'une infection chez l'homme à l'âge adulte, l'infection est généralement asymptomatique et aiguë et devient rarement chronique. Le chimpanzé a été utilisé lors de l'élaboration de vaccins et d'anticorps thérapeutiques ainsi que dans l'évaluation de leur efficacité et innocuité (Kamili *et al*. 2009 ; Durantel, 2010).
Cependant, l'infection chronique ne conduit pas au développement d'une maladie hépatique (cirrhose et CHC) chez l'animal. Par ailleurs, leur grande taille, le coût onéreux des élevages, leur accessibilité ainsi que les fortes contraintes éthiques restreignent considérablement l'utilisation de ce modèle, dont l'utilisation en France est interdite (Durantel, 2010 ; Urban *et al*., 2014).

Un certains nombres d'autres singes comme le gibbon, l'orang-outan, le singe laineux ou encore le babouin peuvent constituer des modèles d'études du VHB.

- Le *Tupaïa belangeri*

Beaucoup d'efforts ont été entrepris pour établir un petit modèle animal d'infection *in vivo* par le VHB, avant l'utilisation du *Tupaïa belangeri* (figure 26). Il s'agit de petits mammifères originaires d'Asie du Sud Est reliés phylogénétiquement aux primates (Glebe, 2007). Il est sensible à l'infection par le VHB et le VHD. Lors de tests d'inoculation de sérums humains porteurs du VHB, une infection VHB se développait chez les animaux, mise en évidence par la réplication virale et l'expression des gènes viraux (Glebe, 2007 ; Xie *et al.*, 2010).

Cependant chez le Tupaïa l'infection est uniquement transitoire, il n'y a pas de portage chronique du virus, sauf si les animaux sont exposés à de l'aflatoxine B1 ou si l'inoculation de l'animal est réalisée tôt après la naissance (Glebe, 2007 ; Urban *et al.*, 2014).

En général, l'infection est faiblement efficace, ce qui limite l'utilisation de ce modèle. Cependant, comme nous le verrons par la suite, les hépatocytes primaires de *Tupaïa belangeri* sont très utilisés (Glebe, 2007 ; Xie *et al.*, 2010).



Figure 26 : Photo de *Tupaïa belangeri*.

❖ Les souris humanisées

Contrairement aux modèles précédemment cités, la souris est un animal très utilisé dans les laboratoires. Il serait un modèle d'étude *in vivo* plus facile d'accès. Mais les souris ne sont pas sensibles à l'infection par le VHB. Cependant, la spécificité d'hôte et tissulaire des hepadnavirus dépend de l'étape d'entrée virale. Afin de contourner cette difficulté, trois modèles de souris chimères humanisées ont été développés, tous basés sur la transplantation de cellules permissives au VHB (hépatocytes primaires humains ou de *Tupaïa belangeri*) dans des souris hôtes.

Les plus anciennes, les souris trimera, correspondent à des souris normales (Balb/c) dont la moelle osseuse a été détruite par irradiation puis reconstituée à l'aide de cellules de moelle osseuse de souris Severe combined immunodeficiency ou SCID (ayant perdu la faculté de produire des cellules T, B et NK fonctionnelles). L'infection des hépatocytes primaires humains est réalisée ex-vivo avant leur transplantation. Ce système présente une efficacité d'environ 80 % mais la virémie est faible (10^5 copies d'ADN/ml de sérum) et ne dure que trois semaines environ (Xie *et al*., 2010).

Des transplantations d'hépatocytes avec un matrigel ont été mises au point sur des souris SCID pour réaliser des infections *in vivo* par inoculation des souris transplantées. Ceci a permis de d'obtenir des lignées de souris produisant du VHB pendant une longue période (environ cinq mois).

Les souris uPA (Rag2, SCID, Fah, ou IL2rγ) sont obtenues par le croisement de souris immunodéficientes et de souris exprimant l'urokinase Plasminogene Activator toxique pour le foie. Les cellules murines du foie exprimant le transgène uPa sont détruites et les hépatocytes hétérologues peuvent ainsi repeupler le foie. Ces hépatocytes primaires proviennent de foies humains ou de *Tupaïa belangeri* (Xie *et al*., 2010 ; Urban *et al*., 2014). L'expression des facteurs spécifiques du foie humain est conservée au cours du temps et l'élaboration de canalicules entre les hépatocytes humains et murins est possible. L'infection de ces souris par le VHB entraine l'apparition, avec une cinétique longue, d'une virémie élevée, d'Ag HBe et d'Ag HBs sériques avec des titres comparables à ceux de patients infectés et ceci durant plusieurs mois (Xie *et al*., 2010 ; Taylor, 2013 ; Urban *et al*., 2014). Ce modèle de souris chimères est le plus utilisé, il permet d'étudier les variants du VHB, l'efficacité d'antiviraux (notamment des inhibiteurs d'entrée comme le Myrcludex) mais surtout la propagation de l'infection (Urban *et al*., 2014 ; Durantel, 2010). Cependant, une forte mortalité des souris est observée dans ce modèle et il est difficile de se procurer des hépatocytes primaires humains.

4.2. Etude du fitness viral *in vitro*

L'étude du fitness viral est complexe et est conditionnée par le choix du modèle utilisé. Des systèmes de culture cellulaire, des modèles animaux capables de répliquer et de propager le virus sont nécessaires pour obtenir une mesure correcte du fitness d'une souche virale. Pour le VHB de tels modèles n'existent pas. Il a donc fallu développer des tests de réplication, d'assemblage et d'infection (Durantel, 2010).

Un modèle d'étude *in vitro* idéal devrait mimer une infection *in vivo* pour étudier tous les aspects du cycle de réplication du VHB. La mise au point d'un tel modèle s'est révélée difficile en raison notamment de l'étroite spécificité d'hôte des hepadnavirus et de leur tropisme hépatocytaire.

4.2.1. Les lignées cellulaires

La réplication du VHB est possible dans de nombreuses lignées cellulaires mais l'infection par des particules virales *in vitro* n'est possible qu'avec la transfection de matériel génétique sur les hépatocytes primaires humains, de *Tupaïa belangeri* et sur les cellules HepaRG (lignée pro-génitrice hépatique bipotente) différenciées **(**Glebe et Urban, 2007 ; Taylor, 2013 ; Urban *et al.*, 2014).

- Les lignées primaires hépatocytaires

Les hépatocytes primaires humains (PHH: Primary Human Hepatocyte) ont constitué pendant vingt ans le seul modèle *in vitro* d'infection du VHB. Malgré des difficultés d'entretien, c'était le seul moyen d'étudier le pouvoir infectieux. Elles sont obtenues à partir de pièces hépatiques après résection chirurgicales (Xie *et al.*, 2010). L'infection produite *in vitro* est plutôt inefficace et ne dure que quelques jours. Celle-ci peut être améliorée en cas d'ajout de Diméthylsulfoxide (DMSO) dans le milieu de culture et de polyéthylène glycol (PEG) au cours de l'infection (Xie *et al.*, 2010 ; Urban *et al.*, 2014). Le PEG a la propriété d'augmenter la fixation du VHB et VHD aux cellules, médiée par les GAGs (Urban *et al.*, 2014).

Cependant, leur approvisionnement est limité et les prélèvements sont de qualité hétérogène ce qui entraine une variation dans la sensibilité à l'infection. Il est donc difficile d'obtenir une bonne reproductibilité (Xie *et al.*, 2010 ; Urban *et al.*, 2014). Mais du fait de la stricte spécificité d'espèce de l'infection VHB, ce modèle le plus proche des hépatocytes humains « normaux » demeure un système essentiel (Xie *et al.*, 2010).

Les hépatocytes primaires issus de *Tupaïa belangeri* sont sensibles à l'infection par le VHB (mise en évidence d'une réplication virale, expression des gènes et sécrétion d'Ag HBe puis d'Ag HBs dans le milieu de culture). Ils sont obtenus plus facilement que les PHH et avec une qualité plus homogène. L'infection est réalisable sans ajout de DMSO ou de PEG, et l'ajout de DMSO dans le milieu de culture et de PEG au cours de l'infection, n'ont pas d'effet significatif sur l'infection (Glebe, 2007 ; Xie *et al.*, 2010 ; Urban *et al.*, 2014).

- Les lignées d'hépatome

La plupart de ces lignées sont dérivées de CHC ou d'hépatomes et sont très utilisées pour étudier les différents aspects du cycle viral (Xie *et al.*, 2010).

Les lignées HepG2 et Huh7 peuvent facilement répliquer l'ADN viral suite à la transfection de plasmides codant tout ou une partie du génome viral (Xie *et al.*, 2010). Cependant elles n'expriment pas à leur surface le récepteur NTCP et ne sont donc naturellement pas sensibles à l'infection par le VHB ou le virus de l'hépatite Delta (VHD). Le VHD est un virus défectif qui nécessite l'enveloppe du VHB pour pouvoir infecter une cellule et se répliquer. Il est communément admis que le processus d'entrée cellulaire est identique aux deux virus. Cependant, le mode de réplication du génome du VHD est beaucoup plus simple et rapide que celui du VHB. Il est donc souvent utilisé pour étudier les étapes précoces de l'entrée. Les lignées HepG2 et Huh7 sont donc classiquement utilisées pour produire des particules virales VHB ou VHD après transfection transitoire de plasmides codant le VHB (1.1 ou 1.3 unité de génome) ou la ribonucléoparticule Delta et les protéines d'enveloppe du VHD.

Récemment, grâce à la découverte du NTCP comme récepteur spécifique du VHB, il est possible de rendre sensible ces deux lignées à l'infection de VHB et de VHD en transfectant un plasmide codant le hNTCP. Cependant, l'infection est efficace, comme pour les PHH, les PTH et les HepaRG, seulement en présence de DMSO et de PEG (Xiao *et al*., 2013 ; Taylor *et al*., 2013). Les taux d'infection annoncés dans la littérature sont aux alentours de 25 à 30 %. (Yan *et al*., 2012 ; König *et al*., 2014). Les cellules hNTCP-HepG2 montraient les taux d'infection les plus élevés (Watashi *et al.*, 2014). Mais d'autres molécules que le hNTCP sont requises pour le pouvoir infectieux du VHB (ou du VHD) et ces facteurs peuvent ne pas être exprimés de façon équivalente entre les lignées hNTCP-transfectées Huh7, hNTCP-transfectées HepG2 et HepaRG (Ni *et al.*, 2014).

Par ailleurs, il existe des lignées avec intégration stable de VHB (HepG2.2.15 ou HepAd38) qui sont utiles pour étudier les dernières étapes de la réplication virale et le screening des antiviraux.

La lignée HepaGR correspond à un modèle plus récent. Il s'agit d'une lignée dérivée d'une tumeur chez une femme souffrant d'une hépatite C chronique (Xie *et al.*, 2010). Cette lignée pro-génitrice hépatique est bipotente (Gripon *et al.*, 2002). Elle devient permissive à l'infection par le VHB ou le VHD après une différenciation cellulaire qui suit une longue période d'induction avec du DMSO (deux semaines en présence de DMSO 2 %) et de l'hydrocortisone (figure 27) (Gripon *et al.*, 2002 ; Xie *et al.*, 2010 ; Urban *et al.*, 2014). C'est l'une des lignées cellulaires hépatiques humaines des plus utilisées pour l'étude du pouvoir infectieux du VHB. Les cellules HepaRG immatures peuvent aussi être transfectées à l'aide d'un plasmide codant le hNTCP, mais avec des taux d'infection VHB inférieurs à ceux mesurés pour les cellules hNTCP-HepG2. Au cours de la culture des PHH ou des PTH et au cours de la différenciation des HepaRG, le DMSO permet l'induction et l'expression de NTCP (Urban *et al.*, 2014 ; Ni *et al.*, 2014).

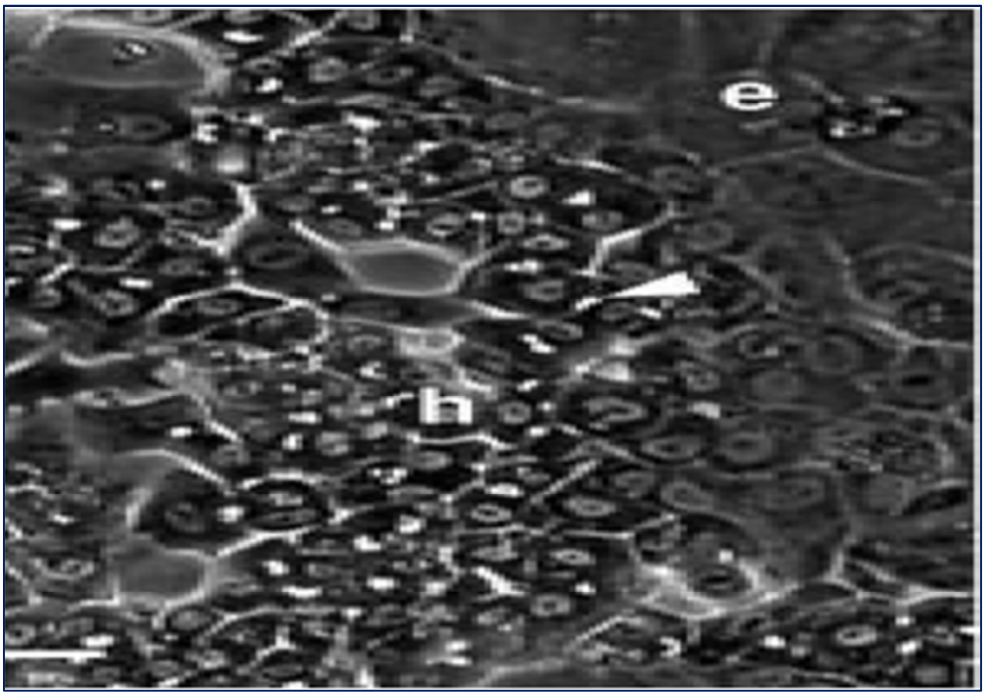


Figure 27 : Observation au microscope électronique de cellules HepaRG différenciées en cellules « hepatocyte-like » (h) et « epithelium-like » (e) (Gripon *et al.*, 2002).

Remarque : Le virus de l'hépatite Delta (VHD)

Le virus de l'hépatite Delta (VHD) a été identifié pour la première fois en 1977 par l'équipe de Mario Rizetto *et al*. Au sein d'une cohorte de patients infectés par le VHB présentant des lésions hépatiques particulièrement sévères (Rizetto *et al*., 1977).

15 à 20 millions d'individus à travers le monde sont co-infectés par du VHB et du VHD, ce qui représente 5 à 20 % des personnes infectées par le VHB (Alfaiate *et al*., 2015). L'infection simultanée par les deux virus est associée à un risque accru d'hépatite fulminante. La surinfection par le VHD d'un sujet porteur chronique d'une infection VHB se carractérise par des lésions hépatiques plus sévères et une évolution plus fréquente vers la cirrhose.

La particule virale VHD mesure 35 à 37 nm de diamètre et contient un génome à ARN de polarité négative, monocaténaire circulaire de 1672 à 1697 nucléotides. Il s'agit d'un virus défectif utilisant l'enveloppe du VHB contenant les trois protéines S, M et L, pour pénétrer et être excrété des hépatocytes. Cette particularité structurale lui confère le même tropisme hépatocytaire que le VHB (Alfaiate *et al*., 2015). Contrairement au VHB, la protéine S seule suffit à l'assemblage de la particule virale VHD mais dans ce cas, celle-ci n'est pas infectieuse (Alfaiate *et al*., 2015).

L'infection par le VHB des hépatocytes est nécessaire à la réalisation du cycle viral VHD. L'entrée du virus fait intervenir la fixation du domaine préS1 de la protéine L au récepteur hNTCP, précédée d'un attachement des particules virales à la surface des hépatocytes via les HSPGs (Alfaiate *et al*., 2015). Les réplications des deux virus sont ensuite parfaitement indépendantes. La réplication du génome VHD est exclusivement nucléaire et s'effectue selon un modèle de « double cercle roulant » faisant intervenir probablement des polymérases cellulaires. Le génome du VHD code une unique protéine l'antigène Delta (Alfaiate *et al*., 2015).

Le cycle de réplication viral du VHD étant plus simple que celui du VHB, de nombreux modèles d'étude *in vitro* ont pu être établis, notamment grâce à la co-transfection de plasmides codant la ribonucléoparticule Delta d'une part et les protéines d'enveloppe du VHB d'autre part, dans des lignées cellulaires (HepG2, Huh7).

4.2.2. Etude de la réplication

L'étude de la réplication est utilisée dans la réalisation des tests phénotypiques qui explorent les capacités réplicatives et le profil de résistance aux antiviraux de mutants viraux.

❖ Méthodes de transfection sans vecteurs

L'amplification du génome entier du VHB est réalisée par PCR. Puis les produits de PCR sont digérés par une enzyme de restriction dont le site de reconnaissance est situé au niveau des amorces utilisées pour la PCR. Le matériel génétique est ensuite transfecté dans des cellules de la lignée d'hépatomes (Huh7 ou HepG2). Le génome est circularisé par les enzymes de la cellule hôte et les ARN viraux sont produits. Tous les intermédiaires de réplication du VHB sont détectés et la transcription à partir de l'ADNccc peut être étudiée. L'avantage de cette technique, c'est que la réplication du virus est sous le contrôle de ses promoteurs naturels. Malheureusement, les niveaux de réplication sont parfois très bas (la circularisation du génome dans la cellule hôte étant souvent l'étape limitante) (Durantel, 2010).

❖ Méthodes de transfection avec vecteurs

Ces méthodes utilisent des plasmides ou des adénovirus ou des baculovirus recombinants, portant 1,1 à 1,3 unité de génome VHB. Ils contiennent l'information nécessaire et suffisante pour initier le cycle de réplication du VHB après transfection ou transduction dans des cellules (Durantel, 2010).

Le recours aux vecteurs plasmidiques permet d'introduire le génome VHB dans les cellules. Celui-ci est alors transcrit en ARNpg servant de matrice pour former des virions infectieux. Il faut au minimum insérer 1,1 unité de génome VHB dans les vecteurs pour obtenir une réplication. La synthèse de l'ARNpg se fait sous le contrôle :

- soit des promoteurs naturels du VHB (pour des insertions d'au moins 1,3 unité de génome)
- soit de promoteurs forts hétérologues (pour des insertions de 1,1 unité de génome).

Les applications de ce modèle sont les suivantes :

- l'étude du rôle des protéines du VHB (surtout des protéines d'enveloppe)
- l'étude des éléments régulant l'expression du VHB et sa réplication
- et surtout l'analyse phénotypique des résistances aux analogues de nucleos(t)ides (Durantel, 2010)

La première génération des tests phénotypiques de résistance aux NUCs utilisait une insertion par échange de cassette ou mutagénèse dirigée sur un plasmide contenant le génome du VHB.

La deuxième génération a recours au clonage des génomes VHB issus de sérum de patients dans des vecteurs plasmidiques (Durantel *et al*., 2004 ; Durantel, 2010). Les niveaux de réplication du VHB sont plus élevés que ceux obtenus avec la première génération. Ce système a permis de cloner l'ensemble de la quasi-espèce chez un patient donné.
Dans tous les cas, les méthodes avec vecteurs et celles sans vecteur sont complémentaires pour déterminer le phénotype de souches cliniques (Durantel, 2010).

4.2.3. Tests d'assemblage et d'infection

Ces tests explorent la production de virion, la capacité de sécrétion et le pouvoir infectieux des virions produits. Il existe deux types d'approches.
La première de ses approches consiste en une transfection stable ou transitoire de lignées d'hépatome humain (Huh7 ou HepG2) avec un plasmide codant le VHB. La transfection stable est utile pour étudier l'assemblage et la sécrétion de souches VHB mais est difficile à générer. La transfection transitoire avec des plasmides portant de 1,1 à 2 unités de génome VHB est plus flexible (même si le nombre de particules produites est plus faible). L'assemblage et la sécrétion de particules VHB sont mesurés par quantification de l'ADN VHB sécrété et/ou détection des protéines d'enveloppe (par ELISA ou Western Blot). Cependant ces méthodes de dosage ne sont pas toujours précises et ne permettent parfois pas de distinguer :

- les nucléocapsides enveloppées de celles qui ne le sont pas (qPCR)
- les SVPs des particules de Dane (ELISA ou Western Blot)

La deuxième approche utilise la production de particules VHD (Durantel, 2010). Comme nous l'avons précédemment expliqué, le VHD utilise les protéines d'enveloppe du VHB pour sa propagation. Ce modèle consiste à co-transfecter un plasmide codant la ribonucléoparticule du VHD et un plasmide exprimant l'ARNpg ou les protéines d'enveloppe du VHB (Villet *et al*., 2009 ; Durantel, 2010). Un mélange de particules VHB/VHD ou seulement des particules VHD sont produites. Ce modèle a permis d'étudier l'impact de mutations sur l'assemblage et la sécrétion de particules VHB et /ou VHD, mais aussi le pouvoir infectieux des particules produites (Villet *et al*., 2013). L'assemblage et la sécrétion de particules VHB/VHD ou VHD est estimée par la quantification de l'ARN VHD sécrété par qRT-PCR (ou Northern Blot) et / ou des protéines d'enveloppe par ELISA ou Western Blot (Villet *et al*., 2013 ; Durantel, 2010).
Afin de pouvoir réaliser une analyse comparative du pouvoir infectieux, l'inoculum de départ (virions produits) doit être standardisé. Les tests d'infection sont ensuite réalisés sur des

cellules infectables *in vitro :* PHH, PTH ou HepaRG (Villet *et al.*, 2013)**.** Après inoculation, l'intensité de l'infection est mesurée (Northern Blot, qRT-PCR VHD).

5. Les protéines d'enveloppe du VHB

5.1. Structure des glycoprotéines d'enveloppe

❖ Synthèse

L'enveloppe du VHB comporte trois glycoprotéines, petite ou S (Small), moyenne ou M (Middle) et grande ou L (Large), codées par un même cadre de lecture. La transcription est initiée au niveau de deux promoteurs distincts :

- l'un en amont de l'ORF S/préS qui conduit à la synthèse de la grande protéine L de longueur variable selon le génotype
- l'autre au niveau d'un promoteur interne en amont du deuxième site de traduction (AUG) conduisant à la synthèse des protéines M (281 aa) et S (226 aa)

La synthèse de ces protéines se déroule au niveau du RE, synthèse au cours de laquelle elles adoptent une topologie complexe (Bruss, 2007). Au cours de la traduction la protéine S s'insère dans la membrane du RE par le biais d'une séquence signal localisée en N terminal (aa 8 à 22). La reconnaissance d'une deuxième séquence signal (aa 80 à 98) permet la translocation de la chaine peptidique à travers la membrane du RE vers la lumière, alors que la région en amont du signal reste dans le cytosol. Ce deuxième signal remplit le rôle d'un domaine transmembranaire au sein de la bicouche lipidique (Bruss, 2007 ; Glebe, 2007). Les 57 aa hydrophobes localisés en région C terminale de la protéine sont donc enchâssés dans la membrane et orientés vers la lumière du RE (Bruss, 2007). Cette topologie particulière conduit à la formation d'une boucle du côté cytosolique de la membrane du RE et d'une boucle glycosylée portant l'épitope conformationnel majeur de l'antigène HBs du côté luminal. Lors de la libération des virions néoformés, après bourgeonnement cette boucle glycosylée et les épitopes qu'elle comporte seront localisés en surface du virion ou des SVPs (Bruss, 2007 ; Glebe, 2007). Sous l'action de la première séquence signal de la protéine S (aa 8 à 22), le domaine préS2 (55 aa) localisé en région N terminale est transloqué dans la lumière du RE (Bruss, 2007). En ce qui concerne la protéine L, les domaines préS1 et préS2 en N terminale sont initialement situés du côté cytosolique de la membrane du RE en conformation dite « i-préS ». Le deuxième signal central dans le domaine S arrime la protéine à la membrane du RE et induirait la translocation des séquences en aval. Ainsi pour environ la moitié des chaines protéiques L, la topologie membranaire change et le domaine préS passe du côté luminal de la membrane du RE en conformation dite « e-préS » (Bruss, 2007 : Urban *et al.*, 2014). La protéine L est insérée dans la bicouche lipidique via le domaine transmembranaire 1 (TM1) du domaine S. Donc initialement le domaine préS1 est situé à

l'intérieur de la particule virale. La myristoylation du domaine préS1 (modification post-traductionnelle) est un ancrage supplémentaire de la protéine à l'enveloppe virale. Elle va induire un processus de translocation post-traductionnel de préS1 et donc son exposition à la surface du virion. Après bourgeonnement des virions, deux isoformes de protéines L vont co-exister :

- la conformation e-preS : les domaines préS1 et préS2 sont exposés à la surface du virion et participent à la fixation au récepteur
- la conformation i-preS : les domaines préS1 et préS2 sont à l'intérieur du virion et sont probablement importants pour le contact avec la nucléocapside (Bruss, 2007).

Dans le compartiment RE, au niveau de la boucle luminale des liaisons entre les protéines d'enveloppe se créent par l'intermédiaire de ponts disulfures. Ainsi, rapidement après la synthèse des hétéro ou homo-dimères entre les protéines S, M et L ont été décrits (Bruss, 2007 ; Glebe et Urban, 2007).

In fine, les trois protéines possèdent en commun une partie C-terminale hydrophobe de 57 acides aminés au niveau du domaine S capable de s'intégrer aux membranes lipidiques (Bruss, 2007).

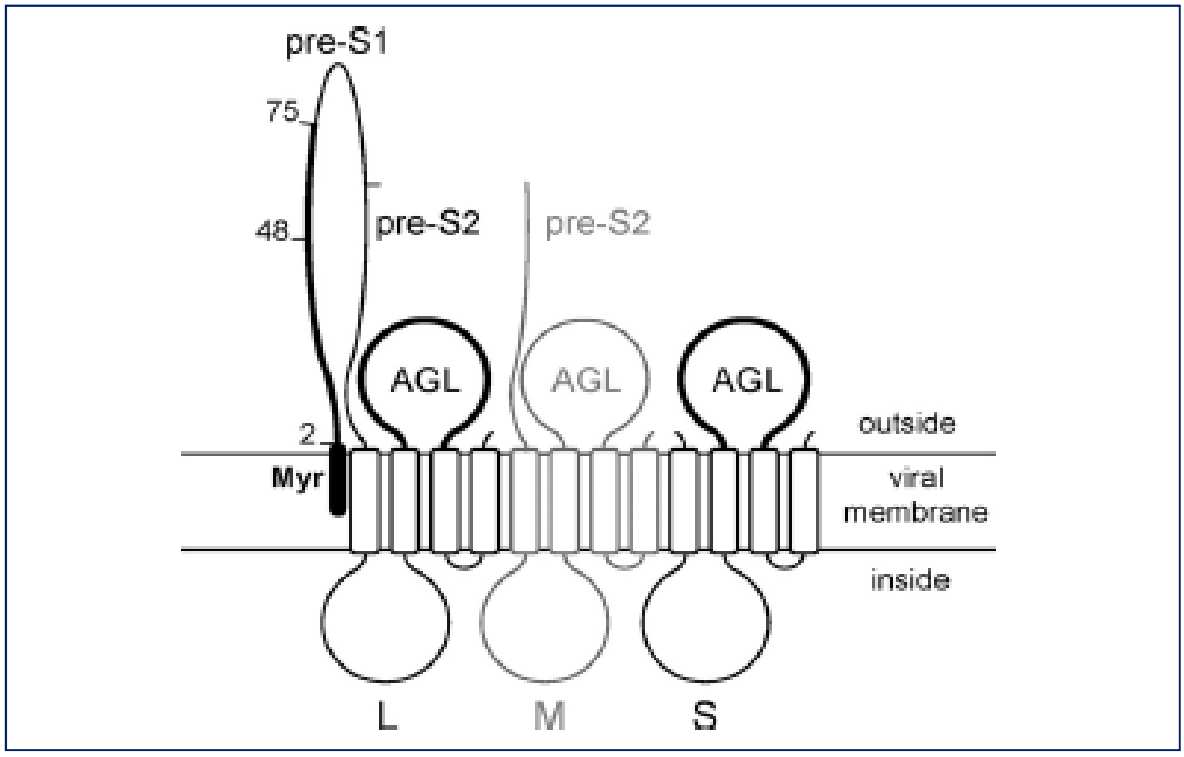


Figure 28 : Topologie membranaire des protéines d'enveloppe du VHB (Le Duff *et al.*, 2009).

❖ Structure de la protéine S

Dans sa topologie finale, la protéine S, formée de 226 aa, présente quatre hélices transmembranaires nommées TM. L'espace entre les TM2 et TM3 (aa 99 à 169) définit la Major Hydrophilic Region (MHR) appelée aussi parfois boucle antigénique. Cette région contient le déterminant « a » immunodominant (aa 124 à 147) qui concentre la plupart des épitopes conformationnels (Glebe, 2007 ; Taylor, 2013). La protéine S est N-glycosylée sur le résidu asparagine situé en 146 (Asn146) (Bruss, 2007 ; Glebe et Urban, 2007). Par ailleurs elle contient de nombreux résidus cystéines (Bruss, 2007).

❖ Structure de la protéine M

La protéine M (281 aa) est codée par les gènes préS2 et S. Sa topologie finale transmembranaire est identique à celle de la protéine S, le domaine préS2 étant exposé à la surface virale (Bruss, 2007 ; Glebe, 2007). La protéine subit une N glycosylation au niveau du résidu asparagine situé en position 4 (Asn 4) (Bruss, 2007 ; Glebe, 2007). Il n'y a pas de N-glycosylation retrouvée à ce niveau sur les protéines L qui contiennent aussi un domaine préS2 (Glebe et Urban, 2007). Chez certains génotypes (B à H) une O-glycosylation a lieu sur une thréonine en position 37 (Thr 37), qui est retrouvée sur la protéine L et la protéine M (Bruss, 2007 ; Glebe, 2007 ; Glebe et Urban, 2007). Cette O-glycosylation est absente chez les virus de génotype A, du fait de la présence d'une asparagine et non d'une thréonine à cette position (Glebe, 2007 ; Glebe et Urban, 2007). La fonction de cette O-glycosylation dans le cycle viral est à ce jour inconnue (Glebe, 2007).

❖ Structure de la protéine L

La protéine L (389 à 400 aa) comprend les domaines préS1, préS2 et S. La taille du domaine préS1 est variable selon le génotype viral : 108 aa (génotype D), 118 aa (génotypes E et G), 119 aa (génotypes A, B, C, F et H). La protéine L présente un ancrage myristoyle en position 2 sur un acide aminé glycine (Bruss, 2007)**.** La myristoylation se produit grâce à la reconnaissance d'une séquence spécifique (aa 1 à 8, génotype D). Ces motifs de N-myristoylation sont présents chez tous les *hepadnavirus*.

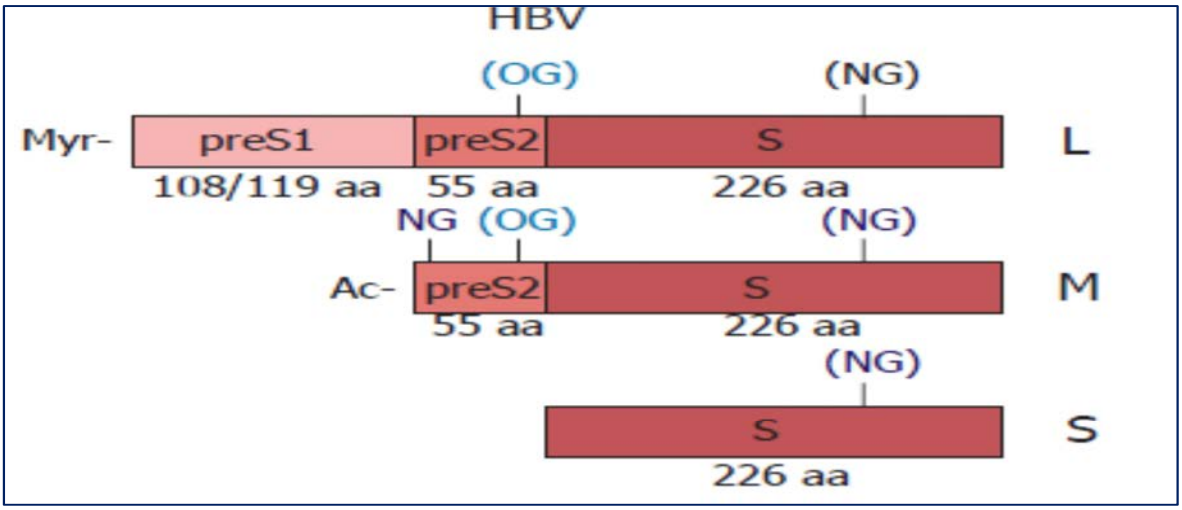


Figure 29 : Les protéines d'enveloppe du VHB (Glebe et Urban, 2007).

5.2. Fonctions des glycoprotéines d'enveloppe

❖ Pouvoir infectieux du virus

Les protéines d'enveloppe, notamment les protéines S et L sont des éléments cruciaux impliqués dans les processus d'attachement, de fixation spécifique à un récepteur et dans la fusion membranaire. Les domaines fonctionnels impliqués dans le pouvoir infectieux du virus ont été identifiés en utilisant deux approches complémentaires (Schultze *et al*., 2010).

La première de ces approches expérimentales utilise des particules VHB ou VHD enveloppées avec des protéines L ou S mutées (Blanchet et Sureau, 2007 ; Le Duff *et al*., 2009 ; Salisse et Sureau, 2009). La deuxième approche utilise des peptides synthétiques myristoylés correspondant à la séquence N terminale (aa 2-78) de préS1 (Schultze *et al.*, 2010).

Les protéines S et L semblent cruciales pour le pouvoir infectieux du VHB et du VHD, tandis que la protéine M ne semble pas indispensable au déroulement de l'infection (Glebe, 2007 ; Taylor, 2013). En effet la fonction de la protéine M demeure inconnue dans le processus d'infection virale, son absence n'empêche pas la formation de virion, ni le pouvoir infectieux (Sureau *et al*., 1994 ; Glebe, 2007 ; Urban *et al*., 2014). Cependant elle doit quand même présenter un avantage évolutif car elle est conservée chez tous les orthohepadnavirus (Glebe, 2007).

Deux déterminants majeurs impliqués dans le pouvoir infectieux ont été identifiés : au niveau du domaine préS1 de la protéine L et le domaine conformationnel situé au niveau de l'Ag HBs.

Le premier déterminant à la partie Nter de préS1 comprenant les aa 2 à 75. Il correspond au Recepteur Binding Domain (RBD) localisé dans la partie N ter de préS1 des aa 2 à 48 et à un domaine accessoire (49-75) dont la fonction est inconnue (Glebe, 2007 ; Blanchet et Sureau, 2007 ; Le Duff *et al*., 2009). Les peptides synthétiques dérivés de préS1 (aa 2-48) n'affectent pas l'attachement primaire des virus aux HSPGs, ni les étapes post-fusion (Schultze *et al.*, 2010). Des analyses réalisées avec différents peptides synthétiques ou à l'aide de particules virales dont les protéines d'enveloppe étaient mutées ou délétées, ont permis de restreindre un peu plus la zone vraiment essentielle à l'entrée virale. Celle-ci correspond à une partie de pré S1 très conservée des aa 9 à 15 (Schultze, 2006 ; Blanchet et sureau, 2007). Cette zone correspond à la zone de fixation spécifique au récepteur NTCP (Yan *et al*., 2012). Par ailleurs, la myristoylation en N ter de la protéine L est essentielle pour le pouvoir infectieux (Urban *et al*., 2014).

Il existe un domaine impliqué dans la fusion membranaire, le domaine TLM (Translocative Motif), au niveau de la partie C terminale de préS2. Mais sa fonction est toujours sujette à controverse (Glebe, 2007).

Un deuxième déterminant a été identifié au niveau de la MHR des trois protéines d'enveloppe plus particulièrement au niveau du déterminant « a » (aa 124-147)**.** Il agirait indépendamment du premier déterminant en préS1 (Le Duff *et al*., 2009). La conformation de la MHR due à la présence de nombreux résidus cystéines dans cette région, est indispensable à la fonction de ce déterminant. La substitution de résidus cystéine par des sérines au niveau du déterminant « a » ou l'utilisation d'inhibiteurs de disulfure isomérase peut bloquer l'entrée du virus et inhiber le pouvoir infectieux du virion (Abou-Jaoude et Sureau, 2007 ; Le Duff *et al*., 2009 ; Salisse et Sureau, 2009). La cystéine 147 semble d'ailleurs être indispensable, car elle est impliquée dans la formation de ponts disulfures intermoléculaires. Cette zone fonctionnelle et structurale est partagée par les trois protéines d'enveloppe, cependant, il semble que la protéine S soit plus impliquée que la protéine L. Ceci est sûrement dû à la stœchiométrie relative des deux types de protéines au niveau de l'enveloppe virale (Le Duff *et al*, 2009).

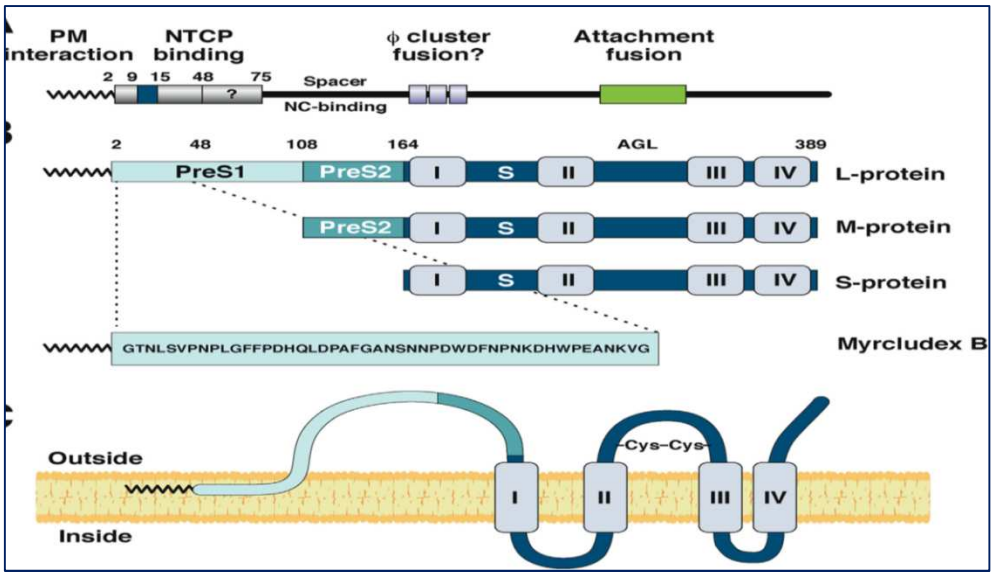


Figure 30 : Représentation schématique des zones fonctionnelles impliquées dans le pouvoir infectieux du VHB (Urban *et al*., 2014).

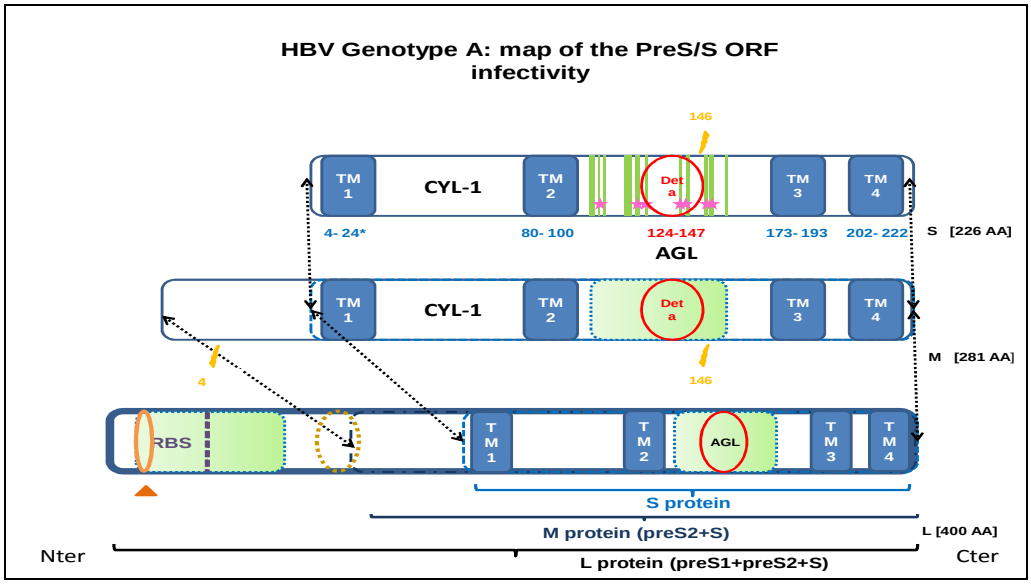


Figure 31 : Cartographie fonctionnelle des zones impliquées dans le pouvoir infectieux du VHB

: Résidu Cystéine ; : Site de N glycosylation ; Dét a : déterminant « a »

: Zone impliquée dans le pouvoir infectieux ; : site de myristoylation.

❖ La réponse immunitaire

Les protéines de surface sont essentielles à l'induction des réponses immunitaires cellulaires et humorales de l'hôte puisque de nombreux épitopes B et T spécifiques ont été décrits au sein des domaines préS1, préS2 et S (Desmond et al., 2008).

Les domaines pré-S1 et pré-S2 portent des épitopes linéaires B et T. Les anticorps dirigés contre les domaines préS1 et préS2 sont souvent absents chez les porteurs chroniques du virus et semblent jouer un rôle important dans la clairance virale (Tai *et al*, 2002).

Le domaine S (Ag HBs) est impliqué dans la formation de ponts disulfures inter- et intramoléculaires via les résidus Cystéine hautement conservés stabilisant la structure en boucle. En effet, cette conformation particulière est indispensable et permet l'exposition des charges positives à la surface du virus (Sureau et Salisse, 2013). Plusieurs zones antigéniques existent au niveau de la MHR : HBs1 (aa 99 à 120), HBs2 (aa 121 à 123), HBs3 (AA 124 à 137), HBs4 (AA 138 à 147), HBs5 (AA148 à 160). Le déterminant « a » (aa 124 à 147) correspond aux zones HBs3 et HBs4 et il est considéré comme la partie antigénique principale de l'antigène HBs. Il est constitué des épitopes conformationnels qui sont les cibles des anticorps neutralisants (Ac anti-HBs) (Tajiiri *et al*., 2010).

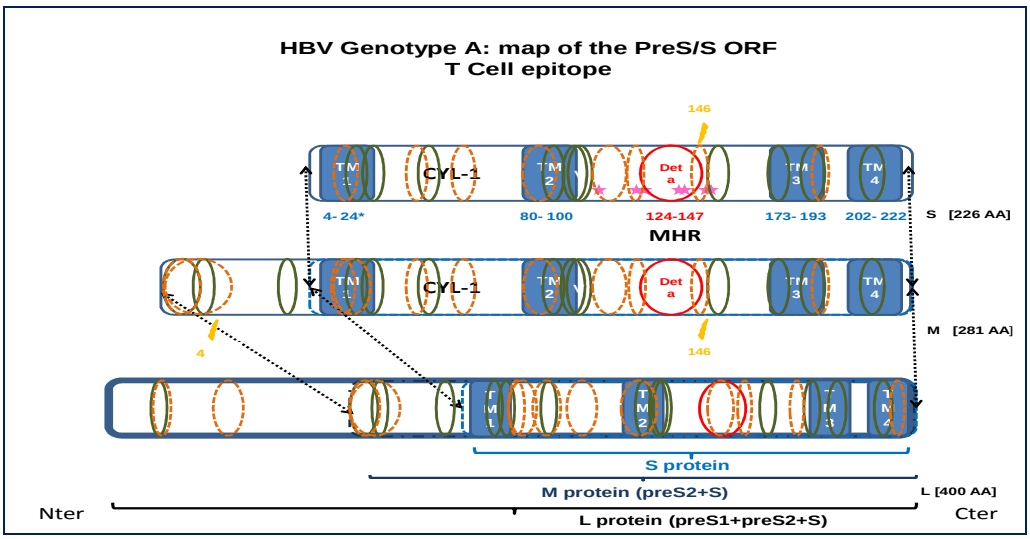


Figure 32 : Cartographie fonctionnelle des zones impliquées dans la réponse immunitaire contre le VHB

: épitopes de la réponse cellulaire restreint au CMHI

: épitopes de la réponse cellulaire restreint au CMHII

Remarque : L'article qui suit est une revue publiée dans World Journal of Gastroenterology en janvier 2013. Cette revue s'interesse aux caractéristiques des glycoprotéines d'enveloppe du VHB et du VHC.

Objectifs

Comme nous venons de l'exposer, l'infection chronique par le virus de l'hépatite B reste actuellement un enjeu sanitaire majeur et de nombreux aspects de la biologie du virus et de la physiopathologie de la maladie restent à explorer. Les traitements de l'infection chronique actuellement disponibles parmi lesquels les analogues nucléos(t)idiques ne permettent que rarement d'obtenir une clairance de l'antigène HBs (réponse idéale). Il apparait donc nécessaire de développer de nouveaux outils thérapeutiques, ciblant d'autres axes du cycle réplicatif du virus. La découverte récente d'un récepteur spécifique du VHB, le NTCP, ouvre de nouvelles perspectives en terme de modèle d'étude disponible pour approfondir notre connaissance de l'entrée virale et surtout en termes de nouveaux axes thérapeutiques tels que les inhibiteurs d'entrée.

Les protéines d'enveloppe du VHB sont, comme nous l'avons développé plus haut, impliquées dans l'entrée virale et dans le développement de la réponse immunitaire de l'hôte. Comme c'est le cas pour de nombreuses pathologies chroniques, l'élimination de l'infection par le VHB correspond à un mécanisme multifactoriel impliquant l'effet des molécules anti-VHB, la réponse immunitaire de l'hôte et des facteurs viraux influençant la structure et les fonctions du virus. Parmi ces facteurs viraux, nous nous sommes particulièrement intéressés aux protéines d'enveloppe du virus.

Notre hypothèse de travail est donc la suivante : des caractéristiques des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B pourraient influencer la clairance de l'Ag HBs sous traitement anti-VHB par analogues nucleot(s)idiques.

L'objectif principal de cette étude était d'identifier de possibles signatures moléculaires, ou acides aminés spécifiques, liées à l'obtention ou à l'absence d'obtention d'une clairance de l'Ag HBs chez des patients infectés par des souches VHB de génotype A ou D (génotypes les plus courants dans nos régions).

Une fois ces signatures moléculaires identifiées et caractérisées (prédiction antigénique par bio-informatique), nous avons produit des particules virales VHD porteuses de ces signatures afin d'évaluer leur impact sur le pouvoir infectieux du virus, grâce à l'utilisation de l'un des modèles fonctionnels décrits dans la partie 4.2.3 Tests d'assemblage et d'infection.

Dans un autre volet d'expérimentation (qui ne fait pas l'objet de ce manuscrit), ces mêmes signatures ont été testées sur un modèle murin vacciné.

L'objectif secondaire de l'ensemble de ces travaux est d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques axées sur les protéines d'enveloppe du VHB et leur fonctionnalité, visant à proposer de nouveaux inhibiteurs de l'entrée cellulaire du virus.

Le déroulement de ces travaux s’articule en trois volets expérimentaux distincts présentés dans la figure 33.

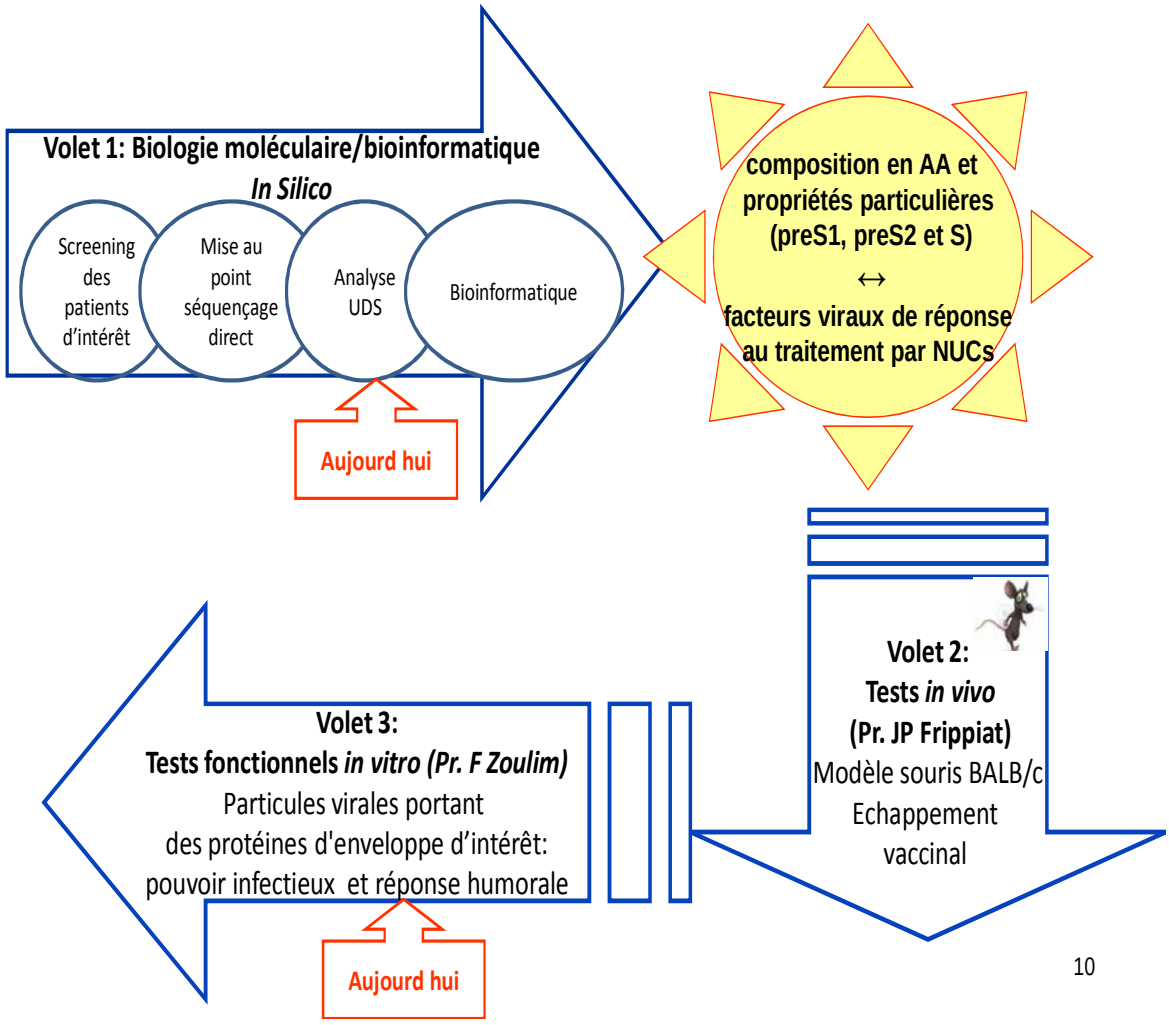


Figure 33 : Connexion des volets expérimentaux de l'étude.

Partie 1 : *Analyses in silico*

(volet 1 de l'étude)

1. Matériels et méthodes

1.1. Constitution de la cohorte :

Notre étude est une étude rétrospective portant sur des patients porteurs chroniques du virus de l'hépatite B, exclusivement sélectionnés au Centre Hospitalier Universitaire de Nancy au sein du service d'Hépato-Gastro-Entérologie (HGE). L'étude (étude DC-2013-1801) a été approuvée par le « Comité de protection des personnes – CPP de Lorraine », en accord avec les recommandations internationales (Helsinki). Les consentements éclairés des patients ont été obtenus et les critères d'inclusion des patients étaient les suivants :

- Patients adultes, porteurs d'une hépatite B chronique, traités par analogues nucléos(t)idiques, mono-infectés par le VHB (sans co-infection par le VHC, le VIH et le VHD).

Pour chaque patient inclus, les données biologiques, cliniques et thérapeutiques ont été recueillies rétrospectivement. L'historique des profils sérologiques vis-à-vis du VHB, des charges virales du VHB et des dosages de transaminases a été dressé. La quantification de l'ADN sérique du VHB a été réalisée par qPCR, en précisant à chaque fois la technique et le seuil de détection utilisés à la date du dosage (tableau 8). Les profils sérologiques (antigène HBs, antigène HBe, anticorps anti-HBc, anticorps anti-HBe et anticorps anti-HBs) étaient réalisés en utilisant des techniques automatisées de dosage par chimiluminescence (CMIA) ou par Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA). Les techniques et seuils de détection utilisés sont précisés dans le tableau 9 (tableau 9). La réponse au traitement était évaluée par quantification de l'ADN sérique ou plasmatique par qPCR et surtout par la diminution puis la disparition de l'antigène HBs sérique. Selon l'obtention de la clairance de l'Ag HBs, les patients ont été classés en deux groupes :

- Patients resolvers (R) : patients ayant obtenu une réponse virologique (ADN sérique du VHB négatif) et la clairance de l'antigène HBs sous traitement par NUCs

- Patients non resolvers (NR) : patients ayant obtenu une réponse virologique (ADN sérique du VHB négatif) sans clairance de l'antigène HBs sous traitement par NUCs.

En fonction des résultats du génotypage, obtenus selon la technique de séquençage direct décrite dans le paragraphe 2.1, les patients ont été appariés selon l'âge (+/- 5 ans), le sexe et le génotype viral (A ou D).

	Techniques de Biologie Moléculaire		
	Dates d'utilisation	Seuil de détection	Facteur de conversion en UI/ml
Cobas (Roche®)	Jusqu'au 05/09/2005	< 29 copies/ml < 1,40 log copies/ml	1UI/ml = 7,21 copies/ml
m1000 + ABI Prism (Abbott®)	Du 06/09/2005 au 04/04/2006	< 29 copies/ml <1,40 log copies/ml	1UI/ml = 7,21 copies/ml
m2000sp + ABI Prism (Abbott®)	Du 05/04/2006 au 09/07/2007	< 29 copies/ml < 1,40 log copies/ml	1UI/ml = 7,21 copies/ml
m2000sp + m2000rt (Abbott®)	Du 10/07/2007 au 20/08/2009	< 34 copies/ml < 1,53 log UI/ml	1 UI/ml = 3,41 copies /ml
m2000sp + m2000rt (Abbott®)	Du 21/08/2009 au 11/06/2011	10 UI/ml 1,00 log UI/ml	1 UI/ml = 3,41 copies /ml
Cobas (Roche®)	A partir du 13/06/2011	20 UI/ml 1,30 log UI/ml	/

Tableau 8 : Techniques de Biologie moléculaire utilisées et leurs seuils de détection respectifs

	Techniques sérologiques	
	Axsym (Abbott®)	Architect (Abbott®)
Ag HBs (quantitatif)	> 2,00	≥ 1,1 (Index) A partir de 2006
Neutralisation Ag HBs	≥ 50%	≥ 50% A partir du 07/06/2011
Ac anti-HBs	> 10 mUI/ml	≥ 10 mUI/ml A partir de 2006
Ac anti-HBc Totaux	> 1,00	≥ 1,1 (Index) A partir de 2006
Ac anti-HBc IgM	> 1,50	≥ 1 (Index) A partir du 07/06/2011
Ag HBe	< 1,00	≥ 1 (Index) A partir du 07/06/2011
Ac anti HBe	> 1,00	≤ 1 (Index) A partir du 07/06/2011

Tableau 9 : Techniques sérologiques utilisées et leurs seuils de positivité respectifs

1.2. Volet 1 : étude *In Silico*

1.2.1. Séquençage direct :

1.2.1.1. Extraction automatisée de l'ADN viral :

L'ADN viral a été extrait à partir du sérum ou du plasma recueilli chez les patients sélectionnés, à l'aide de l'automate NucliSENS® easyMAG™ (bioMerieux). Son principe de fonctionnement repose sur la propriété de la silice à adsorber l'ADN. Les acides nucléiques sont captés sur des billes (silice magnétique) puis élués dans un volume de 50 µL, selon les instructions du fabricant. La quantité de sérum nécessaire pour l'extraction était de 500µL, ou de 1000µL pour les faibles charges virales (inférieure à 3 log UI/ml). Les ADN extraits ont été conservés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

1.2.1.2. Protocole de séquençage direct :

Après extraction de l'ADN viral, le cadre de lecture préS/S du génome du VHB correspondant d'une part au gène S et d'autre part à la région préS (gènes préS1 et préS2) a été amplifié par PCR et séquencé. Le séquençage direct des gènes codant les glycoprotéines d'enveloppe du VHB repose sur deux étapes d'amplification de l'ADN (PCR1 et PCR2) dont une PCR semi-nichée, suivie d'une PCR de séquençage, pour chaque fragment généré (Figure 1). Le recours au séquenceur Genetic Analyzer 3130 Applied Biosystems ® limite la taille des fragments séquencés à 800 pb. Il est conseillé de séquencer des fragments jusqu'à environ 600 pb pour obtenir un signal de qualité optimale. Le gène S (678 pb) est trop long pour pouvoir être séquencé en un seul fragment. Il a donc fallu générer deux fragments (PCR 2a et PCR 2b) ayant une zone de chevauchement de cinquante à cent nucléotides. En revanche, la région préS (489 à 522 pb) a été séquencée en un seul fragment.

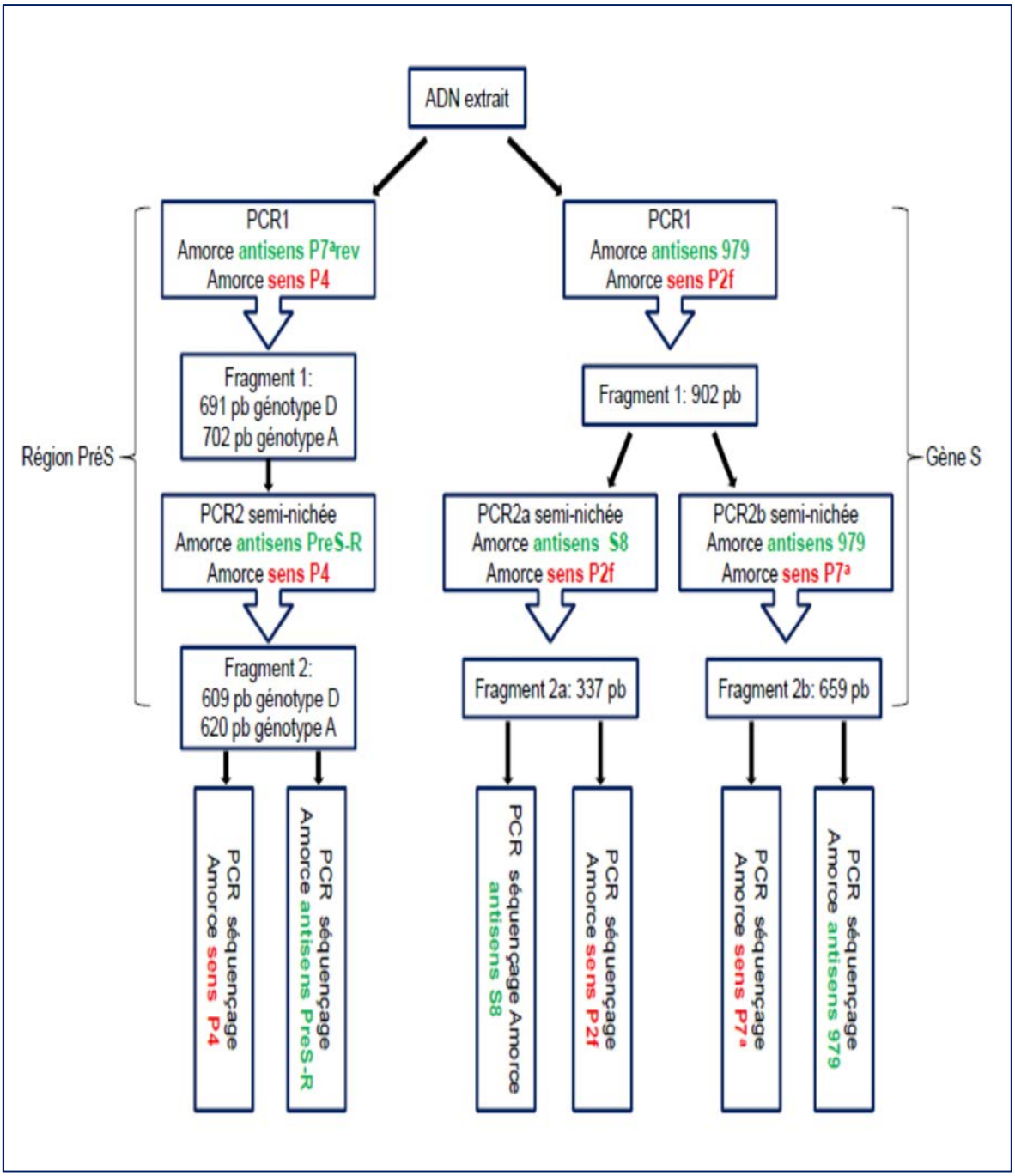


Figure 34 : Protocole de réalisation du séquençage direct.

1.2.1.3. Amplification de l'ADN

❖ Choix des amorces :

Les amorces sens et antisens utilisées ont été choisies parmi les données de la littérature à l'exception de l'amorce antisens P7[a] rev (PCR1 région préS), obtenue par reverse-complémentation de l'amorce P7[a] décrite par Sung *et al.,* 2008 (Sung *et al.*, 2008). Le détail des amorces est présenté dans le tableau 10 (tableau 10).

➢ Remarque

<u>Validation des amorces lors de la mise au point du séquençage direct :</u>

Le choix des amorces décrites dans le paragraphe précédent a été validé en amplifiant la zone d'intérêt à l'aide de l'enzyme « Taq DNA polymérase, recombinant » (Invitrogen™). Le mélange réactionnel et les programmes utilisés étaient les suivants :

Mélange réactionnel : matrice (extrait d'ADN ou produit de PCR1) 5 µl ; tampon 10X PCR Rxn 2,5 µl ; amorce sens (10 µM) 0,75 µl ; amorce antisens (10 µM) 0,75 µl ; dNTP (10 mM) 0,5 µl ; Taq Polymerase 0,6 µl ; $MgCl_2$ (50 mM) 1,5 µl ; **Eau DNAse-free : qsp 25 µl**

Programme PCR1 : 95°C 5 min; [95°C 30 sec ; 60°C 30 sec ; 72°C 1 min] 35 fois; élongation finale 72°C 7 min

Programme PCR2 : 95°C 5 min; [95°C 30 sec; 61°C 30 sec; 72°C 1 min] 35 fois; élongation finale 72°C 7 min

Région	PCR	Amorce		TM (GC%)	Références bibliographiques
préS	PCR1	**Sens P4**	5'- GCCTCATTTTGTGGGTCACCATA- 3'	50.2°C (47.8%)	*Sung et al.*, 2008
		Antisens P7[a] rev	5'-GACTGCGAATTTTGGCCAA- 3'	56.0°C (47.4%)	/
	PCR2	**Sens P4 (Amorce sens PCR1)**			
		Antisens PreS-R	5' -TCAACAAGAAAAACMCCGCCTGT- 3'	50.2°C (43.5%)	*Odemuyiwa et al.*, 2001
S	PCR1	**Sens P2f**	5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'	66.0°C (65%)	*Mulders et al.*, 2004
		Antisens 979	5'-CAAAAGACCCACAATTCTTTGACATACTTTCCAAT- 3'	54.7°C (34.3%)	*Odemuyiwa et al.*, 2001
	PCR2a	**Sens P2f (Amorce sens PCR1)**			
		Antisens S8	5'- GAAGATGAGGCATAGCAGCAGG- 3'	51.6°C (54.5%)	*Sung et al.*, 2008
	PCR2b	**Sens P7[a]**	5'-TTGGCCAAAATTCGCAGTC- 3'	56.0°C (47.4%)	*Sung et al.*, 2008
		Antisens 979 (Amorce antisens PCR2b)			

Tableau 10 : Liste et caractéristiques des amorces utilisées pour le séquençage direct des gènes préS1, préS2 et S.

❖ Gène S :

La PCR1 utilisant les amorces P2f (sens) et 979 (antisens) (tableau 10) génère un amplicon de 902 pb couvrant la région S. Les PCR semi-nichées PCR2a et PCR2b permettent d'obtenir :

- pour la PCR2a utilisant les amorces P2f (sens) et S8 (antisens) un fragment de 337 pb.
- pour la PCR2b utilisant les amorces P7[a] (sens) et 979 (antisens) un fragment de 659 pb.

Ces deux séquences se chevauchent (zone de chevauchement de 50 à 100 nucléotides) couvrant l'ensemble de la région S. Le chevauchement des cadres de lecture du VHB permet également le séquençage d'une grande partie du gène de la transcriptase inverse (RT) (environ 800 pb sur 1032 pb) (figure 35).

❖ Région préS

La PCR1 amplifie un fragment de 691 pb (génotype D) à 711 pb (génotype A) couvrant la région préS en utilisant les amorces P4 (sens) et P7[a] rev (antisens). La PCR2 permet d'amplifier le produit de la PCR1 grâce aux amorces P4 (sens) et PreS-R (antisens). L'amplicon obtenu a une taille de 609 pb (génotype D) à 620 pb (génotype A) (figure 35).

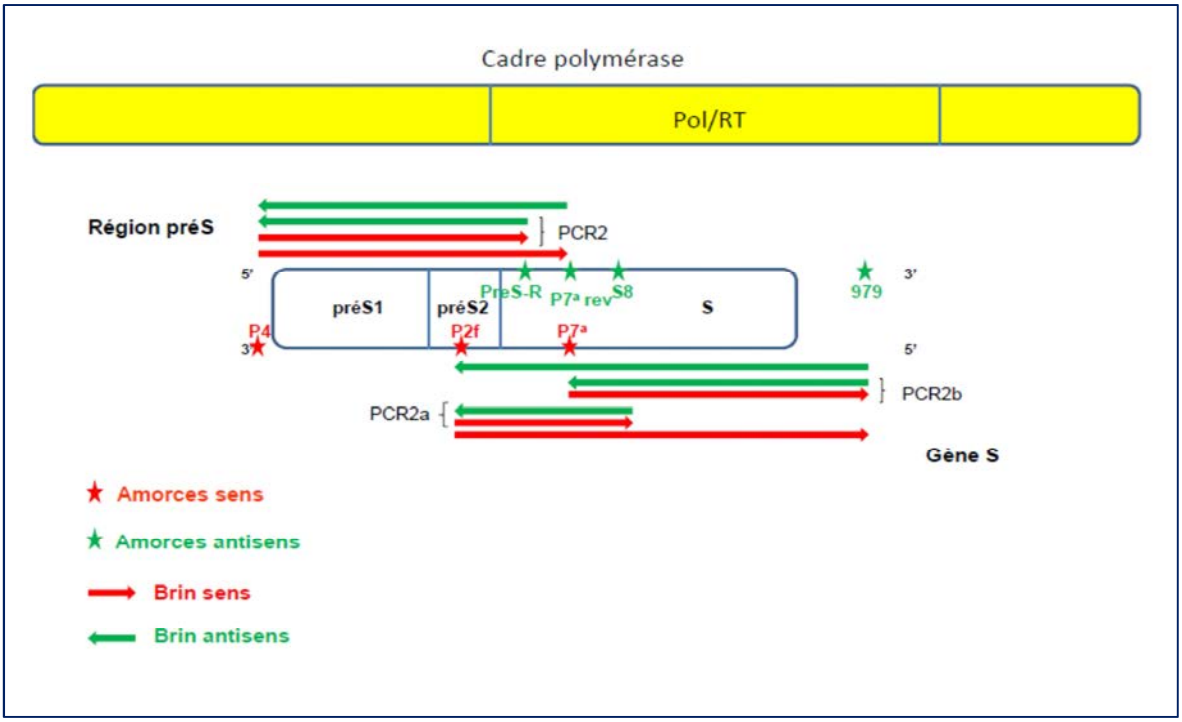


Figure 35 : Positionnement des amorces choisies pour le séquençage direct.

❖ Programmes et mélanges réactionnels :

La trousse Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermofisher Scientific) comprenant un master mix 2X Phusion® (contenant le tampon, les dNTPs, le MgCl2 et une ADN polymérase) a été utilisée. Cette enzyme, dotée d'une activité correctrice 3'→5' exonucléase permet une amplification de haute-fidélité, adaptée aux réactions de séquençage.

Mélange réactionnel pour un échantillon :

Matrice (extrait d'ADN ou produit de PCR1) : 5 µl
Master mix 2X : 12,5 µl
Amorce sens: 0,75 µl
Amorce antisens : 0,75 µl
Diméthyl sulfoxyde (DMSO): 0,6 µl
Eau DNAse-free: qsp 25 µl

Remarques :

Lors de la PCR1, la quantité d'ADN extrait peut être augmentée à 8 µl et jusqu'à 10 µl pour les échantillons présentant des charges virales faibles (inférieure à 3 log UI/ml) et très faibles (inférieure à 2 log UI/ml).

Après la PCR1, pour des échantillons de charges virales supérieures à 7 log UI/ml, si après migration sur gel d'agarose 1,5 %, une bande est visible à environ 900 pb, il n'est pas nécessaire d'amplifier par PCR semi-nichée le produit de PCR1 avant la PCR de séquençage.

Lors de la PCR2 pour les échantillons dont la charge virale était forte les produits de PCR1 ont été dilués au 1/5 ou 1/10 afin de lever une éventuelle inhibition de la PCR et/ou de limiter la présence de bandes aspécifiques visibles sur le gel d'électrophorèse.

Programme d'amplification de la PCR1 :

98°C ; 5 minutes (dénaturation initiale)	1 cycle
98°C ; 30 secondes (dénaturation)	35 cycles
61°C ; 30 secondes (hybridation)	
72°C ; 30 secondes (élongation)	
72°C ; 7 minutes (élongation finale)	1 cycle

Programme d'amplification de la PCR2 :

98°C ; 5 minutes (dénaturation initiale)	1 cycle
98°C ; 30 secondes (dénaturation)	35 cycles
62°C ; 30 secondes (hybridation)	
72°C ; 30 secondes (élongation)	
72°C ; 7 minutes (élongation finale)	1 cycle

1.2.1.4. Migration sur gel d'agarose

Les produits de PCR2 ont été soumis à une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1,5% additionné de GelRed™, agent intercalant de l'ADN. La migration permet de visualiser la présence des amplicons attendus sous UV grâce à la présence d'un marqueur de taille « 100 pb DNA Ladder » (Invitrogen™). Par puits, 5 µl ont été déposés : 4 µl de produit amplifié et 1 µl d'agent alourdisseur. La migration s'est effectuée pendant 30 minutes à 100 Volts. Les bandes d'intérêt devant être observées pour chaque échantillon testé sont : une bande à 337 pb (PCR2a, gène S), une bande à 659 pb (PCR2b, gène S) et une bande à environ 600 pb (PCR2, région préS). Les produits de PCR2 ont ensuite été purifiés à l'aide de la trousse Qiaquick PCR Purification (Qiagen®), selon les recommandations du fabricant.

1.2.1.5. PCR de séquençage et purification

Les réactions de séquençage ont été réalisées à l'aide de la trousse BigDye Terminator V1.1 (Life Technologies®) en utilisant comme matrice les produits de PCR2 purifiés. Les produits de réaction ont été purifiés à l'aide de la trousse Dye EX® 2.0 Spin kit (Qiagen®), selon les recommandations du fabricant puis injectés dans un séquenceur à capillaires Séquenceur ABI 3100 (Applied Biosystems®).

Mélange réactionnel pour un échantillon :

Matrice (produit de PCR2 purifié) : 3 µl
BigDye terminator: 2 µl
BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer: 1 µl
Amorce sens ou antisens 1µM: 3,2 µl
Eau DNAse-free : qsp 15 µl

Remarque :
Pour les échantillons présentant une charge virale inférieure à 3 log UI/ml, la quantité de matrice peut être ajustée à 6 µl.

Programme de la PCR de séquençage:

96°C ; 10 secondes (dénaturation)	25 cycles
50°C ; 5 secondes (hybridation)	
60°C ; 4 minutes (élongation)	

1.2.2. Analyse des séquences par bioinformatique

- Nettoyage des séquences

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été correctement « raboutées » grâce au logiciel informatique ChromasPro (version 1.41) puis corrigées par vérification visuelle de l'aspect des electrophorégrammes. Pour chacune des deux régions préS et S, une séquence « synthèse » des brins sens et anti-sens a été établie. Les séquences ont ensuite été alignées avec des séquences consensus (génotype A et génotype D) en utilisant le logiciel MEGA (Molecular, Evolutionary Genetics Analysis) version 5.2, selon l'algorithme CLUSTAL W et traduites en acides aminés. Les séquences consensus de génotype A et de génotype D correspondant d'une part à la région préS et d'autre part au gène S ont été réalisées à l'aide de la base de données HBVdb release 24.0 (mise à jour le 01/10/2015) (Lyon, http://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/) (Hayer J. *et al.*, 2013) (tableau 11, annexe 1 et annexe 2). Les séquences des patients ont été classées en fonction de la réponse au traitement.

Les analyses bioinformatiques des séquences des patients resolvers et non resolvers recherchent des positions mutées, des « signatures moléculaires » et prédisent des conformations et des profils antigéniques. Les profils obtenus ont été étudiés pour leur corrélation avec l'obtention de la clairance de l'antigène HBs.

	Génotype A	Génotype D
LHBs	1235 séquences (acides aminés)	1153 séquences (acides aminés)
SHBs	2563 séquences (acides aminés)	3395 séquences (acides aminés)

Tableau 11 : Nombre de séquences utilisées pour établir les séquences consensus d'après l' HBVdb release 24.0 (mise à jour le 01/10/2015) (Lyon, http://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/) (Hayer J. *et al.*, 2013).

❖ Construction d'arbres phylogénétiques :

Des arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide du logiciel MEGA version 5.2 selon la méthode du plus proche voisin (ou Neighbor-Joining), appropriée pour les séquences présentant une forte similarité. La matrice des distances de Kimura, utilisée pour estimer les distances génétiques des quasi-espèces virales, a été utilisée comme base de l'analyse phylogénétique. L'analyse a été conduite sur les séquences acides nucléiques codant le gène S du variant majoritaire retrouvé chez chacun des patients.

❖ Calcul de pression de sélection :

La pression de sélection a été évaluée (régions préS et S) en utilisant la méthode de Nei-Gojobori et la correction Jukes-Cantor, à l'aide du logiciel MEGA version 5.2.

❖ Évaluation de l'antigénicité prédite par bio-informatique

L'antigénicité prédite des séquences protéiques obtenues a été évaluée à l'aide du logiciel Antheprot (2000v 6.0) (Deléage *et al*., 2001). Ce logiciel est basé sur le principe développé par Parker *et al.* (Parker *et al*., 1986). La prédiction d'antigénicité se fait selon trois paramètres qui sont l'hydrophilie, définie par le temps de rétention en chromatographie haute performance en milieu liquide (HPLC), la flexibilité atomique des acides aminés et leur accessibilité. Après soumission de la séquence consensus en acide aminé au logiciel, celui-ci élabore un graphique indiquant en abscisse la position des acides aminés dans la séquence protéique et en ordonnée l'évaluation de l'antigénicité en unité arbitraire (figure 36).

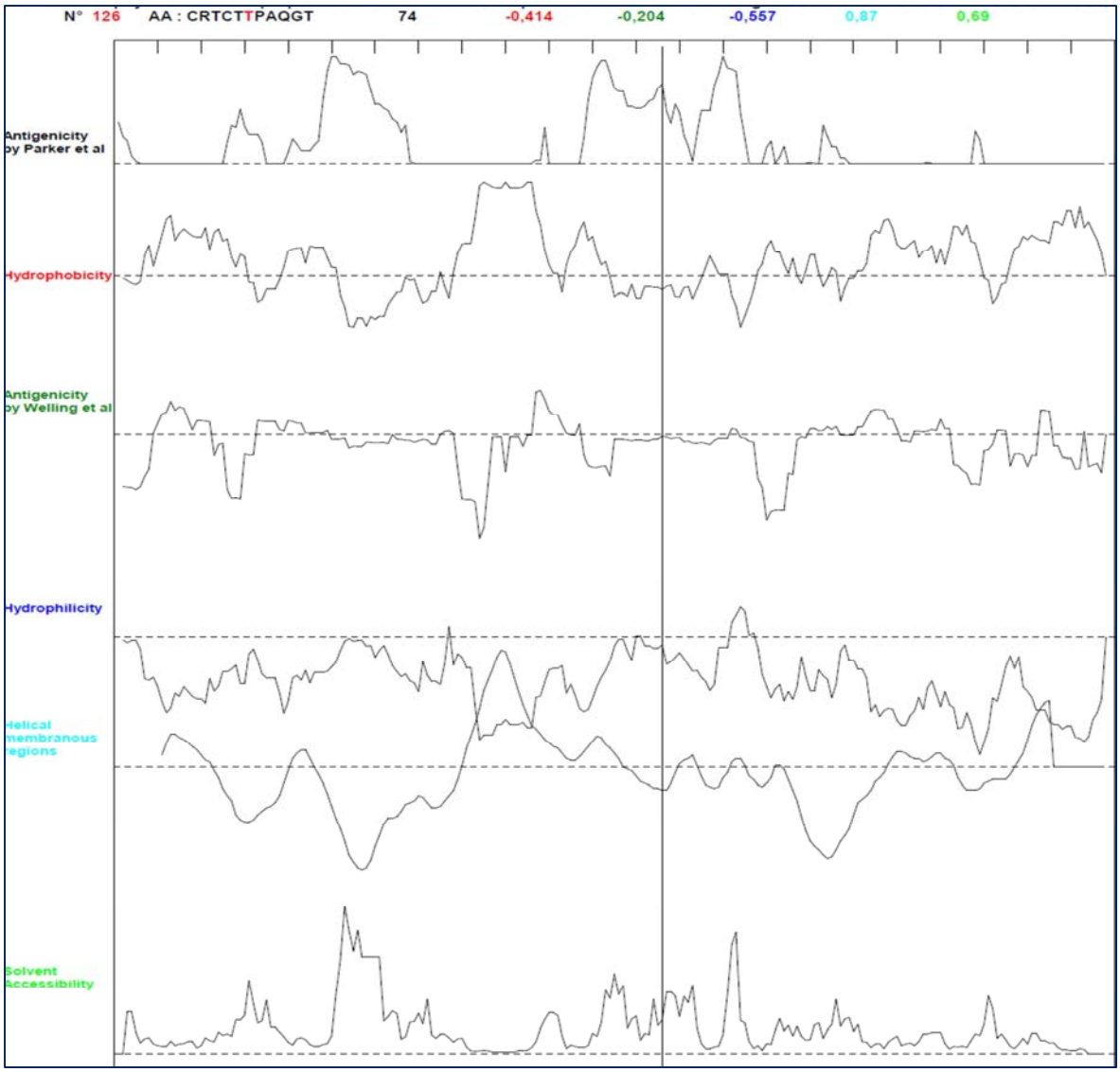


Figure 36 : Représentation graphiques de paramètres physico-chimiques évalués sur le Logiciel Antheprot.

Antigénicité prédite selon la méthode de Parker (noir), hydrophobie (rouge), antigénicité prédite selon la méthode de Welling (vert), hydrophilie (bleu foncé), domaines transmembranaires en hélice α (bleu clair), accessibilité (vert clair). La séquence protéique est indiquée en abscisse (cursus positionné sur la position explorée).

1.3. Ultra-Deep Sequencing (UDS)

Le séquençage haut débit ou Ultra-Deep Sequencing (UDS) a été réalisé à partir d'ADN génomique viral extrait des échantillons sériques selon le protocole décrit dans le paragraphe « Extraction automatisée de l'ADN viral ». L'UDS a été réalisé à l'aide du séquenceur Ion Personal Genome Machine (PGM) (Life Technologies ^{TM}). Le principe de cette technique

repose sur la détection des ions H^+ libérés lors de la fixation d'une base nucléotidique. Afin de travailler avec une quantité de matrice suffisante, les fragments correspondant aux régions préS et S ont préalablement été amplifiés.

1.3.1. Amplification du génome viral

❖ Amplification du gène S

Pour l'amplification du gène S les amorces sens et antisens requises, la composition du mélange réactionnel et le programme d'amplification sont ceux utilisées lors de la PCR1 du séquençage direct. La qualité de l'amplification a été vérifiée par migration des produits de PCR sur gel d'agarose 1,5%. Si aucune bande à la taille attendue n'est visible sur le gel, mettant en doute la quantité d'amplicon obtenue, la PCR1 peut être répétée. Les PCR2a et 2b ne sont ici pas utilisées car elles génèrent des fragments trop courts pour assurer une fragmentation à 200 pb.

❖ Amplification de la région préS (gènes préS1 et préS2)

Les amorces sens et antisens utilisées, la composition des mélanges réactionnels et les programmes d'amplification sont ceux utilisés lors de la PCR1 et de la PCR2 du séquençage direct. La qualité de l'amplification est vérifiée par migration des produits de PCR sur gel d'agarose 1,5 %.

❖ Purification des produits de PCR sur gel:

Les produits de PCR ont été soumis à une migration electrophorétique sur gel d'agarose 1,5% pendant 30 à 40 minutes sous 100 Volts et les bandes d'intérêt (taille voulue) ont été découpées sous UV. La purification des fragments de gel découpés a été réalisée à l'aide de la trousse QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen®).

❖ Contrôle de la qualité des échantillons :

La qualité des échantillons amplifiés et purifiés a été évaluée par dosage d'1 µl d'amplicon sur le fluorimètre QuBIT®2.0 à l'aide de la trousse Qubit® dsDNA HS (high sensitivity) assay kit (Life technologies) selon les recommandations du fabricant.

Remarques :

Lorsque la quantité d'ADN amplifié était insuffisante (inférieure à 100 ng) la PCR1 était à nouveau réalisée (gène S ou région préS) sur le produit de la purification sur gel selon le protocole détaillé précédemment. La qualité de l'amplification était vérifiée sur gel d'agarose et si une bande unique était observée, une purification sur colonne (QIAquick PCR Purification Kit) était réalisée avant de doser à nouveau l'échantillon au QuBIT 2.0.

La constitution d'une librairie a ensuite été réalisée en fixant des adaptateurs spécifiques aux molécules d'ADN simple brin générées par amplification.

1.3.2. Préparation de la librairie

Pour la préparation de la librairie la trousse Ion Xpress ^{TM} Plus Fragment Library kit (Life Technologies) contenant les trousses Ion Shear^{TM} Plus et Ion Plus Fragment Library, ainsi que la trousse Ion Xpress^{TM} Barcode Adaptaters (Life Technologies) ont été utilisées. Cette étape comprend : la fragmentation des amplicons, l'obtention d'extrémités franches, la ligation aux adaptateurs barcodés compatibles Ion Torrent et le « *nick repair* », la sélection des tailles de fragments optimales et l'amplification finale de la librairie (étape optionnelle).

- Fragmentation avec le kit «Ion ShearTM Plus »

Dans un tube (sur glace), 100 ng d'amplicon ont été ajoutés aux réactifs selon le mélange réactionnel suivant :

Réactif	**Volume**
100 ng d'amplicon	x µl
Ion Shear^{TM} Plus 10X Reaction buffer	5 µl
Eau nuclease-free	35 - x µl
Total	40 µl

Puis, 10 µl d'Ion Shear^{TM} Plus Enzyme mix II ont été ajoutés au mélange réactionnel (volume final de 50 µl), l'ensemble a été incubé à 37°C selon le temps indiqué ci-dessous (tableau 12) :

Taille moyenne de fragment	Temps de réaction
Gène S	6 min
Région préS (gènes préS1 et préS2)	5 min

Tableau 12 : Temps de fragmentation en fonction de la région génomique.

A l'issue du temps d'incubation, 5 µl de l'Ion Shear™ Stop Buffer ont été immédiatement ajoutés au mélange.

- Purification de l'ADN fragmenté

La trousse Agencourt® AMPure® XP (Life Technologies) sert à purifier les produits de PCR au moyen de billes magnétiques, utilisant la technique d'Immobilisation Réversible en Phase Solide (SPRI). Le réactif, après remise en suspension des billes magnétiques a été ajouté à l'ADN fragmenté (1,8 fois le volume de l'échantillon). Le mélange a ensuite été placé sur un portoir magnétique le DynaMag™ -2 (Life Technologies) pendant 3 minutes ou jusqu'à ce que la solution soit limpide, le surnageant a été éliminé doucement. Après deux lavages à l'éthanol 70 % (fraichement préparé), l'ADN purifié a été élué dans du tampon Low TE. L'éluât a été recueilli après fixation des billes sur le portoir magnétique.

- Ligation des adaptateurs barcodés

La ligation des adaptateurs barcodés a été réalisée après ajout des réactifs selon le mélange réactionnel et le programme suivants :

<u>Mélange réactionnel pour un échantillon :</u>

Matrice (amplicon d'ADN fragmenté et purifié) : 25 µl
10X ligase buffer : 10 µl
Ion P1 adapter : 2 µl
Ion Xpress™ Barcode X : 2 µl
dNTP Mix : 2 µl
DNA ligase : 2 µl
Nick Repair Polymerase: 8 µl
Eau nuclease-free qsp 100 µl

Programme de la ligation :

25°C ; 15 minutes	1 cycle
72°C ; 5 minutes	
4°C ; ∞	

❖ Purification de l'ADN avec les adaptateurs

Après ligation des adaptateurs, l'ADN a été purifié comme décrit précédemment à l'aide de la trousse Agencourt® AMPure® XP (Life Technologies) et du portoir magnétique DynaMag™ -2 (Life Technologies). Après remise en suspension des billes magnétiques le volume de réactif utilisé pour une librairie constituée d'amplicons barre-codés de 200 bases était de : 140 µl (soit 1,4 fois le volume de l'échantillon). Après deux lavages successifs à l'éthanol à 70 %, l'ADN est élué puis transféré dans un tube Lo-Bind de 0,2 ml.

❖ Sélection des tailles

Les amplicons barcodés ont été sélectionnés selon leur taille en utilisant une migration électrophorétique sur gel d'agarose 2 % E-Gel® SizeSelect™ Agarose gels selon les recommandations du fabricant *(E-Gel® Technical Guide and E-Gel® SizeSelect™ Agarose Gels Quick Reference*) (tableau 13).

Longueur de « read »	**Taille moyenne de l'insert**	**Taille moyenne de la librairie (avec adaptateur)**
200 bases	260 pb (200-300 pb)	330 pb

Tableau 13 : Tailles optimales des fragments sélectionnés pour l'analyse.

❖ Amplification de la librairie

La librairie a été amplifiée selon le mélange réactionnel et le programme indiqués ci-dessous.

Réactifs	Volume
SuperMix PCR Platinium haute-fidélité	100 µl
Mix d'amorces d'amplification de la libraire	5 µl
Librairie non amplifiée	25 µl
Total	130 µl

Programme d'amplification :

95°C ; 5 min (Dénaturation)	1 cycle
95°C ; 15 secondes (Dénaturation)	8 cycles
58°C ; 15 secondes (Hybridation)	
70°C ; 1 minute (Elongation)	

- Purification de la librairie

La purification de la librairie a été réalisée à l'aide de la trousse Agencourt® AMPure® XP (Life Technologies) et du portoir magnétique DynaMag^{TM} -2 (Life Technologies). Cette étape permet d'éliminer les nucléotides libres et les éventuels dimères d'amorces formés lors de la PCR. Après remise en suspension des billes magnétiques le volume de réactif utilisé était de : 195 µl (soit 1,5 fois le volume de l'échantillon).

- Mélange de la librairie

Les amplicons ont été quantifiés sur le fluorimètre QuBIT®2.0 à l'aide de la trousse Qubit® dsDNA HS (high sensitivity) assay kit (Life technologies) selon les recommandations du fabricant, à partir de 3 µL d'ADN.

Un mélange équimolaire de la librairie de chaque patient a ensuite été préparé pour arriver à une concentration finale de 16 pM soit 2,4 pg/µL.

1.3.3. Amplification clonale des fragments d'ADN

L'amplification clonale des fragments d'ADN sur des billes (ISP)a été réalisée par PCR en émulsion sur l'appareil Ion OneTouch (Life Technologies), en utilisant la trousse Ion OneTouch 200 Template kit v2, selon les recommandations du fournisseur.

Le contrôle de qualité des ISP non enrichies est réalisée à l'aide du kit « Ion Sphere Quality Control » sur le fluorimètre QuBIT®2.0. Le calcul du rapport entre les valeurs des

fluorochromes AF488 et AF467 (après déduction du bruit de fond) permet de déterminer le pourcentage d'ISPs positives. Celui-ci doit idéalement se situer entre 10 et 30%.

1.3.4. Enrichissement

L'enrichissement correspond à la sélection des billes dites positives, c'est-à-dire au niveau desquelles l'amplification a été de qualité suffisante. Cette étape a été réalisée à l'aide de l'appareil Ion OneTouch Enrichment System (Life Technologies).

1.3.5. Réaction de séquençage

Les billes positives ont ensuite été chargées sur la puce 314 (10 MegaBases). La réaction de séquençage a été réalisée grâce à la trousse Ion PGM 200 Sequencing kit v.2 sur le séquenceur PGM. Les résultats bruts ont été analysés sur le logiciel NextGEne V2.34.

1.3.6. Analyse des résultats bruts sur le logiciel NextGEne V2.34

Les séquences de chaque « read » ont été alignées sur la séquence de génotype D (AY161150) à l'aide du logiciel NextGEne, en utilisant les paramètres par défaut pour une analyse par position nucléotidique ; La sensibilité a été fixée à 2 % pour une position nucléotidique et 5 % pour une insertion/délétion. La fréquence de chaque mutation a été calculée comme le nombre de « reads » montrant une mutation par rapport au nombre total de « reads ». Le seuil défini pour la fréquence de mutation a été fixée à 2,5 % avec une correction visuelle des séquences pour insertion et délétion. Ce seuil a été défini par l'analyse en triplicate des souches infectant un patient. Le logiciel fournit une séquence de synthèse bâtie sur l'ensemble des « reads » obtenus. Cette séquence est alignée avec la séquence consensus construite d'après l'HBVdb sur les régions préS et S et avec la séquence obtenue par séquençage direct. Le détail de chaque position ayant montré une variation nucléotidique a été examiné en tenant compte de la fréquence de la variation sur le nombre de « reads ».

2. Résultats

2.1. Constitution de la cohorte

Seize patients ont été inclus dans cette étude :

- Quatre patients infectés par du VHB de génotype A, deux resolvers (R) et deux non resolvers (NR)
- 12 patients infectés par du VHB de génotype D, six R et six NR.

Les patients ont été appariés selon l'âge (+/- 5 ans) et le sexe selon la répartition figurant dans le tableau 14 (tableau 14). En revanche, il n'a pas été possible d'apparier les patients resolvers et non resolvers selon leur statut Ag HBe. L'âge moyen était de 60 ans (47,69 ; 72,31) tous génotypes confondus.

	Génotype D												**Génotype A**			
	R1	**NR1**	**R2**	**NR2**	**R3**	**NR3**	**R4**	**NR4**	**R5**	**NR5**	**R6**	**NR6**	**R1A**	**NR1A**	**R2A**	**NR2A**
Sexe	F	F	M	M	M	M	M	M	M	M	F	F	M	M	M	M
Age (ans)	40	39	47	46	77	77	69	70	51	54	62	64	65	62	68	69

Tableau 14 : Appariement des patients selon l'âge, le sexe et le génotype viral.
(R : resolver ; NR : non resolver ; F : Féminin ; M : Masculin)

Chacun des patients inclus a été traité par NUCs selon parfois un à trois protocoles thérapeutiques successifs incluant de la LMV, du TNF, de l'ETV ou de l'ADV en monothérapie ou en combinaison (exemple : ETV + TNF, LMV + ADV, ou ETV + ADV).
Trois patients (génotype A : un NR ; génotype D : un R et un NR) ont reçu de l'IFN avant le traitement par NUCs.
Les caractéristiques clinico-biologiques des patients sont présentées dans les tableaux 15 et 16.
Le sous type viral a été obtenu pour chacun des patients après alignement de la séquence nucléique du variant majoritaire codant la protéine S. Un arbre phylogénétique a été construit à partir de ces mêmes séquences (figure 37).

	Paire 1		Paire 2		Paire 3		Paire 4		Paire 5		Paire 6	
	R1	NR1	R2	NR2	R3	NR3	R4	NR4	R5	NR5	R6	NR6
Origine géographique	Turquie	Turquie	Turquie	Maroc	France	France	Italie	Espagne	France	France	Turquie	France
Sous type Virale	D1	D1	D2	D3	D3	D3	D2	D3	D3	D2	D1	D3
CV * (Log $_{10}$ IU/ml)	>3.44	4.94	6.23	5.15	5.16	3.90	7.60	4.42	2.33	4.25	3.3	4.04
Statut Ag HBe initial	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg
Statut Ac anti HBe initial	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos
Traitement antiviral (années)	LMV (1.6)	LMV (0.5) TDF (6)	LMV (3) ADV (5.75) TDF (2.75)	***IFN*** ***(0.5)*** LMV (1.83) LMV +ADV (7)	ADV (10)	LMV (1.33) ADV (4.5) ADV +ETV (7)	LMV (10)	LMV (1.83) LMV +ADV (0.16) ADV (10)	***IFN*** ***(0.5)*** LMV (2.16) ADV (1.83) ADV +ETV (6.5)	ETV +TDF (5)	ETV (5)	LMV (2) ADV (10)
Consommation d'alcool	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Score de fibrose	F0/F1	F0	F1/F2	F1	F1/F2	F3	F0	F4	F1	F0	F4	F0
Diabète	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non
Dyslipidémie	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	No	Oui	Oui	Oui	Oui
Immunosuppression	Non	Non	Non	Oui#	Non	Non	Oui#	Non	Non	Oui#	Non	Non
Réactivation	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non

Tableau 15 : Données clinico-biologiques des patients infectés par du VHB génotype D

	Paire 1		Paire 2	
	R1A	NR1A	R2A	NR2A
Origine géographique	France	Algérie	France	France
Sous type Virale	A2	A2	A2	A2
CV * (Log $_{10}$ IU/ml)	6,6	> 5,3	>8	2,94
Statut Ag HBe initial	Neg	Neg (mutant préC/C)	Pos	Pos
Statut Ac anti HBe initial	Pos	Pos	Neg	Neg
Traitement antiviral (années)	LMV (7)	LMV (1,3) ADV (4) ADV+ ETV (>5)	LMV (depuis 2000 ?)	*IFN (0.5)* LMV (4) ADV (3) ADV + ETV (5,5) TNF + ETV (>3)
Consommation d'alcool	Non	Non	Non	Non
Score de fibrose	n.d.	F3	n.d.	F1
Diabète	Non	Non	Oui	Non
Dyslipidémie	Non	Non	Non	Non
Immunosuppression	Oui#	Non	Non	Non
Réactivation	Oui	Non	Non	Non

Tableau 16 : Données clinico-biologiques des patients infectés par du VHB génotype A

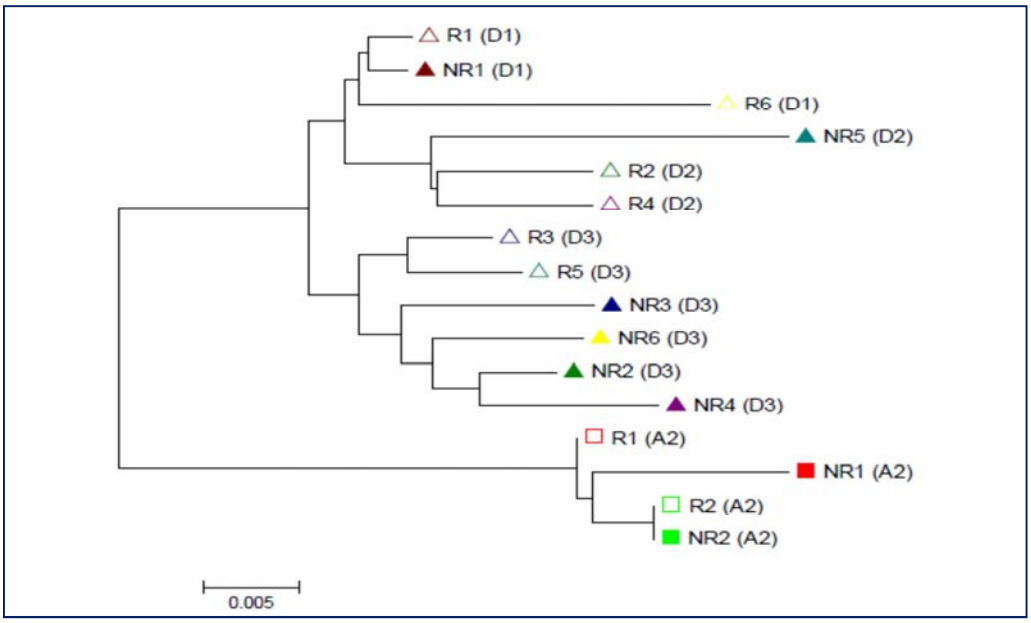


Figure 37 : Arbre phylogénétique regroupant les séquences (gène S) des variants majoritaires isolés chez les patients de l'étude.

( ): génotype, Δ: Patient resolver infecté par du VHB de génotype D, ▲: Patient non resolver infecté par du VHB de génotype D

□: Patient resolver infecté par du VHB de génotype A, ■: Non resolver infécté par du VHB de génotype A

2.2. Résultats du séquençage direct

Les séquences aa du variant majoritaire retrouvé chez les resolvers et les non resolvers sont présentées dans les annexes 3 et 4. Les séquences aa de chaque groupe de patients pour chacun des deux génotypes ont été alignées avec les séquences aa consensus construites à partir de l'HBVdb.

2.2.1. Variabilité intragroupe et intra-génotypique

Les variations aa observées par rapport aux séquences consensus aa de génotype A et D sont rapportées dans le tableau 17 (tableau 17). La numérotation de la région préS pour le génotype A tient compte du décalage de 11 aa (les 11 premiers aa sont numérotés négativement).

		Région préS		Gène S	
		Taux de variabilité	Variations avec un impact sur des positions d'intérêt*	Taux de variabilité	Variations avec un impact sur des positions d'intérêt*
Génotype D	R	12/163 (7,36 %)	**préS2** : preS R124K, R126K, S315F, P149H	22/226 (9,7%)	**MHR** : sT118A, sP127T, sY134F, sP142R **Déterminant « a »** : sP127T, sY134F, sP142R **TM4** : sS204R/N, sY206C, sS207R/N, sF220C, sC221Y, sY225S
	NR	12/163 (7,36 %)	**préS1 :** preS Q93K	23/226 (10,17 %)	**MHR** : sG112L, sS113N, sT118A, sT125M, sP127T, sS136Y **Déterminant « a »** : sT125M, sP127T, sS136Y **TM4** : sP203R, sS204N, sY206F, sS210R
Génotype A	R	12/174 (4,02%)	**préS1 :** preS A43T, V77M, S78P, I80S, P92R **préS2:** preS R124K, R156T, D159G	22/226 (9,7 %)	**TM4** :sS206Y, sS210R
	NR	4/174 (2,3 %)	/	11/226 (4,87 %)	**MHR** : sY100C, sY161F

Tableau 17 : Variabilité intragroupe observée pour chacun des génotypes étudiés.

Variations avec un impact sur des positions d'intérêt* : changement d'acide aminé ayant un impact sur les propriétés physico-chimiques et/ou fonctionnelles au niveau de positions correspondant à des zones fonctionnelles des glycoprotéines d'enveloppe.

Au niveau de la région préS, le variant majoritaire de génotype D retrouvé chez le resolver R3 présentait une délétion de 7 aa (124-130). Des délétions ont également été retrouvées chez le patient NR3 en préS et chez le patient NR5 dans la région S. L'évaluation de la pression de sélection (calculs des ratios dN/dS) par la méthode Nei-Gojobori en utilisant la correction de Jukes–Cantor (MEGA 5.2 software) n'a pas mis en évidence de pression de sélection. Les calculs sont présentés en annexe 5.

2.2.2. Comparaison des séquences aa entre groupes R et NR

2.2.2.1. Génotype D

Les séquences des variants majoritaires retrouvés chez les patients ont été comparées par groupes (NR *versus* R) et par paire de patients (tableau 18). La comparaison entre les deux groupes a révélé la présence de deux signatures moléculaires localisées au niveau du déterminant « a » de la MHR : sT125M et sP127T. Contrairement à la mutation sP127T, sT125M n'était détectée que chez les patients NR (4/6 des NR). La mutation sP127T était présente chez 2/6 patients resolver. La combinaison sT125M+sP127T était associée à la persistance de l'Ag HBs sous traitement par NUCs (p=0,02).

Parmi les 3395 séquences aa SHBs de génotype D recensées dans l'HBVdb (r24), la fréquence de la mutation sT125M était de 8,7 % (293/3395), presque toujours associée avec sP127T (96%) comme chez nos patients. La fréquence de sT125M dans la base de données pour les autres génotypes était extrêmement faible (< 1 % pour les génotypes A, B et C). La mutation sP127T était observée dans 30,6 % des séquences disponibles de génotype D. Elle était rare parmi les séquences des génotypes B (1,7 %), A et C (< 1 %).

La mutation sT125M n'a pas d'impact sur le cadre de lecture RT contrairement à la mutation sP127T qui correspond alors à la mutation rtS135Y. Cependant chez les patients porteurs de la mutation sP127T les mutations suivantes ont été retrouvées dans le cadre de lecture RT : rtS135Y, rtS135N et rtS135H.

En comparant les séquences par paire de patients avec la séquence consensus, d'autres changements d'aa pouvaient être observés (tableau 18). Parmi ceux-ci trois, plus fréquemment retrouvés, étaient localisés au niveau du domaine transmembranaire TM4 (204, 206, 207).

Certaines des variations d'aa observées semblaient plus fréquentes chez les patients resolver (Q30K, T118A et Y206C) ou chez les non resolvers (S193L).

Aucune signature moléculaire n'a été observée au niveau de la région préS.

	TM1 [4-24]	CYL-1 [25-79]	TM2 [80-100]	MHR			TM3 [173-193]	CYL-2 [194-201]	TM4 [202-222]
					A determinant [124-147]				
R1	/								
NR1									
R2	/	Q30K	/	T118A	P127T, Y134F	/	L175S	/	S207N
NR2		/		/	T125M, P127T	E164D	/	I195M	/
R3	/	N40S	/	/	/	/	/	/	S204R, Y206C,
NR3		/			T125M, P127T	G159V	L173F, S193L		Y206F, L213I
R4	G10R	/	/	T118A	P127T	P142R	L176P, P178Q	/	F220C
NR4	F8L	Q30K, N40S		/	T125M, P127T	/	/	W196L	/
R5	/	Q30K,	/	I110L	/	/	L173F	/	/
NR5		T45N		G112L, S113N, T118A	P127T, S136Y		S193L		S204N, S210R
R6	/	G44E	I92T	/	/	W172C	L175S	/	S204N, Y206C, S207R, C221Y, Y225S
NR6		/	/		T125M, P127T	G159A	S175L	/	F220L

Tableau 18 : Comparaison des séquences aa par paire de patient, génotype D, gène S.

2.2.2.2. Génotype A

Aucune signature moléculaire n'a pu être observée chez les patients infectés par du VHB de génotype A, ni dans la région préS, ni dans le gène S. En cohérence avec la représentativité de la combinaison sT125M et sP127T parmi les séquences de génotype A de l'HBVdb, ces deux mutations n'étaient pas retrouvées.

Les variations d'aa observées pour le génotype A lors de la comparaison par paire de patient sont représentées dans le tableau 19. La mutation G145R, mutation d'échappement à la vaccination, était retrouvée chez le patient R1A. L'analyse de la séquence de ce patient a par ailleurs révélé la présence de nombreuses bases dégénérées probablement liées à la circulation de plusieurs variants viraux différents. Chez le variant majoritaire isolé du patient R2A une ambiguïté sur une base dans la région TM3 pouvait conduire à l'apparition d'un codon stop en position 182.

	TM1 [4-24]	CYL-1 [25-79]	TM2 [80-100]	MHR			TM3 [173-193]	CYL-2 [194-201]	TM4 [202-222]
				[101-123]	A determinant [124-147]	[148-172]			
R1A	G18V, F19Y	S34L, N40S, L42P, G43E, , P67Q ,	/	T118M/K/V/E	G145R	F158S, S167L, V168A	A184V	W199L	S204G, Y206S, S207N, S210R
NR1A	V14A,	N40S, S45A, I68N, C76Y, R79H	Y100C	/	/	Y161F,	S193L	/	P217L
R2A	/	/	/	/	/	/	W182w/*	/	/
NR2A							/		

Tableau 19 : Comparaison des séquences aa par paire de patient, génotype A, gène S.

Des variations d'aa ont été observées au niveau de positions décrites précédemment pour les séquences de génotype D : en 193, 204 et 207. Le faible nombre de séquences disponibles de génotype A limite l'analyse comparative.

Remarque 1 :

Le taux de mutation dans la région préS quel que soit le génotype (A ou D) semble plus faible que dans la région S. Les principales variations étaient situées en C ter de préS1 ou dans préS2.

Remarque 2 :

Les signatures moléculaires identifiées sT125M et sP127T ont été confrontées aux données disponibles pour d'autres cohortes de patients infectés chroniques :

-non traités par NUCs (Datta *et al.*, 2014) : sT125M (50 %), sP127T (54,4 %)

-ou naïfs de traitement par NUCs (Ismaïl *et al.*, 2014) : sT125M (13,1 %), sP127T (76,3 %) et sT118V (59,2 %).

2.2.3. Analyse de covariance

Une recherche de “réseaux de covariance” d’aa a été réalisée par le Dr John Murray, bio-informaticien à partir des séquences de génotype D. Cette analyse n’a pas été réalisée pour les quatre patients infectés par du VHB de génotype A. En utilisant une valeur seuil de covariance de 0,145, 20 paires d’aa covariants ont été définies au niveau de la région préS (figure 38a) et 40 au niveau de la région S (figure 38b). En s’attachant uniquement aux paires permettant de distinguer les patients R, des patients NR, certaines combinaisons sont ressorties chez les patients NR2, NR3, NR4 et NR6, toutes incluant les signatures précédemment décrites (figure 38c).

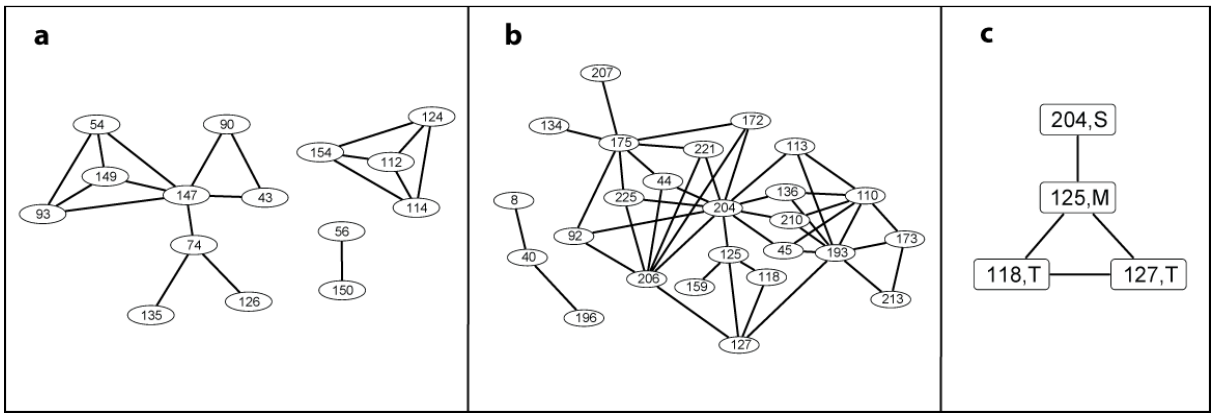


Figure 38 : Réseaux de covariance d’acides aminés identifiés.

Figure 38a : Réseau de covariance d’acides aminés identifié d’après les séquences acides aminés correspondant à la région préS.

Figure 38b : Réseau de covariance d’acides aminés identifié d’après les séquences acides aminés correspondant au gène S.

Figure 38c : Réseau de covariance « minimum » identifié au niveau du gène S, permettant de distinguer les patients resolvers des patients non resolvers.

2.2.4. Prédiction de l’antigénicité

Comme expliqué dans la partie matériel et méthode de ce premier volet de l’étude, les séquences aa de chaque patient ont été analysées à l’aide du logiciel Antheprot. En comparant les profils obtenus pour les séquences isolées chez les patients NR et les patients R, les

séquences des patients NR portant la mutation sT125M montraient un pic d'antigénicité plus faible que sur les profils d'antigénicité des patients R appariés (4/6 paire de patients). La combinaison sT125M et sP127T a ensuite été introduite dans la séquence consensus de génotype D (figure 39). La présence de cette combinaison affectait de manière similaire l'antigénicité prédite.

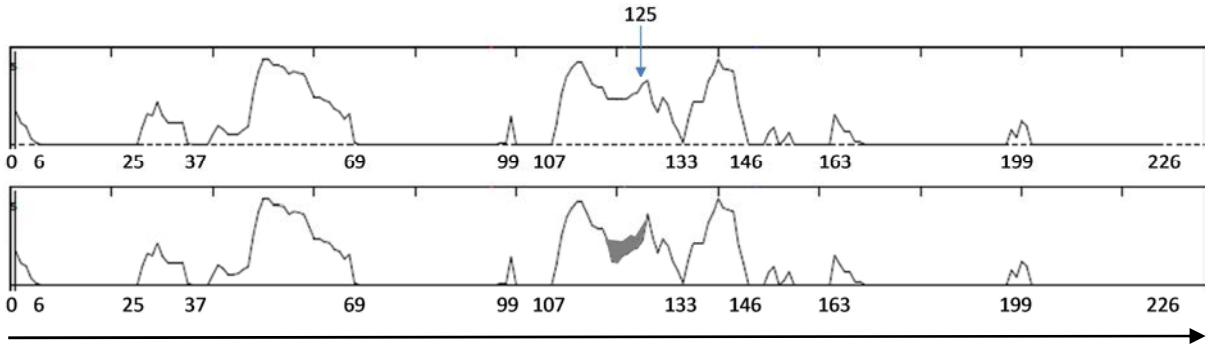


Figure 39 : Profils d'antigénicité prédite obtenus à partir de la séquence consensus de génotype D.

Le graphique du haut correspond au profil d'antigénicité prédite de la séquence consensus de génotype D construite d'après l'HBVdb (Lyon, http://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb:) (Hayer *et al.*, 2013). La flèche bleue indique le pic d'antigénicité mesuré à la position 125. Le graphique du bas correspond au profil d'antigénicité de la séquence consensus de génotype D après introduction des signatures moléculaires sT125M et sP127T. Une zone grise apparait à la supperposition des deux profils (graphique du bas), témoignant de la baisse d'antigénicité liée à l'introduction des deux signatures.

Les profils des variants majoritaires isolés chez les quatre patients de génotype A sont présentés dans la figure 40. La mutation T118V qui est retrouvée chez le patient R1A, située dans la MHR entraine une légère baisse du pic d'antigénicité. Les mutations S45A et Y161F retrouvées chez le patient NR1A conduisent à la disparition de certains pics. Les profils des patients R2a et NR2a sont identiques sauf dans le cas où le variant majoritaire retrouvé chez le patient R2a arborerait un codon stop en 182.

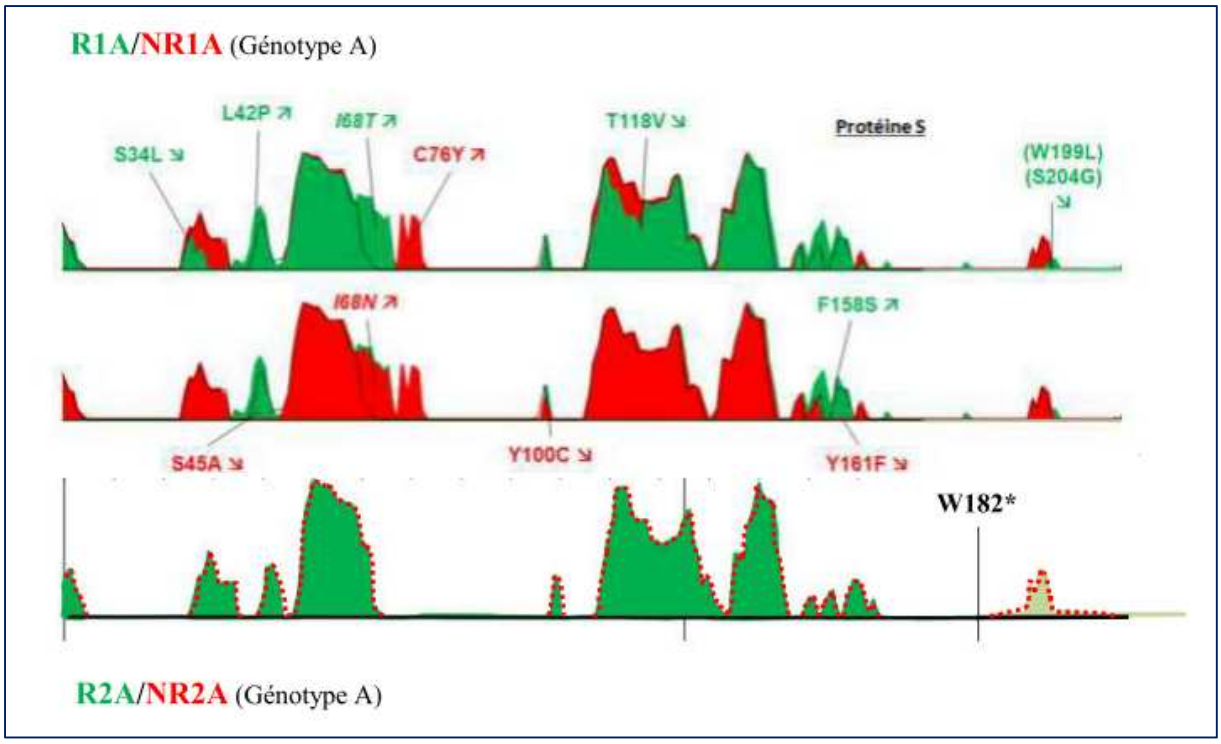


Figure 40 : Profils Antheprot des variants majoritaires isolés chez les patients infectés par du VHB génotype A.

2.3. Ultra-Deep sequencing

Les analyses UDS ont été menées chez les patients infectés par du VHB de génotype D. Les quatre patients infectés par du VHB de génotype A n'ont pas encore été explorés à ce jour.

2.3.1. Performances analytiques obtenues

Les performances obtenues par l'analyse UDS étaient les suivantes :

- Une profondeur de 60 075 à 134 940 lectures par échantillon pour le gène S et de 42 048 à 133 136 lectures par échantillon pour la région préS. La couverture moyenne était de 20 219 lectures par nucléotide.
- Une longueur de fragment allant de 175 à 214 pb

2.3.2. Analyses des variants identifies en UDS

Les séquences obtenues en UDS ont été comparées à celles des variants majoritaires obtenues en séquençage direct, afin de mettre en évidence de potentiels variants mineurs. Un variant minoritaire (14 %) porteur de sT125T a ainsi été observé chez le patient NR4 portant majoritairement la mutation sT125M.

D’autres variations d’aa ont également été relevées au niveau du gène S : 28 chez les patients R et 56 chez les patients NR. Parmi les 43 changements uniquement retrouvés chez les patients NR, 20 (46,5 %) étaient localisés au niveau de la MHR et 9 au niveau du déterminant « a ». Chez les patients R, trois changements d’aa étaient survenus au niveau de la MHR et aucun situé au niveau du déterminant « a ».

Au niveau de la région préS, 13 et 5 changements d’aa non retrouvés en séquençage direct ont été identifiés respectivement chez les patients R et NR, tous localisés en préS1 et préS2, mais hors de la zone de fixation au hNTCP. Les variants porteurs de délétions déjà identifiés en séquençage direct ont aussi été retrouvés au niveau de la région préS (patients R3 et NR3).

Globalement, les analyses UDS réalisées ont permis de mettre en évidence une plus grande variabilité génétique au niveau des régions fonctionnelles de la protéine S (déterminant « a » et MHR), chez les patients NR par rapport aux patients R (figure 41).

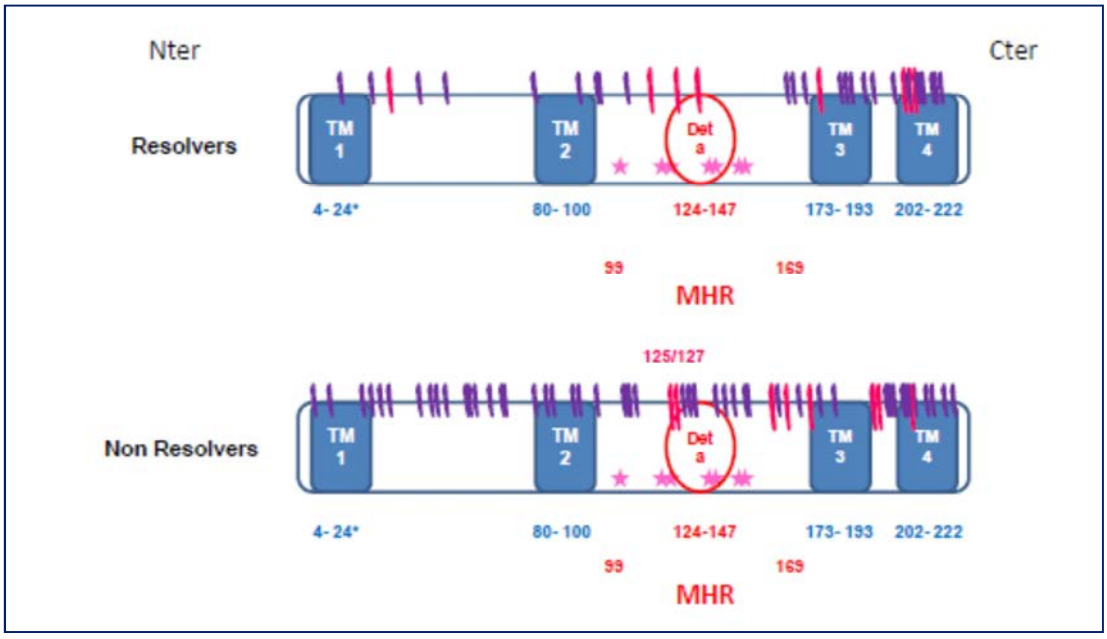


Figure 41 : Variabilité génétique évaluée par séquençage direct et UDS au niveau du gène S.
★ : résidu cystéine ; \ : changement d’aa observé en séquençage direct et en UDS
\ : changement d’aa observé uniquement en UDS

2.3.3. Analyse de la diversité génétique

Une analyse des distances génétiques a également été réalisée pour les quasi-espèces virales identifiées permettant ainsi d’évaluer leur diversité génétique (Kimura two-parameter

method). Celle-ci était très faible quel que soit le groupe de patients (NR ou R) et quel que soit la région étudiée (préS et S).

2.3.4. Evaluation de l'antigénicité prédite

Comme pour les variants majoritaires identifiés en séquençage direct, une analyse prédictive de l'antigénicité a été réalisée pour les variants minoritaires. Le tableau 20 synthétise les données principales, qui sont cohérentes avec les données retrouvées en séquençage direct.

	Région préS		Gène S	
	Augmentation	Baisse	Augmentation	Baisse
Patients R	P160L **(5,8 %)** R124P+R126D **(18 %)**	T40N+D43D **(3,66 %)** Q121P **(7.9 %)**	sL49R, sY100S, sL209S, sS210R, sW182F+sV184G+sL186H **(5,35-36 %)**	sY134F, sE164G, sL205M, sL216F **(2.1 %-4.1 %)**
Patients NR	Pas d'impact sur le profil		sT5T+sG10R, sN40N/S+sT46P/T, sI208T+sS210S, sM198I+sW199L+sY200Y, sY200F, sS204R+sL205M+sI208T/I, sS204R+sY206Y, **(3,2-38,2 %)**	sN40N/S+sT46P+sL49L/R, sP56P/Q+sT57I+sN59S+sS64C, sY200F+sS204S+sL205L+ sI208T/I, **(10.4-12 %)**

Tableau 20 : Impact des variants minoritaires identifiés en UDS sur l'antigénicité prédite.

3. Discussion

3.1. Constitution de la cohorte

Comme nous l'avons vu dans la partie rappels bibliographiques, l'obtention de la clairance de l'Ag HBs est un évènement fortement prédictif de l'élimination de l'ADNccc et donc l'objectif à long terme du traitement antiviral chez les patients infectés chroniquement. Cet évènement est malheureusement rarement observé, même après de nombreuses années de traitement par NUCs. Cette faible prévalence explique le petit nombre de patients resolvers inclus dans cette étude monocentrique : six patients infectés par du génotype D et quatre patients infectés par du génotype A. Ces patients ont été appariés selon le génotype viral, le sexe et l'âge avec des patients non resolvers eux aussi infectés de façon chronique par le VHB, sous traitement par NUCs et en virosuppression sans clairance de l'Ag HBs.

La rareté des patients resolvers et la nécessité d'appariement des patients non resolvers font qu'il était difficile de choisir des patients ayant reçu des protocoles thérapeutiques similaires.

Pour les raisons précédement citées, liées à l'étude rétrospective des patients sélectionnés, la cinétique de disparition de l'Ag HBs, ainsi que la durée de l'infection et le mode de contamination n'ont pu être retracés. Ces données pourraient avoir un impact sur l'évolution de l'infection Toutefois la taille de la cohorte a été validée sur le plan méthodologique (cf plus loin, analyses dans l'article correspondant). De plus les résultats obtenus sont confortés par les analyses en UDS qui permettent l'exploration de milliers de séquences de variants minoritaires et par la comparaison des données retrouvées dans notre cohorte avec celles de l'HBVdb (i.e. prévalence de la mutation sT125M chez 4/6 non répondeurs versus 8 % seulement dans l'HBVdb) et celles de l'analyse des séquences GenBank de deux cohortes de patients disponibles dans la littérature.

Tous les patients infectés par du VHB de génotype A étaient porteurs de sous type A2. La répartition des sous-types viraux était légèrement plus variable pour les patients infectés par du VHB de génotype D, avec une majorité de sous-types D3.

3.2. Analyses in silico

Les analyses de séquençage direct et d'UDS ont mis en évidence deux signatures moléculaires localisées au niveau du déterminant « a » de l'Ag HBs : sT125M et sP127T. Celles-ci étaient plus fréquemment retrouvées chez les patients NR. La mutation sT125M avait déjà été décrite par le passé notamment chez des patients infectés par du VHB de sous type D3 dans un contexte de mono-infection (Pourkarim *et al.*, 2010) ou de co-infection VHB/VIH chez des patients UDIV (Taffon *et al.*, 2014 ; De Maddalena *et al.*, 2007). Cette combinaison de mutations a été décrite dans certains cas rapportés d'échappement vaccinal. Velu *et al.*, ont rapporté la présence de la combinaison de mutations sT125M et SP127T chez un nouveau-né de mère porteuse chronique en dépit d'une sérovaccination à la naissance (Velu *et al.*, 2008). En revanche, Luongo *et al.*, ont rapporté le cas d'un patient adulte vacciné qui a développé une hépatite aigue suite à l'infection par une souche porteuse des mutations sM125T, sT127P et s Q129H (Luongo *et al.*, 2015), cette observation suggérant un mécanisme multifactoriel impliquant la protéine S.

L'évaluation de l'antigénicité prédite après introduction de ces deux mutations dans la séquence consensus de génotype D montrait une baisse significative du pic d'antigénicité. Par ailleurs, Rodriguez Lay *et al.*, ont montré que des mutations associées à un échappement immunitaire dans le gène S de souches VHB de génotype A1, A2, C1 étaient retrouvées dans le déterminant « a » et dans la MHR (Rodriguez Lay *et al.*, 2015). Le déterminant « a » est une zone immunodominante majeure. La conservation de la conformation tridimensionnelle

de l'Ag HBs par des ponts disulfures impliquant différents résidus cystéine est primordiale pour son implication dans la réponse humorale mais aussi dans l'entrée cellulaire virale (Blanchet et Sureau, 2007 ; Salisse *et al.*, 2009). Des mutations intervenant dans le proche voisinage de ces cystéines pourraient déstabiliser le repliement de cette protéine, ses fonctions et ainsi influencer la clairance ou la persistance de l'Ag HBs.

Il a été rapporté depuis plusieurs années déjà l'existence de mutations intervenant dans ces zones clefs et entrainant une mise en défaut des trousses d'immuno-diagnostic couramment utilisées pour le diagnostic sérologique de l'Ag HBs. Les positions fréquemment impliquées sont par exemple les positions 125 (génotype D) (Araujo *et al.*, 2009), 120, 123 et 126 (génotype B et C) (Coleman, 2006 ; Hsu et Yeh, 2011). Nous reviendrons sur ces données dans la deuxième partie de ce manuscrit décrivant le modèle fonctionnel. Des tests ELISA réalisés à l'aide de sérum de souris vaccinées contre le VHB (Engerix B) montrent une baisse de la réactivité des sérums vis-à-vis d'un peptide muté en sT125M par rapport à un peptide sauvage s125T, ce qui renforce les résultats de la prédiction bio-informatique de l'antigénicité.

Par ailleurs, l'analyse de réseau de covariance a identifié davantage de paires covariantes chez les patients non resolvers (NR) sur le gène S et la région préS, ce qui renforce encore la notion d'une plus grande variabilité observée chez les patients NR, notamment grâce aux analyses en UDS mettant en évidence de nombreux variants minoritaires dans la MHR. Les réseaux minimums permettant de séparer les patients R des patients NR impliquaient tous les deux signatures moléculaires retenues.

La présence de la double mutation sT125M et sP127T n'était pas observée chez les variants majoritaires de génotype A. De façon générale, comme pour les variants majoritaires de génotype D, la variabilité de la région préS semblait moins importante que celle de la région S pour les variants de génotype A. Malgré la présence de nombreuses mutations chez les patients R1A et NRA1, la variabilité des souches de génotype A tendait à être inférieure à celle des souches de génotype D. Quelques mutations relevées chez les patients R1A et NR1A ont un impact sur les profils d'antigénicité prédite. Par ailleurs, la présence d'un mutant sG145R chez un resolver montre bien la complexité du phénomène de clairance de l'Ag HBs, qui est multifactoriel, associant des paramètres de l'hôte et du virus. L'étude en UDS des souches virales de ces patients permettront d'explorer les variants minoritaires et de confirmer et de compléter les mutations déjà observées chez les variants viraux en séquençage direct.

En conclusion de cette première partie du travail, la combinaison de mutations identifiée chez les patients NR, sur les résidus 125 et 127, intervient dans une région impliquée à la fois

dans la réponse immune et dans l'entrée cellulaire virale. De façon prédictive (résultats obtenus grâce au logiciel AnTheProt), les signatures moléculaires identifiées sT125M et sP127T semblent avoir un effet sur l'antigénicité de la région considérée. Ces resultats obtenus In silico, doivent être confortés par des études *in vitro* et *in vivo*, plus proches de la réalité physiopathologique de l'infection virale. Afin d'étudier plus précisément l'impact de ce « motif » sur les propriétés fonctionnelles virales, un modèle fonctionnel d'étude *in vitro* a été développé. Les résultats préliminaires obtenus à l'aide de ce modèle seront détaillés dans la partie Volet 3 de l'étude.

4. Article

L'article qui suit, a été soumis et accepté dans la revue Journal of Viral Hepatitis. Il présente les résultats des analyses *in silico* obtenus pour les patients infectés par du VHB de génotype D.

Partie 2 : *Tests fonctionnels*

in vitro

(volet 3 de l'étude)

1. Matériel et méthodes

1.1. Lignées cellulaires utilisées

Pour générer des particules VHB/Delta, la lignée d'hépatome humain Huh7 a été utilisée. Les tests d'infection / neutralisation médiés par les particules produites ont été réalisés sur la lignée hépatocytaire d'HepaRG différenciées.

Les cellules Huh7 ont été entretenues avec du milieu nutritif DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco), additionné de pyruvate 1 %, de glutamate 1 %, de pénicilline (100 UI/ml) et de streptomycine (100 µg/ml) et supplémenté à 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Le SVF a préalablement été traité par chauffage à 56°C pendant 30 minutes pour l'inactivation du complément. Les cellules Huh7 ont été cultivées à 37°C sous 5 % de CO_2 en flasque T75, repiquées et le milieu a été changé toutes les 72 heures.

Les cellules HepaRG ont été entretenues avec du milieu nutritif de Williams E (Gibco), additionné de glutamate 1 %, de pénicilline (100 UI/ml) et de streptomycine (100 µg/ml), d'insuline 5 µg/ml et d'hydrocortisone hémisuccinate 5E-5M et supplémenté à 10 % de SVF décomplémenté. Elles ont été cultivées en flasque T 75 à 37°C sous 5 % de CO_2, puis à confluence repiquées en plaque 12 puits. En plaque 12 puits elles ont été entretenues pendant 15 jours sans trypsination jusqu'au moment de la différenciation des cellules.

1.2. Description et amplification des plasmides

1.2.1. Description des plasmides

Le plasmide pSLVD3 code la ribonucléoparticule du virus Delta (Kuo *et al*., 1989). Le plasmide pT7HB2.7 code les protéines d'enveloppe du VHB (L-HBs Ag, M-HBs Ag, S-HBs Ag) (Sureau *et al*., 1994). Les autorisations pour utilisation des plasmides nous ont été transmises par messieurs les docteurs John Taylor (pSLVD3) et Camille Sureau (pT7HB2.7). Le plasmide pT7HB2.7 a été séquencé au niveau du gène S selon le protocole décrit précédemment. Le marqueur de sélection des deux plasmides est le gène de résistance à l'ampicilline.

1.2.2. Amplification des plasmides :

Les plasmides pT7HB2.7 et pSLVD3 ont été amplifiés à l'aide des bactéries compétentes E. Coli TOP 10 (Invitrogen), selon les recommandations du fabricant. Une quantité de 50 ng d'ADN plasmidique est ajouté aux bactéries. La transformation a été réalisée par choc thermique. Après l'étape de transformation, un volume de 250 µl de milieu SOC (Super

Optimal broth with Catabolite repression), a été ajouté aux bactéries. Les bactéries ont été incubées pendant une heure à 37°C en agitation continue, puis ensemencées sur milieux gélosés LB-Agar additionnés d'ampicilline. Les géloses ont été incubées à 37°C pendant 18 à 20 heures. Seules les bactéries transformées, possédant le plasmide contenant un gène de résistance à l'ampicilline se multiplient. Des colonies sélectionnées ont été prélevées pour réaliser des « mini-cultures » dans du milieu LB additionné d'ampicilline à 50 mg/ml, puis incubées à 37°C pendant 16 à 18 heures en agitation continue. Une partie des « mini-cultures » ont servi à préparer des stocks en glycérol à 15 % pour conservation des bactéries transformées à -80°C.

1.2.3. Extraction et purification des ADNs plasmidiques.

Après 16 à 18 heures de croissance à 37°C, les « mini-cultures » ont été ensemencées dans un volume de culture plus important de milieu LB additionné d'ampicilline à 50 mg/ml défini en fonction de la densité optique mesurée sur la miniculture (200 à 400 ml) et incubées une nuit à 37°C sous agitation continue. Les plasmides produits ont été extraits à l'aide de la trousse NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey Nagel) selon les recommandations du fabricant.

1.2.4. Mutagénèse dirigée :

Les variants sT125/sT127 (variant 2) et sT125/sP127 (variant 3) ont été obtenus par mutagénèse dirigée, à partir du plasmide pT7HB2.7 en utilisant la trousse commerciale QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) et en suivant les recommandations du fabricant. Les amorces utilisées pour les PCR de mutagénèse dirigée sont les suivantes (tableau 21) :

	Amorce sens	**Amorce antisens**
Variant 2 (sT125/sT127)	QCF 5' –CATGCCGGACCTGCACGACTACTGCTCAAGG- 3' (TM : 63,3°C)	QCR 5' –CCTTGAGCAGTAGTCGTGCAGGTCCGGCATG- 3' (TM : 63,3°C)
Variant 3 (sT125/sP127)	QC2F 5'-CCGGACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTC-3' (TM : 65,5°C)	QC2R 5'-GAGGTTCCTTGAGCAGGAGTCGTGCAGGTCCGG-3' (TM : 65,5°C)

Tableau 21 : Amorces utilisées pour les PCR de mutagénèse dirigée.

Mélange réactionnel pour un échantillon :

Matrice (ADN plasmidique) : 10 ng
10X reaction buffer: 5 µl
dNTPs 1µM: 1 µl
Quick solution : 3 µl
Amorce sens ou antisens: 125 ng
Pfu Ultra HF DNA polymerase (2,5 U) : 1 µl
Eau DNAse-free : qsp 50 µl

Programme d'amplification:

95°C ; 1 minute (dénaturation initiale)	1 cycle
95°C ; 50 secondes (dénaturation)	18 cycles
TM du couple d'amorces ; 50 secondes (hybridation)	
68°C ; 4 minutes (élongation)	
68°C ; 7 minutes (élongation finale)	1 cycle

Pour digérer les brins parentaux méthylés, 10 U d'enzyme de restriction Dpn I (activité méthylase) ont été ajoutés au produit de PCR et incubés une heure à 37°C. Les plasmides mutés ont ensuite été propagés dans les bactéries XL10-Gold ®Ultracompetent Cells, selon les recommandations du fabricant.

Afin de vérifier l'efficacité de la mutagénèse, un séquençage direct du gène S était réalisé sur deux clones bactériens (pour protocole, voire partie séquençage direct). Les plasmides mutés obtenus étaient ensuite extraits par Midiprep à l'aide de la trousse NucleoBond ® Xtra Midi EF (Macherey Nagel), en suivant les recommandations du fabricant.

1.3. Production des particules VHB/Delta

1.3.1. Transfection des cellules Huh7

La veille de la transfection les cellules Huh7 cultivées en flasque T 75 (cellules entre 10 et 15 passages) étaient repiquées et ensemencées en plaque 12 puits (densité cellulaire de l'ordre de $4x10^4$cellules/ cm^2). La réaction de transfection s'effectuait le lendemain lorsque les cellules

étaient à peu près à 80 % de confluence dans chaque puits. L'agent de transfection utilisé était le TransIT®-LT1 (Mirus). Le mélange de transfection avait la composition suivante :

Mélange de transfection pour 1 puits (plaque 12 puits) :

Milieu DMEM sans SVF ni antibiotiques : 100 µl
ADN plasmidique (1 µg/µl) : 1 µl (0,5 µg pSLVD3 et 0,5 µg pT7HB2.7)
Trans IT-LT1 : 3 µl

Le mélange de transfection était ajouté goutte à goutte sur le tapis cellulaire Huh7 dans chaque puits. Après 24 heures à 37°C sous 5 % de CO_2, le milieu de culture était changé. Entre le deuxième (J2) et le huitième jour (J8) post-transfection, le milieu de culture était changé toutes les 48 heures.

1.3.2. Récolte des productions particulaires

Les surnageants de chaque puits des plaques de transfection étaient récoltés toutes les 48 heures, à partir de J8 post-transfection et jusqu'à J14 post-transfection (récoltes effectuées à J8, J10, J12 et J14). Les récoltes ont été poolées et centrifugées pendant 30 minutes à 3500g. Le surnageant contenant les particules virales produites a été filtré à travers un filtre à 0,45µm. Les aliquotes étaient ensuite congelées à -80°C dans l'attente de leur qualification par dosage CMIA, qRT-PCR et Western Blot.

1.3.3. qRT-PCR Delta

L'ARN des particules virales produites a été extrait à l'aide de la trousse Nucleospin RNA virus (Macherey Nagel), selon les recommandations du fabricant. Avant de procéder à la qRT-PCR, 8 µl d'extrait ont été soumis à un traitement à la DNAse I RNAse free Ambion® (Applied Biosystem), afin d'éliminer une contamination des extraits par de l'ADN.

Mélange réactionnel pour un échantillon :

Matrice (ARN extrait): 8 µl
DNAse I RNAse free: 1 µl
Buffer 10X: 1 µl

Le mélange a ensuite été incubé à 37°C pendant une heure, puis 15 minutes à 70°C pour inactiver la DNAse.

Afin d'évaluer la production de particules virales par les cellules Huh7 transfectées, l'ARN du virus Delta a été quantifié par qRT-PCR (Scholtes *et al*., 2012) à l'aide de la trousse Express One-step SYBR® GreenER™ (Invitrogen). La gamme de quantification s'étendait de 10 à 10^8 copies par réaction.

Amorce	Nom	Séquence
sens	AgD-F2	5'-CGGGCCGGCTACTCTTCT- 3' (TM : 60°C)
antisens	AgD-R	5'-AAGGAAGGCCCTCGAGAACA- 3' (TM : 62°C)

Tableau 22 : Amorces utilisées pour la qRT-PCR VHD (Scholtes *et al*., 2012)

Mélange réactionnel pour un échantillon :

Matrice (ARN): 4 µl
EXPRESS Superscript OneStep®: 0,25 µl
EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR Super Mix Universal: 5 µl
Amorces sens et antisens (200nM): 0,2 µl
Eau DNAse-free: qsp 10 µl

Programme d'amplification :

50°C ; 15 minutes (reverse transcription)	1 cycle
95°C ; 5 minutes (dénaturation initiale)	1 cycle
95°C ; 10 secondes (dénaturation)	40 cycles
60°C ; 20 secondes (hybridation)	
72°C ; 20 secondes (élongation) **Acquisition du signal**	

1.3.4. Dosage par Chimioluminescent Assay (CMIA) Architect Abbott

Chaque production particulaire (variant 1, variant 2, variant 3) a été analysée à l'aide de la trousse commerciale couramment utilisée en diagnostic sérologique sur l'automate Architect i2000SR (Abbott) :

- HBsAg quantitative et HBsAg Qualitative II assay

Il s'agit d'un dosage immunologique micro-particulaire par chimiluminescence (CMIA) utilisant des microparticules paramagnétiques recouvertes d'anticorps anti-HBs monoclonaux de souris. Le conjugué utilisé correspond à des anticorps monoclonaux de chèvre marqués à

l'acridinium. Les épitopes ciblés par les anticorps monoclonaux des deux trousses sont décrits dans le tableau 23.

	Anticorps de capture sur les microparticules		**Conjugué(s)**	
HBsAg quantitative assay	**Purified H166 anti-HBs** -mouse - monoclonal - IgM -Epitope : **s121-124**	**Purified H53 anti-HBs** - mouse - monoclonal - IgG - Epitopes: **s112-117** et **s187-207**	**Purified anti-HBs** -goat -polyclonal	/
HBsAg Qualitative II assay				**Purified H35 F(ab')2 anti-HBs** - Epitopes: **s122-130** et **s166-175**

Tableau 23 : Descriptif des anticorps utilisés dans les trousses commerciales Architect Abbott.

1.4. Tests d'infection

1.4.1. Différenciation des cellules HepaRG.

Les cellules HepaRG ont été ensemencées en plaque 12 puits à la densité cellulaire de $2.5x10^4$ cellules par cm^2. Elles ont été incubées à 37°C sous 5 % de CO2 pendant deux semaines en changeant le milieu de culture (composition décrite plus haut) toutes les 48 heures. A l'issue de ce délai les cellules ont été entretenues dans du milieu de différenciation correspondant au milieu de culture des HepaRG décrit plus haut, additionné de DMSO Hybrimax à 1,8 %, pendant deux autres semaines.

1.4.2. Protocole d'infection

Au terme de la période de différenciation, les cellules HepaRG différenciées étaient à confluence soit à peu près une densité cellulaire de $5x10^5$ cellules par puits. La quantité de particules introduites par puits a été normalisée en tenant compte des résultats de la qRT-PCR obtenus lors de la qualification de chaque production. Les ratios suivants ont été testés pour la mise au point du test d'infection des cellules : 1, 5 et 10 Viral Genome Equivalent (VGE) par cellule. Ces ratios devront être ré-évaluer, lors de l'optimisation du test. La composition du mélange d'infection était la suivante :

Mélange d'infection pour un puits :

Solution de particules virales : volume selon le ratio 1, 5 ou 10 VGE choisi
Polyethylène glycol (PEG) 8000 ; 40 % : 50 µl
Milieu de Williams pour différenciation qsp 500 µl

Les tapis cellulaires ont été inoculés avec le mélange d'infection puis les plaques ont été incubées pendant 16 heures à 37°C sous 5 % de CO_2. Le lendemain (J1 post-infection), l'inoculum a été retiré, chaque puits a été lavé trois fois avec du PBS 1X et remplacé par du milieu de Williams de différenciation.

1.4.3. Lyse et récolte du tapis cellulaire infecté

A partir de J1 post-infection le milieu de culture a été changé toutes les 48 heures jusqu'à J6 post-infection. Chaque puits a été lavé avec du PBS 1X. Puis après une courte étape de lyse, le tapis cellulaire a été récupéré puis soumis à une courte centrifugation. Le culot cellulaire a été repris dans un volume plus faible de PBS 1X.

1.4.4. qRT-PCR Delta

Les ARN intracellulaires ont été extraits à l'aide de la trousse NucleospinRNA Clean-up (Macherey Nagel), en appliquant le protocole « RNA isolation from up to 10^5 cells », selon les recommandations du fabricant. Avant de procéder à la qRT-PCR, 8 µl d'extrait ont été soumis à un traitement à la DNAse I RNAse free Ambion® (Applied Biosystem), afin d'éliminer une contamination des extraits par de l'ADN, comme expliqué précédemment. La quantification de l'ARN du VHD a ensuite été réalisée comme décrit précédemment.

2. Résultats

2.1. Obtention des plasmides

Chacun des plasmides wild type (pT7HB2.7 ou pSLVD3) ou mutés (variant 2 et variant 3 produits par mutagénèse dirigée) a été vérifié avant son utilisation.

2.1.1. Séquençage direct du plasmide pT7HB2.7

La séquence de la région du plasmide pT7HB2.7 codant les protéines d'enveloppe a été vérifiée à réception et après amplification (bactéries TOP10) et purification par midiprep. Les séquences en acide nucléique et en aa du plasmide figurent en annexe 7. La séquence aa

(ORFs) du plasmide pT7HB2.7 est identique à la séquence consensus de génotype D à l'exception des positions 125 et 127. En effet le plasmide pT7HB2.7 que nous avons choisi d'appeler variant 1 est porteur des deux signatures moléculaires précédemment identifiées sT125M et sP127T.

2.1.2. Vérification du plasmide pSLVD3

Le plasmide pSLVD3 code la ribonucléoparticule du VHD. Une qRT-PCR a été réalisée après la midiprep pour valider l'amplification et la purification du plasmide.

2.1.3. Obtention et vérification des plasmides mutés

Les variants 2 (sT125/sT127) et 3 (sT125/sP127) ont été obtenus après mutagénèse dirigée à partir du plasmide pT7HB2.7. Pour vérifier si les mutations ponctuelles désirées avaient bien été insérées un séquençage direct du gène S a été réalisé (figure 42).

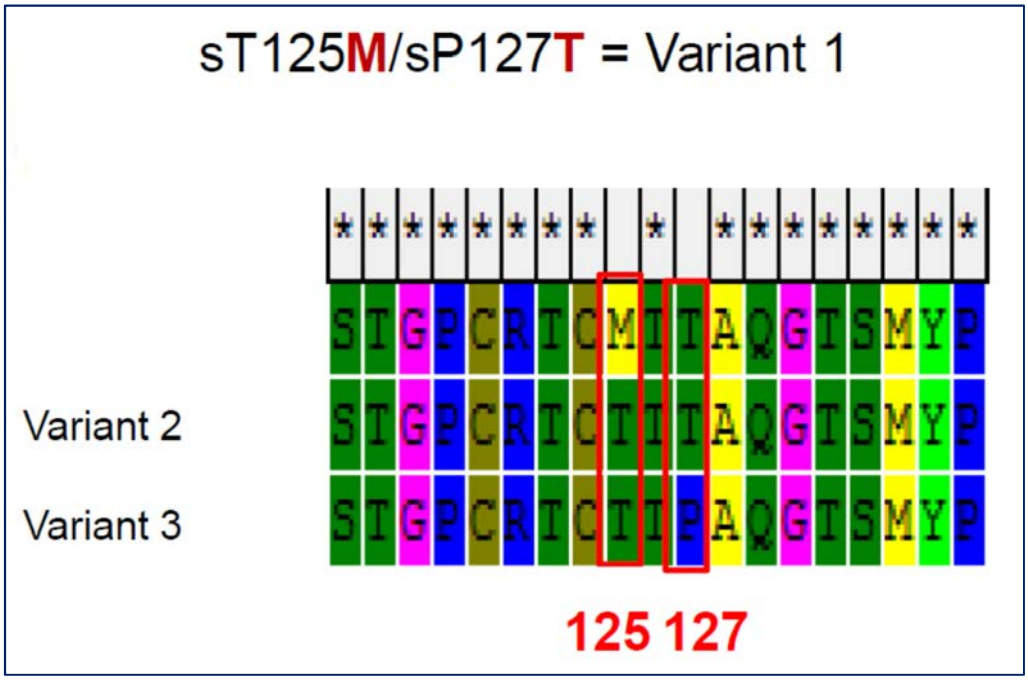


Figure 42 : Vérification des mutations introduites par mutagénèse dirigée.

2.2. Production des particules virales

Suite à la co-transfection du plasmide pT7HB2.7 muté ou sauvage et du plasmide pSLVD3 dans des cellules Huh7, des particules virales (VHD et SVPs) ont été produites. Les productions des trois variants ont été qualifées de deux façons différentes :

- par qRT-PCR VHD qui quantifie l'ARN des particules VHD produites
- par techniques CMIA qui quantifie l'Ag HBs des particules VHD et des SVPs produites.

2.2.1. Qualification des productions

2.2.1.1. Par qRT-PCR (Delta)

Les protocoles de récupération des productions et de qRT-PCR ont été décrits précédemment dans la partie matériel et méthode. Dans un premier temps un dosage des productions pour chaque jour de récolte avait été envisagé, mais les taux mesurés étaient trop faibles. Nous avons donc choisi pour la suite des productions de pooler les surnageants de récolte (J8, J10, J12 et J14 post-transfection). Chaque échantillon a été dosé en qRT-PCR en duplicate.
Les valeurs obtenues (moyenne des duplicate) pour les différentes productions figurent dans le tableau 24.

	Variant 1 (s125**M**, s127**T**)	Variant 2 (s125T, s127**T**)	Variant 3 (s125T, s127P)
Production 1	$9{,}37x10^5$ Cp /ml **5,97 log Cp/ml**	$9{,}68x10^5$ Cp/ml **5,99 log Cp/ml**	Ce variant n'était pas encore produit par mutagénèse dirigée au moment de ces productions
Production 2	$8{,}57x10^4$ Cp/ml **4,93 log Cp/ml**	$8{,}63x10^4$ Cp/ml **4,94 log Cp/ml**	
Production 3	$7{,}05x10^4$ Cp/ml **4,85 log Cp/ml**	$1x10^5$ Cp/ml **5 log Cp/ml**	
Production 4	$6{,}125x10^6$ Cp/ml **6,79 log Cp/ml**	Ce variant n'a pas été testé lors de cette production	$5{,}77x10^6$ Cp/ml **6,76 log Cp/ml**
Production 5	$4{,}35x10^6$ Cp/ml **6,64 log Cp/ml**	$2{,}8x10^6$Cp/ml **6,45 log Cp/ml**	$1{,}17x10^8$ Cp/ml **8,07 log Cp/ml**
Production 6	$1.39x10^7$ Cp/ml **7,14 log Cp/ml**	$3{,}415x10^7$Cp/ml **7.53 log Cp/ml**	1.965x107 Cp/ml **7.29 log Cp/ml**

Tableau 24 : Productions particulaires exprimées en copies par ml (Cp/ml) de surnageant et en log Cp/ml.

Les charges virales du variant 1 (s125M/s127T) ont été comparées à celles du variant 2 (s125T/s127T) puis à celles du variant 3 (s125T/s127P) au risque α = 5 %, à l'aide du test de Mann and Whitney (MW). Aucune différence significative n'a été observée (figures 43 et 44).

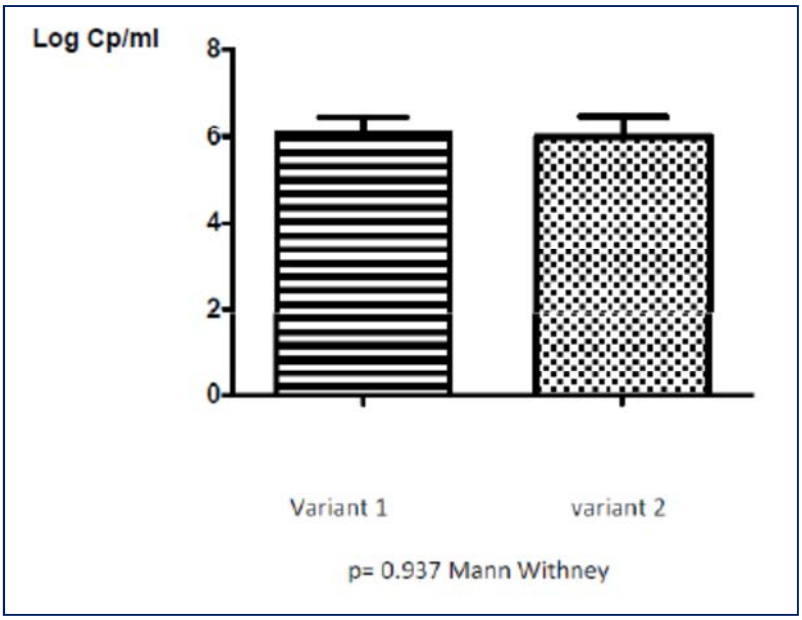


Figure 43 : Comparaison des valeurs (en Log Cp/ml) obtenues en qRT-PCR Delta pour les variants 1 et 2.

(Analyse réalisée sur les moyennes des duplicate de chaque variant pour les productions 1, 2, 3, 5 et 6)

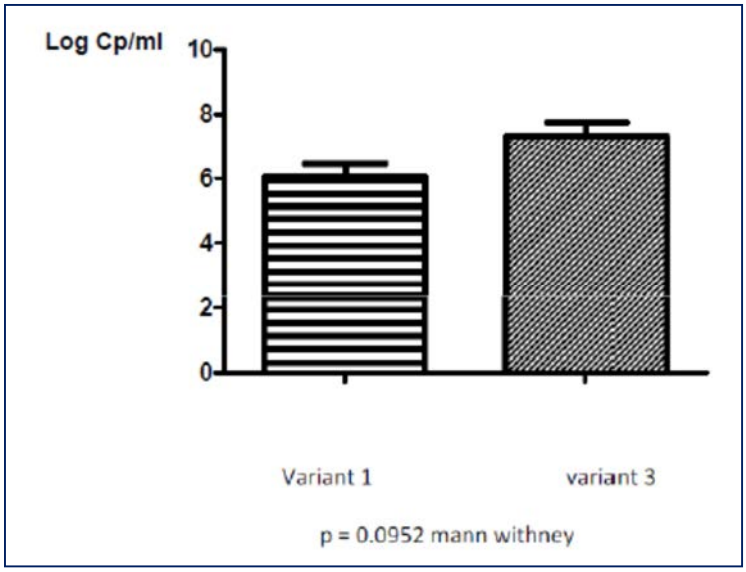


Figure 44 : Comparaison des valeurs (en Log Cp/ml) obtenues en qRT-PCR Delta pour les variants 1 et 3.

(Analyse réalisée sur les moyennes des duplicate de chaque variant pour les productions 4, 5 et 6)

2.2.1.2. Par technique CMIA

Les surnageants récoltés ont aussi été dosés en Ag HBs à l'aide de trousses commerciales couramment utilisées en diagnostic sérologique. Les caractéristiques des tests qualitatif et quantitatif ainsi que le principe du dosage ont été décrits dans la partie matériel et méthodes. Chaque production de variant a été dosée en triplicate. Les résultats obtenus pour les variants ont été comparés pour chaque production réalisée, afin de tenir compte des variations inter-production (tableau 24) (figures 45 et 46). Une analyse statistique a été réalisée à l'aide des tests de Mann and Whitney ou de Kruskal-Wallis au risque α = 5 %.

- Test qualitatif : HBsAg Qualitative II assay

La comparaison des valeurs du variant 1 (s125M/s127T) et du variant 2 (s125T/s127T) montre une différence significative pour les productions 5 et 6 (p= 0.02 KW ; p=0.009 KW). Une différence significative est retrouvée entre les variants 1 (s125M/s127T) et 3 (s125T/s127P) pour la production 4 uniquement (p=0,02 MW). Le variant 2 (s125T/s127T) diffère significativement du variant 3 uniquement dans la production 5 (p= 0.009).

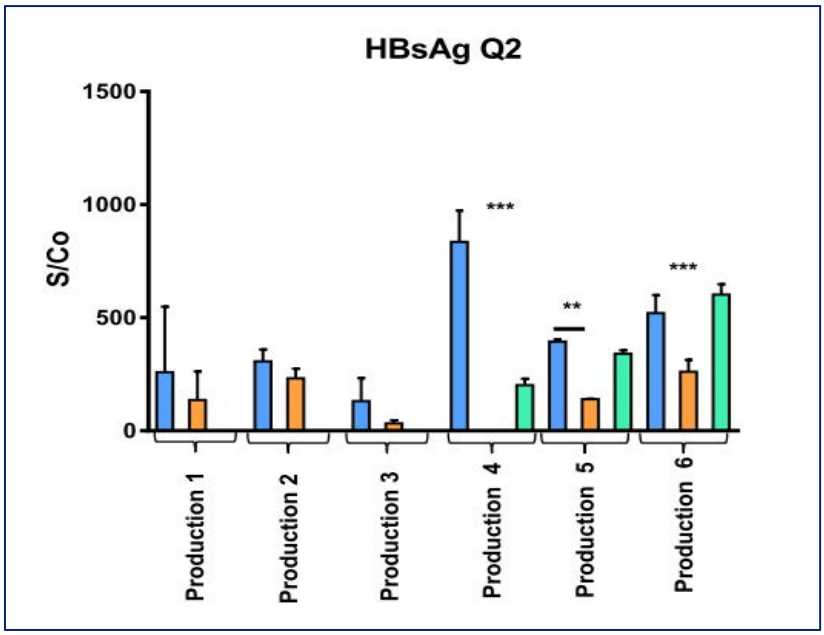


Figure 45 : Comparaison des valeurs (en S/Co) obtenues avec le test HBsAg Qualitative II assay pour chacune des productions réalisées.
Le variant 1 (s125M/s127T) est représenté par les barres bleues, le variant 2 (s125T/s127T) est représenté par les barres oranges et le variant 3 (s125T/s127P) par les barres vertes.

❖ Test quantitatif : HBsAg quantitative assay

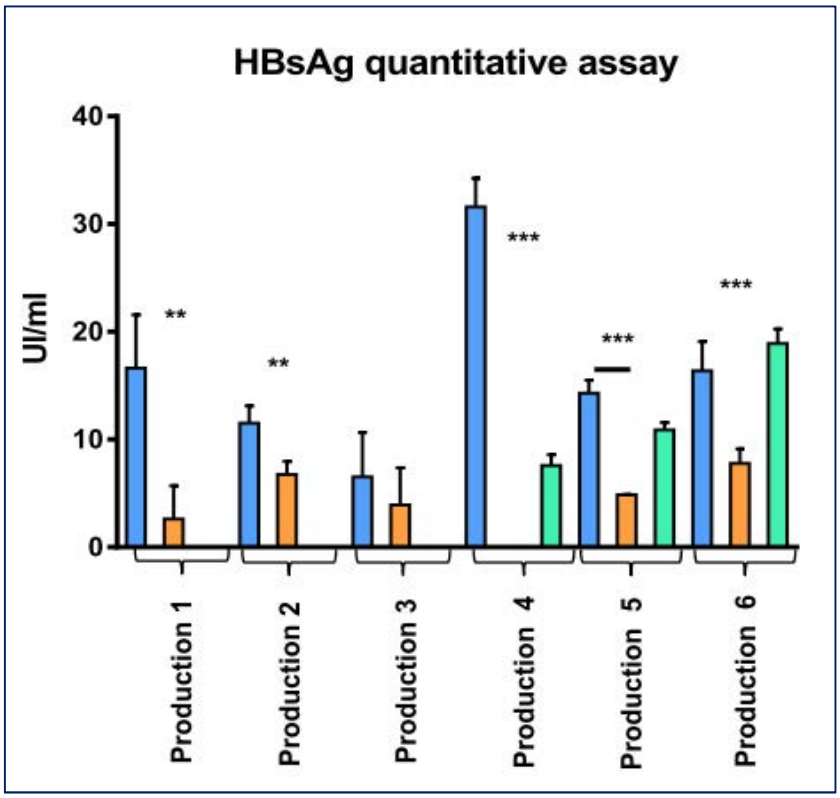


Figure 46 : Comparaison des valeurs (en UI/ml) obtenues avec le test HBsAg Quantitative assay pour chacune des productions réalisées
Le variant 1 (s125M/s127T) est représenté par les barres bleues, le variant 2 (s125T/s127T) est représenté par les barres oranges et le variant 3 (s125T/s127P) par les barres vertes.

La comparaison des valeurs du variant 1 (s125M/s127T) et du variant 2 (s125T/s127T) montre une différence significative pour les productions 1, 2, 5 et 6 (p= 0.0058 MW, p= 0.0022 MW, p= 0.02 WK, p= 0.009 WK). Une différence significative est retrouvée entre les variants 1 (s125M/s127T) et 3 (s125T/s127P) pour la production 4 uniquement (p= 0.0002 MW). Le variant 2 (s125T/s127T) diffère significativement du variant 3 pour la production 6 (p<0.0001 KW).

2.3. Tests d'infection

Un premier test d'infection sur cellules HepaRG différenciées a été réalisé pour choisir l'inoculum le mieux adapté : 1, 5 ou 10 viral genome equivalent (VGE). L'infection était évaluée au bout de 6 jours, par qRT-PCR Delta réalisée sur les culots cellulaires. Pour le variant 2 (s125T/s127T) aucun signal n'a pu être mesuré. Pour les variants 1 (s125M/s127T) et 3 (s125T/s127P), les valeurs les plus élevées étaient trouvées pour un inoculum à 5 VGE. Cependant, suite à la différentiation des HepaRG la confluence du tapis cellulaire n'était que de 20 %. Les deux tests d'infection suivants réalisés à partir d'un inoculum de 5 VGE ont montré des taux faibles d'infection (entre $5x10^2$ et $1x10^3$ copies par réaction) pour chacun des variants. Le taux de confluence des cellules HepaRG était alors de 100 %.

Des essais de neutralisation ont été menés mais n'ont pas abouti à des résultats interprétables (données non communiquées dans ce manuscrit).

3. Discussion :

3.1. Choix des variants à tester

Les analyses *in silico* nous avaient permis de mettre en évidence la présence de deux signatures moléculaires sT125M et sP127T présentes exclusivement chez 4/6 des patients NR. La prédiction d'antigénicité (logiciel Antheprot) ainsi que des tests ELISA réalisés sur un modèle de souris vaccinées contre le VHB ont suggéré que la présence de ces deux mutations pourrait influencer la conformation spatiale de la MHR et du déterminant « a ». Nous avons donc souhaité tester *in vitro* l'influence de ces deux mutations sur le pouvoir infectieux viral et la réponse humorale. D'autres mutations intéressantes relevées lors du séquençage direct et /ou lors de l'UDS, situées dans des zones d'intérêt mériteraient aussi d'être explorées à l'aide du modèle fonctionnel.

3.2. Choix du modèle cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment (rappels bibliographiques, partie 4), il existe peu de modèles cellulaires permettant d'une part de produire beaucoup de particules virales et d'autre part d'être sensibles à une infection par le VHB. Pour répondre à nos hypothèses de travail, le système développé par Camille Sureau semblait parfaitement adapté (Sureau, 2010).

Nous nous intéressons essentiellement aux étapes précoces de l'entrée du virus dans les hépatocytes. Or il est communément admis que ces étapes précoces impliquant les protéines d'enveloppe sont communes au VHB et au VHD, les étapes post fusion membranaires seraient divergentes (Urban *et al*.,2014).

Sur ce modèle les taux de production particulaires obtenus sur cellules Huh7 semblent satisfaisants, les taux d'infection sur lignée cellulaire HepaRG différenciée sont de l'ordre de 10 à 15 %.

La découverte du hNTCP comme récepteur du VHB en 2012 a ouvert d'autres perspectives de modèles fonctionnels *in vitro*. Les lignées transfectées hNTCP Huh7 et surtout hNTCP HepG2 affichent des taux d'infection plus importants (Yan *et al.*, 2012). Les taux d'infection retrouvés dans la littérature pour les lignées hNTCP HepG2 sont de 25 à 30 % (Yan *et al.*, 2012 ; König A *et al.*, 2014). Cependant d'autres molécules que le hNTCP sont requises pour le pouvoir infectieux du VHB (ou du VHD) et ces facteurs pourraient ne pas être exprimés de façon équivalente entre les lignées hNTCP-transfectées Huh7, hNTCP-transfectées HepG2 et HepaRG. (Ni *et al.*, 2014).

3.3. Qualification des productions particulaires par qRT-PCR et par CMIA.

La production particulaire a été examinée par qPCR Delta et par CMIA sur le surnageant des cellules Huh7.

La qualification des productions par qRT-PCR n'a pas montré de différence significative entre le variant 1 (pT7HB2.7) porteur de la double mutation s125M/s127T et les variants 2 (s125T/s127T) et 3 (s125T/s127P). Ceci laisse donc supposer que les particules VHD s'assembleraient de façon équivalente pour les trois variants.

Dans ce modèle la co-transfection des plasmides pT7HB2.7 (sauvage ou muté) et du plasmide pSLVD3 conduisent à la production par les cellules Huh7 de particules VHD et de SVPs. Il est difficile d'évaluer le ratio de production VHD/SVPs. La qRT-PCR Delta mesure l'ARN Delta correspondant aux particules VHD mais ne permet pas d'estimer le nombre de SVPs présentes dans les surnageants récupérés. La réalisation d'un western blot permettant de détecter les différentes protéines d'enveloppe d'une part et d'autre part une protéine spécifique du VHD (antigène Delta) permettrait d'apprécier ce ratio. L'optimisation de ce test est actuellement en cours et son protocole provisoire figure en annexe 7. La mesure de l'Ag HBs par les techniques CMIA ne permet pas non plus de distinguer les deux types de particules exprimant à leur surface l'Ag HBs.

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, l'existence de variants viraux mieux ou moins bien détectés par les trousses diagnostiques est connue depuis longtemps (Araujo *et al.*, 2009 ; Coleman, 2006). Servant-Delmas *et al.*, ont ainsi étudié l'effet de plusieurs combinaisons de mutations, présentes chez plusieurs génotypes sur 13 trousses commerciales dont l'HBsAg Quantitative assay. Selon ces travaux, la technique CMIA Architect a une

bonne capacité de détection des souches portant des mutations de l'Ag HBs et notamment les mutations sT125M et sP127T (Servant-Delmas *et al.*, 2013).

Les variants 1 (s125M/s127T) et 3 (s125T/s127P) correspondants aux mutations observées chez les patients non répondeurs et répondeurs respectivement, sont comparés à partir des productions 4, 5 et 6 de particules chimériques VHB/VHD. Ces deux variants sont reconnus à des taux similaires par les deux tests CMIA qualitatif et quantitatif. Mais il faut noter que la différence est significative pour la production 4 au cours de laquelle un taux élevé d'Ag HBs a été observé (pour un taux d'ARN VHD constant). On peut retenir en conclusion que le variant observé chez les patients non répondeurs est correctement détecté par les deux techniques de dépistage en dépit de la présence des deux mutations signatures.

L'impact de la mutation sT125M peut être évalué en comparant les résultats obtenus pour le variant 1 (s125M/s127T) et le variant 2 (s125T/s127T). La présence d'une méthionine entraine une meilleure détection de l'Ag HBs par les trousses CMIA, et notamment par la trousse HBsAg Quantitative assay (différence significative pour les productions 1, 2, 5 et 6). La présence d'un Ac conjugué supplémentaire H35 ciblant la zone s122-130 dans la trousse HBsAg Qualitative II assay optimise la détection des différents variants et pourrait diminuer les différences observées entre les souches.

Le variant 2 (s125T/s127T) est moins bien détecté que le variant 3 (s125T/s127P) correspondant au VHB de génotype D sérotype adw2 utilisé pour la préparation des trousses Architect Abbott. Cette différence est significative sur les productions 5 ou 6 selon la trousse utilisée, bien que seul l'aa en position 127 diffère du variant sauvage. Le défaut de détection pourrait être lié aux caractéristiques physicochimiques de l'association des deux thréonines en position 125 et 127.

Ces résultats ne nous permettent pas de déterminer si les différences obtenues pour la détection de l'Ag HBs sur les productions particulaires des trois variants étaient dues à une différence de sécrétion de l'Ag ou de détection par les trousses CMIA.

3.4. Les tests d'infection

Le premier test d'infection réalisé sur cellules HepaRG différenciées devait nous permettre d'évaluer l'inoculum le plus approprié. Nous avions fait le choix de tester des tailles d'inoculum correspondant à nos taux de production soit 1, 5 et 10 VGE par cellule, dans des plaques 12 puits. A six jours post-infection les culots cellulaires étaient récupérés et

l'infection évaluée par l'ARN Delta produit dans les cellules (suite à la réplication du génome VHD dans les cellules infectées). Des taux d'ARN (très faibles) avaient été mesurés seulement pour des inoculum de 5 VGE par cellule. Cependant, au bout des 15 jours nécessaires à la différenciation des cellules, le tapis cellulaire était seulement à 20 % de confluence. Nous avons choisi de tester à nouveau l'inoculum à 5 VGE par cellule.

Lors des deux tests suivants, au bout de la période de différenciation, les HepaRG différenciées étaient à 100 % de confluence. Les charges virales VHD trouvées étaient de l'ordre de $5x10^2$ et $1x10^3$ copies par réaction.

Les taux d'infection sur lignée cellulaire HepaRG différenciée, de l'ordre de 10 à 15 %, ne peuvent expliquer à eux seuls les résultats obtenus. Bien que l'inoculum de départ soit normalisé sur la charge virale VHD, nous ne savons pas quel est le ratio VHD/ SVPs dans chacune de nos productions. Les SVPs pourraient rentrer en compétition avec les particules VHD lors des étapes de fixation aux HepaRG différenciées. L'analyse des productions par le Western Blot nous permettra de mieux apprécier ce ratio.

Par ailleurs, l'extraction de l'ARN VHD sur les culots cellulaires nécessite l'utilisation de protocoles d'extraction particuliers pour limiter les interférences liées à la présence d'acides nucléiques cellulaires. Ainsi dans certains points de « blanc » (puits ne contenant que des cellules HepaRG différenciées et du milieu), des signaux faibles ont pu être mesurés quand l'extraction était réalisée à l'aide d'un extracteur automatisé. Ce problème devrait être surmonté grâce à l'utilisation d'un contrôle cellulaire lors de la qRT-PCR Delta. Il s'agirait alors de rajouter un couple d'amorces ciblant spécifiquement un gène « de ménage cellulaire » (exemple : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) (Tseng *et al.*, 2008).

Un autre facteur limitant l'optimisation de l'infection est le taux de production des particules. En effet, en tenant compte du nombre de cellules par puits à confluence (plaque 12 puits), si l'on souhaitait tester un inoculum supérieur à 10 VGE par cellule il faudrait augmenter d'un facteur 10 à 100 nos taux de production. Une autre alternative technique possible réside dans la concentration des volumes de production au 1/10 ^{ème} en employant du PEG 40 %. Mais pour obtenir un bon compromis entre concentration finale et volume disponible pour réaliser les tests d'infection, il faudrait augmenter de façon conséquente les volumes de surnageant récoltés.

Lorsque les tests d'infection seront optimisés, il sera alors possible de réaliser à nouveau des tests de neutralisation. Il conviendra dans un premier temps de mieux définir les dilutions de sérum testées. En effet dans le cas de dilutions trop faibles, un effet non spécifique du sérum

ne peut être exclu. Dans un second temps, l'étape de formation des complexes anticorps/ particules devra aussi être revue car elle peut aussi influencer les résultats de la neutralisation. Ainsi plusieurs conditions de température (à 37°C, à température ambiante ou à +4°C) et de durée (de 30 minutes à plusieurs heures) devront être testées.

Perspectives et conclusions générales

Comme nous l'avons précédemment évoqué, l'hépatite B chronique est un enjeu de santé publique majeur, touchant environ 240 millions de personnes dans le monde. Malgré l'existence d'un vaccin efficace, cette infection reste difficile à éradiquer. Sous traitement par analogues nucléos(t)idiques (NUCs), la clairance de l'antigène HBs (Ag HBs), un paramètre virologique corrélé au bon pronostic clinique, est rarement obtenue. Notre hypothèse de travail est la suivante : parmi d'autres facteurs viraux, des caractéristiques des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B pourraient influencer la clairance de l'Ag HBs sous traitement anti-VHB par analogues nucleot(s)idiques.

Des patients infectés de façon chronique par le VHB, traités par NUCs et ayant obtenu une clairance de l'Ag HBs, ont été classés en resolvers (R). Ils ont été appariés à des patients également infectés de façon chronique et traités par NUCs, en viro-suppression mais sans clairance de l'Ag HBs, nommés non resolvers (NR). Ainsi, six patients R infectés par du VHB génotype D et quatre patients R infectés par du VHB génotype A ont été appariés selon le génotype viral, le sexe et l'âge avec autant de patients NR.

Les analyses *in silico* (premier volet de cette étude) avaient pour objectif de rechercher l'existence de signatures moléculaires, c'est-à-dire de mutations plus fréquemment retrouvées dans un des deux groupes de patients et d'évaluer de façon prédictive leur impact fonctionnel : prédiction par bio-informatique de l'antigénicité des protéines de surface du VHB et recherche de réseaux de covariance d'aa permettant de distinguer les deux groupes de patients en fonction de la réponse au traitement anti-viral. Les analyses de séquençage direct et d'UDS ont mis en évidence deux signatures moléculaires, plus fréquemment retrouvées chez les patients NR et localisées dans le déterminant « a » de la MHR de l'Ag HBs : sT125M et sP127T. L'évaluation de l'antigénicité prédite après introduction de ces deux mutations dans la séquence consensus de génotype D montrait une baisse significative du pic d'antigénicité. Des tests ELISA réalisés à l'aide de sérum de souris vaccinées contre le VHB (Engerix B) montraient une baisse de la réactivité des sérums vis-à-vis d'un peptide muté en sT125M par rapport à un peptide sauvage s125T, ce qui renforce les résultats de la prédiction bio-informatique de l'antigénicité (volet 2 de l'étude). De plus, des réseaux de covariance permettant de séparer les patients R des patients NR ont été définis, impliquant à chaque fois les deux signatures moléculaires retenues. Par ailleurs, la double mutation sT125M et sP127T n'était pas observée chez les variants majoritaires de génotype A. Enfin, le séquençage direct

et l'UDS ont montré une plus grande variabilité génétique du gène S par rapport à la région préS, surtout dans la région hydrophilique majeure (MHR) de l'Ag HBs.

Les mutations identifiées chez les patients NR, sur les résidus 125 et 127, interviennent dans une région impliquée à la fois dans la réponse immune et dans l'entrée cellulaire virale. La partie extracellulaire de l'Ag HBs comprend huit résidus cystéines conservés et deux ponts disulfures entre les cystéines en 121 et 124 ou 124 et 137 puis en 139 et 148. La conservation de la conformation tridimensionnelle de l'Ag HBs par les ponts disulfures est primordiale pour son implication dans la réponse humorale mais aussi dans l'entrée cellulaire virale (Blanchet et Sureau, 2007 ; Salisse *et al.*, 2009). Des mutations intervenant dans le proche voisinage de ces cystéines pourraient déstabiliser le repliement de cette protéine et perturber ses fonctions. En effet la majorité des anticorps neutralisants se fixent sur cette partie extracellulaire et en particulier au niveau de la première boucle de la MHR qui contient notamment le déterminant « a » (Tajiri *et al.*, 2010). Si l'entrée cellulaire du virus implique la fixation spécifique du hNTCP à un site en préS1, la MHR de l'Ag HBs intervient dans l'attachement aux HSPGs mais aussi dans une étape plus tardive de l'entrée virale au cours de laquelle le maintien de sa conformation spatiale semble indispensable (Salisse et Sureau, 2009 ; Sureau et Salisse 2013).

La mutation sT125M avait déjà été décrite chez certains patients porteurs chroniques mono-infectés ou co-infectés VHB/VIH (Taffon *et al.*, 2014 ; De Maddalena *et al.*, 2007). Ces positions ont également été impliquées dans certains cas rapportés d'échappement vaccinal (Velu *et al.*, 2008, Luongo *et al.*, 2015). Par ailleurs, d'autres mutations situées dans le déterminant « a » et dans la MHR ont été associées à un échappement immunitaire chez des souches VHB de génotype A1, A2, C1 (Rodriguez Lay *et al.*, 2015).

L'Ag HBs est également la cible des anticorps monoclonaux couramment utilisés dans les trousses commerciales utilisées pour le diagnostic sérologique de l'infection. Des mutations entrainant une mise en défaut de ces trousses d'immuno-diagnostic ont été rapportées notamment sur la MHR. Les positions fréquemment impliquées sont par exemple les positions 125 (génotype D) (Araujo *et al.*, 2009), 120, 123 et 126 (génotype B et C) (Coleman, 2006 ; Hsu et Yeh, 2011).

Afin d'étudier l'impact de cette double mutation sur les propriétés fonctionnelles virales et ainsi pouvoir compléter les données obtenues avec les analyses bio-informatiques, un modèle fonctionnel d'étude *in vitro* a été développé (volet 3 de l'étude). Les signatures moléculaires sT125M/sP127T ont été introduites par mutagénèse dirigée dans le plasmide pT7HB2.7

codant les protéines d'enveloppe. Des particules virales, VHD et SVPs, correspondant à trois variants différents ont été produites par co-transfection avec le plasmide pSLVD3 dans des cellules Huh7 : variant 1 (s125M/s127T), variant 2 (s125T/s127T), variant 3 (s125T/s127P) (Sureau, 2010). Nous nous intéressons aux étapes précoces de l'entrée du virus dans les hépatocytes, qui sont communes au VHB et au VHD (Urban *et al*.,2014). En dépit de la variabilité inter-production, les taux de production particulaires obtenus sur cellules Huh7 semblaient satisfaisants. La qualification des productions par qRT-PCR n'a pas montré de différence significative entre les variants 1 (s125M/s127T), 2 (s125T/s127T) et 3 (s125T/s127P). Ceci laisse donc supposer que les particules VHD seraient produites et s'assembleraient de façon équivalente pour les trois variants. Cependant nous n'avons pas pu évaluer le ratio de production VHD/SVPs. La réalisation d'un Western Blot permettra de détecter les différentes protéines d'enveloppe d'une part et d'autre part une protéine spécifique du VHD (antigène Delta) et d'apprécier ce ratio.

Le variant1 (s125M/s127T) correspondant aux patients NR et le variant 3 (s125T/s127P) correspondants aux patients R étaient le plus souvent reconnus de façon similaire par les tests CMIA HBsAg quantitative et HBsAg Qualitative II assay Architect Abbott. La présence de la double mutation ne semblait donc pas influencer la détection de l'Ag HBs. La mutation sP127T seule (variant 2) semble abaisser la détection (et la fixation) par les anticorps monoclonaux des deux tests. Il serait intéressant de produire un variant viral porteur uniquement de la sT125M, afin de compléter les données obtenues en ELISA avec les souris vaccinées. L'existence de variants viraux mieux ou moins bien détectés par les trousses diagnostiques est connue (Araujo *et al.*, 2009 ; Coleman, 2006, Servant-Delmas *et al.*, 2013). Néanmoins une étude a démontré la bonne détection des souches VHB porteuses de mutations de l'Ag HBs par les trousses Architect Abbott. (Servant-Delmas *et al.*, 2013).

Le premier test d'infection réalisé sur cellules HepaRG différenciées devait nous permettre d'évaluer l'inoculum le plus approprié, mais les conditions de réalisation ne sont pas encore optimales (tapis cellulaire à 20 % de confluence seulement). Lors des deux tests suivants, réalisés dans de meilleures conditions cellulaires, nous avons choisi de tester l'inoculum à 5 VGE par cellule. Les charges virales VHD trouvées étaient de l'ordre de $5x10^2$ et $1x10^3$ copies par réaction. Les taux d'infection sur lignée cellulaire HepaRG différenciée, de l'ordre de 10 à 15 %, ne peuvent expliquer à eux seuls les résultats obtenus. Une optimisation de ces tests sera donc nécessaire (introduction d'un contrôle cellulaire pour la qRT-PCR, productions particulaires en plus grande quantité). Elle sera notamment facilitée par la réalisation du Western Blot qui nous permettra de mieux apprécier le ratio VHD/SVPs produit. Lorsque les

tests d’infection seront optimisés, de nouveaux tests de neutralisation pourront être effectués. Par ailleurs d’autres mutations intéressantes relevées lors du séquençage direct et /ou lors de l’UDS, situées dans des zones d’intérêt fonctionnel mériteraient aussi d’être explorées à l’aide du modèle VHD.

En conclusion, les données obtenues sont en faveur de l'existence de "motifs" spécifiques dans le gène S du VHB pouvant avoir une influence sur l’infection virale sous pression thérapeutique par NUCs. Chez les patients NR, sous pression thérapeutique, une baisse de l'antigénicité et des mutations plus fréquentes dans le gène S du VHB suggèrent un rôle des caractéristiques des protéines d'enveloppe sur l'évolution de la maladie.
Ces résultats devront être approfondis avec notamment l’optimisation des tests fonctionnels et l’étude du VHB de génotype A fréquent en France. Ils pourront également être explorés dans une autre population de patients souvent infectés par le VHB, les patients co-infectés par le VIH. Les résultats obtenus ouvriront de nouvelles perspectives thérapeutiques, en particulier vers des cibles potentielles d'inhibiteurs d'entrée du VHB.

Références bibliographiques

Abou-Jaoude G, Sureau C. Entry of Hepatitis Delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus enveloppe protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of Thiol-Disulfide exchange. *J Virol.*, 2007 ; 81: 13057-66

Albin C, Robinson WS. Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol.*, 1980 ; 34: 297-302

Allain JP. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. *J Clin Virol.*, 2006 ; 36 Suppl 1: S12-7

Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet.*, 1971 ; 2 (7736): 1225-7

Araujo NM, Vianna COA, Moraes MTB, Gomes SA. Expression of Hepatitis B virus antigen (HBs Ag) from genotypes A, D and F and influence of amino acid variations related or not to genotypes on HBs Ag detection. *Braz J Infect Dis*., 2009 ; 13 (4): 266-71

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

Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol.*, 1972 ; 109 (4): 842-8

Bartenschlager R, Schaller H**.** Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J.*, 1992 ; 11(9):3413-20

Bhattacharya D, Thio CL. Review of hepatitis B therapeutics. *Clin Infect Dis.*, 2010 ; 51 (10):1201-8

Bayer ME, Blumberg BS, Werner B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature.,* 1968 ; 218:1057-9

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

Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut*., 2012 ;61 (12):1754-64.

Blanchet M, Sureau C. Infectivity determinants of the HBV preS domain are confined to the N-Terminal 75 amino acid residues. *J Virol*., 2007 ; 81:5841-9

Blumberg BS. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science*, 1977 ; 197 (4298):17-25

Blumberg BS. The discovery of the hepatitis B virus and the invention of the vaccine: a scientific memoir. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002 ; 17 Suppl: S502-3

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A “new” antigen in leukemia sera. *JAMA*, 1965 ; 191(7): 514-6

Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down’s syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*, 1967 ; 66 (5):924-31

Bosch V, Bartenschlager R, Radziwill G, Schaller H. The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology.*,1988 *;* 166 (2)**:** 475-85

Bréchot C, Kremsdorf D, Soussan P, Pineau P, Dejean A, Paterlini-Bréchot P, Tiollais P. Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): Molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathol Biol*., 2010 ; 58: 278-87

Bremer CM, Bung C, Kott N, Hardt M, Glebe D. Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell Microbio.*, 2009 *;* 11 (2): 249-60

Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F, Lau GKK, Farci P, Yurdaydin c, Piratvisuth T, Luo K, Wang Y, Hadziyannis S, Wolf E, McCloud P, Batrla R, Marcellin P. Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to Peginterferon alpha- 2a in HBeAg-Negative chronic hepatitis B. *Hepatology.*, 2009 ; 49 (4): 1141-50

Brunetto MR, ** Oliveri F, ** Colombatto P**, ** Moriconi F**, ** Ciccorossi P**, ** Coco B**, ** Romagnoli V**, ** Cherubini B**, ** Moscato G**, ** Maina AM**, ** Cavallone D**, ** Bonino F. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology.*, 2010 ; 139 (2):483-90

Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol.*, 2007 ; 13 (1): 65-73

Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat.*, 1997 ; 4 Suppl 1:11-20.

Chan HL, ** Thompson A, ** Martinot-Peignoux M**, ** Piratvisuth T**, ** Cornberg M**, ** Brunetto MR**, ** Tillmann HL**, ** Kao JH**, ** Jia JD**, ** Wedemeyer H**, ** Locarnini S**, ** Janssen HL**, ** Marcellin P. Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report. *J Hepatol.*, 2011 ; 55 (5):1121-31

Chang SF, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, Frölich K, Will H. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (Anser caerulescens) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology.*, 1999 ; 262: 39-54

Chisari FV, Isogawa M., Wieland SF. Pathogenesis of HBV infection. *Pathol Biol*., 2010 ; 58 (4):258-66

Ciesek S, Helfritz FA, Lehmann U, Becker T, Strassburg CP, Neipp M, Ciner A, Fytili P, Tillmann HL, Manns MP, Wedemeyer H. Persistence of occult hepatitis B after removal of the hepatitis B virus-infected liver. J Infect Dis. 2008 ;197(3):355-60

Coleman PF. Detecting Hepatitis B Surface Antigen Mutants. *Emerg Infect Dis.*, 2006 ; 12:198-203

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.*, 1970 ; 1 (7649):695-8

Datta S, Ghosh A, Dasgupta D, Ghosh A, Roychoudhury S, Roy G, Das S, Das K, Gupta S, Basu K, Basu A, Datta S, Chowdhury A, Banerjee S. Novel point and combo mutations in the genome of hepatitis B virus genotype D: characterization and impact on liver disease progression to hepatocellular carcinoma. *PLoS One.*, 2014 ; 9: e110012.

Dawson AJ. An ethical argument in favour of routine hepatitis B vaccination in very low-incidence countries. *Lancet Infect Dis.*, 2005 ; 5 (2):120-5

Delaney WE. Molecular virology of chronic hepatitis B and C: parrallels, contrasts and impact on drug development and treatment outcome. *Antiviral research.*, 2013 ; 99: 34-48

Deléage G, Combet C, Blanchet C, Geourjon C. ANTHEPROT : an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput Biol Med.*, 2001 , 31: 259-67

De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D, Schiavini M, Milazzo L, Bernini F, Ebranati E, Cargnel A, Bruno R, Galli M, Zehender G. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology.*, 2007 ; 365: 113-24

Dény P, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol.* , 2010 ; 58 (4):245-53

Desmond CP, Batholomeusz A, Gaudieri S, Revill PA, Lewin SR. A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus : identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. *Antiviral Therapy.*, 2008 ; 13:161-75

Desmyter J, De Groote J, Desmet VJ, Billiau A, Ray MB, Bradburne AF, Edv VG, De Somer P. Administration of human fibroblast interferon in chronic hepatitis-B infection. *Lancet.*, 1976 ; 2 (7987):645-7

Durantel D, Carrouée-Durantel S, Werle-Lapostolle B, Brunelle MN, Pichoud C, Trépo C, Zoulim F. A new strategy for studying In Vitro the drug susceptibility of clinical isolates of Human Hepatitis B Virus. *Hepatology*., 2004 ;40 (4):855-64.

Durantel D. Fitness and infectivity of drug-resistant and cross-resistant HBV mutants: why and how is it studied ? , *Antivir Ther.*, 2010 ; 15:521-27

Fasano M, Lampertico P, Marzano A, Di Marco V, Niro GA, Brancaccio G, Marengo A, Scotto G, Brunetto MR, Gaeta GB, Rizzetto M, Angarano G, Santantonio T. HBV DNA suppression and HBsAg clearance in HBeAg negative chronic hepatitis B patients on lamivudine therapy for over 5 years. *J Hepatol*., 2012 ; 56 (6):1254-8.

Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J. Hepatol*., 2008 ; 48: 335-52

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. Coli. *Nature.*, 1979 , 281 (5733): 646-50

Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell.,* 1980 *;* 21 (3)**:** 801-9

Giles JP, McCollum RW, Berndtson LW Jr, Krugman S. Relation of Australia-SH antigen to the willowbrook MS-2 strain. *N Engl J Med.,* 1969 ; 281 (3): 119-22

Gish RG, Chang T-T, Lai C-L, De Man R, Gadano A, Poordad F, Yang J, Brett-Smith H,. Tamez R , Loss of HBsAg antigen during treatment with entecavir or lamivudine in nucleoside-naïve HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.*, 2010 ; 17 (1):16-22.

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

Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol.*, 2007 , 13 (1)**:** 22-38

Gocke DJ, Kavey NB. Hepatitis antigen. Correlation with disease and infectivity of blood-donors. *Lancet.*, 1969 ; 1 (7605):1055-9

Gordon SC, Krastev Z**,** Horban A**,** Petersen J**,** Sperl J**,** Dinh P**,** Martins EB**,** Yee LJ**,** Flaherty JF**,** Kitrinos KM**,** Rustgi VK**,** Marcellin P**.** Efficacy of tenofovir disoproxil fumarate at 240 weeks in patients with chronic hepatitis B with high baseline viral load. *Hepatology.*, 2013 ; 58 (2):505-13.

Greenberg HB, Pollard RB, Lutwick LI, Gregory PB, Robinson WS, Merigan TC. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N Engl J Med.,* 1976 ; 295 (10): 517-22

Grethe S, Heckel JO**,** Rietschel W**,** Hufert FT. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol.*, 2000 ; 74 (11):5377-81

Grimm D, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol. Int.,* 2011 ; 5:644-53

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

Gripon P, Diot C, Guguen-Guillouzo C. Reproductible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus-Effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology.*, 1995 ; 213 (2): 292-9

Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, Guguen-Guillouzo C. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol.*, 1988 ; 62 (1): 4136-43

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 2002 ; 99 (24): 15655-60

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

Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*., 2006 ; 1:23-61

Havens JW. Period of infectivity of patients with homologous serum jaundice and routes of infection in this disease. *J Exp Med.*, 1946 ; 83: 441-7

Hayer J, Jadeau F, Deléage G, Kay A, Zoulim F, Combet C. HBVdb: a knowledge database for Hepatitis B Virus. *Nucleic Acids Res.*, 2013 ; 41(Database issue):D566-70.

Heathcote EJ, Marcellin P**,** Buti M**,** Gane E**,** De Man RA**,** Krastev Z**,** Germanidis G**,** Lee SS**,** Flisiak R**,** Kaita K**,** Manns M**,** Kotzev I**,** Tchernev K**,** Buggisch P**,** Weilert F**,** Kurdas OO**,** Shiffman ML**,** Trinh H**,** Gurel S**,** Snow-Lampart A**,** Borroto-Esoda K**,** Mondou E**,** Anderson J**,** Sorbel J**,** Rousseau F**.** Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology.***,** 2011 ; 140 (1):132-43

Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol.*, 1984 ; 52 (2)**:**396-402

Hillis WD. An outbreak of infectious hepatitis among chimpanzee handlers at a United States Air Force Base. *Am J Hyg.*, 1961 ; 73:316-28.

Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y,Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Clearance of hepatitis B surface antigen during long-termnucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study. *J Gastroenterol.*, 2013 ; 48: 930-41

Hsu CW, Yeh CT. Emergence of hepatitis B virus S gene mutants in patients experiencing hepatitis B surface antigen seroconversion after peginterferon therapy. *Hepatology*., 2011 ; 54:101-8.

Hudu SA, Malik YA, Niazlin MT, Harmal NS, Sekawi Z. An Overview of Hepatitis B Virus Surface Antigen Mutant in the Asia Pacific. *Curr Issues Mol Biol.*, 2014 ; 16 (2):69-78

Ismail AM, Puhazhenthi KS, Sivakumar J, Eapen CE, Kannangai R, Abraham P. Molecular epidemiology and genetic characterization of hepatitis B virus in the Indian subcontinent. *Int J Infect Dis.*, 2014 Mar ; 20:1-10.

Kamili S, Sozzi V, Thompson G, Campbell K, Walker CM, Locarnini S, Krawczynski K. Efficacy of hepatitis B vaccine against antiviral drug-resistant hepatitis B virus mutants in the chimpanzee model. *Hepatology.*, 2009 ; 49 (5):1483-91

Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS. DNA polymerase associated with human hepatitis b antigen. *J Virol.*, 1973 ; 12 (5): 995-1005

Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Research.*, 2007 ; 127: 164-76.

Kim do Y, Chang HY, Lim SM, Kim SU, Park JY, Kim JK, Lee KS, Han KH, Chon CY, Ahn SH. Quasispecies and pre-existing drug-resistant mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *Gut Liver*., 2013 ; 7 (3):329-34.

Kock J, Borst EM, Schlicht HJ. Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J Virol.*, 1996 *;* 70 (9)**:** 5827-31

König A, Döring B, Mohr C, Geipel A, Gever J, Glebe D. Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na+/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) In hepatocytes. *J Hepatol.*, 2014 ; 61 (4): 867-75

Korba BE, Brown TL, Wells FV, Baldwin B, Cote PJ, Steinberg H, Tennant BC, Gerin JL. Natural history of experimental woodchuck hepatitis virus infection: molecular virologic features of the pancreas, kidney, ovary and testis. *J Virol.*, 1990 ; 64 (9): 4499-506

Korba BE, Cote PJ, Wells FV, Baldwin B, Popper H, Purcell RH, Tennant BC, Gerin JL. Natural history of Woodchuck hepatitis virus infection during the course of experimental viral infection: molecular virologic features of the liver and lymphoid tissues. *J Virol.*, 1989 ; 63 (3): 1360-70

Korba BE, Wells F, Tennant BC, Yoakum GH, Purcell RH, Gerin JL. Hepadnavirus infection of peripheral blood lymphocytes in vivo: woodchuck and chimpanzee models of viral hepatitis. *J Virol.*, 1986 ; 58 (1): 1-8

Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine.*, 2005 ; 23 (19):2409-23

Kuo MY, Chao M, Taylor J. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J. Virol.*, 1989 ; 63:1945-50

Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Res Off J Jpn Soc Hepatol.*, 2010 ; 40:14-30

Lanford RE, Chavez D**,** Brasky KM**,** Burns RB 3rd**,** Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1998 ; 95 (10):5757-61

Laperche S, Servant-Delmas A, Gallian P, Pillonel J. La surveillance de la diversité des virus VIH, VHB et VHC chez les donneurs de sang français entre 2000 et 2010. *Bull Epidémiol Hebd.*, 2012 ; 39-40:447-52.

Le Bouvier GL, McCollum RW, Hierholzer WJ Jr, Irwin GR, Krugman S, Giles JP. Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus. *JAMA.*, 1972 ; 222 (8): 928-30

Le Duff Y., Blanchet M., Sureau C. The Pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins functionally independent. *J Virol.*, 2009 ; 83: 12443-51

Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.*, 2008 ; 10 (1):122-33

Lew YY, Michalak TI. In vitro and in vivo infectivity and pathogenicity of the lymphoid cell-derived woodchuck hepatitis virus. *J Virol.*, 2001 ; 75 (4): 1770-82

Li L, Dixon RJ, Gu X, Newbold JE: Comparison of the sequences of the Grey Teal, Maned Duck and Duck Hepatitis B Viruses. In The molecular biology of Hepatitis B Virus. *The United States: University of California San Diego*, 1998: 13

Locarnini SA, Yuen L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antivir. Ther.*, 2010 ; 15:451-61

London WT, Sutnick AI, Blumberg BS. Australia antigen and acute viral hepatitis. *Ann Intern Med.*, 1969 ; 70 (1): 55-9

Loustaud-Ratti V, Wagner A, Carrier P, Marczuk V, Chemin I, Lunel F, Fouchard-Hubert I, Ahmed SS, Abergel A, Rousseau A, Lefebvre A, Debette-Gratien M, Denis F, Alain S. Distribution of total DNA and cccDNA in serum and PBMCs may reflect the HBV immune status in HBsAg+ and HBsAg- patients coinfected or not with HIV or HCV. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2013 Sep;37(4):373-83

Luongo M, Critelli R, Grottola A, Gitto S, Bernabucci V, Bevini M, Vecchi C, Montagnani G, Villa E. Acute hepatitis B caused by a vaccine-escape HBV strain in vaccinated subject: sequence analysis and therapeutic strategy. *J Clin Virol.*, 2015 Jan ; 62:89-91

MacCallum F. Homologous serum hepatitis. *Lancet.*, 1947 ; 2:691-2

McMahon BJ, Holck P, Bulkow L, Snowball M. Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska natives chronically infected with hepatitis B virus. *Ann Intern Med.*, 2001 ; 135:759-68

Magnius LO, Espmark A. A new antigen complex co-occuring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.*, 1972a ; 80 (2):335-7

Magnius LO, Espmark JA. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J Immunol.*, 1972b ; 109 (5): 1017-21

Mangold CM, Unckell F, Werr M, Streeck RE. Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region. *Virology.*, 1995 ; 211 (2)**:** 535-43

Marcellin P, Asselah T, Lada O Treatment "à la carte" of chronic hepatitis B. *Gastroenterol Clin Biol.*, 2008 ; 32 (1 Pt 2):S1-5.

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

Marcellin P, Gane E**,** Buti M**,** Afdhal N**,** Sievert W**,** Jacobson IM**,** Washington MK**,** Germanidis G**,** Flaherty JF**,** Schall RA**,** Bornstein JD**,** Kitrinos KM**,** Subramanian GM**,** McHutchison JG**,** Heathcote EJ**.** Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet.*, 2013 ; 381 (9865):468-75

Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Nat Acad Sci USA* , 1980 ; 77: 2941-5

Martinot-Peignoux M, Carvalho-Filho R, Lapalus M, Ferreira Netto-Cardoso AC, Lada O, Batrla R, Krause F, Asselah T, Marcellin P. Hepatitis B surface antigen serum level is associated with fibrosis severity in treatment-naïve, e antigen-positive patients. *J Hepatol.*, 2013 ; 58 (6):1089-95

Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol.*, 1980 ; 36: 829-36

Matsumoto A, Tanaka E, Morita S, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S. Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection. *J Gastroenterol*., 2012 ; 47:1006-13

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

Maupas P, goudeau A, Coursaget P, Drucker J, bagros P, Baudin S, Geslin N. Vaccine against hepatitis B-18 months prevention in a high risk setting. *Med Microbiol Immunol.*, 1978 ; 166 (1-4):109-18

Meffre C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau E, Dubois F, Antona D, Lemasson J-M., Warszawski J, Steinmetz J, Coste D, Meyer J-F, Leiser S, Giordanella J-P, Gueguen R, Desenclos J-C.Prevalence of Hepatitis B and Hepatitis C Virus infections in France in 2004: Social factors are important predictors after adjusting for known risk factors. *J. Med. Virol.*, 2010 ; 82:546-55

Meier A, Mehrle S, Weiss TS, Mier W, Urban S. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology.*, 2013 ; 58 (1):31-42

Moucari R, Marcellin P. Quanti¢cation of hepatitis B surface antigen: a newconcept for the management of chronic hepatitis B. *Liver Int.*, 2011 ; 31 Suppl 1:122-8.

Mulders MN, Venard V**,** Njayou M**,** Edorh AP**,** Bola Oyefolu AO**,** Kehinde MO**,** Muyembe Tamfum JJ**,** Nebie YK**,** Maiga I**,** Ammerlaan W**,** Fack F**,** Omilabu SA**,** Le Faou A**,** Muller CP**.** Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis.*, 2004 ; 190 (2):400-8

Murray JM, Wieland SF, Purcell RH, Chisari FV. Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2005 ; 102:17780-5

Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, Gerlich WH. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol.*, 1993 ; 74 (Pt 8): 1627-32

Nebbia G, Peppa D, Maini MK Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. *Q J Med* , 2012 ; 105:109-13

Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, Stindt J, Königer C, Nassal M, Kubitz R, Sültmann H, Urban S. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate

co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology*., 2014 ; 146:1070-83

Norder H, Ebert JW, Fields HA, Mushahwar IK, Magnius LO. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology*., 1996 ; 218 (1):214-23.

Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*., 1996 ; 93 (9):4398-402

Odemuyiwa SO, Mulders MN, Oyedele OI, Ola SO, Odaibo GN, Olaleye DO, Muller CP. Phylogenetic analysis of new hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol.*, 2001 ; 65 (3):463-9

Parker JMR, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. », *Biochemistry.*, 1986 ; 25:5425-32

Patient R, Hourioux C, Sizaret PY, Trassard S, Sureau C, Roingeard P. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol.*, 2007 ; 81 (8)**:** 3842-51

Pioche C, Brouard C, Chevaliez S, Alric l, Couzigou P, Delarocque-Astagneau E, Denis F, Goria O, Guyader D, Marcellin P, Roudot-Thoraval F, Roulot D, Silvain C, Zarski J-P, Semaille C, Larsen C. Hépatite B chronique : prise en charge en France entre 2008 et 2011. *Bull epidémiol Hebd*., 2014 ; 12: 210-6

Pol S. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hepatite B. *La Presse Médicale.*, 2006 ; 35:308-16

Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *J Hepatol.*, 2014 ; 61 (2):408-17

Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, Levrero M. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology*., 2006 ; 130 (3):823-37

Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyaee S, Verbeeck J, Lemey P, Zeller M, Rahman M, Maes P, Nevens F, Van Ranst M. Molecular evolutionary analysis and mutational pattern of full-length genomes of hepatitis B virus isolated from Belgian patients with different clinical manifestations. *J Med Virol.*, 2010 Mar ; 82 (3):379-89

Prassolov A, Hohenberg H, Kalinina T, Schneider C, Cova L**,** Krone O, Frölich K, Will H, Sirma H. New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J Virol*. 2003 ; 77 (3):1964-76

Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Nati Acad Sci U.S.A.*, 1968 ; 60 (3): 814-21

Pult I, Netter HJ, Bruns M, Prassolov A, HuÈseyin S, Hohenberg H, Chang SF, FroÈlich K, Krone O, Kaleta EF, Will H. Identification and Analysis of a New Hepadnavirus in White Storks. *Virology.*, 2001 ; 289:114-28

Purcell RH, London WT, McAuliffe VJ, palmer AE, Kaplan PM, Gerin JL, Wagner J, Popper H, Lvovsky E, Wong DC, Levy HB. Modification of chronic hepatitis-B virus infection in chimpanzees by administration of an interferon inducer. *Lancet.*, 1976 ; 2 (7989): 757-61

Ramezani F, Norouzi M, Sarizade GR, Poortahmasebi V, Kalantar E, Magnius L, Norder H, Domingo E, Jazayeri SM. Mutation hot spots in hepatitis B surface antigen in chronic carriers from Khoozestan province, southern of Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol.*, 2013 ; 12 (3):269-75

Rizetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/antidelta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. Gut. 1977 ;18 (12):997-1003

Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol.*, 1974 ; 14 (2):384-91

Rodríguez Lay LA, Corredor MB, Villalba MC, Frómeta SS, Wong MS, Valdes L, Samada M, Sausy A, Hübschen JM, Muller CP. Genetic Diversity of the Hepatitis B Virus Strains in Cuba: Absence of West-African Genotypes despite the Transatlantic Slave Trade. *PLoS One*., 2015 May ; 10 (5):e0125052

Salisse J., Sureau C. A function essential to viral entry underlies the HBV « a » determinant. *J Virol*., 2009 ; 83:9321-8

Sattler F, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol.*, 1979 *;* 32 (1)**:**226-33

Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol.*, 2007 ; 13 (1): 14-21

Scholtes C, Icard V, Amiri M, Chevallier-Queyron P, Trabaud MA, Ramière C, Zoulim F, André P, Dény P. Standardized One-Step Real-Time Reverse transcription-PCR assay for universal detection and quantification of hepatitis Delta virus from clinical samples in the presence of a heterologous internal-control RNA. *JCM.*, 2012 ; 50:2126-8

Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology.*, 2007 *;* 46 (6)**:**1759-68

Schulze A., Schieck A., Ni Y., Mier W, Urban S. Fine mapping of Pre-S sequence requirements for HBV Large envelope protein-mediated receptor interaction. *J Virol.*, 2010 ; 84: 1989-2000

Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2000 ; 64 (1):51-68

Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science.*, 1986 *;* 232 (4749)**:**477-84

Senior JR, Sutnick AI, Goeser E, London WT, Dahike MB, Blumberg BS. Reduction of post-transfusion hepatitis by exclusion of Australia antigen from donor blood in an urban public hospital. *Am J Med Sci.*, 1974 ; 267 (3):171-7

Septfons A, Gautier A, Brouard C, Bernillon P, Nicolau J, larsen C. Prévalence, morbidité et mortalité associées aux hépatites B et C chroniques dans la population hospitalisée en France, 2004-2011. *Bull epidémiol Hebd.*, 2014 ; (12):202-9

Servant-Delmas A, Mercier-Darty M, Ly TD, Wind F, Alloui C, Sureau C, Laperche S. Variable capacity of 13 hepatitis B virus surface antigen assays for the detection of HBsAg mutants in blood samples. *J Clin Virol*.,2012 Apr ; 53 (4):338-45

Sohn JA , Litwin S, Seeger C Mechanism for CCC DNA Synthesis in Hepadnaviruses. *Pone.*, 2008 ; 4 (11) e8093

Sonneveld MJ, Rijckborst V, Cakaloglu Y, Simon K, Heathcote EJ, Tabak F, Mach T, Boucher CA, Hansen BE, Zeuzem S, Janssen HL. Durable hepatitis B surface antigen decline in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients treated with pegylated interferon-α2b: relation to response and HBV genotype. *Antivir Ther*., 2012 ; 17 (1):9-17

Sprengel R, Kaleta EF, Will H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol.*, 1998 ; 62: 3832-9

Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B, Oess S, Will H, Sirma H, Hildt E. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2006 *;* 103 (17)**:**6730-4

Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis-B like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.*, 1982 ; 29 (2): 403-15

Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Nati Acad Sci U.S.A.*, 1975 ; 72 (11):4597-4601

Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1978 ; 75 (9): 4533-7

Sung JJY, Tsui SKW, Tse CH, Ng EYT, Leung KS, Lee KH, Mok TSK, Bartholomeusz A, Au TCC, Tsoi KKF, Locarnini S, Chan HLY. Genome-specific genomic markers associated with primary hepatomas, based on complete genomic sequencing of hepatitis B virus. *J Virol.*, 2008 ; 82:3604-11

Sureau C. The use of hepatocytes to investigate HDV infection: the HDV/HepaRG model. *Methods Mol Biol*., 2010 ; 640:463-73

Sureau C, Guerra B, Lee H. The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol*., 1994 ; 68:4063-6

Sureau C, Salisse J. A conformational Heparan Sulfate Binding Site essential to infectivity overlaps with the conserved HBV a-determinant. *Hepatology.*, 2013 ; 57 (3):985-94

Taffon S, Genovese D, Blasi M, Pierotti P, Degli Esposti A, Catone S, Chionne P, Pulimanti B, Candido A, Dettori S, Tosti ME, Argentini C, Mazzotta F, Rapicetta M. HBV whole-genome mutation profile in HIV-1/HBV coinfected patients in a long-term follow-up study. *Infection*., 2014 Aug ; 42 (4):675-87

Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C. Hypermodification and Immune Escape of an Internally Deleted Middle-Envelope (M) Protein of Frequent and Predominant Hepatitis B Virus Variants. *Virology.*, 2002 ; 292:44-58

Tajiri K, Ozawa T, Jin A Tokimitsu Y, Minemura M, Kishi H, Sugiyama T, Muraguchi A. Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. *Antivir Res*., 2010 ; 87:40-9

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.,* 2009 ; 83:10538-47

Taylor JM. Virus entry mediated by hepatitis B virus envelope proteins. *World J Gastroenterol.*, 2013 ; 19 (40):6730-34

Testut P, Renard CA, Terradillos O, Vitvitski-Trepo L, Tekaia F, Degott C, Blake J, Boyer B, Buendia MA. A new hepadnavirus endemic in artic ground squirrels in Alaska. *J Virol.*, 1996 ; 70 (7):4210-9

Thomas RE, Lorenzetti DL, Spragins W. Mortality and morbidity among military personnel and civilians during the 1930s and world war II from transmission of hepatitis during yellow fever vaccination: systematic review. *Am J Public Health.*, 2013 ; 103 (3): e16-29

Tong S, Li J, Wands JR, Wen YM. Hepatitis B virus genetic variants: biological properties and clinical implications. *Emerg Microbes Infect.*, 2013 ; 2 (3):e10

Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol*., 2002 ; 25 (2):97-106

Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol.*, 2008 ; 82 (11):5657-63

Trepo C. A brief history of hepatitis milestones. *Liver Int.*, 2014 ; 34 Suppl 1: 29-37

Tseng CH, Jeng KS, Lai MM. Transcription of subgenomic mRNA of hepatitis delta virus requires a modified hepatitis delta antigen that is distinct from antigenomic RNA synthesis. *J Virol.* 2008 Oct; 82 (19):9409-16

Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of HBV, *J Hepatol.*, 2010 ; 52: 282-4

Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV Into Hepatocytes. *Gastroenterology*., 2014 ; 147:48-64

Vaudin M, Wolstenholme AJ**,** Tsiquaye KN**,** Zuckerman AJ**,** Harrison TJ. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol*., 1988 ; 69 (6):1383-9

Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, Kumarasamy T, Thyagarajan SP. Transmission of "a" determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. *Jpn J Infect Dis*., 2008 ; 61 (1):73-6

Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, Heydmann L, Weiss A, Renaud M, Durand SC, Habersetzer F, Durantel D, Abou-Jaoudé G, López Ledesma MM, Felmlee DJ, Soumillon M, Croonenborghs T, Pochet N, Nassal M, Schuster C, Brino L, Sureau C, Zeisel MB, Baumert TF. A targeted functional RNAi screen uncovers Glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology***.,** 2015 ;. doi: 10.1002/hep.28013

Villet S, Billioud G, Pichoud C, Lucifora J, Hantz O, Sureau C, Dény P, Zoulim F In vitro characterization of viral fitness of therapy resistant HBV. *Gastroenterology.*, 2009 ; 136:168-76

Walter E, Keist R, Niederöst B, Pult I, Blum HE. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology*., 1996 ; 24 (1):1-5

Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. *Hepatology.*, 2008 Jul ; 48 (1):88-98

Warren KS, Heeney JL, Swan RA, Heriyanto, Verschoor EJ. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (Pongo pygmaeus). *J Virol.*, 1999 ; 73:7860-5

Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T. NTCP and beyond: opening the door to unveil hepatitis B virus only. *Int J Mol Sci*., 2014 ; 15 (2): 2892-905

Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol*., 2005 ; 32 (2):102-12

Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol.*, 2010 ; 58:267-72

Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol.*, 1987 *;* 61 (3)**:**904-11

Xie Y, Zhai J, Deng Q, Tiollais P, Wang Y, Zhao M. Entry of hepatitis B virus: Mechanism and new therapeutic target. *Pathol. Biol*., 2010 ; 58 301-7

Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*, 2012 ; 1: e00049

Yu H, Yuan Q**,** Ge SX**,** Wang HY**,** Zhang YL**,** Chen QR**,** Zhang J**,** Chen PJ**,** Xia NS**.** Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One*., 2010 ; 5 (2):e9297

Zoutendijk R, Reijnders JG, Zoulim F, Brown A, Mutimer DJ, Deterding K, Hofmann WP, Petersen J, Fasano M, Buti M, Berg T, Hansen BE, Sonneveld MJ, Wedemeyer H, Janssen HL; VIRGIL Surveillance Study Group. Virological response to entecavir is associated with a better clinical outcome in chronic hepatitis B patients with cirrhosis. Gut., *2013* ; 62 (5):760-5

Annexe 1 : Séquences consensus VHB de génotype D

HBVdb (Lyon, http://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/), release 24.0 (consultée le 01/10/2015)

>Séquence consensus (acide aminé) protéine S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS
DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSP
FLPLLPIFFCLWVYI

>Séquence consensus (acide aminé) protéine L

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSS
GTVNPVPTTASPISSIFSRIGDPALNMENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTT
VCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYYQGMLPVCPLIPGSSTTS
TGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGL
SPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI

Annexe 2 : Séquences consensus VHB de génotype A

HBVdb (Lyon, http://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/), release 24.0 (consultée le 01/10/2015)

>Séquence consensus (acide aminé) protéine S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGY
RWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTD
GNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPF
IPLLPIFFCLWVYI

>Séquence consensus (acide aminé) protéine L

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAANQVGVGAFGPG
LTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGPQPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPRVR
GLYFPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISARTGDPVTNMENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSW
WTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVC
PLIPGSTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSWLSLLV
PFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLPIFFCLWVYI

Annexe 3 : Séquences aa VHB des patients resolver

- ❖ Génotype D

>R1-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS
DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSP
FLPLLPIFFCLWVYI

>R1-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPEANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSS
SGTVNPVPTTVSPISSIFSRIGDPALN

>R2-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPKSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSAGPCRTCTTTAQGTSMFPSCCCTKPS
DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSSLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSP
FLPLLPIFFCLWVYI

>R2-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGIIQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVKGLYFPAGGSSS
GTVNPVPTTASPISSIFSRIGDPALN

>R3-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLSFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS
DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPRLCSILSP
FLPLLPIFFCLWVYI

>R3- preS (del 7AA)

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPPAGGSSSGTVNPVP
TTASPLSSIFSRIGDPALN

>R4-S

MENITSGFLRPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSAGPCRTCTTTAQGTSMYPSCCCTKRS
DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLPVQFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSP
FLPLLPIFCCLWVYI

>R4-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGIIQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGFSS
GTVNPVPTTASPISSIFSRIGDPALN

>R5-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPKSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPS
DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWFSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSP
FLPLLPIFFCLWVYI

>R5-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWTSSTFHQTLQDPKVRGLYFPAGGSSS
GTVNPVPTTASPISSILSRIGDPALN

>R6-S

MENITS[G/*]FLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGETTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTC
PGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLTFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCT
KPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSCLSSLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPNLCRI
LSPFLPLLPIFFYLWVSI

>R6-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSS
GTVNPVPTTVSHISSIFSRIGDPALN

❖ Génotype A

>R1A-S

MENITSGFLGPLLVLQA[G/V]YFLLTRILTIPQSLD[S/L]WWTSLSF[P/L][E/G]G[T/S]PVCLGQNSQSPTSN
HSPTSCP[Q/P][T/I]CPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIP[R/K/G/E]STTTS[T/M/V
/A]GPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTD[G/S]NCTCIPIPSSWA[F/S]AKYLWEWA[L/S][A/V]RFSWLSL
LVPFVQWF[A/V]GLSPTVWLSAIWMM[W/L]YWGP[S/G]L[C/S][N/S]IVRPFIPLLPIFFCLWVYI

>R1A-preS

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAANQVGVGAFGPG
LTPPHGGILGWSPQAQGILTTMPTSPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPKV
RGLYFPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISATTGGPVTN

>R2A-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGY
RWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTD
GNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSWLSLLVPFVQ[*/W]FVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIV
SPFIPLLPIFFCLWVYI

>R2A-preS

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPTANQVGVGAFGPGL
TPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPRVR
GLYFPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISARTGDPVTN

Annexe 4 : Séquences aa VHB des patients non resolver

- **Génotype D**

>NR1-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTC**T**T**P**AQGTSMYPSCCCTKPS
DGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSP
FLPLLPIFFCLWVYI

>NR1-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPPASTNRQSGRKPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSS
GTVNPVPTTVSHISSIFSRIGDPALN

>NR2-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTC**M**T**T**AQGTSMYPSCCCTKP
SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWDWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVMWMMWYWGPSLYSIL
SPFLPLLPIFFCLWVYI

>NR2-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGLTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSS
GTVNPVPTTASPLSSIFSRIGDPALN

>NR3-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTC**M**T**T**AQGTSMYPSCCCTKP
SDGNCTCIPIPSSWAFVKFLWEWASARFSWFSLLVPFVQWFVGLSPTVWLL[A/V]IWMMWYWG[R/P]S
LFSILSPFIPLLPIFFCLWVYI

>NR3-preS

MGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGLTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQP----------
XPAGGSSSGTVNPVP[T/I]TASPLSSIFSRIGDPALN

>NR4-S

MENITSGLLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPKSLDSWWTSLSFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTC**M**T**T**AQGTSMYPSCCCTKP
SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVILMMWYWGPSLYSILSP
FLPLLPIFFCLWVYI

>NR4-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPKVRGLYFPAGGSS
SGTVNPVPTTASPISSIFSRIGDPALN

>NR5-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGNTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPL--
LNSTTSAGPCRTC**T**T**T**AQGTSMYPYCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFV
QWFVGLSPTVWLLVIWMMWYWGPNLYSILRPFLPLLPIFFCLWVYI

>NR5-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGIIQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSS
GTVNPVPTTASPISSIFSRIGDPALN

>NR6-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTC**M**T**T**AQGTSMYPSCCCTKP
SDGNCTCIPIPSSWAFAKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILS
PFLPLLPIFLCLWVYI

>NR6-preS

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWS
PQAQGILQTLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSS
GTVNPVPTTASPLSSIFSRIGDPALN

❖ Génotype A

>NR1A-S

MENITSGFLGPLLALQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLSFLGGAPVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPNCPG
YRWMYLRHFIIFLFILLLCLIFLLVLLDCQGMLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPT
DGNCTCIPIPSSWAFAKFLWEWASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLLAIWMMWYWGPSLYSIV[R/
S]PFIPLL[P/L]IFFCLWVYI

>NR1A-preS

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAANQVGVGAFGPG
LTPPHGGLLGWSPQAQGILTT?STIPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQA?QWNSTAFHQALQDPRVR
GLYLPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISARTGDPVTN

>NR2A-S

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGY
RWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTD
GNCTCIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPF
IPLLPIFFCLWVYI

>NR2A-preS

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAANQVGVGAFGPG
LTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPRV
RGLYFPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISARTGDPVTN

Annexe 5 : Evaluation de la pression de sélection

- ❖ Ratios dN/dS par la méthode Nei-Gojobori en utilisant la correction de Jukes–Cantor (MEGA 5.2 software)

Remarque :

Les substitutions synonymes (Ds), conduisent à des mutations neutres car elles ne changent pas l'acide aminé traduit. Les substitutions non synonymes (Dn), qui conduisent à un changement de l'aa peuvent avoir un impact délétère, avantageux ou neutre sur la protéine.

L'estimation de la pression de sélection (w) est possible grâce au ratio Dn/Ds. Quand il est supérieur à 1, une pression de sélection positive s'exerce qui favorise les changements. Quand ce ratio est inférieur à 1, on est en présence d'une sélection purifiante. Ainsi les changements sont contre-sélectionnés puisque Ds est bien supérieur à Dn (exemple : les gènes de ménage). Enfin, lorsque le ratio est égal à un, il n'y a pas de variation. On dit que le gène subit une sélection relâchée ou neutre. (exemple : les pseudogènes).

- ✓ Génotype D, patients Resolvers

Species 1	Species 2	Distances (dN/dS)	Std. Error
Consensus Genotype D	R1	0.145	-1.468
	R2	0.493	-1.413
	R3	0.093	-1.723
	R4	0.606	0.517
	R5	0.065	-1.859
	R6	0.597	-0.531

- ✓ Génotype D, patients Non Resolvers

Species 1	Species 2	Distances (dN/dS)	Std. Error
Consensus Genotype D	NR1	0.321	-0.996
	NR2	0.167	-1.392
	NR3	0.401	-0.843
	NR4	0.147	-1.459
	NR5	0.549	-0.602
	NR6	0.058	-1.917

✓ Génotype A, patients Resolvers

Species 1	Species 2	Distances (dN/dS)	Std. Error
Consensus Genotype A	R1A	0.137	0.00
	R2A	1.00	1.497

✓ Génotype A, patients Non Resolvers

Species 1	Species 2	Distances (dN/dS)	Std. Error
Consensus Genotype A	NR1A	0.002	0.00
	NR2A	1.00	1.497

Annexe 6 : Séquences (acide nucléique et aa) du plasmide pT7HB2.7 correspondant à l'ORF S

>Plasmide-pT7HB2.7 (wild type) AN

ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGA
CAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAA
CTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCCTCC
AACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCTGCTAT
GCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGA
TCCTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTAT
CCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGG
CTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATT
TGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGG
GGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGT
ATACATT

>Plasmide- pT7HB2.7 (wild type) aa

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPG
YRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKP
SDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILS
PFLPLLPIFFCLWVYI

Annexe 7 : Protocole provisoire du Western Blot

REACTIFS

- ➔ Laemmli
  - Tris HCl 0.5M pH 6.8 = 1 mL
  - SDS 10% = 2 mL
  - Glycérol = 1mL
  - B mercaptoethénol (1M) = 100µL (2%)
  - Bleu de bromophénol 0.5% = 100µL
  - H_2O ultrapure = 0.8 mL
- ➔ Tampon gel séparation
  - Tris – HCl 1.5 M pH 8.8 dans de l'eau ultrapure
- ➔ Tampon gel concentration
  - Tris – HCl 0.5 M pH 6.8 dans de l'eau ultrapure
- ➔ Tampon de migration
  - Tris Glycine 0.025M pH 8.3 dans de l'eau distillée
- ➔ Tampon de transfert
  - Tris Glycine 0.012M pH 8.3 (50mL de tris glycine 20X)
  - Méthanol 200 mL
  - Eau distillée 750 mL
- ➔ Tampon de lavage TBS-L
  - Tris 0.05M pH 7.5 dans de l'eau distillée
  - NaCl 0.2M
  - Tween 0.01%
- ➔ Tampon de saturation TBS-S
  - Tris 0.05M pH 7.5 dans de l'eau distillée
  - NaCl 0.2M
  - Tween 0.01%
  - 5% de régilait
- ➔ Tampon de dilution des Ac
  - Tris 0.05M pH 7.5 dans de l'eau distillée
  - NaCl 0.2M
  - 0.5% de régilait
- ➔ Gel de séparation 12 % (10 mL = 2 minigel)
  - Acrylamide bis 40% (37.5 :1) = 3mL
  - Tris 1.5M pH 8.8 = 2,5 mL (préparé dans de l'eau distillée)
  - SDS 10% = 100µL
  - Eau ultrapure = 4.5 mL
  - Homogénéiser et dégazer
  - Ajouter persulfate d'ammonium 10 % = 100µL
  - TEMED = 10µL
- ➔ Gel de concentration 5% (Vf = 5 mL : 2 minigels)
  - Acrylamide bis 40% (37.5 : 5) = 0.63 mL
  - Tris 0.5M pH 6.8 = 1.2 mL (préparé dans de l'eau distillée)
  - SDS 10% = 50µL
  - Eau ultrapure = 3.1 mL
  - Homogénéiser et dégazer
  - Ajouter persulfate d'ammonium 10 % = 50µL
  - TEMED = 5µL

PREPARATION DES ECHANTILLONS

A. Surnageant

➔ 2mL de la production + 500µLde PEG 40% en agitation à +4°C sur une nuit

➔ Centrifugation 4500g pendant 1h30

- ➔ Retirer doucement le surnagent (laisser 500µL environ pour ne pas perdre) et reprendre le culot dans 1mL de PBS 1X
- ➔ Centrifugation 4500g pendant 1h
- ➔ Laisser 250 µL de PBS et reprendre le culot dans 250 µL de tampon Laemmli (solution d'échantillon d'électrophorèse)
    - Tris HCl 0.5M pH 6.8 = 1 mL
    - SDS 10% = 2 mL
    - Glycérol = 1mL
    - B mercaptoethénol (1M) = 100µL (2%)
    - Bleu de bromophénol 0.5% = 100µL
    - H2O ultrapure = 0.8 mL
    - (préparation des échantillons en les diluant V/V dans du tampon de Laemmli)

B. Culot cellulaire

- ➔ Travailler toujours sur glace
- ➔ Laver les puits de la plaque au PBS (sur glace) avec le PBS 1X glacé
- ➔ Retirer le PBS
- ➔ Procéder à la lyse directement dans les puits ou trypsination + congélation à -80°C
    - Utiliser le tampon de lyse glacé (500µL par puits environ ou directement dans le falcon cellules trypsinées)
        - 50mmol/L de Tris HCl pH=8
        - 1mmol/L EDTA
        - 1% substitut NP – 40
    - Gratter les cellules si directement dans les puits
    - Récupérer le tout dans un Eppendorf glacé
    - Agitation 30 minutes à 4°C
    - Centrifugation 20 minutes à 12 000 rpm à +4°C
    - Aspirer le surnagent à remettre dans un tube glacé à +4°C et jeter le culot cellulaire
    - Ajouter 250µL de tampon de Laemmli dans 250µL de surnagent (préparation des échantillons en les diluant V/V dans du tampon de Laemmli)

C. Détermination de la concentration en protéine totale

- ➔ Test de Bradford avec une gamme étalon BSA spectro
- ➔ Possibilité de congélation des échantillons à -20 à -80°C jusqu'à utilisation

ELECTROPHORESE

A. Montage et préparation des gels

- ➔ Monter les 2 plaques avec les espaceurs sur le support
- ➔ Visser après avoir vérifié leur position
- ➔ Fixer sur le support de coulage vertical en clipant
- ➔ Vérifier l'étanchéité
- ➔ Préparer les gels
    - Gel de séparation 12% (Vf = 10 mL : 2minigels)
        - Acrylamide bis 40% (37.5 :1) = 3mL
        - Tris 1.5M pH 8.8 = 2,5 mL (préparé dans de l'eau distillée)
        - SDS 10% = 100µL
        - Eau ultrapure = 4.5 mL
        - Homogénéiser et dégazer
        - Ajouter persulfate d'ammonium 10 % = 100µL
        - TEMED = 10µL
            - Attention polymérisation avec les deux derniers produits
        - Homogénéiser puis couler 3.5mL entre les deux plaques avec une pipette P5000
        - Compléter avec de l'eau distillée et laisser polymériser 10 minutes environ
    - Gel de concentration 5% (Vf = 5 mL : 2 minigels)
        - Acrylamide bis 40% (37.5 : 5) = 0.63 mL
        - Tris 0.5M pH 6.8 = 1.2 mL (préparé dans de l'eau distillée)
        - SDS 10% = 50µL

- Eau ultrapure = 3.1 mL
- Homogénéiser et dégazer
- Ajouter persulfate d'ammonium 10 % = 50µL
- TEMED = 5µL
- Après avoir éliminé l'eau par retournement et absorbé par capillarité sur papier filtre : couler entre deux plaques avec une pipette P5000
- Ajouter le peigne
- Laisser polymériser au moins 15 minutes
- Oter délicatement le peigne et rincer les puits à l'eau distillée
- Positionner les gels dans le support à électrophorèse
- Mettre le support dans la cuve
- Remplir avec le tampon de migration
    - Tris glycine 0.025M pH = 8.3 dans de l'eau distillée

➔ Dépôts des échantillons
- Prévoir des dépôts de 10 à 20 µL contenant 20 et 50µg de protéines totales
- Percer le bouchon des tubes
- Faire chauffer 3 minutes à 95°C
- Vortexer
- Ne pas prendre les puits du bord
- Déposer le marqueur de poids moléculaire (coloré), le témoin positif (1 patient AgHBs ++ ?), le témoin négatif (blanc des plaques de productions) et nos échantillons

➔ Migration
- Faire migrer 15 minutes à 80V et 400 mA constant
- Puis 1h45 à 150V et 400mA constant

TRANSFERT

➔ Retirer les gels du support après arrêt du générateur
➔ Dévisser et retirer délicatement les plaques de verre
➔ Tremper les membranes de transfert (PVDF) 2 minutes dans le méthanol (ou éthanol)
➔ Puis dans le tampon de transfert
- Tris glycine 0.012M pH8.3 (50mL de tris glycine 20X)
- méthanol = 200mL
- eau distillée = 750mL

➔ tremper les deux tampons blancs et les 2 papiers filtres dans le tampon de transfert
➔ décoller délicatement la plus grande plaque de verre du gel
➔ poser un papier filtre imbibé sur le gel et le décoller de la plaque de verre
➔ le déposer sur le côté noir du support
➔ recouvrir le gel avec la membrane de PVDF puis la recouvrir avec le papier filtre
➔ chasser les bulles d'air entre le gel et la membrane et refermer l'ensemble
➔ mettre l'ensemble dans le support puis la cuve
➔ remplir de tampon de transfert
➔ mettre le couvercle et brancher le générateur
➔ migration 100V et 250mA constant pendant 1h
➔ couper le générateur et retirer les gels et les membranes

WESTERN BLOT

➔ repérage des bandes
- récupérer les gels et les colorer au Bleu de Commassie
- récupérer les membranes et les colorer dans la solution de rouge Ponceau
- repérer les pistes de protéines et découper les bandelettes
- les déposer dans les cupules
- décolorer à l'eau distillée

➔ saturation
- ajouter 4mL par cupules de solution de saturation (TBS-S)

        - Tris 0.05M pH 7.5 dans de l'eau distillée + NaCl 0.2M + Tween 0.01% + 5% de régilait
    - incuber 1h à 37°C ou une nuit à 4°C

➔ réaction avec les Ac monoclonaux

- préparer la dilution des Ac avec le TBS-AC (1/500 et 1/1000)
    - Tris 0.05M pH 7.5 dans de l'eau distillée + NaCl 0.2M + 0.5% de régilait
- Eliminer la solution de saturation par aspiration
- Ajouter 2mL de solution d'Ac dilués (1/500 et 1/1000 pour optimisation)
- Incuber sous agitation 1h – 1h30 à 37°C ou une nuit à 4°C

➔ Réaction avec les AcII conjugués à la HRP

- Eliminer la solution d'Ac par aspiration (peut être récupéré)
- Laver chaque membrane avec 4mL de TBS-L pendant 5 minutes sous agitation
    - Tris 0.05M pH 7.5 dans de l'eau distillée + NaCl 0.2M + Tween 0.01%
- Eliminer le TBS-L par aspiration et renouveler le lavage 3 fois
- Eliminer le TBS-L par aspiration
- Ajouter 2 mL de solution d'Ac conjugué avec la HRP dilué au 1/2000 dans le TBS-AC
- Incuber 1h à 37°C

➔ Révélation

- Eliminer la solution d'Ac par aspiration
- Laver chaque membrane avec 4mL de TBS-L pendant 5 minutes sous agitation
- Eliminer le TBS-L par aspiration et renouveler le lavage 2 fois
- Laver une dernière fois avec le tampon du substrat pendant 5 minutes sous agitation
- Vider le contenu par aspiration
- Ajouter 2 mL de solution de substrat préparée préalablement
- Incuber au moins 15 minutes à 37°C

Résumé en anglais

Hepatitis B virus (HBV)-related chronic infection remains difficult to eradicate. On treatment by nucleos(t)ide analogues (NUCs), HBs Antigen (Ag) clearance is the ultimate but difficult therapeutic goal. Our aim was to investigate how variability of HBV envelope protein, crucial in viral cellular entry and targeted by host immune response, could play a role in HBsAg clearance. HBV chronically infected patients, treated by NUCs with HBsAg clearance (resolver) were matched with patients without HBsAg clearance (non resolver). Combined mutations sT125M/sP127T, associated with HBsAg persistence, displayed a lower predicted antigenicity. Ultra Deep Sequencing of S gene showed a higher variability in non resolver. Functional assays on viral particles including sT125M and sP127T mutations versus reference particles are in progress. As a conclusion, molecular features observed in non NR argue in favor of a different pattern in HBV S characteristics according to variable NUCs efficiency.
Key words: HBs antigen, envelope glycoproteins, Hepatitis B virus, Nucleos(t)ide analogues

Résumé en français:

L'hépatite B chronique reste un problème majeur de santé publique. Sous traitement par analogues nucléos(t)idiques (NUCs), l'objectif thérapeutique ultime est la clairance de l'antigène (Ag) HBs. Nous avons étudié l'influence de la variabilité des protéines d'enveloppe, impliquées dans l'entrée cellulaire du virus et cibles de la réponse immune, sur la clairance de l'Ag HBs. Des patients traités par NUCs ayant obtenu une clairance de l'Ag HBs (resolvers) ont été appariés à des non-resolver. Deux mutations combinées sT125M/sP127T, caractéristiques des non-resolver, étaient associées à une baisse de l'antigénicité prédite. L'analyse par séquençage haut débit montrait une plus grande variabilité du gène S chez les non resolver. Des tests fonctionnels portant sur des particules virales mutées en sT125M et sP127T sont en cours. Ces données moléculaires sont en faveur de l'existence de "motifs" spécifiques dans le gène S associés à la persistance de l'Ag HBs sous traitement par NUCs.
Mots clés : antigène HBs, glycoprotéines d'enveloppe, virus de l'hépatite B, analogues nucléos(t)idiques