



HAL
open science

Influence de la variabilité des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur l'évolution de l'infection évaluée par la persistance de l'antigène HBs

Marine Eschlimann

► To cite this version:

Marine Eschlimann. Influence de la variabilité des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur l'évolution de l'infection évaluée par la persistance de l'antigène HBs. Immunologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0133 . tel-01762403

HAL Id: tel-01762403

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01762403v1>

Submitted on 1 Oct 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 **Marine ESCHLIMANN**

**Influence de la variabilité des protéines d'enveloppe du virus de
l'hépatite B sur l'évolution de l'infection évaluée par la persistance de
l'antigène HBs**

Le 29 Septembre 2017

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Catherine GAUDY-GRAFFIN	MCU-PH, UMR INSERM U966, Tours
	Mr Alexis de ROUGEMONT	MCU-PH, Centre National de Référence des virus des gastroentérites (CNR-vge), Dijon
Examineurs :	Mr Bernard NAMOUR	PU-PH, UMR INSERM U954, Vandœuvre-lès-Nancy
	«Président du jury »	
	Mme Evelyne SCHVOERER	PU-PH, EA 7300 jusqu'en décembre 2017, Vandœuvre-lès-Nancy LCPME, UMR 7564, CNRS à partir de janvier 2018, Villers-lès-Nancy Directrice de thèse
Membres invités:	Mme Hélène JEULIN	MCU-PH, EA 7300 jusqu'en décembre 2017, Vandœuvre-lès-Nancy LCPME, UMR 7564, CNRS à partir de janvier 2018, Villers-lès-Nancy Co-directrice de thèse

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier tous les membres de mon jury de thèse, le Docteur Alexis de Rougemont, le Docteur Catherine Gaudy-Graffin et le Professeur Bernard Namour pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ces travaux.

Je remercie très sincèrement toutes les personnes qui m'ont aidée tout au long de ce projet.

Je souhaite remercier particulièrement ma directrice de thèse, le Professeur Evelyne Schvoerer, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail. Merci à vous pour tous vos conseils précieux, vos encouragements et pour toutes les heures consacrées à diriger cette recherche jusqu'à la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie également ma co-directrice de thèse, le Docteur Hélène Jeulin, pour m'avoir transmis son savoir-faire et m'avoir épaulée durant ces trois ans. Merci pour ton écoute, ton soutien, ta patience et tes multiples conseils qui m'ont guidé pendant ces trois années.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Jean-Pol Frippiat, directeur de l'EA 7300 SIMPA, pour son accueil au sein de son équipe. Je remercie également toute l'équipe SIMPA, qui porte bien son nom, pour tous les conseils avisés, les compétences, l'assistance et la bonne humeur qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions. Une attention toute particulière à Lisiane et Anne-Marie qui m'ont aidée et soutenue pendant ces trois années. Cette thèse n'aurait jamais été pareille sans vous.

Je remercie le Docteur Christine Legrand-Frossi, pour son aide dans le développement du modèle murin. Merci pour vos conseils, votre disponibilité et toute votre sympathie.

Je remercie également le personnel du Centre Hospitalier de Recherche Universitaire de Nancy pour son accueil lors de ces trois années. Je remercie le Docteur Myriam Bronner pour son aide précieuse dans la mise au point et la réalisation du séquençage haut-débit. Merci au Docteur Sibel Berger pour tous ses conseils experts dans le domaine de la biologie moléculaire. Je remercie toutes les techniciennes du laboratoire de Virologie et de la plateforme de génétique pour leur soutien et leur aide technique. Je remercie plus particulièrement Lucette, Nicole, Martine et Anne qui m'ont aidée sur le modèle cellulaire et m'ont soutenue durant ces trois années ; toujours de très bons conseils et une très grande sympathie. Je tiens également à remercier le Docteur Aurélie Velay pour toutes les connaissances techniques et scientifiques qu'elle m'a transmises lors de ma première année de thèse. Merci à Honorine et Manon pour leur soutien et pour cette phrase qui restera « T'inquiète paupiette, ça va bien se passer ».

J'associe à ces remerciements le Professeur Fabien Zoulim, le Docteur David Durantel et le Docteur Barbara Testoni de l'unité Inserm UI 1052 de Lyon, ainsi que le Professeur Camille Sureau et le Docteur Georges Abou-Jaoudé de l'Institut National de la Transfusion Sanguine de Paris pour leur aide précieuse dans le développement du modèle cellulaire au sein du laboratoire.

Je remercie également l'Université de Lorraine et la firme Gilead pour leur soutien financier essentiel au bon déroulement de ce projet.

Je souhaite remercier spécialement tous les membres de ma famille qui m'ont soutenue et motivée tout au long de ce projet. Une attention toute particulière à ma sœur, Loraine, qui a toujours été là, dans les bons comme dans les mauvais moments pour me soutenir et trouver les mots qu'il fallait. Je dédie également cette thèse à mes parents, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Je tiens également à remercier Kévin et tous mes amis pour m'avoir soutenue et supportée pendant ces trois dernières années.

Table des matières

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES FIGURES	10
INTRODUCTION	14
I. Le contexte épidémiologique actuel de l'hépatite B	15
II. L'origine du virus de l'hépatite B	17
III. Le cycle infectieux du virus de l'hépatite B	20
1. Structure et organisation du virus de l'hépatite B	20
2. Le cycle répliatif du VHB	24
1.1. Entrée du virus dans les cellules	25
1.1.1. Attachement du virus aux hépatocytes	25
1.1.1.1. Le récepteur HSPG « Heparan Sulfate Protéoglycan »	26
1.1.1.2. Le récepteur NTCP « Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide »	27
1.1.1.3. Des cofacteurs potentiels	29
1.1.2. Mécanisme d'entrée dans les cellules	30
1.2. Transport de la nucléocapside, décapsidation et entrée dans le noyau	32
1.3. Réparation ADN circulaire (ADNrc) incomplet et formation de l'ADNccc	33
1.4. Transcription et traduction	33
1.5. Assemblage et sécrétion	34
1.5.1. Formation et maturation de la capsid	34
1.5.2. Enveloppement et formation du virion	35
1.6. Les deux topologies de préS et le pouvoir infectieux	36
3. Les zones fonctionnelles présentes sur les protéines d'enveloppe du VHB	37
IV. Les différents modèles d'études disponibles pour étudier le VHB	40
1. Les modèles <i>in vivo</i>	40
2. Les modèles <i>in vitro</i>	45
V. La variabilité génotypique et phénotypique du virus de l'hépatite B	50
1. Les sérotypes	50
2. La variabilité génotypique	51
2.1. Corrélation entre génotypes, distribution géographique et mode de transmission	52
2.2. Les génotypes et la pathogenèse du virus de l'hépatite B	54
2.3. Les différents génotypes et la réponse aux traitements	57
3. Variabilité phénotypique du VHB	59
3.1. Les mutants du promoteur basal du core (BCP) et préC/C	60
3.2. Les mutants de la protéine X	62
3.3. Les mutants de la polymérase	62
3.4. Les mutants préS/S	64
VI. L'hépatite B	70
1. La transmission du virus de l'hépatite B	70

2. Le diagnostic de l'hépatite B et les marqueurs de l'infection par le VHB.	70
2.1. L'AgHBs	70
2.2. Les anticorps anti-HBs	71
2.3. Les anticorps anti-HBc	72
2.4. L'AgHBe	72
2.5. L'AgHBc	72
2.6. L'ADN du virus de l'hépatite B	72
2.7. Les marqueurs hépatiques	73
2.8. Les nouveaux marqueurs	73
2.8.1. L'ARN du VHB	74
2.8.2. L'AgHBcr	74
3. La physiopathologie du virus de l'hépatite B	76
3.1. L'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B	76
3.1.1. Les facteurs influençant l'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B	76
3.1.2. L'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B	77
3.2. L'immunopathogenèse du VHB	80
3.2.1. L'échappement à l'immunité innée lors d'une infection par le VHB	81
3.2.1.1. Les PRRs (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)	82
3.2.1.2. Les cellules dendritiques	83
3.2.1.3. Les cellules « Natural Killer » (NK) et NKT	84
3.2.2. L'immunité adaptative mise en jeu contre le virus de l'hépatite B	86
3.3. Le foie, la fibrose et la cirrhose	88
3.4. L'hépatite B et le développement de carcinome hépatocellulaire	90
4. La prévention et les traitements contre le virus de l'hépatite B	93
4.1. La prévention de l'infection par le VHB : les vaccins	93
4.2. Les traitements actuels utilisés contre le virus de l'hépatite B	96
4.3. Les recommandations de traitements de l'EASL 2017	96
4.4. Les nouveaux traitements en développement	100
4.4.1. Le Myrcludex B : l'inhibiteur d'entrée du virus de l'hépatite B	100
4.4.2. Un ARN interférant ciblant l'ARNm du VHB: ARC-520 (Arrowhead)	101
4.4.3. Les modulateurs d'assemblage de capsid	103
4.4.4. Les nouveaux inhibiteurs potentiels de la polymérase	104
4.4.4.1. Le Ténofovir Alafenamide	104
4.4.4.2. Le Besiclovir	105
4.4.5. L'élimination de l'ADNccc	105
4.4.6. Quelques exemples d'immunomodulateurs potentiels	107
VII. Les co-infections	109
1. La co-infection VHB/VHD	109
1.1. Le cycle répliatif du virus de l'hépatite Delta	111
1.2. Le diagnostic	113
1.3. Influence de l'infection par le virus de l'hépatite Delta sur l'histoire naturelle du virus de l'hépatite B	113
1.4. Les traitements	114
2. La co-infection VHB/VIH	115
2.1. Le virus de l'immunodéficience humaine	115
2.2. La co-infection VHB/VIH	116
2.2.1. Influence de la co-infection par le VHB sur l'infection par le VIH	117
2.2.2. Influence de la co-infection par le VIH sur l'infection par le VHB	118
2.3. Les traitements	119
2.3.1. Les traitements contre le VIH	119
2.3.2. Les traitements contre la co-infection VHB/VIH	120

OBJECTIFS	123
MATERIELS ET METHODES	127
I. Sélection des patients	128
1. Cohorte de génotype D	128
2. Cohorte de génotype A	128
3. Deux patients de génotype C	129
II. Détermination des séquences de référence pour les génotypes A, C et D	130
III. Evaluation de la variabilité du virus de l'hépatite B	130
1. Préparation des amplicons	131
2. Séquençage direct	133
2.1. Préparation des échantillons	133
2.2. Analyse des données brutes	134
3. Séquençage haut-débit	135
3.1. Préparation des échantillons	135
3.2. Préparation de la « librairie »	136
3.3. Amplification des différentes « librairies »	138
3.4. Mélange équimolaire des « librairies », PCR en émulsion et enrichissement sur « Ion OneTouch™ Enrichment System »	139
3.5. La réaction de séquençage sur le « Ion Personal Genome Machine (PGM) »	141
3.6. Analyse des données brutes	142
4. Phylogénie	143
5. Analyse des mutations	144
5.1. Analyse de la prédiction antigénique : le logiciel AnTheProt	144
5.2. Pression de sélection	146
5.3. Analyse de la diversité entre les patients	146
5.4. Analyse de la complexité des quasi-espèces	147
6. Analyses statistiques	147
IV. Modèle murin : modèle d'évaluation de la réactivité des anticorps vaccinaux murins face à un peptide présentant des mutations signatures décrites dans la cohorte de génotype D	148
1. Production des peptides	148
2. Immunisation des souris avec du vaccin anti-VHB	149
3. ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »)	149
3.1. Solutions utilisées pour la réalisation de la réaction ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »)	149
3.2. Reconstitution des peptides couplés à la BSA	149
3.3. Protocole ELISA	150
3.4. Analyse des résultats ELISA	151
V. Modèle cellulaire : évaluation de l'impact des mutations sur l'entrée du virus dans les cellules et la neutralisation par les anticorps vaccinaux humains	151
1. Production des particules virales	152
1.1. Préparation des plasmides	152
1.2. Conditions de culture des cellules Huh7	153
1.3. Transfection des plasmides et production de particules chimériques	153
1.4. Caractérisations des particules virales produites dans le surnageant	154
1.4.1. Quantification ARN VHD par RT- qPCR	154
1.4.2. Dosage des protéines d'enveloppe par CMIA (« Chimioluminescent Assay »)	155
2. Infection des cellules HepaRG et neutralisation par les anticorps vaccinaux	156

2.1. Conditions de culture des cellules HepaRG	156
2.2. Infection des cellules HepaRG par le virus de l'hépatite B : entrée du virus dans les cellules	156
2.3. Protocoles de neutralisation de l'infection par les anticorps vaccinaux sur le modèle cellulaire HepaRG	157
2.4. Quantification des particules ayant infectées les cellules	158
2.5. Détermination du pourcentage de neutralisation	159
TRAVAUX REALISES : PRESENTATION DES ARTICLES PUBLIES ET SOUMIS	160
ETUDE N°1	161
Objectifs	162
Résultats principaux	162
Conclusion	165
ETUDE N°2	178
Objectifs	179
Résultats principaux	179
Conclusion	180
ETUDE N°3	193
Objectifs	194
Résultats principaux	194
Conclusion	195
DISCUSSION	204
I. La variabilité des protéines d'enveloppe du VHB explorée par séquençage haut-débit.	206
1. Présentation générale	206
2. Différentes méthodes de séquençage haut-débit	207
3. L'analyse des haplotypes	208
4. Le seuil de détection	209
II. La variabilité des protéines d'enveloppe du VHB et l'évolution de l'infection évaluée par la persistance de l'AgHBs.	210
1. Comparaison de la cohorte de patients infectés par le VHB de génotype A ou D	210
1.1. Clairance de l'AgHBs et réponse immunitaire de l'hôte	210
1.2. Signatures moléculaires dans les glycoprotéines du VHB	211
2. La cohorte des patients infectés par du VHB de génotype C	213
CONCLUSION	216
VALORISATIONS SCIENTIFIQUES	218
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	221

Liste des principales abréviations

A

Aa : acide aminé

ABI : Applied Biosystems

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNase : Déoxyribonucléase

ADNccc : ADN circulaire fermé de manière covalente, ADN super enroulé « covalently closed circular DNA »

ADNrc : ADN relaxé circulaire

ADV : Adéfovir dipivoxil

AES : Accident d'exposition au sang

AgHBc : Antigène HBc (core)

AgHBe : Antigène HBe (précore)

AgHBs : Antigène HBs (surface)

AgHD : Antigène hépatite Delta

AgHD-L : Antigène hépatite Delta – « large »

AgHD-S : Antigène hépatite Delta – « small »

AGL : Boucle antigénique (« AntiGenic Loop »)

Akt : « Protein kinase B »

ALAT : ALanine AminoTransférase

An : Acide nucléique

Anti HBe : Anticorps dirigé contre l'AgHBe

Anti-HBc : Anticorps dirigé la protéine core

Anti-HBs : Anticorps dirigé contre l'AgHBs

AP-1, AP-2 : protéine activatrice-1, protéine activatrice-2 (« Activator protein »)

APOBEC : « Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like »

ApoH : Apolipoprotéine H

ARF-1 : « Adenosine diphosphate-ribosylation factor 1 »

ARN : Acide RiboNucléique

ARNase H : Ribonucléase H

ARNase : Ribonucléase

ARNi : ARN interférant

ARNm : ARN messenger

ARNmi : Micro-ARN

ARNpg : ARN pré-génomique

ARNsi : ARN simple brin interférant

ASAT: Aspartate transaminase

ASGPR : Récepteur Asiaglycoprotéine « Asialoglycoprotein receptor »

ASHV : Virus de l'hépatite de l'écureuil arctique

B

BAM : « Binary Alignment Map »

BCoV : Coronavirus respiratoire bovin

BCP : Promoteur basal du core

BIM : « Building Information Model »

Blast : « Basic Local Alignment Search Tool »

BSA : Albumine sérique bovine

C

C/EBP : « CCAAT/enhancer binding protein »

cART : Thérapies antirétrovirales combinées

CCR5 : « C-C chemokine receptor type 5 » :

CD : Cluster de différenciation

CHBV : Virus de l'hépatite B de la grue,

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CHRU : Centre Hospitalier de Recherche Universitaire

CMIA : « Chemiluminescent Assay »

CO₂ : Dioxyde de carbone

COX : Cyclo-oxygénase

CPP : Comité de Protection des Personnes

CRF : « Circulating recombinant form »

CSMD3 : « CUB and Sushi Multiple Domain 3 »

Cter : Extrémité carboxy-terminale (C-terminale)

CYL : Domaine cytosolique

CYP : Cytochrome P

CYP7A1 : Enzyme cholestérol 7 α -hydroxylase

D

DC : Cellules dendritiques

DDX3 : « DEAD-box RNA helicase »

DHBV : virus de l'hépatite B du canard,

DMEM : « Dulbecco's Modified Eagle Medium »

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dN : Nombre de mutation non-synonyme

dNTP : Nucléoside triphosphate

DR : Séquence directe, « Direct Repeat »

dS : Nombre de mutation synonyme

E

EASL : « European Association for the Study of the Liver »

ELISA : « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »

Enh : « Enhancer »

ESCRT : « Endosomal Sorting Complexes Required for Transport »

ETV : Entécavir

F

FAH : Fumarylacetoacetate hydrolase

G

Gamma GT : Gamma-glutamyl-transpeptidases

GGH : « Ground Glass Hepatocyte »

GSHV : Virus de l'hépatite de l'écureuil terrestre

H

H₂O : Eau

HAT : Heteroaryldihydropyrimidine

HBIG : Immunoglobulines anti-VHB

HBVdb : Database VHB

HBx : Protéine X

HHBV : Virus de l'hépatite B de héron,

HLC : Cellules de type hépatocellulaire, « hepatocyte-like cell »

HNF : « Hepatocyte nuclear factor »

hNTCP : « Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide » humain

HPLC : chromatographie haute performance en milieu liquide

HRP : « HorseRadish Peroxidase »

HSC : Cellule souche hématopoïétique

HSPG : « Heparan Sulfate Proteoglycan »

hTERT : « Human Telomerase reverse transcriptase »

HuHEP : Souris humanisées portant des xénogreffes d'hépatocytes humains

I

IBCP : « Institute of Biology and Chemistry of proteins »

iDC : Cellule dendritique immature

IFN : Interféron

IFN α -pégylé : Interféron alpha pégylé

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

INNTI : Inhibiteurs non nucléotidiques de la rétrotranscriptase

INTI : Inhibiteur nucléotidique de la rétrotranscriptase

INVS : Institut national de Veille sanitaire

iPS : Cellule souche pluripotente induite « Induced pluripotent stem cell »

IRF3 : « Interferon regulatory factor »

ISG : Gènes stimulés par l'interféron, « Interferon-stimulated genes »

ISP : « Ion Sphere Particules »

L

AgHBcr : « Hepatitis B virus core-related antigen »

LAM : Lamivudine

LB : milieu Luria-Bertani, « lysogeny broth »

LHB : grande protéine d'enveloppe du VHB (« Large »)

Low TE : Tampon Tris HCl/Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique (EDTA)

LPL : Lipoprotéine lipase

LTR : Séquences terminales longues répétées (« Long terminal repeat »)

M

MAP : « Mitogen-activated protein »

MAPK : « Mitogen-activated protein kinase »

MDA5 : « Melanoma Differentiation-Associated protein 5 »

mDC : Cellule dendritique mature

MHB : moyenne protéine d'enveloppe du VHB (« Medium »)

MHR : région hydrophile majeure, « Major Hydrophylic Region »,

MSM : « Man who have sex with men »

mTOR : « mammalian target of rapamycin »

MxA : « Interferon-induced guanosine triphosphate-binding protein »

MyD88 : « Myeloid differentiation primary response gene 88 »)

N

NAFLD : Stéatose hépatique non alcoolique, « Non-alcoholic fatty liver disease »

NCBI : « National Center for Biotechnology Information »

ND : pas de données disponibles

Nedd4 : « Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 »

NFκB : « Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells »

NK : Cellules « Natural Killer »

NKT : Cellules présentant les marqueurs des lymphocytes T et des cellules « Natural Killer »

NLR : « Nucleotide oligomerization domain receptors »

NOD : « Non-obese diabetic »

NR : « non-répondeurs »

NTBC : Nitisinone

NTCP : « Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide »

Nter : N-terminal

NUC : analogues nucléos(t)idiques

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORF : Cadre de lecture ouvert, « Open Reading Frame »

P

PAMP : Motif moléculaire associé aux pathogènes

pb : Paire de bases

PBS : « Phosphate Buffered Saline »

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne, « Polymerase Chain Reaction »

PD-1 : « Programmed cell death protein 1 »

PD-1L : « Programmed cell death protein 1 ligand »

PEG : Polyéthylène Glycol

PGDF : « Platelet-derived growth factor »

PGM : « Personal Genome Machine »

PHH : hépatocyte primaire humain, « Primary Human Hepatocyte »

pHSA : protéine sérum albumine humaine polymérisée, « Polymerized Human Serum Albumin »

PPHBV : Virus de l'hépatite B de perroquet

PRR : « Pattern Recognition Receptor »

PTH : Hépatocyte primaire de Tupaia belangeri, « Primary Tupaia Hepatocyte »

Q

qPCR : PCR quantitative, PCR en temps réel

Qsp : quantité suffisante pour

R

R : « Répondeur »

Rab : « Ras-related protein »

RACE : Amplification rapide des extrémités d'ADNc, « Rapid amplification of cDNA ends »

RE : Réticulum endoplasmique

RGHV : Virus de l'hépatite de l'oie

RiG : « retinoic acid-inducible gene »

RISC : « RNA induced silencing complex »

ROS : Espèce réactive à l'oxygène

Rpm : tours par minutes

RT : Rétrotranscriptase

RT-qPCR : rétrotranscriptase PCR en temps réel

S

SCAA1 : « Human squamous cell carcinoma antigen 1 »

SCID : « Severe Combined Immune Deficient »
SHB : petite protéine d'enveloppe du VHB (« Small »)
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise
SLC : Transporteur de la famille des « Solute Carrier »
Sn : Entropy de Shannon
SPRI : Immobilisation Réversible en Phase Solide
SRF/SRE : « Serum Response Factor/Serum Response Element »
STAT : « Signal transducer and activator of transcription »
STHBV : virus de l'hépatite B de cigogne
SVF : Sérum de veau foetal
SVP : Particules sous-virales

T

TAF: Ténofovir Alafenamide
TBHBV : Virus de l'hépatite B de la chauve-souris
TBV : Telbivudine
TCR : Récepteur des lymphocytes T (« T cell receptor »)
TDF: Ténofovir disoproxil fumarate
TGF- β : « Transforming growth factor beta »
Th : Lymphocyte T helper
Tim-3 : «T cell immunoglobulin mucin-3 »
TK : Thymidine Kinase
TLM : « Cell permeable peptide translocation motif »
TLR : « Toll Like Receptor »
TM : Domaine transmembranaire
Tm : Température de fusion
TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF α : facteur de nécrose tumorale, « Tumor necrosis factor alpha »
TRAIL : «Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand »
TRIF : « TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β »
TSH : « Thyroid Stimulating Hormon »

U

UI : Unité internationale
uPA : « Urokinase-type Plasminogen Activator »

V

VEGF : « Vascular endothelial growth factor »
Vge : Volume équivalents génomes
VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VHD : Virus de l'hépatite Delta

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

W

WHV : Virus de l'hépatite de la marmotte

WMHBV : Virus de l'hépatite B de singe laineux

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Cofacteurs potentiels pour l'entrée du virus de l'hépatite B à la surface des hépatocytes [Xie <i>et al.</i> , 2010].	30
Tableau 2 : Récapitulatif des avantages et des inconvénients des différents modèles cellulaires disponibles pour étudier le virus de l'hépatite B (VHB : virus de l'hépatite B ; PHH : Hépatocyte primaire humain, « Primary Human Hepatocyte » ; PTH : Hépatocyte primaire de Tupaïa, « Primary Tupaïa Hepatocyte », PEG : polyéthylène glycol, DMSO : diméthylsulfoxyde).	49
Tableau 3 : Récapitulatif des bases moléculaires permettant de déterminer les sérotypes et les sous-types associés au génotype du virus de l'hépatite B [Kay et Zoulim, 2007 ; Servant-Delmas <i>et al.</i> , 2007].	51
Tableau 4 : Distribution géographique des génotypes, des sous-génotypes et des sérotypes du virus de l'hépatite B à travers le monde [Kramvis, 2014 ; Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Tong et Revill 2016].	52
Tableau 5 : Comparaison des différents génotypes du virus de l'hépatite B en fonction des caractéristiques cliniques, virologiques et la réponse aux traitements antiviraux (ND : pas de données disponibles) [Sundul, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Hassemer <i>et al.</i> , 2017].	58
Tableau 6 : Mutations de résistance associées aux traitements par analogues nucléos(t)idiques décrites sur le gène de la polymérase du virus de l'hépatite B [Lazarevic, 2014 ; Yano <i>et al.</i> , 2015].	63
Tableau 7 : Récapitulatif des épitopes reconnus par les lymphocytes B et les lymphocytes T répertoriés par Desmond <i>et al.</i> , (2008) et Lin <i>et al.</i> , (2013).	67
Tableau 8 : Récapitulatif des résistances croisées pouvant exister entre les différents traitements NUCs qui sont utilisés pour traiter une infection par le virus de l'hépatite B (S : sensible, I : intermédiaire, diminution de la sensibilité, R : résistant, LAM : Lamivudine, ADV : Adéfovir dipivoxil, TBV : Telbivudine, ETV : Entécavir, TDF : Ténofovir disoproxil fumarate, TAF : Ténofovir Alafenamide) [EASL, 2017].	98
Tableau 9 : Mélange réactionnel utilisé pour amplifier les gènes préS et S du virus de l'hépatite B.	131
Tableau 10 : Récapitulatif des différentes amorces utilisées pour l'amplification du gène S du virus de l'hépatite B.	132
Tableau 11 : Récapitulatif des différentes amorces utilisées pour l'amplification de la région préS du virus de l'hépatite B.	132
Tableau 12 : Programme de PCR utilisé pour amplifier les gènes S et préS du virus de l'hépatite B.	133
Tableau 13 : Mélange réactionnel utilisé pour réaliser la PCR de séquençage direct des gènes préS et S du virus de l'hépatite B.	133
Tableau 14 : Programme de PCR utilisé pour réaliser la PCR de séquençage des gènes préS et S du virus de l'hépatite B.	134
Tableau 15 : Mélange réactionnel utilisé pour fragmenter les amplicons obtenus à partir des gènes S et préS, nécessaire pour la technique de séquençage haut-débit Ion Torrent.	136
Tableau 16 : Mélange réactionnel utilisé pour fixer des adaptateurs barcodés à chaque amplicon lors de la préparation des échantillons pour le séquençage haut-débit Ion Torrent.	137

Tableau 17 : Mélange réactionnel utilisé pour amplifier la « librairie » destinée au séquençage haut-débit Ion Torrent.	139
Tableau 18 : Programme de PCR utilisé pour amplifier la « librairie » destinée au séquençage haut-débit Ion Torrent.	139
Tableau 19 : Mélange réactionnel utilisé pour transfecter les cellules Huh7 à l'aide d'un plasmide muté aux positions sT125M/sP127T (« non-répondeur ») ou sT125T/sP127T (« muté 1 ») et produire des particules chimériques VHB/VHD.	153
Tableau 20 : Mélange réactionnel utilisé pour quantifier les particules chimériques VHB/VHD post-transfection par RT-qPCR dans le thermocycleur Light Cycler.	155
Tableau 21 : Programme d'amplification utilisé pour quantifier les particules chimériques VHB/VHD post-transfection par RT-qPCR dans le thermocycleur Light Cycler.	155
Tableau 22 : Mélange réactionnel utilisé pour l'infection des cellules HepaRG par les particules chimériques VHB/VHD.	157
Tableau 23 : Mélange réactionnel utilisé pour réaliser la réaction de rétrotranscription nécessaire à la quantification de l'ARN du virus de l'hépatite Delta dans le thermocycleur ABI 7500.	158
Tableau 24 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR en temps réel permettant de quantifier l'ARN du virus de l'hépatite Delta présent dans les cellules HepaRG infectées (préalablement rétrotranscrit en ARN).	159
Tableau 25 : Protocole de PCR en temps réel permettant de quantifier l'ARN du virus de l'hépatite Delta présent dans les cellules HepaRG infectées (préalablement rétrotranscrit en ARN).	159
Tableau 26 : Pourcentage de neutralisation de l'infection par les anticorps vaccinaux humains observés chez les variants « non-répondeur » sT125M/sP127T et « muté 1 » sT125T/sP127T, en fonction des dilutions en anticorps vaccinaux testés sur un modèle d'infection du virus de l'hépatite B faisant intervenir des cellules HepaRG.	164
Tableau 27 : Pourcentage de neutralisation de l'infection par les anticorps vaccinaux humains observés chez les variants « muté 1 » sT125T/sP127T et « non-répondeur » sT125M/sP127T avec une dilution au 1/100 ^{ème} des anticorps testés sur un modèle d'infection du virus de l'hépatite B faisant intervenir des cellules HepaRG. ...	164
Tableau 28 : Les différentes caractéristiques des méthodes de séquençage haut-débit actuellement sur le marché [Glenn, 2011].	207

Liste des Figures

Figure 1 : Distribution géographique des infections chroniques du virus de l'hépatite B dans le monde (2014) [Center for Disease Control and Prevention (http://www.cdc.gov)].	16
Figure 2 : Estimation du taux de prévalence de l'AgHBs pour 100 000 habitants en France d'après les données issues de l'enquête réalisée par Labohep en 2013 [Bulletin épidémiologique de l'institut national de veille sanitaire, 2015].	16
Figure 3 : Arbre phylogénétique de la famille des Hepadnaviridae (virus de l'hépatite B : WMHBV singe laineux, GSHV écureuil terrestre, ASHV écureuil arctique, WHV marmotte, DHBV canard, RGHV oie, CHBV grues, HHBV héron, STHBV cigogne, PHBV perroquet) [Locarnini <i>et al.</i> , 2013].	17
Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation génomique du virus de l'hépatite B [Pollicino <i>et al.</i> , 2014].	20
Figure 5 : Représentation graphique de la proportion des trois protéines d'enveloppe (les petites protéines d'enveloppe SHBs en gris, les moyennes MHBs en noir et les grandes LHBs en rouge) présentes sur le virus de l'hépatite B [Patient <i>et al.</i> , 2008].	23
Figure 6 : Schématisation des différents types de particules virales du virus de l'hépatite B [Lepère-Douard et Gripon, 2010].	23
Figure 7 : Représentation schématique de la particule infectieuse du virus de l'hépatite B [Pollicino <i>et al.</i> , 2014].	24
Figure 8 : Cycle de répliation du virus de l'hépatite B [Morikawa <i>et al.</i> , 2016].	25
Figure 9 : Mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite B (VHB) dans les hépatocytes (HSPG : « Heparan Sulfate Proteoglycan », NTCP : « Na ⁺ Taurocholate Cotransporting Polypeptide ») [Li et Urban, 2016].	26
Figure 10 : Les étapes précoces du cycle infectieux du virus de l'hépatite B [Hayes <i>et al.</i> , 2016].	32
Figure 11 : Représentation schématique du rôle des deux topologies iprés et eprés des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B impliqué dans le processus de maturation et le pouvoir infectieux du virus de l'hépatite B [Watashi, 2016].	37
Figure 12 : Cartographie des zones fonctionnelles présentes sur les régions prés et S codant les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B (pHSA : « polymerized Human Serum Albumin ») [Locarnini et Yuen, 2010 ; Lin <i>et al.</i> , 2012 ; Urban <i>et al.</i> , 2014].	38
Figure 13 : Représentation de la région hydrophile majeure (MHR) présent sur les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B [Gencay <i>et al.</i> , 2017]. Chaque acide aminé est représenté sous la forme d'un cercle. Les cercles rouges sont les positions les plus souvent mutées, les positions en vert sont moyennement retrouvées mutées, les positions en jaune sont faiblement mutées et les positions en blanc ne sont généralement pas mutées.	39
Figure 14 : Cartographie des épitopes des lymphocytes T présents sur les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B (SHB, MHB et LHB). Les épitopes des lymphocytes T helper (CD4 ⁺) sont représentés par un cercle vert, les épitopes des lymphocytes T cytotoxiques (CD8 ⁺) sont représentés par un cercle orange (séquence de référence : virus de l'hépatite B de génotype A) [Desmond <i>et al.</i> , 2008 ; Velay, 2015].	39
Figure 15 : Tupaïa adulte (Tupaïa belangeri) [Tsukiyama-Kohara et Kohara, 2014].	41

Figure 16 : Approche expérimentale utilisée pour générer des souris uPA-SCID (urokinase-type Plasminogen Activator- Severe Combined Immune Deficient) présentant des foies chimériques composés d'hépatocytes humains [Dandri et Lütgehetmann, 2014].	43
Figure 17 : Approche expérimentale utilisée pour générer des souris TK-NOG (thymidine kinase-NOG) présentant des foies chimériques composés d'hépatocytes humains [Dandri et Lütgehetmann, 2014].	43
Figure 18 : Approche expérimentale utilisée pour générer des souris uPA-NOG (urokinase-type Plasminogen Activator-NOG) présentant des foies chimériques composés d'hépatocytes humains [Dandri et Lütgehetmann, 2014].	44
Figure 19 : Observation de la morphologie des cellules HepaRG, en microscopie en contraste de phase, du processus de différenciation. L'ajout de 2 % de DMSO a été réalisé lors du 15 ^{ème} jour. La photo A représente les cellules HepaRG deux jours après encemencement, la photo B cinq jours post-encemencement, la photo C à 15 jours au moment de l'ajout du DMSO pour la différenciation des cellules et la photo D à 30 jours avec les cellules différenciées soit en Hépatocytes (H) soit en cellules biliaires (BC) [Cerec <i>et al.</i> , 2007].	47
Figure 20 : Cartographie de la distribution géographique des différents génotypes du virus de l'hépatite B dans le monde [LittleJohn <i>et al.</i> , 2016].	53
Figure 21 : Schématisation des différentes pressions exercées sur le virus de l'hépatite B au sein de l'hôte favorisant l'apparition de quasi-espèces virales [Chisari <i>et al.</i> , 2010 ; Xiao <i>et al.</i> , 2013 ; Morikawa <i>et al.</i> , 2016 ; Velay <i>et al.</i> , 2016 ; réalisé par Manon Chassaing étudiante en master 2].	60
Figure 22 : Représentation non exhaustive des mutations de la protéine SHBs permettant au virus de l'hépatite B d'échapper au système immunitaire de l'hôte (* = Stop) [Mathet <i>et al.</i> , 2003 ; Coleman, 2006 ; Kay et Zoulim., 2007 ; Locarnini et Yuen., 2010 ; Wu <i>et al.</i> , 2010 ; Hsu et Yeh. 2011 ; Huang <i>et al.</i> , 2012a ; Ijaz <i>et al.</i> , 2012 ; Wu <i>et al.</i> , 2012 ; Biswas <i>et al.</i> , 2013 ; Ramezani <i>et al.</i> , 2013 ; Simon <i>et al.</i> , 2013 ; Zhang <i>et al.</i> , 2013a ; Baclig <i>et al.</i> , 2014 ; Lazarevic, 2014 ; Pourkarim <i>et al.</i> , 2014 ; Tuteja <i>et al.</i> , 2014 ; Yu <i>et al.</i> , 2014 ; Coppola <i>et al.</i> , 2015 ; Urone <i>et al.</i> , 2015 ; Su <i>et al.</i> , 2016 ; Zhang <i>et al.</i> , 2016a ; http://hbv.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php].	65
Figure 23 : Représentation schématique de la composition de l'AgHBcr, « Hepatitis B virus core-related antigen » du virus de l'hépatite B [Suzuki <i>et al.</i> , 2009].	75
Figure 24 : Les différents facteurs pouvant interagir avec l'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) (VHD : virus de l'hépatite Delta, VHC : virus de l'hépatite C, VIH : virus de l'immunodéficience humaine, NAFLD : Stéatose hépatique non alcoolique, « Non alcoholic fatty liver disease ») [Croagh et Lubel, 2014].	76
Figure 25 : L'histoire naturelle de l'hépatite B [Servant-Delmas <i>et al.</i> , 2007; Pol, 2007; Hézode, 2010 ; Burns et Thompson, 2014 ; Croagh et Lubel, 2014 ; EASL, 2017].	78
Figure 26 : Les caractéristiques des différentes phases de l'histoire naturelle de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B [Burns et Thompson, 2014 ; Croagh et Lubel, 2014 ; EASL, 2017].	80
Figure 27 : Le développement de la maladie hépatique chez les patients infectés par le virus de l'hépatite B [Ait-Goughoulte <i>et al.</i> , 2010].	81
Figure 28 : Les différents acteurs de la réponse immunitaire innée mis en jeu face au virus de l'hépatite B [Wilson <i>et al.</i> , 2016].	82
Figure 29 : Schématisation des différentes fonctions des cellules « Natural Killer » altérées lors d'une infection par le virus de l'hépatite B [Rehermann, 2015].	85

Figure 30 : Les différents acteurs de la réponse immunitaire adaptative engagés face à une infection par le virus de l'hépatite B [Wilson <i>et al.</i> , 2016].....	86
Figure 31 : Schématisation des divers facteurs pouvant être impliqués dans le développement et la progression du carcinome hépatocellulaire lié à l'infection par le virus de l'hépatite B (interaction entre le virus et l'hôte, prédispositions génétiques, facteurs environnementaux) [Levrero et Zucman-Rossi, 2016].	91
Figure 32 : Incidence cumulative des résistances associées aux traitements NUCs chez le virus de l'hépatite B sur un à cinq ans (LAM : Lamivudine, ADV : Adéfovir dipivoxil, TBV : Telbivudine, ETV : Entécavir, TDF : Ténofovir disoproxil fumarate, TAF : Ténofovir Alafenamide) [EASL, 2017].	98
Figure 33 : Mécanisme d'action des ARN interférants [Chauchereau et Harel-Bellan, 2004].	102
Figure 34 : Mécanisme d'édition du génome réalisé à l'aide du complexe CRISPR-Cas9 [lejournal.cnrs.fr].	106
Figure 35 : Aperçu des différentes stratégies thérapeutiques pouvant être utilisées pour stimuler le système immunitaire contre le virus de l'hépatite B [Bertoletti et Gehring, 2013].	107
Figure 36 : Prévalence de l'infection par l'hépatite Delta parmi les porteurs du virus de l'hépatite B à travers le monde [Alfaiate <i>et al.</i> , 2015].	110
Figure 37 : Schématisation des ribonucléoprotéines de l'hépatite Delta interagissant avec l'enveloppe du virus de l'hépatite B [Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015].	112
Figure 38 : Le cycle de réplication du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) [Saayman <i>et al.</i> , 2015].	116
Figure 39 : Influence de l'infection par le virus de l'hépatite B sur l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (DC : Cellules dendritiques, iDC : immature, mDC : mature, LTR : « Long Terminal Repeat », TLR : « Toll like Receptor ») [Li <i>et al.</i> , 2012].	118
Figure 40 : Influence de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine sur l'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B (HSC : cellules souches hématopoïétiques) [Li <i>et al.</i> , 2012].	119
Figure 41 : Exemple d'analyse des données brutes obtenues en séquençage direct de l'électrophorogramme à la séquence en acides aminés.	135
Figure 42 : Dispositif E-gel utilisé pour récupérer les amplicons barcodés de la taille attendue lors de la préparation des échantillons destinés au séquençage haut-débit Ion Torrent.	138
Figure 43 : Exemple de données chiffrées fournies par le logiciel AnTheProt pour analyser l'antigénicité prédite. Les données du profil antigénique générées selon le modèle de Parker <i>et al.</i> (1986) sont représentées en « grisé » sur la figure.	145
Figure 44 : Différents profils prédictifs (antigénicité, hydrophobicité, hydrophilicité, régions membranaires hélicoïdales, accessibilité au solvant) décrits par le logiciel Antheprot pour caractériser les propriétés physico-chimiques d'une protéine à partir d'une séquence en acides aminés donnée (exemple de la protéine S d'une séquence consensus génotype D).	146
Figure 45 : Représentation schématique de la boucle antigénique de la petite protéine de surface du VHB où le déterminant « a » est délimité en bleu et la position du peptide d'intérêt est entourée en vert. La position de la mutation sT125M du peptide muté est entourée en rouge [Locarnini et Yuen, 2010 ; Tajiri <i>et al.</i> , 2010].	148
Figure 46 : Schématisation du protocole ELISA en (a) avec l'immuno-absorption (=coating) d'un peptide sauvage et en (b) avec l'immuno-absorption d'un peptide muté.....	151

Figure 47 : Réactivité des anticorps vaccinaux murins contre les protéines S face à un peptide sauvage ou un peptide muté en sT125M..... 163

INTRODUCTION

I. Le contexte épidémiologique actuel de l'hépatite B

Malgré l'existence d'un vaccin depuis les années 1980, le virus de l'hépatite B touche actuellement plus de deux milliards d'individus dans le monde, dont 257 millions sont porteurs d'une infection chronique caractérisée par la persistance de l'antigène HBs (AgHBs, protéines de surface du virus de l'hépatite B) plus de six mois dans le sérum [EASL, 2017 ; OMS, 2017]. Les complications provoquées par le virus de l'hépatite B (VHB), telles que la cirrhose et le cancer du foie (carcinome hépatocellulaire, CHC), sont responsables d'environ un million de morts dans le monde chaque année. En 2015, 887 000 personnes sont mortes des suites d'une infection au VHB [OMS, 2017]. Entre 1990 et 2013, une augmentation de 33 % du nombre de morts par cirrhose ou CHC, causé par le VHB, a été observée [EASL, 2017].

L'infection par le VHB est répartie de façon inégale à travers le monde : les zones de forte endémicité où la prévalence de l'AgHBs est supérieure à 8 %, les zones de moyenne endémicité où la prévalence de l'AgHBs se situe entre 2 % et 8 % et les zones de faible endémicité (inférieure à 2 %). Les zones de forte endémicité sont localisées essentiellement en Asie, dans certaines régions d'Amérique du Sud et en Afrique, ainsi que dans les régions subsahariennes [Papastergiou *et al.*, 2015 ; Ballarin *et al.*, 2017]. Les zones de moyenne endémicité regroupent la région Méditerranéenne, l'Europe de l'Est, l'Asie centrale, le Moyen-Orient et quelques régions d'Amérique du Sud [Papastergiou *et al.*, 2015 ; Ballarin *et al.*, 2017]. Les autres régions du monde sont généralement localisées dans des zones de faible endémicité (les Etats-Unis, l'Europe de l'Ouest, l'Australie et le Japon) malgré l'existence de certains foyers infectieux [Papastergiou *et al.*, 2015 ; Ballarin *et al.*, 2017]. La répartition géographique des différentes zones d'endémicité est présentée dans la Figure 1.

Par ailleurs, l'incidence des carcinomes hépatocellulaires est liée à la prévalence des infections chroniques dans les différentes régions du monde. Dans les zones de faible endémicité, le VHB est responsable de 10 à 15 % des cas de CHC, tandis que dans les zones de forte endémicité, le VHB est responsable de 70 % des cas de CHC [Ballarin *et al.*, 2017].

Actuellement, la prévalence des infections par le VHB diminue dans les zones de forte endémicité grâce à la vaccination, les nouveaux traitements et l'accès aux soins qui évolue [EASL, 2017]. Cependant, les migrations favorisent également la propagation des infections dans les pays de faible endémie comme l'Europe (Italie, Allemagne) [Tong et Revill, 2016 ; EASL, 2017].

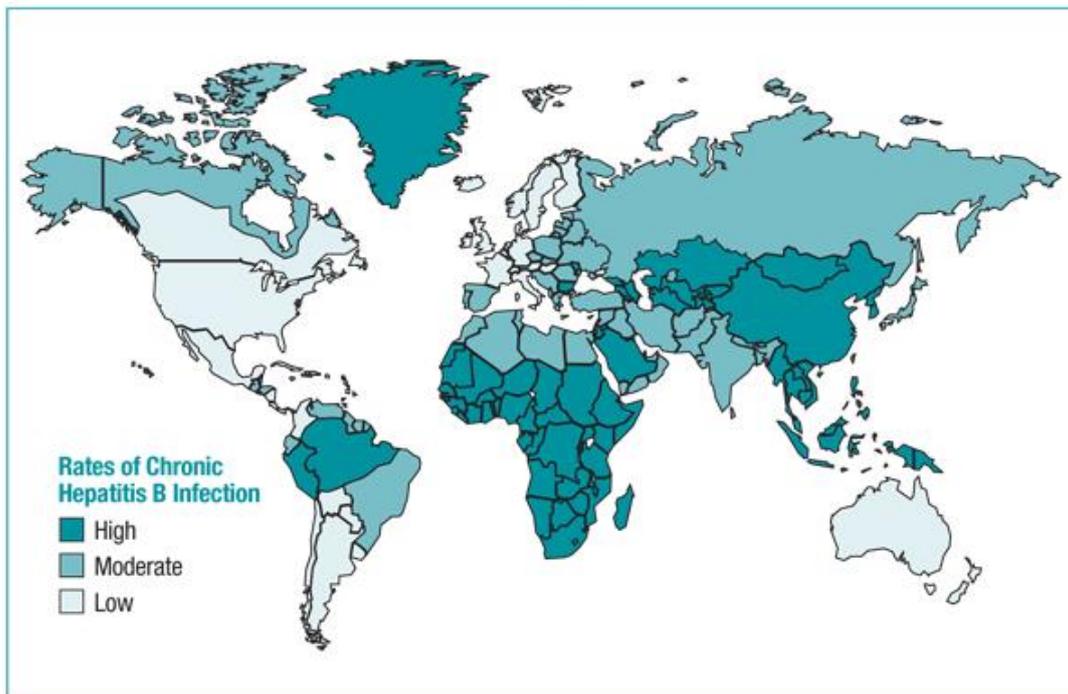


Figure 1 : Distribution géographique des infections chroniques du virus de l'hépatite B dans le monde (2014) [Center for Disease Control and Prevention (<http://www.cdc.gov>)].

La France se situe dans une zone de faible endémie. Les études réalisées par l'Institut national de Veille sanitaire (InVs) ont montré, que 300 000 personnes seraient infectées chroniquement par le VHB, 2 500 nouvelles infections seraient dépistées chaque année et le VHB serait responsable d'environ 1 500 décès par an dont 1/3 associé à un cancer hépatique. Une plus forte prévalence de patients porteurs de l'AgHBs est observée en Ile-de-France (Figure 2).

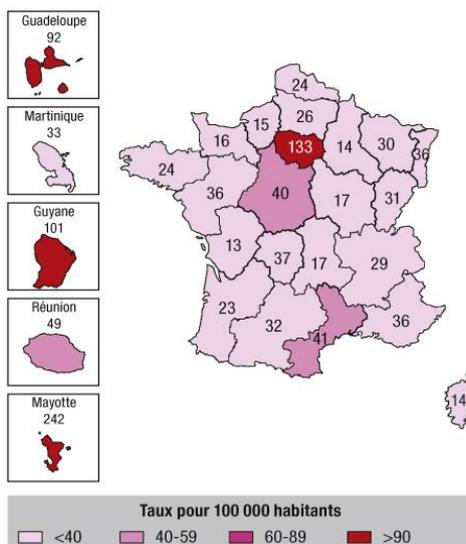


Figure 2 : Estimation du taux de prévalence de l'AgHBs pour 100 000 habitants en France d'après les données issues de l'enquête réalisée par Labohep en 2013 [Bulletin épidémiologique de l'institut national de veille sanitaire, 2015].

II. L'origine du virus de l'hépatite B

Le virus de l'hépatite B appartient à la famille des *Hepadnaviridae*. Ces virus sont sphériques, de petite taille et enveloppés. Le tropisme de ces virus est essentiellement hépatocytaire. Ce sont des virus à ADN (acide désoxyribonucléique) relaxé bicaténaire (ADNrc) avec un passage par une étape ARN (acide ribonucléique) viral lors de la répllication [Locarnini *et al.*, 2013]. Cette famille de virus hépatotropes infecte diverses espèces animales. Elle est divisée en deux genres : les *Orthohepadnaviridae* qui infectent les mammifères (chimpanzé, orang-outang, gorille, gibbon, singe, écureuil, marmotte, chauve-souris) et les *Avihepadnaviridae* qui infectent les oiseaux (canard, oie, héron, cigogne, grue, perroquet) (Figure 3) [Locarnini *et al.*, 2013 ; Zehender *et al.*, 2014]. Par exemple, le génome du VHB humain et celui du VHB de canard (DHBV) ne présentent que 40 % de similarités [Locarnini *et al.*, 2013].

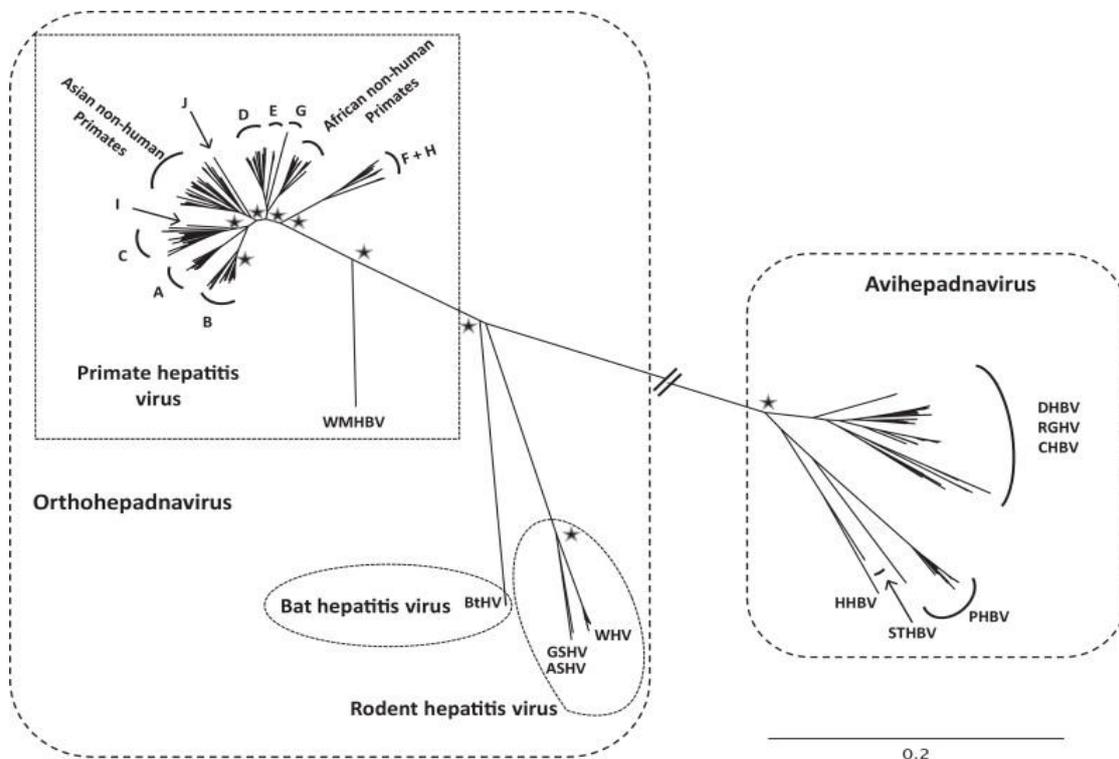


Figure 3 : Arbre phylogénétique de la famille des *Hepadnaviridae* (virus de l'hépatite B : WMHBV singe laineux, GSHV écureuil terrestre, ASHV écureuil arctique, WHV marmotte, DHBV canard, RGHV oie, CHBV grues, HHBV héron, STHBV cigogne, PHBV perroquet) [Locarnini *et al.*, 2013].

La première épidémie causée par les hépatites virales a été observée en 1885 par le chercheur A. Lurman, à Brême en Allemagne [Lurman, 1885]. La propagation d'hépatites virales par transfusion lors de la Seconde Guerre mondiale a accéléré le développement des recherches sur ces hépatites infectieuses. C'est dans les années 1960 que le virus de l'hépatite B humain a été découvert par le généticien B. Blumberg. L'étude des anticorps présents dans le sérum des patients infectés a permis de mettre en évidence un anticorps réagissant avec le sérum d'un patient

aborigène australien. Ainsi, il nomma ce nouvel antigène : l'antigène « Australia » [Blumberg *et al.*, 1967]. Après avoir mis en évidence le lien existant entre cet antigène et les hépatites, Blumberg et son équipe ont produit les premiers vaccins contre les hépatites B composés de plasmas riches en AgHBs et cela leur a valu un prix Nobel en 1976. A partir des échantillons sériques de patients infectés par le VHB et porteurs de l'AgHBs, Dane *et al.* (1970) ont mis en évidence l'existence de trois types de particules virales au microscope électronique : des sphères et des filaments d'environ 20 nm et des particules de 45 nm. Après l'analyse des différents types de particules, ils ont conclu que les particules complètes et infectieuses étaient celles de 45 nm, nommées les particules de Dane [Dane *et al.*, 1970]. Les particules sphériques ou en forme de bâtonnets de 20 nm sont des particules ne possédant pas le matériel génétique du VHB et sont nommées les particules sous virales (SVP). Le séquençage complet du génome du VHB a été réalisé en 1979 [Galibert *et al.*, 1979].

Actuellement, de nombreuses recherches sont en cours pour comprendre la propagation de l'infection par le VHB chez l'Homme. L'origine du VHB est très controversée. A partir des données géographiques, phylogéniques, fossiles, génotypiques, historiques et le taux de mutations du VHB ainsi que les données disponibles sur l'évolution de l'Homme, cinq théories sur l'origine du VHB ont été énoncées.

En se basant sur l'étude des populations indigènes, le génotype C et plus particulièrement le sous-génotype C4 serait le VHB le plus ancien chez l'homme moderne non-Africain et son origine a été estimée à 50 000 ans. Le VHB actuel pourrait être à l'origine des transmissions multiples ou des zoonoses entre les différentes espèces et des événements de recombinaisons au sein du VHB de génotype C auraient ensuite eu lieu [Littlejohn *et al.*, 2016].

La première théorie propose que le virus de l'hépatite B soit originaire du Nouveau Monde. Les humains originaires des Amériques auraient transmis le virus aux Européens lors de la colonisation il y a 400 ans. Ce modèle est contradictoire avec la propagation géographique des génotypes qui nécessiterait une dissémination et une diversification rapide du VHB, ce qui est un défi épidémiologique [Locarnini *et al.*, 2013 ; Littlejohn *et al.*, 2016]. De plus, le virus a été retrouvé chez des espèces de primates non humains de l'Ancien Monde (orang-outan, chimpanzé et gibbon) [Locarnini *et al.*, 2013 ; Zehender *et al.*, 2014 ; Littlejohn *et al.*, 2016]. En parallèle, une souche de VHB isolée en Corée aurait été datée du 16^{ème} siècle [Littlejohn *et al.*, 2016].

La seconde théorie propose une co-spéciation. Les *Hepadnaviridae* auraient évolué en parallèle au sein des espèces spécifiques durant les 10 à 35 derniers millions d'années. Selon cette théorie, la divergence du virus avec son hôte primate aurait eu lieu il y a plusieurs millions d'années [Zehender *et al.*, 2014 ; Littlejohn *et al.*, 2016]. Ce modèle est appuyé par le phénomène de divergence des espèces. En effet, le moment de divergence entre les *Orthohepadnaviridae* et les *Avihepadnaviridae* coïncide avec la divergence des hôtes respectifs (phylogénie et données fossiles).

De plus, la variabilité spécifique aux espèces de chimpanzés, gorilles, gibbons, orangs-outangs, singes laineux, favorise cette hypothèse. Par exemple, le chimpanzé possède un VHB dont la séquence génomique est phylogénétiquement spécifique à ce primate [Littlejohn *et al.*, 2016]. Les espèces se seraient ensuite transmises les souches entre les espèces transfrontalières, puis à l'homme dans les zones géographiques partagées [Locarnini *et al.*, 2013]. Cependant, ce modèle suppose que le taux d'évolution du VHB eut été très lent, ce qui est contredit par l'horloge moléculaire proposant un taux d'évolution plus rapide du VHB [Zehender *et al.*, 2014]. De plus, il existe des similarités entre la séquence génomique du VHB infectant le gorille et le chimpanzé [Littlejohn *et al.*, 2016].

Le troisième modèle propose que le virus a co-évolué avec l'Homme anatomiquement moderne et qu'il se soit propagé à cause des migrations au cours des 100 000 dernières années [Zehender *et al.*, 2014 ; Littlejohn *et al.*, 2016]. Cette théorie peut ainsi expliquer la dispersion géographique des différents géotypes. Selon Paraskevis *et al.* (2013), l'étude de la phylogénie du VHB et de la diversité génétique de l'homme moderne estimerait la première transmission virale du virus chez les Hommes il y a 33 600 ans (22 000 – 47 100 années), ce qui correspond à l'origine des Hommes modernes non Africains. Ainsi, le virus se serait ensuite propagé et aurait migré avec les populations humaines depuis environ 40 000 ans, mais également chez les primates non humains des différentes régions. De plus, les pandémies provoquées par le VHB sont corrélées avec l'augmentation de la population ces 5 000 dernières années [Paraskevis *et al.*, 2013]. Cependant, ce modèle n'explique pas les relations génétiques étroites du VHB entre les primates non humains et les humains. De plus, l'étude de la variabilité géotypique du VHB chez les populations autochtones d'Amérique et les populations du Nord de l'Asie, génétiquement proches, a montré que ces deux populations n'étaient pas infectées par le même géotype de VHB (géotype F en Amérique vs. Géotype B et C en Asie) [Littlejohn *et al.*, 2016].

Le quatrième modèle est basé sur la transmission inter-espèces. En effet, le VHB humain est proche du virus des primates non humains et les zones de forte prévalence du VHB chez les humains se retrouvent dans des zones géographiques où la transmission du VHB peut être potentiellement réalisable entre les primates humains et non humains. Ce modèle est corroboré par la description de cas de transmission de l'Homme aux chimpanzés. Par exemple, le géotype J est issu de la recombinaison entre le géotype C humain et le VHB du Gibbon [Littlejohn *et al.*, 2016]. Ce géotype, découvert en 2009, diffère de 10,7 à 15,7 % des autres géotypes [Tong et Reville, 2016].

Un dernier modèle émet l'hypothèse que la chauve-souris pourrait être à l'origine de la transmission des Hepadnavirus à l'Homme [Drexler *et al.*, 2013]. Une étude réalisée par Drexler *et al.* (2013), a suggéré que les chauves-souris auraient pu constituer des sources ancestrales d'Hepadnavirus de primates aux vues des relations existantes entre les deux virus. En effet, des virus très diversifiés apparentés au VHB ont été observés dans les chauves-souris de l'Ancien et du

Nouveau Monde. Les traits d'infection chez les chauves-souris (tropisme hépatique, virémie élevée, infiltrations inflammatoires des leucocytes typiques des hépatites) ressemblent à une infection humaine par le VHB. Par ailleurs, les pseudo-particules virales possédant les protéines de surface d'un Hepadnavirus de chauve-souris pourraient infecter les cellules hépatiques humaines. De plus, cette étude a mis en évidence le potentiel zoonotique d'une souche de virus de l'hépatite B de chauves-souris (TBHBV) [Drexler *et al.*, 2013].

Selon Littlejohn *et al.* (2016), l'origine du VHB ne peut pas être expliquée par une seule des théories présentées. La combinaison de théories (la plus probable), permettant d'expliquer les relations étroites entre le VHB humain et celui des primates non humains serait la suivante : le VHB aurait évolué par co-spéciation chez les différents hôtes suivie par la transmission entre espèces des virus [Littlejohn *et al.*, 2016].

III. Le cycle infectieux du virus de l'hépatite B

1. Structure et organisation du virus de l'hépatite B

Le virus de l'hépatite B est un virus à ADN partiellement bicaténaire [Locarnini et Yuen, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011]. Ce petit virus sphérique a la particularité de présenter quatre cadres de lecture ouverts (« Open Reading Frame », ORF) qui se chevauchent, réduisant ainsi la taille de son génome à environ 3 200 pb [Locarnini et Yuen, 2010]. Les quatre cadres de lecture sont les suivants : l'ORF préC/C, l'ORF P, l'ORF préS/S et l'ORF X (Figure 4). Il existe également des régions impliquées dans la régulation des gènes qui sont intégrées dans les régions codantes (quatre promoteurs, deux enhancers Enh I et Enh II) et différents sites d'initiation de la transcription des protéines du VHB [Wei *et al.*, 2010].

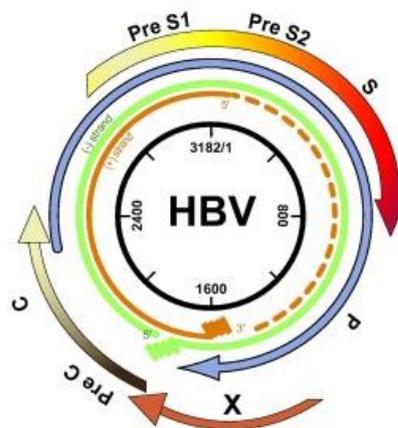


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation génomique du virus de l'hépatite B [Pollicino *et al.*, 2014].

L'ORF précore/core (préC/C) code les protéines de la nucléocapside (AgHBc) et la protéine non structurale nommée antigène HBe (AgHBe) [Lazaveric, 2014]. L'ORF se situe entre les positions 1 814 et 2 458 en acides nucléiques du génome viral (référence génotype C), avec chevauchement partiel de l'ORF P et l'ORF X [Yano *et al.*, 2015]. Les protéines précore et core sont codées à partir de deux codons initiateurs : les protéines précore à partir du premier codon initiateur et les protéines core à partir du second site d'initiation. Les protéines core forment l'antigène HBc (AgHBc) correspondant aux protéines structurales de la nucléocapside [Lazaveric, 2014]. Pour former la nucléocapside, environ 200 AgHBc vont s'auto-assembler selon une symétrie icosaédrique T3/T4 [Bruss, 2007]. La région N-terminale (Nter) de ces protéines est composée d'un motif « leucine zipper » important pour l'assemblage de la capsid. L'extrémité carboxy-terminale (Cter) de ces protéines contient quatre domaines riches en arginine. Le premier domaine permet l'encapsidation de l'ARN pré-génomique (ARNpg) lors de la réplication du VHB [Bruss, 2007 ; Cole, 2016]. Les protéines précore sont les précurseurs de l'AgHBe. La protéine précore est composée de 29 acides aminés supplémentaires en Nter comparé aux protéines core [Lazaveric, 2014]. Les 19 premiers acides aminés vont servir de peptide signal pour le clivage du domaine riche en arginine en Cter du domaine core dans le réticulum endoplasmique (RE) qui va permettre de former l'AgHBe. Cet antigène est mûri avant d'être sécrété sous forme d'antigène soluble dans le sérum [Lazaveric, 2014]. L'AgHBe est impliqué dans la modulation des réponses immunitaires et faciliterait l'établissement d'infection chronique chez les patients [Balmasova *et al.*, 2014 ; Lazaveric, 2014 ; Guidotti *et al.*, 2015].

L'ORF P code la polymérase virale qui est impliquée dans la réplication du VHB [Locarnini et Yuen, 2010 ; Wei *et al.*, 2010]. L'ORF se situe entre les positions 2 307 et 1 623 en acides nucléiques du génome viral [Yano *et al.*, 2015]. Cette ORF chevauche les trois autres cadres de lecture. La polymérase virale est divisée en différents domaines [Locarnini et Yuen, 2010 ; Wei *et al.*, 2010] :

- la protéine Nter nommée primase qui contient le site d'attachement en 5' et permet d'amorcer la synthèse du brin négatif de l'ADN
- le domaine de la rétrotranscriptase (RT) comprenant le site catalytique (motif YMDD) de la polymérase
- la ribonucléase H (ARNase H) responsable de la dégradation de l'ARN lors de la réplication du génome viral
- un domaine « spacer » qui assure la flexibilité de la polymérase

L'ORF X code la protéine X (HBx). Cette protéine est un transactivateur transcriptionnel qui est capable d'activer de nombreux promoteurs viraux et cellulaires [Wei *et al.*, 2010 ; Lazaveric, 2014]. L'ORF se situe entre les positions 1 374 et 1 838 en acides nucléiques du génome viral [Yano *et al.*, 2015]. Cette protéine chevauche l'ORF P et l'ORF préC. Cette protéine est essentielle pour une

réplication efficace du VHB [Lazaveric, 2014]. La protéine X agit sur différentes voies de signalisation pour faciliter la réplication du VHB [Wei *et al.*, 2010 ; Lazaveric, 2014 ; Murphy *et al.*, 2016]. Elle joue également un rôle important dans l'oncogenèse [Locarnini et Yuen, 2010 ; Lazaveric, 2014].

L'ORF prés/S code les trois protéines d'enveloppe du VHB : la petite protéine SHB pour « Small », la moyenne protéine MHB pour « Medium » et la grande protéine LHB pour « Large ». Ces trois protéines d'enveloppe forment l'AgHBs [Glebe et Urban, 2007]. Il existe trois codons initiateurs au niveau de la région prés/S qui sont responsables de la production de ces trois protéines d'enveloppe. L'ORF codant le gène S se situe entre les acides nucléiques 155 et 835. La région prés (acides nucléiques 2848 – 155 pour le génotype D et acides nucléiques 2854 – 155 pour les génotypes A et C ; génome circulaire) est divisée en deux régions, la région prés1 et prés2 [Yano *et al.*, 2015]. Ainsi, les trois protéines d'enveloppe ont le même domaine Cter (gène S), mais différent par leur extrémité Nter.

La protéine SHB est codée par le gène S. Elle est composée de 226 acides aminés (aa) et possède quatre domaines transmembranaires (TM ; TM1 : aa s4 – s24, TM2 : aa s80 – s98, TM3 – 4 : aa s170 – s226) et deux domaines cytosoliques (CYL) exposés à la surface des virus (CYL1 : aa s25 – s79, CYL2 : aa s99 – s169). Le domaine CYL2 est également appelé la région hydrophile majeure (MHR ; « Major Hydrophilic Region ») ou la boucle antigénique (AGL ; « Antigenic Loop »). Cette région est importante pour le pouvoir infectieux du virus. Elle est également la cible préférentielle du système immunitaire de l'hôte et plus particulièrement la région située entre les aa s124 – s147 : le déterminant « a ». En effet, cette région est un groupe (« cluster ») d'épitopes reconnus par les anticorps neutralisants l'infection [Glebe et Urban, 2007 ; Sureau et Salisse, 2013]. La protéine S est N-glycosylée en position 146 (asparagine) [Bruss, 2007].

La seconde protéine MHB est codée par les gènes prés2 et S. Elle est composée de 281 acides aminés. Le domaine prés2 est exposé à la surface du virus [Glebe et Urban, 2007]. Cette protéine possède une seconde N-glycosylation en position 4 sur la région prés2 [Glebe et Urban, 2007]. C'est une région d'espacement (« spacer ») qui ne semble pas indispensable au pouvoir infectieux du virus [Xie *et al.*, 2010]. Cependant, elle est conservée chez les *Orthohepadnaviridae* [Glebe et Urban, 2007].

La protéine LHB est codée par les gènes prés1, prés2 et S. Elle est composée de 389 à 400 acides aminés, selon le génotype. Cette protéine présente une myristoylation au niveau de la glycine en position 2 de la région prés1. Cette myristoylation est importante pour le pouvoir infectieux du virus [Bruss, 2007 ; Yan *et al.*, 2012].

Ces protéines sont retrouvées dans des proportions différentes sur l'enveloppe virale (Figure 5) [Patient *et al.*, 2008]. La protéine la plus représentée sur les particules virales est la protéine SHB.

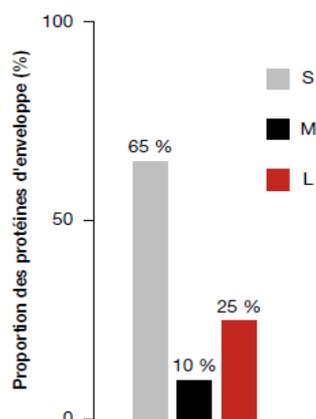


Figure 5 : Représentation graphique de la proportion des trois protéines d'enveloppe (les petites protéines d'enveloppe SHBs en gris, les moyennes MHBs en noir et les grandes LHBs en rouge) présentes sur le virus de l'hépatite B [Patient *et al.*, 2008].

Les protéines d'enveloppe génèrent également des particules vides sans ADN appelées particules sous-virales (SVP) au niveau du réticulum endoplasmique (Figure 6) [Glebe, 2006 ; Bruss, 2007 ; Lepère-Douard et Gripon, 2010 ; Urban *et al.*, 2010 ; Xie *et al.*, 2010 ; Glebe et König, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016 ; Tong et Reville, 2016].

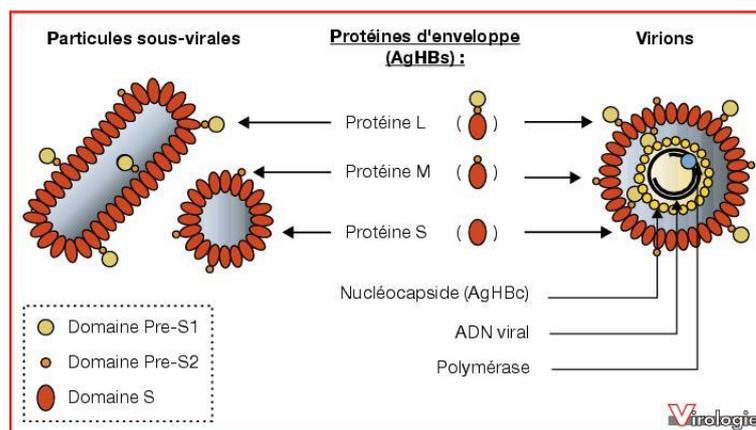


Figure 6 : Schématisation des différents types de particules virales du virus de l'hépatite B [Lepère-Douard et Gripon, 2010].

Ces particules ont une taille de 22 nm [Glebe, 2006 ; Glebe et Urban, 2007 ; Xie *et al.*, 2010]. Il existe deux types : des particules sphériques et des particules filamenteuses [Glebe, 2006 ; Glebe et Urban, 2007 ; Xie *et al.*, 2010 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Une quantité importante de SVP est sécrétée dans le sang 1 000 fois à 10 000 fois plus que le virion lui-même [Urban *et al.*, 2010 ; Xie *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Sureau et Salisse, 2013 ; Tong et Reville, 2016]. Ces particules sous-virales pourraient jouer un rôle de leurre pour l'immunité humorale et faciliteraient ainsi la dissémination du virus et sa persistance dans l'organisme en réduisant la quantité d'anticorps neutralisants dirigés contre les particules infectieuses [Chisari *et al.*, 2010].

Le ratio des trois protéines d'enveloppe varie selon la particule virale, infectieuse (particule de Dane) ou SVP [Morikawa *et al.*, 2016]. En effet, les particules de Dane possèdent beaucoup plus

de LHBs que les SVP sphériques [Glebe, 2006 ; Bruss, 2007 ; Glebe et Urban, 2007 ; Urban *et al.*, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Il semble que les SVP filamenteuses présentent autant de LHBs que les particules de Dane [Glebe, 2006 ; Bruss, 2007 ; Glebe et Urban, 2007]. Les protéines SHBs sont les plus abondantes, mais ne diffèrent pas selon la particule [Glebe, 2006 ; Glebe et Urban, 2007].

Ainsi, la particule infectieuse, ou particule de Dane s'organise de la façon suivante (Figure 7). Le génome du VHB, lié de manière covalente à la protéine terminale de la polymérase virale endogène, est encapsidé dans une nucléocapside icosaédrique de 30 nm de diamètre. La nucléocapside est entourée d'une enveloppe contenant des lipides et trois types de protéines d'enveloppe (LHBs, MHBs, SHBs) [Jeulin *et al.*, 2013 ; Pollicino *et al.*, 2014]. L'enveloppe du VHB est acquise lors du bourgeonnement du virus au niveau du réticulum endoplasmique. Elle dérive donc des membranes cytoplasmiques des hépatocytes. Elle se compose d'une bicouche lipidique au sein de laquelle le cholestérol joue un rôle dans le pouvoir infectieux du virus [Urban *et al.*, 2014].

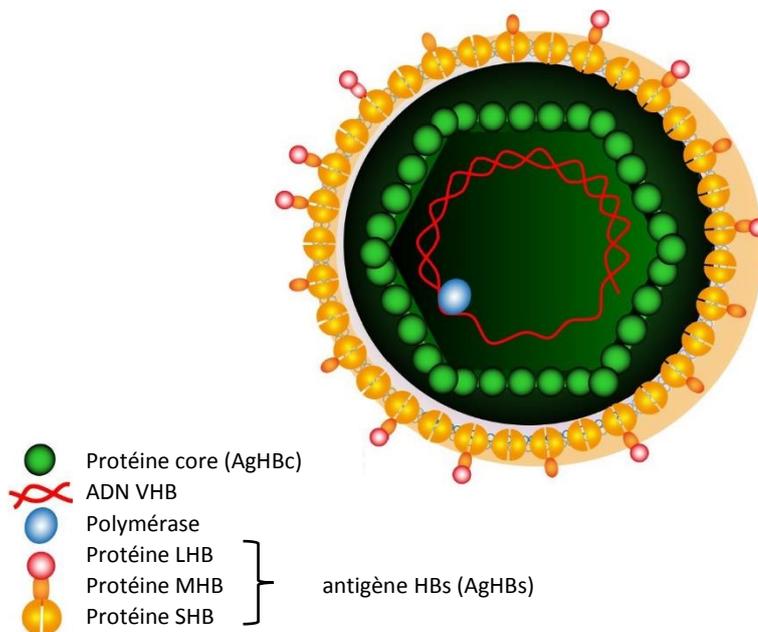


Figure 7 : Représentation schématique de la particule infectieuse du virus de l'hépatite B [Pollicino *et al.*, 2014].

2. Le cycle réplcatif du VHB

La réplication du VHB se fait essentiellement dans les hépatocytes malgré l'existence d'autres réservoirs extra-hépatiques où de l'ADN viral a également été retrouvé tels que les cellules épithéliales des canaux biliaires, les cellules du système lymphoïde, les cellules mononuclées du sang périphérique (monocytes, lymphocytes B et T) [Seeger et Mason, 2000 ; Schulze *et al.*, 2012 ;

Loustaud-Ratti *et al.*, 2013]. Ces réservoirs pourraient être une source de réactivation virale [Loustaud-Ratti *et al.*, 2013]. Le VHB a un cycle de réplication complexe et original faisant intervenir une étape de rétrotranscription. De nombreuses recherches ont été développées pour mieux comprendre toutes les étapes de son cycle infectieux. La découverte récente (2012) du récepteur « Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide » (NTCP) au niveau des hépatocytes a été une grande avancée dans la compréhension du cycle du virus [Yan *et al.*, 2012]. Cette découverte a permis de mieux comprendre le mécanisme d'entrée du virus dans les cellules, d'élaborer de nouveaux modèles d'étude et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Malgré de nombreuses recherches sur le cycle de réplication, certaines étapes restent à élucider. Voici les étapes clés du cycle de réplication du VHB (Figure 8).

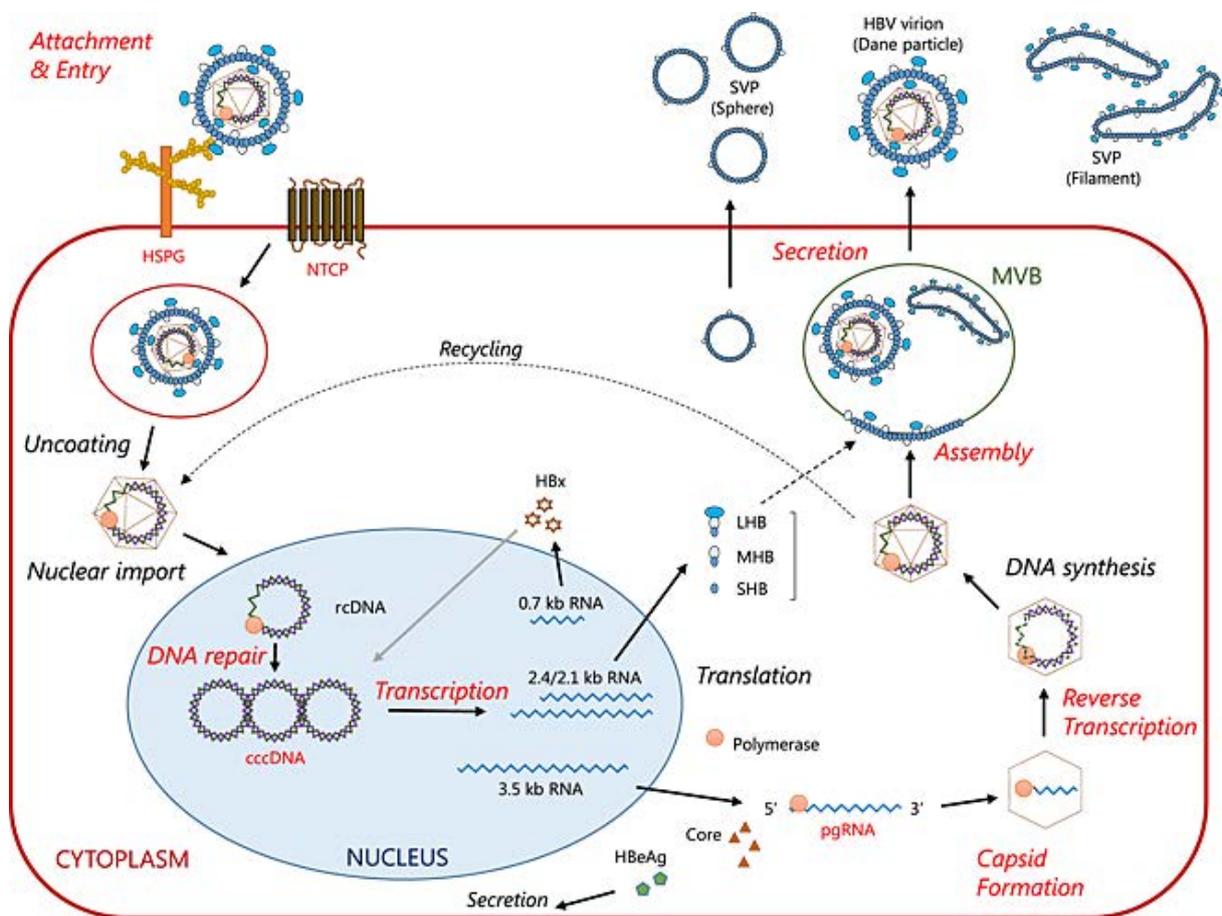


Figure 8 : Cycle de réplication du virus de l'hépatite B [Morikawa *et al.*, 2016].

1.1. Entrée du virus dans les cellules

1.1.1. Attachement du virus aux hépatocytes

Lors d'une infection par le VHB, le virus est transporté vers l'espace de Disse (espace compris entre les vaisseaux et les hépatocytes) en passant par les cellules endothéliales sinusoidales. Ainsi, le VHB entre en contact avec les hépatocytes. La première étape d'attachement aux hépatocytes fait

intervenir deux récepteurs clés au niveau des hépatocytes : les HSPGs «Heparan Sulfate Proteoglycan » et le NTCP « Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide » (Figure 9) [Xie *et al.*, 2010 ; Yan *et al.*, 2012 ; Sureau et Salisse, 2013 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Li et Urban, 2016]. L'attachement spécifique à ces récepteurs contribue à la spécificité d'hôte et à l'hépatotropisme [Glebe, 2006 ; Urban *et al.*, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Li et Urban, 2016].

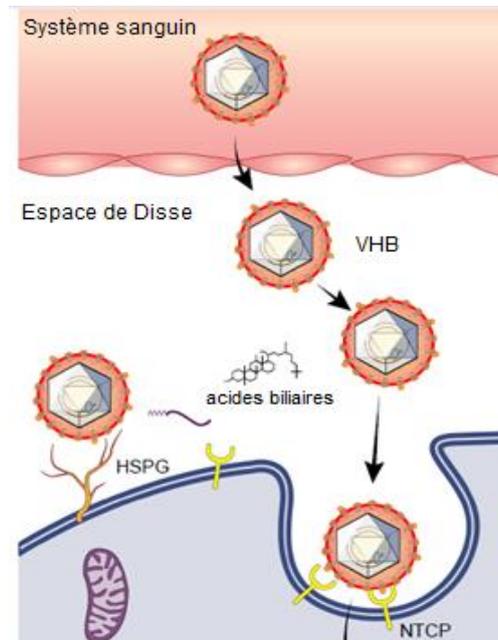


Figure 9 : Mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite B (VHB) dans les hépatocytes (HSPG : « Heparan Sulfate Proteoglycan », NTCP : « Na⁺ Taurocholate Cotransporting Polypeptide ») [Li et Urban, 2016].

1.1.1.1. Le récepteur HSPG « Heparan Sulfate Protéoglycan »

Les HSPGs sont composés d'une protéine core portant l'héparine sulfate et de plusieurs chaînes de glycosaminoglycane d'héparane sulfate [Hayes *et al.*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016a].

Des études faisant intervenir des inhibiteurs ou compétiteurs du récepteur HSPG, comme l'héparinase ou l'héparine, ont montré l'importance du récepteur HSPG dans le cycle infectieux du VHB [Leistner *et al.*, 2008 ; Urban *et al.*, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016b]. L'espace de Disse est riche en HSPG [Glebe et Urban, 2007; Urban *et al.*, 2014]. L'attachement du virus aux HSPG est réversible, de faible affinité [Glebe et Urban, 2007; Urban *et al.*, 2010 ; Glebe et König, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Watashi, 2016]. Cette fixation permet l'accumulation des virus à la surface des cellules et favorise l'engagement du ou des récepteur(s) spécifique(s) [Xiao *et al.*, 2013 ; Urban *et al.*, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016]. De nombreuses cellules de mammifères possèdent ce récepteur HSPG à leur surface [Hayes *et al.*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016a]. Cependant, les HSPG présents à la surface des hépatocytes sont plus sulfatés, ce qui favorise l'interaction avec le VHB [Schulze *et al.*, 2007 ;

Leistner *et al.*, 2008 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016b]. Des études récentes de l'équipe de Verrier *et al.* (2016a) ont montré que le récepteur HSPG impliqué dans l'entrée du VHB était de type glycan 5 [Li *et Urban*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016a]. Par ailleurs, le VHB ne peut entrer qu'en présence d'autres récepteurs spécifiques tels que le NTCP, présent à la surface des hépatocytes [Watashi *et al.*, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Morikawa *et al.*, 2016 ; Watashi, 2016].

Les protéines LHBs et SHBs sont essentielles à l'attachement du VHB avec le récepteur HSPG [Lempp *et Urban*, 2014]. La région MHR, retrouvée au niveau du gène S de ces protéines, est une zone essentielle pour la fixation du virus aux HSPGs [Xie *et al.*, 2010 ; Glebe *et König*, 2014; Lempp *et Urban*, 2014 ; Watashi, 2016]. Les acides aminés sR122 et sK141 sont chargés positivement et favorisent la liaison électrostatique avec le récepteur HSPG chargé négativement [Glebe *et Urban*, 2007 ; Xie *et al.*, 2010 ; Sureau *et Salisse*, 2013 ; Urban *et al.*, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Li *et Urban*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016b]. La conformation de la région MHR, principalement celle du déterminant « a » qu'elle contient, est importante pour l'infection. Les résidus proline et les ponts disulfures engendrés par les cystéines sont essentiels à sa structure [Sureau *et Salisse*, 2013]. Les aa hydrophobes sI110 et sW156 de la région MHR et la région préS contribueraient également à la liaison aux HSPG [Schulze *et al.*, 2007 ; Sureau *et Salisse*, 2013 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Morikawa *et al.*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016b].

1.1.1.2. Le récepteur NTCP « Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide »

Les virions, ainsi accumulés au niveau des hépatocytes, vont ensuite être transférés vers le récepteur NTCP [Morikawa *et al.*, 2016].

Ce récepteur fait partie de la famille des transporteurs de solutés 10A1 et de la famille des transporteurs SLC (« Solute Carrier ») [Urban *et al.*, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014]. Le NTCP est un récepteur de 349 acides aminés composé de sept à neuf domaines transmembranaires [Xiao *et al.*, 2013]. Le NTCP est localisé principalement dans la membrane basolatérale des hépatocytes au niveau des cellules sinusoidales permettant la propagation du virus dans le système sanguin [Lempp *et Urban*, 2014 ; Urban *et al.*, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Li *et Urban*, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016b]. La localisation du NTCP dépend des propriétés de polarisation des cellules qui diffèrent entre les cellules épithéliales et les hépatocytes matures [Schulze *et al.*, 2012]. L'expression du NTCP peut être régulée soit négativement par l'interleukine 6 (IL-6) ou positivement par les glucocorticoïdes [Urban *et al.*, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016].

Le NTCP est impliqué dans le transport, sodium dépendant, des sels biliaires conjugués. Le changement de conformation nécessaire aux transports est généré par un gradient d'ions sodium [Xiao *et al.*, 2013 ; Urban *et al.*, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Verrier *et al.*, 2016b]. L'utilisation du récepteur par le VHB affecte le taux d'acides biliaires intracellulaires finement régulé par l'expression

du NTCP. En effet, les modifications d'activité du NTCP sur un modèle murin ont montré des changements compensatoires dans la synthèse des acides biliaires et le métabolisme du cholestérol [Oehler *et al.*, 2014]. Par exemple, l'enzyme cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) permettant la conversion du cholestérol en acide biliaire est surexprimée (multipliée par 12) [Oehler *et al.*, 2014]. Par ailleurs, certaines molécules qui inhibent le transport des sels biliaires, comme la cyclosporine A et l'Ézitimibe, inhibent également l'entrée du VHB [Lucifora *et al.*, 2013 ; Urban *et al.*, 2014]. Ce récepteur est également impliqué dans le transport d'autres molécules telles que : les hormones stéroïdes, les hormones thyroïdes, les médicaments conjugués aux acides biliaires et plusieurs xénobiotiques [Watashi *et al.*, 2014].

Le rôle du NTCP dans l'entrée du VHB a été découvert par l'équipe de Yan *et al.*, en 2012. L'utilisation des hépatocytes primaires de *Tupaia belangeri* (PTH) et d'un lipopeptide natif mimant préS1 myristoylée (aa 2 – 48) a permis de mettre en évidence le rôle du récepteur NTCP dans la liaison avec préS1 [Yan *et al.*, 2012 ; Verrier *et al.*, 2016b]. De plus, l'utilisation d'ARN interférent (ARNi) ou l'extinction de gènes ciblant le NTCP réduisent considérablement l'infection par le VHB et confirment les résultats de l'équipe de Yan *et al.* (2012) [Ni *et al.*, 2014]. Par ailleurs, la transduction du NTCP dans des cellules non sensibles leur confère la susceptibilité au VHB comme les cellules HepG2 ou Huh7 ou encore 293T n'exprimant pas habituellement ce récepteur [Yan *et al.*, 2012 ; Ni *et al.*, 2014 ; Verrier *et al.*, 2016b].

Ainsi, le NTCP interagit avec la région préS1 des protéines LHBs [Xiao *et al.*, 2013]. Avant même la découverte du récepteur NTCP, des études utilisant un lipopeptide mimant la région préS1 sur des cellules PTH, des hépatocytes primaires humains (PHH) et HepaRG avaient mis en évidence l'importance des aa 2 – 48 (référence génotype D) dans l'entrée du virus dans les cellules [Glebe *et al.*, 2005 ; Gripon *et al.*, 2005]. Parmi ces aa, les aa 9 – 18 (NPLGFFPDHQ, référence génotype D) sont essentiels à l'infection et les aa 28 – 48 favorisent l'infection tandis que les aa 2 – 9 et les aa 19 – 28 sont accessoires [Glebe *et al.*, 2005 ; Glebe, 2006 ; Glebe et Urban, 2007 ; Xie *et al.*, 2010 ; Urban *et al.*, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Li et Urban, 2016]. La glycine myristoylée en Nter de préS1 (position 2) est cruciale pour le pouvoir infectieux du virus ; elle favorise la fixation aux récepteurs [Xie *et al.*, 2010 ; Urban *et al.*, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016].

Au niveau du NTCP, il existe deux sites importants pour le cycle infectieux du VHB : les aa 157 – 165 qui se lient à préS1 et sont indispensables à la fixation et les aa 84 – 87 qui seraient impliqués dans les événements post-fixation [Xiao *et al.*, 2013 ; Urban *et al.*, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Li et Urban, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016b ; Ni *et al.*, 2014]. La comparaison des séquences de NTCP humain avec d'autres espèces telles que la souris et le macaque crabier a mis en évidence des différences au niveau de la séquence en acides aminés entre les aa 157 et 165 [Yan *et al.*, 2012 ; Urban *et al.*, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Li et Urban, 2016]. Le remplacement de ces aa par le

fragment humain confère la susceptibilité au VHB de ces espèces [Watashi *et al.*, 2014]. Les acides aminés aspartate en position 115, glutamate en position 257 et cystéine en position 266 sont également très conservés sur le NTCP car ils sont indispensables à son activité de transporteur [Urban *et al.*, 2014]. Par ailleurs, des mutations dans le gène du NTCP pouvant interférer avec le cycle infectieux du virus ont déjà pu être observées [Watashi *et al.*, 2014 ; Li et Urban, 2016]. Les mutations I223T et R252H agissent sur l'expression du NTCP au niveau des hépatocytes (localisation et activité) [Urban *et al.*, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Li et Urban, 2016]. La mutation S267F produit une perte complète du transport des acides biliaires, diminue le transport d'autres acides et affecte la fonction de récepteur du VHB. Cette mutation est retrouvée dans les résistances aux infections chroniques par le VHB [Urban *et al.*, 2014 ; Watashi *et al.*, 2014 ; Li et Urban, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016b]. Les mutations N262A et Q293A/L294A empêcheraient également la liaison avec le domaine préS1 [Watashi *et al.*, 2014].

Cependant, des études sur le rôle du NTCP dans l'entrée ont montré que l'infection n'est pas totalement supprimée dans les lignées cellulaires sans NTCP et suggèrent ainsi l'intervention d'autres facteurs d'hôte dans l'entrée du virus dans les hépatocytes [Yan *et al.*, 2012 ; Xiao *et al.*, 2013].

1.1.1.3. Des cofacteurs potentiels

D'autres facteurs cellulaires semblent donc être impliqués dans l'entrée du virus dans les hépatocytes [Glebe, 2006 ; Xie *et al.*, 2010 ; Hayes *et al.*, 2016]. Les différents cofacteurs potentiels sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Cofacteurs potentiels pour l'entrée du virus de l'hépatite B à la surface des hépatocytes [Xie et al., 2010].

Protéine	Site de fixation sur l'enveloppe du VHB	Localisation cellulaire	Spécificité dans le foie	Références
Interleukine 6(IL-6)	prés1 aa 21 – 47	sérum	non	Neurath et al., 1992 ;
« Human squamous cell carcinoma antigen 1 » (SCAA1)	prés1 aa 21 – 47	membrane plasmatique	non	De Falco et al., 2001
Lipoprotéine lipase (LPL)	prés1 aa 21 – 47	sérum	ciblé durant le métabolisme des lipides	Deng et al., 2007
Récepteur IgA	prés1 aa 21 – 32	membrane plasmatique	non	Neurath et Strick, 1990 ; Pontisso et al., 1992
Récepteur Asiaglycoprotéine (ASGPR)	prés1	membrane plasmatique	oui	Treichel et al., 1994
Récepteur transférine	prés2	membrane plasmatique	non	Franco et al., 1992
Apolipoprotéine H (ApoH)	prés1	sérum	ciblé durant le métabolisme des lipides	Mehdi et al., 1994 ; Stefas et al., 2001
Protéine pHSA	prés2	sérum	non	Imai et al., 1979 ; Dash et al., 1991 ;
Annexine V	S	membrane plasmatique	non	Gong et al., 1999
Fibronectine	prés2	matrice extracellulaire	non	Budkowska et al., 1995

1.1.2. Mécanisme d'entrée dans les cellules

Après l'attachement du virus aux cellules via les différents récepteurs, le virus entre dans les cellules. Deux mécanismes d'entrée potentiels dans les cellules ont été proposés :

- une étape d'endocytose suivie de la libération de la nucléocapside à partir des vésicules endocytiques [Urban et al., 2010 ; Grimm et al., 2011 ; Watashi et al., 2014] ou
- la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique [Urban et al., 2010 ; Grimm et al., 2011 ; Glebe et König, 2014].

D'après les publications récentes, le mécanisme d'endocytose semble être privilégié [Watashi *et al.*, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Il existe deux types d'endocytose, l'endocytose clathrine dépendante ou l'endocytose cavéole dépendante. Différents facteurs cellulaires peuvent être impliqués dans ces mécanismes d'endocytose : la cavéoline1, la chaîne lourde de clathrine (« Clathrin heavy chain ») et la protéine adaptatrice clathrine AP-2 (« Clathrin adaptator protein AP-2 ») [Hayes *et al.*, 2016]. Afin de déterminer la voie préférentielle utilisée par le VHB, des inhibiteurs de cavéole ont été utilisés sur des modèles cellulaires d'infection HepaRG (cellules d'hépatomes humains) et PTH (cellules primaires de foie de *Tupaia belangeri*) [Macovei *et al.*, 2010 ; Hayes *et al.*, 2016]. Les inhibiteurs de cavéole n'ont pas montré d'effets significatifs sur l'infection des deux modèles cellulaires étudiés. Au contraire, des études réalisées sur des cellules PHH ont montré l'interaction entre le domaine préS1 des grandes protéines d'enveloppe LHBs avec des facteurs de type clathrine (chaîne lourde de clathrine, protéine adaptatrice clathrine AP-2) [Huang *et al.*, 2012b ; Hayes *et al.*, 2016]. En outre, l'inhibition de ces deux facteurs cellulaires (ou l'extinction de leurs gènes) a montré une diminution de la susceptibilité des cellules à l'infection par le VHB [Hayes *et al.*, 2016]. Ainsi, le VHB semble utiliser de façon préférentielle la voie d'endocytose clathrine dépendante [Huang *et al.*, 2012b ; Hayes *et al.*, 2016].

La particule virale poursuit ensuite dans la voie de l'endocytose (transport de l'endosome) régulée par les protéines de type Rab (« Ras-related protein ») [Macovei *et al.*, 2013 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Ces petites protéines appartiennent à la superfamille des Ras et occupent les compartiments endocytiques. La protéine Rab 5 joue un rôle dans le déplacement de la membrane plasmique vers l'endosome précoce et Rab 7 permet le transport de l'endosome tardif vers le lysosome. Il existe deux autres protéines Rab 9 et Rab 11 qui ne semblent pas être impliquées dans les étapes précoces d'infection par le VHB [Hayes *et al.*, 2016]. Ainsi, le VHB semblerait utiliser l'endosome pour son transport, puis il échapperait au lysosome grâce à un changement de charge électrostatique, un gradient de protons et/ou la composition en cholestérol de la membrane (Figure 10) [Hayes *et al.*, 2016 ; Morikawa *et al.*, 2016].

Cependant, les études ont été réalisées à l'aide du virus de l'hépatite B de canard (DHBV) et non du VHB humain [Stoeckl *et al.*, 2006 ; Hayes *et al.*, 2016]. Néanmoins, il semble que le motif TLM (« Cell permeable peptide translocation motif ») présent en Cter de la région préS2 des protéines d'enveloppe, agirait comme des protéases endosomales pour faciliter la translocation des particules virales à travers la membrane de l'endosome [Stoeckl *et al.*, 2006 ; Hayes *et al.*, 2016].

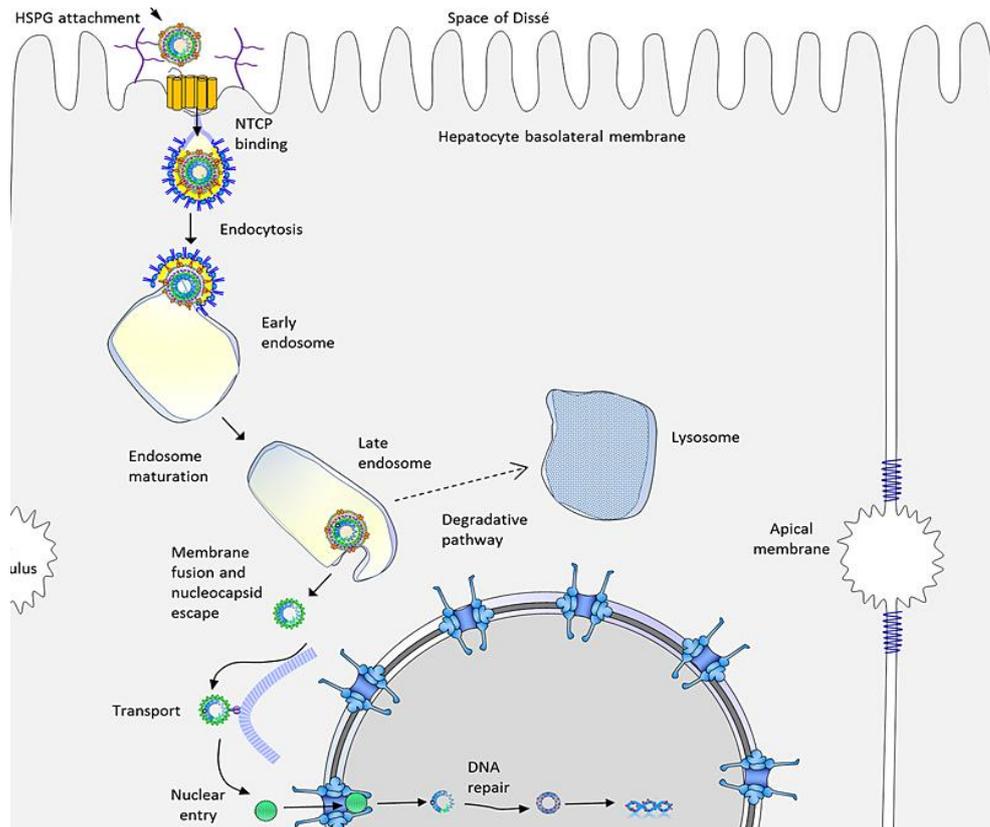


Figure 10 : Les étapes précoces du cycle infectieux du virus de l'hépatite B [Hayes *et al.*, 2016].

1.2. Transport de la nucléocapside, décapsidation et entrée dans le noyau

Lorsque la particule virale arrive dans le cytoplasme de l'hépatocyte, elle est immédiatement désenveloppée et la nucléocapside contenant l'ADN relaxé circulaire (ADNrc) partiellement double brin, liée de manière covalente au domaine terminal de la polymérase, est libérée [Urban *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Morikawa *et al.*, 2016].

Le transport de la nucléocapside vers les pores du noyau est réalisé grâce aux microtubules [Urban *et al.*, 2010 ; Glebe et König, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Les nucléocapsides s'accumulent ensuite au niveau de l'enveloppe du noyau et facilitent ainsi les interactions entre les protéines et le complexe des pores nucléaires (« nuclear pore complex ») [Urban *et al.*, 2010 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Ce complexe est localisé dans la membrane du noyau et régule l'entrée dans le noyau [Glebe et König, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016]. En effet, un signal de localisation nucléaire est présent en Cter de la protéine core du VHB entre les positions 141 et 185 (PKKKRKV) et va interagir avec les protéines du « nuclear pore complex » que sont les importines [Hoelz *et al.*, 2011 ; Hayes *et al.*, 2016]. Les nucléocapsides semblent être piégées et/ou dégradées par le « Nuclear Basket » du complexe et l'ADNrc est libéré au niveau du nucléoplasme [Urban *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Morikawa *et al.*, 2016].

1.3. Réparation ADN circulaire (ADNrc) incomplet et formation de l'ADNccc

L'entrée de l'ADN partiellement double brin du virus dans le noyau a pour but de produire de l'ADN complet, circulaire et fermé de manière covalente appelé ADNccc (« covalently closed circular DNA »). Cette étape permet de déclencher la transcription et la réplication du virus [Grimm *et al.*, 2011 ; Glebe et König, 2014 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Tong et Revill, 2016].

La première étape consiste à réparer l'ADN circulaire partiellement double brin (ADNrc) grâce aux enzymes virales et cellulaires [Grimm *et al.*, 2011]. La polymérase virale fixée de manière covalente à l'ADNrc va compléter la séquence du brin court, dit de polarité positive [Urban *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Morikawa *et al.*, 2016]. La polymérase virale et l'amorce d'ARN utilisées pour la synthèse du brin positif sont, par la suite, supprimées grâce aux enzymes cellulaires. [Urban *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011]. L'ADNccc pourrait être formé par ligation covalente des deux brins complets d'ADN positif et négatif [Urban *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Morikawa *et al.*, 2016].

L'ADNccc a une organisation structurale de type chromatine complexé avec des protéines histones et non-histones [Urban *et al.*, 2010 ; Glebe et König, 2014]. Il est considéré comme un « mini chromosome » [Urban *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Glebe et König, 2014 ; Tong et Revill, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016b]. Des facteurs spécifiques de l'hôte sont également impliqués dans la formation de l'ADNccc tels que la tyrosyl DNA phosphodiesterase 2 [Urban *et al.*, 2010 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Cet ADNccc est stable et persistant dans le noyau avec une demie-vie de 33 à 57 jours [Hayes *et al.*, 2016 ; Tong et Revill, 2016]. L'ADNccc est crucial pour la persistance de l'infection [Grimm *et al.*, 2011].

1.4. Transcription et traduction

L'ADNccc nouvellement synthétisé sert de modèle pour la production des ARN viraux nécessaires à la production des protéines virales et à la réplication virale [Verrier *et al.*, 2016b]. Tous les ARN transcrits sont produits grâce à la machinerie cellulaire de l'hôte, et plus particulièrement l'ARN polymérase ADN dépendante : la polymérase II [Urban *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Hayes *et al.*, 2016 ; Morikawa *et al.*, 2016 ; Tong et Revill, 2016]. Ainsi, quatre ARN viraux de quatre longueurs différentes sont produits [Morikawa *et al.*, 2016] :

- un ARN de 3,5 kb, nommé ARNpg, qui code la polymérase, la protéine core de capsid ainsi que la protéine précocore non structurale, précurseur de l'AgHBe sécrété
- un ARN de 2,4 et un ARN de 2,1 kb codant les trois protéines de surface LHBS, MHBS et SHBS synthétisées à partir des gènes préS1, préS2 et S grâce aux différents promoteurs

- un ARN de 0,7 kb codant la protéine de régulation de la protéine X

La transcription est régulée par différents promoteurs (préC/C, préS, S et X), mais également différents facteurs de transcriptions spécifiques de l'hôte tels que les enhanceurs 1 et 2, les « CCAAT/enhancer binding protein » (C/EBP) ou « Hepatocyte nuclear factor » (HNF), mais aussi par les protéines virales comme la protéine X ou la protéine core [Urban *et al.*, 2010 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Les quatre classes d'ARN (ARN 3,5 kb, ARN 2,4 kb, ARN 2,1 kb et ARN 0,7 kb) sont ensuite exportées vers le cytoplasme pour être traduites en protéines et permettre la réplication de l'ADN [Morikawa *et al.*, 2016 ; Tong et Revill, 2016].

1.5. Assemblage et sécrétion

1.5.1. Formation et maturation de la capsid

Une fois dans le cytoplasme, la rétrotranscription débute par la fixation de la polymérase virale en 5' de la structure ϵ localisée dans le domaine terminal redondant de l'ARNpg et facilite l'assemblage de la nucléocapside [Urban *et al.*, 2010 ; Glebe et König, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Le complexe s'auto-assemble avec les protéines core pour former la capsid immature [Bruss, 2007 ; Urban *et al.*, 2010 ; Glebe et König, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016]. L'ARNpg est alors, rétrotranscrit en ADN négatif dans le lumen de la particule [Bruss, 2007 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Urban *et al.*, 2010 ; Glebe et König, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Cette étape est initiée par la formation de liaisons phosphodiester entre le résidu hydroxyle d'une tyrosine dans le domaine terminal de la polymérase et une courte séquence d'ADN située sur la boucle centrale de la structure ϵ [Beck et Nassal, 2007 ; Sohn *et al.*, 2009 ; Glebe et König, 2014 ; Tong et Revill, 2016]. Au cours de la synthèse du brin négatif, l'ARNpg est dégradé simultanément par l'activité RNase H de la polymérase, sauf la séquence répétée 1 (DR1). Cette séquence DR1 non dégradée va servir d'amorce pour l'élongation du brin positif et la circularisation du brin négatif en s'appariant à la région DR2 en 5' du brin négatif [Beck et Nassal, 2007 ; Glebe et König, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016]. L'ADNrc est ainsi formé. Dans le cytosol, la nucléocapsid devient mature lorsque l'ARN de la capsid devient ADN [Bruss, 2007 ; Urban *et al.*, 2010].

Puis, la nucléocapsid contenant l'ADN est soit réimportée dans le noyau pour former un stock d'ADNccc (ADNrc converti en ADNccc) soit enveloppée et sécrétée au niveau du réticulum endoplasmique pour infecter de nouvelles cellules [Urban *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Morikawa *et al.*, 2016 ; Tong et Revill, 2016]. Seule une très faible quantité de capsides nouvellement synthétisées est réimportée dans le noyau [Hayes *et al.*, 2016]. Des facteurs d'hôtes et viraux contrôlent la formation et la taille du pool d'ADNccc [Morikawa *et al.*, 2016]. Par exemple, les

protéines LHBS du virus jouent un rôle dans le contrôle de l'amplification de l'ADNccc (feedback négatif) [Urban *et al.*, 2010].

1.5.2. Enveloppement et formation du virion

La nucléocapside acquiert sa capacité de bourgeonnement dès que l'ARNpg de la capsid immature est rétrotranscrit en ADN (capsid mature) [Bruss, 2007]. La différenciation des capsides matures et immatures a lieu avant l'arrivée au site de bourgeonnement [Bruss, 2007]. Il existe un motif essentiel au bourgeonnement et la formation de la capsid au niveau des protéines de capsid : le motif PPAY en position aa 129 – 132 [Bruss, 2007]. Les protéines d'enveloppe LHBS et SHBS jouent un rôle essentiel dans l'enveloppement du virus [Bruss, 2007 ; Glebe et König, 2014 ; Urban *et al.*, 2014]. En effet, les protéines d'enveloppe sont insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique sous leur forme repliée [Urban *et al.*, 2010 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Durant la synthèse des protéines LHBS, le domaine prés prend sa conformation iprés (i : interne) où il est exposé du côté cytoplasme et devient myristoylé [Urban *et al.*, 2010]. Dans un premier temps, la nucléocapside est transportée à la surface des corps multi-vésiculaires par la protéine ligase ubiquitine E3, Nedd4 (« neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 ») et « γ -2-adaptine » [Glebe et Urban, 2007 ; Urban *et al.*, 2010 ; Morikawa *et al.*, 2016 ; Tong et Revill, 2016]. Le processus de migration des protéines du réticulum endoplasmique vers les corps multi-vésiculaires est inconnu [Morikawa *et al.*, 2016].

La nucléocapside et l'enveloppe du VHB entrent ensuite en contact au niveau des corps multi-vésiculaires [Morikawa *et al.*, 2016]. Le bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire est régulé par un mécanisme multi-protéique faisant intervenir le complexe ESCRT (« endosomal sorting complexes required for transport ») [Watanabe *et al.*, 2007 ; Glebe et König, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Ainsi, le domaine prés des protéines LHBS interagit avec la nucléocapside mature contenant ADNrc (17 aa en Cter de prés1 et 5 aa Nter de prés2) et forme la particule de Dane de 42 nm [Bruss, 1997 ; Bruss, 2007 ; Xie *et al.*, 2010 ; Glebe et König, 2014 ; Urban *et al.*, 2014 ; Morikawa *et al.*, 2016]. Le domaine S semble également intervenir dans l'assemblage [Glebe et König, 2014]. Après l'enveloppement de la nucléocapside, la région prés est transloquée à travers la membrane [Urban *et al.*, 2010]. Pour finir, le virion bourgeonne à travers les corps multi-vésiculaires dans la lumière du réticulum endoplasmique pour ensuite être sécrété par les cellules [Glebe, 2006 ; Urban *et al.*, 2010 ; Tong et Revill, 2016]. Lors de ces étapes de bourgeonnement, il semblerait y avoir un passage par le compartiment pré-Golgi responsable de la composition de l'enveloppe. En effet, l'enveloppe est plutôt composée de dérivés lipidiques du compartiment intracellulaire que de la membrane plasmique [Glebe et Urban, 2007]. Le mécanisme de sécrétion du virus est incertain, mais Rab 7 semble réguler la dégradation des corps multi-vésiculaires [Morikawa *et al.*, 2016].

Les protéines d'enveloppe génèrent également des particules sous-virales (SVP) (§ 'structure et organisation'). Ces particules sont libérées par l'appareil de Golgi ou les corps multi-vésiculaires [Morikawa *et al.*, 2016]. Les protéines d'enveloppe sont traduites et intégrées dans la membrane du réticulum endoplasmique où ont lieu les modifications traductionnelles (exemple : glycosylation) et l'acquisition de la structure par la formation des ponts disulfures grâce à une protéine disulfure isomérase qui réside dans le réticulum endoplasmique, l'assemblage en dimères protéiques à la surface et la formation de la boucle antigénique. Les SVPs sont ensuite sécrétées par la voie classique sans la nucléocapside [Glebe et König, 2014].

1.6. Les deux topologies de préS et le pouvoir infectieux

Les deux topologies de préS ont un rôle important tout au long du cycle infectieux du virus [Bruss, 2007 ; Watashi, 2016]. Des hypothèses ont été émises concernant le rôle de ces deux topologies (Figure 11). La conformation ipréS serait la forme de virion sécrétée par la cellule [Bruss, 2007 ; Watashi, 2016]. Elle jouerait un rôle dans l'enveloppement de la nucléocapside en interagissant avec la protéine core de la capsidie dans le cytoplasme [Bruss, 2007 ; Xie *et al.*, 2010 ; Watashi, 2016]. La conformation epréS (e : externe), quant à elle, jouerait un rôle important dans l'entrée du virus dans les cellules [Xie *et al.*, 2010 ; Watashi, 2016]. Cette conformation pourrait jouer un rôle dans la liaison avec le récepteur HSPG [Somiya *et al.*, 2016]. Il a été démontré que les virions prêts à infecter une cellule présentaient environ 66 % de leur domaine préS à leur surface (epréS) et seulement 2 % de leur domaine préS pour les virions nouvellement sécrétés [Watashi, 2016]. Le mécanisme de changement de conformation ipréS/epréS est complexe. Il semblerait que ce changement soit dépendant de la température. En effet, la quantité de particules avec une conformation de type epréS serait favorisée lors d'une augmentation de la température entre 37°C et 42°C. Le changement de conformation ipréS/epréS dépendrait également du pH ; un pH acide favoriserait la conformation epréS [Somiya *et al.*, 2016 ; Watashi, 2016]. La conformation epréS ne permet pas une forte virémie, tandis que le passage par la conformation ipréS serait plus favorable à une distribution des particules plus spécifique dans le foie [Watashi, 2016]. Ainsi, le changement de conformation epréS/ipréS pourrait également être une stratégie du virus pour échapper à l'hôte [Watashi, 2016].

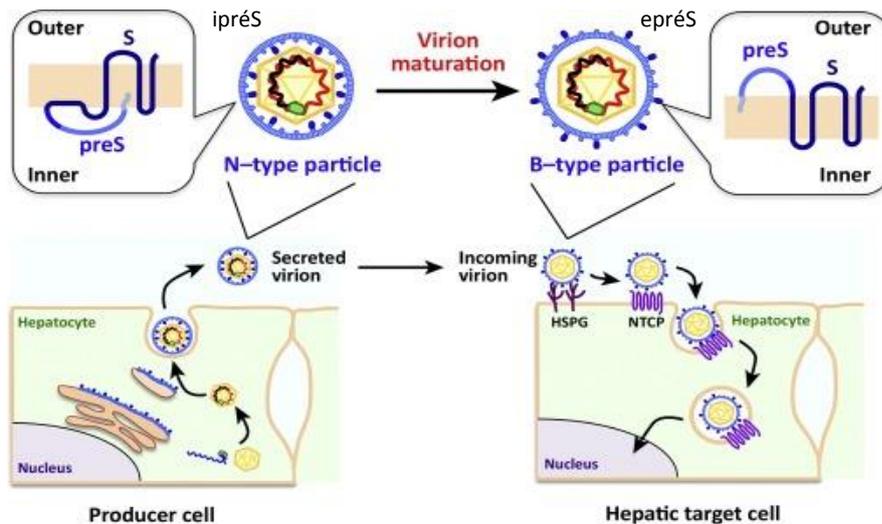


Figure 11 : Représentation schématique du rôle des deux topologies *iprS* et *eprS* des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B impliqué dans le processus de maturation et le pouvoir infectieux du virus de l'hépatite B [Watashi, 2016].

3. Les zones fonctionnelles présentes sur les protéines d'enveloppe du VHB

Les protéines de surface jouent un rôle essentiel dans le pouvoir infectieux du virus, d'une part dans l'entrée du virus dans les cellules permissives et d'autre part comme cibles du système immunitaire de l'hôte.

En effet, les protéines SHBs et LHBs sont essentielles à l'entrée du virus dans les cellules (§ 'le cycle viral du VHB'). Les acides aminés en position s122 et s141 de la protéine SHBs interagissent avec les HSPG tandis que les acides aminés 2 à 48, et plus particulièrement les acides aminés 9 à 18 de la protéine LHBs (séquence de référence : génotype D) qui sont importants pour l'interaction avec le récepteur NTCP [Yan *et al.*, 2012 ; Sureau et Salisse, 2013]. La protéine MHBs n'est pas indispensable à l'infection. Cependant, en Nter de la protéine préS2 se trouve le site de fixation à la nucléocapside, essentiel pour l'assemblage du virus [Xie *et al.*, 2010 ; Lin *et al.*, 2012]. Il existe également d'autres zones fonctionnelles importantes pour le pouvoir infectieux du virus au niveau des régions préS1 et préS2 [Xie *et al.*, 2010 ; Lin *et al.*, 2012]:

- le promoteur des protéines S (acides nucléiques 3045 – 3180),
- une zone importante pour le changement de topologie des protéines d'enveloppe (*iprS* interne et *eprS* externe; aa 74 – 118),
- le site de fixation à la nucléocapside (aa 103 – 127) important pour l'assemblage du virus
- un site de fixation aux pHSA ; aa 123 – 136. Cette protéine est un partenaire cellulaire potentiel impliqué dans l'entrée du virus dans les cellules.

Les zones fonctionnelles importantes pour le pouvoir infectieux du VHB sont répertoriées sur la Figure 12.

Les protéines d'enveloppe sont également essentielles à l'induction des réponses immunitaires cellulaires et humorales. La région S est la cible préférentielle de l'immunité à médiation humorale. En effet, la région S comprend la région MHR (aa s99 – s169) qui est ciblée par le système immunitaire de l'hôte et plus particulièrement le déterminant « a » (aa s124 – s147) comprenant une série d'épitopes reconnus par les anticorps neutralisants. La structure de la protéine S est importante pour l'induction de la réponse immunitaire cellulaire. La conformation de la protéine est régie par quatre ponts disulfures conservés (s107 – s138 ; s121 – s124 ; s137 – s149 ; s139 – s147) permettant de maintenir une structure en forme de boucles exposées à la surface du virus [Locarnini et Yuen, 2010]. De plus, cette protéine possède un site de N-glycosylation en position 146 qui est un signal important pour le repliement de la protéine de surface et l'assemblage de la nucléocapside (Figure 13) [Yu *et al.*, 2014].

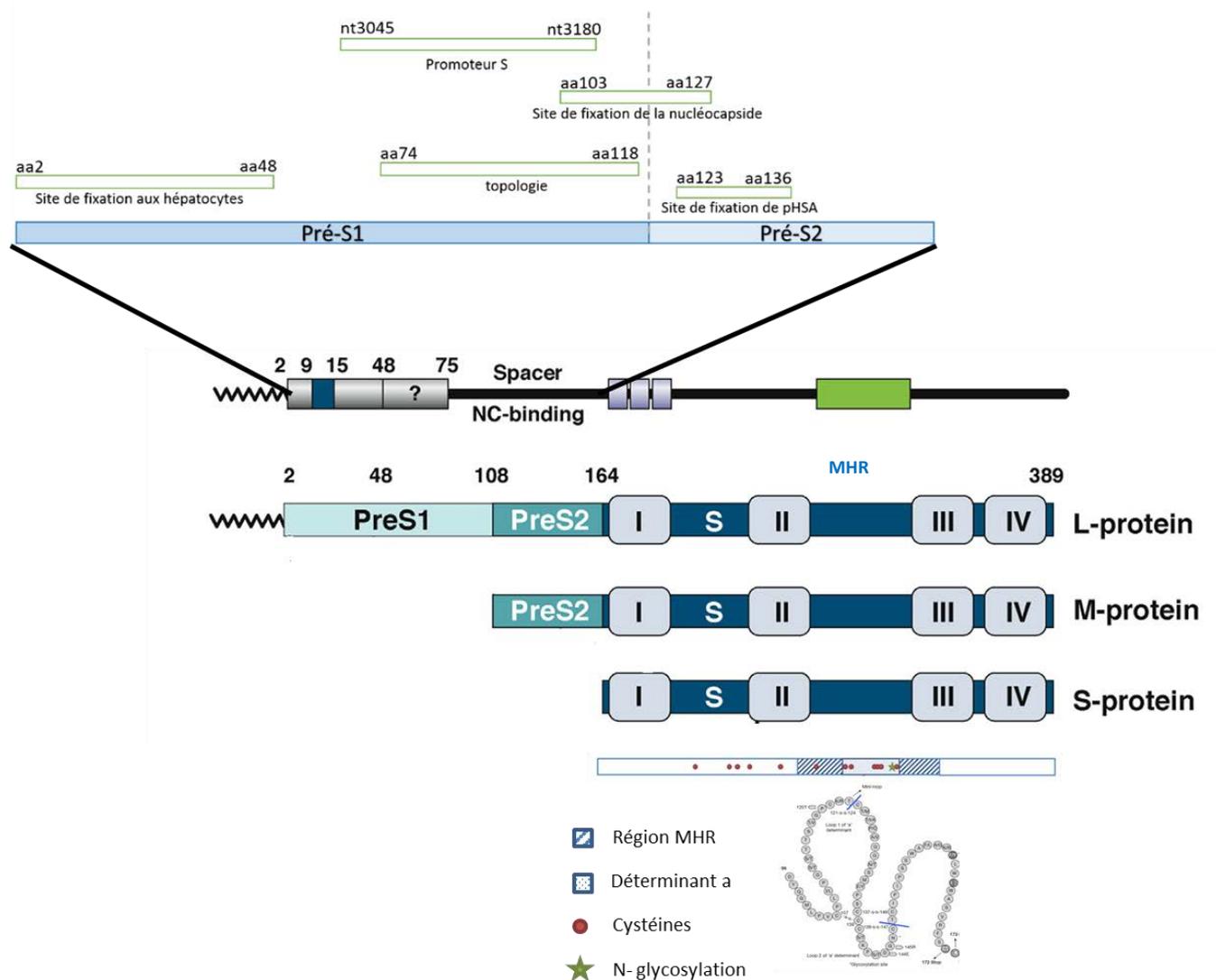


Figure 12 : Cartographie des zones fonctionnelles présentes sur les régions préS et S codant les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B (pHSA : « polymerized Human Serum Albumin ») [Locarnini et Yuen, 2010 ; Lin *et al.*, 2012 ; Urban *et al.*, 2014].

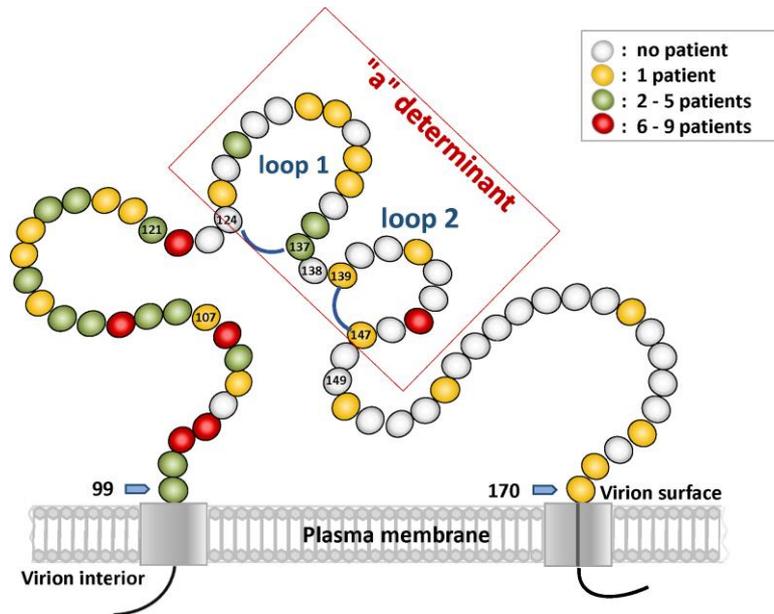


Figure 13 : Représentation de la région hydrophile majeure (MHR) présent sur les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B [Gencay et al., 2017]. Chaque acide aminé est représenté sous la forme d'un cercle. Les cercles rouges sont les positions les plus souvent mutées, les positions en vert sont moyennement retrouvées mutées, les positions en jaune sont faiblement mutées et les positions en blanc ne sont généralement pas mutées.

Des épitopes des lymphocytes T sont également présents au sein des régions préS1, préS2 et S [Desmond et al., 2008]. Ces épitopes vont être impliqués dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les différents épitopes des lymphocytes T helper (cluster de différenciation 4 ; CD4⁺) et des lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) sont décrits dans la Figure 14.

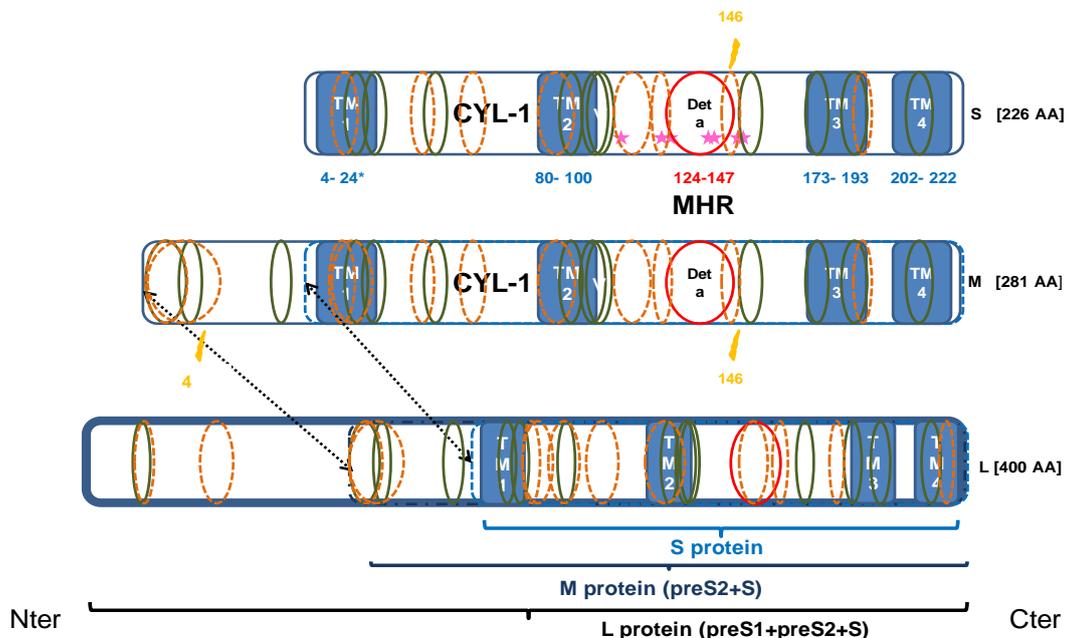


Figure 14 : Cartographie des épitopes des lymphocytes T présents sur les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B (SHB, MHB et LHB). Les épitopes des lymphocytes T helper (CD4⁺) sont représentés par un cercle vert, les épitopes des lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) sont représentés par un cercle orange (séquence de référence : virus de l'hépatite B de génotype A) [Desmond et al., 2008 ; Velay , 2015].

IV. Les différents modèles d'études disponibles pour étudier le VHB

1. Les modèles *in vivo*

Il existe différents modèles animaux qui sont utilisés pour étudier la pathogénèse du VHB et développer de nouveaux traitements contre ce virus. Le virus de l'hépatite B est un virus avec une spécificité d'hôte étroite. Ainsi, le VHB infecte seulement certaines espèces animales. Le chimpanzé est le seul primate non humain sensible à l'infection par le VHB [Zeisel *et al.*, 2015 ; Allweiss et Dandri, 2016]. C'est le seul modèle immunocompétent pour l'infection par le VHB et le virus de l'hépatite Delta (VHD) ; il mime le plus précisément l'infection naturelle par le VHB [Allweiss et Dandri, 2016]. Ce modèle a permis de développer des vaccins contre le VHB et d'étudier les réponses immunitaires engendrées par celui-ci [Allweiss et Dandri, 2016 ; Sandhu *et al.*, 2017]. Cependant, le chimpanzé ne développe pas de maladies hépatiques sévères lorsqu'il est infecté chroniquement [Sandhu *et al.*, 2017]. De plus, l'utilisation du chimpanzé est restreinte pour des raisons d'éthique. Ainsi, les macaques sont utilisés comme modèles alternatifs, mais présentent une identité de séquence avec l'humain qui est seulement de 93 % [Zeisel *et al.*, 2015]. De plus, des différences au niveau de la séquence du NTCP ont également pu être observées chez certaines espèces de macaques limitant ainsi leur utilisation pour l'étude de l'entrée du virus ; le virus devant être inoculé de façon intrahépatique à l'aide de différentes constructions d'ADN viral [Zeisel *et al.*, 2015 ; Allweiss et Dandri, 2016]. De plus, l'utilisation de ces primates non humains est également très restreinte. Il était ainsi nécessaire de trouver de nouveaux modèles d'étude en se concentrant sur les petits animaux.

Ainsi, des modèles d'étude faisant intervenir d'autres virus de l'hépatite B spécifiques d'autres espèces animales ont été utilisés : le virus de l'hépatite B du canard (DHBV) et de la marmotte (WHV). Ces deux modèles ont permis d'étudier certaines étapes du cycle infectieux du VHB et le développement de la pathogénèse tout en prenant en compte les différences existant avec le VHB (humain).

Le virus de la marmotte (WHV) a permis d'étudier l'histoire naturelle de l'infection, d'approfondir les connaissances en matière de pathogénèse de l'infection chronique par le virus (maladie hépatique et carcinogénèse), de trouver de nouveaux vaccins et d'évaluer la toxicité des traitements [Roggendorf *et al.*, 2010 ; Allweiss et Dandri, 2016 ; Sandhu *et al.*, 2017]. Cependant, il existe des différences avec le VHB. En effet, le développement de CHC est plus répandu chez les marmottes et le mécanisme de cancérogénèse est différent chez l'humain. De plus, il n'existe pas de séroconversion de l'AgHBe naturellement chez cet animal et les marmottes présentent un métabolisme différent de l'Homme (hibernation) [Zeisel *et al.*, 2015 ; Allweiss et Dandri, 2016]. Par

ailleurs, la disponibilité des animaux est difficile et le modèle est très onéreux [Allweiss et Dandri, 2016].

Le virus de l'hépatite B spécifique du canard (DHBV) a également été utilisé comme modèle d'étude des *Hepadnaviridae*. Il a permis d'élucider le mécanisme de transcription et de réplication de cette famille de virus [Glebe, 2007 ; Allweiss et Dandri, 2016 ; Sandhu *et al.*, 2017]. Cependant, il existe des différences importantes avec le VHB. En effet, le DHBV est transmis majoritairement de façon verticale et le mécanisme d'entrée du virus fait intervenir des récepteurs différents du VHB. Par ailleurs, une hépatite DHBV conduit majoritairement à une hépatite chronique contrairement au VHB, le DHBV cause rarement des maladies au niveau du foie et la composition des protéines d'enveloppe est différente (il n'existe pas de protéines M et les protéines d'enveloppe ne sont pas glycosylées) [Glebe, 2007].

Afin d'étudier le VHB, un seul modèle animal non primate peut être infecté naturellement par le VHB : le *Tupaia belangeri* (Figure 15). Le *Tupaia* partage des homologies génétiques élevées avec les humains et les primates qui permettent au VHB humain d'infecter transitoirement les hépatocytes de *Tupaia belangeri* [Tsukiyama-Kohara et Kohara, 2014 ; Allweiss et Dandri, 2016]. L'utilisation de ce modèle pour étudier le VHB a permis de mieux définir la réplication du virus, ainsi que les gènes exprimés par le VHB. Ce modèle permet d'étudier le cycle viral, l'infection chronique par le VHB et la formation d'ADNccc [Sandhu *et al.*, 2017]. Cependant, l'infection n'est que transitoire (pas d'infection chronique) et ce modèle ne présente que des faibles taux d'infection. De plus, les réponses immunitaires et la pathogénèse sont différentes de ce qui est observé chez l'Homme [Allweiss et Dandri, 2016]. La difficulté de maintien et la gestion des *Tupaia*s sont également des facteurs limitants l'utilisation de cet animal pour étudier les infections virales [Tsukiyama-Kohara et Kohara, 2014]. Des recherches sont actuellement en cours pour optimiser ces problèmes (modification génétique, conditions d'élevage) et pour augmenter le potentiel de ce petit animal dans l'étude de la pathogénèse des virus et l'évaluation du potentiel des médicaments [Tsukiyama-Kohara et Kohara, 2014].



Figure 15 : *Tupaia* adulte (*Tupaia belangeri*) [Tsukiyama-Kohara et Kohara, 2014].

La disponibilité de ces animaux, les contraintes du modèle et les disparités avec l'Homme ont mené à la recherche de nouveaux modèles faisant intervenir des animaux plus couramment utilisés en recherche : les souris. Elles ne sont pas sensibles à l'infection par le VHB, mais ont été modifiées pour étudier le VHB. Différents modèles murins ont été développés.

Des souris ont été modifiées génétiquement pour exprimer les protéines virales du VHB (AgHBs, AgHBe, protéine X) ou produire le génome complet du VHB [Dandri et Lütgehetmann, 2014 ; Allweiss et Dandri, 2016]. Les souris transgéniques sont réalisées par micro-injection d'ADN du VHB, contenant les régions codantes d'intérêts, au niveau de cellules œufs fertilisées [Chisari *et al.*, 1985]. Ces modèles sont utilisés pour étudier la réplication du VHB, mais ne permettent pas d'étudier le cycle complet d'infection. Par exemple, l'entrée du virus dans les cellules ne peut pas être étudiée, ni les mécanismes de clairance de l'infection, car le génome viral est intégré dans le génome de l'hôte [Allweiss et Dandri, 2016].

Des souris non sensibles à l'infection par le VHB peuvent également être infectées soit par un vecteur adénovirus contenant le génome du VHB permettant la transformation des hépatocytes des souris immunocompétentes, soit par l'injection hydrodynamique du matériel génétique du VHB dans le foie des souris [Dandri et Lütgehetmann, 2014 ; Allweiss et Dandri, 2016]. Ces modèles permettent d'étudier l'immunopathogenèse du virus, la clairance virale et l'étude des souches virales, sauvages ou mutées. Cependant, ces différents modèles murins ne permettent pas d'étudier les étapes d'entrée du virus, ni d'étudier l'ADNccc et la propagation du virus. De plus, l'infection des souris n'est que transitoire [Allweiss et Dandri, 2016].

D'autres modèles de souris humanisées ont ainsi été développés pour étudier le cycle complet du VHB.

Ces différents modèles consistent à créer des souris chimériques présentant un foie humain. Des hépatocytes humains sont intégrés de façon stable dans le parenchyme du foie des souris [Dandri et Lütgehetmann, 2014 ; Allweiss et Dandri, 2016]. Pour réaliser ces modifications au niveau du foie des souris, les hépatocytes murins ont préalablement été éliminés et les réponses immunitaires adaptatives de l'animal ont été supprimées pour permettre la survie de la greffe d'hépatocytes humains.

Il existe différents modèles de souris chimères hépatiques (HuHEP, souris humanisées portant des xéngreffes d'hépatocytes humains). Les souris uPA-SCID (urokinase-type Plasminogen Activator- Severe Combined Immune Deficient) sont issues du croisement entre des souris immunodéficientes (SCID) et des souris ayant subi une destruction des hépatocytes (uPA) (Figure 16). Les souris SCID ont perdu la capacité à produire des cellules immunitaires fonctionnelles (lymphocytes B et T) à cause de la destruction de la moelle osseuse par irradiation [Xie *et al.*, 2010]. Les souris uPA sont des souris qui expriment l'urokinase plasminogène activator qui est toxique pour

les cellules du foie et va donc détruire les hépatocytes murins. Après avoir été croisées entre elles, les souris uPA-SCID vont subir une greffe d'hépatocytes primaires humains ou de *Tupaia belangeri* via les veines spléniques et portales. La régénération du foie humanisé est obtenue au bout de deux mois ; la présence d'albumine sérique humaine est utilisée pour valider le modèle [Allweiss et Dandri, 2016]. Les souris uPA peuvent être croisées également avec d'autres modèles de souris immunodéficientes telles que les souris Rag 2^{-/-} « knock out » ; les souris déficientes en Rag sont dépourvues de lymphocytes en raison de leur incapacité de réarranger les loci des immunoglobulines (Ig) ou des récepteurs des cellules T (TCR ; « T cell receptor ») et les souris Scid/beige dépourvut de lymphocytes B, T et de cellules « Natural Killer » (NK) [Dandri et Lütgehetmann, 2014 ; Allweiss et Dandri, 2016].



Figure 16 : Approche expérimentale utilisée pour générer des souris uPA-SCID (urokinase-type Plasminogen Activator- Severe Combined Immune Deficient) présentant des foies chimériques composés d'hépatocytes humains [Dandri et Lütgehetmann, 2014].

Il existe également d'autres modèles de souris dont la destruction des hépatocytes murins est contrôlée : les souris déficientes en acide acétoacétate de fumaryle (FAH ; Fumarylacetoacetate hydrolase). En effet, l'enzyme FAH est une enzyme importante pour la dégradation de la tyrosine. Son inhibition favorise l'accumulation de composés toxiques pour le foie. Cette dégradation peut être contrôlée par l'administration d'un médicament : le Nitisinone (NTBC). Ce nouveau modèle présente un taux de greffe du foie après croisement de plus de 95 % [Allweiss et Dandri, 2016].

Un troisième modèle TK-NOG a également été développé. Ces souris sont issues du croisement entre des souris présentant un transgène de la thymidine kinase (TK), du virus de l'herpès simplex, permettant d'éliminer les hépatocytes murins des souris NOG (croisement entre des souris NOD « Non-obese diabetic », SCID et Il2ry) pour permettre la greffe de cellules hépatiques humaines (Figure 17). Les dommages au foie peuvent être contrôlés par le ganciclovir qui détruit les hépatocytes exprimant la thymidine kinase [Dandri et Lütgehetmann, 2014 ; Allweiss et Dandri, 2016].

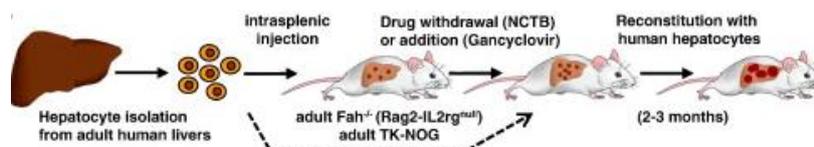


Figure 17 : Approche expérimentale utilisée pour générer des souris TK-NOG (thymidine kinase-NOG) présentant des foies chimériques composés d'hépatocytes humains [Dandri et Lütgehetmann, 2014].

Ces modèles de souris HuHEP permettent d'obtenir une virémie importante et des taux d'AgHBs et AgHBe comparables à ceux observés chez l'Homme [Xie *et al.*, 2010]. Ils permettent

d'étudier l'entrée du virus dans les cellules, la propagation dans les cellules du foie, les réponses immunitaires innées et la régulation de l'ADNccc. Cependant, ces modèles sont complexes et nécessitent une quantité importante d'hépatocytes primaires dont la disponibilité est limitée. De plus, l'absence d'un système immunitaire fonctionnel empêche l'étude de l'immunité engendrée contre le VHB dans ces modèles [Allweiss et Dandri, 2016].

Ainsi, des souris chimériques humanisées HuHEP et immunocompétentes ont été développées pour mieux caractériser la pathogenèse du VHB, l'immunité et développer de nouveaux immunomodulateurs. Différentes approches ont été étudiées comme la restitution des cellules immunitaires après infection de souris humanisées immunodéficientes, la destruction partielle du système immunitaire ou la co-transplantation de cellules souches hématopoïétiques et de cellules hépatocytaires adultes [Dandri et Lütgehetmann, 2014 ; Allweiss et Dandri, 2016]. Par exemple, des hépatocytes humains adultes ont été introduits par injection intra-splénique chez des nouveau-nés uPA-NOG (Figure 18). Après la reconstitution du foie des souris avec les hépatocytes humains (deux à trois mois), des cellules souches hépatiques isolées de foies fœtaux humains ont été administrées chez ces souris préalablement traitées pendant trois jours sous chimiothérapie par threosulfane. Chez ce modèle, la reconstitution partielle du système immunitaire chez la souris est observée après deux à trois mois [Dandri et Lütgehetmann, 2014].

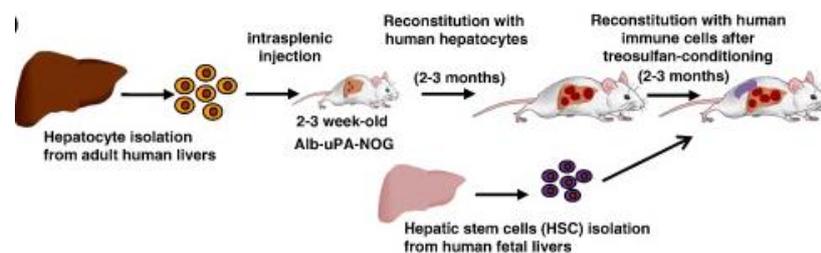


Figure 18 : Approche expérimentale utilisée pour générer des souris uPA-NOG (urokinase-type Plasminogen Activator-NOG) présentant des foies chimériques composés d'hépatocytes humains [Dandri et Lütgehetmann, 2014].

Actuellement, les recherches se focalisent sur de nouveaux modèles prometteurs issus du croisement entre des souris HuHEP et des souris His qui présentent un système immunitaire humanisé [Strick-Marchand *et al.*, 2015]. Les premiers résultats montrent une greffe stable et robuste d'hépatocytes humains chez ces souris [Strick-Marchand *et al.*, 2015]. Ces modèles sont actuellement en cours d'amélioration.

Une étude réalisée par Lempp *et al.* (2017), a également montré que la transfection du NTCP humain chez les macaques et les cochons permettait de rendre ces espèces sensibles à l'infection par le VHB. Ces animaux immunocompétents pourraient ainsi être utilisés pour étudier l'infection, la réponse immunitaire du VHB et la pathogenèse [Lempp *et al.*, 2017].

2. Les modèles *in vitro*

Différents modèles cellulaires sont actuellement disponibles pour étudier le cycle infectieux du VHB. Ces modèles présentent chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Deux types de lignées cellulaires sont utilisés : les lignées primaires hépatocytaires (PHH, PTH) et les lignées cellulaires d'hépatomes (HepG2, Huh7, HepaRG, NTCP-HepG2).

Pour la plupart de ces modèles (sauf les cellules PTH et les cellules HepG2 et Huh7), l'utilisation de PolyéthylèneGlycol (PEG) et de Diméthylsulfoxyde (DMSO) est nécessaire à l'infection. Le PEG permet d'augmenter la fixation du VHB et VHD aux cellules, médié par les glycosaminoglycanes [Urban *et al.*, 2014]. Le DMSO, quant à lui, augmente certaines fonctions spécifiques du foie comme la transcription de cytochromes (cytochrome P (CYP) 1A2, CYP2B6, CYP3A4) et accroît, ainsi, le taux d'infection des cellules [Hoekstra *et al.*, 2011 ; Verrier *et al.*, 2016c]. Le DMSO est indispensable pour la polarisation des cellules et la différenciation hépatocytaire (modulation de l'expression de facteurs intervenant dans l'entrée du VHB, modification des motifs transcriptomiques des cellules) [Verrier *et al.*, 2016c]. Toutefois, son rôle exact dans l'infection par le VHB sur les modèles cellulaires est mal caractérisé. Par ailleurs, le DMSO est toxique pour les cellules [Xie *et al.*, 2010].

Les différents modèles cellulaires utilisés pour étudier le VHB sont présentés ci-dessous. Les cellules primaires d'hépatocytes humains (PHH) ont été largement utilisées pour les premières études du VHB. Les cellules sont issues de biopsie de foie [Xie *et al.*, 2010]. Ce modèle *in vitro* est le plus proche des hépatocytes humains. Ce modèle permet d'étudier la réponse immunitaire innée et le métabolisme des médicaments [Zeisel *et al.*, 2015 ; Hayes et Chayama, 2016 ; Sandhu *et al.*, 2017]. Cependant, leur utilisation est limitée à cause de leur disponibilité (biopsie), de la diversité génétique du foie des donneurs (problème de reproductibilité), de la difficulté de maintien en culture (deux à trois semaines seulement) et de la perte rapide de leur capacité à exprimer les facteurs spécifiques du foie nécessaire à l'infection par le VHB [Zeisel *et al.*, 2015 ; Allweiss et Dandri, 2016 ; Hayes et Chayama, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016c]. La culture des cellules PHH nécessite une étape de différenciation à l'aide de DMSO (1,8 – 2 %) pour permettre l'infection par le VHB [Zeisel *et al.*, 2015]. Le pourcentage d'infection varie entre 20 et 100 % [Zeisel *et al.*, 2015].

Une alternative aux cellules PHH est l'utilisation des cellules primaires d'hépatocytes de *Tupaia belangeri* (PTH) qui ont montrées leur susceptibilité à l'infection par le VHB [Von Weizsacker *et al.*, 2004]. Ces cellules ont permis de mettre en évidence le rôle du récepteur NTCP dans l'entrée du VHB au sein des hépatocytes. L'infection ne nécessite pas de DMSO [Xie *et al.*, 2010]. Cependant, les difficultés d'élevage de l'animal ont également limité l'utilisation de ce modèle [Zeisel *et al.*, 2015].

Une seconde alternative a été d'utiliser des hépatocytes primaires humains (PHH) isolés de souris chimériques possédant un foie humanisé [Ishida *et al.*, 2015]. Ce modèle permet d'avoir un meilleur accès aux hépatocytes primaires. Les problèmes de reproductibilité sont réduits avec ce modèle, car les cellules présentes le même patrimoine génétique [Ishida *et al.*, 2015]. Cependant, le modèle est onéreux et complexe [Hayes et Chamaya, 2016].

De nouveaux modèles d'études faisant intervenir des cellules d'hépatomes ont ainsi été développés. Les cellules Huh7 et HepG2 sont des cellules issues de carcinome hépatocellulaire humain. Elles sont permissives à la réplication virale et à l'assemblage de particules virales (morphogénèse), mais ne sont pas sensibles naturellement à l'infection car elles n'expriment pas les récepteurs d'entrée du virus à leur surface comme le NTCP [Zeisel *et al.*, 2015, Allweiss et Dandri, 2016]. De plus, des différences morphologiques (exemple : les cellules PHH sont généralement cubiques et binuclées tandis que les HepG2 ont une morphologie épithéliale et un seul noyau) ont été observées par rapport aux cellules PHH [Hayes et Chamaya, 2016]. Ainsi, une étape de transfection de plasmide est nécessaire pour produire des particules infectieuses [Zeisel *et al.*, 2015]. Ce modèle permet d'étudier les étapes post-entrée [Zeisel *et al.*, 2015]. Il existe des plasmides permettant la production de particules virales VHB (pTriex-HBV). Cependant, de par son organisation complexe, le VHB est difficile à produire. Ainsi, une alternative à ce problème fait intervenir le génome du VHD beaucoup plus simple à produire que celui du VHB [INTS, Paris ; Pr. Sureau]. En effet, le VHD utilise l'enveloppe du VHB pour se propager. Ainsi, la transfection transitoire d'un plasmide codant la ribonucléoparticule Delta (pSLVD3) et d'un second pour les protéines d'enveloppe du VHB (pT7HB2.7) permet de produire des particules virales présentant l'enveloppe protéique du VHB importante pour l'entrée.

Il existe également des lignées cellulaires avec une intégration stable du VHB comme les cellules HepG2.2.15 ou HepAd38. Ces cellules ne permettent pas l'étude des étapes d'entrée du virus dans les cellules et l'étude de la réponse immunitaire innée, mais permettent d'étudier les étapes de réplication virale, le métabolisme des médicaments et les interactions du virus avec l'hôte au sein des cellules (intégration dans le génome de l'hôte, régulation épigénétique de l'ADNccc) [Allweiss et Dandri, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016c ; Sandhu *et al.*, 2017]. Elles sont également utilisées pour produire des inocula importants de VHB [Verrier *et al.*, 2016c].

Afin d'observer les mécanismes d'entrée du virus de l'hépatite B, Gripon *et al.* (2002) ont décrit un nouveau modèle cellulaire : les cellules HepaRG (Figure 19). Ces cellules sont issues d'une tumeur de patients souffrant d'une infection par le virus de l'hépatite C [Gripon *et al.*, 2002]. Cette lignée est stable avec une prolifération en continu [Gripon *et al.*, 2002]. Ces cellules présentent un transcriptome proche des cellules PHH, comme les cytochromes P450 [Verrier *et al.*, 2016c]. De plus, ces cellules peuvent produire des particules infectieuses jusqu'à plus de 100 jours post-infection et

permettent ainsi d'étudier l'effet de molécules antivirales [Allweiss et Dandri, 2016]. Ces cellules progénitrices de foie sont bipotentes et nécessitent une étape de différenciation (DMSO, Hydrocortisone) pour être sensible à l'infection par le VHB et exprimer les fonctions spécifiques du foie [Gripon *et al.*, 2002]. Deux types cellulaires sont exprimés lors de la différenciation : des cellules biliaires et des cellules hépatocytaires. Seules les cellules hépatocytaires (50-55 % des cellules) vont supporter l'infection par le VHB [Gripon *et al.*, 2002 ; Allweiss et Dandri, 2016 ; Hayes et Chamaya, 2016]. Ce modèle a permis d'étudier l'entrée du virus dans les cellules et a mis en évidence le rôle de la protéine X dans la régulation de l'ADNccc [Gripon *et al.*, 2002 ; Allweiss et Dandri, 2016 ; Verrier *et al.*, 2016c]. Cependant, l'infection ne se propage pas dans le milieu de culture. De plus, l'infection n'est efficace que dans 5 à 20 % des cellules [Zeisel *et al.*, 2015].

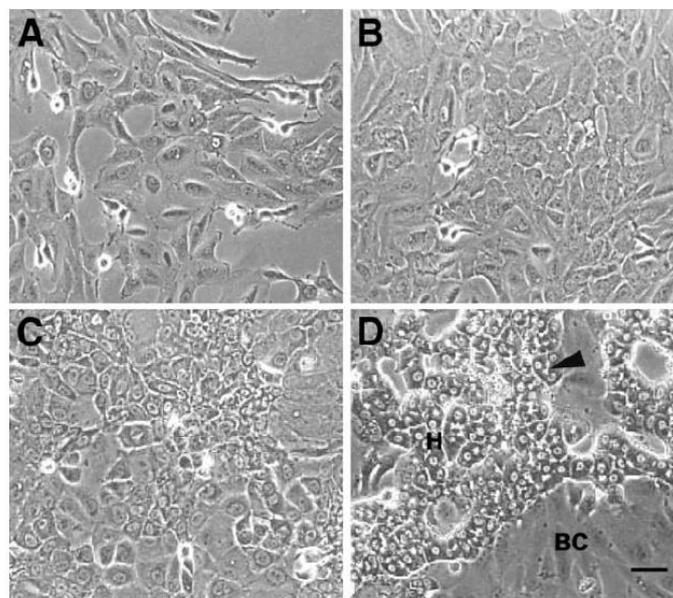


Figure 19 : Observation de la morphologie des cellules HepaRG, en microscopie en contraste de phase, du processus de différenciation. L'ajout de 2 % de DMSO a été réalisé lors du 15^{ème} jour. La photo A représente les cellules HepaRG deux jours après encencement, la photo B cinq jours post-encencement, la photo C à 15 jours au moment de l'ajout du DMSO pour la différenciation des cellules et la photo D à 30 jours avec les cellules différenciées soit en Hépatocytes (H) soit en cellules biliaires (BC) [Cerec *et al.*, 2007].

Pour améliorer le taux d'infection du VHB au sein d'un modèle *in vitro*, la découverte du récepteur NTCP a permis de développer, récemment, de nouveaux modèles cellulaires faisant intervenir des cellules Huh7 ou HepG2 exprimant le récepteur NTCP à leur surface [Zeisel *et al.*, 2015 ; Allweiss et Dandri, 2016]. Pour cela, les cellules sont transfectées avec un plasmide codant le récepteur NTCP humain (hNTCP). Le taux d'infection de ces cellules est augmenté entre 50 et 100 % [Zeisel *et al.*, 2015]. Ce modèle permet d'étudier l'effet des nouveaux antiviraux et de mieux comprendre les facteurs qui interviennent dans l'entrée du VHB. Cependant, l'infection par le VHB n'est efficace qu'en présence d'une quantité importante de DMSO (2,5 - 3,5 %) et nécessite également une quantité d'inoculum importante [Zeisel *et al.*, 2015 ; Hayes et Chamaya, 2016]. De

plus, ce sont des cellules non différenciées, transformées *in vitro* qui présentent des différences avec les hépatocytes primaires humains (mutations et anomalies chromosomiques, expression différente de certains gènes, propriétés métaboliques différentes) [Zeisel *et al.*, 2015 ; Verrier *et al.*, 2016c].

Les avantages et les inconvénients de chaque modèle cellulaire sont répertoriés dans le Tableau 2.

Des études sont en cours afin de développer de nouveaux modèles d'étude plus proches des cellules humaines, qui amélioreraient les études du cycle complet du virus et permettraient de mieux caractériser l'ADNccc. De plus, il est nécessaire de rechercher de nouveaux modèles *in vitro* pour contourner les problèmes d'efficacité et de sécurité qui ont pu être observés lorsque les tests réalisés sur modèle *in vitro* ont été transposés aux études cliniques de phase II et III. Un nouveau modèle cellulaire est actuellement en cours de développement : les cellules iPS-HLCs (iPS-derived hepatocyte-like cells). Ce sont des cellules de type hépatocellulaire (HLC) qui sont différenciées à partir de cellules souches pluripotentes (iPS, « Induced pluripotent stem cell »). Elles sont proches des cellules PHH, mais doivent subir une maturation pour acquérir leurs fonctions hépatiques. Les premiers résultats obtenus sur ce modèle ont montré une expression de gènes identiques aux cellules PHH (comme le taux d'ARN messager, ARNm, du NTCP) et une infection robuste comparable aux cellules PHH [Sakurai *et al.*, 2017]. Comparées aux PHH, les cellules iPS-HLCs peuvent proliférer indéfiniment et posent moins de problèmes éthiques [Sakurai *et al.*, 2017]. Ce modèle cellulaire en cours d'étude est le premier à récapituler toutes les étapes du cycle du VHB et pourra donc être utilisé pour l'étude du rôle de l'ADNccc, de la pathogenèse du VHB et de l'élaboration de nouveaux traitements.

Tableau 2 : Récapitulatif des avantages et des inconvénients des différents modèles cellulaires disponibles pour étudier le virus de l'hépatite B (VHB : virus de l'hépatite B ; PHH : Hépatocyte primaire humain, « Primary Human Hepatocyte » ; PTH : Hépatocyte primaire de *Tupaia*, « Primary *Tupaia* Hepatocyte », PEG : polyéthylène glycol, DMSO : diméthylsulfoxyde).

Modèles cellulaires	Avantages	Inconvénients
PHH	<p>Modèle cellulaire le plus proche physiologiquement des hépatocytes humains (hôte naturel du VHB)</p> <p>Sensibles au VHB</p> <p>Fonctions hépatiques naturelles</p> <p>Etude de la réplication/ transcription du VHB</p> <p>Etude de l'immunité innée induite</p> <p>Etude du métabolisme des médicaments</p>	<p>Disponibilité restreinte (biopsie de foie humain)</p> <p>Variabilité génétique entre donneurs (mauvaise reproductibilité)</p> <p>Difficultés de maintien en culture</p> <p>Efficacité d'infection et de réplication limitées</p> <p>Utilisation PEG/DMSO</p>
PTH	<p>Sensibles au VHB</p> <p>Etude de la réplication/ transcription du VHB</p> <p>Meilleure reproductibilité comparée aux PHH</p> <p>Etude récepteurs d'entrée du VHB</p>	<p>Difficultés d'élevage des <i>Tupaia</i>s</p> <p>Efficacité d'infection et de réplication limitée</p> <p>Cellules non humaines</p>
PHH issues de souris chimériques humanisées	<p>Sensibles au VHB</p> <p>Meilleur accès aux cellules PHH</p> <p>Meilleure reproductibilité comparée aux PHH</p>	<p>Onéreux</p> <p>Complexe</p> <p>Utilisation DMSO/PEG</p>
Huh7/HepG2	<p>Permissives à la réplication et à l'assemblage</p> <p>Production de particules virales</p> <p>Etude des étapes post-entrée</p>	<p>Non sensible au VHB</p> <p>Nécessite une transfection plasmidique</p> <p>Ne supporte pas les étapes d'entrée</p> <p>Différences morphologiques</p>
HepG2.2.15/ HepAd38	<p>Production inoculum VHB</p> <p>Etude des étapes post-entrée</p> <p>Etude du métabolisme des médicaments</p> <p>Etude des interactions virus/hôte à l'intérieur des cellules</p>	<p>Non sensible au VHB</p> <p>Ne supporte pas les étapes d'entrée</p> <p>Pas d'étude de la réponse immunitaire innée</p>
HepaRG	<p>Transcriptome proche des cellules PHH</p> <p>Etude des étapes d'entrée du virus</p> <p>Etude des effets des molécules antivirales</p>	<p>Besoin de différenciation</p> <p>Conditions de culture délicates</p> <p>Pas de propagation de l'infection</p> <p>Efficacité d'infection et de réplication limitées</p> <p>Utilisation DMSO/PEG</p>
HepG2/Huh7 hNTCP	<p>Augmentation du taux d'infection</p> <p>Haute reproductibilité</p> <p>Disponibilité</p> <p>Infection virale efficace et robuste</p>	<p>Cellules transformées</p> <p>Quantité d'inoculum importante</p> <p>Utilisation DMSO/PEG</p> <p>Pas de propagation de l'infection</p> <p>Peu de synthèse d'ADNccc</p>

V. La variabilité génotypique et phénotypique du virus de l'hépatite B

Au cours de l'évolution du VHB, la dérive évolutive neutre du génome viral, les recombinaisons et l'adaptation du virus à long terme aux déterminants génétiques des populations ont favorisé l'apparition de différents génotypes au sein de l'espèce [Günther, 2006]. Une estimation de l'horloge phylogénétique a évalué la divergence des différents génotypes chez l'Homme, il y a environ 6 000 ans [Fares et Holmes, 2002]. De plus, le virus de l'hépatite B est connu pour sa variabilité, importante pour un virus à ADN, responsable de l'apparition de variants phénotypiques. En effet, la réplication du VHB nécessite une étape ARN faisant intervenir une rétrotranscriptase dépourvue de l'activité de relecture qui va favoriser l'apparition de mutations sur le génome du VHB [Locarnini et Yuen, 2010]. La polymérase cellulaire peut également être responsable de l'apparition de mutations spontanées durant la synthèse de l'ARNpg [Günther, 2006]. Le taux d'erreurs estimé pour le virus de l'hépatite B est d'environ 1,4 à 3,2 x 10⁻⁵ substitutions par site et par an, ce qui est 10⁴ fois plus élevé qu'un virus à ADN classique [Kramvis *et al.*, 2005 ; Lazarevic, 2014 ; Lin et Kao, 2015]. Les différents génotypes et sous-génotypes et les quasi-espèces apparues au cours de l'évolution à long terme du VHB vont agir sur le cours naturel de l'infection chronique par le VHB et l'évolution clinique de la maladie [Lin et Kao, 2015].

1. Les sérotypes

Avant la classification en différents génotypes, le VHB était caractérisé par son sérotype (ayw, ayr, adw, adr). Celui-ci était déterminé grâce à la réactivité de l'AgHBs vis-à-vis d'un panel d'antisérum standard (anticorps). La première lettre du sérotype correspond au déterminant « a » qui est commun à tous les sérotypes. Les deux lettres suivantes correspondent aux déterminants antigéniques d/y et r/w qui sont définis par la nature des acides aminés présents aux positions s122 (deuxième lettre) et s160 (troisième lettre). La présence d'une lysine K en position s122 correspond au déterminant d, alors que l'arginine (R) correspond au déterminant y. En position s160, la présence d'une lysine (K) correspond au déterminant w et une arginine (R) correspond au déterminant r. Les acides aminés présents aux positions s127, s177 et s178 permettent d'affiner la séparation des sérotypes en différents sous-types [Kay et Zoulim, 2007 ; Servant-Delmas *et al.*, 2007]. C'est à partir des années 1980 que le génotype a remplacé le sérotype, dès lors que le séquençage du génome complet du VHB a pu être réalisé [Galibert *et al.*, 1979]. Il existe une corrélation entre certains génotypes et sérotypes du VHB (Tableau 3) [Kay et Zoulim, 2007 ; Servant-Delmas *et al.*, 2007]. Cependant, il est possible qu'un même sérotype puisse être retrouvé chez des patients avec des génotypes différents [Lin et Kao., 2015].

Tableau 3 : Récapitulatif des bases moléculaires permettant de déterminer les sérotypes et les sous-types associés au génotype du virus de l'hépatite B [Kay et Zoulim, 2007 ; Servant-Delmas et al., 2007].

Sérotypes	Séquences de l'AgHBs	Génotypes associés
ayw1	122R + 160K + 127P + (134F et/ou 159A)	A/B/C/D
ayw2	122R + 160K + 127P	D/E
ayw3	122R + 160K + 127T	D
ayw4	122R + 160K + 127L	D/E/F
ayr	122R + 160R	C
adw2	122K + 160K + 127P	A/B/C/F/G
adw3	122K + 160K + 127T	B
adw4q-	122K + 160K + 127L + 178Q	F/H
adrq+	122K + 160R + 177V + 178P	C
adrq-	122K + 160R + 177A	C

2. La variabilité génotypique

Il existe actuellement dix génotypes de VHB dans le monde (A à J) ; ils sont définis par une divergence de leurs séquences nucléotidiques de plus de 8 % [Lin et Kao, 2011]. Parmi ces génotypes, les génotypes A, B, C, D et F sont divisés également en sous-génotypes avec une divergence de leurs séquences nucléotidiques comprise entre 4 % et 8 % [Lin et Kao, 2015]. Les autres génotypes ne présentent pas de sous-génotypes, ce qui est probablement dû à leur origine récente [Tong et Revill, 2016].

La taille moyenne du génome du VHB est d'environ 3 215 pb. Certains génotypes présentent des différences au niveau de la taille de leur génome. Le génotype A présente une insertion de six nucléotides en 3' du gène C, le génotype D est délété de 33 nucléotides au début du gène préS1 et le génotype G présente une insertion de 36 nucléotides en 5' du gène C associé à un codon stop dans le gène préC ne permettant pas la synthèse d'AgHBe [Günther, 2006].

De nombreuses différences ont été observées entre les génotypes pour la distribution géographique, le lien avec la progression de la maladie et la pathogenèse associée au VHB, la réponse aux traitements antiviraux [Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Tong et Revill, 2016 ; Hassemer et al., 2017]. Ces différences sont la conséquence des interactions entre le virus et l'hôte.

2.1. Corrélation entre génotypes, distribution géographique et mode de transmission

La distribution génotypique et sous-génotypique varie entre les pays et les régions (Tableau 4, Figure 20).

Tableau 4 : Distribution géographique des génotypes, des sous-génotypes et des sérotypes du virus de l'hépatite B à travers le monde [Kramvis, 2014 ; Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Tong et Reville 2016].

Génotypes	Sérotypes majoritaires	Sous – génotypes	Localisations géographiques principales	Autres exemples de pays touchés
A	Adw/Ayw	A1	Afrique sub-saharienne et Inde	Brésil, Philippines, République Centre Afrique
		A2	Europe, Amérique du Nord, Japon et Inde	Brésil, Maroc
		A3	Afrique de l'Ouest	
		A4 – A7	Afrique	Gambie, Nigeria, Haiti, Congo, Rwanda, Cameroun
B	Adw, ayw	B1	Japon	
		B2-B5	Asie de l'Est, Taiwan, Chine, Indonésie, Vietnam, Philippines	
		B6	Alaska, Nord du Canada, Groenland	
C	Adw, ayr, adr	C1-C3	Taiwan, Chine, Corée, et Asie du Sud et de l'Est	Japon, Thaïlande
		C4	Australie	
		C5	Philippines et Vietnam	
		C6-C16	Indonésie	Vietnam
D	Ayw	D1	Moyen-Orient	Indonésie
		D2	Europe/Afrique	
		D3	Monde	
		D5	Inde	
		D6/D7	Afrique	
E	Ayw		Afrique centrale et de l'Ouest	République Centre Afrique, Arabie Saoudite
F	Adw	F1-F4	Amérique centrale et Amérique du Sud	Tunisie, Espagne
G	Adw		France, Allemagne, Etats-Unis	
H	Adw		Amérique centrale	Mexico Nicaragua
I	Adw/Ayw		Vietnam, Laos, Inde, Sud de la Chine	
J	Ayw		Japon	Origine Bornéo

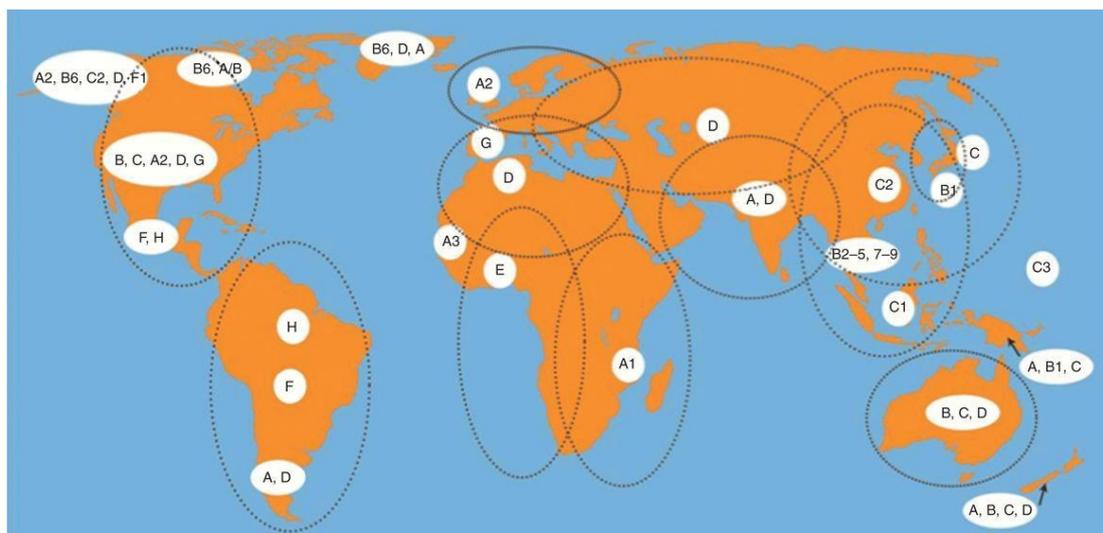


Figure 20 : Cartographie de la distribution géographique des différents génotypes du virus de l'hépatite B dans le monde [LittleJohn et al., 2016].

Les génotypes B et C sont communément retrouvés dans les zones de fortes endémicités où la transmission virale prédominante se fait via une exposition périnatale ou verticale [Kramvis, 2014 ; Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015, Tong et Revill, 2016]. La transmission du génotype I est généralement verticale [Kramvis, 2014]. Les autres génotypes sont transmis le plus souvent par exposition horizontale (transmission sexuelle, par le sang ou contact entre jeunes enfants) [Kramvis, 2014 ; Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015]. Le génotype A est un génotype ubiquitaire retrouvé dans presque tous les continents [Zehender *et al.*, 2015] et semble être acquis essentiellement durant l'âge adulte tandis que le génotype D plutôt à l'adolescence [Tong et Revill, 2016].

Plusieurs génotypes sont co-localisés dans certaines régions du monde. Ceci peut conduire à la co-infection par plusieurs génotypes de VHB chez un même hôte [Günther, 2006 ; Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Tong et Revill, 2016]. Un changement de génotype est parfois observé au cours de l'histoire naturelle, chez un même patient. Il peut être dû à une surinfection par un autre génotype ou à la coexistence, initialement de deux génotypes dont un était minoritaire et non détecté [Wang *et al.*, 2015]. L'émergence de génotype minoritaire est généralement observée sous pression thérapeutique [Jardi *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2015]. De plus, la co-infection simultanée de différents génotypes peut conduire à la recombinaison de ces génotypes entre eux. Il y a peu de chance que la recombinaison apparaisse durant la rétrotranscription de l'ARNpg car le processus de rétrotranscription est localisé dans la nucléocapside impliquant seulement une molécule d'ARNpg. Ainsi, la recombinaison est probablement le résultat d'une recombinaison homologe entre différentes molécules d'ADNccc durant le cycle de réplication [Araujo, 2015]. Les recombinaisons entre génotypes sont observées pour la plupart des génotypes (excepté le génotype H) et plus particulièrement entre les génotypes A et D, A et G, A et E, D et E, B et C, A et C, B et C, G et C, mais également la recombinaison entre les génotypes C et D qui a été observée au Tibet [Cui *et al.*, 2002 ;

Günther, 2006 ; Lin et Kao, 2015 ; Tong et Revill, 2016]. La co-localisation des génotypes A, C4 et G au Vietnam et au Laos a conduit à la recombinaison de ces génotypes pour former le génotype I [Lin et Kao, 2015 ; Tong et Revill, 2016]. Les sous-génotypes B2 à B5 sont nés de la recombinaison entre le génotype B et la région préC/C de génotype C [Lin et Kao, 2015 ; Tong et Revill, 2016]. Les zones de recombinaison sur le génome du virus se situent généralement dans les régions du promoteur basal du core (BCP) ou dans le gène précore. Certaines recombinaisons ont également pu être observées dans le gène S et dans la région core [Simmonds et Midgley, 2005 ; Shi *et al.*, 2013 ; Kramvis, 2014 ; Tong et Revill, 2016].

Actuellement, la distribution géographique des différents génotypes varie et évolue à cause de la migration des populations et des différents comportements à risques [Günther, 2006 ; Tong et Revill, 2016]. Par exemple, les génotypes B et C sont apparus en Amérique par la migration des populations asiatiques [Günther, 2006]. Au Japon, une augmentation du nombre de personnes infectées par le génotype A a été observée entre 2000 et 2006 (1,7 % à 3,5 %). Ce génotype semble avoir été introduit par les flux migratoires dans le pays et favorisé par les comportements à risques (usagers de drogues injectables, MSM (« Man who have sex with men »), tourisme sexuel) [Matsuura *et al.*, 2009]. Le sous-génotype A2 s'est récemment répandu au Japon où généralement les génotypes B et C sont prédominants. La propagation du sous-génotype A2 semble être récente et principalement due aux transmissions sexuelles dans les groupes présentant des comportements à risques comme les MSM [Zehender *et al.*, 2015].

2.2. Les génotypes et la pathogenèse du virus de l'hépatite B

L'évolution clinique de la maladie provoquée par le VHB est complexe. Elle est régie par différents facteurs tels que le mode de transmission, les facteurs génétiques de l'hôte, les mutations adaptatives et les facteurs environnementaux, mais également le génotype viral [Tong et Revill, 2016]. Des études ont été réalisées pour étudier l'influence des génotypes sur le développement et l'évolution de la maladie, généralement sur les génotypes co-localisés dans une même région éliminant ainsi les différences ethniques [Günther, 2006].

Les paramètres biologiques sont également influencés par le génotype viral. Ainsi, le génotype peut influencer la charge virale dans le sérum des patients. En effet, le génotype C présente une plus haute capacité de répllication que les autres génotypes favorisant des dommages hépatiques sévères [Lin et Kao, 2011 ; Sunbul, 2014]. La quantité d'ADN intracellulaire et extracellulaire est plus importante lors d'infections par des virus de génotype B et C que par des virus de génotype A ou D. Par ailleurs, le taux de transaminases est plus élevé lors d'une infection par le VHB de génotype C et D [Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015].

Des différences en termes de statut AgHBe, sécrétion de l'AgHBe et séroconversion de l'AgHBe ont pu être observées entre les génotypes A, B, C et D. Le taux de séroconversion spontanée de l'AgHBe est moins important lors d'une infection par le VHB de génotype C comparé au génotype B et lors d'une infection par le VHB de génotype D comparé au génotype A. Par ailleurs, la séroclairance de l'AgHBe paraît retardée dans le temps pour le génotype C [Sundul, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Tong et Revall, 2016]. La quantité d'AgHBe sécrétée est plus faible pour le génotype B que le génotype C [Lin et Kao, 2015].

La séroclairance de l'AgHBs est plus fréquente pour les génotypes A et B que C et D [Lin et Kao, 2015]. Une étude récente réalisée par Hassemer *et al.* (2017), a permis de caractériser les différences au niveau de l'AgHBs entre les génotypes A, B, C, D et G. Les conclusions de cette étude ont montré que la quantité d'AgHBs intracellulaire et libérée dans le surnageant variait selon le génotype. *In vitro*, le VHB de génotype C libère plus d'AgHBs dans le surnageant que le VHB de génotype B et D ; ces deux derniers génotypes libérant également plus d'AgHBs que le génotype A. En parallèle, la quantité intracellulaire d'AgHBs est identique pour les génotypes A et D et légèrement plus importante que pour les génotypes B et C [Hassemer *et al.*, 2017]. Une seconde étude s'est focalisée sur la libération et la rétention des petites protéines SHBs de génotype A et D [Zhang *et al.*, 2017a]. Une différence de production de ces protéines a été observée entre ces deux génotypes montrant une moins bonne production d'AgHBs pour le génotype D. Ce phénomène peut être attribué à une diminution de la transcription du promoteur SPII due à l'activité inhibitrice potentielle des protéines LHBs (feedback négatif) [Zhang *et al.*, 2017a]. Par ailleurs, la protéine SHBs est la protéine la plus libérée dans le milieu extracellulaire, tandis que les protéines MHBs et LHBs sont la fraction protéique la plus représentée dans le milieu intracellulaire des hépatocytes quel que soit le génotype A, B, C ou D [Hassemer *et al.*, 2017].

L'impact de ces différences liées au génotype sur les outils de diagnostics a également été évalué. Les trousse qui ont été testées sont les suivantes : « Architect HBsAg » d'Abbott Ireland, « Elecsys HBsAg II quant de Roche Diagnostics », « Enzygnost HBsAg 6.0 » et « Immulite Hepatitis B Surface Antigen » de Siemens Healthcare, « Lumipulse G HBsAg quant » de Fujirebio et Surase B-96 de General Biological. Les différents génotypes ont été détectés selon la même sensibilité avec ces différents tests [Hassemer *et al.*, 2017].

Par ailleurs, l'évolution vers la chronicité est favorisée par certains génotypes. Le génotype A semble présenter un plus grand risque de progression vers la chronicité suite à une hépatite aigüe acquise à l'âge adulte et la résolution de l'hépatite B aigüe est souvent prolongée chez les patients infectés par le génotype A [Croagh *et al.*, 2015]. Par exemple, en Chine, le passage à la chronicité est majoritairement observé lors d'une infection par le génotype A suivi par les génotypes B et C [Sunbul, 2014]. Au Japon, le passage à la chronicité est observé plus souvent chez les patients infectés par le

génotype A (23,4 %, A2 généralement) que pour les génotypes B et C (8,6 %) probablement en raison de la transmission sexuelle essentiellement en cause pour ce génotype [Ito *et al.*, 2014 ; Tong et Revill, 2016]. En Europe, les génotypes D sont plus fréquents chez les patients avec une infection aiguë que les génotypes A (80 % vs 10 %) et les génotypes A prédominent chez les patients porteurs d'une infection chronique (80 % pour génotype A vs 11 % pour génotype D [Mayerat *et al.*, 1999]. Cependant, des variabilités géographiques semblent exister. Une étude italienne a montré que les patients infectés de façon chronique en Sicile étaient essentiellement infectés par des souches de génotype D (92 % de génotypes D), moins souvent par le VHB de génotype A (9 % de génotypes A) et que le génotype A était prédominant chez les patients présentant une infection aiguë [Urone *et al.*, 2015]. L'âge lors de l'infection, la quantité d'inoculum viral, le taux de réplication virale, le mode de transmission du virus, la distribution variable des génotypes et les interactions existantes entre l'hôte et le virus sont également des facteurs prédisposants au passage à la chronicité [Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015, Urone *et al.*, 2015].

L'évolution vers la fibrose, la cirrhose et le développement de carcinomes hépatocellulaires (CHC) peut également être influencée par les génotypes. Les génotypes C et D présentent une évolution plus défavorable de la maladie que les génotypes A et B [Sunbul 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Urone *et al.*, 2015 ; Tong et Revill, 2016]. Le virus de génotype C présente une phase de clairance immunitaire plus longue favorisant la réplication virale, l'activité inflammatoire histologique du foie, une faible réponse aux traitements et la progression de la maladie plus sévère [Sunbul, 2014]. Il existerait également un lien entre les sous-génotypes et le développement de la maladie hépatique [Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015]. Par exemple, le sous-génotype D1 semble être corrélé à l'évolution vers la chronicité et le sous-génotype D3 aux hépatites occultes. Le sous-génotype C2 semble être le principal responsable du développement des CHC [Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015]. De plus, le génotype A2 est acquis préférentiellement à l'âge adulte et il est généralement associé à un risque plus élevé de développer une infection chronique, contrairement au génotype A1 qui serait acquis durant l'enfance et associé à une progression rapide de maladie hépatique, avec 4,5 fois plus de développement de CHC que les autres génotypes chez de jeunes hommes africains sans cirrhose sous-jacente [Tong et Revill, 2016].

Les connaissances sur l'influence des autres génotypes sur l'histoire naturelle du VHB sont limitées. En Argentine, les patients infectés par le génotype F présenteraient une activité inflammatoire histologique plus élevée [Pezzano *et al.*, 2011]. Au Mexique, le génotype H serait lié à une fréquence d'hépatite B occulte plus importante que les autres génotypes [Roman *et al.*, 2010].

2.3. Les différents génotypes et la réponse aux traitements

Le génotype viral peut également influencer la réponse aux traitements par Interféron alpha pégylé (IFN α -pégylé). Une meilleure réponse à l'interféron (IFN) est généralement observée pour les génotypes A et B comparé aux génotypes C, D et I [Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015]. Le génotype D est l'un des génotypes les plus difficiles à traiter avec l'interféron avec une longue période de traitement nécessaire [Sunbul, 2014]. Lors des traitements avec interféron, la diminution de l'AgHBs est plus importante pour les génotypes A, modérée pour les génotypes B et D et plus faible pour les génotypes C et E [Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015]. La perte durable de l'AgHBs à trois ans est plus importante pour les génotypes A et B [Lin et Kao, 2015]. La clairance de l'AgHBe est plus importante pour les génotypes A et B que C et D après trois ans de traitement [Sunbul, 2014]. En ce qui concerne la réponse aux analogues nucleos(t)idiques (NUCs), il n'existe pas de différence significative entre les génotypes A, B, C et D [Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015].

La détermination du génotype est utile pour estimer la progression et l'intensité de la maladie et planifier un traitement adéquat et optimal pour le patient [Sunbul, 2014]. Les différentes données sur la corrélation entre la variabilité génotypique et l'évolution clinique et virologique, ainsi que la réponse aux traitements sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Comparaison des différents géotypes du virus de l'hépatite B en fonction des caractéristiques cliniques, virologiques et la réponse aux traitements antiviraux (ND : pas de données disponibles) [Sundul, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Hassemer et al., 2017].

Caractéristiques cliniques/virologiques	Géotypes				
	A	B	C	D	E-J
Mode de transmission	Horizontal	Périnatale/ verticale	Périnatale/ verticale	Horizontale	Horizontale
Quantité ADN VHB dans le sérum	ND	Faible	Elevée	ND	ND
Expression ADN VHB intracellulaire	Faible	Faible	Elevée	Elevée	ND
AgHBe positif	Elevé	Faible	Elevée	Faible	ND
Séroconversion AgHBe	Précoce	Précoce	Tardive	Tardive	ND
Sécrétion AgHBe	ND	Faible	Elevée	ND	ND
Séroclairance AgHBs	Elevée	Elevée	Faible	Faible	ND
Quantité d'AgHBs libéré	Faible	Modérée	Elevée	Modérée	Inexistante
Quantité d'AgHBs intracellulaire	Quantité d'AgHBs intracellulaire légèrement plus importante pour les géotypes A et D				Faible
Fraction protéique dominante libérée	SHBs				ND
Fraction protéique dominante intracellulaire	MHBs/LHBs				ND
Distribution intracellulaire de l'AgHBs	Distribution identique des protéines intracellulaires quel que soit le géotype				Distribution différente pour le géotype G
Détection AgHBs en diagnostic	Même potentiel de détection par différents kits de diagnostics				
Tendance à la chronicité	Elevée	Faible	Elevée	Faible	ND
Activité inflammatoire histologique	Faible	Faible	Elevée	Elevée	ND
Complications (cirrhose, carcinomes hépatocellulaires...)	Favorable	Favorable	Défavorable	Défavorable	Défavorable pour géotype F
Réponse à l'IFN α	Elevée	Elevée	Faible	Faible	Faible pour géotype G
Réponse aux traitements par analogues nucleos(t)idiques	Pas de différence significative entre les différents géotypes				ND

3. Variabilité phénotypique du VHB

Les processus biochimiques des cellules de l'hôte et les erreurs commises par la machinerie répliquative du virus vont favoriser l'apparition de mutations dites « spontanées » [Günther, 2006]. Au sein de l'hôte, le virus de l'hépatite B est soumis à diverses pressions de sélection : les pressions immunitaires de l'hôte, les pressions vaccinales, mais également les pressions thérapeutiques (Figure 21).

Les différentes pressions exercées sur le virus favorisent l'émergence de mutants, indépendamment de leur robustesse, mais qui vont être avantagés par un processus de sélection [Günther, 2006]. En effet, un virus, dont les capacités répliquatives sont mieux adaptées aux pressions auxquelles il est soumis, va être sélectionné. Ce phénomène fait référence à la capacité de réplication (ou fitness) du virus qui correspond à sa capacité à produire de nouveaux virus infectieux dans un environnement donné où il est soumis à différentes pressions [Wargo et Kurath, 2012]. Durant certaines phases de l'infection chronique par le VHB, la population virale majoritaire peut être remplacée complètement par une population de variants spécifiques seulement en quelques semaines voire en quelques mois [Günther, 2006]. Cependant, si certaines mutations confèrent au virus une meilleure adaptation à l'environnement dans lequel il se réplique, elles peuvent également avoir un impact sur le pouvoir infectieux du virus. En effet, de par son organisation en quatre cadres de lecture chevauchants, si une mutation apparaît, par exemple, sur la petite protéine d'enveloppe du VHB, elle peut également se répercuter sur la polymérase du VHB et limiter la réplication du virus. De la même façon pour les autres cadres de lecture, l'assemblage, la stabilité et le pouvoir infectieux du virus peuvent également être affectés [Kay et Zoulim, 2007].

Ainsi, la variabilité phénotypique va être à l'origine de l'émergence de quasi-espèces virales au sein d'un même patient (Figure 21). Les quasi-espèces ont été préalablement décrites par Domingo *et al.* (1978) comme des populations hétérogènes capables de s'adapter rapidement à un changement d'environnement, non seulement en raison d'un taux de mutation important, mais aussi grâce à la présence d'une large population de variants. Actuellement, la quasi-espèce se définit comme une population de virus étroitement liés, mais composée de variants génétiquement distincts, qui cohabitent chez un même patient à un instant donné et qui sont capables de survivre dans un environnement mutagène [Zhou *et al.*, 2017]. Les quasi-espèces virales vont être responsables de l'échappement du virus aux traitements, à l'immunité de l'hôte, à la vaccination et par conséquent aux tests diagnostiques. Elles peuvent être transmises verticalement (mère-enfant) ou horizontalement (relation sexuelle, contacts rapprochés) [Kay et Zoulim, 2007]. Toutes les protéines du VHB sont soumises à cette variabilité. Une variabilité importante est généralement observée dans les épitopes des lymphocytes B et T, région essentielle pour la reconnaissance par le

système immunitaire de l'hôte [Lin et Kao, 2015]. Cette variabilité contribue généralement à la sévérité de la maladie hépatique [Urone *et al.*, 2015].

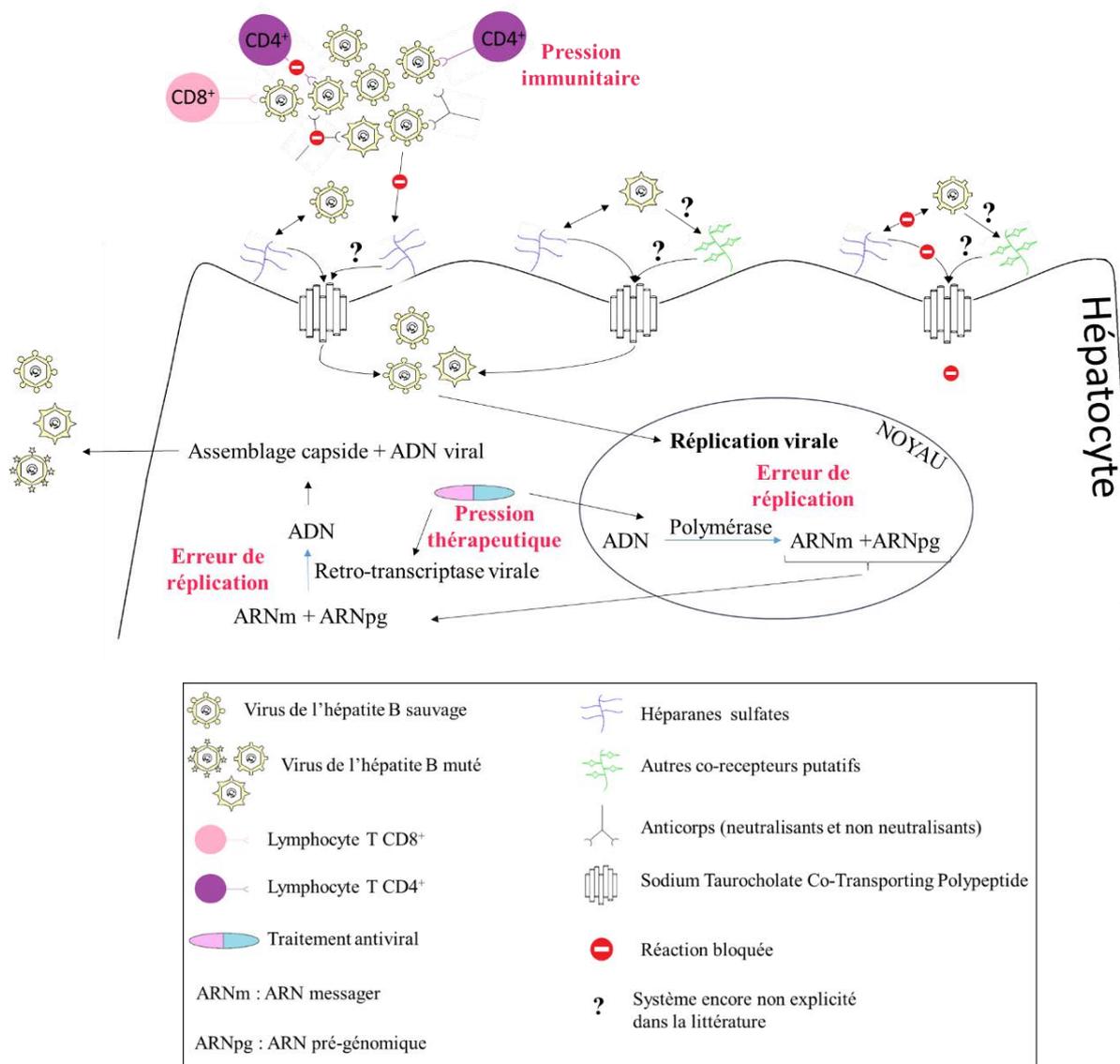


Figure 21 : Schématisation des différentes pressions exercées sur le virus de l'hépatite B au sein de l'hôte favorisant l'apparition de quasi-espèces virales [Chisari *et al.*, 2010 ; Xiao *et al.*, 2013 ; Morikawa *et al.*, 2016 ; Velay *et al.*, 2016 ; réalisé par Manon Chassaing étudiante en master 2].

3.1. Les mutants du promoteur basal du core (BCP) et préC/C

La région préC/C joue un rôle important dans la régulation de l'expression de certains gènes, dans la réplique virale, dans la production de la protéine X et dans la production d'AgHBe et AgHBc [Urone *et al.*, 2015]. Les mutations et les délétions dans la région préC/C, ainsi que dans le promoteur basal du core (BCP) chevauchant le gène X, sont prédictives de la progression de la maladie hépatique et de la réponse aux traitements [Lin et Kao, 2015]. Les mutations dans la région préC/C et BCP sont généralement présentées en acides nucléiques.

Les mutations A1762T et G1764A retrouvées dans le BCP sont largement décrites dans la littérature. Elles sont généralement associées à la progression de la maladie hépatique (développement de fibrose, cirrhose), favorisent la prolongation de l'infection chronique et sont un facteur de risque de développement de carcinome hépatocellulaire (CHC) [Buti *et al.*, 2005 ; Juniastuti *et al.*, 2013 ; Lazarevic, 2014 ; Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Urone *et al.*, 2015 ; Ducancelle *et al.*, 2016 ; Wei *et al.*, 2017]. Ces mutations sont également associées à une diminution de la synthèse de l'ARNm précore (préC) qui réduit l'expression de l'AgHBe, favorise la rétention de l'AgHBe dans le cytoplasme et par conséquent, la nécro-inflammation des hépatocytes [Lazarevic, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Urone *et al.*, 2015 ; Tong et Revill, 2016 ; Castelain *et al.*, 2017]. Les mutations T1753C, C1766T, T1768A vont compenser les effets délétères des mutations A1762T et G1764A sur la réplication virale [Lazarevic, 2014 ; Castelain *et al.*, 2017].

La mutation G1896A dans le gène précore a été décrite dans la littérature. Cette mutation donne lieu à un codon stop en position 28 de la protéine précore, inhibe la synthèse des protéines générées par les gènes préC/C et abolit la production d'AgHBe [Buti *et al.*, 2005 ; Lazarevic, 2014 ; Yano *et al.*, 2015]. Cette mutation va influencer la conformation de la structure tige boucle ϵ (entrave l'appariement des bases à la base du renflement de la structure ϵ) requise pour l'encapsidation de l'ARNpg [Buti *et al.*, 2005 ; Castelain *et al.*, 2017]. Cette mutation est généralement associée à la mutation C1858T qui se retrouve dans la position opposée, sur la structure tige boucle [Buti *et al.*, 2005]. Ces mutations seraient associées au développement de maladies sévères [Yano *et al.*, 2015 ; Wei *et al.*, 2017]. Cependant, son rôle est controversé. L'étude de Kitab *et al.* (2012) a montré une forte prévalence de cette mutation chez des patients en phase inactive, sans développement de maladie hépatique avancée. Le rôle de cette mutation dans le développement de la maladie pourrait être dépendant de l'ethnie. En effet, une augmentation du risque de développement d'hépatites sévères a été observée chez les populations asiatiques, mais pas chez les caucasiens et les africains [Liao *et al.*, 2012].

La mutation G1899A a également été associée aux mutations A1762T et G1764A chez des patients présentant un CHC [Kitab *et al.*, 2012]. Cependant, une étude récente de Ducancelle *et al.* (2016) a montré que cette mutation pourrait contrecarrer les effets délétères des mutations en position 1762 et 1764 et agir plutôt comme un facteur protecteur contre le développement de fibrose sévère. [Ducancelle *et al.*, 2016].

Des mutations dans le enhancer II (C1653T), dans le promoteur basal du core chevauchant la protéine X et dans les protéines core (T1753V, A1762T et/ou G1764A, G1896A) ont également été associées à un risque plus élevé d'évolution vers le CHC [Lin et Kao, 2011 ; Sunbul, 2014 ; Kim *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2016 ; Lin et Kao, 2017 ; Wei *et al.*, 2017]. Par exemple, chez les patients infectés par le VHB de génotype C, les mutations dans préS, la mutation C1653T dans l'enhancer II et les

mutations T1753V et A1762T/G1764A dans la région BCP favorisent le développement de CHC chez 80 % des individus [Li *et al.*, 2016]. Par ailleurs, les mutations A1383C, G1386A/C et C1485T ont également été associées au développement de CHC [Kim *et al.*, 2016].

La mutation en acides aminés S183P dans la protéine core est généralement observée chez les porteurs inactifs progressant vers la cirrhose ou le CHC [Sunbul, 2014]. Une étude élaborée par Xu *et al.* (2015) a mis en évidence une nouvelle mutation : la mutation A2159G/C sur la protéine core associée au développement d'hépatite fulminante [Xu *et al.*, 2015].

3.2. Les mutants de la protéine X

La protéine X joue un rôle important dans la carcinogenèse. Plusieurs mutations et délétions dans le gène X ont fréquemment été décrites chez des patients présentant un CHC [Iavarone *et al.*, 2003 ; Lin et Kao 2011 ; Lazarevic, 2014]. En plus des mutations déjà décrites dans le précédent paragraphe, les mutations A1383C, G1386A/C, C1485T ont été associées à la sévérité clinique de l'infection tout comme les délétions et insertions au niveau de la région carboxy-terminale (Cter) de la protéine X [Kim *et al.*, 2016]. En effet, des délétions en Cter du gène X sont souvent retrouvées dans les cellules tumorales de foie [Lin et Kao, 2011 ; Jung *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2016]. Ces protéines délétées en Cter sont retrouvées dans environ 80 % des tissus de CHC [Lin et Kao, 2017]. Les protéines X tronquées en Cter perdent leur activité antiproliférative, mais coopèrent avec les gènes oncogènes ras et myc qui favorisent la transformation des cellules et le développement de tumeurs [Iavarone *et al.*, 2003 ; Yano *et al.*, 2015 ; Lin et Kao, 2017]. Ces protéines délétées en 3' peuvent également être responsables du développement d'un stress oxydatif qui induit des dommages à l'ADN mitochondrial. Les fragments délétés contiennent des zones importantes pour la réplication du virus ce qui favorise l'intégration du génome viral dans celui de l'hôte et la persistance dans le foie [Iavarone *et al.*, 2003 ; Jung et Kim, 2013 ; Toh *et al.*, 2013 ; Lazarevic, 2014].

3.3. Les mutants de la polymérase

La plupart des mutations observées sur le gène de la polymérase virale sont responsables de résistances aux traitements par analogues nucléos(t)idiques (NUCs). Les principales mutations impliquées dans l'échappement aux traitements NUCs qui ont été décrites dans la littérature ont été répertoriées dans le Tableau 6. Parmi ces mutations, certaines ont déjà été caractérisées comme des mutations de résistance primaires qui sont responsables directement de la résistance aux traitements et d'autres comme des mutations de résistance secondaires ou compensatoires qui favorisent ou améliorent les compétences de répliquations des souches résistantes [Lazarevic, 2014].

Tableau 6 : Mutations de résistance associées aux traitements par analogues nucléos(t)idiques décrites sur le gène de la polymérase du virus de l'hépatite B [Lazarevic, 2014 ; Yano et al., 2015].

Mutations	Résistances aux différents analogues nucléos(t)idiques	Types de mutations
rtL80V/I	Résistance Lamivudine et Telbivudine	Mutation compensatoire
rtI169T	Résistance Lamivudine et Telbivudine	Mutation compensatoire
rtV173L	Résistance Lamivudine et Telbivudine	Mutation compensatoire
rtP177G	Résistance Ténofovir disoproxil fumarate	Mutation primaire
rtL180M	Résistance Lamivudine, Telbivudine et Entécavir	Mutation compensatoire
rtA181T	Résistance Lamivudine, Telbivudine et Adéfovir dipivoxil	Mutation primaire
rtA181V	Résistance Lamivudine, Telbivudine et Adéfovir dipivoxil	Mutation primaire
rtT184S/G	Résistance Lamivudine, Telbivudine et Entécavir	Mutation compensatoire
rtA194T	Résistance partielle au Ténofovir disoproxil fumarate	Mutation primaire
rtS202I	Résistance Lamivudine, Telbivudine et Entécavir	Mutation compensatoire
rtS202G	Résistance Entécavir	Mutation compensatoire
rtM204V	Résistance Lamivudine, Telbivudine et Entécavir	Mutation primaire
rtM204I	Résistance Lamivudine et Telbivudine	Mutation primaire
rtQ215S	Résistance Lamivudine et Telbivudine	Mutation compensatoire
rtI233V	Résistance Adéfovir dipivoxil	Mutation primaire
rtN236T	Résistance Adéfovir dipivoxil	Mutation primaire
rtF249A	Résistance Ténofovir disoproxil fumarate	Mutation primaire
rtM250V	Résistance Entécavir	Mutation compensatoire

Chez des patients infectés par le VHB de génotype C sous traitement NUCs, la mutation rtH55R a également été observée, associée à la mutation rtM204I/V. Il semblerait que cette mutation a un rôle compensatoire sur la mutation rtM204I sous Lamivudine (LAM) et améliorerait la capacité de réplication du virus [Xiang *et al.*, 2017].

Par ailleurs, la petite protéine de surface S du VHB chevauche le gène de la polymérase et certaines mutations se répercutent sur les deux cadres de lectures. Par exemple, la mutation rtA181T code un codon stop au niveau du codon 172 de la petite protéine de surface du VHB. Les mutations

rtV173L, rtL180M et rtM204V provoquent également deux changements en acides aminés dans la protéine S : sE164D et sI195M [Torresi *et al.*, 2002]. Ces mutations confèrent une résistance aux traitements, mais elles contribuent également à l'enrichissement de mutations d'échappement à l'immunité de l'hôte [Tang *et al.*, 2011 ; Lazarevic, 2014 ; Shan *et al.*, 2017]. L'impact de ces mutations présentes sur la protéine S sera décrit dans le paragraphe suivant 'les mutants prés/S'.

3.4. Les mutants prés/S

Les protéines d'enveloppe du VHB sont présentes à la surface du VHB et sont donc directement exposées à la pression immunitaire de l'hôte [Urone *et al.*, 2015]. De nombreuses mutations sont répertoriées au niveau de ces protéines et plus particulièrement au sein de la région hydrophile majeure (MHR) de la petite protéine de surface S comprenant le déterminant « a » reconnu par les anticorps neutralisants. Les mutations observées dans le déterminant « a » modifient les épitopes, altérant ainsi la reconnaissance du virus par le système immunitaire de l'hôte [Lazarevic, 2014 ; Yano *et al.*, 2015].

Ces mutations spécifiques autour et dans le déterminant « a » peuvent être responsables de modifications des propriétés antigéniques de l'AgHBs qui vont permettre au virus d'échapper aux traitements prophylactiques faisant intervenir des immunoglobulines anti-VHB (HBIG), à la vaccination, mais également au diagnostic où la détection des AgHBs par les kits commerciaux qui est réalisée à l'aide d'anticorps reconnaissant ces épitopes [Araujo *et al.*, 2009 ; Lazarevic, 2014 ; Coppola *et al.*, 2015].

Ainsi, 2 à 3 % des enfants nés d'une mère infectée chroniquement par le VHB échappent à la vaccination prophylactique par les HBIG en raison de la transmission de souches présentant des mutations essentiellement observées sur le déterminant « a » [Velu *et al.*, 2008]. Par exemple, les mutations sT125M, sI126T, sP127T, sT131N, sF134Y, sS143T ont été observées chez ces enfants [Velu *et al.*, 2008].

De nombreuses mutations ont également été répertoriées comme permettant au virus d'échapper à la réponse immunitaire. La mutation la plus connue est la mutation sG145R présente dans une boucle en saillie au niveau du déterminant « a » [Coleman, 2006]. Cette mutation est stable dans le temps et peut se transmettre horizontalement [Weber, 2005 ; Lazarevic, 2014 ; Coppola *et al.*, 2015]. Elle confère un avantage sélectif pour la réplication du virus sous la pression immunitaire de l'hôte [Chen *et al.*, 1996 ; Coleman, 2006 ; Xue *et al.*, 2017]. Cette mutation est, en effet, responsable d'une diminution de la production d'anticorps et d'une mauvaise reconnaissance par les anticorps anti-VHB, favorisant ainsi l'échappement du virus au système immunitaire de l'hôte [Chen *et al.*, 1996 ; Coleman, 2006 ; Wu *et al.*, 2012 ; Xue *et al.*, 2017]. Elle est également responsable d'une diminution de la sécrétion des AgHBs et favorise le développement de maladies hépatiques [Xue *et*

al., 2017]. De plus, cette mutation se répercute sur l'ORF de la polymérase via la mutation rtW153Q. La polymérase reste compétente pour la réplication, mais sa capacité de réplication est altérée [Chen *et al.*, 1996 ; Torresi *et al.*, 2002 ; Coleman, 2006].

Une autre mutation a été largement décrite dans la littérature : la mutation sE164D. Elle est généralement associée à la mutation sI195M. Ces deux mutations sont responsables d'une diminution de la capacité de fixation des anticorps contre l'AgHBs (anti-HBs) *in vitro* [Torresi *et al.*, 2002]. De plus, comme nous avons pu le voir précédemment, ces mutations sont associées aux mutations de résistance à la Lamivudine ou à l'Entécavir (rtL180M and rtM204V +/- rtV173L) [Torresi *et al.*, 2002].

Il existe beaucoup d'autres mutations influençant la reconnaissance du virus par le système immunitaire et favorisant l'échappement du virus. Certaines de ces mutations sont répertoriées dans la Figure 22 montrant un panel de mutations (liste non exhaustive) décrites dans la littérature comme permettant au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte, en particulier à la reconnaissance par les anticorps.

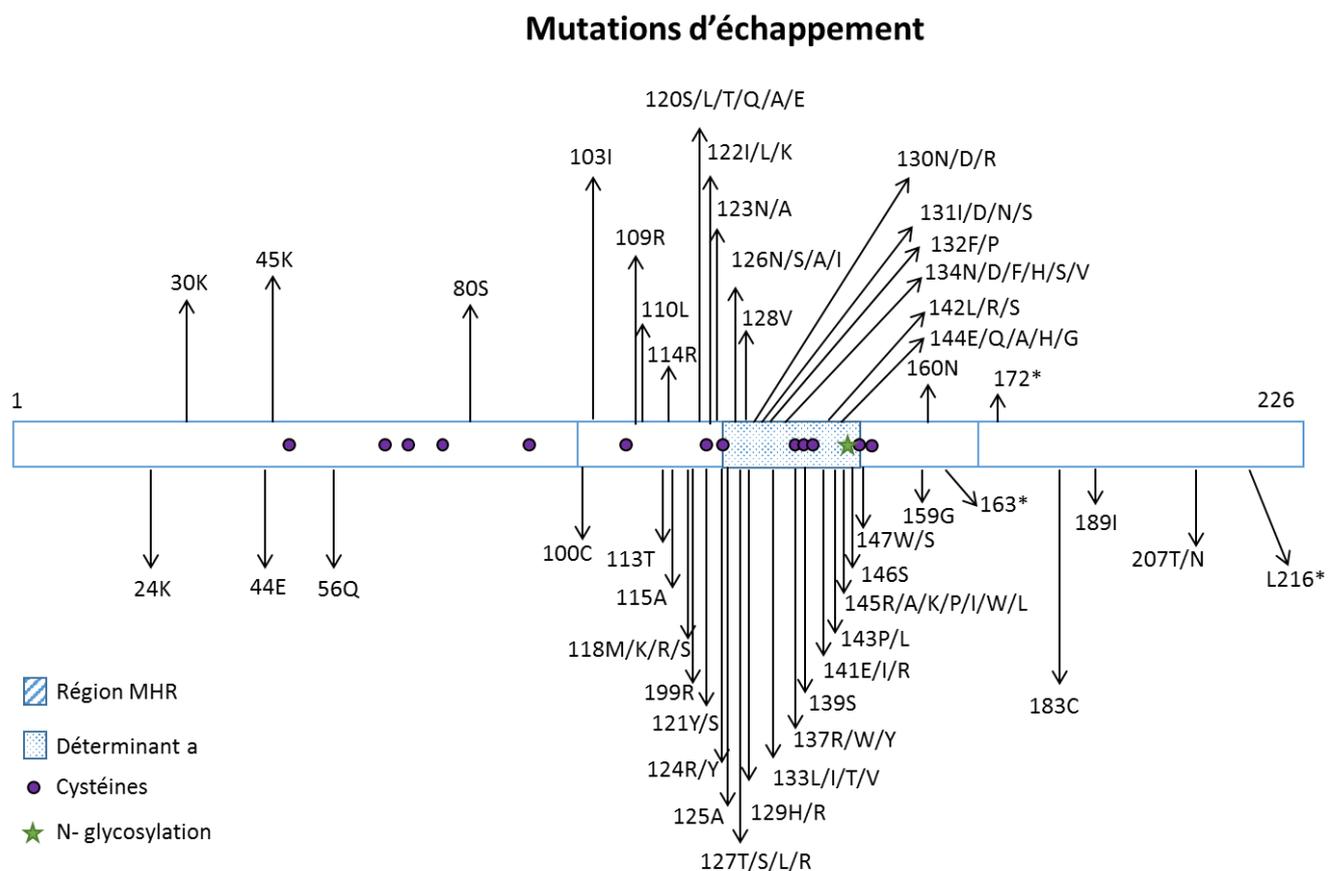


Figure 22 : Représentation non exhaustive des mutations de la protéine SHBs permettant au virus de l'hépatite B d'échapper au système immunitaire de l'hôte (* = Stop) [Mathet *et al.*, 2003 ; Coleman, 2006 ; Kay et Zoulim., 2007 ; Locarnini et Yuen., 2010 ; Wu *et al.*, 2010 ; Hsu et Yeh. 2011 ; Huang *et al.*, 2012a ; Ijaz *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2012 ; Biswas *et al.*, 2013 ; Ramezani *et al.*, 2013 ; Simon *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013a ; Baclig *et al.*, 2014 ; Lazarevic, 2014 ; Pourkarim *et al.*, 2014 ; Tuteja *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2014 ; Coppola *et al.*, 2015 ; Urone *et al.*, 2015 ; Su *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2016a ; <http://hbv.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>].

Certaines mutations dans le déterminant « a » favorisent également l'apparition de nouveaux sites de N-glycosylations ; ces sites de N-glycosylations se situent au sein d'un motif asparagine(N)-X-Serine(S)/Thréonine(T) où X correspond à un acide aminé quelconque sauf la proline. Ces N-glycosylations supplémentaires sont impliquées dans l'échappement immunitaire [Yu *et al.*, 2014].

En plus des épitopes des lymphocytes B présents sur la protéine S, il existe des épitopes des lymphocytes T helper (CD4⁺) ou T cytotoxiques (CD8⁺) sur le gène S, mais également dans la région préS. L'apparition de mutations dans ces épitopes va favoriser l'échappement du virus à l'immunité de l'hôte [Desmond *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2013 ; Ramezani *et al.*, 2013]. Par exemple, des mutations dans le déterminant « a » (aa s126, s129, s130) et dans les épitopes des lymphocytes T cytotoxiques (aa s87–95) ont été observées chez des patients présentant un profil sérologique atypique où les anticorps anti-HBs et les AgHBs coexistent dans le sérum [Chen *et al.*, 2011 ; Ding *et al.*, 2014].

Ce phénomène, observé chez 2,43 à 8,9 % des patients infectés par le VHB, est généralement associé à une évolution défavorable de la maladie [Jang *et al.*, 2009 ; Seo *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2016]. Les anticorps anti-HBs semblent être incapables de neutraliser totalement la population virale, et ce, potentiellement via des mutations sur le génome du VHB.

Les épitopes des lymphocytes B et les épitopes des lymphocytes T présents sur les protéines d'enveloppe du VHB, qui ont été proposés par Desmond *et al.*, en 2008 et Lin *et al.*, en 2013 sont répertoriés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Récapitulatif des épitopes reconnus par les lymphocytes B et les lymphocytes T répertoriés par Desmond *et al.*, (2008) et Lin *et al.*, (2013).

	Position sur le gène S	Position sur le gène préS	
Lymphocytes B	44-49	12-32	
	99-169 (MHR)	19-26	
	122-148	27-35	
	160-207	32-47	
			37-45
			41-53
			72-78
			94-105
			106-117
			120-126
			123-135
			133-144
	158-168		
Lymphocytes T	19-33/20-28	21-28/21-30	
	28-51/37-51	29-48	
	41-49	52-67	
	54/69	94-105	
	81-99	106-117	
	88-96	120-135/120-146	
	95-104	141-150/132-150	
	97-106	149-168	
	124-137	164-173	
	136-155		
	139-146		
	150-158		
	165-172		
	172-180		
	185-194		
	207/208-216		
	215-223		

Les mutants de l'AgHBs sont aussi observés au cours de l'hépatite occulte définie par la persistance de l'ADN du VHB sans détection de l'AgHBs. Une étude de Svicher *et al.* (2012), portant sur des patients infectés par une hépatite occulte de génotype D, a permis de répertorier 20

mutations dans ou en dehors du déterminant « a » corrélées avec une infection occulte (sY100S, sQ101R, sP105R, sT115N, sT116N, sP120L, sR122P, sT123N, sT126I, sP127H/L, sQ129P, sM133T, sY134C, sS143L, sS167L, sR169H, sS174N, sL175S, sV177A). Une étude de Huang *et al.* (2012a), a mis en évidence des mutations présentes dans la MHR (sC124Y, sK141E, sD144A) entraînant une diminution de la sensibilité de trousse commerciale, mais également une sécrétion altérée des protéines S et du virion sur un modèle *in vitro*. Pour contrer ce phénomène, les trousse de détection les plus récentes font intervenir des mélanges d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux capables de reconnaître également les AgHBs mutés.

Certaines mutations observées sur le gène S ont également été associées à une évolution défavorable de la maladie vers le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). Par exemple, une étude récente a démontré le rôle oncogénique de la mutation sW172stop. En effet, cette mutation favorise la rétention des protéines tronquées dans le réticulum endoplasmique, le renouvellement rapide des hépatocytes et diminue l'expression de CSMD3 (« CUB and Sushi Multiple Domain 3 », suppresseur de tumeur), ce qui contribue à l'hépatocarcinogenèse [Lai *et al.*, 2016]. Cette mutation se répercute sur l'ORF de la polymérase (et réciproquement) sous la forme d'une mutation rtA181T qui est une mutation de résistance primaire à la Lamivudine, à la Telbivudine (TBV) et à l'Adéfovir dipivoxil (ADV). Les mutations sW182stop (rtV191I) et sW196stop (rtM204I) ont également été décrites pour leurs propriétés oncogéniques potentielles [Wang et Tang, 2016]. Les protéines tronquées en Cter des protéines LHBs favorisent les altérations métaboliques et sont généralement associées au développement de cirrhose et de CHC dus à l'accumulation intracellulaire des protéines dans le réticulum endoplasmique [Aragri *et al.*, 2016 ; Tong et Revill, 2016]. Par ailleurs, une étude a récemment mis en évidence une nouvelle mutation : la mutation sL21S (T216C en acides nucléiques) sur la protéine S qui serait un facteur de risque de développement d'hépatite fulminante [Xu *et al.*, 2015].

Dans la région préS, ce sont souvent des délétions qui sont observées. Ces délétions sont généralement associées à la progression de la maladie hépatique (augmentation des fibroses et cirrhoses), à des exacerbations aiguës conduisant parfois à des hépatites fulminantes et favorisent le développement de CHC (3,77 fois plus de risque) [Lin *et al.*, 2012 ; Pollicino *et al.*, 2014 ; Sunbul, 2014 ; Coppola *et al.*, 2015 ; Lin et Kao, 2015 ; Chen, 2016 ; Tong et Revill, 2016]. Les délétions dans préS sont généralement observées dans la jonction préS1/préS2 [Lin *et al.*, 2012 ; Lin et Kao, 2015 ; Urone *et al.*, 2015 ; Tong and Revill, 2016]. Cette région est importante pour la formation des virions par exemple en tant que site de fixation à la nucléocapside [Lin *et al.*, 2012]. Ainsi, les virus délétés doivent être accompagnés par des virus sauvages pour le maintien du fitness viral. Ces délétions se retrouvent également dans le promoteur SPII essentiel pour la transcription des protéines S ce qui réduit l'expression des protéines S au niveau de la transcription [Tong et Revill, 2016].

Les délétions dans préS diminuent généralement la production des protéines d'enveloppe et favorisent leur accumulation dans le réticulum endoplasmique. Ce stress cellulaire génère des dommages oxydatifs dans l'ADN de l'hôte qui conduisent à l'instabilité du génome cellulaire et à l'initiation de la mutagenèse du génome de l'hôte, favorisant la transformation des cellules hépatocytaires en cellules GGH (« Ground Glass Hepatocyte ») et contribuant au développement de l'hépatocarcinogenèse [Lin *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2014 ; Tong and Revill, 2016 ; Zhang *et al.*, 2017b]. Les délétions dans préS jouent également un rôle important dans le développement d'infection occulte, car elles affectent l'expression, la synthèse et la sécrétion des protéines S [Chen *et al.*, 2012 ; Huang *et al.*, 2012a ; Urone *et al.*, 2015]. Les délétions se retrouvent également au niveau d'épitopes reconnus par les lymphocytes B et T contribuant à une immunité altérée [Lin et Kao, 2011 ; Lin *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2014 ; Lin et Kao 2017].

Certaines mutations dans la région préS sont également associées à la progression de la maladie comme la mutation W4P impliquée dans le développement de CHC dépendant de la signalisation d'IL-6 chez des hommes infectés par le VHB de génotype C et la mutation P32L favorisant la progression de la maladie [Lee *et al.*, 2013 ; Coppola *et al.*, 2014]. Les délétions se retrouvent également sur des épitopes reconnus par les lymphocytes B et T contribuant à l'altération de la réponse immunitaire [Lin et Kao, 2011 ; Lin et Kao 2017 ; Zhang *et al.*, 2017b].

Ainsi, les mutations et délétions dans la région préS/S peuvent altérer les propriétés antigéniques, la capacité répliquative du VHB, la susceptibilité aux traitements antiviraux (chevauchement avec le gène de la polymérase) et l'évolution de la maladie. Ces mutations vont ainsi favoriser la persistance de l'infection et par conséquent la persistance de l'AgHBs.

Les variants observés sur les protéines du VHB ont un rôle important dans l'établissement et le maintien de l'infection chronique, la progression de la maladie, la pathogenèse et la réponse aux traitements [Tong et Revill, 2016]. Certains génotypes peuvent présenter un plus grand nombre de ces mutations comme le génotype C avec plus de mutations/délétions dans le promoteur basal du core (plus particulièrement les mutations A1762T/G1764A) et dans la région préS tout au long de l'infection en comparaison avec d'autres génotypes [Sunbul, 2014 ; Lin et Kao, 2015 ; Tong et Revill, 2016]. Par ailleurs, le génotype D présente une plus grande variabilité génétique par rapport au génotype A [Urone *et al.*, 2015 ; Aragri *et al.*, 2016]. Néanmoins, certaines mutations observées sur le génome du VHB sont associées à une meilleure évolution clinique chez les patients. Une étude réalisée par Chook *et al.* (2013) a pu mettre en évidence des mutations qui seraient des marqueurs d'un faible taux de passage à la chronicité de l'infection : la mutation C801 sur le gène S, la mutation G1171 dans le gène de la polymérase et les mutations T1785 et A1786 dans la région BCP [Chook *et al.*, 2013].

VI. L'hépatite B

1. La transmission du virus de l'hépatite B

Il existe différents modes de transmission du VHB [Grimm *et al.*, 2011 ; OMS, 2017]:

- la voie sexuelle : écoulements menstruels, sécrétions vaginales et séminales
- la voie périnatale : transmission verticale du virus de la mère à l'enfant généralement lors de l'accouchement ou lors de contacts rapprochés entre la mère infectée chroniquement par le VHB et son enfant
- les voies percutanées ou parentérales (à travers les muqueuses) : aiguilles et rasoirs infectés (usagers de drogues...), tatouages, piercings, actes chirurgicaux dentaires et accidents d'exposition au sang (AES) notamment observés chez les personnels de santé.

Le mode de transmission varie selon les zones d'endémicité précédemment décrites (§ 'le contexte épidémiologique actuel de l'hépatite B'). Dans les zones de forte prévalence du virus de l'hépatite B, la transmission se fait généralement de façon verticale, par voie périnatale [Grimm *et al.*, 2011 ; Burns et Thompson, 2014]. Le virus est également transmis pendant la petite enfance (âge inférieur à cinq ans) lors de contacts rapprochés entre les enfants, mais également par l'intermédiaire de la salive [Burns et Thompson, 2014 ; OMS, 2017]. Dans les zones de faible prévalence du VHB, la transmission du VHB se fait généralement lors de contacts sexuels à risques et par transmission percutanée [Grimm *et al.*, 2011 ; Burns et Thompson, 2014 ; OMS, 2017].

2. Le diagnostic de l'hépatite B et les marqueurs de l'infection par le VHB.

2.1. L'AgHBs

Le premier marqueur recherché dans l'hépatite B est l'AgHBs. Il est utilisé comme marqueur précoce de l'infection par le VHB. Cet antigène apparaît dans le sérum après une à dix semaines d'infection [Song et Kim, 2016]. La persistance de l'AgHBs plus de six mois dans le sérum des patients est utilisée comme marqueur de chronicité.

La quantification de l'AgHBs est également utilisée pour prédire l'activité de la maladie, surveiller sa progression et prédire la réponse aux traitements en cas d'hépatite B chronique [Cornberg *et al.*, 2016 ; OMS, 2017]. En effet, la perte de l'AgHBs est considérée comme la guérison fonctionnelle de l'infection par le VHB. Ce phénomène est souvent utilisé comme un signal d'arrêt des traitements [Zeisel *et al.*, 2015 ; Cornberg *et al.*, 2016 ; EASL, 2017].

Il existe trois tests commerciaux majoritairement utilisés pour qualifier la présence de l'AgHBs : l'Architect QT (Abbott), l'« Elecsys HBsAg II quant » (Roche diagnostic) et « DiaSorin Liaison

XL ». Ces automates sont utilisés pour leur reproductibilité, la quantification automatisée de l'AgHBs et leur faible coût [Cornberg *et al.*, 2016]. La comparaison de ces trois tests par l'équipe de Thibault *et al.* (2017), a montré qu'ils présentaient tous les trois une sensibilité élevée et une bonne corrélation en matière de détection de l'AgHBs même si l'automate DiaSorin Liaison XL tend à sous-estimer la quantité d'AgHBs. Cependant, pour ces trois automates, les mutants d'échappements, généralement localisés dans le déterminant « a », le génotype et le complexe immun peuvent influencer la détection de l'AgHBs [Cornberg *et al.*, 2016, Thibault *et al.*, 2017]. La présence de ces mutations peut influencer l'interprétation d'une hépatite B. En effet, certains patients présentent une persistance de la charge virale, alors que l'AgHBs n'est pas détecté dans le sérum : l'infection occulte. Les infections occultes peuvent également être associées à des mutations favorisant la rétention de l'AgHBs dans les hépatocytes (§ ' les mutants préS/S) [Huang *et al.*, 2012a ; Urone *et al.*, 2015 ; EASL, 2017].

L'AgHBs peut être corrélé au stade de fibrose chez les patients AgHBe positif. Un taux d'AgHBs positif plus élevé est observé chez les patients présentant un score de fibrose F0 à F1 comparé à F2 - F4 (4,36 +/- 0,58 vs. 3,84 +/- 1,01 log UI/mL). Lors de cette étude un seuil d'AgHBs de 3,85 log UI/mL a été déterminé pour identifier les fibroses sévère à modérée [Cornberg *et al.*, 2016]. Chez les patients AgHBe négatif, l'intégration du VHB au sein du génome de l'hôte est plus importante ; ce phénomène favorise une diminution plus lente de l'AgHBs sous traitements [Cornberg *et al.*, 2016].

Récemment, les études se sont concentrées sur la corrélation pouvant exister entre l'AgHBs et l'ADNccc. Chez les patients AgHBe positif présentant une infection chronique par le VHB, le taux d'AgHBs est corrélé à la quantité d'ADN du VHB dans le sérum et la quantité d'ADN intracellulaire dont l'ADNccc [Cornberg *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2017a]. Le taux d'AgHBs semble également corrélé à l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc dans les hépatocytes [Cornberg *et al.*, 2016 ; Song et Kim, 2016 ; Li *et al.*, 2017a]. Cependant, chez les patients AgHBe négatif, il ne semble pas exister de corrélation entre le taux d'AgHBs dans le sérum et la quantité d'ADNccc dans le foie [Cornberg *et al.*, 2016].

2.2. Les anticorps anti-HBs

Les anticorps anti-HBs sont les anticorps neutralisant l'infection. Ils indiquent une immunité efficace contre l'infection par le VHB ou la réponse à la vaccination contre le VHB [Wilkins *et al.*, 2010].

2.3. Les anticorps anti-HBc

Les anticorps anti-HBc sont les marqueurs sérologiques de contagage par le VHB. Les immunoglobulines M (IgM), anticorps contre la protéine core (anti-HBc) et les immunoglobulines G peuvent être observées une à deux semaines après la détection des AgHBs. Les IgM anti-HBc sont recherchées dans le sérum des patients pour diagnostiquer une hépatite aigüe et disparaissent après six mois d'infection aigüe [Wilkins *et al.*, 2010 ; Song et Kim, 2016]. Les IgG anti-HBc persistent en cas d'infection chronique, mais également en cas d'infection 'résolue' [Song et Kim, 2016].

2.4. L'AgHBe

L'AgHBe est un marqueur généralement associé à une forte intensité de réplication [OMS, 2017]. La séroconversion de l'AgHBe, tout comme la séroclairance de l'AgHBs, indique le contrôle par le système immunitaire de l'infection par le VHB et une rémission de la maladie au niveau du foie [Lin et Kao, 2015 ; Song et Kim, 2016]. En effet, une séroconversion de l'AgHBe précoce en anticorps contre l'antigène HBe (anti-HBe) est souvent associée à une évolution clinique plus favorable de l'infection [Lin et Kao, 2015]. Cependant, chez certains patients présentant une séroconversion de l'AgHBe, la réplication du virus persiste. En effet, certaines mutations dans la région préC/C peuvent inhiber la production d'AgHBe [Song et Kim, 2016]. La séroconversion tardive de l'AgHBe ou l'absence de séroconversion accélère le processus de chronicité et la progression de la maladie hépatique [Lin et Kao, 2015].

2.5. L'AgHBc

L'AgHBc est retrouvé seulement à l'intérieur des hépatocytes et il peut être détecté dans les biopsies de foie. Ce marqueur est généralement peu utilisé pour diagnostiquer une hépatite.

2.6. L'ADN du virus de l'hépatite B

L'ADN viral est quantifié, à l'aide de techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR, « Polymerase Chain Reaction ») en temps réel (qPCR, PCR quantitative), dans le sang. La quantification permet de suivre l'évolution de l'infection et rend compte directement de l'activité de réplication du virus dans le foie. Il est détectable un mois après l'infection et peut augmenter jusqu'à 10^8 copies/mL après trois mois d'infection [Song et Kim, 2016]. Les taux importants d'ADN de VHB dans le sérum des patients sont associés généralement à une progression plus rapide de la maladie hépatique et une incidence plus élevée de carcinome hépatocellulaire. L'ADN du VHB est également utilisé comme un facteur important dans la prise de décision d'initier un traitement. Il permet également de surveiller la réponse aux traitements antiviraux [Song et Kim, 2016].

2.7. Les marqueurs hépatiques

Des marqueurs hépatiques sont également utilisés pour évaluer les atteintes au niveau du foie. Généralement, la mesure des transaminases (Alanine aminotransférase, ALAT et Aspartate transaminase, ASAT), de l'albumine, de la bilirubine et le taux de prothrombine rendent compte de l'inflammation au niveau du foie et de la destruction des hépatocytes. Cependant, lorsque ces marqueurs persistent, une biopsie est essentielle pour définir le stade et la gravité de la maladie. C'est un acte chirurgical invasif pour le patient. Il était donc nécessaire de trouver d'autres méthodes moins invasives permettant d'estimer le stade de fibrose hépatique et l'intensité de l'inflammation. Le Fibroscan® est utilisé pour évaluer l'élasticité du foie par élastométrie impulsionnelle basée sur les vibrations et la mesure de la vitesse de déplacement de l'onde. Plus la vibration se déplace rapidement, plus le foie est dur et plus le stade de fibrose est avancé. Les marqueurs sériques ont également été utilisés pour évaluer le stade de fibrose (Fibrotest) et l'intensité de l'inflammation au niveau du foie (Actitest). Le Fibrotest est un index déterminé par les dosages des marqueurs suivants : l'alpha-2-macroglobuline, l'haptoglobine, l'apolipoprotéine-A, la bilirubine totale, les Gamma GT (gamma-glutamyl-transpeptidases). Un score de fibrose de F1 (sans fibrose) à F4 (cirrhose) est estimé, selon l'index obtenu. De la même manière, l'Actitest est basé sur le dosage des mêmes marqueurs auquel s'ajoute le dosage des transaminases ALAT. Un score d'A0 (sans activité) à A3 (activité sévère) est estimé, selon l'index obtenu.

2.8. Les nouveaux marqueurs

Actuellement, de nouvelles recherches sont menées pour détecter de nouveaux marqueurs de l'infection par le VHB pouvant mieux caractériser la réplication virale, prédire l'évolution de l'infection, de la maladie hépatique et, à long terme, la réponse aux traitements.

L'ADNccc joue un rôle important dans la persistance du VHB, la réactivation après traitement et persistance de l'infection sous traitements [Mu *et al.*, 2015]. Actuellement, l'ADNccc est quantifié sur les biopsies de foie par Southern blot ou par PCR en temps réel (qPCR). Cependant, la technique de southern-blot est chronophage et présente des limites en matière de détection et de quantification. De plus, une quantité importante de matériel est nécessaire. La PCR en temps réel est plus précise. Cependant, la quantification avec les méthodes actuelles est faussée par la détection de l'ADNrc intracellulaire présent dans les échantillons à analyser [Mu *et al.*, 2015 ; EASL, 2017]. Plusieurs équipes ont développé de nouvelles méthodes de PCR quantitatives (sondes TaqMan, nouvelles amorces, PCR numérique basée sur la technique des gouttelettes en émulsion eau/huile) pour augmenter la spécificité de la méthode. De nouvelles méthodes d'extraction (Hirt : isolement ADN extra chromosomique d'une cellule de mammifère avec élimination ADN de masse moléculaire

élevée, immunoprecipitation chromatine) et de prétraitements (exonucléase T5 ou « plasmid-safe DNase », déoxyribonucléase de haricot mungo) des échantillons sont également étudiés pour limiter la quantité d'ADNrc dans l'échantillon à analyser [Guo *et al.*, 2012 ; Mu *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2017a ; Liu *et al.*, 2017a ; Xia *et al.*, 2017]. Ainsi, ces études permettront de développer une méthode standardisée pour la quantification de l'ADNccc sur les biopsies de foie [Mu *et al.*, 2015 ; EASL, 2017].

Cependant, la recherche de l'ADNccc nécessite un acte chirurgical pour obtenir une biopsie de foie à analyser. Ainsi, de nouveaux marqueurs non invasifs, faciles à détecter et qui pourraient refléter l'activité de l'ADNccc dans le foie sans avoir recours à la biopsie sont recherchés. L'AgHBcr (« Hepatitis B virus core-related antigen ») et l'ARN du VHB retrouvés dans le sérum des patients sont des marqueurs potentiels.

2.8.1. L'ARN du VHB

L'ARN du VHB est retrouvé dans le sérum sous la forme de virions enveloppés contenant de l'ARNpg [Wang *et al.*, 2016]. Il est détecté rapidement à l'aide d'une RT-qPCR (rétrotranscriptase PCR en temps réel) de type RACE (amplification rapide des extrémités d'ADNc ; « Rapid amplification of cDNA ends ») [EASL, 2017]. Une corrélation forte entre l'ARN du VHB dans le sérum et l'ADNccc intrahépatique a pu être observée [EASL, 2017]. Chez les patients non traités, l'ARN du VHB est corrélé à la quantité d'ADN du VHB. Il peut également être utilisé comme marqueur de la réplication virale [Fourati et Pawlotsky, 2016]. De plus, l'ARN du VHB serait corrélé à la présence d'ADNccc dans le foie, mais également à son activité intra-hépatique [Wang *et al.*, 2016]. La cinétique de l'ARN du VHB serait également corrélée à une séroconversion de l'AgHBe sous traitements par NUCs et sous IFN α -pégylé [Van Bömmel *et al.*, 2015 ; Fourati et Pawlotsky, 2016 ; EASL, 2017]. La détection de l'ARN du VHB pourrait également prédire un rebond viral [Van Bömmel *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2016]. Le changement de la quantité d'ARN du VHB chez les patients sous traitements pourrait ainsi être un marqueur prédictif de réponse aux traitements, plus intéressant que l'ADN du VHB et l'AgHBs [Fourati et Pawlotsky, 2016].

2.8.2. L'AgHBcr

L'AgHBcr (« Hepatitis B virus core-related antigen ») est composé de l'AgHBe, de l'AgHBc dénaturé et de la protéine p22cr. La protéine p22cr correspond à la protéine précore contenant le peptide signal non clivé en Nter, mais le domaine riche en arginine en Cter du domaine core a été clivé (Figure 23) [Suzuki *et al.*, 2009]. Cette protéine est retrouvée dans les particules SVP sans ADN viral [Suzuki *et al.*, 2009]. Ainsi, l'AgHBcr permet à la fois de détecter les particules de Dane infectieuses, mais également les SVP contenant la protéine p22cr [EASL, 2017]. Le dosage de l'AgHBcr est réalisé selon une méthode immuno-enzymatique faisant intervenir un mélange de trois anticorps

monoclonaux dirigés contre les trois protéines formant l'AgHBcr. Cette méthode a été élaborée par la firme Fujirebio sous le nom de Limipluse®G system.

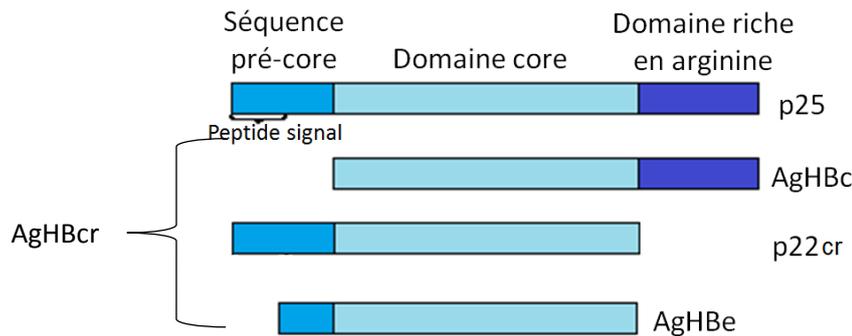


Figure 23 : Représentation schématique de la composition de l'AgHBcr, « Hepatitis B virus core-related antigen » du virus de l'hépatite B [Suzuki *et al.*, 2009].

De nombreuses études ont également été réalisées pour évaluer le potentiel de l'AgHBcr comme nouveau marqueur de l'infection par le VHB.

L'AgHBcr est retrouvé de façon plus abondante chez les patients AgHBe positif. Il a également été montré que la cinétique de l'AgHBcr pourrait être prédictive de la séroconversion spontanée de l'AgHBe [Song *et al.*, 2017]. Récemment, une étude réalisée par Cheung *et al.* (2017) a montré qu'un taux d'AgHBcr plus élevé avant et après traitement par NUCs serait associé à un risque plus élevé de développer un CHC chez les patients où l'ADN devient indétectable sous traitement par NUCs. Chez ces patients, la quantité d'AgHBs ne serait quant à elle pas corrélée au développement de CHC [Cheung *et al.*, 2017]. En effet, avant traitement, la valeur médiane d'AgHBcr chez les patients développant un CHC était de 279 KU/mL vs. 34 KU/mL ($p < 0,005$) chez les patients ne développant de CHC. Après traitement, le même phénomène a pu être observé chez les patients développant un CHC (10,2 vs. 1,7 KU/mL) [Cheung *et al.*, 2017]. L'AgHBcr pourrait prédire à long terme le développement d'un CHC [EASL, 2017]. Par ailleurs, l'AgHBcr semble corrélé à la quantité d'ADN du VHB dans le sérum et au taux d'ADNccc intrahépatique, avec ou sans traitement [Suzuki *et al.*, 2009 ; Matzusaki *et al.*, 2013]. Ainsi, l'AgHBcr pourrait être utilisé comme marqueur de la réplication virale [Maasoumy *et al.*, 2015]. L'AgHBcr est essentiellement corrélé au taux d'ADNccc intrahépatique [Suzuki *et al.*, 2009 ; Matzusaki *et al.*, 2013 ; Maasoumy *et al.*, 2015 ; Chen *et al.*, 2017 ; EASL, 2017]. Cependant, l'AgHBcr n'est que très modérément associé à la quantité d'AgHBs dans le sérum des patients [Maasoumy *et al.*, 2015].

Les études généralement réalisées sur l'AgHBcr sont effectuées sur des cohortes de patients asiatiques. Les résultats observés doivent être confirmés sur des cohortes Européennes [EASL, 2017]. L'AgHBcr semble être un nouveau marqueur potentiellement caractéristique de la réplication virale, représentatif de la quantité d'ADNccc intracellulaire et de l'activité transcriptionnelle au sein des hépatocytes et ne nécessite pas d'acte chirurgical.

3. La physiopathologie du virus de l'hépatite B

3.1. L'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B

3.1.1. Les facteurs influençant l'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B

L'évolution de l'infection par le VHB est le résultat d'interactions entre les facteurs viraux, les facteurs de l'hôte et les facteurs environnementaux (Figure 24) [Croagh et Lubel, 2014].

Différents facteurs environnementaux sont responsables de l'évolution clinique de la maladie : la co-infection avec d'autres virus (virus de l'hépatite Delta, VHD ; virus de l'hépatite C, VHC, virus de l'immunodéficience humaine, VIH), les facteurs de co-morbidité (consommation d'alcool) et l'exposition à d'autres agents infectieux (aflatoxine). Des facteurs d'hôte peuvent également influencer l'histoire naturelle du VHB : le sexe, l'âge de l'infection et les facteurs génétiques [Croagh et Lubel, 2014]. En effet, l'infection par le VHB évolue plus souvent vers la chronicité chez les hommes et lorsque l'infection est transmise à la naissance ou durant l'enfance [Croagh et Lubel, 2014].

Il existe également différents polymorphismes génétiques au sein de l'hôte qui peuvent favoriser l'évolution vers la chronicité. Par exemple, certains polymorphismes ont été observés sur le gène APOBEC3G (« apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like » 3G, cytidine deaminases) et semblent influencer la progression de l'infection. Le polymorphisme rs8177832 est associé à une diminution du risque de développer une infection chronique et un CHC tandis que le polymorphisme rs2011861 est associé à une augmentation du risque de développer un CHC [He et al., 2017]. Une étude a également montré qu'il existait un polymorphisme au sein du récepteur NTCP de l'hôte (S267F ; rs2296651) qui pourrait être responsable d'une prédisposition à l'infection par le VHB et favoriserait l'évolution de l'infection vers la chronicité [Li et al., 2014].

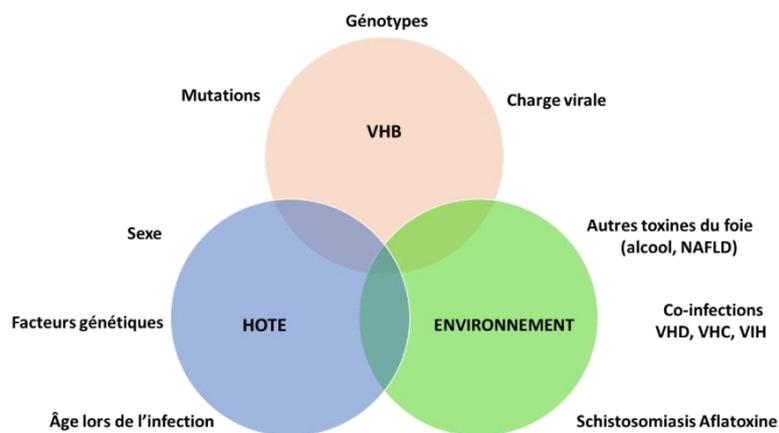


Figure 24 : Les différents facteurs pouvant interagir avec l'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) (VHD : virus de l'hépatite Delta, VHC : virus de l'hépatite C, VIH : virus de l'immunodéficience humaine, NAFLD : Stéatose hépatique non alcoolique, « Non alcoholic fatty liver disease ») [Croagh et Lubel, 2014].

3.1.2. L'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B

L'infection par le VHB conduit au développement d'une hépatite aigüe. Dans 75 % des cas, l'hépatite aigüe est asymptomatique [Pol, 2007]. Dans 25 % des cas, certains symptômes peuvent être observés comme l'ictère, la coloration des urines, de la fatigue, des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales [OMS, 2017]. Dans environ 1 % des cas, l'infection peut provoquer une insuffisance hépatique avec une nécrose rapide des hépatocytes qui conduit généralement à une hépatite fulminante mortelle [Pol, 2007 ; OMS, 2017]. L'hépatite aigüe peut être soit résolutive, soit évoluer vers la chronicité. L'hépatite résolutive est définie par un AgHBs indéctable et une charge virale dans le sérum des patients avec l'apparition ou non des anticorps anti-HBs (la guérison fonctionnelle) [Pol, 2007 ; Levrero *et al.*, 2016]. En effet, la guérison d'une hépatite B n'est jamais complète, car de l'ADNccc persiste dans le foie et peut conduire à des réactivations sévères de l'infection par le VHB en cas d'immunosuppression. Lorsque l'infection survient à l'âge adulte, l'hépatite aigüe est résolutive dans environ 95 % des cas [Ait-goughoulte *et al.*, 2010 ; Hézode, 2010 ; Croagh et Lubel, 2014]. Chez l'enfant, l'infection périnatale favorise la persistance de l'infection dans 90 % des cas [Grimm *et al.*, 2011 ; Abdelnabi *et al.*, 2014 ; Burns et Thompson, 2014 ; Croagh et Lubel, 2014]. De plus, chez les enfants de moins de cinq ans, environ 20 à 30 % évoluent vers la chronicité [Burns et Thompson, 2014 ; Croagh et Lubel, 2014]. Le développement d'une infection chronique peut conduire à un portage inactif du VHB, sans symptôme, seulement chez 1/3 des patients porteurs d'une infection chronique. En effet, chez 70 % des patients, l'infection chronique conduit à la destruction des tissus hépatiques par le système immunitaire et favorise le développement de maladies hépatiques (fibrose, cirrhose, décompensation hépatique, carcinome hépatocellulaire) [Pol, 2007 ; Hézode, 2010]. L'incidence cumulative sur cinq ans du développement d'une cirrhose, chez les patients chroniquement infectés par le VHB, a été évaluée entre 8 et 20 %. Chez ces patients atteints d'une cirrhose, le risque de développer une décompensation hépatique est de 20 % [EASL, 2017]. De plus, le risque annuel de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) suite à une cirrhose provoquée par une infection par le VHB est d'environ 2 à 5 % [EASL, 2017]. Le risque de développer un CHC peut être augmenté jusqu'à 100 fois lors d'une infection par le VHB [Ballarin *et al.*, 2017]. L'histoire naturelle de l'infection par le VHB est résumée sur la Figure 25.

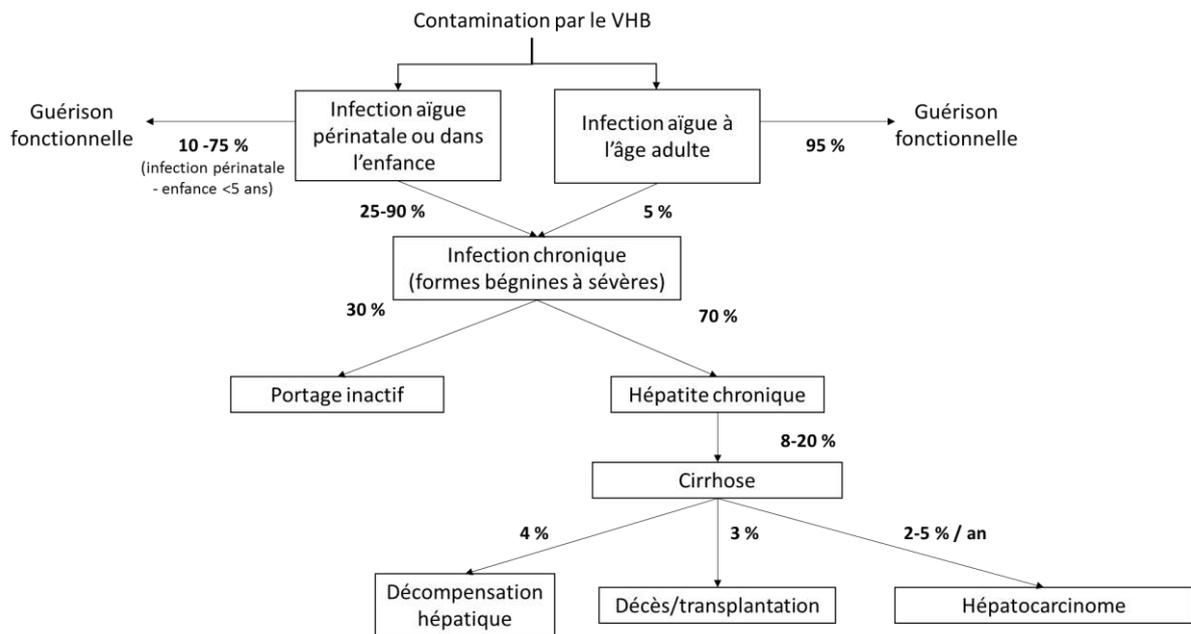


Figure 25 : L'histoire naturelle de l'hépatite B [Servant-Delmas et al., 2007; Pol, 2007; Hézode, 2010; Burns et Thompson, 2014; Croagh et Lubel, 2014; EASL, 2017].

L'infection chronique par le VHB se divise en cinq phases selon l'équilibre existant entre la réplication du virus et la réponse immunitaire de l'hôte. Ces différentes phases se caractérisent par différents marqueurs : le statut AgHBe, la quantité d'ADN du VHB, le taux d'aminotransférase et la présence ou non d'inflammation au niveau du foie [Burns et Thompson, 2014; Croagh et Lubel, 2014; EASL, 2017]. La nomenclature a été récemment modifiée, selon les recommandations de l'EASL en 2017. Les cinq phases sont les suivantes.

La phase d'infection chronique AgHBe positive, auparavant nommée la phase de tolérance immunitaire, se caractérise par une réplication intense du virus (charge virale élevée). Le taux d'aminotransférase est normal (seuil : 40 UI/mL). Au niveau du foie, il n'y a pas ou peu de nécro-inflammation ou de fibrose [EASL, 2017]. La séroconversion de l'AgHBe est très rarement observée lors de cette phase et les patients sont très contagieux à cause de la quantité importante d'ADN du VHB [Burns et Thompson, 2014; EASL, 2017]. Lors de cette phase, l'intégration de l'ADN du VHB et l'expansion clonale des hépatocytes sont conséquentes. Ceci suggère que l'initiation de l'hépatocarcinogenèse peut débuter dès cette phase [EASL, 2017]. Généralement, un seul variant viral domine à cette phase [Burns et Thompson, 2014]. Cette phase est plus fréquente et plus longue chez les patients infectés à la naissance. La fonction des lymphocytes T spécifiques du VHB est préservée au moins jusqu'à l'âge adulte [EASL, 2017]. Cette phase peut durer 10 à 30 ans [Burns et Thompson, 2014].

La phase d'hépatite chronique AgHBe positive, anciennement appelée phase de clairance immunitaire, est caractérisée par une réplication intense du virus (charge virale élevée), et une augmentation des transaminases du foie. Cette étape s'accompagne d'une nécro-inflammation

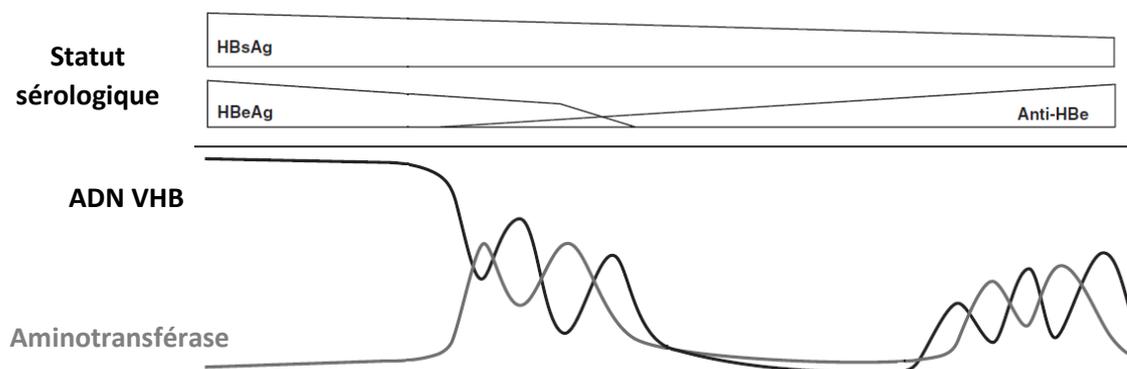
sévère ou modérée des hépatocytes et favorise un développement accéléré de la fibrose. Cette phase est atteinte plus rapidement et plus fréquemment chez les individus infectés à l'âge adulte. Ensuite, la plupart des patients présentent une séroconversion de l'AgHBe et la suppression de l'ADN du VHB. Ils entrent ensuite en phase d'infection AgHBe négatif. Si la séroconversion de l'AgHBe n'est pas observée et que la charge virale persiste, le patient progresse vers la phase d'hépatite AgHBe négative chronique [EASL, 2017].

La phase d'infection chronique AgHBe négative correspond à celle nommée auparavant la phase de portage inactif (« inactive carrier ») ou la phase de contrôle immunitaire. Elle se caractérise par la présence d'anticorps anti-HBe dans le sérum des patients. La charge virale est faible voire indétectable (inférieure à 2 000 UI/mL), le taux d'aminotransférase est revenu à un taux normal et l'activité nécro-inflammatoire est réduite. La réactivité des lymphocytes T spécifiques du VHB est augmentée pour maintenir la suppression virale. La séroconversion spontanée de l'AgHBs n'est que très rarement observée, 1 à 3 % des cas par an. Généralement la quantité d'AgHBs est inférieure à 1 000 UI/mL. Ces patients présentent généralement un faible risque de progression vers la cirrhose et le CHC s'ils restent dans cette phase [EASL, 2017]. Diverses populations de variants coexistent (quasi-espèces) et la sélection positive de certains variants apparaît progressivement [Burns et Thompson, 2014].

La phase d'hépatite B chronique AgHBe négative correspondant à la phase anciennement appelée échappement immunitaire. Elle se caractérise par la perte de l'AgHBe et généralement des anticorps anti-HBe positifs. La charge virale persiste ou fluctue entre des taux moyens ou élevés, tout comme les transaminases. Lors de cette phase, une nécro-inflammation et le développement de la fibrose sont observés [EASL, 2017]. Elle se caractérise ainsi, par des fluctuations de l'activité de la maladie au cours du temps, et l'accumulation progressive des dommages au niveau du foie [Burns et Thompson, 2014]. De nouveaux variants émergent lors de cette phase, généralement localisés au sein des gènes préC et de la région BCP (promoteur basal du core), qui sont responsables d'une diminution ou de l'abolition de l'expression de l'AgHBe. Cette phase est associée à un faible taux de rémission spontanée de l'hépatite [EASL, 2017].

La phase AgHBs négative se caractérise par la perte de l'AgHBs et la présence d'anticorps anti-HBc. La séroconversion des AgHBs en anticorps anti-HBs n'est pas systématique. Les patients ont des taux d'ALAT et d'ASAT normaux [EASL, 2017]. L'ADN du VHB n'est en général pas détecté dans le sérum. Cette phase est considérée comme la guérison fonctionnelle du VHB [Levrero *et al.*, 2016]. Cependant, l'ADNccc persiste dans le foie. Lorsque la charge virale persiste, l'infection est qualifiée d'occulte (mauvaise détection de l'AgHBs, rétention intracellulaire de l'AgHBs). Si la perte de l'AgHBs apparaît avant le développement de cirrhose, le patient présentera moins de risques de développer une cirrhose ou un CHC. Cependant, si la cirrhose s'est développée avant la perte de l'AgHBs, le

patient présentera un risque plus élevé de développer un CHC. De plus, l'immunosuppression peut conduire à la réactivation de l'infection lors de cette phase. Cette réactivation correspond à la disparition des anticorps anti-HBe et à la réapparition de l'AgHBe et de l'ADN du VHB dans le sérum à partir du pool d'ADNccc persistant dans le noyau des hépatocytes [EASL, 2017]. Les différentes phases de l'infection chronique sont résumées dans la Figure 26.



Différentes phases	Infection chronique	Hépatite chronique	Infection chronique	Hépatite chronique
	AgHBe positive	AgHBe positive	AgHBe négative	AgHBe négative
Charge virale	> 10 ⁷ UI/mL	10 ⁴ à 10 ⁷ UI/mL	< 2 000 UI/mL	> 2 000 UI/mL
Taux d'aminotransférase	Normal	Elevé	Normal	Elevé (persistant ou intermittent)
Maladie au niveau du foie (nécro-inflammation, fibrose)	Inexistante ou minimale	Modérée à sévère	Inexistante	Modérée à sévère
Intermédiaires de réplication intra-hépatique (copies ADNccc/cellules, activité transcriptionnelle ADNccc)	++++	+++	+	++
Phase immunologique	Phase de tolérance immunitaire	Phase de clairance immunitaire	Phase de contrôle immunitaire	Phase d'échappement immunitaire

Figure 26 : Les caractéristiques des différentes phases de l'histoire naturelle de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B [Burns et Thompson, 2014 ; Croagh et Lubel, 2014 ; EASL, 2017].

3.2. L'immunopathogenèse du VHB

Le virus de l'hépatite B n'est pas strictement cytotoxique. En effet, la cytotoxicité est provoquée par l'activité du système immunitaire contre les antigènes du VHB [Ait-goughoulte *et al.*, 2010 ; Chisari *et al.*, 2010 ; Grimm *et al.*, 2011 ; Lin et Kao, 2015]. Ces mécanismes de défense mis en jeu contre le VHB vont être responsables du développement de maladies hépatiques telles que la fibrose, la cirrhose et le CHC (Figure 27) [Ait-Goughoulte *et al.*, 2010].

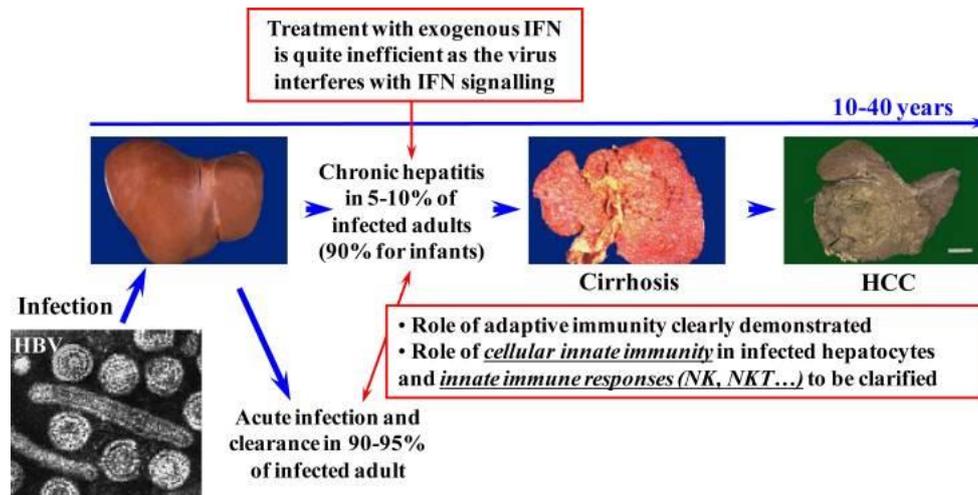


Figure 27 : Le développement de la maladie hépatique chez les patients infectés par le virus de l'hépatite B [Ait-Goughoulte et al., 2010].

Lors d'une infection par un agent pathogène, deux types d'immunité sont mises en jeu afin d'éliminer le virus: l'immunité innée et l'immunité adaptative. En cas d'évolution favorable, l'immunité adaptative à médiation cellulaire contre le VHB est robuste, polyclonale, multi spécifique et contribue à la résolution de l'infection. L'immunité adaptative à médiation humorale intervient également pour éliminer les dernières cellules infectées [Guidotti et al., 2015].

3.2.1. L'échappement à l'immunité innée lors d'une infection par le VHB

L'immunité innée est la première ligne de défense déployée par le système immunitaire de l'hôte pour prévenir l'invasion du virus [Zou et al., 2016]. L'organisme détruit le pathogène sans contact préalable avec celui-ci [Madigan et Martinko., 2007]. Cette réponse est généralement mise en place plus rapidement que la réponse immunitaire adaptative. Les principaux acteurs de cette immunité sont les phagocytes (macrophages et cellules dendritiques) [Madigan et Martinko, 2007].

Les PRRs (« Pattern Recognition Receptor ») sont présents à la surface de ces cellules afin de détecter des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) [Ait-goughoulte et al., 2010]. L'activation de ces récepteurs stimule divers mécanismes antiviraux comme la production de cytokines antivirales et pro-inflammatoire comme l'interféron (IFN) α et β et l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. En effet, ces cytokines vont avoir un effet direct sur le pathogène ou indirect via la stimulation d'autres acteurs du système immunitaire [Ait-goughoulte et al., 2010 ; Zou et al., 2016]. Cependant, malgré la présence des nombreuses cellules du système immunitaire dans le foie (§ 'Le foie, la fibrose et la cirrhose'), le virus de l'hépatite B semble échapper à la détection par le système immunitaire inné [Ait-goughoulte et al., 2010]. Des études réalisées sur le chimpanzé ont montré que l'IFN α/β , l'IFN γ , l'IFN λ ainsi que les gènes stimulés par l'IFN (ISGs, « Interferon-stimulated genes ») ne sont pas induits lors de la propagation de l'infection [Guidotti et al., 2015].

Ainsi, le virus de l'hépatite B est reconnu par le système immunitaire inné, mais interagit avec différents acteurs de l'immunité innée (PRR, cellules dendritiques et cellules « Natural Killer » NK et NKT) pour y échapper (Figure 28) [Zou *et al.*, 2016].

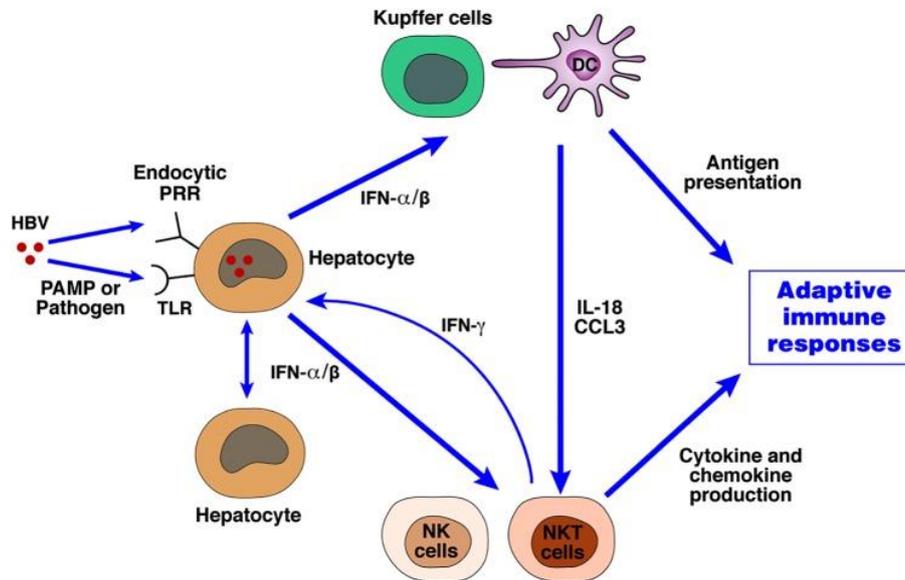


Figure 28 : Les différents acteurs de la réponse immunitaire innée mis en jeu face au virus de l'hépatite B [Wilson *et al.*, 2016].

3.2.1.1. Les PRRs (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)

Le virus de l'hépatite B est responsable de la diminution de l'expression des récepteurs reconnaissant les particules virales à la surface des cellules du foie. Il interfère avec l'expression des TLRs (« Toll Like Receptor ») et les voies de signalisation induites [Zou *et al.*, 2016]. Les récepteurs TLRs, RiG1 (« retinoic acid-inducible gene ») et NLR (« nucleotide oligomerization domain receptors ») sont importants pour la détection des pathogènes à la surface des cellules et permettent d'initier la réponse immunitaire innée [Zou *et al.*, 2016]. Le VHB inhibe sa reconnaissance par les récepteurs TLR-3 et les récepteurs RiG1-MDA5 (« Melanoma Differentiation-Associated protein 5 ») [Maini et Gehring, 2016 ; Zou *et al.*, 2016].

Le virion, l'AgHBs et l'AgHBe semblent impliqués dans la réduction de l'expression des TLRs et dans l'inhibition des voies de signalisation induites. Par conséquent, les cytokines pro-inflammatoires, l'IFNβ, les ISGs (« Interferon-stimulated gene ») produits par les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales sinusoidales, ainsi que certains facteurs de transcription sont inhibés [Zou *et al.*, 2016]. Par exemple, le facteur de transcription IRF3 (« Interferon regulatory factor »), impliqué dans la transcription des IFN et NFκB («nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ») et contrôlant la production de cytokine et régulant la survie cellulaire via l'activation de la phagocytose, est inhibé [Zou *et al.*, 2016].

Des études ont montré que l'AgHBs pouvait agir sur les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales sinusoidales du foie, mais également sur la régulation de l'activation des lymphocytes T via TLR-3. Par ailleurs, l'AgHBs inhibe la voie de signalisation « c-Jun Nterminal kinase » induite par les TLR-2 [Zou *et al.*, 2016]. Cette voie de signalisation joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes T et l'apoptose des cellules infectées. L'AgHBs peut également induire la production d'IL-10 qui va réduire la réponse immunitaire et la production de certaines cytokines (IL-2, IL-3, facteur de nécrose tumorale TNF α « Tumor necrosis factor alpha », IFN) impliquées dans la réponse inflammatoire [Zou *et al.*, 2016].

Chez les patients AgHBe positif, l'expression des TLR-2 au niveau des cellules de Kupffer et des cellules mononuclées du sang périphériques est réduite. Le récepteur TLR-2 est habituellement impliqué dans la reconnaissance de nombreux PAMPs et permet d'activer la voie de signalisation NF κ B dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 (« Myeloid differentiation primary response gene 88 ») impliquée dans la production de cytokines pro-inflammatoires et l'interféron [Zou *et al.*, 2016]. L'AgHBe peut interagir avec des molécules adaptatrices impliquées dans les voies de signalisation des TLRs et inhiber ces voies de signalisation [Zou *et al.*, 2016]. Le domaine riche en arginine de l'AgHBc peut également agir négativement sur les voies de signalisation des TLR-2. Chez des cellules de Kupffer murines, ce phénomène a montré une suppression de l'immunité impliquant des lymphocytes T spécifiques du VHB [Maini et Gehring, 2016].

Les protéines X et P (polymérase) interfèrent également avec les PRRs. En effet, la protéine X peut réduire l'expression de la protéine TRIF (« TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ») impliquée dans la signalisation des TLR-3 et 4. La protéine TRIF agit habituellement sur la libération de cytokines inflammatoires et la régulation positive de l'expression des cellules immunitaires [Zou *et al.*, 2016]. La protéine X et la protéine P sont également impliquées dans l'inactivation des voies de signalisation RIG1-MDA5. Chez les patients infectés de façon chronique, l'ARNm RIG1/MDA5 diminue de façon drastique. Par ailleurs, la protéine X inhibe divers facteurs de transcription, NF κ B et IRF3 impliqués dans la production d'interféron. La protéine P, quant à elle, interagit avec DDX3 (« DEAD-box RNA helicase », protéine se liant à la polymérase du VHB,) et bloque la signalisation des PRRs [Zou *et al.*, 2016].

3.2.1.2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont importantes dans la mise en place de l'immunité adaptative. Elles permettent de reconnaître les antigènes étrangers et les présentent aux cellules effectrices [Balmasova *et al.*, 2014]. De plus, les cellules dendritiques permettent de générer les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'AgHBc [Zou *et al.*, 2016]. En cas d'infection chronique, certaines études ont montré que les fonctions des cellules dendritiques étaient dégradées (diminution de l'expression

des molécules de co-stimulation, diminution de la production de cytokines, diminution de la capacité de stimulation d'un même antigène). Cependant, certaines études montrent que le phénotype et les fonctions des cellules dendritiques de patients infectés par le VHB (plasmacytoïdes et myéloïdes) sont peu touchés avec un défaut de production d'interféron [Gehring et Ann D'Angelo, 2015]. En effet, l'AgHBs et les particules virales du VHB sont capables de supprimer la transcription d'IFN α induite par les TLR-9 présents à la surface des cellules dendritiques plasmacytoïdes [Zou *et al.*, 2016]. De plus, le VHB perturbe les interactions entre les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les monocytes [Zou *et al.*, 2016].

Par ailleurs, la présence du VHB et de l'AgHBs contribue au dysfonctionnement des cellules dendritiques myéloïdes. En effet, le VHB semble favoriser la production de cellules dendritiques myéloïdes présentant un phénotype de tolérance du virus (diminution de l'expression de marqueurs) [Balmasova *et al.*, 2014 ; Zou *et al.*, 2016].

Sous l'influence de l'AgHBs, les cellules dendritiques périphériques diminuent leurs propriétés d'adhésion et leur capacité de production d'IFN α [Balmasova *et al.*, 2014]. De nombreuses études montrent tout de même que le VHB favorise le dysfonctionnement des cellules dendritiques dans le sang périphérique en faveur de sa persistance dans le foie mais certaines recherches sont contradictoires [Balmasova *et al.*, 2014 ; Zou *et al.*, 2016 ; Sandhu *et al.*, 2017].

3.2.1.3. Les cellules « Natural Killer » (NK) et NKT

En ce qui concerne les cellules « Natural Killer » (NK) et NKT (cellules présentant les marqueurs des lymphocytes T et des cellules « Natural Killer »), le nombre, la distribution et la cytotoxicité ne semblent pas altérés par le VHB, mais l'activation et l'expression des récepteurs à sa surface et la production de cytokines (IFN γ et TNF α) sont fortement influencées chez les patients infectés chroniquement par le VHB [Zou *et al.*, 2016 ; Rehermann, 2015 ; Sandhu *et al.*, 2017]. Ces cellules sont généralement activées durant les phases précoces de l'infection par le VHB. Le VHB est capable de supprimer spécifiquement la capacité des NK à produire de l'IFN γ sans interférer sur les capacités cytolytiques des cellules (destruction des hépatocytes, altération de l'immunité, suppression des lymphocytes T spécifiques du VHB) [Rehermann, 2015 ; Maini et Gehring, 2016 ; Zou *et al.*, 2016]. Lors d'une infection par le VHB, la production des cytokines par les cellules NK semble être altérée par les cytokines IL-10 et « Transforming growth factor beta » (TGF- β) produites par les monocytes et les macrophages. Ce sont des cytokines immunosuppressives [Rehermann, 2015]. Cependant, l'activité cytotoxique des cellules persiste avec une augmentation de l'expression de TRAIL («Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand ») corrélée avec l'inflammation du foie (Figure 29) [Rehermann, 2015]. L'AgHBs pourrait également inhiber la production d'IFN γ en ciblant la production des cytokines IL-18 [Zou *et al.*, 2016].

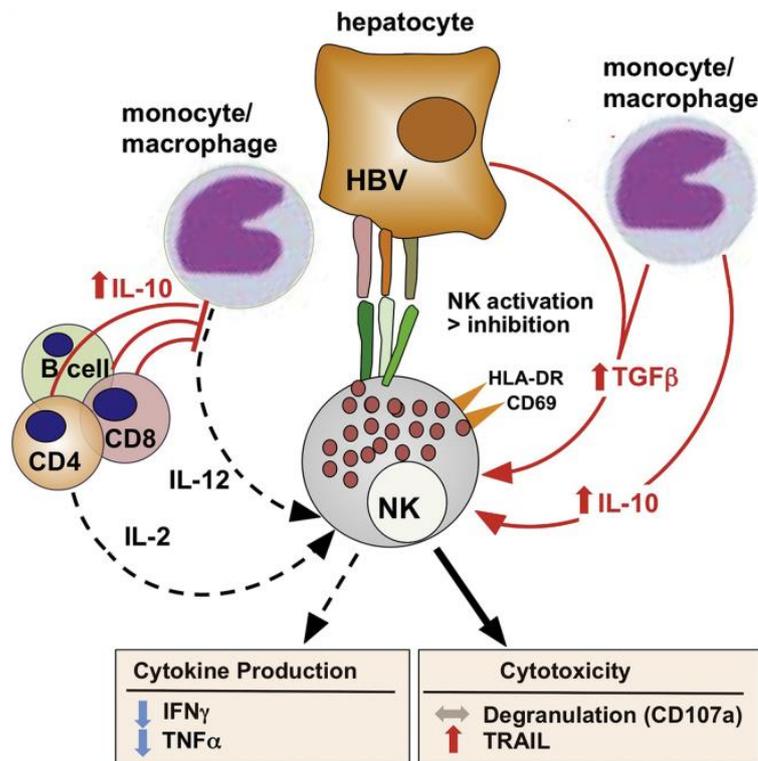


Figure 29 : Schématisation des différentes fonctions des cellules « Natural Killer » altérées lors d'une infection par le virus de l'hépatite B [Rehermann, 2015].

De plus, différents récepteurs activateurs ou inhibiteurs sont présents à la surface des cellules : le récepteur NKG2D est un récepteur activateur présent à la surface des cellules NK, NKT et des lymphocytes T cytotoxiques. La transcription de ce ligand est régulée négativement par le VHB [Zou *et al.*, 2016]. En effet, lorsque la charge virale du VHB est importante, les récepteurs inhibiteurs des cellules NK et NKT sont régulés positivement (NKG2A) contrairement aux récepteurs activateurs qui sont régulés négativement (NKG2D) [Zou *et al.*, 2016]. Lorsque la charge virale est réduite (lors de traitements par NUCs par exemple), l'activité des NK est partiellement restaurée en termes de quantité, de taille, de capacité de destruction des cellules, mais la capacité de production de l'IFNγ n'est que partiellement restaurée [Rehermann, 2015]. La restauration partielle des NK semble favoriser la clairance de l'AgHBs (la perte de l'AgHBs) plus importante est observée [Zou *et al.*, 2016].

Les cellules NKT présentent à leur surface des marqueurs des cellules NK de type CD56, mais également un récepteur des lymphocytes T de type CD3. Des études chez les souris ont montré que la quantité de cellules NKT et leur capacité de production de l'IFNγ étaient détériorées par le VHB. De plus, chez les patients chroniques, le nombre d'NKT périphériques était plus faible, mais pouvait être augmenté sous traitement [Zou *et al.*, 2016]. En effet, l'utilisation d'IFNα-pégylé permet d'augmenter les NKT dans le sang périphérique des patients qui répondent au traitement [Zou *et al.*, 2016]. Le mécanisme n'est pas encore élucidé, mais certaines pistes envisagent des recherches sur la migration des NKT dans le foie, l'expression de molécules inhibitrices comme PD-1 («Programmed cell death

protein 1 ») et Tim-3 («T cell immunoglobulin mucin-3 ») qui pourrait affecter le nombre de NKT en cas d'infection chronique [Zou *et al.*, 2016].

Ainsi, les protéines du VHB peuvent interagir avec diverses molécules, cellules immunitaires et différentes voies de signalisation impliquées dans l'immunité innée et lui permettre d'échapper à la première ligne de défense de l'hôte.

3.2.2. L'immunité adaptative mise en jeu contre le virus de l'hépatite B

La clairance virale et la pathogénèse du VHB sont essentiellement régulées par l'immunité adaptative (Figure 30). Lors d'une infection par le VHB, le nombre de lymphocytes B et les lymphocytes T augmentent pour combattre l'infection [Bertoletti et Ferrari, 2016]. La réponse immunitaire adaptative contre le VHB est plus efficace chez l'adulte que chez l'enfant. En effet, la phase de tolérance immunitaire est plus souvent observée chez les jeunes enfants pouvant être expliquée par l'immaturation du système immunitaire chez ce dernier [Chisari *et al.*, 2010 ; Balmasova *et al.*, 2014].

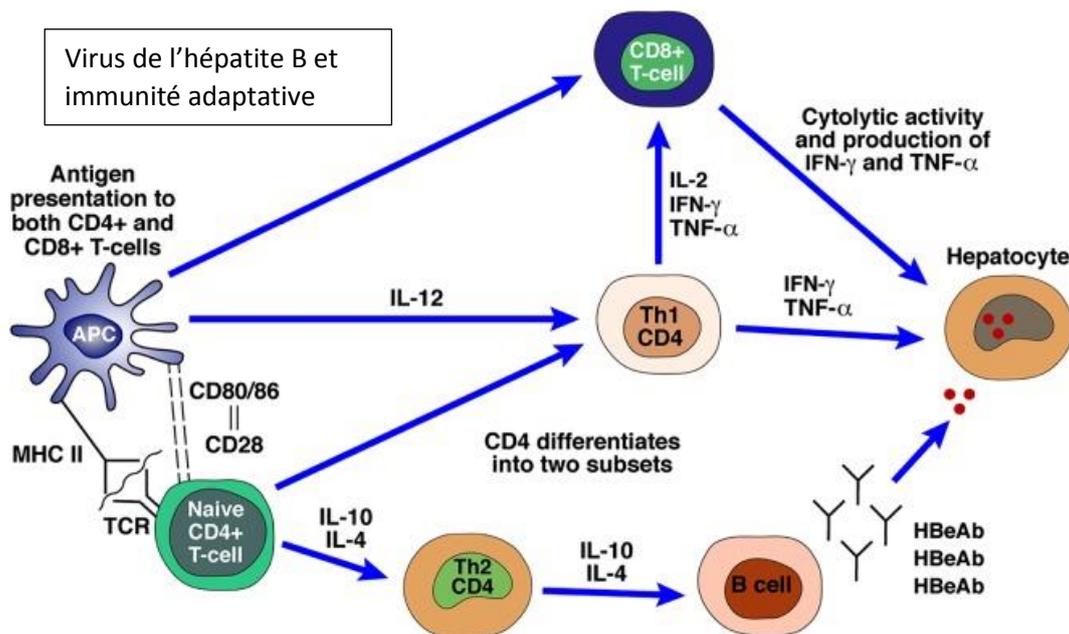


Figure 30 : Les différents acteurs de la réponse immunitaire adaptative engagés face à une infection par le virus de l'hépatite B [Wilson *et al.*, 2016].

L'immunité adaptative est dite acquise ; elle nécessite un contact préalable avec le pathogène. En effet, des fragments de pathogènes présents sur les cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques) vont être utilisés pour activer les lymphocytes qui sont les principaux acteurs de la réponse adaptative. Les lymphocytes sont programmés pour reconnaître un seul antigène pathogène grâce aux récepteurs présents à leur surface. Les lymphocytes détruisent directement les molécules ou les cellules présentant l'antigène du pathogène à leur surface, produisent des molécules favorisant l'inflammation ou activent les

lymphocytes B permettant de produire des anticorps contre l'antigène du pathogène. L'immunité adaptative se caractérise par sa spécificité, sa capacité de mémoire et sa tolérance aux antigènes. Il existe deux types d'immunité adaptative jouant des rôles différents dans l'élimination du pathogène. Dans un premier temps, l'immunité à médiation cellulaire fait intervenir essentiellement les lymphocytes T. Ces derniers se divisent en deux catégories : les lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) qui lysent ou induisent l'apoptose des cellules présentant l'antigène recherché sur leur membrane et les lymphocytes T helper (CD4⁺) de type 1 (Th1) qui produisent des molécules de signalisation, les cytokines, permettant d'activer les lymphocytes T cytotoxiques ou d'autres cellules du système immunitaire comme les macrophages qui aident à détruire les cellules ciblées [Guidotti *et al.*, 2015 ; Bertoletti et Ferrari 2016]. La qualité de la réponse immunitaire adaptative et la clairance du VHB dépendent de l'amorçage de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques [Chisari *et al.*, 2010 ; Guidotti *et al.*, 2015 ; Sandhu *et al.*, 2017]. Les lymphocytes T helper jouent un rôle essentiel dans l'intensité de ce processus [Bertoletti et Ferrari, 2016]. En effet, la réponse des lymphocytes T helper, contribue indirectement au contrôle de l'infection en facilitant l'induction et la maintenance des lymphocytes T cytotoxiques [Chisari *et al.*, 2010]. L'activation précoce des lymphocytes T helper lors de l'infection par le VHB favorise l'induction et la maintenance des lymphocytes T cytotoxiques ainsi que la production des anticorps neutralisants contribuant à la résolution de l'infection [Chisari *et al.*, 2010 ; Guidotti *et al.*, 2015]. Cependant, l'induction faible ou tardive des cellules CD4⁺ induit une activation tardive des lymphocytes T cytotoxiques et favorise la persistance de l'infection [Chisari *et al.*, 2010 ; Sandhu *et al.*, 2017].

Le deuxième type d'immunité adaptative est l'immunité à médiation humorale qui fait intervenir les anticorps. Les lymphocytes T helper de type 2 (Th2) interviennent lors de cette étape. Ils vont stimuler les lymphocytes B spécifiques de l'antigène ciblé responsables de la production d'immunoglobulines ou d'anticorps. Les anticorps sont des protéines solubles qui vont reconnaître les épitopes présents sur l'antigène ciblé dans le sang et les fluides du corps humain. Ainsi, lorsque l'antigène est reconnu par les anticorps, celui-ci neutralise directement l'antigène et le détruit, ou présente la cellule présentant l'antigène cible à des agents destructeurs. L'immunité adaptative contrôle l'infection de manière efficace et durable [Madigan et Martinko, 2007 ; Ait-goughoulte *et al.*, 2010 ; Bertoletti et Ferrari, 2016]. Lors d'une infection par le VHB, la réponse immunitaire humorale n'apparaît que tardivement. Elle prévient la propagation du virus à long terme dans les cellules infectées par le VHB n'ayant pas été éliminées par les lymphocytes T cytotoxiques lors de la réponse immunitaire à médiation cellulaire [Chisari *et al.*, 2010 ; Bertoletti et Ferrari, 2016].

3.3. Le foie, la fibrose et la cirrhose

Le foie est un organe remplissant diverses fonctions au sein de l'organisme. Il joue un rôle d'épuration des composés toxiques pour l'organisme comme l'ammoniac qu'il transforme en urée. Il intervient dans la synthèse et le stockage de certains composés comme la bile. Il est également impliqué dans le métabolisme des glucides, des lipides et de la vitamine D. De plus, le foie collabore avec le système immunitaire pour éliminer les cellules infectées et les substances nocives pour l'organisme.

Cependant, lorsque le foie subit une agression provoquant une inflammation et la dégénération ou la nécrose des hépatocytes, une fibrose hépatique peut se mettre en place. La fibrose correspond au remplacement du parenchyme hépatique détruit par des tissus fibreux (accumulation de matrice extracellulaire, collagène). Cette fibrose peut progresser et évoluer ensuite vers une cirrhose. En effet, la destruction des hépatocytes et la régénération en continu favorisent le développement de cirrhose.

Différents acteurs interviennent dans le développement de la fibrose : les différentes cellules du foie, les cytokines et les ARNmi (les micro-ARN interférants) [Zhou *et al.*, 2014]

Le foie est composé de cellules parenchymateuses que sont les hépatocytes (80 % des cellules du foie) et des cellules non parenchymateuses représentées par les cellules endothéliales sinusoidales du foie, les cellules de Kupffer et les cellules stellaires hépatiques [Ait-Goughoulte *et al.*, 2010 ; Zhou *et al.*, 2014]. Les hépatocytes sont ciblés par les agents toxiques. Lors d'une maladie chronique, ces cellules vont être sujettes à l'apoptose et vont être ciblées par la régénération compensatoire des hépatocytes lorsqu'une quantité importante de cellules est détruite. Lorsque des dommages sont causés sur les hépatocytes, des molécules réactives à l'oxygène et des médiateurs de la fibrogenèse sont libérés et vont favoriser l'activation des cellules stellaires. Les cellules stellaires sont localisées dans l'espace de Dissé au niveau du foie. Elles jouent un rôle de stockage de la vitamine A et de l'acide rétinoïque [Zhou *et al.*, 2014]. Cependant, lors d'une agression importante au niveau du foie (destruction de nombreux hépatocytes) ou l'exposition du foie à certaines cytokines comme le TGF- β , le TNF α et l'IL-1, les cellules stellaires, à l'état de repos, vont s'activer, proliférer et migrer. Elles vont également acquérir des capacités myofibroblastiques responsables d'une synthèse importante de collagène et de matrice extracellulaire favorisant le développement de fibrose [Zhou *et al.*, 2014]. Les cellules endothéliales sinusoidales constituent les fenestrations à la surface de l'endothélium du foie. Ces cellules jouent le rôle de filtre et facilitent les échanges entre le sang et le parenchyme [Zhou *et al.*, 2014]. Lors de dommages tissulaires hépatiques, le nombre de fenêtres est réduit et les sinusoides se transforment progressivement en capillaires continus [Zhou *et al.*, 2014]. Ces phénomènes vont réduire les échanges de substrats dans le foie et déréguler les fonctions

hépatiques. De plus, ils vont favoriser la production d'IL-33 impliquée dans l'activation des cellules stellaires [Marvie *et al.*, 2010 ; Zhou *et al.*, 2014]. Ces différents facteurs vont être également responsables du développement d'une fibrose hépatique. Les cellules de Kupffer, quant à elles, sont des macrophages localisés dans les parois de revêtement des sinusoides du foie qui vont intervenir dans les mécanismes de phagocytose. Ils sont activés par différents facteurs nocifs pour le foie comme les infections virales. Lors de leur activation, les cellules de Kupffer vont détruire les hépatocytes via la production de médiateurs solubles nocifs. Ainsi, l'inflammation hépatique et les lésions hépatiques sont aggravées. Les cellules de Kupffer sont des cellules présentatrices d'antigènes [Zhou *et al.*, 2014]. Il a été montré sur des cellules de rats que les cellules de Kupffer pouvaient également activer les cellules stellaires via l'expression des cytokines PDGF (« Platelet-derived growth factor ») et TGF- β responsables d'une augmentation de la production de matrice extracellulaire et de collagène [Friedman et Arthur, 1989 ; Matsuoka et Tsukamoto, 1990 ; Zhou *et al.*, 2014].

Ainsi, comme nous venons de le voir, les cytokines, libérées lors de l'inflammation du foie, jouent également un rôle important dans le développement de la fibrose. Elles activent les cellules stellaires et la production de matrices extracellulaires et peuvent inhiber l'activité de certaines enzymes comme la collagénase pour limiter la dégradation de cette matrice. La cytokine PDGF est produite par les cellules de Kupffer face à différents facteurs comme l'infection par un virus. La cytokine TGF- β est synthétisée par toutes les cellules du foie. Le TNF α présente une activité pro-inflammatoire. Il est produit par les cellules de Kupffer et les cellules stellaires. Les interleukines IL-1, IL-17 sont produites par les cellules de Kupffer ou les cellules sinusoidales du foie. Par ailleurs, l'IL-17 est impliquée dans la régulation positive de TNF α , TGF- β 1 et du collagène 1 α chez la souris [Hara *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2014].

D'autres cytokines permettent de limiter le développement de fibrose. En effet, l'interféron est une molécule de signalisation soluble libérée dans le milieu extracellulaire en réponse à une infection ou un antigène. Cette cytokine est impliquée dans l'inactivation et l'apoptose des cellules stellaires ainsi que la diminution de la production de matrice extracellulaire et de collagène via l'inhibition de TGF- β et PDGF [Baroni *et al.*, 1996 ; Ogawa *et al.*, 2009 ; Rao *et al.*, 2010]. Les interleukines IL-10, IL-22 et IL-6 peuvent moduler la fibrogenèse en régulant négativement les réponses pro-inflammatoire, en atténuant l'apoptose des cellules hépatocytaires, en favorisant la régénération des hépatocytes, en régulant négativement l'activation des cellules stellaires ou encore en favorisant la sénescence des cellules stellaires [Zhou *et al.*, 2014].

Les ARNmi sont également impliqués dans le développement de la fibrose. Ce sont des petits ARN non codants qui vont contrôler la traduction et la transcription de plusieurs gènes. Ils peuvent présenter une activité favorisant ou inhibant le développement de la fibrose selon le contexte et la

nature des stimuli. Par exemple, chez le rat, l'ARN miR21 régule négativement l'expression TGF- β et inhibe l'activation des cellules stellaires [Zhang *et al.*, 2013b]. Les ARN miR150 et miR194 inhibent l'activation des cellules stellaires et la production de matrice extracellulaire via l'inhibition de l'expression de c-myb (retrouvé sur les cellules stellaires activées) et rac 1 (impliqué dans la prolifération et l'activation des cellules stellaires) [Venugopal *et al.*, 2010]. L'ARN miR181, quant à lui, est induit par la cytokine TGF- β 1 et favorise la prolifération des cellules stellaires [Wang *et al.*, 2012a].

3.4. L'hépatite B et le développement de carcinome hépatocellulaire

L'activation exacerbée et inefficace de l'immunité (plus particulièrement les lymphocytes spécifiques du VHB) favorise une inflammation chronique au niveau du foie responsable du développement d'un carcinome hépatocellulaire [Chisari *et al.*, 2010]. Les protéines virales du VHB sont également impliquées dans le développement de la maladie et plus particulièrement l'hépatocarcinogénèse.

En effet, divers facteurs interviennent dans le développement de la tumorigénèse : l'inflammation et la régénération du foie, les mutations dans le génome viral, les propriétés oncogènes des protéines du VHB (protéines X et protéines préS/S) et l'intégration du génome viral dans le génome de l'hôte [Li *et al.*, 2016]. Des facteurs génétiques et environnementaux prédisposent également au développement de CHC (alcool, syndrome métabolique) lors d'une infection par le VHB (Figure 31) [Levrero et Zucman-Rossi, 2016].

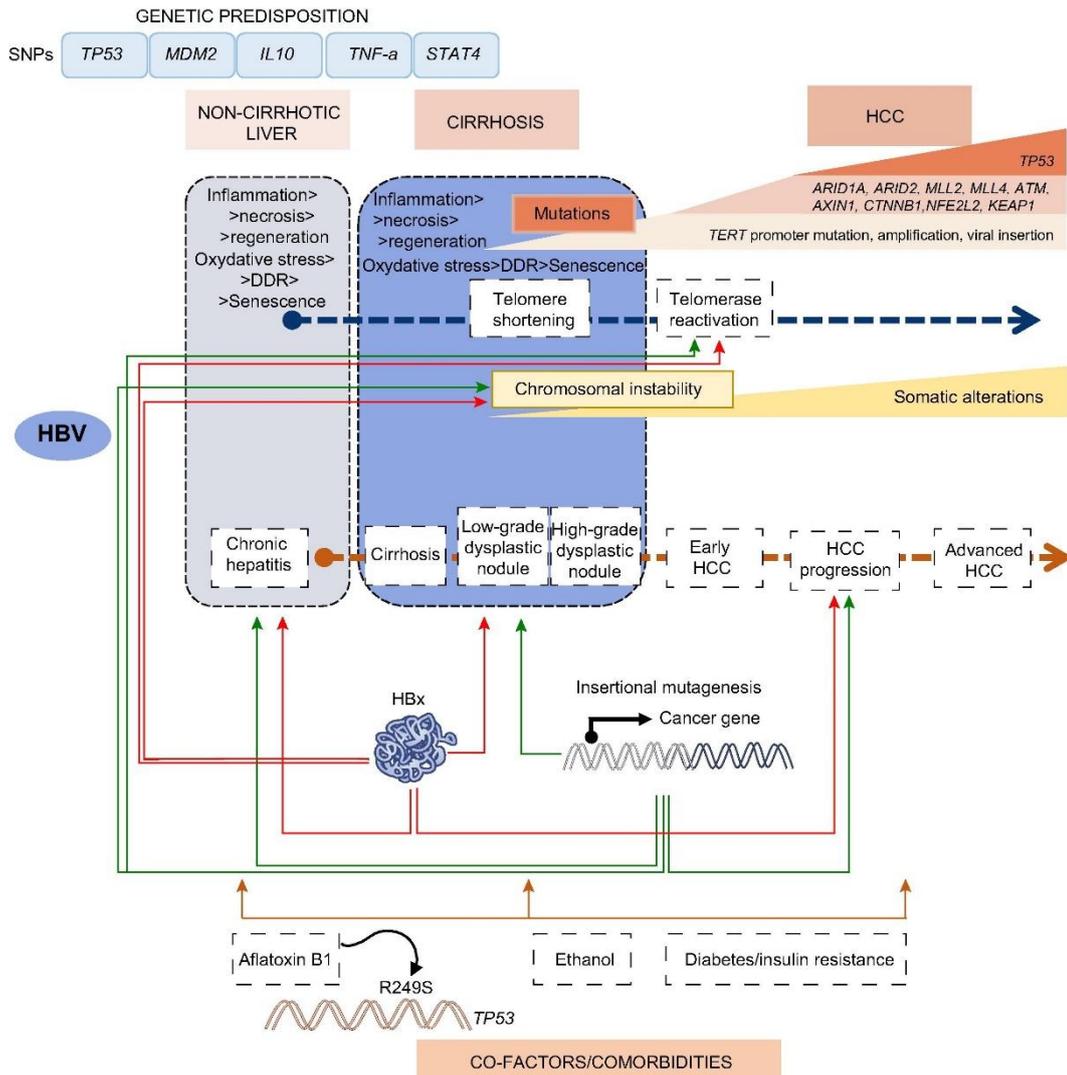


Figure 31 : Schématisation des divers facteurs pouvant être impliqués dans le développement et la progression du carcinome hépatocellulaire lié à l'infection par le virus de l'hépatite B (interaction entre le virus et l'hôte, prédispositions génétiques, facteurs environnementaux) [Levrero et Zucman-Rossi, 2016].

Nous nous concentrerons sur les protéines d'enveloppe et leurs effets pro-oncogènes. Les protéines d'enveloppe mutées sont également considérées comme des oncoprotéines [Li *et al.*, 2016]. Les gènes préS/S codent un activateur transcriptionnel potentiellement impliqué dans les propriétés de transformation des cellules [Li *et al.*, 2016]. En effet, les protéines d'enveloppe peuvent activer la voie de signalisation c-Raf-1/MAP1 (« Mitogen-activated protein »)-kinase dépendante de la protéine kinase C qui est engagée dans la prolifération des hépatocytes [Hildt *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 2016]. Les protéines tronquées en Cter de LHBs et MHBs sont également impliquées dans le développement de CHC. Par exemple, les protéines tronquées MHBs peuvent stimuler le promoteur de gènes oncogéniques tels que c-myc et c-fos [Li *et al.*, 2016]. De plus, les protéines MHBs tronquées en position s112 sur le gène S ont également été associées au développement de CHC en interagissant avec des protéines impliquées dans l'oncogenèse telle que l'« Adenosine diphosphate-ribosylation factor 1 » (ARF-1) qui serait engagée dans les voies de signalisation associées à la

réparation de l'ADN, la prolifération et la transformation maligne des cellules [Li *et al.*, 2016]. Une étude réalisée par Lee *et al.* (2015), a montré que la mutation W4P sur les protéines LHBs de patients infectés par le génotype C favorisait le développement de CHC chez les souris mâles associé à une augmentation de la production des IL-6 impliquées dans la capacité de prolifération des cellules. Ce mécanisme est dépendant du sexe. En effet, les œstrogènes produits par les femelles limiteraient la libération d'IL-6 et diminueraient le risque de développer un CHC avec cette mutation [Lee *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2015a]. L'étude de Salpini *et al.*, 2017 a mis en évidence de nouvelles mutations associées au développement de CHC : les mutations sP203Q et sS210R présentent sur le gène S. Ces mutations sont localisées dans le domaine transmembranaire en Cter des protéines d'enveloppe du VHB, dans une région importante pour la sécrétion de l'AgHBs. Ainsi, ces mutations empêchent la sécrétion de l'AgHBs et favorisent la prolifération des cellules [Salpini *et al.*, 2017]. En effet, les mutations sP203Q et sP203Q/S210R augmentent le pourcentage des cellules en phase S (phase de réplication de l'ADN) et favorisent la progression du cycle cellulaire. La mutation sS210R seule augmente le nombre de cellules en phase G2/M et favorise la prolifération des cellules [Salpini *et al.*, 2017]. Par ailleurs, la mutation rtA181T conduit à la production d'une protéine tronquée en position s172 du gène S [Levero et Zucman-Rossi, 2016 ; Li *et al.*, 2016 ; Wang et Tang, 2016]. Cette mutation est associée au développement de CHC et serait impliquée dans la régulation de l'activation du gène c-myc jouant un rôle dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et la transformation des cellules [Li *et al.*, 2016]. Les mutations retrouvées dans préS, et plus particulièrement dans préS2, jouent un rôle important dans le développement de stress au niveau du réticulum endoplasmique et contribuent au développement de CHC [Li *et al.*, 2016]. L'accumulation des AgHBs dans le réticulum endoplasmique (RE), induit un stress oxydant qui favorise les dommages sur l'ADN. Les mutations dans préS1 favoriseraient plutôt l'activation de gènes tels que TGF- α . Ce dernier est un facteur de croissance impliqué dans les voies de signalisation pour la prolifération, la différenciation et le développement des cellules [Li *et al.*, 2016]. Les mutants préS1 sont également impliqués dans l'activation de protéines chaperonnes engagées dans les processus de réponses au stress au niveau du réticulum endoplasmique, l'activation de la cyclooxygénase-2 et des cytokines pro-inflammatoires. Ils peuvent également être impliqués dans l'activation des intermédiaires du stress oxydatif [Li *et al.*, 2016]. Récemment, une étude réalisée par Liu *et al.* (2017b), a montré que préS1 serait impliqué dans l'apparition et l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses durant le développement des CHC [Liu *et al.*, 2017b].

Les mutations dans pré2 s'accumulent au niveau du RE et activent les voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress au niveau du réticulum endoplasmique : la voie VEGF (« Vascular endothelial growth factor »)/Akt (« Protein kinase B »)/mTOR (« mammalian target of rapamycin ») et NF κ B/COX (cyclo-oxygénase)-2. L'activation de ces voies de signalisation favorise

l'instabilité du génome de l'hôte, la transformation des cellules et le développement de CHC. Les protéines mutées en préS2 sont impliquées dans la croissance des cellules transformées GGH. Elles activent certaines voies de signalisation engagées dans la progression du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire [Li *et al.*, 2016]. En effet, les mutations dans préS2 favorisent la dégradation de la « Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27 » (protéine inhibitrice du cycle cellulaire) par l'activation de la voie « c-Jun Activation Domain-Binding Protein 1 » [Hsieh *et al.*, 2007]. Les cellules GGH sont des cellules parenchymateuses du foie dont le cytoplasme est modifié par l'accumulation des protéines d'enveloppe du VHB ou par certains médicaments. Les cellules GGH présentant des mutations dans préS2 sont prédictives du développement CHC [Su *et al.*, 2014]. Les protéines préS2/S tronquées sont impliquées dans l'activation de la voie de signalisation MAPK (« Mitogen-activated protein kinase »). Cette voie active des facteurs de transcription comme AP-1 (protéine activatrice, « Activator protein ») et NFκB et favorise la prolifération anormale des cellules [Wang *et al.*, 2017]. Les protéines préS2 interagissent également avec le promoteur hTERT (« human Telomerase reverse transcriptase ») et augmentent l'activité des télomérases favorisant la survie des cellules [Wang *et al.*, 2017]. De plus, les protéines S tronquées en position 95, 182 et 216 sont impliquées dans la prolifération du cycle cellulaire et la transformation des cellules [Li *et al.*, 2016 ; Wang et Tang, 2016]. Par ailleurs, l'étude de Zhang *et al.* (2017) a montré que les délétions dans la région préS et les mutations observées au niveau des positions 4, 27 et 167 (génotype C) étaient plus souvent observées chez les patients développant un CHC [Zhang *et al.*, 2017b]. Les protéines mutées, observées lors d'une infection occulte, peuvent également contribuer à la transformation des cellules conduisant au développement de CHC [Li *et al.*, 2016].

4. La prévention et les traitements contre le virus de l'hépatite B

4.1. La prévention de l'infection par le VHB : les vaccins

Afin de prévenir l'infection par le VHB, un vaccin est disponible depuis 1982. Les vaccins actuels sont efficaces à 95 % pour prévenir l'infection [OMS, 2017]. Dans le monde, la vaccination dès le plus jeune âge a permis de réduire la prévalence de l'infection par le VHB chez les enfants de moins de cinq ans à 1,5 % en 2015 comparé à 8 – 15 % avant l'accès à la vaccination [OMS, 2017]. Cependant, à cause des polémiques sur les effets secondaires provoqués par ce vaccin (sclérose en plaques), le vaccin n'est pas suffisamment appliqué [OMS, 2017].

Les vaccins utilisés actuellement sont très immunogènes. Le taux d'anticorps minimal permettant de protéger contre le virus a été fixé à 10 mUI/mL pour tous les individus quel que soit l'âge de l'individu, sauf pour les professionnels de santé pour qui le seuil de protection est fixé à 100 mUI/mL, selon le ministère de la Santé. Lors de la contamination accidentelle d'une personne

non immunisée et chez les nouveau-nés d'une mère infectée par le VHB, l'immunisation passive par injection d'immunoglobulines humaines spécifiques (HBIG) anti-HBs est préconisée en association avec la vaccination [EASL, 2017].

La première génération de vaccins était d'origine plasmatique (années 1970) : Hepatavax-B® (Merck & Co.), Hevac B® (Pasteur), KGC® (Korea Green Cross) [Shouval *et al.*, 2015]. Par la suite, les vaccins de seconde génération, produits par génie génétique sur des levures, ont remplacé ces vaccins. Le vaccin Engerix-B® (GSK, Belgique) est largement utilisé en Europe et dans le monde entier. Ce vaccin contient les petites protéines d'enveloppe SHBs de sérotype adw2. Ce vaccin est inactivé, produit à partir de levure *Saccharomyces cerevisiae* [Shouval *et al.*, 2015]. Le vaccin HBVaxPro® est également un vaccin recombinant inactivé contenant des protéines SHBs purifiées. Il est utilisé essentiellement chez les nouveau-nés. Le vaccin RECOMBIVAX® HB (Merck & Co., USA) repose également sur l'utilisation des protéines SHBs du VHB [Shouval *et al.*, 2015]. Les vaccins recombinants dérivés de levure ont démontré leur efficacité et leur sécurité en terme de prévention de l'hépatite B avec une réduction du taux de portage de l'AgHBs et une diminution de l'incidence des CHC [Shouval *et al.*, 2015]. Cependant, chez certains groupes de patients spécifiques, différents facteurs peuvent affecter la réactivité à cette vaccination comme : l'âge avancé, l'insuffisance rénale, les cancers, l'infection par le VIH et l'immunosuppression. Des études ont montré que la non-réactivité à l'immunisation par la petite protéine de surface SHBs pouvait être compensée par l'utilisation de vaccin ciblant également la région préS [Shouval *et al.*, 2015]. En effet, la vaccination avec des protéines MHBs induit une réponse en anticorps anti-HBs plus forte et permet également de produire des anticorps anti-préS2. De plus, l'immunisation avec les trois protéines d'enveloppe du VHB pourrait réduire l'apparition de mutations d'échappement au sein du gène S [Shouval *et al.*, 2015 ; Fedorowicz-Stronska *et al.*, 2016].

Ainsi de nouveaux vaccins recombinés sur des cellules de mammifères et contenant les épitopes des gènes préS/S ont été développés comme le vaccin Sci-B-Vac™ (BioHepB®) et le vaccin Gen Hevac B (Pasteur®). Ce dernier contenait une suspension purifiée et inactivée de protéines SHBs et MHBs dérivée de cellules de mammifères [Momméja-Marin *et al.*, 1999], mais sa commercialisation a été arrêtée à la fin de l'année 2016 (raison non divulguée).

Le vaccin Sci-B-Vac™ (BioHepB®), est un vaccin mimant les protéines LHBs, MHBs et SHBs du VHB. C'est un vaccin recombinant dérivé de cellules de mammifères (ovaires de hamster chinois). Les cellules sont transfectées avec un plasmide codant les gènes préS1, préS2 et S et les protéines produites sont purifiées à partir du milieu de culture (pureté 99 %) [Madalinski *et al.*, 2004]. Ce vaccin a été développé à partir du sérotype adw2 et du VHB de génotype A [Madalinski *et al.*, 2004]. Des études réalisées sur souris Balb/c ont montré que le titre en anticorps et le taux de séroconversion étaient significativement plus élevés chez les animaux immunisés avec le vaccin Sci-B-

Vac™ comparés aux vaccins recombinés produits sur la levure comme Engerix B® [Shouval *et al.*, 2015]. Chez l'homme, ce vaccin a montré une immunogénicité accrue, un taux de séroprotection plus rapide (70 % chez les patients vaccinés par Sci-B-Vac™ contre 25 % chez les patients vaccinés par Engerix B® six mois après une dose de vaccin) et plus élevée que les vaccins dérivés de levures [Shouval *et al.*, 2015]. Ce vaccin nécessite aussi moins de doses pour protéger les patients contre le VHB que les vaccins dérivés de levures [Shouval *et al.*, 2015]. Ce vaccin pourrait donc être utilisé chez les groupes de patients spécifiques ne répondant pas aux vaccins de seconde génération.

Il existe également d'autres vaccins qui sont actuellement en développement. Par exemple, le vaccin GeneVac-B® en Inde, contenant des AgHBs purifiés, est utilisé pour immuniser les enfants nés d'une mère présentant des AgHBs positifs [Velu *et al.*, 2017]. Ce vaccin a montré des résultats comparables au vaccin Engerix B® en matière de réduction de l'incidence de l'infection par le VHB chez ces enfants lorsqu'une première injection est réalisée 24 heures après la naissance. L'avantage du vaccin GeneVac-B® est le coût plus faible de la vaccination dans un pays en développement et qui pourrait ainsi faciliter l'immunisation universelle [Velu *et al.*, 2017].

Une étude originale réalisée par le Dr. Pniewski a consisté à produire des protéines d'enveloppe du VHB (LHBs, MHBs et SHBs) dérivées de plantes comme la laitue [Fedorowicz-Stronska *et al.*, 2016 ; Pniewski *et al.*, 2017]. Les plantes sont des bioréacteurs efficaces pour produire des antigènes dans leur forme native qui vont être capables d'induire une réponse immunitaire efficace. Les avantages de la production de protéines par l'intermédiaire des plantes sont : la production de protéines sous leur forme native et active biologiquement et la possibilité d'une vaccination sans douleur, sûre, simple et autonome par voie orale, le stockage et la distribution facilités et le coût de production moins élevé. Les études réalisées par Fedorowicz-Stronska *et al.*, (2016) ont montré que les protéines SHBs et MHBs dérivées de plantes permettaient de produire des anticorps à des titres élevés (100 mUI/mL) lorsqu'elles étaient injectées en intramusculaire chez des souris Balb/c. Ces résultats étaient comparables à ceux du vaccin Engerix B® et ne nécessitaient que des faibles doses de vaccins (0,1 – 0,3 µg contre 0,5 à 2 µg pour Engerix B®). Par ailleurs, les vaccins à base de plantes ne nécessitent pas d'adjuvant pour booster l'immunisation. Ainsi, les protéines SHBs et MHBs dérivées de plantes et purifiées pourraient limiter le nombre d'injections de vaccin par voie parentérale et réduire le coût de production.

De plus, des recherches ont été réalisées pour produire un vaccin oral. La production de vaccin oral dépend de la quantité de protéines d'intérêt dans le matériel utilisé. L'équipe de Pniewski *et al.*, (2017) a mis au point un protocole de micropropagation pour des lignées transgéniques de laitue permettant de produire en grande quantité des protéines d'enveloppe du VHB. Ainsi, les feuilles de laitue contenant les protéines d'enveloppe du VHB pourraient être lyophilisées et stabilisées à long terme pour être utilisées comme vaccins oraux [Pniewski *et al.*, 2017].

4.2. Les traitements actuels utilisés contre le virus de l'hépatite B

Les objectifs des traitements anti-VHB sont d'améliorer la qualité de vie, la survie des patients infectés par le VHB et prévenir les diverses complications au niveau hépatique. Les traitements sont également utilisés pour prévenir la transmission périnatale du virus, éviter les réactivations et prévenir les manifestations extra-hépatiques du VHB [EASL, 2017]. Chez les patients présentant un CHC, les traitements sont utilisés pour supprimer la réplication virale, mais également prévenir la progression de la maladie [EASL, 2017]. Actuellement, il existe deux types de traitements utilisés contre le VHB : l'IFN α plus ou moins pégylé qui stimule la réponse immunitaire pour éliminer les cellules infectées et les analogues nucléos(t)idiques (NUCs) qui inhibent la réplication du VHB, diminuent l'activité histologique au niveau du foie et préviennent la propagation de l'infection [Grimm *et al.*, 2011 ; EASL, 2017]. Les NUCs sont des inhibiteurs compétitifs de la polymérase virale. Durant la réplication, les NUCs s'intègrent dans l'ADN du virus. Ils ne présentent pas de groupements hydroxyles et rendent impossible la liaison covalente avec le prochain nucléotide. Ils sont ainsi responsables de l'inhibition de la polymérisation du génome viral et par conséquent empêchent la réplication du VHB [Grimm *et al.*, 2011].

Actuellement, une charge virale indétectable, la perte de l'AgHBs avec ou sans l'apparition des anticorps anti-HBs sont considérés comme les marqueurs d'une réponse thérapeutique efficace. C'est le concept de la guérison fonctionnelle [Grimm *et al.*, 2011 ; Levrero *et al.*, 2016]. Cependant, cette guérison fonctionnelle n'est que très rarement observée : 1 à 3 % par an (3 – 7 % sans traitement, 3 – 16 % après deux à cinq ans de traitements sous NUCs ou IFN α -pégylé) [Heathcote *et al.*, 2011 ; Zoutendijk *et al.*, 2011 ; Buti *et al.*, 2015 ; Habersetzer *et al.*, 2015 ; EASL, 2017 ; Li *et al.*, 2017c].

Nous ne reviendrons pas sur les données classiques du traitement anti-VHB, mais nous nous concentrerons sur les nouvelles recommandations de l'EASL (2017) et sur les pistes d'innovation.

4.3. Les recommandations de traitements de l'EASL 2017

Selon les recommandations de l'EASL 2017, tous les patients présentant une infection chronique par le VHB doivent être traités quel que soit le statut AgHBe s'ils présentent ces trois paramètres :

- une quantité d'ADN du VHB supérieure à 2 000 UI/mL
- un taux d'ALAT et d'ASAT supérieur à 40 UI/mL
- une nécro-inflammation au niveau du foie ou une fibrose.

Il existe certaines exceptions. Les patients présentant une cirrhose doivent être traités si l'ADN est détectable dans le sérum. Les patients présentant une charge virale supérieure à

20 000 UI/mL et un taux d'ALAT et d'ASAT supérieur à 80 UI/mL doivent être traités quel que soit le score de fibrose. La mise en place de traitements est généralement préconisée lors de la phase d'hépatite chronique AgHBe positive et la phase d'hépatite chronique AgHBe négative.

Les NUCs présentent des avantages par rapport au traitement par IFN α -pégylé. En effet, la prise de médicaments est plus facile car elle se fait par voie orale. De plus, l'activité antivirale est plus importante que les traitements IFN α -pégylé [EASL, 2017]. L'Entécavir, le Ténofovir disoproxil fumarate (TDF) et le Ténofovir Alafenamide (TAF) doivent être utilisés en première ligne de traitement quelle que soit la sévérité de la maladie, car ils présentent une barrière génétique élevée. Les patients sous Ténofovir disoproxil fumarate doivent être suivis pour les maladies rénales (estimation de la filtration glomérulaire et du taux de phosphate dans le sérum) et osseuses (densitométrie osseuse). La combinaison de deux NUCs n'est pas recommandée, mais peut être envisagée chez les patients présentant une suppression virale incomplète durant un traitement à long terme par Entécavir (ETV) ou Ténofovir disoproxil fumarate (changement de traitements ou combinaison de deux molécules). Chez les patients sous traitement NUCs à long terme et/ou présentant une cirrhose, le développement de CHC doit être surveillé. En effet, l'Entécavir et le Ténofovir disoproxil fumarate augmentent la nécro-inflammation du foie et la fibrose et augmente l'incidence de CHC au long terme.

La décision d'arrêter le traitement est difficile à prendre pour les NUCs. L'EASL recommande l'arrêt du traitement par NUCs lorsque :

- l'ADN du VHB est supprimé à long terme et soutenue après 12 mois d'arrêt de traitement
- la perte de l'AgHBe est observée avec ou sans la séroconversion
- le taux d'ALAT et d'ASAT est normalisé
- la perte de l'AgHBs est observée avec ou sans la séroconversion

Chez les patients AgHBe positif présentant une séroconversion de l'AgHBe et une charge virale indétectable, mais ne présentant pas de cirrhose au niveau du foie, le traitement peut être arrêté après un an de traitement minimum, mais doit être surveillé attentivement. Chez les patients AgHBe négatif, l'arrêt de traitement ne peut être effectué qu'après trois ans de traitement minimums. Si le traitement est un échec, les traitements doivent être modifiés en privilégiant les NUCs présentant une barrière de résistance plus forte, tout en prenant en compte les résistances croisées (Figure 32, Tableau 8). Il faut également vérifier l'observance des traitements par le patient.

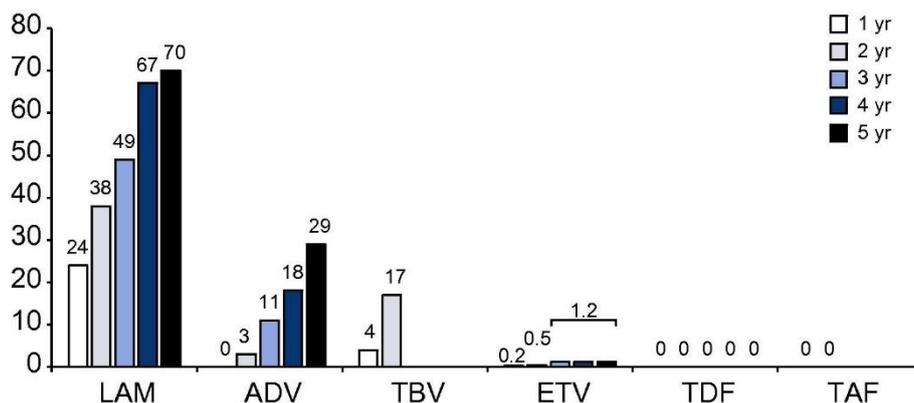


Figure 32 : Incidence cumulative des résistances associées aux traitements NUCs chez le virus de l'hépatite B sur un à cinq ans (LAM : Lamivudine, ADV : Adéfovir dipivoxil, TBV : Telbivudine, ETV : Entécavir, TDF : Ténofovir disoproxil fumarate, TAF : Ténofovir Alafenamide) [EASL, 2017].

Tableau 8 : Récapitulatif des résistances croisées pouvant exister entre les différents traitements NUCs qui sont utilisés pour traiter une infection par le virus de l'hépatite B (S : sensible, I : intermédiaire, diminution de la sensibilité, R : résistant, LAM : Lamivudine, ADV : Adéfovir dipivoxil, TBV : Telbivudine, ETV : Entécavir, TDF : Ténofovir disoproxil fumarate, TAF : Ténofovir Alafenamide) [EASL, 2017].

Variants VHB	LAM	LDT	ETV	ADV	TDF/TAF
Sauvage	S	S	S	S	S
rtM204V	R	S	I	I	S
rtM204I	R	R	I	I	S
rtL180M + rtM204V	R	R	I	I	S
rtA181T/V	I	I	S	R	I
rtN236T	S	S	S	R	I
rtL180M + rtM204V/I ± rtI169T ± rtV173L ± rtM250V	R	R	R	S	S
rtL180M + rtM204V/I ± rtT184G ± rtS202I/G	R	R	R	S	S

L'interféron est moins prescrit que les NUCs. Il peut être utilisé, tout de même, en première ligne de traitement chez les patients présentant des conséquences hépatiques faibles à modérées quel que soit le statut AgHBe. Le traitement dure généralement 48 semaines à raison d'une injection par semaine et peut-être étendu à 72 semaines chez les patients AgHBe négatif pour améliorer la réponse virologique soutenue si le médicament est bien toléré par le patient. Chez les patients traités par IFN α - pégylé, un suivi périodique des ALT, TSH (« Thyroid Stimulating Hormon »), ADN, AgHBs, l'AgHBe et les anticorps anti-HBe et du nombre de globules doit être réalisé pendant le traitement, mais également à long terme après le traitement pour éviter les rechutes et les effets indésirables sur la santé du patient. L'IFN α -pégylé est contre-indiqué chez les femmes enceintes et en cas de cirrhose décompensée [EASL, 2017]. En effet, il est associé à des effets secondaires hématologiques, un risque accru de décompensation hépatique lié au développement de poussée cytolytique et un risque infectieux liés à une neutropénie [EASL, 2017]. Les patients présentant un

haut risque de développer un CHC doivent être suivis au long terme même après arrêt du traitement et la perte de l'AgHBs. La combinaison des NUCs avec l'IFN α -pégylé n'est pas recommandée, mais peut-être envisagée au cas par cas chez les patients traités au long terme par les NUCs.

Voici quelques recommandations spécifiques de l'EASL pour certains groupes de patients.

Les patients présentant une hépatite B aigüe ne nécessitent pas de traitement. Cependant, les patients présentant une hépatite B aigüe sévère avec une coagulopathie et une infection aigüe prolongée doivent être traités par NUCs et la transplantation hépatique peut être envisagée.

Chez les enfants, l'infection chronique est souvent asymptomatique et ne nécessite pas de traitement. Cependant, dans certains cas elle nécessite la mise en place de traitement. L'Entécavir, le Ténofovir disoproxil fumarate, le Ténofovir Alafenamide (TAF) et l'IFN α - pégylé peuvent être utilisés.

Les personnels soignants exposés à un sérum présentant une charge virale supérieure à 200 UI/mL peuvent être traités préventivement par NUCs pour éviter le risque de transmission.

Chez les patients présentant une cirrhose décompensée, l'utilisation de NUCs avec une barrière génétique élevée est préconisée et la transplantation hépatique est envisagée [EASL, 2017].

Chez les femmes enceintes, la recherche de l'AgHBs doit être réalisée lors du premier trimestre de grossesse. La thérapie antivirale peut être retardée chez la femme qui envisage de procréer dans un avenir proche seulement si elle ne présente pas de fibrose avancée. Le Ténofovir disoproxil fumarate est recommandé chez les femmes enceintes. Chez les femmes enceintes présentant une charge virale supérieure à 20 000 UI/mL et présentant une quantité d'AgHBs supérieure à 4 log UI/mL, le Ténofovir disoproxil fumarate devrait être débuté aux semaines 24 ou 28 de la gestation et continué au moins douze semaines après l'accouchement. L'allaitement n'est pas contre-indiqué.

Tous les patients devant subir une chimiothérapie, une thérapie immunosuppressive, avec une transplantation rénale ou sous dialyse devrait être testés pour les marqueurs du VHB. Si ces patients présentent un AgHBs positif, les patients devraient être traités soit avec du Ténofovir disoproxil fumarate (pas pour les patients sous dialyse ou transplantation rénale), du Ténofovir Alafenamide ou de l'Entécavir.

Chez les patients devant subir une chimiothérapie ou une thérapie immunosuppressive, un traitement prophylactique contre le VHB est préconisé chez les patients AgHBs négatif et anti-HBc positif s'ils ont un risque de réactivation viral. Les patients anti-HBc positifs et AgHBs négatifs ayant subi une transplantation rénale doivent être surveillés.

Les patients présentant une infection VHB répliquative et des manifestations extra-hépatiques devraient recevoir un traitement NUCs, mais pas d'IFN α -pégylé.

Les traitements actuels permettent de supprimer la réplication du VHB, de diminuer le taux de progression vers la cirrhose et réduit l'incidence de CHC [Serigado *et al.*, 2017]. Cependant, les patients doivent être suivis à long terme, le taux de réponse et la durabilité de la réponse sont faibles. Les coûts engendrés par la thérapie à long terme sont élevés et la perte de l'AgHBs n'est que très rarement observée avec ces différents traitements [EASL, 2017]. De plus, la guérison n'est jamais totale car il existe toujours un réservoir d'ADNccc qui persiste dans le foie et qui peut réactiver à tout moment. De nombreuses études sont en cours afin d'élaborer de nouveaux traitements pouvant améliorer la perte de l'AgHBs et éliminer le pool d'ADNccc persistant. Ceci permettrait d'aboutir à la guérison complète du virus de l'hépatite B [Levrero *et al.*, 2016].

4.4. Les nouveaux traitements en développement

Différentes cibles thérapeutiques sont actuellement exploitées pour trouver de nouveaux traitement contre le VHB [Levrero *et al.*, 2016 ; Ko *et al.*, 2017] :

- l'entrée du virus dans les cellules (ex : Myrcludex B, Cyclosporine A)
- la production et la libération des protéines virales (ex : Replicor inhibant la libération des AgHBs, l'ARN interférant ARC-520)
- l'assemblage de la capsid (ex : NVR 3-778, AT-130, BAY-41-4109)
- la polymérase : les nouveaux analogues nucléos(t)idiques (ex : TAF, Besifovir, CMX157)
- l'ADNccc (ex : lymphotoxine β , la méthode CRISPR-Cas9)
- la restauration de l'immunité innée et adaptative : les immunomodulateurs (GS-9620 agoniste des TLRs, E6F6 vaccin thérapeutique, le Nivolumab inhibiteur PD-1/PD-L1).

Voici quelques exemples parmi les molécules actuellement en cours d'études.

4.4.1. Le Myrcludex B : l'inhibiteur d'entrée du virus de l'hépatite B

La recherche des récepteurs impliqués dans l'entrée du virus a permis de décrire un peptide acétylé dérivé des grandes protéines d'enveloppe du VHB (LHBs) capable de bloquer l'entrée du VHB *in vitro* et *in vivo* [Grimm *et al.*, 2011 ; Urban *et al.*, 2014]. Ce peptide synthétique recouvre les positions en acides aminés 2 – 48 du domaine prés1 de la protéine LHBs et prend en compte la séquence peptidique aa 9 – NPLGFFP – aa 15, essentielle à l'entrée du virus dans les cellules [Urban *et al.*, 2014 ; Blank *et al.*, 2017]. Depuis 2012, cette région de prés1 a été décrite par Yan *et al.* (2012), comme interagissant avec le récepteur NTCP essentiel à l'entrée du virus dans les cellules. Ce peptide inhibiteur a été nommé Myrcludex B et ses capacités antivirales ont été testées.

Les premiers résultats précliniques ont montré que le Myrcludex B était capable de bloquer efficacement l'infection du VHB *in vitro* (cellules de carcinome hépatocellulaire humain : HepaRG) et sur un modèle de souris humanisées (uPA-SCID greffée avec des hépatocytes humains) [Gripon *et al.*, 2005 ; Volz *et al.*, 2013]. Une diminution de la virémie, de l'ADNccc et du taux d'antigènes a été observée chez des souris humanisées. Le Myrcludex B a montré son efficacité contre la propagation du VHB [Volz *et al.*, 2013]. Par ailleurs, il est efficace à de faibles concentrations (de l'ordre du pico molaire) [Urban *et al.*, 2014].

Les premiers essais cliniques ont montré que le Myrcludex B présentait une faible toxicité, peu d'effets hors cible, pas de réactivité immunogénique et une bonne tolérance chez des volontaires sains. [Blank *et al.*, 2016]. Actuellement, le Myrcludex B est en phase clinique IIa/IIb. La première étude a été réalisée chez des patients co-infectés par le VHD. L'utilisation du Myrcludex B chez ces patients a permis de diminuer de façon conséquente la quantité d'ARN du VHD après 24 semaines de traitement et de normaliser le taux d'ALAT et d'ASAT au niveau du foie. La diminution de l'ADN du VHB était moins significative [Bogomolov *et al.*, 2016]. Néanmoins, la combinaison de Myrcludex B et IFN α -pégylé a mis en évidence des effets antiviraux synergiques sur l'ADN du VHB et l'ARN du VHD [Bogomolov *et al.*, 2016]. Le Myrcludex B doit être testé sur des patients mono-infectés par le VHB pour valider son efficacité [Serigado *et al.*, 2017].

4.4.2. Un ARN interférant ciblant l'ARNm du VHB: ARC-520 (Arrowhead)

L'ARN interférant (ARNi) est un petit ARN qui va s'hybrider avec un ARNm spécifique et le dégrader via le complexe Dicer/RISC. En effet, l'ARN double brin spécifique de l'ARNm à cibler est pris en charge par la protéine Dicer dans le cytoplasme des cellules. Cette protéine clive l'ARN double brin en ARN simple brin (ARNsi) et présente l'un des brins au complexe RISC (« RNA induced silencing complex »). Le brin d'ARNsi dirige le complexe RISC vers l'ARNm ciblé. Lorsque le brin ARNsi reconnaît par complémentarité l'ARNm ciblé, le complexe RISC clive l'ARNm et le dégrade (Figure 33). Ainsi, l'ARNm ciblé n'est plus traduit en protéines.

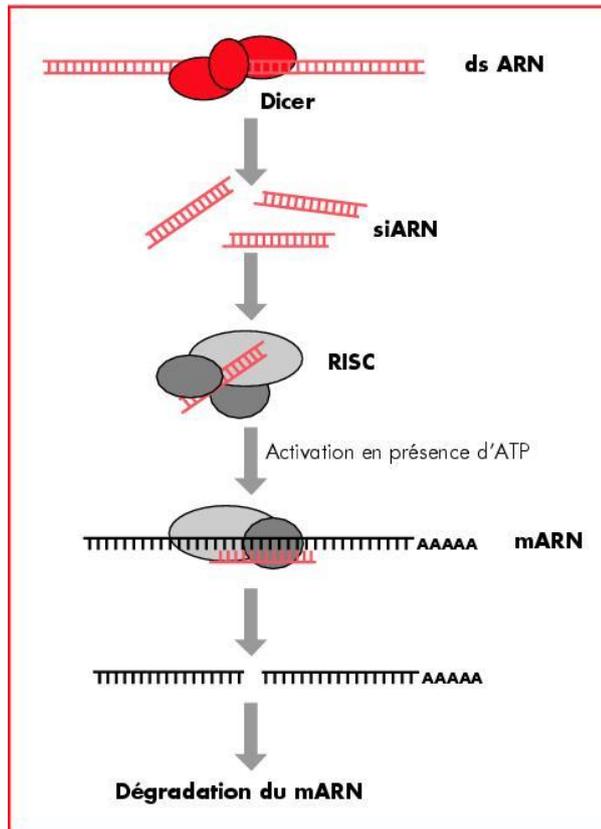


Figure 33 : Mécanisme d'action des ARN interférants [Chauchereau et Harel-Bellan, 2004].

Ce mécanisme est utilisé pour inhiber la production de certaines protéines. Les ARN interférants ont montré leurs potentiels en termes de réduction de la charge virale du VHB, de la quantité d'AgHBe, d'AgHBs et d'ADNccc *in vivo* et *in vitro* [Pei *et al.*, 2017 ; Serigado *et al.*, 2017]. L'ARNi ARC-520 cible l'ARNm du VHB. Des résultats précliniques réalisés sur des chimpanzés traités par NUCs avec ou sans ARC-520 ont mis en évidence une diminution significative de la quantité d'ADN du VHB (1,5 à 2,9 log), et de l'ADNccc (1,4 +/- 0,7 log) en présence d'ARC-520 [Yuen *et al.*, 2015 ; Pei *et al.*, 2017]. Des premiers essais cliniques ont été réalisés chez des volontaires sains. Cette molécule est bien tolérée. Actuellement, ARC-520 est en phase clinique II. Les premières études ont été réalisées chez des patients traités ou non par Entécavir. Chez les patients AgHBe positif, une diminution plus importante de l'AgHBe (- 1,2 log) et de l'AgHBcr (-0,9 log) a été observée par rapport à l'AgHBs (-0,2 log). Une meilleure réduction de l'AgHBs a été observée chez les patients naïfs de traitement Entécavir (réduction de l'AgHBs jusqu'à environ 1,5 log chez les patients AgHBe positif) [Yuen *et al.*, 2015]. Selon les informations de la firme Arrowhead, une réduction de l'AgHBs de plus de 3 log a pu être observée chez les patients ayant reçu plusieurs doses de ARC-520 en combinaison avec NUCs. Par ailleurs, chez la plupart des patients, une diminution de plusieurs log d'ADN du VHB jusqu'à des concentrations indétectables a été observée.

4.4.3. Les modulateurs d'assemblage de capsid

Les modulateurs d'assemblage de capsid interagissent avec les protéines core et interfèrent ou perturbent la formation de la capsid ou l'encapsidation de l'ARNpg [Cole *et al.*, 2016 ; Wilson *et al.*, 2016]. Il existe trois classes de modulateurs d'assemblage de capsid ciblant le génome du VHB : les composés heteroaryldihydropyrimidine (HAT), les phenylpropenamides et les benzamides sulfamoyl [Cole *et al.*, 2016 ; Wilson *et al.*, 2016 ; Serigado *et al.*, 2017].

Les heteroaryldihydropyrimidine induisent la formation de capsides agrégées et aberrantes. En effet, ces composés permettent d'accélérer le taux d'assemblage de la capsid et la quantité de capsides. Ils renforcent les interactions entre les dimères de protéines de capsid induisant un mauvais assemblage de la capsid (modification de la géométrie) [Cole *et al.*, 2016 ; Wilson *et al.*, 2016 ; Ko *et al.*, 2017 ; Serigado *et al.*, 2017]. Deux molécules sont actuellement étudiées dans cette famille : BAY-41-4109 et GSL-4. La molécule BAY-41-4109 a montré une diminution significative de la quantité d'ADN du VHB et de l'AgHBc sur différents modèles d'études : des cellules HepG2.2.15 transfectées de façon stable par le VHB, des souris transgéniques (per os) et des souris uPA-SCID transplantées avec un foie humain (diminution de la charge virale d'environ un log après cinq jours de traitement) [Weber *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2008 ; Brezillon *et al.*, 2011]. Cependant, des mutations de résistance face aux HAT sont apparues dans la protéine core (V124W) et la molécule s'avère toxique à des doses élevées sur des cellules primaires de foie humain [Cole *et al.*, 2016]. Une seconde molécule est actuellement en cours d'étude : la molécule GSL-4. Ce modulateur de capsid permet de diminuer la quantité d'ADN du VHB de façon similaire à BAY-41-4109. Il ne présente pas de toxicité à 25 µM comparé à BAY-41-4109 sur des cellules de foie humain. De plus, il est efficace à des doses plus faibles que BAY-41-4109 (EC₅₀ 12 nM vs. 50 nM) *in vitro* [Wang *et al.*, 2012b ; Cole, 2016]. Par ailleurs, ce composé est efficace contre les mutations de résistance associées à l'Adéfovir dipivoxil [Wang *et al.*, 2012b]. Les études cliniques sont envisagées actuellement.

Les phénylpropenamides favorisent l'assemblage précoce de capsides vides, sans matériel génétique du VHB [Cole *et al.*, 2016 ; Wilson *et al.*, 2016 ; Ko *et al.*, 2017 ; Serigado *et al.*, 2017]. Les représentants majeurs de cette classe de modulateur de capsid sont AT-61 et AT-130. La molécule AT-61 inhibe la réplication du VHB dans différents modèles cellulaires (HepAD38, HepAD79, HepG2.2.15, HepG2 infecté transitoirement). Cette molécule a ensuite été modifiée pour améliorer sa puissance (réduction EC₅₀) et réduire sa toxicité et ainsi former la molécule AT-130 [Pei *et al.*, 2017]. Le mécanisme d'action d'AT-130 a été décrit par Feld *et al.*, en 2007. La molécule AT-130 interagit avec les protéines chaperonnes des cellules et stabilise la polymérase de l'ARNpg du VHB. Ce mécanisme perturbe l'ARNpg et inhibe son encapsidation malgré la production de capsid normale [Feld *et al.*, 2007 ; Serigado *et al.*, 2017]. Ainsi, des capsides vides et non infectieuses sont

produites [Cole *et al.*, 2016]. Ces molécules sont efficaces également contre les virus présentant des mutations d'échappement à la Lamivudine [Delaney *et al.*, 2002]. Ces composés sont toujours en cours d'étude préclinique.

Les benzamide sulfamoyd présentent des propriétés proches des phénylpropénamides. En effet, ils présentent une même efficacité et sont responsables d'une mauvaise encapsidation de l'ARNpg [Cole *et al.*, 2016]. La molécule actuellement étudiée est NVR 3-778 (Novira). Cette molécule accélère le mauvais assemblage de la capsid et produit des capsides vides [Cole *et al.*, 2016 ; Pei *et al.*, 2017]. Les premiers essais précliniques *in vitro* ont montré que cette molécule était capable d'inhiber la réplication du VHB [Pei *et al.*, 2017]. Des essais précliniques sur des souris humanisées ont confirmé ces résultats. En effet, une étude réalisée chez des souris humanisées uPA-SCID a montré une diminution de l'ADN du VHB identique à l'Entécavir après six semaines de traitement [Klumpp *et al.*, 2015]. Par ailleurs, des effets synergiques avec l'IFN α -pégylé ont été observés. Une diminution de l'ADN du VHB jusqu'au seuil de détection a pu être observée chez ces souris humanisées [Klumpp *et al.*, 2015]. Actuellement, cette molécule, disponible per os, est en cours d'étude clinique (phase Ia/Ib). Les premiers résultats ont montré une bonne sécurité et tolérance du médicament chez des patients sains. Par ailleurs, une diminution de l'ADN du VHB (1,72 log UI/mL) et de l'ARN du VHB (0,86 log UI/mL) ont pu être observés chez des patients AgHBe positif (phase 1b : 28 jours de traitement, 600 mg/jour) [Yuen *et al.*, 2015].

Comme nous avons pu le voir avec ces exemples, les modulateurs d'assemblage de capsid permettent d'inhiber la réplication du virus et la production de particules virales tout comme les NUCs, mais ils peuvent également inhiber l'encapsidation du virus. Récemment, une étude a montré que les modulateurs de l'assemblage de la capsid inhibaient également la libération extracellulaire de l'ARN du VHB [Lam *et al.*, 2017]. Ces molécules pourraient être utilisées en combinaison avec d'autres molécules.

4.4.4. Les nouveaux inhibiteur potentiel de la polymérase

4.4.4.1. Le Ténofovir Alafenamide

L'utilisation de Ténofovir disoproxil fumarate est associée à l'apparition de lésions rénales aiguës et une diminution de la densité minérale des os [Scott et Chan, 2017 ; Wu *et al.*, 2017]. Pour limiter ces problèmes, la molécule de Ténofovir disoproxil fumarate a été modifiée : le Ténofovir Alafenamide (TAF, Vemlidy[®]). Le TAF est une prodrogue du Ténofovir disoproxil fumarate diphosphate. Cette molécule a été développée pour optimiser le potentiel antiviral et la sécurité clinique du Ténofovir disoproxil fumarate. En effet, cette molécule a été modifiée pour s'activer au niveau intracellulaire (contrairement au Ténofovir disoproxil fumarate qui peut être activé dans le

plasma) et peut réduire l'exposition systémique du Ténofovir disoproxil fumarate responsable, par exemple, des dysfonctionnements tubulaires au niveau du rein. L'utilisation du TAF permet d'éviter les effets néfastes sur le rein et les os. De plus, le TAF n'interagit pas avec les transporteurs au niveau des reins [Scott et Chan, 2017]. Le TAF présente une activité antivirale comparable au Ténofovir disoproxil fumarate. Aucune mutation de résistance aux traitements n'a été observée après 96 semaines de traitement [Scott et Chan, 2017]. Fait intéressant, le TAF améliore le taux d'ALAT et d'ASAT réduisant ainsi les dommages au niveau du foie. Le TAF est actuellement en phase III clinique. Après 96 semaines de traitement, le TAF est bien toléré et montre des résultats concluant sur la sécurité du rein et des os confrontés au Ténofovir disoproxil fumarate [Scott et Chan, 2017].

4.4.4.2. Le Besiclovir

Le besiclovir est un nouvel inhibiteur de la polymérase présentant une structure chimique proche de l'Adéfovir dipivoxil et le Ténofovir disoproxil fumarate. Ce traitement a fait des preuves chez des patients AgHBe positif avec une perte de l'ADN du VHB après 28 jours de traitement. Ce traitement était également actif chez les patients présentant des mutations de résistance associées à la Lamivudine [Yuen *et al.*, 2006]. Cette molécule a été comparée à l'Entécavir chez des patients AgHBe positif et négatif sous traitement pendant 48 semaines. Les taux d'ADN, le taux des transaminases et de séroconversion de l'AgHBe sont similaires entre ces deux traitements [Lai *et al.*, 2014]. Le Bésiclovir pourrait être utilisé comme alternative thérapeutique chez des patients ne répondant pas aux autres traitements et présentant des mutations de résistance. Ce traitement est actuellement en phase clinique III.

4.4.5. L'élimination de l'ADNccc

Les NUCs n'agissent pas ou peu sur l'élimination de l'ADNccc et l'ADN intégré [Grimm *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2017b]. L'élimination de l'ADNccc pourrait ainsi prévenir les réactivations du VHB et permettre une guérison complète du VHB [Levrero *et al.*, 2016].

Des études se sont concentrées directement sur l'élimination de l'ADNccc à l'aide de la technique CRISPR-Cas9. Cette méthode CRISPR (« Clustered regularly interspaced short palindromic repeats »)-Cas9 est basée sur un mécanisme de défense des bactéries contre les bactériophages. Cette méthode est de plus en plus utilisée pour éditer les gènes. Le complexe est simple à reprogrammer et peut-être délivré *in vitro* et *in vivo* [Li *et al.*, 2017b]. Le complexe CRISPR-Cas9 est formé d'une séquence ARN guide (plasmide) complémentaire de la séquence d'ADN à éliminer et d'une endonucléase d'ADN guidé par cet ARN : Cas9. Lorsque l'ADN cible dans la cellule est reconnu par le brin d'ARN guide, l'enzyme Cas 9 vient découper l'ADN complémentaire et n'importe quel fragment d'ADN peut être inséré à la place (Figure 34).

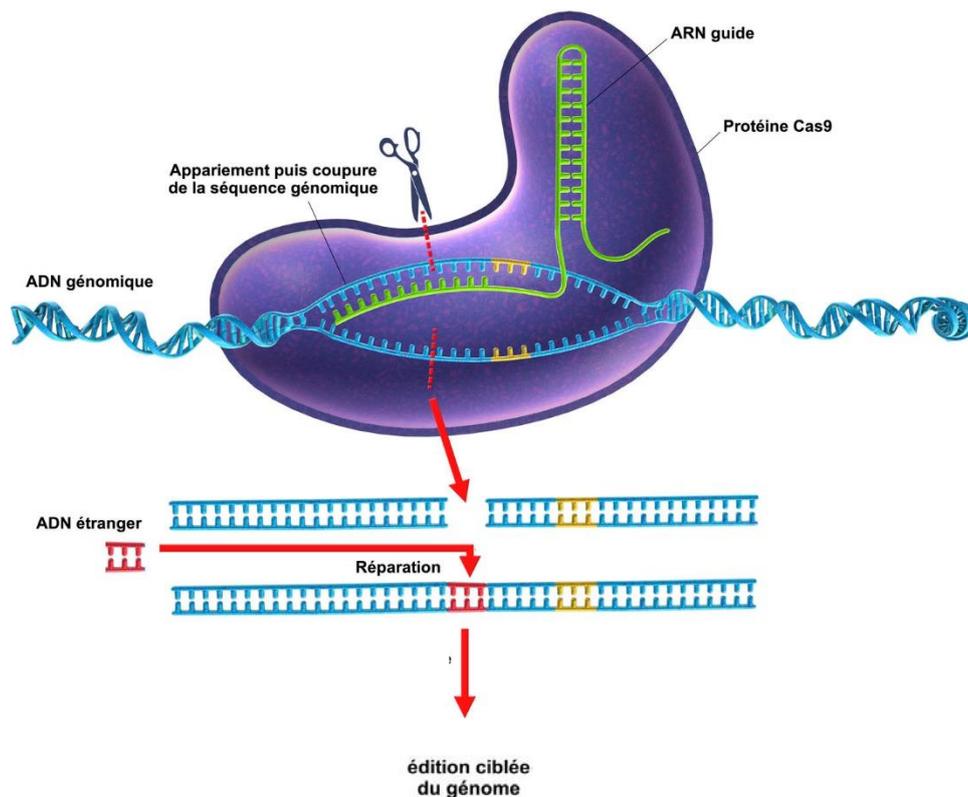


Figure 34 : Mécanisme d'édition du génome réalisé à l'aide du complexe CRISPR-Cas9 [lejournal.cnrs.fr].

Cette méthode a été détournée pour cibler directement l'ADNccc du VHB. Une inhibition efficace de la réplication virale et la suppression de l'accumulation de l'ADNccc du VHB ont pu être observées grâce à cette méthode [Dong *et al.*, 2015 ; Kennedy *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2015].

L'utilisation de cette méthode a également été élargie pour cibler l'ADN intégré dans le génome de l'hôte. Une étude réalisée récemment par Li *et al.* (2017b) a permis d'exciser complètement un fragment d'ADN de VHB (3 175 pb) intégré dans le génome d'une lignée cellulaire infectée de façon stable par le VHB (HepG2.A64) [Li *et al.*, 2017b]. Dans ces lignées cellulaires, l'ADNccc intracellulaire, l'ADN du VHB, l'AgHBs et l'AgHBe dans le surnageant restent en dessous des valeurs négatives après dix mois [Li *et al.*, 2017b].

Cette méthode prometteuse pourrait ainsi être utilisée pour favoriser la guérison complète des patients. Cependant, cette méthode présente un risque potentiel d'excision d'ADN hors cible et l'efficacité doit être optimisée (système dégradation/réparation, combinaisons d'ARN guide) [Ko *et al.*, 2017]. Ce complexe est toujours en cours d'études précliniques.

Les traitements ciblant la voie de signalisation APOBEC3 (« Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) peuvent être une approche pour éliminer l'ADNccc. En effet, APOBEC3 est une cytidine désaminase qui est utilisée dans l'édition de gène simple brin. Elle est responsable d'une désamination des cytosines (en uracile) en réponse à un ADN étranger. Les

différentes enzymes de cette famille (APOBEC3A et 3B principalement) peuvent dégrader l'ADNccc du VHB si elles sont activées. L'activation des lymphotoxine- β à l'aide d'agoniste permet de réguler positivement APOBEC3A et APOBEC3B et rend l'ADNccc sensible à la dégradation [Levero *et al.*, 2016 ; Ko *et al.*, 2017 ; Serigado *et al.*, 2017]. Des premiers essais précliniques sur des cellules infectées par le VHB, des cellules hépatocytes primaires humaines et des biopsies de foie ont montré que l'IFN α -pégylé combiné avec l'activation du récepteur de la lymphotoxin- β permettait de réguler positivement APOBEC3A et APOBEC3B et réduisait la quantité d'ADNccc [Lucifora *et al.*, 2014].

4.4.6. Quelques exemples d'immunomodulateurs potentiels

Pour restaurer la réponse immunitaire contre le VHB, différentes stratégies peuvent être envisagées (Figure 35) :

- restaurer l'immunité innée en favorisant la production de cytokines ou délivrer des cytokines directement en intrahépatique
- restaurer l'immunité adaptative en bloquant les signaux inhibant l'immunité ou délivrer des cellules T spécifiques du VHB ou des anticorps anti-VHB.

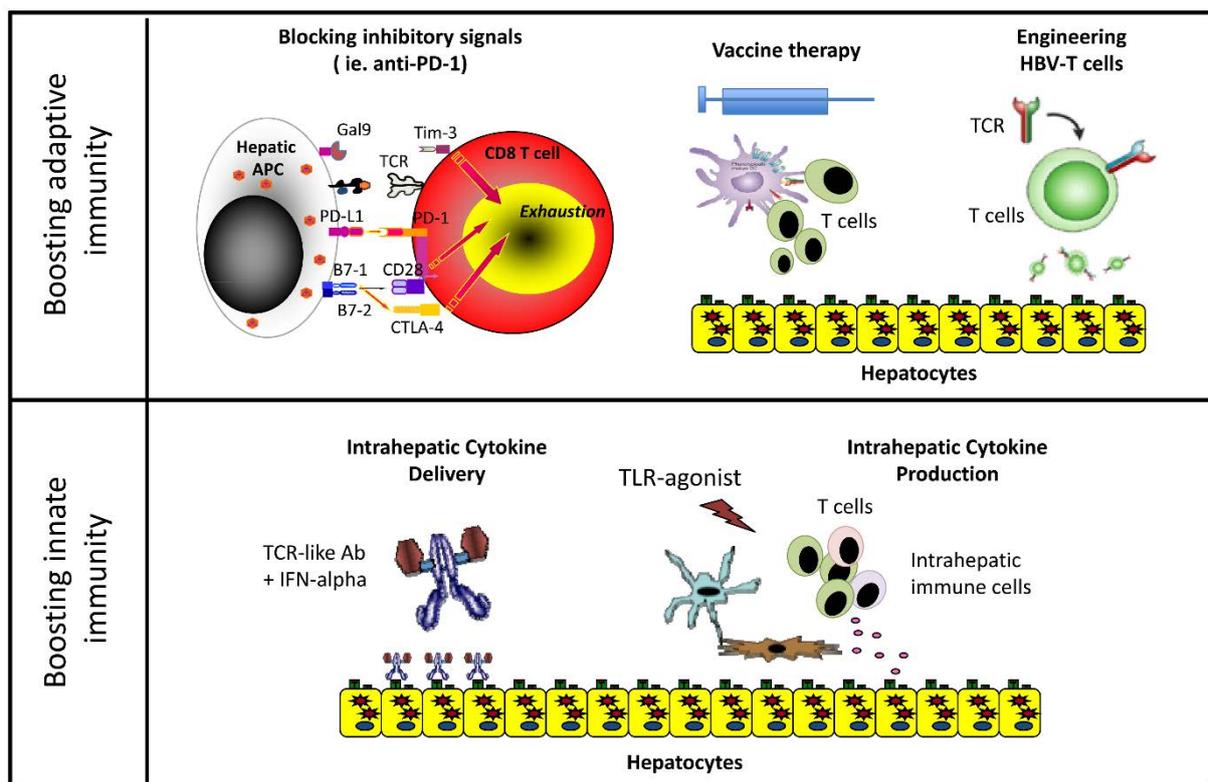


Figure 35 : Aperçu des différentes stratégies thérapeutiques pouvant être utilisées pour stimuler le système immunitaire contre le virus de l'hépatite B [Bertoletti et Gehring, 2013].

Voici quelques cibles potentielles pouvant aider à traiter les hépatites B.

Les TLRs jouent un rôle important dans la reconnaissance du virus et l'induction des réponses immunitaires. Cependant, lors d'une infection par le VHB, la signalisation des TLRs est régulée

négativement [Wilson *et al.*, 2016]. Ainsi, l'utilisation de molécules agonistes des TLRs pourrait être utilisée pour réactiver les réponses immunitaires induites par les TLRs. La molécule GS-9620 agoniste des TLR-7 a ainsi été étudiée. Les TLR-7 sont impliqués dans la production d'IFN α [Wilson *et al.*, 2016]. Les IFN α jouent un rôle important dans l'induction de la réponse immunitaire innée comme l'activation de gènes impliqués dans les résistances aux infections virales ou des cellules immunitaires impliquées dans l'élimination des cellules infectées comme les cellules NK et les macrophages. Une étude préclinique réalisée sur des chimpanzés a montré que l'administration orale de GS-9620 stimulait la production d'IFN α et d'autres cytokines et chimiokines capables de réduire l'ADN du VHB circulant de façon prolongée après quatre semaines de traitement [Lanford *et al.*, 2013]. D'autres études réalisées *in vitro* sur des cellules mononuclées du sang périphérique de patients sains ou de patients infectés chroniquement par le VHB ont montré que GS-9620 favorisait l'augmentation du marqueur CD69 sur les cellules «Natural Killer » et la cytotoxicité des NK contre les cellules HepG2 et les cellules primaires de foie humain, mais n'induisait pas la production de cytokine. Par ailleurs, GS-9620 augmente également l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ [Steuer *et al.*, 2015]. Les premiers essais cliniques réalisés chez les patients ont validé la sûreté du médicament en per os. Par ailleurs, l'utilisation de cette molécule a induit la production d'ISG-15 (« Interferon-stimulated gene »-15) impliqué dans l'élimination du pathogène, mais n'a pas induit la production significative d'IFN α systémique [Gane *et al.*, 2015]. Ainsi, GS-9620 permettrait d'éliminer le VHB principalement en activant l'activité cytolytique des cellules NK, des cellules CD8⁺ et des ISGs.

Des vaccins thérapeutiques sont également étudiés pour agir contre la persistance de l'infection par le VHB. Récemment, un nouvel anticorps E6F6 a été développé pour cibler l'AgHBs. L'anticorps monoclonal E6F6 cible un seul épitope de l'AgHBs localisé au niveau des acides aminés s119 à s125 de la protéine S du VHB. La fixation des anticorps sur cet épitope tolère les mutations d'échappement présentes aux alentours comme les mutations sG145R, sK141E et sD144A retrouvées couramment chez les patients infectés par le VHB [Gao *et al.*, 2017]. Chez des souris transgéniques modifiées génétiquement pour produire des AgHBs et AgHBs en grande quantité, l'anticorps E6F6 présente des effets thérapeutiques importants contrairement à d'autres épitopes testés (épitopes aa s124 – s137, aa s139 – s147 de la protéine S et aa 21 – 47 et 124 – 145 de la région préS) [Zhang *et al.*, 2016b]. En effet, il permet de supprimer le taux d'AgHBs et d'ADN du VHB de plus de 3 log pendant plusieurs semaines chez les souris [Gao *et al.*, 2017]. Ainsi, ces anticorps ont la capacité de neutraliser l'infection en bloquant l'entrée du virus dans les cellules, limitant ainsi sa propagation dans les cellules. Ces anticorps peuvent également stimuler les réponses immunitaires associées aux anticorps (augmentation de la présentation des antigènes et de la réponse des lymphocytes T) et favorisent la clairance virale [Gao *et al.*, 2017]. Les études cliniques n'ont pas encore été réalisées sur l'Homme [Gao *et al.*, 2017]. Au préalable, il serait nécessaire de mettre au point un cocktail

d'anticorps monoclonaux pour éviter l'apparition de mutations d'échappement [Gao *et al.*, 2017]. Actuellement, des recherches sont également réalisées sur des vaccins ciblant la polymérase du VHB pour essayer également d'éliminer totalement le VHB [Zheng *et al.*, 2017].

Le récepteur PD-1 (« programmed cell death protein 1 ») et les ligands associés (PD-L1) jouent un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire face au VHB. En effet, lors d'une infection chronique, l'exposition persistante des lymphocytes T aux antigènes viraux favorise l'apparition de lymphocytes T dysfonctionnelles (surtout sur les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques) qui sur-expriment PD-1 à leur surface. La fixation des ligands PD-L1 sur PD-1 favorise l'épuisement des lymphocytes T helper et cytotoxiques et inhibe les réponses immunitaires associées à ces cellules comme l'élimination des cellules infectées, l'inhibition de la production de cytokines contre le VHB et la production d'anticorps anti-VHB, ce qui favorise la persistance de l'infection par le VHB. Ainsi, l'inhibition de l'interaction des ligands sur ces récepteurs PD-1 favorise la ré-expansion des lymphocytes T cytotoxiques et conduit à la normalisation de la production de cytokine au niveau des cellules mononuclées du sang périphérique isolées de patients mono-infectés par le VHB ou co-infectés par le VIH et le VHB sous Adéfovir dipivoxil [Zhang *et al.*, 2011 ; Wilson *et al.*, 2016]. Le Nivolumab est un anticorps monoclonal humain de type IgG4 dirigé contre PD-1 généralement utilisé pour traiter les cancers (mélanome, cancer du rein). Il pourrait potentiellement être employé pour traiter des hépatites B chroniques. Des premiers essais cliniques sont actuellement réalisés chez des patients présentant un CHC associés à une infection par le VHB [Wilson *et al.*, 2016].

La combinaison de NUCs, d'inhibiteur de PD-1/PD-L1 et d'autres agents immunomodulateurs pourrait être utilisée comme une nouvelle stratégie pour traiter les infections par le VHB [Pei *et al.*, 2017].

VII. Les co-infections

1. La co-infection VHB/VHD

Le virus de l'hépatite Delta (VHD) est responsable du développement d'hépatites chroniques pouvant évoluer vers la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Le VHD touche environ 15 à 20 millions d'individus dans le monde, ce qui correspond à environ 5 % des patients infectés par le VHB [Alfaiate *et al.*, 2015 ; Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015 ; Sureau et Negro, 2015 ; OMS, 2016a]. Des foyers de forte endémicité ont été observés en Afrique et en Amérique du Sud avec une prévalence du VHD de 85 % chez des patients AgHBs positifs dans le bassin Amazonien. Les zones de moyenne endémicité sont localisées dans le bassin Méditerranéen et les zones de faible endémicité sont localisées en Europe du Nord et en Amérique du Nord (Figure 36).

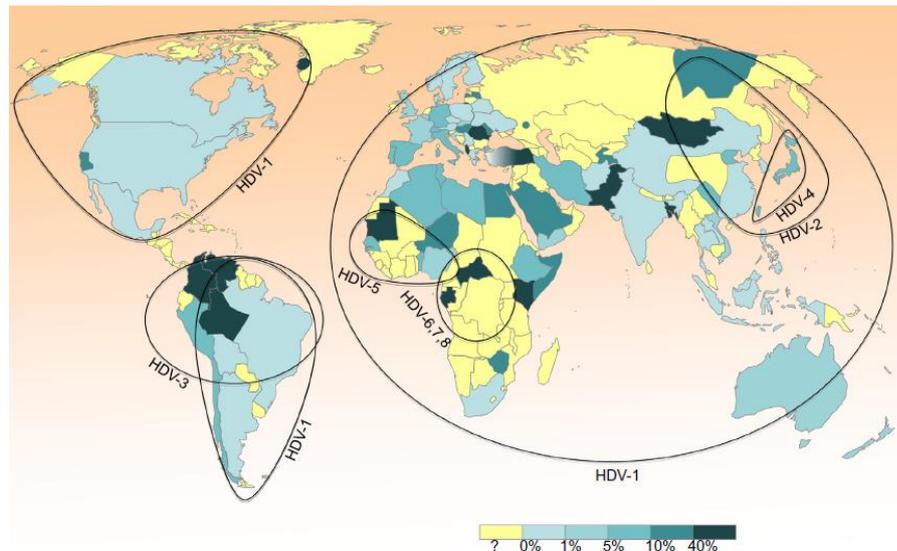


Figure 36 : Prévalence de l'infection par l'hépatite Delta parmi les porteurs du virus de l'hépatite B à travers le monde [Alfaiate et al., 2015].

La transmission du virus se fait généralement par voie parentérale ou sexuelle, mais rarement par transmission verticale [Rizzetto, 2015 ; OMS, 2016a]. Le contrôle de la répllication du VHB pendant ces deux dernières décennies a permis de diminuer la circulation du VHD dans les pays industrialisés [Rizzetto, 2015].

Ce virus a été découvert par Rizzetto *et al.*, en 1977. L'étude de biopsies de foie d'une cohorte de patients infectés par le VHB et présentant des hépatites sévères a permis de mettre en évidence ce nouvel antigène ne réagissant pas avec les antisérums ou anticorps dirigés contre les marqueurs du VHB (AgHBs, AgHBe et AgHBc). Ce nouvel antigène a ainsi été nommé antigène Delta (AgHD). En 1980, l'étude de l'AgHD chez le chimpanzé a permis d'observer une particule contenant de l'AgHBs et une molécule d'ARN : le virus de l'hépatite Delta [Rizzetto *et al.*, 1980]. Le VHD a par la suite été décrit comme un virus satellite naturel du VHB.

Le VHD est un petit virus à ARN simple brin négatif de 1 672 à 1 697 pb. La taille de ce virus est comprise entre 35 et 37 nm [Alfaiate *et al.*, 2015 ; Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015]. L'origine du VHD serait soit un viroïde de végétal (particule plus petite qu'un virus composé d'un ARN circulaire sans capsid) qui aurait évolué peut-être par recombinaison avec un ARNm humain, soit un dérivé de l'ARNpg du VHB qui aurait évolué par l'intermédiaire de l'épissage dans la cellule hôte [Taylor, 2014].

Le VHD est une particule virale défectueuse qui utilise l'enveloppe du VHB pour entrer et sortir des hépatocytes. Une infection productive et la propagation du virus se produisent uniquement dans les cellules infectées de manière concomitante par le virus de l'hépatite B : soit le VHB et le VHD infectent simultanément un même hôte, c'est une co-infection ; soit le VHD infecte un hôte déjà infecté chroniquement par le VHB, communément appelée surinfection [Alfaiate *et al.*, 2015]. La composition de l'enveloppe du VHD est identique à celle du VHB et la proportion des

protéines correspond aux particules sous-virales (SVP) du VHB [Alfaiate *et al.*, 2015]. Contrairement au VHB, seules les protéines SHBs sont essentielles à l'assemblage du virus. Cependant, les protéines LHs sont essentielles pour le pouvoir infectieux du virus (entrée dans les cellules) [Sureau *et al.*, 1993 ; Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015]. Il existe huit génotypes du VHD (1 – 8). Le génotype 1 est le plus commun et se retrouve en Europe, Amérique du Nord, Afrique du Nord, et Moyen Orient. Le génotype 2 est localisé plutôt au Moyen-Orient tandis que le génotype 3 se retrouve dans le Bassin Amazonien [Rizzetto, 2015]. Parmi les génotypes, le génotype 1 du VHD est associé à une maladie hépatique plus sévère que le VHD de génotype 2. Le génotype 3 est le génotype le plus agressif [Alfaiate *et al.*, 2015].

1.1. Le cycle répliatif du virus de l'hépatite Delta

Lors de sa réplication, le génome du VHD code un intermédiaire de réplication : l'ARN anti-génomique de polarité positive complémentaire du génome viral. Cet anti-génome est retrouvé à l'intérieur du noyau des cellules infectées. [Alfaiate *et al.*, 2015]. Une des ORF présente sur l'anti-génome code deux protéines structurales à l'aide de l'ADN polymérase cellulaire : l'AgHD-S (« small ») de 24 kDa et l'AgHD-L (« large ») de 27 kDa [Abbas *et al.*, 2015 ; Alfaiate *et al.*, 2015 ; Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015]. La différence entre ces deux protéines est une extension de 19 aa en Cter au niveau de l'AgHD-L [Alfaiate *et al.*, 2015 ; Sureau et Negro, 2015]. Ces deux isoformes forment l'Ag de l'hépatite Delta (AgHD). Cet antigène subit des modifications post-traductionnelles (phosphorylation sérine/thréonine, acétylation lysine, sumoylation lysine, méthylation arginine) qui sont importantes pour la progression du cycle viral [Alfaiate *et al.*, 2015]. Les deux protéines ont des rôles différents dans le cycle du virus et la pathogenèse du virus. La protéine AgHD-S est nécessaire pour l'initiation de la réplication de VHD, l'élongation et l'accumulation d'ARN du VHD durant le cycle [Alfaiate *et al.*, 2015]. La protéine AgHD-L, quant à elle, est essentielle pour l'assemblage du virus. En effet, cette protéine possède un signal de farnesylation en Cter (CXXX) qui lui permet d'interagir avec la protéine SHBs du VHB (Figure 37) [Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015]. La nature hydrophobe des acides aminés dans cette région favorise les interactions entre les deux virus [Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015]. L'AgHD s'associe à l'ARN du VHD et forme la ribonucléoprotéine [Alfaiate *et al.*, 2015]. Cette ribonucléoprotéine est importante pour l'assemblage du virion (enveloppement), mais également pour le transport de l'ARN du VHD du noyau au cytoplasme [Alfaiate *et al.*, 2015].

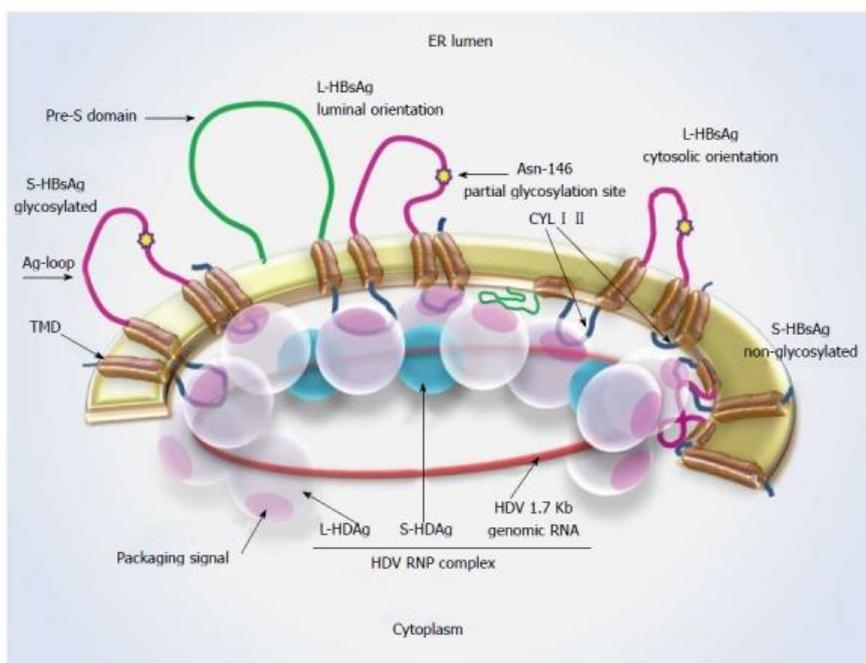


Figure 37 : Schématisation des ribonucléoprotéines de l'hépatite Delta interagissant avec l'enveloppe du virus de l'hépatite B [Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015].

Pour se propager, le VHD utilise le même mécanisme d'entrée dans les cellules que le VHB. Les étapes suivantes du cycle du VHD sont différentes de celui du VHB. L'internalisation du virus se fait par une étape d'endocytose clathrine dépendante [Alfaiate *et al.*, 2015]. Le transport des ribonucléoprotéines du cytoplasme vers le noyau met en jeu l'AgHD et les importines [Alfaiate *et al.*, 2015]. Le mécanisme de réplication du VHD fait intervenir un modèle de réplication en double cercle roulant et l'ARN polymérase II de la cellule hôte qui génère deux ARN circulaire (l'ARN génomique et l'ARN anti-génomique) ainsi que des transcrits linéaires multimériques intermédiaires [Alfaiate *et al.*, 2015 ; Sureau et Negro, 2015]. L'AgHD-S est important pour le recrutement de l'ARN polymérase II.

Lors de la réplication, l'anti-génome reste dans le noyau tandis que le génome du VHD peut se retrouver à l'intérieur du noyau pour le cycle de réplication ou dans le cytoplasme pour l'assemblage de nouvelles particules [Alfaiate *et al.*, 2015]. L'ARN génomique est utilisé pour former le génome viral des nouvelles ribonucléoprotéines. L'ARN anti-génomique est transcrit en ARNm et est traduit en AgHD [Alfaiate *et al.*, 2015 ; Sureau et Negro, 2015]. La ribonucléoprotéine du VHD, ainsi formée, est ensuite enveloppée au niveau du réticulum endoplasmique où les AgHBs du VHB sont synthétisées [Sureau et Negro, 2015]. Un domaine riche en proline proche du site de farnésylation serait impliqué dans la liaison de la ribonucléoprotéine du VHD et les protéines d'enveloppe du VHB [Sureau et Negro, 2015]. La sécrétion du VHD est ensuite réalisée à travers l'appareil de Golgi [Alfaiate *et al.*, 2015 ; Sureau et Negro, 2015].

1.2. Le diagnostic

Afin de diagnostiquer une hépatite Delta, la recherche des anticorps anti-VHD (IgM et IgG), dans le sérum des patients est effectuée [Alfaiate *et al.*, 2015]. Ces anticorps anti-VHD, et plus particulièrement les anticorps IgM, sont des marqueurs de l'infection active par le VHD. La recherche de ce marqueur doit être réitérée à différents intervalles de temps car lors d'une infection récente les anticorps ne sont pas détectables. Une sérologie anti-VHD peut être confirmée par la détection de l'ARN du VHD sérique à l'aide d'une PCR [Alfaiate *et al.*, 2015 ; OMS, 2016a].

1.3. Influence de l'infection par le virus de l'hépatite Delta sur l'histoire naturelle du virus de l'hépatite B

La co-infection par le VHD est généralement responsable d'hépatite aigüe et la résolution de l'infection apparaît généralement dans 90 à 95 % des cas comme pour le VHB. Cependant, la majorité des surinfections par le VHD conduisent à une hépatite chronique [Alfaiate *et al.*, 2015]. La co-infection ou la surinfection par le VHD chez des patients infectés de façon chronique par le VHB aggrave l'histoire naturelle de l'infection par le VHB (progression vers la fibrose, cirrhose). Le VHD favorise également le développement d'hépatites fulminantes, de cirrhose et d'insuffisances hépatiques chez les co-infectés par le VHD comparé aux patients mono-infectés par le VHB (exemple : 14,7 % vs. 52,9 % de cirrhose chez les patients mono-infectés vs. co-infectés) [Goto *et al.*, 2003 ; Alfaiate *et al.*, 2015 ; Rizzetto, 2015 ; Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015]. Le risque de progression de la maladie peut être multiplié par trois [Alfaiate *et al.*, 2015].

Tout comme pour le VHB, le système immunitaire joue un rôle important dans l'atteinte hépatique. Récemment, le rôle des cellules NK (« Natural Killer ») dans l'infection par le VHD a été mis en évidence. En effet, le nombre de NK est augmenté lors d'infections chroniques par le VHD, comparé à des personnes saines. De plus, le nombre de lymphocytes T helper perforine positive (protéines responsables de la formation de pores dans la membrane) est augmenté en cas de co-infection par le VHD comparé aux patients mono-infectés par le VHB favorisant ainsi le développement d'une hépatite plus sévère [Alfaiate *et al.*, 2015].

Le VHD est également responsable d'une diminution de la réplication du VHB. Une diminution de la quantité des intermédiaires de réplication du VHB a été observée, mais la synthèse des protéines d'enveloppe est augmentée [Alfaiate *et al.*, 2015 ; Shirvani-Dastgerdi et Tacke, 2015]. En effet, l'AgHD favorise l'activation des promoteurs des protéines S et préS [Wei et Ganem, 1998] et réprime la réplication du VHB en interagissant avec l'enhancer I et II du VHB [Williams *et al.*, 2009]. De plus, l'AgHD induirait également l'expression du gène MxA (« Interferon-induced guanosine

triphosphate-binding protein») qui est connu pour être un répresseur de la réplication du VHB [Alfaiate *et al.*, 2015].

L'infection par le virus de l'hépatite D favorise le développement de CHC comparé aux patients mono-infectés par le VHB [Goto *et al.*, 2003 ; Alfaiate *et al.*, 2015]. Par exemple, la voie SRF/SRE (« Serum Response Factor/Serum Response Element »), impliquée dans la transcription du gène *c-fos* (oncogène) est activée de façon synergique par la protéine X du VHB et l'AgHD du VHD [Goto *et al.*, 2003]. Ces protéines favoriseraient également l'induction de stress au niveau du réticulum endoplasmique et, ou la production d'espèce réactive à l'oxygène (ROS) responsable de l'activation de NFκB et STAT 3 (« Signal transducer and activator of transcription »). Cette voie favorise la transformation des cellules et induit la tumorigenèse [Abbas *et al.*, 2015 ; Alfaiate *et al.*, 2015]. Les protéines AgHD-S pourraient également être responsables d'une régulation positive de l'expression des clusterines (hyperacétylation) impliquées dans la survie cellulaire [Liao *et al.*, 2009].

1.4. Les traitements

Le vaccin contre le VHB est très efficace pour prévenir l'infection par le VHD [Alfaiate *et al.*, 2015]. Il n'existe pas de vaccin agissant directement contre le VHD, car les anticorps contre l'AgHD n'ont pas une capacité de neutralisation forte [Alfaiate *et al.*, 2015].

Actuellement, il n'existe pas de traitement ciblant directement le VHD car ce virus est dépendant du VHB et de la machinerie cellulaire pour sa réplication. En cas d'hépatite Delta chronique, le seul traitement actif actuellement est : l'IFNα +/- pégylé [EASL, 2017]. Ce traitement permet de diminuer la réplication du VHD [Urban *et al.*, 2014 ; Alfaiate *et al.*, 2015]. Cependant, une réponse soutenue n'est obtenue que dans 14 à 50 % des cas. De plus, une rechute à l'arrêt du traitement est souvent observée [OMS, 2016a]. Le traitement est mal toléré et la optimale durée de traitement n'est pas encore bien définie [Alfaiate *et al.*, 2015 ; OMS, 2016a]. Selon les recommandations de l'EASL 2017, l'augmentation de la durée de traitement par l'IFNα-pégylé pourrait améliorer l'efficacité du traitement. Ainsi, si l'IFNα-pégylé est toléré par le patient le traitement doit être continué [EASL, 2017]. Lorsque la réplication de l'ADN du VHB persiste (supérieure à 2 000 UI/mL), les traitements NUCs peuvent également être utilisés pour bloquer la réplication résiduelle du VHD [EASL, 2017]. Cependant, ils ne doivent être prescrits qu'en dernier recours.

La Lamivudine, l'Adéfovir dipivoxil, et l'Entécavir n'ont pas montré d'effets significatifs contre le VHD. Le traitement à long terme par le Ténofovir disoproxil fumarate pourrait supprimer la réplication du VHB et diminuer également la réplication du VHD [Alfaiate *et al.*, 2015]. Chez les patients présentant une décompensation hépatique, le traitement par interféron ne doit pas être

utilisé et une transplantation doit être envisagée [EASL, 2017]. Chez ses patients, l'utilisation de NUCs peut être envisagée [EASL, 2017].

Il est nécessaire de trouver de nouveaux traitements plus efficaces contre le VHD. Actuellement, les recherches se focalisent sur des traitements contre le VHB qui pourraient également influencer le cycle viral du VHD, comme l'inhibition de l'entrée des deux virus pour limiter la propagation de l'infection et les dommages hépatiques, mais également l'inhibition de la production des protéines d'enveloppe pour réduire la production en excès des SVP et, ou favoriser la clairance immunitaire [Alfaiate *et al.*, 2015 ; Petersen *et al.*, 2016]. Par exemple, des études ont été réalisées sur l'effet du Myrcludex B, inhibiteur d'entrée du VHB, contre le VHD. Le Myrcludex B prévient également l'entrée du VHD dans les cellules et diminue la dissémination du virus. Ce traitement pourrait être combiné avec d'autres traitements pour traiter ces infections [Urban *et al.*, 2014]. La cyclosporine A a également montré son effet inhibiteur sur l'entrée des deux virus dans les cellules [Urban *et al.*, 2014 ; Alfaiate *et al.*, 2015]. Des études ont également été réalisées sur les inhibiteurs directs d'assemblage du VHD. En effet, l'assemblage du VHD nécessite une farnésylation (ou prénylation = ajout de lipides prénylés) au niveau des quatre derniers acides aminés de l'AgHD-L (CXXQ). L'utilisation d'inhibiteurs de farnésylation pourrait ainsi limiter les interactions avec l'AgHBs du VHB et limiter la formation et la sécrétion des particules VHD. La molécule Lonafarmib a ainsi été testée. Des résultats significatifs ont été observés *in vitro* et sur un modèle murin. En phase clinique 2a, une diminution de la virémie VHD a pu être observée, mais la quantité d'AgHBs n'était pas modifiée. De plus, un rebond de la virémie VHD (ARN VHD) a également été observé dès l'arrêt du traitement [Koh *et al.*, 2015]. La combinaison de plusieurs de ces molécules pourrait être envisagée pour traiter le VHD.

2. La co-infection VHB/VIH

2.1. Le virus de l'immunodéficience humaine

L'étude OMS réalisée en 2015 a estimé qu'environ 36,7 millions d'individus dans le monde vivent actuellement avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [OMS, 2016b]. L'Afrique subsaharienne est la région la plus touchée par le virus avec environ 25,6 millions d'individus infectés [OMS, 2016b]. En France, environ 152 000 personnes vivent avec le VIH. Le VIH est un virus très fragile. Sa transmission se fait généralement par voie sexuelle (sperme et sécrétions vaginales), par le sang, mais également par voie périnatale (allaitement) [OMS, 2016b].

Le VIH à l'origine du syndrome de l'immunodéficience acquise a été découvert en 1983 par une équipe française [Barré-Sinoussi *et al.*, 1983]. Ce virus appartient à la famille des *Retroviridae* et au genre des *Lentivirus*. Ce genre regroupe des virus associés à une maladie chronique caractérisée

par une longue période d'incubation [Fanales-Belasio *et al.*, 2010]. Le VIH infecte les cellules du système immunitaire qui présentent à leur surface la molécule CD4⁺ (lymphocytes T helper, cellules dendritiques, macrophages) [Zulfiqar *et al.*, 2017]. Cela aboutit à un affaiblissement du système immunitaire qui rend l'organisme vulnérable à certaines infections opportunistes, mais également à certains types de cancer. C'est ce que l'on nomme le syndrome de l'immunodéficience acquise, plus communément appelé : le SIDA.

Il existe deux types de VIH : le VIH-1 qui est le plus répandu et le plus virulent et le VIH-2 qui est généralement restreint seulement à certaines régions du monde (Afrique centrale et Afrique de l'Ouest) [Zulfiqar *et al.*, 2017]. Le VIH-1 est divisé en quatre groupes M, N, O et P. Le groupe M est également divisé en 9 sous-groupes (A à D, F à H et J à K). Parmi ces sous-groupes, des sous-types recombinants sont apparus et sont appelés les CRF (« Circulating recombinant form »). Par exemple, la recombinaison entre les virus de sous-groupes A et G ont donné lieu au CRF02-AG [Zulfiqar *et al.*, 2017]. Le cycle de réplication du VIH est représenté sur la Figure 38.

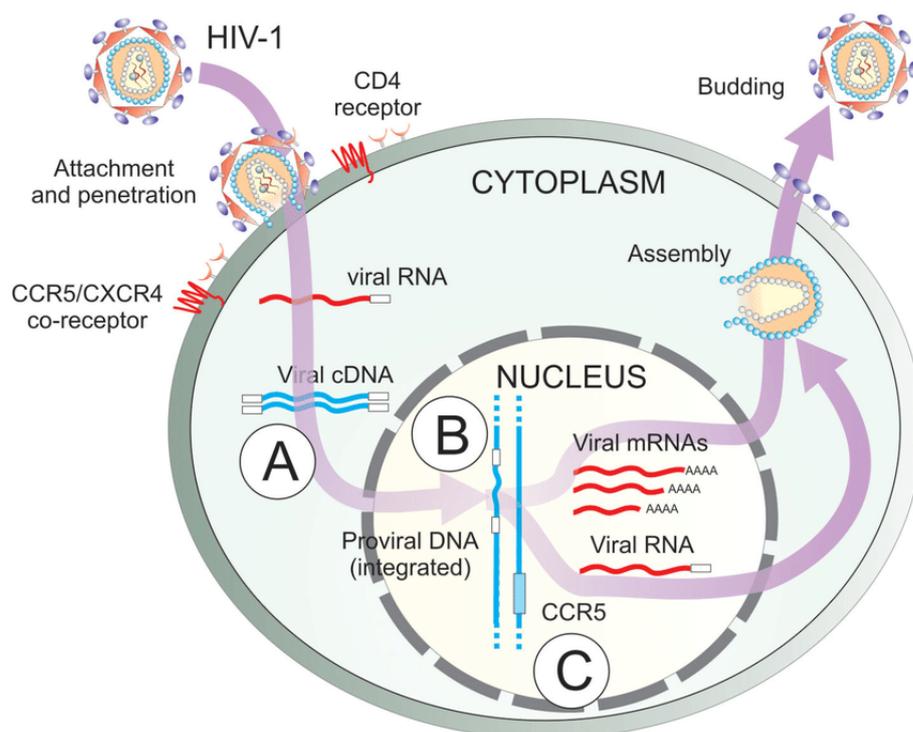


Figure 38 : Le cycle de réplication du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) [Saayman *et al.*, 2015].

2.2. La co-infection VHB/VIH

Le virus de l'hépatite B et le VIH partagent des voies de transmission similaires favorisant des co-infections fréquentes. La prévalence des infections chroniques par le VHB chez des patients infectés par le VIH est d'environ 10 % [Mondal *et al.*, 2016 ; Rajbhandari *et al.*, 2016]. D'après les dernières études réalisées par l'OMS, cette prévalence serait diminuée à 7,4 % en 2017 [OMS, 2017].

En Europe, 9 % des patients infectés par le VIH présentent des AgHBs positif [Wu *et al.*, 2017]. Chez les personnes ayant été en contact avec le VHB, seulement 1 % sont également infectées par le VIH [OMS, 2017]. Les interactions entre les deux virus vont influencer l'histoire naturelle de l'infection de chacun de ces virus.

2.2.1. Influence de la co-infection par le VHB sur l'infection par le VIH

Au cours de l'infection, le VHB (haut taux de LPS dans le sérum, CD14, activation immunitaire) et le VIH (translocation microbienne, activation immunitaire) semblent agir en synergie pour activer le système immunitaire en continu et favoriser la réplication du VIH. Ce qui pourrait expliquer une diminution plus sévère des lymphocytes T CD4⁺ chez les patients co-infectés VHB/VIH [Li *et al.*, 2012].

L'influence du VHB sur la progression de l'infection par le VIH est controversée.

Des études ont montré que la co-infection par le VHB était un facteur de risque d'aggravation de l'immunodéficience (diminution des lymphocytes T CD4⁺) et que le risque de progression vers le stade SIDA était multiplié par 3,6 à 6,8 comparé aux patients mono-infectés par le VIH [Sun *et al.*, 2014]. De plus, une autre étude a également observé que le risque de développer un SIDA ou de décès était presque le double pour les patients qui présentaient une co-infection avec le VHB (ratio de risque ajusté : 1,80 ; IC 95% : 1,20 – 2,69) [Chun *et al.*, 2014].

En parallèle, le VHB pourrait limiter la propagation du VIH. Les cellules dendritiques jouent un rôle crucial dans l'infection par le VIH. Le VIH utilise les cellules dendritiques matures et immatures pour se propager, avec une préférence pour les cellules dendritiques matures qui favorisent la transmission du virus. Cependant, le VHB inhibe les cellules dendritiques pour favoriser son immunotolérance et limite l'expression des TLR-2 à la surface des cellules mononucléaires du sang périphérique pour contrer l'immunité innée [Li *et al.*, 2012]. L'influence du VHB sur l'infection par le VIH est résumée sur la Figure 39.

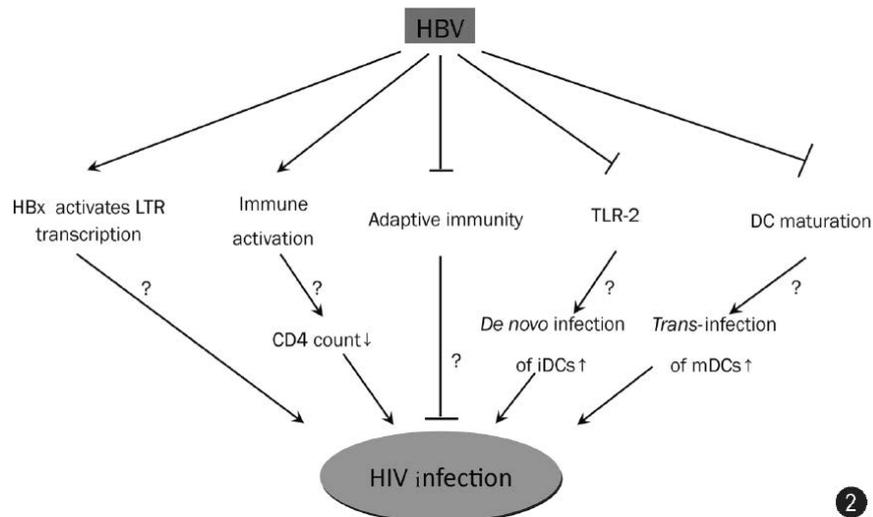


Figure 39 : Influence de l'infection par le virus de l'hépatite B sur l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (DC : Cellules dendritiques, iDC : immature, mDC : mature, LTR : « Long Terminal Repeat », TLR : « Toll like Receptor ») [Li et al., 2012].

2.2.2. Influence de la co-infection par le VIH sur l'infection par le VHB

L'infection par le VIH chez les patients infectés par le VHB est corrélée avec une mauvaise évolution de l'infection par le VHB. La mortalité liée aux maladies hépatiques est plus élevée en cas de co-infection VHB/VIH comparé aux infections VIH ou VHB seule [Joshi *et al.*, 2011]. Lors d'une co-infection VHB/VIH, le taux de fibrose est accéléré chez les patients co-infectés comparé aux patients mono-infectés par le VHB et favorise ainsi la progression de la maladie [Joshi *et al.*, 2011].

Par ailleurs, lors d'une co-infection VHB/VIH, la clairance de l'infection par le VHB est réduite en raison du rôle crucial des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse immunitaire adaptative contre le VHB [Chisari *et al.*, 2010]. Une diminution du nombre des lymphocytes T CD4⁺ (helper) va favoriser le passage à la chronicité du VHB [Li *et al.*, 2012]. Ainsi, dans l'étude de Joshi *et al.* (2011), le risque de passage à la chronicité est environ multiplié par cinq chez les patients co-infectés VHB/VIH, comparés aux patients mono-infectés par le VHB (5 % vs. 23 %) [Joshi *et al.*, 2011]. La co-infection par le VIH et le VHB est également responsable d'une diminution de la séroclairance de l'AgHBs et de l'AgHBe [Taffon *et al.*, 2014]. L'influence du VIH sur l'infection par le VHB est résumée sur la Figure 40.

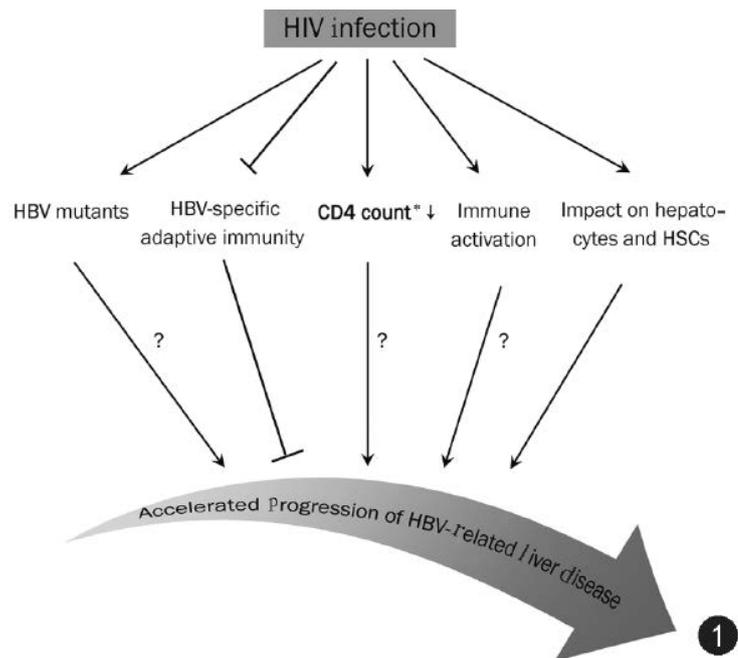


Figure 40 : Influence de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine sur l'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B (HSC : cellules souches hématopoïétiques) [Li *et al.*, 2012].

Chez les co-infectés VHB/VIH, le développement d'hépatites occultes est plus élevé [Ramezani *et al.*, 2011], potentiellement influencé par les modifications de pressions de sélection provoquées par le VIH. L'association entre le taux faible de lymphocytes T CD4⁺ et l'hépatite B occulte a été observée [Li *et al.*, 2012].

Par ailleurs, la diversité du VHB semble moins hétérogène en présence du VIH. En effet, les patients positifs pour le VIH présentent une immunité potentiellement affaiblie, diminuant ainsi, les pressions immunitaires exercées sur le VHB et par conséquent l'apparition de nouvelles mutations spontanées [Mondal *et al.*, 2016].

Une étude a été réalisée sur l'influence de la co-infection ou surinfection par le VHD chez les patients co-infectés VHB/VIH. La co-infection par le VHD chez ces patients est associée à une augmentation de la mortalité chez ces patients et une accélération de la progression de la maladie [Béguelin *et al.*, 2017]. Dans cette étude Suisse, l'infection par le VHD est associée à un risque 2,5 fois plus élevé de mortalité, huit fois plus de risques de mourir à cause des complications hépatiques, et neuf fois plus de risques de développer un carcinome hépatocellulaire comparé aux patients co-infectés VHB/VIH [Béguelin *et al.*, 2017].

2.3. Les traitements

2.3.1. Les traitements contre le VIH

Depuis le milieu des années 1990, le développement d'inhibiteurs variés contre les enzymes du VIH a permis d'améliorer la prise en charge de l'infection par le VIH. La combinaison de plusieurs

molécules a donné naissance aux thérapies antirétrovirales combinées (cART). La combinaison de thérapies antirétrovirales consiste à mélanger au moins deux médicaments actifs appartenant à deux classes différentes parmi les classes d'antirétroviraux existantes [Zulfiqar *et al.*, 2017]. Dans les régions développées, les cARTs ont permis de diminuer de façon considérable le passage au stade SIDA et la mortalité due au SIDA [OMS, 2016b].

Voici les différentes classes d'antirétroviraux existantes [Zulfiqar *et al.*, 2017]:

- les inhibiteurs d'entrée qui inhibent l'entrée du virus dans les cellules hôtes soit en interagissant avec le co-récepteur CCR5 (« C-C chemokine receptor type 5 ») soit en se fixant à la protéine gp41 inhibant ainsi la fusion membranaire nécessaire à l'entrée du virus dans les cellules,
- les inhibiteurs nucléotidiques de la rétrotranscriptase (INTI) qui entrent en compétition avec les acides nucléiques incorporés lors de l'activité d'élongation de la rétrotranscriptase et vont stopper l'élongation de la chaîne d'ADN,
- les inhibiteurs non nucléotidiques de la rétrotranscriptase (INNTI), qui sont des inhibiteurs non compétitifs, vont se fixer dans une région hydrophobe à proximité du site actif de la RT et inhiber son activité,
- les inhibiteurs d'intégrase qui empêchent l'intégration du génome viral dans le génome de l'hôte,
- les inhibiteurs de protéases qui inhibent la maturation infectieuse du VIH.

Ces antirétroviraux permettent d'améliorer la qualité de vie des patients en limitant la propagation du VIH et l'évolution de la maladie. Cependant, ils ne permettent pas d'éliminer le VIH intégré dans les cellules [Zulfiqar *et al.*, 2017].

2.3.2. Les traitements contre la co-infection VHB/VIH

Depuis 2015, l'OMS recommande de traiter le VHB chez toutes les personnes co-infectées par le VIH. Les nouvelles recommandations de l'EASL 2017 recommandent d'initier les traitements cART chez tous les patients infectés par le VIH et le VHB quel que soit le taux de CD4⁺ [EASL, 2017].

Certains traitements antirétroviraux contre le VIH sont actifs contre le VHB. Les cARTs peuvent ralentir la progression de la maladie hépatique en préservant ou en restaurant les fonctions immunitaires [Sun *et al.*, 2014]. La réponse aux traitements cART contre le VIH ne semble pas être impactée par le VHB. Sous traitement anti-VIH, les patients co-infectés VHB/VIH, sans stade SIDA, présentent une progression de la maladie hépatique plus faible que les patients mono-infectés par le VHB en raison des traitements antiviraux prescrits, mais également du meilleur suivi des patients [Mallet *et al.*, 2017]. Une autre étude a démontré que la diminution de l'ADN du VHB jusqu'à des

concentrations indétectables et la séroconversion de l'AgHBs sont plus souvent observées chez les patients co-infectés comparés aux patients mono-infectés par le VHB (80 % vs. 55,1 % et 15,2 % vs. 9,7 %, respectivement) [Piroth *et al.*, 2015]. Cependant, le traitement ne doit pas être arrêté car l'arrêt du traitement cART favorise le rebond de l'ADN du VHB et accélère la détérioration de l'immunité [Dore *et al.*, 2010].

Pour traiter les co-infections VHB/VIH, les cARTs comprenant du Ténofovir disoproxil fumarate sont privilégiés [OMS, 2017]. Le Ténofovir disoproxil fumarate est un agent efficace contre le VHB et le VIH [EASL, 2017]. Cette molécule présente une forte barrière génétique [Sun *et al.*, 2014]. Cependant, le Ténofovir disoproxil fumarate en monothérapie n'est pas recommandé chez les co-infectés car il peut être responsable de l'apparition de mutations dans le gène de la RT du VIH [EASL, 2017]. Les cARTs comprenant du Ténofovir disoproxil fumarate favorisent la séroconversion de l'AgHBe chez les patients co-infectés VHB/VIH (50 %), d'autant plus quand il est associé à l'Emtricitabine (57 %) [Joshi *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2014]. La suppression de la réplication du VHB est observée dans 91 % des cas après cinq ans de traitements. Le rebond de la virémie VHB est rare sous Ténofovir disoproxil fumarate [Sun *et al.*, 2014]. Cependant, un suivi rapproché des patients est nécessaire car ce traitement provoque des effets indésirables au niveau du rein et des os [Joshi *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2014 ; EASL, 2017]. Pour cela, les nouveaux traitements faisant intervenir les molécules de Ténofovir disoproxil fumarate modifiées (Ténofovir Alafenamide : TAF) sont utilisés [EASL, 2017]. Le traitement par Ténofovir disoproxil fumarate (ou autres NUCs) et cART est rarement arrêté car l'arrêt du traitement favorise la réactivation du VHB (hépatite fulminante et décompensation hépatique) [EASL, 2017].

L'Entécavir n'est pas conseillé en monothérapie chez les co-infectés VIH et VHB car il favorise l'apparition de mutations dans la RT du VIH et présente également des résistances croisées avec d'autres analogues nucléos(t)idiques comme la Lamivudine et l'Emtricitabine chez le VHB [Joshi *et al.*, 2011]. Cependant, il peut être utilisé au sein des cARTs chez les patients intolérants au Ténofovir disoproxil fumarate [EASL, 2017].

La Lamivudine et l'Emtricitabine ont déjà été utilisées pour traiter la co-infection VHB/VIH. Des résultats intéressants ont été observés en termes de séroconversion de l'AgHBe et de la suppression de la charge virale [Sun *et al.*, 2014]. Cependant, la Lamivudine présente une faible barrière génétique et un taux élevé de mutations de résistance associées au traitement a été observé (40 % de résistances après deux ans et 90 % après 4 ans) [Joshi *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2014]. L'Emtricitabine présente des effets similaires à la Lamivudine pour le traitement des co-infections VHB/VIH, mais l'apparition de mutations de résistance associées au traitement est plus faible (18 % après deux ans de traitements) [Sun *et al.*, 2014].

L'Adéfovir dipivoxil est utilisé chez les patients co-infectés VHB/VIH qui présentent des mutations de résistance associées aux traitements par Lamivudine. Ce traitement agit sur le VHB (quantité indétectable d'ADN chez 25 % des patients et séroconversion de l'AgHBe chez 9 % des patients après 144 semaines de traitement) [Sun *et al.*, 2014]. Même si la barrière génétique est plus forte pour ce virus, l'augmentation des doses de médicaments favorise l'apparition de mutations de résistance associées au traitement (29 % des patients après cinq ans de traitements) [Joshi *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2014]. De plus, ce médicament est toxique pour les reins [Sun *et al.*, 2014].

L'IFN α -pégylé ne présente qu'un effet modeste sur la réplication du VIH. De plus, les patients présentant une quantité de CD4⁺ faible, l'utilisation de l'interféron est à bannir à cause de la lymphocytopénie provoquée par ce traitement [Sun *et al.*, 2014].

A ce jour, les traitements ne permettent pas de guérir totalement ni du VIH ni de l'hépatite B. La recherche de nouveaux traitements est importante pour éliminer ces deux virus.

OBJECTIFS

Comme nous venons de l'exposer, l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) reste difficile à éradiquer avec environ 257 millions de personnes dans le monde qui sont actuellement encore infectées de façon chronique par ce virus. Ainsi, le virus de l'hépatite B reste un enjeu de santé publique majeur dans le monde dont plusieurs aspects biologiques, physiologiques et pathologiques restent à explorer.

En raison de modes de transmission similaires, l'infection par le VHB peut être accompagnée d'autres infections virales causées par exemple par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Chez les patients infectés par le VIH, environ 10 % sont infectés par le VHB [Rajbhandari *et al.*, 2016]. Ces co-infections sont généralement associées à un mauvais pronostic clinique avec une immunité potentiellement affaiblie [Li *et al.*, 2012 ; Mondal *et al.*, 2016].

Ainsi, pour prévenir la progression de l'infection par le VHB vers la fibrose, la cirrhose, l'insuffisance hépatocellulaire terminale et le carcinome hépatocellulaire, les traitements disponibles à ce jour sont les analogues nucléos(t)idiques (NUCs) et l'interféron (IFN). Les NUCs sont plus largement utilisés que l'IFN car ils sont mieux tolérés. Cependant, ces traitements anti-VHB sont imparfaitement efficaces, dotés d'effets secondaires non négligeables et favorisent l'apparition de souches virales résistantes qui échappent aux traitements, mais également au système immunitaire de l'hôte. Par ailleurs, la guérison de l'infection par le VHB est difficile à obtenir car un pool d'ADN viral super-enroulé (ADNccc) persiste dans les cellules du foie. Toutefois, la perte de l'AgHBs dans le sérum, ou clairance, a été démontrée comme étant un marqueur de guérison fonctionnelle chez les patients infectés, avec ou sans traitement antiviral. Elle a été corrélée à un moindre risque de carcinome hépatocellulaire (CHC), bien que la question soit encore en cours d'étude. Malheureusement, même sous traitement, la perte de l'AgHBs n'est que très rarement observée. Sous IFN, un taux annuel de 3 à 11 % de clairance de l'AgHBs a été observé après un traitement de 48 semaines à cinq ans [Li *et al.*, 2017c]. Sous NUCs, la perte de l'AgHBs n'apparaît que dans 3 à 8 % des cas après deux ans de traitement par Ténofovir disoproxil fumarate ou Entécavir [Heathcote *et al.*, 2008 ; Marcellin *et al.*, 2008] et peut atteindre entre 8 et 14 % sous Ténofovir disoproxil fumarate après cinq ans de traitement [Buti *et al.*, 2015]. Chez les patients co-infectés VHB/VIH, la perte de l'AgHBs est observée chez environ 10 % des personnes traitées par NUCs pendant quatre ans [Boyd *et al.*, 2015].

Cet AgHBs, utilisé comme marqueur de guérison fonctionnelle, est formé des trois glycoprotéines d'enveloppe du VHB (LHBs, MHBs, SHBs). Ces glycoprotéines d'enveloppe jouent un rôle important dans l'infection du VHB. Elles sont essentielles à l'entrée du virus dans les cellules sensibles et sont ciblées par la réponse immunitaire de l'hôte durant l'infection [Desmond *et al.*, 2008 ; Lempp et Urban, 2014]. D'autre part, les protéines d'enveloppe sont connues pour leur

grande variabilité que ce soit de façon spontanée ou sous l'effet des pressions immunitaires de l'hôte ou thérapeutiques [Günther *et al.*, 2006].

Ainsi, l'hypothèse de notre travail reposait sur la question suivante :

Est-ce que la variabilité des protéines d'enveloppe du VHB pourrait expliquer, au moins partiellement, l'évolution de l'infection par le VHB chez des patients avec ou sans traitement par analogues nucléos(t)idiques.

Le premier objectif a été de mettre en évidence des « signatures moléculaires », ou acides aminés spécifiques, sur les glycoprotéines d'enveloppe du VHB qui seraient liées à la persistance de l'AgHBs et par conséquent à la persistance de l'infection chez des patients suivis au Centre Hospitalier de recherche Universitaire de Nancy.

Le VHB est variable sur le plan génétique et comporte plusieurs génotypes. Parmi les différents génotypes du VHB (A – J), les génotypes A et D sont prédominants en Europe. Une première étude a été réalisée sur une cohorte de patients présentant une clairance ou une persistance de l'AgHBs malgré le contrôle de la charge virale (ADN du VHB indétectable) sous traitements par analogues nucléos(t)idiques. Une seconde étude a ensuite été étendue à des patients infectés par le VHB de génotype A présentant divers profils cliniques (infection aiguë par le VHB, monoinfection chronique par le VHB, co-infection chronique par le VHB et le VIH) avec une clairance ou non de l'AgHBs avec (infections chroniques) ou sans traitement (infections aiguës). Les infections par le VHB de génotype C sont plus rarement observées en Europe, mais sont généralement associées à une évolution vers la chronicité plus élevée et au développement d'une maladie hépatique plus sévère. Nous avons eu l'occasion dans le cadre de la recherche clinique du laboratoire hospitalier de virologie, d'étudier deux patients infectés chroniquement par des souches virales de génotypes C et présentant des profils atypiques (infection chronique par un recombinant C/G, présence d'AgHBs et anticorps anti-HBs concomitants dans le sérum d'un patient infecté chroniquement par le VHB). Ainsi, la variabilité des protéines d'enveloppe du VHB (gènes S et préS) a été évaluée par séquençage direct pour observer les variants majoritaires, puis par séquençage haut-débit pour observer les variants minoritaires.

Après avoir identifié des signatures moléculaires, le second objectif a été de caractériser les conséquences potentielles de ces signatures sur le pouvoir infectieux du virus au regard de la littérature :

- prédiction antigénique par bio-informatique pour évaluer l'influence des signatures moléculaires sur la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte
- localisation des signatures dans des zones fonctionnelles virales et/ou dans des épitopes pouvant influencer le cycle infectieux du virus

- évaluer *in vivo* et *in vitro*, l'influence de la mutation sT125M, observée seulement chez les patients infectés par des souches de génotype D et présentant une persistance de l'AgHBs sous NUCs (68 %), sur la reconnaissance du virus par les anticorps vaccinaux (modèle murin, cellules HepaRG) et l'entrée du virus dans les cellules (cellules HepaRG).

MATERIELS ET METHODES

I. Sélection des patients

Afin de réaliser cette étude, trois groupes de patients ont été constitués. Une première partie de l'étude a porté sur des patients porteurs d'une infection chronique par le VHB de génotype D. L'étude a ensuite été élargie à des patients porteurs d'une hépatite B de génotype A avec différents profils cliniques et le troisième volet a porté sur deux patients infectés par le VHB de génotype C. Les patients ont été sélectionnés exclusivement au Centre Hospitalier de Recherche Universitaire (CHRU) de Nancy au sein du service d'Hépatogastroentérologie et du service des Maladies Infectieuses et Tropicales. Les données biologiques, cliniques et thérapeutiques ont été récupérées pour chaque patient afin de les classer dans les différents groupes étudiés. Le consentement éclairé des patients a été obtenu et approuvé par le Comité de Protection des Personnes (CPP) de Lorraine, en accord avec les Lignes Directrices Internationales (Helsinki) (DC-2013-1801, DC-2016-2790).

1. Cohorte de génotype D

Une première cohorte présentant des patients porteurs d'une hépatite B chronique de génotype D a été construite. Les patients ont été inclus dans l'étude selon les critères suivants : ils devaient être adultes, porteurs d'une hépatite B chronique (persistance de l'AgHBs pendant plus de six mois dans le sérum), traités par analogues nucléos(t)idiques (NUCs) et dépourvu de co-infection par le VHC, VIH et VHD. Les patients inclus ont été séparés en deux groupes selon la réponse au traitement. La réponse au traitement a été évaluée par quantification de l'ADN sérique ou plasmatique par PCR en temps réel (qPCR) et la disparition de l'AgHBs. Ainsi, les patients présentant une perte de l'AgHBs (ou clairance de l'AgHBs) ont été nommés « répondeurs » tandis que les patients présentant une persistance de l'AgHBs dans leur sérum ont été classés comme « non-répondeurs ». Ainsi, la cohorte était composée de six patients « répondeurs » qui ont été appariés à six patients « non-répondeurs » selon l'âge (+/- cinq ans) et le sexe, pouvant influencer l'évolution de la maladie.

Pour chacun des patients inclus dans l'étude, le dernier sérum disponible avec une charge virale généralement supérieure à 2 log a été analysé afin d'évaluer la variabilité des protéines d'enveloppe des souches du VHB.

2. Cohorte de génotype A

L'étude a ensuite été élargie à une cohorte de patients infectés par le VHB de génotype A présentant divers profils cliniques : des patients infectés chroniquement par le VHB, des patients porteurs d'une hépatite aiguë et des patients chroniquement infectés par le VHB et co-infectés par le

VIH. Les patients ont été classés, de la même manière que précédemment, comme « répondeurs » et « non-répondeurs ». Ils ont été regroupés selon leur contexte clinique, mais aussi leur sexe et leur âge. La cohorte était composée de quinze patients séparés en trois sous-groupes :

- cinq patients non traités développant une hépatite aigüe évaluée par la présence d'anticorps anti-HBc de type IgM dans le sérum des patients, comprenant trois « répondeurs » et deux « non-répondeurs » évoluant vers la chronicité (âge moyen : 50 +/- six ans),
- quatre patients traités par NUCs présentant une infection chronique par le VHB évaluée par la persistance de l'AgHBs pendant plus de six mois dans le sérum des patients, dont deux « répondeurs » et deux « non-répondeurs » (âge moyen : 68 +/- trois ans),
- Six patients traités par NUCs présentant une infection chronique par le VHB et co-infectés par le VIH dont deux « répondeurs » et quatre « non-répondeurs » (âge moyen : 54 +/- dix ans).

De la même manière que la précédente cohorte, le dernier sérum disponible avec une charge virale analysable a été utilisé pour étudier la variabilité des protéines d'enveloppe du VHB. L'absence de co-infection VHD et VHC a été vérifiée.

3. Deux patients de génotype C

Dans le cadre du suivi clinique au CHRU de Nancy, deux patients porteurs d'une hépatite B chronique, mais présentant des souches virales de génotype différent aux deux cohortes précédentes, ont également été étudiés. Ces deux patients étaient infectés par des souches de VHB de génotype C depuis plus de 20 ans et présentaient une persistance de l'AgHBs (« non-répondeurs »).

Le patient P1 présentait une co-infection VIH et VHB. Il a été diagnostiqué en 1997 pour l'infection par le VHB et en 2000 pour l'infection par le VIH conduisant à la mise en place de traitements antirétroviraux incluant des traitements contre le VHB. En 2008, un épisode dépressif majeur a conduit à la rupture de l'observance du traitement antiviral par le patient et une rechute alcoolique qui a conduit à la mort du patient des suites d'une décompensation hépatique cirrhotique.

Le patient P2 était porteur d'une hépatite B chronique (mono-infection) découverte en 1988. Après un premier essai de traitement par IFN, qui s'est révélé sans succès, le patient n'a, par la suite, jamais reçu d'autres traitements contre le VHB. Ce patient présentait un profil atypique avec la coexistence des anticorps anti-HBs et des AgHBs dans le sérum accompagné d'une charge virale persistante (4,74 logUI/mL). En décembre 2014, ce patient présentait une cirrhose hépatique sévère (score F4) avec une activité inflammatoire et une destruction des hépatocytes sévère (stade A3).

II. Détermination des séquences de référence pour les génotypes A, C et D

Afin d'identifier les mutations sur les séquences générées par séquençage pour les différents échantillons, des séquences de référence pour chaque génotype ont été élaborées. Elles ont été nommées consensus. Elles ont été construites à l'aide de la base de données HBVdb r35 proposée par IBCP (« Institute of Biology and Chemistry of proteins »; Hayer *et al.*, 2013 ; <https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/>, Lyon). Cette base de données regroupe des séquences de génome du VHB (Archives Européenne de l'« European Nucleotide Archive ») issues de différents patients infectés par le VHB et présentant divers profils cliniques. Les séquences sont séparées selon le génotype (A-H) et les gènes du VHB (HBe, HBc, HBx, LHBs, MHBs, SHBs, Pol). Des séquences en acides aminés, mais également en acides nucléiques, sont disponibles. Pour les protéines d'enveloppe, entre 1 000 et 7 500 séquences issues de patients infectés par le VHB de génotype A, C ou D sont disponibles en acides aminés ou en acides nucléiques. Ainsi, les différentes séquences disponibles pour chacun des génotypes ont été comparées entre elles à l'aide du logiciel Vespa disponible sur le site de la base de données « Los Alamos National Laboratory » (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html>).

Pour chaque position, l'acide aminé ou l'acide nucléique présent au plus haut pourcentage a été considéré comme l'acide aminé ou l'acide nucléique de référence pour cette position. Lorsque deux acides nucléiques ou deux acides aminés présentaient un fort pourcentage à une même position (supérieur à 40 %), la double possibilité a été prise en compte. Une séquence consensus a ainsi été construite pour les trois génotypes (A, C et D). De plus, pour le sous-génotype A2, la séquence de référence a été comparée à une séquence consensus déterminée par l'équipe de Cai *et al.*, (2016).

III. Evaluation de la variabilité du virus de l'hépatite B

Dans le but d'évaluer les mutations présentes sur les protéines d'enveloppe des souches virales du VHB des patients inclus dans l'étude, nous avons procédé au séquençage des gènes S et préS du VHB. Dans un premier temps, le séquençage des gènes S et préS a été réalisé par séquençage direct. Dans un second temps, le séquençage haut-débit a été utilisé pour mettre en évidence les mutations minoritaires et confronter les analyses des deux méthodes pour chaque échantillon étudié.

1. Préparation des amplicons

Dans un premier temps, les gènes de l'enveloppe du VHB ont été amplifiés pour les deux méthodes de séquençage. A partir du sérum ou du plasma des patients inclus dans l'étude, l'ADN viral a été extrait de façon automatisée grâce à l'automate « NucliSENS[®] easyMAG[™] ». Cette technique utilise des billes de silice magnétique sur lesquelles vont se fixer les acides nucléiques chargés négativement dans un milieu salin présentant une force ionique élevée. Généralement, 500 µL de sérum ou plasma ont été extraits pour chaque échantillon à séquencer. Pour les faibles charges virales (inférieures à 3 log), le volume de sérum utilisé pour l'extraction était de 1 000 µL. Le volume d'éluion final était de 50 µL. L'ADN extrait a été stocké à -20°C avant son amplification.

Afin de séquencer les gènes S et préS des protéines d'enveloppe du VHB, une méthode d'amplification par PCR semi-nichée a été adaptée au sein du laboratoire [Velay, 2015]. Les gènes S et préS (préS1 et préS2) ont été amplifiés séparément. L'amplification des gènes a été réalisée à l'aide du kit « Phusion[®] High-Fidelity DNA polymerase » (ThermoFisher Scientific). L'enzyme polymérase utilisée permet d'avoir une amplification plus fidèle de l'ADN grâce à une activité 3' – 5' exonucléase en plus de son activité 5' – 3' polymérase. Le taux d'erreur de cette enzyme est de $4,4 \times 10^{-7}$ mutations/pb/cycles ; ce qui limite l'introduction de mutations artéfacts durant la PCR.

Le mélange réactionnel utilisé pour la réaction d'amplification est présenté dans le Tableau 9 :

Tableau 9 : Mélange réactionnel utilisé pour amplifier les gènes préS et S du virus de l'hépatite B.

Réactifs	Volume pour une réaction
Master mix 2X Phusion	12,5 µL
DMSO	0,6 µL
Amorce sens 10 µM	0,75 µL
Amorce antisens 10µM	0,75 µL
Matrice (extrait d'ADN ou produit de PCR1)	5 µL (jusqu'à 10 µL pour les échantillons avec une faible charge virale)
Eau sans deoxyribonucléase (ADNase)	qsp 25 µL

Pour le séquençage direct, le gène S du VHB a été amplifié à l'aide de deux PCR successives. La première PCR (PCR1) génère un amplicon de 902 pb. Cet amplicon est ensuite amplifié par deux PCR semi-nichées distinctes générant des amplicons de tailles différentes : 337 pb pour la PCR2a et 659 pb pour la PCR2b. Ces amplicons générés par les PCR2 se chevauchent sur une zone de 50 à 100 nucléotides et couvrent l'ensemble de la protéine S.

Pour le séquençage haut-débit, le gène S n'a été amplifié que par la PCR1 générant des fragments dont la taille était adéquate pour l'étape de fragmentation en 200 pb. En effet, le séquençage par la méthode Ion Torrent nécessite une étape de fragmentation des amplicons en fragments de 200 pb. Il était donc préconisé d'utiliser des fragments dont la longueur est un multiple de 200. Les séquences des amorces utilisées pour amplifier le gène S sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Récapitulatif des différentes amorces utilisées pour l'amplification du gène S du virus de l'hépatite B.

PCR S	Amorces	Séquences	Taille des amplicons générés	Méthode de séquençage	Références bibliographiques
1	P2f sens	5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'	902 pb	Séquençage direct/ haut-débit	Mulders <i>et al.</i> , 2004
	979 antisens	5'-CAAAAGACCCACAATTCTTTGACATACTTTCCAAT-3'			Odemuyiwa <i>et al.</i> , 2001
2a	P2f sens	5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'	337pb	Séquençage direct	Mulders <i>et al.</i> , 2004
	S8 antisens	5'-GAAGATGAGGCATAGCAGCAGG-3'			Sung <i>et al.</i> , 2008
2b	P7 ^a sens	5'-TTGGCCAAAATTCGCAGTC-3'	659 pb	Séquençage direct	Sung <i>et al.</i> , 2008
	979 antisens	5'-CAAAAGACCCACAATTCTTTGACATACTTTCCAAT-3'			Odemuyiwa <i>et al.</i> , 2001

Le gène préS a été amplifié à l'aide de deux PCR successives (PCR1 et PCR2). Les séquences des amorces utilisées pour amplifier le gène préS sont présentées dans le Tableau 11. La PCR1 génère un amplicon de 691 à 711 pb selon le génotype viral (691 pb pour le génotype D et 711 pb pour les génotypes A et C). Les amplicons générés lors de la PCR2 varient entre 609 et 620 pb. Pour le gène préS, la PCR2 a été utilisée pour le séquençage direct et le séquençage haut-débit.

Tableau 11 : Récapitulatif des différentes amorces utilisées pour l'amplification de la région préS du virus de l'hépatite B.

PCR préS	Amorces	Séquences	Taille des amplicons générés	Méthode de séquençage	Références bibliographiques
1	P4 sens	5'- GCCTCATTTTGTGGGTCACCATA-3'	691-711 pb (génotype D-A/C)	Séquençage direct/ haut-débit	Sung <i>et al.</i> , 2008
	P7 ^a rev antisens	5'-GACTGCGAATTTTGGCCAA-3'			Velay <i>et al.</i> , 2016
2	P4 sens	5'- GCCTCATTTTGTGGGTCACCATA-3'	609-620 pb (génotype D-A/C)	Séquençage direct/ haut- débit	Sung <i>et al.</i> , 2008
	PreS-R antisens	5'- TCAACAAGAAAAACMCCGCTGT-3'			Sung <i>et al.</i> , 2008

Le programme de PCR utilisé pour les PCR 1 et 2 quel que soit le gène à amplifier est présenté dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Programme de PCR utilisé pour amplifier les gènes S et préS du virus de l'hépatite B.

Étapes	PCR1	PCR2	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98°C pendant 5 minutes		1 cycle
Dénaturation	98°C pendant 30 secondes		35 cycles
Hybridation	61°C pendant 30 secondes	62°C pendant 20 secondes	
Elongation	72°C pendant 30 secondes		
Elongation finale	72°C pendant 7 minutes		1 cycle

La taille des amplicons a été vérifiée à l'aide d'une migration sur gel d'agarose 1,5 % après chaque PCR, afin de valider la présence des amplicons recherchés. L'intercalant d'ADN utilisé était le GelRed™(Biotium). A partir de cette étape, les échantillons ont subi des préparations différentes selon la méthode de séquençage utilisée.

2. Séquençage direct

2.1. Préparation des échantillons

Afin de procéder au séquençage direct, les amplicons générés par la PCR2 pour le gène préS et les PCR 2a et 2b pour le gène S ont été purifiés à l'aide du kit « Qiaquick PCR Purification » (Qiagen®) en suivant le protocole recommandé par le fournisseur. Ces amplicons purifiés ont ensuite subi une PCR de séquençage à l'aide du kit « BigDye Terminator V.1.1 » (Life Technologies®). Chaque amplicon de PCR2 a subi une PCR de séquençage soit avec l'amorce sens soit avec l'amorce antisens ayant servi à leur amplification en PCR2. Les réactions ont été réalisées dans des tubes différents afin d'obtenir diverses séquences qui seront superposées au moment de l'analyse.

Le mélange réactionnel utilisé pour chaque PCR de séquençage est présenté dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Mélange réactionnel utilisé pour réaliser la PCR de séquençage direct des gènes préS et S du virus de l'hépatite B.

Réactifs	Volume pour une réaction
« BigDye Terminator »	2 µL
« BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer »	1 µL
Amorce sens ou antisens 1 µM	3,2 µL
Matrice (produit de PCR2)	3 µL (jusqu'à 6 µL pour les échantillons avec une faible charge virale)
Eau sans ADNase	qsp 15 µL

Le programme de PCR de séquençage direct des gènes préS et S est présenté dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Programme de PCR utilisé pour réaliser la PCR de séquençage des gènes préS et S du virus de l'hépatite B.

Programme PCR de séquençage	Nombre de cycles
96°C pendant 10 secondes	25 cycles
50°C pendant 5 secondes	
60 °C pendant 4 minutes	

Une seconde purification a ensuite été réalisée sur les produits de réactions à l'aide du kit « Dye EX® 2.0 Spin kit » (Qiagen®) selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons ont été séquencés à la plateforme de séquençage du CHRU de Nancy (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems®).

2.2. Analyse des données brutes

Les données générées ont été récupérées sous forme d'électrophorégramme pour chaque réaction de séquençage. Le logiciel Mega6 a été utilisé pour analyser ces électrophorégrammes et déterminer la séquence en acides nucléiques de chaque amplicon. Une lecture visuelle des électrophorégrammes a été réalisée pour vérifier les données générées. Pour chacune des deux régions préS et S de chaque patient, une séquence « synthèse », combinant les données obtenues pour les brins sens et antisens, a été réalisée.

Les séquences obtenues ont ensuite été alignées avec les séquences consensus dont la construction a été décrite précédemment (génotype A, C ou D selon la cohorte de patients étudiée) à l'aide de la fonction « Align » par ClustalW du logiciel Mega6. Puis, les séquences ont été traduites en acides aminés afin d'observer les mutations majoritaires (non-synonymes et synonymes) sur les souches de VHB de chacun des patients étudiés. Un exemple d'analyse est présenté Figure 41.

La quantité d'ADN présente dans les échantillons a ensuite été dosée à l'aide du fluorimètre QuBIT® 2.0 et du kit « Qubit® dsDNA HS (« high sensitivity ») assay kit » (Life technologies) selon les recommandations du fabricant. Le fluorimètre a préalablement été calibré à l'aide d'un témoin négatif et un témoin positif fournis dans le kit. Puis, la quantité d'ADN présente dans l'échantillon a été dosée à partir d'1 µL d'amplicon de chaque échantillon, après que celui-ci ait été mis en contact pendant deux minutes avec 199 µL d'une solution tampon comprenant 1 µL de réactif Qubit® (sonde fluorescente) interagissant avec l'ADNdb. Ce kit a été conçu pour détecter des échantillons à de faibles concentrations d'ADN de l'ordre de 10 pg/µL. A cette étape, les échantillons ont pu être stockés à -20°C.

3.2. Préparation de la « librairie »

L'étape suivante consistait à préparer une « librairie » pour chaque échantillon de patients. Elle se divise en trois sous étapes : la fragmentation des amplicons, la ligation aux adaptateurs barcodés compatibles avec la technique Ion Torrent et, pour finir, la sélection des fragments de taille attendue. Afin de préparer cette « librairie », le kit « Ion Xpress™ Plus Fragment Library kit » (Life Technologies) comprenant les trousseaux « Ion Shear™ Plus », « Ion Plus Fragment Library » et « Ion Xpress™ Barcode Adaptaters » a été utilisé.

La fragmentation a été réalisée à l'aide du kit « Ion Shear™ Plus » (Life Technologies) sur 100 ng d'ADN obtenus pour chacun des échantillons. Après avoir mélangé cinq secondes les tampons « Ion Shear™ Plus 10X » et « Ion Shear™ Plus Enzyme mix II » nécessaires à la réaction de fragmentation, le mélange réactionnel présenté dans le Tableau 15 a été réalisé sur glace dans des tubes LoBind.

Tableau 15 : Mélange réactionnel utilisé pour fragmenter les amplicons obtenus à partir des gènes S et prés, nécessaire pour la technique de séquençage haut-débit Ion Torrent.

Réactifs	Volume pour une réaction
100 ng d'amplicon	x µl
« Ion Shear™ Plus 10X Reaction buffer »	5 µl
H ₂ O sans nucléase	35 - x µl
Total	40 µl

A ce mélange, 10 µl de « Ion Shear™ Plus Enzyme mix II » ont été ajoutés et mélangés immédiatement par aspiration-refoulement avant de transférer le mélange dans un thermocycleur préalablement chauffé à 37°C. Le temps de fragmentation était de cinq minutes pour les gènes prés

et de six minutes pour les gènes S. La réaction de fragmentation a ensuite été stoppée précisément, à cinq ou six minutes à l'aide de 5 µL de « Ion Shear™ Stop Buffer ».

Ces amplicons, alors fragmentés, ont été purifiés à l'aide du kit « Agencourt® AMPure® XP » (Life Technologies). Cette purification fait intervenir une technique d'Immobilisation Réversible en Phase Solide (SPRI) et des billes magnétiques. Les billes présentes dans le réactif « Agencourt® AMPure® XP » ont été remises en suspension puis, 99 µL de cette suspension ont été ajoutés aux amplicons fragmentés (soit 1,8 fois le volume de l'échantillon). Les échantillons ont ensuite été laissés à température ambiante pendant cinq minutes. Le tube a ensuite été déposé sur un portoir magnétique « DynaMag™ -2 » jusqu'à ce que la solution soit limpide. Après avoir éliminé le surnageant, des lavages successifs ont été réalisés à l'aide de 500 µl d'éthanol 70 %. A la suite des trois lavages, le surnageant a été éliminé et 25 µL de Low TE (tampon Tris HCl/Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique) ont été dispersés sur les billes des tubes retirés du portoir magnétique. Après avoir été mélangés, les tubes ont, à nouveau, été transférés sur le portoir magnétique pour séparer les billes magnétiques de l'éluât contenant l'ADN purifié. Celui-ci a été récupéré et stocké à -20°C.

L'étape suivante a consisté à lier les amplicons, fragmentés et purifiés, à des adaptateurs barcodés afin d'identifier les différents échantillons qui seront analysés sur une même puce. Une des extrémités est biotinylée pour permettre, ultérieurement, la sélection des sphères ADN positives.

Dans chacun des tubes PCR contenant les amplicons fragmentés et purifiés, les réactifs, décrits dans le Tableau 16, ont été ajoutés.

Tableau 16 : Mélange réactionnel utilisé pour fixer des adaptateurs barcodés à chaque amplicon lors de la préparation des échantillons pour le séquençage haut-débit Ion Torrent.

Réactifs	Volume pour une réaction
« 10X ligase buffer »	10 µl
« Ion P1 Adapter »	2 µl
« dNTP Mix »	2 µl
H ₂ O sans nucléase	49 µl
« DNA ligase »	2 µl
« Nick Repair Polymerase »	8 µl
Amplicons fragmentés et purifiés	25 µL
Ion Xpress™ Barcode X	2 µl

A cette étape, un barcode différent a été assigné à chaque échantillon testé. Chaque tube a ensuite été transféré dans un thermocycleur pour suivre le programme de ligation comprenant une étape de 15 minutes à 25°C suivit par une étape de cinq minutes à 72 °C.

Les échantillons ont, à nouveau, été purifiés à l'aide du kit « Agencourt® AMPure® XP ». Seule la quantité de réactif initial à ajouter varie par rapport à la précédente purification. Le volume de réactif utilisé pour purifier les amplicons barcodés de 200 pb était de 140 µl (soit 1,4 fois le volume de l'échantillon).

La dernière étape pour préparer la « librairie » consiste à sélectionner les amplicons barcodés de taille optimale, soit 330 pb environ (fragments d'ADN de 200 pb et adaptateurs barcodés de 130 pb), à l'aide de gels « E-Gel® SizeSelect™ Agarose Gels » à 2 % et de l'équipement « E-Gel® iBase™ Power System » et « E-Gel® Safe Imager™ Transilluminator » (Invitrogen). Cette technique permet d'observer, en temps réel, la migration des fragments d'ADN dans un gel contenant du SYBR green, se liant à l'ADN double brin et qui peut être détecté sous lumière bleue. Cette dernière provoque des dommages minimes à l'ADN comparé aux rayons ultra-violet. Des puits de récupération sont présents au niveau des E-gels, permettant de récupérer les amplicons barcodés de la taille d'intérêt (Figure 42).

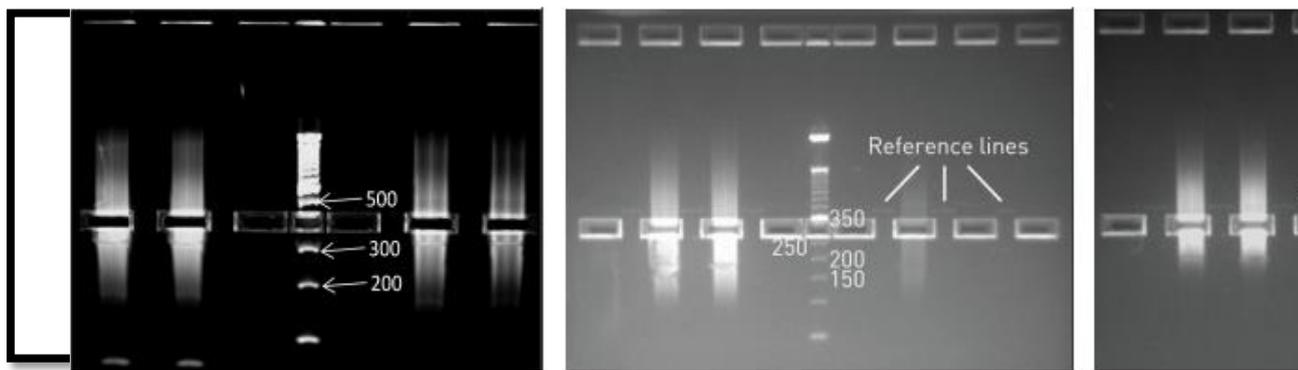


Figure 42 : Dispositif E-gel utilisé pour récupérer les amplicons barcodés de la taille attendue lors de la préparation des échantillons destinés au séquençage haut-débit Ion Torrent.

La taille des fragments a pu être évaluée à l'aide d'un marqueur de poids moléculaires (25 ng/µl). Dans chacun des puits, 20 µL d'ADN barcodé ont été déposés. Dans les puits de récupération, 25 µL d'eau sans nucléases ont été déposés pour récupérer l'ADN barcodés après la migration (12 – 14 minutes). Lorsque la bande de la taille attendue s'est retrouvée au niveau des puits de récupération, les échantillons ont été récupérés. Afin de récupérer la totalité des amplicons dans les puits, 10 µL d'eau sans nucléases ont été ajoutés pour rincer les puits et transférés dans les mêmes tubes de récupération (volume final de 30 µL environ).

3.3. Amplification des différentes « librairies »

Les différentes « librairies » obtenues pour chaque gène et chaque patient ont ensuite été amplifiées selon le mélange réactionnel et le programme présentés dans les Tableaux 17 et 18.

Tableau 17 : Mélange réactionnel utilisé pour amplifier la « librairie » destinée au séquençage haut-débit Ion Torrent.

Réactifs	Volume pour une réaction
SuperMix PCR Platinum haute fidélité	100 µl
Mélange d'amorces d'amplification de la « librairie »	5 µl
« Librairie » (après sélection par E-gel)	25 µl
Total	130 µl

Tableau 18 : Programme de PCR utilisé pour amplifier la « librairie » destinée au séquençage haut-débit Ion Torrent.

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95 °C	5 minutes	1 cycle
Dénaturation	95 °C	15 secondes	8 cycles
Hybridation	58 °C	15 secondes	
Elongation	70 °C	1 minute	

Les échantillons ont, à nouveau, été purifiés à l'aide du kit « Agencourt® AMPure® XP ». Seule la quantité de réactif initiale à ajouter varie par rapport aux précédentes purifications. Le volume de réactif utilisé pour une « librairie » constituée d'amplicons barcodés de 200 bases était de 195 µl (soit 1,5 fois le volume de l'échantillon). Cette étape permet d'éliminer les nucléotides libres et les éventuels dimères d'amorces formés lors de la PCR.

3.4. Mélange équimolaire des « librairies », PCR en émulsion et enrichissement sur « Ion OneTouch™ Enrichment System »

A partir de ces étapes, les différentes « librairies » créées ont été mélangées et préparées pour procéder à la réaction de séquençage sur puces. Différents types de puces ont été utilisées : des puces 314 pour les souches de génotypes D et des puces 316 pour les souches de génotypes A et C. Une puce par gène a été réalisée dans chacune des expériences. Il existe quelques différences selon le type de puce utilisée (314 ou 316). Pour une puce 314, la concentration finale du mélange équimolaire des « librairies » était de 2,4 pg/µL (correspondant à 16 pM) tandis que la concentration finale pour les puces 316 était de 5,3 pg/µL (correspondant à 35 pM). Afin de procéder au mélange équimolaire des « librairies », la quantité d'amplicons présente dans chaque « librairie » a été dosée à l'aide du fluorimètre Qubit®. Pour cela, 3 µL de la « librairie » obtenue pour chaque patient ont été dosés, après avoir été préalablement mis en contact pendant deux minutes avec 197 µL d'une solution tampon comprenant 1 µL de réactif Qubit® interagissant avec l'ADNdb. A partir des quantités obtenues, chaque « librairie » barcodée a été diluée dans du LowTE à une concentration finale de 24 ou 53 pg/µL selon la puce utilisée. Puis, 5 µL de chaque échantillon ont été mélangés

dans un tube LoBind. Ce mélange équimolaire des « librairies » barcodées a ensuite été dilué au 10^{ème} pour obtenir une concentration finale de 2,4 ou 5,3 pg/μL, selon la puce utilisée, dans un volume de 30 μL.

A partir de ce mélange, une PCR en émulsion a été réalisée. Ce procédé permet de générer des micro-réacteurs contenant une seule sphère où, idéalement, une unique copie d'ADN va être amplifiée par PCR. Cette PCR en émulsion a été réalisée à l'aide de l'appareil « Ion OneTouch™ 2 » (Life Technologies). L'amplification clonale des « librairies » sur les sphères (« Ion Sphere Particules », ISP) a été réalisée grâce au kit « Ion Personal Genome Machine (PGM)™ Template OT2 200 » (Life Technologies). L'utilisation du « Ion OneTouch™ 2 » est décrite dans le manuel en ligne « Ion PGM™ Template OT2 200 Kit user guide ». Ainsi, 25 μL du mélange équimolaire des « librairies » (2,4 ou 5,3 pg/μL) ont été ajoutés au mélange réactionnel suivant : 25 μL d'H₂O, 500 μL de « Reagent mix », 300 μL de Reagent B », 50 μL d' « enzyme mix », 2,4 ou 5,3 pg/μL du mélange équimolaire des « librairies » ont été ajoutés.

Ce mélange a été mis en contact avec 100 μL d'ISPs, mélangé, puis transféré dans le filtre du « Ion OneTouch » avec de l'huile pour la réaction en émulsion. Le filtre est ensuite déposé au niveau du « Ion OneTouch™ 2 », préalablement préparé pour réaliser la PCR en émulsion. Une centrifugation est réalisée par l'appareil à la fin de la PCR en émulsion afin de récupérer le culot contenant les sphères avec les « librairies » fixées dessus. Après avoir éliminé le surnageant, les sphères ont été lavées avec 500 μL de « Ion OneTouch Wash Solution » fournies dans le kit. Une seconde centrifugation à 15 000 g pendant deux minutes et 30 secondes a été réalisée et le surnageant a, de nouveau, été éliminé sauf 100 μL. Les sphères ont été remises en suspension dans les 100 μL restants.

Afin de vérifier la qualité des sphères, et la proportion des sphères non enrichies, 2 μL de cette solution ont été utilisés. Le kit « Ion Sphere Quality Control » a été utilisé pour réaliser le mélange réactionnel suivant : 2 μL de la solution contenant les sphères, 19 μL d' « Annealing Buffer » et 1 μL de « Ion Probes ». Ce mélange a été chauffé à 95°C pendant deux minutes puis à 37°C pendant deux minutes. Le mélange a ensuite été lavé avec 200 μL de « Quality control wash solution » et centrifugé à 15 500 g pendant une minute et 30 secondes. Le surnageant a été éliminé sauf 10 μL. Ce lavage a été réalisé trois fois de suite. Lors du dernier lavage, 190 μL de « Quality control wash solution » ont été ajoutés et transférés dans un tube pour un dosage avec le fluorimètre Qubit®. Le calcul du rapport entre les valeurs des fluorochromes AF488 et AF467 (après déduction du bruit de fond) a permis de déterminer le pourcentage de sphères positives. Celui-ci doit idéalement se situer entre 10 et 30 %.

L'étape suivante avait pour but de sélectionner et d'enrichir les sphères dites « matrice positive » avec l'automate « Ion OneTouch™ Enrichment System » (Life Technologies) et les réactifs

du kit « Ion PGM™ Template OT2 200 Kit ». Sur une barrette de puits, différents réactifs ont été préparés et déposés dans les puits correspondants suivant les recommandations du fournisseur : une solution contenant les billes magnétiques « Dynabeads MyOne Streptavidin C1 beads » permettant l'immobilisation des sphères présentant une molécule d'ADN (réaction biotine/streptavidine) sur l'aimant pour la purification, des solutions de lavage, une solution Melt-off contenant du NaOH permettant la dénaturation de l'ADNdb en ADNs_b au niveau des sphères. Une solution de neutralisation a préalablement été déposée dans le tube de récupération des sphères dites « matrice-positive ». A la fin du run, 230 µL de sphères enrichies ont été récupérés dans le tube de récupération et stockés à +4°C.

3.5. La réaction de séquençage sur le « Ion Personal Genome Machine (PGM) »

L'étape suivante consiste à planifier le run sur un ordinateur de l'appareil PGM (la méthode utilisée, le nom des barcodes, le type de puce, la séquence de référence...), nettoyer le PGM (lavage au chlorite, lavage à l'eau) et initialiser le PGM (préparation des bouteilles de lavage, préparation des dNTPs, Nucleosides triphosphates), selon les recommandations du fournisseur, afin de procéder au séquençage sur puces. Les recommandations du fournisseur sont présentées sur le guide « Ion PGM Sequencing 200 kit v2 » de Life Technologies.

Avant de procéder aux dépôts des sphères enrichies dans la puce, une étape d'hybridation des amorces a été réalisée à l'aide du kit « Ion PGM sequencing reagents 200 v2 ».

Pour les puces 314, 115 µL de l'échantillon contenant les sphères enrichies ont été transférés dans un tube contenant 5 µL de « Control Ion Sphere particles » (contrôle interne). Après une centrifugation à 15 500 g pendant deux minutes, le surnageant sauf 3 µL a été éliminé et les sphères présentes dans le culot ont été mises en contact avec 3 µL d'amorces de séquençage (« Sequencing Primer »). Le mélange a ensuite été transféré dans un thermocycleur pour suivre le programme suivant permettant l'hybridation des amorces : 95°C pendant deux minutes, puis 37 °C pendant deux minutes et 10°C jusqu'à ce que l'étape de « Chip Check » soit réalisée par l'appareil. Après l'étape de « Chip Check » (sur le PGM) qui consiste à vérifier le bon état de la puce, 1 µL de polymérase a été ajouté à l'échantillon présent dans le thermocycleur et le mélange a été incubé cinq minutes à température ambiante (volume final de 7 µL).

Pour les puces 316, la totalité de l'échantillon contenant les sphères enrichies (230 µL) ont été transférés dans un tube contenant 5 µL de « Control Ion Sphere particles ». Après une centrifugation à 15 500 g pendant deux minutes, le surnageant, sauf 15 µL, a été éliminé et les sphères présentes dans le culot ont été mises en contact avec 12 µL de « Sequencing Primer ». Le mélange a ensuite été transféré dans un thermocycleur pour suivre le programme suivant

permettant l'hybridation des amorces : 95°C pendant deux minutes, 37°C pendant deux minutes et 10°C jusqu'à ce que l'étape de « Chip Check » soit réalisée par l'appareil. Après cette étape, 3 µL de polymérase ont été ajoutés à l'échantillon présent dans le thermocycleur et le mélange a été incubé cinq minutes à température ambiante (volume final de 30 µL).

Après avoir éliminé le liquide résiduel présent dans les puces, les échantillons ayant subi l'hybridation des amorces ont été déposés dans les puces. Pour la puce 314, 7 µL ont été déposés doucement dans la puce tandis que 30 µL ont été déposées dans la puce 316. Des étapes de centrifugation et aspiration/refoulement ont été réalisées pour répartir de façon homogène le volume réactionnel sur la puce. La réaction sur puce a ensuite débuté sur le « Ion PGM™ System » (ThermoFisher Scientific).

3.6. Analyse des données brutes

Les puces sont validées par l'analyse du pourcentage de chargement de la puce, du nombre de lectures (« reads ») générées, au total et par échantillon, de la taille moyenne des fragments, de la qualité (précision) des échantillons (Q score ou Phred score), et du résultat obtenu pour le « Control Ion Sphere particles ». Les fichiers BIM (« Building Information Model ») et BAM (« Binary Alignment Map ») générés pour chaque patient ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel NextGENe (SoftGenetics). Ce dernier permet d'aligner les différents « reads » générés par le séquenceur sur une séquence de référence. Nous avons utilisé une séquence consensus (selon le génotype et le gène étudié).

Ainsi, grâce au logiciel NextGENe, la fréquence de chaque acide nucléique à chaque position a pu être extraite dans un fichier Excel généré par le logiciel. Le seuil défini pour la fréquence de mutation a été fixé à 2 %, après analyse en triplicat des souches infectant un même patient. En effet, après avoir amplifié séparément le gène S d'un même patient à l'aide de l'ADN polymérase de haute fidélité (« Phusion® High-Fidelity DNA polymerase »), le séquençage haut-débit a été réalisé pour chaque échantillon amplifié (n=3). La comparaison des séquences S obtenues par les trois essais de séquençage a montré que, généralement, les mutations présentes à des fréquences inférieures à 2 % n'étaient pas observées dans les trois échantillons analysés. Ce seuil a ensuite été appliqué à toutes les autres analyses (paramètre introduit dans le logiciel Next-Gen). Pour toutes les analyses, une correction visuelle a été réalisée pour éliminer les mauvais alignements par rapport à la séquence consensus construite à partir de HBVdb. La technologie Ion Torrent est connue pour ses erreurs commises au niveau des délétions, des insertions et des régions homopolymériques. Ainsi, pour confirmer les mutations, insertions et délétions observées en séquençage haut-débit, une correction visuelle des séquences a été réalisée et les séquences obtenues en séquençage haut-débit pour chaque patient ont été comparées aux séquences obtenues en séquençage direct, pour les variants

majoritaires (supérieurs à 20 %). Par exemple, les délétions observées pour un patient de la cohorte de VHB de génotype C ont également été observées en séquençage direct.

La comparaison des données obtenues avec la séquence consensus a permis de déterminer les mutations présentes et leur fréquence (nombre de « reads » mutés / le nombre total de « reads » à cette position) dans la population virale présente chez un patient. De plus, une analyse plus approfondie des mutations observées en acides aminés a été réalisée au niveau de la région MHR de la cohorte de génotype A afin de déterminer les différents haplotypes. Les haplotypes correspondent aux différentes quasi-espèces présentes, ici au niveau de la MHR, où des mutations sont co-localisées sur le même génome viral (sur le même « read »). Cela revient à évaluer les différentes quasi-espèces présentes dans la population virale chez un même patient au niveau de cette région. Les « reads » générées étant de 200 pb environ, seules des régions spécifiques ne dépassant pas cette taille peuvent être analysées, comme la MHR.

4. Phylogénie

Le génotype de chaque souche a été déterminé par le logiciel GREG⁺ (CHU Grenoble, France). Ce logiciel est basé sur la comparaison des séquences du gène S et, ou de la RT du VHB obtenues par séquençage direct avec une base de données (database non accessible). Les génotypes ont ensuite été confirmés par la fonction BLAST du logiciel NCBI et la création d'un arbre phylogénique à partir des séquences consensus obtenues grâce au logiciel HBVdb (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Lyon). Le sous-génotype a été déterminé à l'aide d'un arbre phylogénétique réalisé avec le logiciel Mega6 (Tamura *et al.*, 2013). La méthode Neighbor-joining a été utilisée avec un bootstrap de 1 000 répétitions. La matrice des distances utilisée était Kimura (« Kimura 2 parameter »). L'analyse a été réalisée sur les séquences obtenues par séquençage direct.

Pour déterminer le sous-génotype des patients de génotype A, les séquences de référence des sous-génotypes A1, A2, A3 et A5 décrites par Cai *et al.*, 2016 (KP234050-KP234053) ont été utilisées pour réaliser un arbre phylogénétique. Pour les sous-génotypes A4 et A6, des séquences décrites dans la database NCBI (« National Center for Biotechnology Information ») ont été utilisées (KM606737 et CQ331047, respectivement). Les sous-génotypes de génotypes D ont été obtenus à l'aide de la fonction Blast (« Basic Local Alignment Search Tool ») de NCBI.

Le sous-type du VIH des patients co-infectés a été déterminé en utilisant la fonction Blast de NCBI pour le gène de la protéase et de la RT du VIH (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5. Analyse des mutations

A partir des données brutes obtenues en séquençage direct et en séquençage haut-débit, des analyses ont été réalisées pour caractériser les souches virales et les quasi-espèces à l'aide de divers outils présentés ci-dessous. La comparaison des séquences de chaque groupe de patients a été utilisée pour mettre en évidence des mutations signatures correspondant aux mutations retrouvées spécifiquement chez les « non-répondeurs » ou les « répondeurs ».

5.1. Analyse de la prédiction antigénique : le logiciel AnTheProt

L'antigénicité des protéines d'enveloppe du VHB a été prédite à partir de séquences consensus de chaque génotype et du logiciel AnTheProt (Deléage *et al.*, 2001 ; <http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>). Ce logiciel utilise des modèles mathématiques et des données physico-chimiques pour prédire la conformation des protéines. Les résultats sont représentés sous forme de profils. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au profil antigénique prédit par Parker *et al.*, en 1986. Ce modèle est basé sur trois paramètres : l'hydrophilie déterminée par le temps de rétention en chromatographie haute performance en milieu liquide (HPLC) de peptides synthétiques, l'accessibilité et la flexibilité atomiques des acides aminés d'une protéine. Ce logiciel produit un profil antigénique dont la hauteur du pic est proportionnelle à l'antigénicité prédite. Les séquences en acides aminés de chaque patient ont été analysées à l'aide du logiciel. L'influence d'une mutation précise sur l'antigénicité prédite a été évaluée en introduisant cette mutation dans un profil sauvage. La comparaison de ce profil muté avec un profil sauvage a permis de mettre en évidence ou non l'influence de cette mutation d'intérêt sur l'antigénicité prédite. De plus, des données chiffrées (Figure 43) fournies par le logiciel ont permis d'évaluer le pourcentage de diminution ou d'augmentation du pic antigénique en présence des différentes mutations testées. Le seuil de significativité retenu pour la diminution de l'antigénicité prédite a été estimé à 15 % à partir d'études portant sur le VHC.

* Antigenicity(Parker) >= 50 And (Hydrophobicity < 0.1 Or hydrophilicity > -0.1) And accessibility >= 0.62;						
KD: Hydrophobicity (Kyte & Doolittle), HW: Hydrophilicity (Hopp & Woods),						
SA :Solvent accessibility(Boger), PA : Antigenicity (% Parker), WE: Antigenicity Welling						
		KD	HW	SA	PA	WE
1	M	-.012	-.008		0	41 -.592
2	E	-.027	-.016		0	27 -.599
3	N	-.043	-.01		86	22 -.602
4	I	-.051	-.01		86	8 -.629
5	T	-.033	-.035		43	4 -.594
6	S	.116	-.122		22	0 -.477
7	G	.179	-.127		31	0 -.393
8	F	.055	-.118		33	0 .017
9	L	.146	-.146		20	0 .13
10	G	.24	-.189		17	0 .241
11	P	.334	-.22		15	0 .266
12	L	.354	-.206		15	0 .393
13	L	.206	-.164		26	0 .284
14	V	.25	-.174		17	0 .327
15	L	.274	-.146		20	0 .308
16	Q	.254	-.16		21	0 .181

Figure 43 : Exemple de données chiffrées fournies par le logiciel AnTheProt pour analyser l'antigénicité prédite. Les données du profil antigénique générées selon le modèle de Parker et al. (1986) sont représentées en « gris » sur la figure.

D'autres modèles caractérisant les protéines sont également disponibles avec ce logiciel. Un profil décrit l'hydrophobicité d'après Kyte et Doolittle (1982). Ce profil est basé sur l'énergie nécessaire pour transférer la chaîne latérale de chaque acide aminé d'un solvant polaire à un solvant non polaire (eau à éthanol). Un autre profil décrit l'antigénicité prédite à l'aide d'une méthode élaborée à partir d'une échelle d'antigénicité dérivée d'epitopes connus (Welling *et al.*, 1985). L'hydrophilie a été évaluée grâce à une méthode décrite par Hopp et Woods (1981) basée sur le même principe que Kyte et Doolittle (1982). Un profil décrit également l'accessibilité dans le solvant d'après la méthode de Boger *et al.* (1986) qui se base sur la détermination des fractions accessibles moyennes de chaque acide aminé. Un dernier profil évalue les régions hélicoïdales, les domaines transmembranaires pouvant être présents au sein de la protéine étudiée d'après l'échelle d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle (1982) et la règle indiquant que le côté cytoplasmique d'une membrane est plutôt chargé positivement tandis que le côté externe est plutôt chargé négativement, décrite par Von Heijne (1992). Un exemple des différents profils pouvant être générés par le logiciel AnTheProt à partir d'une séquence en acides aminés de protéine S est présenté sur la Figure 44.

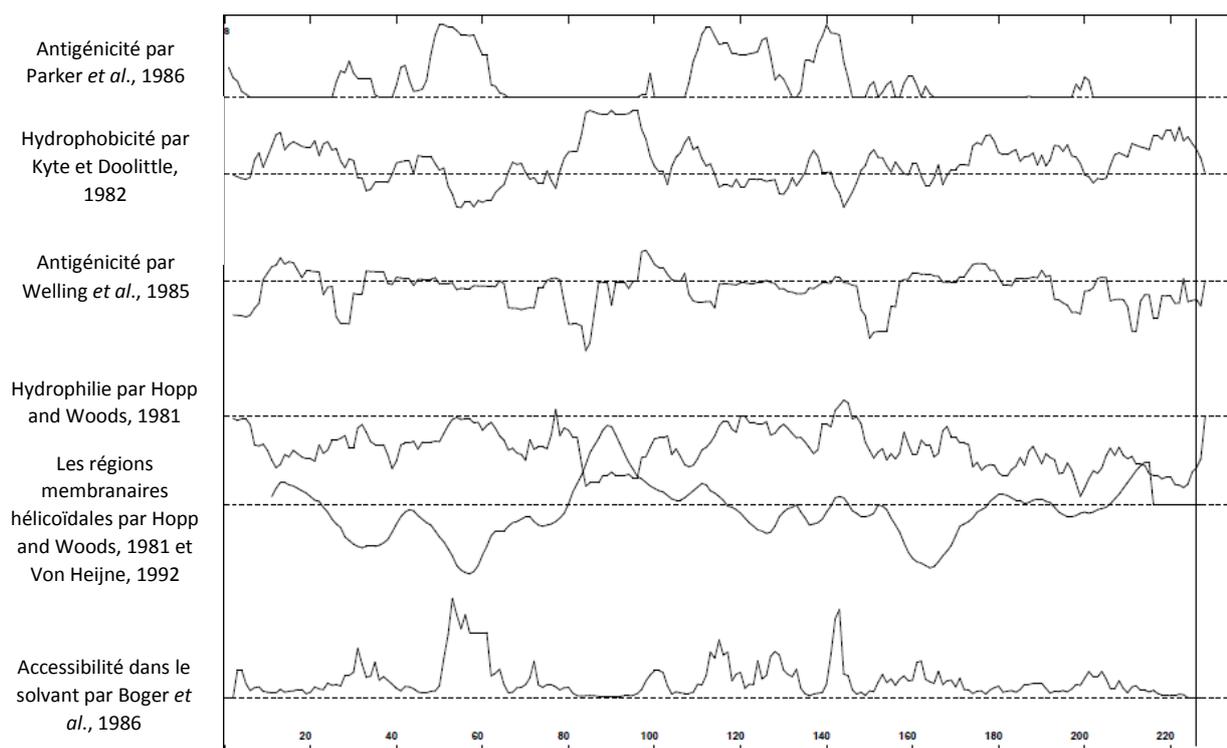


Figure 44 : Différents profils prédictifs (antigénicité, hydrophobicité, hydrophilicité, régions membranaires hélicoïdales, accessibilité au solvant) décrits par le logiciel Antheprot pour caractériser les propriétés physico-chimiques d'une protéine à partir d'une séquence en acides aminés donnée (exemple de la protéine S d'une séquence consensus génotype D).

5.2. Pression de sélection

La pression de sélection a été analysée à l'aide du logiciel Mega6 en utilisant le test Z. L'hypothèse suivante a été utilisée : $dN = dS$ où dN correspond au nombre de mutations non-synonymes et dS correspond au nombre de mutations synonymes. La pression de sélection a été évaluée sur les régions préS et S ainsi que sur la MHR. La méthode utilisée était Nei-Gojobori avec une correction de type Jukes-Cantor. Pour estimer la variance, la méthode bootstrap avec 1 000 répétitions a été utilisée. Ainsi une pression de sélection a été considérée comme positive lorsque le nombre de mutations non-synonymes était supérieur au nombre de mutations synonymes. Les résultats étaient considérés comme significatifs lorsque la valeur p était inférieure à 0,05.

5.3. Analyse de la diversité entre les patients

Le calcul de la diversité a été utilisé pour caractériser la divergence d'évolution moyenne, correspondant à l'hétérogénéité génétique entre les patients. Cette diversité a été déterminée à l'aide de la méthode Kimura (« Kimura 2-parameters ») proposée par le logiciel Mega6 (Tamura *et al.*, 2013). L'analyse a été réalisée sur les séquences en acides nucléiques obtenues par séquençage haut-débit (variants majoritaires et minoritaires).

5.4. Analyse de la complexité des quasi-espèces

La complexité des quasi-espèces virales a été évaluée à l'aide des données en acides aminés obtenues par séquençage haut-débit. La complexité a été déterminée en utilisant l'entropie de Shannon (S_n) qui varie de 0 (pas de complexité) à 1 (complexité maximum) [Ramirez *et al.*, 2013 ; Hayer *et al.*, 2014]. Elle a été évaluée dans un premier temps pour chaque position en acide aminé du gène S, de la région préS et de la région MHR. La complexité moyenne de chaque échantillon (patient) a été déterminée en calculant la somme des entropies de Shannon déterminées pour chaque position (formule suivante), le tout divisé par le nombre total d'acides aminés de chaque gène (226 aa pour le gène S, 163 aa (génotype D) ou 174 aa (génotype A et C) pour le gène préS et 71 aa pour la région MHR).

$$S_n = \frac{-\sum_i (p_i \ln p_i)}{\ln N}$$

où p_i correspond à la fréquence des différentes mutations en acides aminés à chaque position et N correspond au nombre de séquences analysées (« read ») à cette position.

Dans un second temps, la complexité moyenne a été évaluée sur la région MHR de 11 patients de génotype A en prenant en compte les haplotypes (co-localisation de mutations sur le même génome viral). La formule suivante a été utilisée :

$$S_n = \frac{-\sum_i (p_i \ln p_i)}{\ln (h)}$$

où p_i correspond à la fréquence des haplotypes dans la population virale et h correspond au nombre d'haplotype total pour chaque patient sur la MHR.

6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California, USA). Les tests Mann and Whitney et t-Student ont été utilisés pour comparer les différences entre les groupes et entre les sous-groupes pour les différents paramètres de l'étude. Une valeur $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

IV. Modèle murin : modèle d'évaluation de la réactivité des anticorps vaccinaux murins face à un peptide présentant des mutations signatures décrites dans la cohorte de génotype D

Le but de cette étude était de voir l'influence de certaines mutations d'intérêts sur la reconnaissance par des anticorps vaccinaux. Ainsi, après avoir produit des anticorps vaccinaux sur un modèle murin. La réactivité de ces anticorps contre des peptides sauvages ou préalablement mutés sur les positions d'intérêts a été testée en ELISA (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »).

1. Production des peptides

Une étude de Tajiri *et al.* (2010) a décrit un peptide se situant sur une partie de la région MHR du gène S où nous avons pu observer certaines mutations signatures (incluant la position 125). Ce peptide était de génotype C : NH₂-PCKTCTIPAQGTSMFPS-CONH₂. L'alignement du peptide avec la séquence consensus de génotype C déterminée précédemment a été vérifié.

Notre travail portait sur les mutations observées dans la cohorte de patients infectés par des souches de génotype D. Ainsi, la séquence du peptide de génotype D a été déterminée en alignant la séquence consensus de génotype D et le peptide de génotype C de Tajiri *et al.* (2010).

Séquence peptidique d'intérêt de génotype D dite sauvage :

NH₂-PCRTCTTPAQGTSMYPS-CONH₂

La mutation d'intérêt sT125M a ensuite été insérée dans ce peptide (Figure 45) :

NH₂-PCRTCMTPAQGTSMYPS-CONH₂.

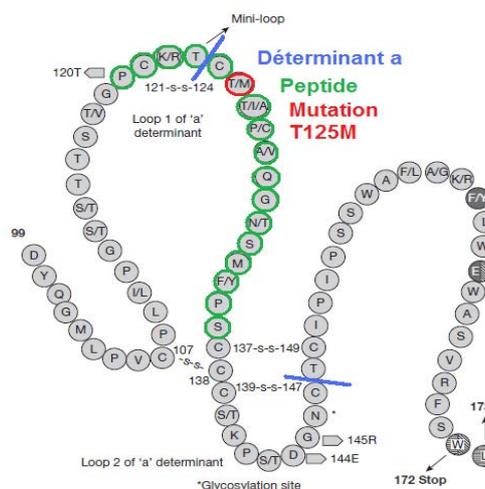


Figure 45 : Représentation schématique de la boucle antigénique de la petite protéine de surface du VHB où le déterminant « a » est délimité en bleu et la position du peptide d'intérêt est entourée en vert. La position de la mutation sT125M du peptide muté est entourée en rouge [Locarnini et Yuen, 2010 ; Tajiri *et al.*, 2010].

Le peptide comprenant le couple de mutation sT125M et sP127T a également été choisi :

- NH₂-PCRTCMTTAQGTSMYPS-CONH₂.

D'autres peptides ont été testés :

- sQ129H : NH₂-PCRTCTTPAHGTSMYPS-CONH₂
- sT131A, sM133I et Y134H : NH₂-PCRTCTTPAQGASIHPS-CONH₂
- sS136Y : NH₂-PCRTCTTPAQGTSMYPY-CONH₂

Les peptides sauvages et mutés de génotype D ont été synthétisés, couplés à de l'albumine sérique bovine (BSA) pour favoriser l'immuno-absorption des peptides au fond des plaques ELISA. Le pont disulfure en position sT121 – 124 a été préservé lors de la fabrication des peptides. Les différents peptides ont été produits par la firme ProteoGenix (France).

2. Immunisation des souris avec du vaccin anti-VHB

Des souris âgées de dix semaines ont été immunisées avec un vaccin contre le VHB contenant 20 µg/mL de la petite protéine SHBs (Engerix B®). Le schéma type d'immunisation était le suivant : une injection à jour zéro (J0) et une injection trois semaines plus tard (S3) avec 100 µL de vaccin correspondant à 2 µg de protéine SHBs. Les injections ont été réalisées par voie intra-péritonéale après désinfection à l'alcool de la zone d'injection. Selon le protocole, les souris ont ensuite été sacrifiées à la quatrième semaine sous anesthésie, par dislocation cervicale. Le sang a été rapidement prélevé après le sacrifice. Puis, le sérum a été récupéré par centrifugation à 4°C pendant 15 minutes à 10 000 rpm.

3. ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »)

3.1. Solutions utilisées pour la réalisation de la réaction ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »)

Diverses solutions ont été produites afin de réaliser les tests ELISA : le tampon de coating (tampon carbonate 0,2 M à pH 9,6) qui a servi à immuno-adsorber les peptides au fond des puits ; le PBS (« Phosphate Buffered Saline ») qui a été utilisé pour les dilutions des sérums et des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de Raifort (HRP ; « HorseRadish Peroxidase ») ; le tampon de lavage composé de PBS et de Tween-20 utilisé pour les lavages des puits et du TMB (3,3',5,5' – tetramethylbenzidine) permettant la réaction enzymatique.

3.2. Reconstitution des peptides couplés à la BSA

Les peptides couplés à la BSA ont été mis en suspension dans du tampon de coating à une concentration finale de 5 mg/mL pour tous les peptides.

3.3. Protocole ELISA

Dans un premier temps, les plaques ELISA ont été adsorbées avec 5 µg/mL du peptide couplé à la BSA, sauvage ou muté selon la position testée, dilués dans la solution de coating, à raison de 100 µL dans chaque puits. Les puits « blancs réactifs » ont aussi été adsorbés avec du peptide couplé à la BSA. La plaque a ensuite été scellée et incubée toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les puits ont été lavés quatre fois avec 200 µL de tampon de lavage en respectant un temps de trempage d'une minute entre chaque lavage et en séchant bien les puits après le dernier lavage. Puis, 100 µL de sérum de souris, dilués dans du PBS au 1/100, 1/1 000 et 1/10 000, ont été déposés (chaque échantillon dilué a été déposé en triple) ; 100 µL de PBS ont été déposés dans les puits « blancs réactifs ». Des sérums de souris non immunisées ont été utilisés comme témoins négatifs. La plaque a été incubée deux heures à température ambiante. Les puits ont, de nouveau, été lavés comme décrit ci-dessus. Puis, 100 µL d'anticorps secondaires anti-IgG marqués à la HRP (dilués préalablement au 1/2 000 dans du PBS) ont été déposés dans chacun des puits sauf dans les « blancs réactifs » où ont été déposés 100 µL de PBS. La plaque a été incubée une heure à température ambiante. Les puits ont, à nouveau, été vidés et lavés comme décrits ci-dessus. Puis, 100 µL de solution de TMB (substrat de l'enzyme HRP) ont été ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 10 à 20 minutes environ, la réaction enzymatique a entraîné l'apparition d'une coloration bleue. Pour stopper la réaction enzymatique, 50 µL de solution de H₂SO₄ 1N (acide fort) ont été ajoutés dans chaque puits. La coloration a viré au jaune. La densité optique a ensuite été mesurée avec un lecteur de micro-plaques avec une longueur d'onde égale à 450 nm (Wallac Victor² 1420 Multilabel counter). Le protocole ELISA est schématisé Figure 46.

1. Production des particules virales

Pour générer les particules VHB/Delta, la lignée cancéreuse d'hépatocytes humains Huh7 a été utilisée [Glebe et Urban, 2007]. Ces cellules ne permettent pas l'entrée du virus de l'hépatite B dans les cellules, mais permettent une production importante de particules virales. Une étape de transfection est donc nécessaire pour produire des particules virales. Le virus de l'hépatite B est difficile à produire de par son organisation complexe. Ainsi, une alternative a été trouvée pour étudier l'enveloppe du VHB en utilisant le génome du VHD qui est beaucoup plus facile à produire [Villet *et al.*, 2009]. La production de particules chimériques fait intervenir deux plasmides : le plasmide pSVLD3 utilisé pour la synthèse de l'ARN génomique et la synthèse des ribonucléoprotéides spécifiques du VHD et le second plasmide pT7HB2.7 codant pour les protéines d'enveloppe du VHB (LHBS, MHBS et SHBS). Les plasmides pT7HB2.7 et pSVLD3 ont été fournis par l'équipe du Pr. D. Durantel et du Pr. F. Zoulim (Unité INSERM 1052, Lyon). Les autorisations pour utilisation des plasmides nous ont été transmises par messieurs les docteurs John Taylor (pSVLD3) et Camille Sureau (pT7HB2.7).

1.1. Préparation des plasmides

Afin d'évaluer l'influence de la mutation sT125M sur l'entrée du virus dans les cellules, deux plasmides pT7HB2.7 ont été produits par mutagenèse dirigée à partir d'un plasmide présentant la double mutation sT125M et sP127T dit plasmide « non-répondeur ». Ainsi, un plasmide appelé « muté 1 » présentant seulement la mutation sP127T a été produit (sT125T et sP127T) [Velay, 2015]. Le kit « QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit » (Agilent Technologies) a été utilisé pour réaliser la mutagenèse dirigée, selon les recommandations du fournisseur. Les amorces utilisées (Température de fusion, $t_m = 63,3^\circ\text{C}$) pour réaliser le plasmide « muté 1 » sont les suivantes :

- F : 5'-CATGCCGGACCTGCACGACTACTGCTCAAGG- 3'
- R : 5' -CCTTGAGCAGTAGTCGTGCAGGTCCGGCATG- 3'

Le produit d'amplification a ensuite été coupé avec 10 U d'enzyme de restriction Dpn I (incubation une heure à 37°C). Le marqueur de sélection de ces deux plasmides est le gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide muté a ensuite été propagé dans les bactéries XL10-Gold[®] Ultracompetent Cells sur des boîtes de LB (« lysogeny broth », milieu Luria-Bertani) solide supplémenté d'ampicilline, selon les recommandations du fabricant. L'efficacité de la mutagenèse a été vérifiée par un séquençage direct des gènes S de deux clones bactériens. Le plasmide ainsi produits a été extrait des bactéries après avoir procédé à la culture dans du LB liquide supplémenté d'ampicilline. L'extraction plasmidique a été réalisée à l'aide du kit « NucleoBond[®] Xtra Midi EF »

(Macherey Nagel), en suivant les recommandations du fabricant. La quantité de plasmide produite a été quantifiée à l'aide d'un nanodrop et les plasmides ont été congelés à -80°C.

De la même façon, le plasmide pSLVD3 fournis par l'équipe de Lyon (unité INSERM 1052) a également été transfecté dans des bactéries XL10-Gold pour renouveler le stock de plasmide.

1.2. Conditions de culture des cellules Huh7

Les cellules Huh7 ont été entretenues dans du milieu nutritif DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle Medium ») (Gibco) complété avec 1 % de sodium pyruvate 100µM (Gibco), 1 % de GlutaMax™ (glutamate Gibco), 100 UI/mL de pénicilline (Gibco), 100 µg/mL de streptomycine (100 µg/ml, Gibco) ainsi que 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio). Le SVF a préalablement été traité par chauffage à 56°C pendant 30 minutes pour inactiver le complément. Les cellules Huh7 ont été cultivées à 37°C sous 5 % de CO₂ en flasque T75, repiquées deux fois par semaine lors d'un traitement avec 5 mL de trypsine. Le milieu a été changé toutes les 72 heures.

1.3. Transfection des plasmides et production de particules chimériques

Afin de réaliser la transfection, les cellules Huh7 ont été repiquées dans des plaques de 12 puits avec une densité cellulaire de 4×10^4 cellules/cm² (un puits = 3,8 cm²), après avoir été préalablement repiquées au moins dix fois en flasque T75. Les cellules en plaque ont ensuite été laissées 16 heures à 37°C sous 5 % de CO₂. La transfection a été effectuée lorsqu'une confluence d'environ 80 % était observée dans les puits. Le milieu de culture des cellules a été éliminé et 1 mL de milieu nutritif DMEM sans SVF ni antibiotique par puits a été déposé ; le SVF et les antibiotiques pouvant affecter les étapes de transfection. La réaction de transfection a été réalisée à l'aide du réactif « Trans®IT- LT1 » (Mirus) composé d'un ensemble de liposome permettant la transfection des plasmides dans les cellules. Le mélange réactionnel de transfection est présenté dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Mélange réactionnel utilisé pour transfecter les cellules Huh7 à l'aide d'un plasmide muté aux positions sT125M/sP127T (« non-répondeur ») ou sT125T/sP127T (« muté 1 ») et produire des particules chimériques VHB/VHD.

Réactifs	Volume/quantité pour une réaction
Milieu nutritif DMEM sans SVF ni antibiotiques	100 µL
plasmide pT7HB2.7 (+/- muté)	0,5 µg (± 1µL)
plasmide pSLVD3	0,5 µg (± 1µL)
Réactif de transfection (transIT® - LT1)	3 µL

Un blanc correspondant à une transfection sans plasmide a également été réalisé sur chacune des plaques. Après 20 minutes à température ambiante pour favoriser la pénétration des plasmides dans les liposomes, le mélange a été déposé goutte à goutte et bien perpendiculairement

aux puits pour favoriser la transfection des plasmides dans les cellules Huh7. Après 24 heures de contact à 37 °C sous 5 % de CO₂, le milieu de culture a été changé avec du milieu nutritif DMEM supplémenté, à nouveau, avec du SVF et des antibiotiques. Le milieu a ensuite été changé tous les deux jours jusqu'au premier jour de récolte au huitième jour. A partir de cette date, le surnageant de chaque puits a été récupéré puis centrifugé à 3 500 g pendant 30 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Une centrifugation de 3 500 g ne suffit pas pour culoter les particules. Le surnageant contenant les particules a ainsi été récupéré et filtré sur un filtre de 0,45 µm avant d'être congelé à -80°C. Les surnageants du dixième, du douzième et du quatorzième jour ont été récoltés de la même façon. Les différents surnageants ont ensuite été poolés avant d'être quantifiés, caractérisés et utilisés pour l'infection des cellules HepaRG.

1.4. Caractérisations des particules virales produites dans le surnageant

1.4.1. Quantification ARN VHD par RT- qPCR

La quantité de particules chimériques a été déterminée par quantification de l'ARN du VHD. L'ARN viral a été extrait à l'aide du kit « Nucléospin RNA virus » (Macherey Nagel) selon le protocole « Viral RNA isolation from cell-free biological fluids » recommandé par le fournisseur. L'ARN extrait a subi un traitement à la « DNase I RNase free Ambion® » (Applied Biosystem) avec 1 µL de « DNase I RNase free (2 U/ml) » et 1 µL de « DNase I Buffer 10X ». Le mélange a ensuite été incubé à 37°C pendant une heure, puis 15 minutes à 70°C pour inactiver la DNase pour éliminer l'ADN. Cette étape permet d'éliminer toute contamination d'ADN pouvant influencer la réaction de RT-qPCR. Afin de procéder à la réaction de RT-qPCR, le kit « Express One-step SYBR® GreenER™ » (Invitrogen) a été utilisé. La réaction de rétrotranscriptase et la réaction d'amplification de l'ADN ont été réalisées en une seule étape. Ces réactions ont été réalisées dans des capillaires disposés dans l'appareil LightCycler (Roche). Le SYBR green utilisé dans la réaction se lie à l'ADNdb et émet un signal fluorescent lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets. Pour quantifier les particules virales, une gamme étalon d'ARN du VHD a été constituée à partir d'un échantillon de 10⁹ copies d'ARN du VHD fourni par l'équipe de Lyon (Unité INSERM 1052). La gamme utilisée s'étendait de 10 à 10⁸ copies par réaction.

Les amorces décrites par Scholtes *et al.* (2012) ont été utilisées pour la réaction de RT-qPCR :

- Sens AgD-F2 : 5'-CGGGCCGGCTACTCTTCT- 3'
- Antisens AgD-R : 5'-AAGGAAGCCCTCGAGAACA- 3'

Le mélange réactionnel et le programme d'amplification utilisés pour déterminer, par RT-qPCR, la quantité de particules chimériques produites sont décrits dans les Tableaux 20 et 21.

Tableau 20 : Mélange réactionnel utilisé pour quantifier les particules chimériques VHB/VHD post-transfection par RT-qPCR dans le thermocycleur Light Cycler.

Réactifs	Volume/quantité pour une réaction
Matrice (ARN prétraité à la DNase)	4 µL
« Express Superscript OneStep® » (« SuperScript III Reverse Transcriptase + RNase OUT™ »)	0,25 µL
« Express SYBR GreenER™ qPCR Super Mix Universal »	5 µL
Amorce sens (10 µM)	0,2 µL
Amorce antisens (10 µM)	0,2 µL
Eau sans ADNase	Qsp 10 µL

Tableau 21 : Programme d'amplification utilisé pour quantifier les particules chimériques VHB/VHD post-transfection par RT-qPCR dans le thermocycleur Light Cycler.

Etapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Rétrotranscription	50°C	15 minutes	1 cycle
Dénaturation initiale	95°C	5 minutes	1 cycle
Dénaturation	95°C	10 secondes	40 cycles
Hybridation	60°C	20 secondes	
Elongation	72°C	20 secondes	
	Acquisition du signal		

1.4.2. Dosage des protéines d'enveloppe par CMIA (« Chimiluminescent Assay »)

La présence des protéines d'enveloppe HBs des particules chimériques a été évaluée à l'aide de l'automate Architect i2000SR (Architect Abbott®). Pour cela, les kits « HBsAg quantitative » et « HBsAg Qualitative II assay » ont été utilisés. Selon le principe de la chimioluminescence, des microparticules magnétiques recouvertes d'anticorps anti-HBs monoclonaux de souris vont reconnaître certains épitopes des protéines d'enveloppe du VHB (AgHBs). Puis, des anticorps conjugués purifiés à partir d'anticorps monoclonaux de chèvre, marqués à l'acridinium, vont interagir avec ces anticorps murins et émettre un signal détecté par l'automate. Les épitopes reconnus par ces kits sont les épitopes s121 – 124, s112 – 117 et s187 – 207. Le kit « HBsAg Qualitative II assay » a la particularité de détecter également les épitopes s122 – 130 et s166 – 175.

2. Infection des cellules HepaRG et neutralisation par les anticorps vaccinaux

2.1. Conditions de culture des cellules HepaRG

Les cellules HepaRG sont sensibles aux infections VHB/Delta. C'est une lignée cellulaire d'hépatome dérivée d'un carcinome hépatocellulaire provenant d'une patiente atteinte d'une infection chronique par le VHC [Hayes et Chayama, 2016]. Les cellules HepaRG ont été entretenues avec du milieu nutritif Williams E (Gibco) complété avec 1 % de GlutaMax™, 100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, de 5 µg/ml d'insuline, de 5 x 10⁻⁵ M d'hydrocortisone hémisuccinate (Upjohn), 1 % d'acides aminés non essentiels (« Minimum Essential Medium Non Essential Amino Acid », Gibco) et de 10 % de sérum de veau fœtal spécifique FetalClone™ II (SVF HyClone™, contenant d'avantages de facteurs de croissance) décomplété (chauffage à 56°C pendant 30 minutes). Les cellules HepaRG ont été cultivées à 37°C sous 5 % de CO₂ en flasque T75. Lorsqu'elles sont arrivées à confluence, elles ont été repiquées en plaque 12 puits à raison de 2,5 x 10⁴ cellules par puit. En plaque 12 puits, le milieu de culture des cellules HepaRG a été changé régulièrement pendant 14 jours pour entretenir les cellules, sans trypsination jusqu'au moment de la différenciation des cellules. En effet pour pouvoir infecter ces cellules avec les particules chimériques, une étape de différenciation est nécessaire. L'addition de 1,8 % de Diméthylsulfoxyde (DMSO) « Hybri-Max » (Sigma-Aldrich), mais également l'hydrocortisone hémisuccinate déjà présente dans le milieu, induit la différenciation des cellules en deux types de morphologies : cellules épithéliales biliaires et hépatocytaires [Hayes et Chayama, 2016]. Après 14 jours, le milieu d'entretien a été supplémenté de 1,8 % de DMSO « Hybri-Max » et déposé dans les puits à raison de 1 mL par puits pour différencier les cellules. Ces dernières ont été entretenues pendant 10 jours dans le milieu de différenciation à raison de deux changements de milieu.

2.2. Infection des cellules HepaRG par le virus de l'hépatite B : entrée du virus dans les cellules

Lors du dixième jour post-différenciation, les cellules HepaRG ont été infectées par les particules chimériques dites « non-répondeurs » (sT125M/sP127T) et « muté 1 » (sT125/sP127T), produites précédemment, pour observer l'impact de la mutation sT125M sur l'entrée du VHB dans les cellules. Pour infecter les cellules, cinq équivalents génomes viraux (Vge) par cellules ont été déposés dans les puits, ce qui revient à déposer cinq particules pour une cellule. Il faut noter qu'un puits de cellules HepaRG à confluence est composé d'environ 5 x 10⁵ cellules. Ainsi, le volume de particules déposé dans les puits a été évalué selon le pourcentage de confluence (généralement 80 %) et la concentration de particules à notre disposition. Le Polyéthylène glycol (PEG, Sigma-

Aldrich) a été utilisé pour aider l'infection (4 % par réaction); il favorise les liaisons avec le glycosaminoglycane. Le mélange réactionnel utilisé pour infecter un puits de cellules HepaRG avec des particules chimériques VHB/VHD est présenté dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Mélange réactionnel utilisé pour l'infection des cellules HepaRG par les particules chimériques VHB/VHD.

Réactifs	Volume/quantité pour une réaction
Polyéthylène Glycol (PEG) 40 %	50 µL
Particules virales (à déterminer selon la quantité de particules produites et le pourcentage de confluence des cellules HepaRG dans les puits)	x µL
Milieu de Williams E complémenté sans DMSO Hybri-Max	Qsp : 500 - x

Le mélange a été déposé sur les cellules HepaRG et laissé en contact pendant 16 heures à 37°C sous 5 % de CO₂. Puis, chaque puits a été vidé et lavé trois fois avec du PBS 1X afin d'éliminer les particules chimériques qui ne seraient pas entrées dans les cellules. Les puits ont ensuite été remplis avec 1 mL de milieu Williams E complémenté avec 1,8 % de DMSO « Hybri-Max ». Le surnageant et le tapis cellulaire ont ensuite été récoltés lors du sixième jour d'infection. Pour récupérer le tapis cellulaire, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et décollées avec de la trypsine. Les cellules ont ensuite été récupérées dans 500 µL de PBS 1X.

2.3. Protocoles de neutralisation de l'infection par les anticorps vaccinaux sur le modèle cellulaire HepaRG

L'étape de neutralisation a été réalisée de la même manière que l'infection. Cependant, un prétraitement avec des échantillons sériques humains a été réalisé sur les particules virales avant de réaliser le mélange réactionnel. Pour réaliser le test de neutralisation par les anticorps vaccinaux, deux sérums de patient ont été sélectionnés. Un premier sérum de patient non vacciné, sans anticorps neutralisants contre l'AgHBs du VHB et non infecté par le VIH et le VHC a été sélectionné comme sérum témoin de neutralisation (« sérum témoin »). Un second sérum de patient vacciné contre le VHB et possédant des anticorps neutralisants contre l'AgHBs a été utilisé comme sérum de neutralisation ('sérum positif'). Ce sérum avait une concentration en anticorps anti-AgHBs de 924,25 mUI/mL. Les sérums ont préalablement été chauffés à 56°C pendant 30 minutes pour inactiver le complément. Une quantité constante d'anticorps (231 mUI) a été utilisée pour une quantité de cellules/particules donnée à raison de 250 µL pour un puits à 100 % de confluence. Les anticorps anti-HBs et le « sérum témoin », ont été dilués soit au 1/10^{ème}, 1/100^{ème} ou 1/1 000^{ème} et mise en contact avec les particules chimériques dites « non-répondeurs » (sT125M/sP127T) et

« muté 1 » (sT125/sP127T). Le contact entre les sérums et les particules virales a été réalisé pendant une heure à 37°C en mélangeant toutes les 15 minutes. Puis, le même protocole que l'infection des cellules HepaRG a été réalisé (les particules virales ont été remplacées par le mélange sérum/particules).

Le tout a été déposé sur les cellules HepaRG et laissé en contact pendant 16 heures à 37°C sous 5 % de CO₂. Puis, les lavages et la récolte ont été réalisés comme pour l'infection.

2.4. Quantification des particules ayant infectées les cellules

Les cellules HepaRG différenciées sont sensibles à l'infection, mais ne permettent pas la libération des particules chimériques dans le milieu extracellulaire (Ni *et al*, 2014). Ainsi, afin de quantifier le nombre de particules qui sont entrées dans les cellules, l'ARN du VHD a été extrait à partir du culot cellulaire. L'extraction a été réalisée à l'aide du kit « NucleospinRNA Clean-up » (Macherey Nagel) selon le protocole « RNA isolation from up to 10⁵ cells », selon les recommandations du fournisseur. Avant de procéder à la RT-qPCR, 8 µL d'ARN extrait ont été traités à la DNase (« DNase I RNase free Ambion® »). La RT-qPCR s'est déroulée en deux étapes. Une première étape a permis de réaliser la rétrotranscription de l'ARN en ADN à l'aide des kits « M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µL) » (Invitrogen) et « RNase OUT™ Ribonuclease inhibitor » (Invitrogen). Le mélange réactionnel utilisé pour réaliser l'étape de rétrotranscription est présenté dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Mélange réactionnel utilisé pour réaliser la réaction de rétrotranscription nécessaire à la quantification de l'ARN du virus de l'hépatite Delta dans le thermocycleur ABI 7500.

Réactifs	Volume/quantité pour une réaction
Matrice (ARN prétraité à la DNase)	10 µL
Tampon 5X First strand Buffer	5 µL
DTT 0,1 M	2,5 µL
dNTP (10 mM)	1,25 µL
Rétrotranscriptase M-MLV (200 U/µL)	1,25 µL
RNase OUT™ (40 U/µL)	0,5 µL
Amorce antisens AgD-R (10 µM)	1 µL
Eau sans ADNase	Qsp : 25 µL

Les échantillons ont ensuite été déposés dans un thermocycleur pour réaliser la rétrotranscription selon le programme suivant : une heure à 37°C et dix minutes à 98°C.

Puis, la quantification de l'ADN généré a été réalisée par qPCR à l'aide du thermocycleur Applied Biosystems® (ABI) 7500 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific). Le mélange réactionnel et le programme d'amplification sont présentés dans les Tableaux 24 et 25.

Tableau 24 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR en temps réel permettant de quantifier l'ARN du virus de l'hépatite Delta présent dans les cellules HepaRG infectées (préalablement rétrotranscrit en ARN).

Réactifs	Volume/quantité pour une réaction
Matrice (ARN prétraité à la DNase ayant subi l'étape de rétrotranscriptase)	4 µL
Amorce sens AgD-F (10µM)	0,2 µL
Amorce antisens AgD-R (10 µM)	0,2 µL
Express SYBR GreenER™ qPCR Super Mix Universal	5 µL
Eau sans ADNase	Qsp : 10 µL

Tableau 25 : Protocole de PCR en temps réel permettant de quantifier l'ARN du virus de l'hépatite Delta présent dans les cellules HepaRG infectées (préalablement rétrotranscrit en ARN).

Etapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	5 minutes	1 cycle
Dénaturation	95°C	10 secondes	40 cycles
Hybridation	60°C	20 secondes	
Elongation	72°C	30 secondes	
	Acquisition du signal		

2.5. Détermination du pourcentage de neutralisation

Le pourcentage de neutralisation a été évalué selon le calcul suivant :

$$\% \text{ neutralisation} = \frac{\text{Nombre de copies/réactions (Sérum témoin - Sérum positif)}}{\text{Nombre de copies/réactions Sérum témoin}} \times 100$$

TRAVAUX REALISES :
Présentation des articles
publiés et soumis

ETUDE N°1

Caractérisation de la variabilité de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B et son influence sur la clairance de l'antigène HBs sous traitement par analogues nucléos(t)idiques

A. Velay, H. Jeulin (co-premier auteur), M. Eschlimann, B. Malvé, F. Goehringer, M. Bensenane, J.P. Frippiat, P. Abraham, A.M. Ismail, J.M. Murray, C. Combet, F. Zoulim, J.P. Bronowicki, E. Schvoerer

Etude publiée dans Journal of Viral Hepatitis, 2016, volume 23, pages 387-398

Objectifs

L'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) reste un problème de santé publique majeur dans le monde. Malgré l'existence de traitement anti-VHB améliorant la durée et la qualité de vie du patient, la clairance de l'AgHBs, corrélée à un bon pronostic clinique, est difficile à obtenir. L'AgHBs, formé par les trois glycoprotéines d'enveloppe du VHB, est connu pour sa grande variabilité. Il joue également un rôle important dans l'infection par le VHB. En effet, les protéines d'enveloppe du VHB sont essentielles à l'entrée du virus dans les cellules sensibles et à la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Les réponses immunitaires de l'hôte sont à la fois impliquées dans la clairance du virus et le développement de maladies hépatiques en réponse à l'infection par le VHB [Chisari *et al.*, 2010]. Certaines mutations des protéines d'enveloppe du VHB pourraient être responsables de l'échappement du virus aux défenses de l'hôte et favoriser la persistance de l'infection. Des premières études ont montré que plusieurs substitutions observées autour ou dans le déterminant « a » pouvaient influencer négativement la liaison aux anticorps anti-HBs [Wu *et al.*, 2012]. Ainsi, notre première étude a été réalisée chez des patients infectés chroniquement par des souches de VHB de génotype D, génotype prédominant en Europe, pour essayer d'appréhender la question suivante : Comment la variabilité des protéines d'enveloppe du VHB pourrait expliquer la clairance différentielle de l'AgHBs chez des patients traités par NUCs ?

La variabilité des protéines d'enveloppe a été évaluée par séquençage direct et haut-débit chez douze patients infectés par le VHB de génotype D dont six présentant une persistance de l'AgHBs sous traitement (« non-répondeurs ») et six patients présentant une clairance de l'AgHBs (« répondeurs »). Des analyses *in silico* ont été réalisées afin d'identifier des signatures moléculaires sur les protéines d'enveloppe du VHB, spécifiques à un des deux groupes, et leur influence sur l'antigénicité prédite.

Résultats principaux

Les résultats obtenus chez les patients infectés chroniquement par le VHB de génotype D ont montré un nombre plus important de mutations sur le gène S que sur la région préS ($p=0,03$). Les mutations majoritaires observées dans la région hydrophile majeure (MHR), région importante reconnue par le système immunitaire, avaient tendance à être plus fréquemment retrouvées chez les « non-répondeurs » présentant une persistance de l'AgHBs comparés aux « répondeurs » (16 vs. 7 ; $p=0,1$). Sur le gène S, la combinaison des mutations sT125M/sP127T a été observée chez quatre des six patients « non-répondeurs ». Ces résultats ont été confirmés par une analyse de covariance des acides aminés. De plus, cette combinaison de mutations, située dans une zone antigénique

importante de la MHR, le « a » déterminant, est associée à une diminution du pouvoir antigénique prédit par bio-informatique (logiciel AnTheProt), d'environ 28 % comparée à la séquence consensus sauvage.

Ma contribution à ce travail s'est portée essentiellement sur l'analyse *in vivo* et *in vitro* des mutations sT125M/sP127T sur un modèle murin, sur un modèle cellulaire, mais également sur le séquençage haut-débit des gènes prés/S du VHB des douze patients de l'étude.

Les études réalisées sur le modèle murin ont montré une plus faible réactivité en ELISA du sérum de souris vaccinées vis-à-vis du mutant sT125M comparé à un peptide sauvage (index : 0,50 +/- 0,07 vs. 1,0 +/- 0,13 ; $p=0,0029$; Figure 47). Ces résultats étaient cohérents avec la diminution de l'antigénicité prédite par bio-informatique de cette mutation (-28 %). D'autres peptides présentés dans le § 'production de peptides-matériels et méthodes' (sT125M/sP127T, sQ129H, sT131A/sM133I/sY134H et sS136Y) n'ont pas montré de différence significative en termes de réactivité face aux anticorps vaccinaux murins comparés à un peptide sauvage.

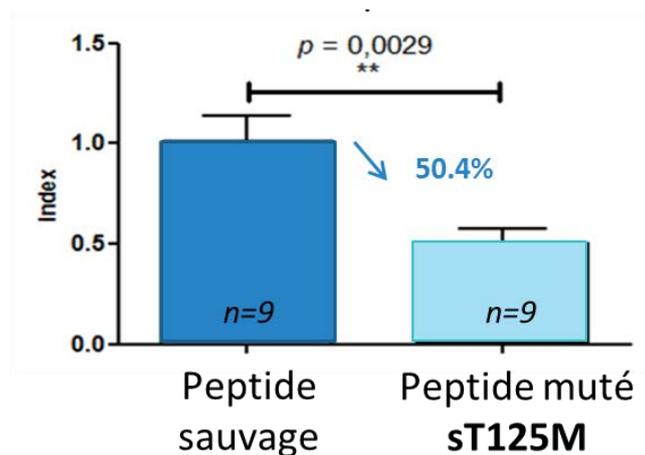


Figure 47 : Réactivité des anticorps vaccinaux murins contre les protéines S face à un peptide sauvage ou un peptide muté en sT125M.

L'influence du couple de mutations sT125M/sP127T sur le pouvoir infectieux, et notamment sur l'entrée du virus dans la cellule, et la reconnaissance par les anticorps vaccinaux humains a été évaluée sur un modèle d'infection faisant intervenir les cellules HepaRG. Pour cela, des particules virales présentant les mutations sT125M/sP127T (« non-répondeur ») et des particules virales présentant seulement la mutation sP127T (« muté 1 ») ont été produites et quantifiées. La quantité de particules produites variait de 7×10^4 à $1,4 \times 10^7$ copies de génome/mL pour le variant « non-répondeurs » et de $8,6 \times 10^4$ à $3,4 \times 10^7$ copies de génome/mL pour le variant « muté 1 ». Après avoir qualifié la présence d'AgHBs par CMIA (« chemiluminescent microparticle immunoassay ») dans le surnageant de culture, des tests d'infection par les deux variants, « non-répondeurs » et « muté 1 », et des tests de neutralisation par des anticorps vaccinaux humains de ces variants avant infection des

cellules HepaRG ont été réalisés. La comparaison des tests d'infection des cellules HepaRG par le variant « non-répondeur » ou le variant « muté 1 » n'a pas montré de différences significatives pour l'entrée du virus dans les cellules ($p=0,53$). Les premiers tests de neutralisation par les anticorps vaccinaux ont été réalisés avec différentes concentrations d'anticorps dont les meilleurs résultats étaient obtenus pour une dilution en anticorps au 1/100^{ème}. Les résultats de neutralisation sont présentés dans les Tableaux 26 et 27.

Tableau 26 : Pourcentage de neutralisation de l'infection par les anticorps vaccinaux humains observés chez les variants « non-répondeur » sT125M/sP127T et « muté 1 » sT125T/sP127T, en fonction des dilutions en anticorps vaccinaux testés sur un modèle d'infection du virus de l'hépatite B faisant intervenir des cellules HepaRG.

Dilutions des anticorps vaccinaux	Pourcentage de neutralisation du variant « non-répondeurs » sT125M/sP127T	Pourcentage de neutralisation du variant « muté 1 » sP127T
1/10	0 %	3 %
1/100	3 %	100 %
1/1000	0 %	0 %

Tableau 27 : Pourcentage de neutralisation de l'infection par les anticorps vaccinaux humains observés chez les variants « muté 1 » sT125T/sP127T et « non-répondeur » sT125M/sP127T avec une dilution au 1/100^{ème} des anticorps testés sur un modèle d'infection du virus de l'hépatite B faisant intervenir des cellules HepaRG.

Test	Variant sT125M/sP127T « non-répondeur »	Variant sT125T/sP127T « muté 1 »
1	3 %	100 %
2	10 %	80 %

D'après ces premiers résultats, il semble que le variant sT125M/sP127T « non-répondeur » soit moins bien neutralisé par les anticorps vaccinaux humains (3 % et 10 %) que le variant sP127T « muté 1 » observé chez les « répondeurs » (80 % et 100 %). Ainsi, la mutation sT125M pourrait influencer la reconnaissance par les anticorps vaccinaux. Cependant, le mauvais rendement d'infection généralement obtenu avec ce modèle (10-15 % de cellules infectées) et la quantité faible de particules produites à l'aide du modèle cellulaire Huh7 n'ont pas permis de consolider les résultats.

D'autre part, l'analyse des variants minoritaires par séquençage haut-débit a mis en évidence un plus grand nombre de mutations dans la région préS du VHB des patients « répondeurs » (16 mutations minoritaires chez les « répondeurs » vs. sept chez les « non-répondeurs ») connue pour être une zone essentielle au pouvoir infectieux du virus. Les mutations observées dans cette région pourraient influencer négativement le fitness de réplication du virus et favoriser la clairance de l'infection. Sur le gène S, un plus grand nombre de mutations minoritaires ont été observées chez

les « non-répondeurs ». Elles se situaient principalement dans la région MHR (46,5 % vs. 15 %), et plus particulièrement dans le déterminant « a » (9 vs. 0 ; $p= 0,04$), zone essentielle pour la reconnaissance par les anticorps neutralisants. En effet, seules trois mutations ont été observées dans la MHR des « répondeurs » (sQ101H, sE164G, sA166V) contre 20 mutations dans la MHR des « non-répondeurs ». Contrairement aux mutations observées chez les patients « répondeurs », conduisant généralement à une augmentation de la prédiction antigénique, les variants observés chez les « non-répondeurs » étaient associés à une diminution de l'antigénicité prédite.

Conclusion

Dans cette cohorte de patients traités par NUCs, les patients « non-répondeurs », dont l'AgHBs persistait sous NUCs, ont montré plus de mutations que les « répondeurs » dans la région MHR, région importante pour la reconnaissance du système immunitaire. Ces mutations pourraient ainsi influencer la reconnaissance du virus par l'immunité humorale de l'hôte et favoriser la persistance de l'infection. En parallèle, un plus grand nombre de mutations a été retrouvé dans la région préS des « répondeurs », regroupant de nombreuses zones essentielles au pouvoir infectieux du virus : le site de fixation aux récepteurs NTCP important pour l'entrée dans les cellules, le promoteur protéine S essentiel dans de nombreuses étapes du cycle viral (entrée, assemblage) et le site de fixation à la nucléocapside requis pour l'assemblage des particules. Une mutation dans ces régions essentielles au pouvoir infectieux du virus pourrait influencer le fitness répliatif du virus et favoriser la clairance de l'infection. Cette étude a également pu mettre en évidence une signature moléculaire associée à la persistance de l'AgHBs : les mutations sT125M et sP127T retrouvées chez 4/6 « non-répondeurs » et aucun « répondeur ». La mutation sT125M a été retrouvée associée à une antigénicité prédite réduite *in silico* et à une diminution de la réactivité des anticorps vaccinaux face à des peptides mutés à cette position. Le séquençage haut-débit a permis de mettre en évidence des mutations minoritaires associées à une diminution de l'antigénicité chez les patients « non-répondeurs » contrairement aux « répondeurs ». Ainsi, ces données suggèrent que l'incapacité à atteindre une clairance de l'AgHBs sous NUCs pourrait être expliquée, au moins partiellement, par des signatures moléculaires observées sur le gène S du VHB entre les patients présentant une persistance ou une clairance de l'AgHBs ; ces signatures moléculaires pouvant être responsables de la modification du fitness global du VHB.

L'étude a ensuite été élargie à une cohorte de patients infectés par le VHB de génotype A (deuxième génotype dominant en Europe) présentant différents profils d'infection : une infection aiguë ou une co-infection VHB/VIH en plus de patients présentant une infection chronique (mono-infectés par le VHB).

Characterization of hepatitis B virus surface antigen variability and impact on HBs antigen clearance under nucleos(t)ide analogue therapy

A. Velay,^{1,†} H. Jeulin,^{1,2,†} M. Eschlimann,¹ B. Malvé,² F. Goehringer,³ M. Bensenane,⁴ J.-P. Fripiat,¹ P. Abraham,⁵ A. M. Ismail,⁵ J. M. Murray,⁶ C. Combet,⁷ F. Zoulim,⁷ J.-P. Bronowicki⁴ and E. Schvoerer^{1,2} ¹EA 7300 'Stress, Immunité, Pathogènes', Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France; ²Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Vandoeuvre-les-Nancy, France; ³Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Vandoeuvre-les-Nancy, France; ⁴Service d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Vandoeuvre-les-Nancy, France; ⁵Department of Clinical Virology, Christian Medical College, Vellore, Tamil Nadu, India; ⁶School of Mathematics and Statistics, UNSW Australia, Sydney, NSW, Australia; and ⁷Unité Inserm U11052, Université de Lyon, Lyon, France

Received August 2015; accepted for publication November 2015

SUMMARY. For hepatitis B virus (HBV)-related chronic infection under treatment by nucleos(t)ide analogues (NUCs), HBsAg clearance is the ultimate therapeutic goal but very infrequent. We investigated how HBV envelope protein variability could lead to differential HBsAg clearance on NUCs. For 12 HBV genotype D patients receiving NUCs, six resolvers (HBsAg clearance) were compared to six matched nonresolvers (HBsAg persistence). PreS/S amino acid (aa) sequences were analysed with bioinformatics to predict HBV envelope antigenicity and aa covariance. To enrich our analyses on very rare resolvers, these were compared with other HBV genotype D strains in three characterized clinical cohorts including common chronically infected patients. The sT125M+sP127T combination was observed in four nonresolvers of six, corroborated by aa covariance analysis, associated with a lower predicted antigenicity than sT125T+sP127P. Concordant

features within this HBV key functional domain, at positions 125 and 127, were reported from two of the three comparative cohorts. In our hands, a lower ELISA reactivity of HBV-vaccinated mice sera was observed against the sT125M mutant. In the S gene, 56 aa changes in minor variants were detected in non-resolvers, mainly in the major hydrophilic region, vs 28 aa changes in resolvers. Molecular features in patients showing HBsAg persistence on NUCs argue in favour of a different aa pattern in the HBV S gene compared to those showing HBsAg clearance. In nonresolvers, a decrease in HBs 'a' determinant antigenicity and more frequent mutations in the S gene suggest a role for the HBV envelope characteristics in HBsAg persistence.

Keywords: anti-HBV treatment, HBV preS/S variability, hepatitis B Virus.

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV)-related infection is a major worldwide public health problem, with approximately 240

Abbreviations: HBsAg, hepatitis B antigen; HBV, hepatitis B Virus; IFN, interferon; LHBs, large Hepatitis B s protein; MHBs, middle Hepatitis B s protein; MHR, major hydrophilic region; NUCs, nucleos(t)ide analogues; PGM, personal genome machine; SHBs, small Hepatitis B s protein; UDS, ultra-deep sequencing.

Corresponding: Prof. Evelyne Schvoerer, Laboratoire de Virologie, CHU de Nancy Brabois, Route de Neufchâteau, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

E-mail: e.schvoerer@chu-nancy.fr

[†]AV and HJ contributed equally to this work.

million people currently living with chronic HBV infection. Clearance of the virus by anti-HBV treatment is difficult. A successful treatment will result in the disappearance of HBV DNA from the blood, followed by HBs antigen (Ag) clearance and ideally anti-HBs antibody production, also called a functional cure. But only a few patients will exhibit this optimal profile, with an annual rate of 10–15% HBsAg loss under treatment by interferon alfa. For nucleot (s)ide analogues (NUCs), the rate of HBsAg loss reaches 3–6% after 2 years of treatment with tenofovir or entecavir, and 8–14% after 5 years of tenofovir in HBeAg-positive patients [1–4]. The difficulty of HBV eradication is especially due to a long-lasting intracellular HBV reservoir, the covalently closed circular viral DNA (cccDNA) [5].

HBs antigens are comprised of the large (LHBs), the middle (MHBs) and the small surface protein (SHBs). The major hydrophilic region (MHR), including the 'a' determinant, is located on the surface of extracellular particles [6,7]. HBV envelope glycoproteins are quite variable and play a crucial role in HBV entry in sensitive cells, as well as in the stimulation of host immunity.

The first step of HBV cellular infection is the intercalation of the antigenic loop region of HBsAg and heparan sulphate proteoglycans on the cell membrane [8]. The preS1 segment then binds to the NTCP receptor (sodium taurocholate cotransporting polypeptide), a multiple transmembrane transporter predominantly expressed in the liver [9,10].

Host immune responses play a key role in the evolution of HBV infection with or without treatment pressure. After primary HBV infection, the adaptive immune response is responsible for viral clearance and HBV-related disease pathogenesis. The CD8⁺ T-cell response acts on viral clearance by triggering direct hepatocyte apoptosis and by secreting IFN- γ , which inhibits HBV replication [11]. The production of anti-HBs antibodies is needed for HBsAg neutralization and clearance [12]. Anti-envelope protective antibodies form a complex with free particles, removing them from the circulation and preventing HBV attachment to hepatocytes [13]. Both viral factors (such as high HBV variability) and host factors (age, immunosuppression) can inhibit antibody-mediated HBV neutralization. Monoclonal antibodies generated from vaccinated individuals mainly bind to the loop domain of the small HBsAg [14], but several amino acid substitutions around or within the corresponding 'a' determinant can impair HBs antibody binding and favour HBV immune escape [12].

Molecular characteristics of HBV envelope proteins may favour better viral fitness at the entry step into hepatocytes and/or HBV escape from host immunity. Here we investigated whether variability of HBV envelope proteins can contribute to the differential responses to anti-HBV treatment in patients (HBsAg clearance or persistence). Our data obtained by direct sequencing were compared with HBV sequences from three cohorts of HBV genotype D-infected patients. The mutation sT125M, a molecular signature observed in nonresolvers on NUCs with HBsAg persistence, was studied for its impact on ELISA reactivity of HBV-vaccinated mice sera. Moreover, ultra-deep sequencing (UDS) of preS/S genes allowed us to characterize minor HBV variants.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Serum samples were collected from 12 patients with HBV infection, genotype D, followed in Hepato-gastroenterology, University Hospital, Nancy, France (study DC-2013-1801). Informed consent was obtained, and the study was

approved by the 'Comité de Protection des Personnes – CPP de Lorraine' (DC-2013-1801), in accordance with international guidelines (Helsinki). Inclusion criteria were as follows: adult patients chronically infected with HBV, treated with NUCs, and without HIV, HCV or HDV co-infection. HBV viral load (threshold at 20 IU/mL; Roche Cobas[®], Roche Diagnostics France, Meylan, France) and HBs antigen levels (Architect Abbott[®], Abbott France, Rungis, France) were analysed. Biological, clinical and therapeutic data were retrospectively collected. Patients were classified as resolvers when achieving HBsAg clearance, or nonresolvers in the event of HBsAg persistence, and paired according to age and gender.

Our data were compared with HBV genotype D sequences drawn from three characterized clinical cohorts: 68 sequences from treatment naïve patients with chronic HBV infection [15], 76 sequences from chronically HBV-infected patients analysed at baseline before the initiation of treatment pressure [16], 113 sequences from patients chronically HBV infected and treated with NUCs according to European/American guidelines [17].

Direct sequencing

Hepatitis B virus DNA was amplified for the preS1, preS2 and S genes using a nested PCR. The primers used for the S gene were P2f [18]/979 [19] for the first round, P2f/S8 [20] and P7a [20]/979 for nested PCR. The primers for the first round of the preS1 and preS2 genes were P4 [20]/P7arev (5'-GACTGCGAATTTTGGCCAA-3'); primers for the nested PCR were P4 /PreSr [19].

For both PCRs, a Phusion Master Mix 2X (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) was used. Amplicons were directly sequenced using the BigDye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) and an automated DNA sequencer (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems).

Bioinformatics

Nucleic and aa sequences were analysed using MEGA 5.2 software (freeware). The positions of mutations in the 'S' open reading frame were identified by an 's' prefix. The estimation of selective pressure by calculating synonymous (dS) vs nonsynonymous substitutions (dN), dN/dS, was performed with the Nei-Gojobori method, Jukes-Cantor correction. The AnTheProt software (freeware) was used to predict the antigenicity of aa sequences [21,22]. Sets of covarying pairs, based on the aa sequences, were calculated for the preS region and S gene sequences as previously described [23]. Aa combinations from the set of covarying pairs that were present in one group (i.e. resolver or nonresolver) but not the other were called separating pairs. The overall frequency of mutations was compared to the HBVdb release r23 (<http://hbvdb.ibcp.fr>) [24].

Data obtained by direct sequencing of genotype D HBV strains in the three previously published clinical cohorts mentioned above were compared with our results within the MHR.

Ultra-deep sequencing

Ultra-deep sequencing was performed using the Ion Personal Genome Machine (PGM) Sequencer (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France), after HBV DNA amplification by PCR used for direct sequencing (see above). Amplicons were cut to 200-bp fragments. After an emulsion PCR (Ion OneTouch 200 Template Kit v2, ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France), each DNA fragment was sequenced onto an ion 214 chip (Ion[™] PGM 200 Sequencing Kit v2, ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France). Sequences from each read obtained by UDS were aligned to the HBV genotype D sequence (AY161150) using the NextGene software (Softgenetics, State College, PA, USA). The cut-off for the mutation frequency was set at 2.5% with visual correction of sequences for insertion and deletions.

In vivo antigenicity evaluation

Female BALB/c mice (Charles River, Saint Germain-sur-L'Arbresle, France) were used. Ten-week-old mice were immunized using 100 µL of the Engerix B vaccine (i.e. 2 µg of nonglycosylated SHBs protein), injected intraperitoneally at day 0 and week 3. At week 4, sera were collected. Nine mice were used for the experiments, in accordance with the National Legislation about the protection of animals used for experimental purposes and local ethics committee (authorization number 75-1641).

For ELISA, 96-well plates were coated with peptides adapted from Tajiri *et al.* [14], corresponding to the 120–136 aa region of the S protein (wild-type peptide: NH₂-PCRTCTTPAQGTSMPYPS-CONH₂ and sT125M-mutated peptide: NH₂-PCRTCMTPAQGTSMPYPS-CONH₂) with the s121–124 disulphide bridge, and linked to bovine serum albumin protein (Proteogenix, Schiltigheim, France). The reactivity of immunized mouse sera against peptides was tested using a conventional ELISA procedure, with sera from unimmunized mice used as negative controls. The results were expressed as an index corresponding to the ratio between the mean optical density (OD) of the triplicate results for each sample and the mean OD of the triplicate results of serum from immunized mice used as a calibrator.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Two groups, resolvers and nonresolvers, were compared using Student's *t*-test or Mann–Whitney *U*-test for

HBeAg positivity, HBV plasma DNA level, presence/absence of sT125M mutation, the predicted antigenicity of S protein and genomic variability within functional areas of the HBV envelope proteins. The ELISA reactivity of sera from HBV-vaccinated mice against wild-type compared with the sT125M-mutated peptide was evaluated using Student's *t*-test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Patients

The 12 patients were eight men and four women, aged 38–76 years at inclusion, and infected by HBV genotype D (1).

Each patient received sequentially one to three different NUCs including lamivudine, tenofovir, entecavir or adefovir, or combinations such as entecavir + tenofovir, lamivudine + adefovir or entecavir + adefovir. Two patients (one resolver and one nonresolver) received interferon before treatment by NUCs.

Direct sequencing

Variability in the S and in the preS regions

The overall analysis of sequences from genotype D resolvers highlighted 22 aa changes within the 226 aa HBV S sequences (9.70%); five of the 22 changes, concerning three of six patients, were located in the MHR region (aa 110, 118, 127, 134, 142). In preS sequences of resolvers, 12 aa changes within the 163 aa preS sequences (7.36%) were observed.

Alignment of the S ORF sequences of HBV genotype D for nonresolvers showed 23/226 (10.17%) aa changes: eight of 23 changes, concerning five of six patients, were located in the MHR region (aa 112, 113, 118, 125, 127, 136, 159, 164). The variations observed in the 163 aa preS sequence were about 7.36% (12/163). Bioinformatics did not support any selective pressure for the S gene mutations.

Two molecular signatures in the S gene were identified in nonresolvers at residue s125 and s127

Comparison of sequences between the two groups of patients revealed two molecular signatures, located in the 'a' determinant, sT125M and sP127T, relating to nonresponse status. The sT125M mutation was only detected in nonresolvers (four of six). A threonine in position 127 was present in only two of six resolvers and in five of six nonresolvers. The sT125M + sP127T combination was associated with HBsAg persistence under NUCs (*P* = 0.02). Among the 3415 S ORF genotype D sequences of the HBVdb r23 [24], the sT125M frequency was 8.7% (298/3415), almost always associated with sP127T (96%) as described in our cohort. Within the HBVdb, the sT125M

Table 1 Biological and clinical features of the HBV-infected patients

	Pair 1		Pair 2		Pair 3		Pair 4		Pair 5		Pair 6	
	R1	NR1	R2	NR2	R3	NR3	R4	NR4	R5	NR5	R6	NR6
Gender	F	F	M	M	M	M	M	M	M	M	F	F
Age (years)	39	38	46	45	76	76	68	69	50	53	61	63
Geographical origin	Turkey	Turkey	Turkey	Morocco	France	France	Italy	Spain	France	France	Turkey	France
HBV subgenotype	D1	D1	D2	D3	D3	D3	D2	D3	D3	D2	D1	D3
Viral load* (Log ₁₀ IU/mL)	Positive	4.94	6.23	5.15	5.16	3.90	7.60	4.42	2.33	4.25	3.3	4.04
N.Q.												
HBcAg status at baseline	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg
Anti-HBe status at baseline	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos
Antiviral therapy (years)	NA-1 (1.6)	NA-1 (6.5)	NA-1 (8.75)	IFN (0.5)	NA-1 (10)	NA-1 (5.83)	NA-1 (10)	NA-1 (11.99)	IFN (0.5)	NA-2 (5)	NA-2 (5)	NA-1 (12)
			NA-2 (2.75)	NA-1 (8.83)		NA-1 (7)			NA-1 (3.99)			
									NA-1 (6.5)			
Alcohol consumption	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Score of fibrosis	F0/F1	F0	F1/F2	F1	F1/F2	F3	F0	F4	F1	F0	F4	F0
Diabetes	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Dyslipidaemia	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Immunosuppressive condition	No	No	No	Yes [†]	No	No	Yes [†]	No	No	Yes [†]	No	No
HBV reactivation	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No

*Viral load of the sample of sera submitted to direct and Ultra-deep sequencing.

[†]Kidney transplantation.

R, Resolver; NR, Nonresolver; F, Female; M, Male; Neg, Negative; Pos, Positive; N.Q., Not Quantified (Resolver 1 viral Load at baseline); IFN, Interferon; NA-1, First-generation Nucleos(t)ide Analogues (e.g. Lamivudine, adefovir dipivoxil); NA-2, Second-generation Nucleos(t)ide Analogues (e.g. entecavir, tenofovir disoproxil fumarate).

mutation was only found in genotype D (< 1% for genotypes A, B and C). The sP127T was observed in 30.5% of genotype D sequences, was rare in genotype B (1.7%) and present at less than 1% for genotypes A and C. The sT125M had no impact on the RT gene (rtH133H), whereas the sP127T induced a mutation in RT (rtS135Y or rtS135N or rtS135H).

With regard to these molecular signatures, relevant features were retained from previously HBV genotype D published cohorts [15–17]. Interestingly, the mutations sT125M and sP127T were highly frequent in chronically HBV-infected patients without NUCs reported by Datta *et al.* [15], at 50% and 54.4% (and sP127I, 17.6%), respectively; they were also common in 13.1% and frequent in 76.3% of the patients investigated by Ismail *et al.* Moreover, at position 118, another sT118V mutant was highly represented, at 59.2% [16]. The corresponding residues were conserved within the HBV strains published by Al Baqlani *et al.* [17]. In patients investigated by Ismail *et al.*, the mean number of mutations in the MHR was similar to that observed in nonresolvers in our cohort (2.59 vs 2.67 mutations/patient). When separate analyses were realized according to virological response to NUCs (i.e. HBV DNA reduction or undetectable HBV DNA), the mean number of mutations in MHR and in the ‘a’ determinant was not different between patients with and without virological ‘response’ as defined by Ismail ($P = 0.18$ and $P = 0.267$, ns, respectively).

Covariance analysis revealed aa combinations associated with ‘nonresponse’

With a minimum covariance value of 0.145, there were approximately 20 covarying pairs in the preS1 sequences and 40 in the S sequences. An attempt was made to separate pairs within the resolver or nonresolver networks. There were a number of separating pairs exhibited by non-resolver patients 2, 3, 4 and 6 (Fig. 1) that included the sT125M + sP127T mutations.

The sT125M mutation was associated with a lower predicted S antigenicity

In the S protein harbouring the sT125M + sP127T mutations (four of six nonresolvers), the predicted antigenic peak was clearly lower than patterns containing sT125T + sP127P or sT125T + sP127T observed in resolvers. At position sT125M, the peak height was significantly decreased in nonresolvers compared to resolvers ($P = 0.04$). By introducing the sT125M + sP127T mutations within an S consensus sequence of genotype D (HBVdb), we observed a decrease of *in silico* predicted antigenicity (Fig. 2) essentially due to the sT125M mutation.

A decrease in serum ELISA reactivity was observed against a sT125M-mutated peptide after mouse anti-HBV vaccination

To assess a potential escape from host immunity, the ELISA reactivity of sera from nine vaccinated mice was evaluated against wild-type or sT125M-mutated peptides. Intra-assay variability of ELISA was checked on 10 points (3–8%), with absence of ELISA reactivity for nonimmunized mice sera. For the nine mice, the ELISA reactivity was lower against the mutated sT125M peptide compared to wild-type peptide (index = 0.50 ± 0.07 vs 1.0 ± 0.13 , $P = 0.0029$ Student’s t-test, Fig. 3).

Ultra-deep sequencing

Ultra-deep sequencing generated 1 607 420 sequence reads (60 075–134 940 per sample in S gene and 42 048–133 136 per sample in preS gene) of 175–214-bp length, with a median value of 75 029 reads/sample. The sequence reads encompassed the entire S and preS genes. The median coverage was 20 219 reads per nucleotide (14 908 for S gene and 28 335 for preS genes).

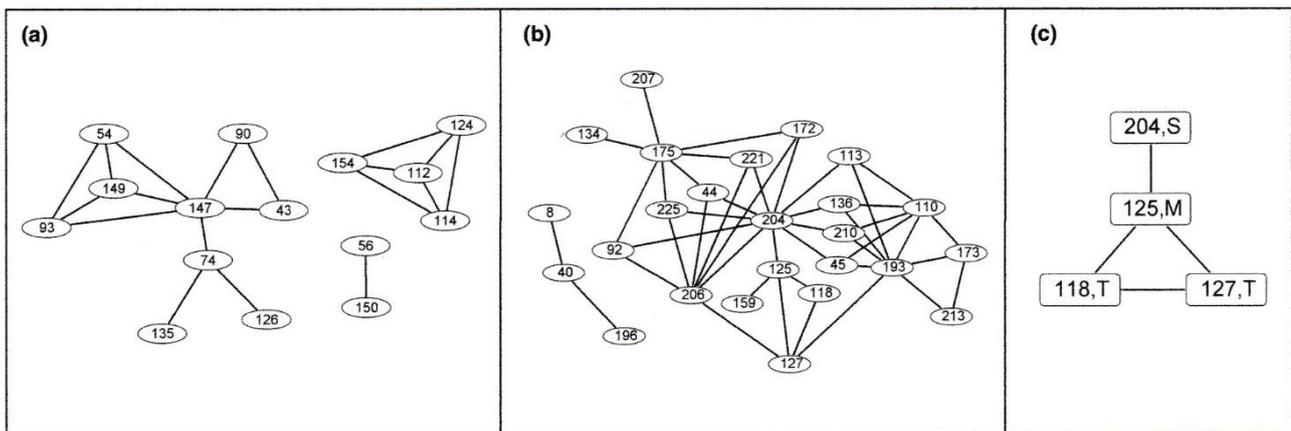


Fig. 1 Highly covarying aa networks for (a) the preS gene, (b) the S gene and (c) the network of S gene separating covarying pairs common to four of six nonresolvers and to no resolvers.

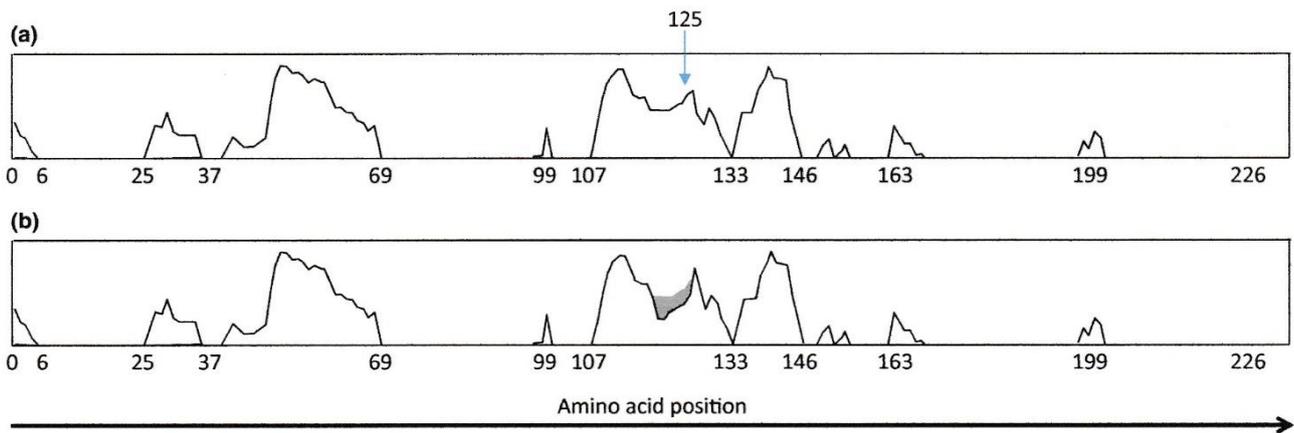


Fig. 2 Antigenic profiles of S protein (amino acid 1–226) of genotype D HBV (higher the peak is, higher the predicted antigenicity is): (a) consensus sequence established from HBVdb (<http://hbvdb.ibcp.fr>); (b) consensus sequence with mutations sT125M and sP127T with decreased predicted antigenicity (grey area).

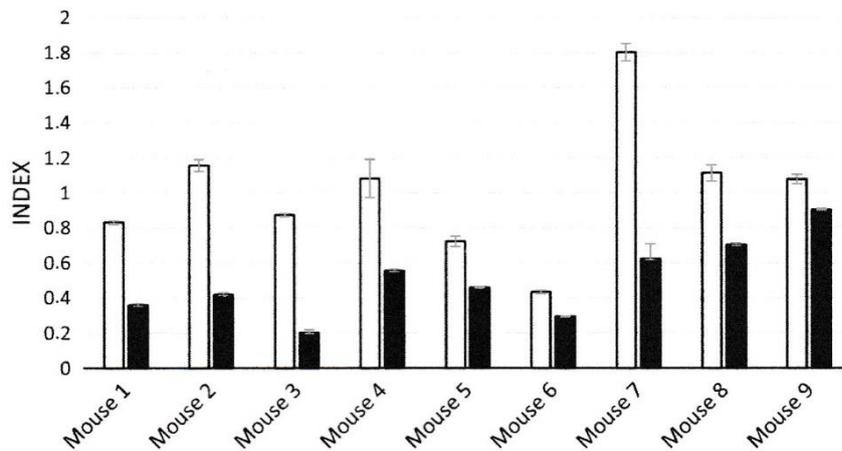


Fig. 3 ELISA reactivity after immunization in mice ($n = 9$): reactivity of sera from HBV S protein vaccinated mice ($n = 9$) against wild-type (white) and sT125M-mutated (black) peptides of the s120–136 amino acid region of HBV S protein (index: ratio between the mean optical density (OD) of the triplicate results for each sample and the mean OD of the triplicate results of a serum from immunized mice used as a calibrator).

Ultra-deep sequencing showed more frequent mutations in the S gene in nonresolvers compared to resolvers

Hepatitis B virus (HBV) sequences from UDS were compared to sequences from direct sequencing for 12 patients with the aim of highlighting possible minor variants. In addition to the mutations detected by direct genotyping, some minor wild-type variants were detected, especially the variant sT125T found in NR4 (14%).

In the S gene, UDS allowed us to highlight 28 supplementary aa changes in resolvers vs a higher level of 56 aa changes in nonresolvers (Fig. 4a). Among the 43 mutations which were observed exclusively in nonresolvers, 20 (46.5%) were located in the MHR, including nine mutations in the 'a' determinant (Fig. 4c). Among the 20 mutations exclusively found in resolvers, only three were located in the MHR (sQ101H, sE164G, sA166V) and none in the 'a' determinant. In one nonresolver (NR5), two major variants

(60% and 25%) with deletions in the 'a' determinant were detected, associated with one minor variant with a truncated protein (8%) and minor complete variants (7%).

In the preS gene, 13 supplementary aa changes were highlighted in resolvers vs five in nonresolvers (Fig. 4b). The mutations were located in preS1 and preS2, without involving the NTCP binding site. Minor variants with various patterns of deletions were also observed in preS in patient pair number 3, with a larger deletion in the nonresolver in preS1 and preS2, in areas without any reported functional role.

In nonresolvers, UDS identified a higher genomic variability in functional regions of the S protein, namely the 'a' determinant ($P = 0.04$), the cytosolic loop-1 ($P = 0.7$, ns) and the MHR ($P = 0.1$, ns) (Fig. 5).

The quasispecies diversity was low whatever the gene or HBsAg clearance: $d = 0.013$ for resolvers vs

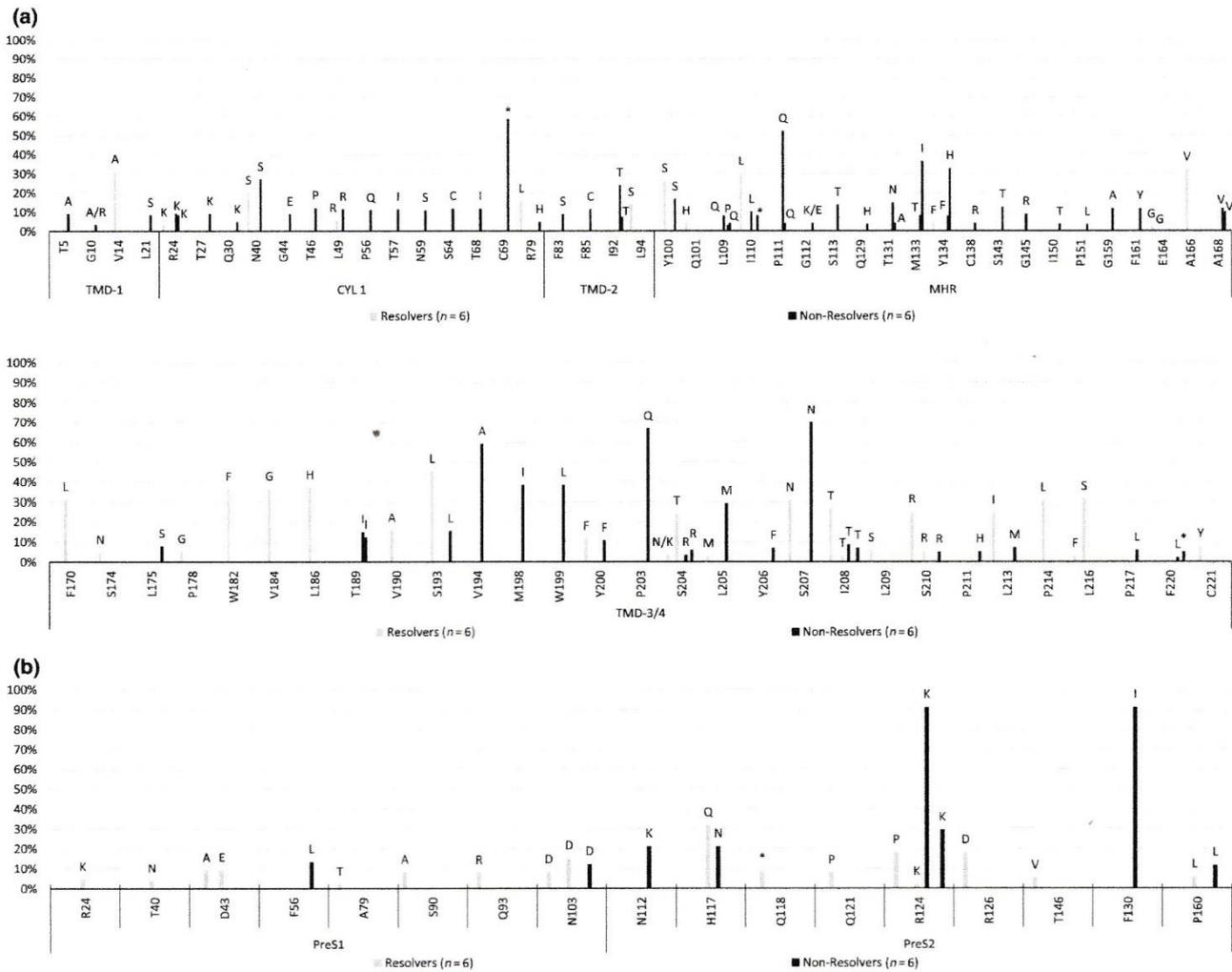


Fig. 4 Minor variants in the HBV 'S' gene (a) and preS genes (b) of resolver (light bar) and nonresolver (dark bar) patients, according to amino acid position in the gene and (c) sequence logo representation based on amino acid pattern of hepatitis B virus quasiespecies of the major hydrophilic region (MHR) (R, resolver; NR, Nonresolver; *: stop codon; TMD, transmembrane domain; CYL, cytosolic loop; MHR, major hydrophilic region; Z, deletion).

$d = 0.009$ for nonresolvers in S, $d = 0.011$ for resolvers vs $d = 0.008$ for nonresolvers in preS (overall mean distances calculated according to the Kimura two-parameter method). The distribution of normalized Shannon entropy was <0.1 for S and preS areas.

Antigenicity evaluated in silico for minor HBV envelope variants

In the preS region, the mutations detected by UDS in nonresolvers had no impact on predicted antigenicity. In resolvers, two variants (P160L, 5.8% and R124P+R126D, 18%) showed a higher predicted antigenicity while two variants (T40N+D43D, 3.66% and Q121P, 7.9%) gave a lower antigenicity.

In the S gene, most of the mutations (sL49R, sY100S, sL209S, sS210R, sW182F+sV184G+sL186H, 5.35–36%)

led to a higher predicted antigenicity in resolvers. A few mutations (sY134F, sE164G, sL205M, sL216F, 2.1–4.1%) were associated with a lower predicted antigenicity. In non-resolver patients, some variants (sN40N/S+sT46P+sL49L/R, sP56P/Q+sT57I+sN59S+sS64C, sY200F+sS204S+sL205L+sI208T/I, 10.4–12%) showed a lower predicted antigenicity. For these patients, we also observed some mutations associated with higher predicted antigenicity (sT5T+sG10R, sN40N/S+sT46P/T, sI208T+sS210S, sM198I+sW199L+sY200Y, sY200F, sS204R+sL205M+sI208T/I, sS204R+sY206Y, 3.2–38.2%).

DISCUSSION

Factors favouring HBsAg clearance during antiviral treatment by NUCs are not well known, and their molecular mechanisms are not yet clear. In previous studies, HBsAg

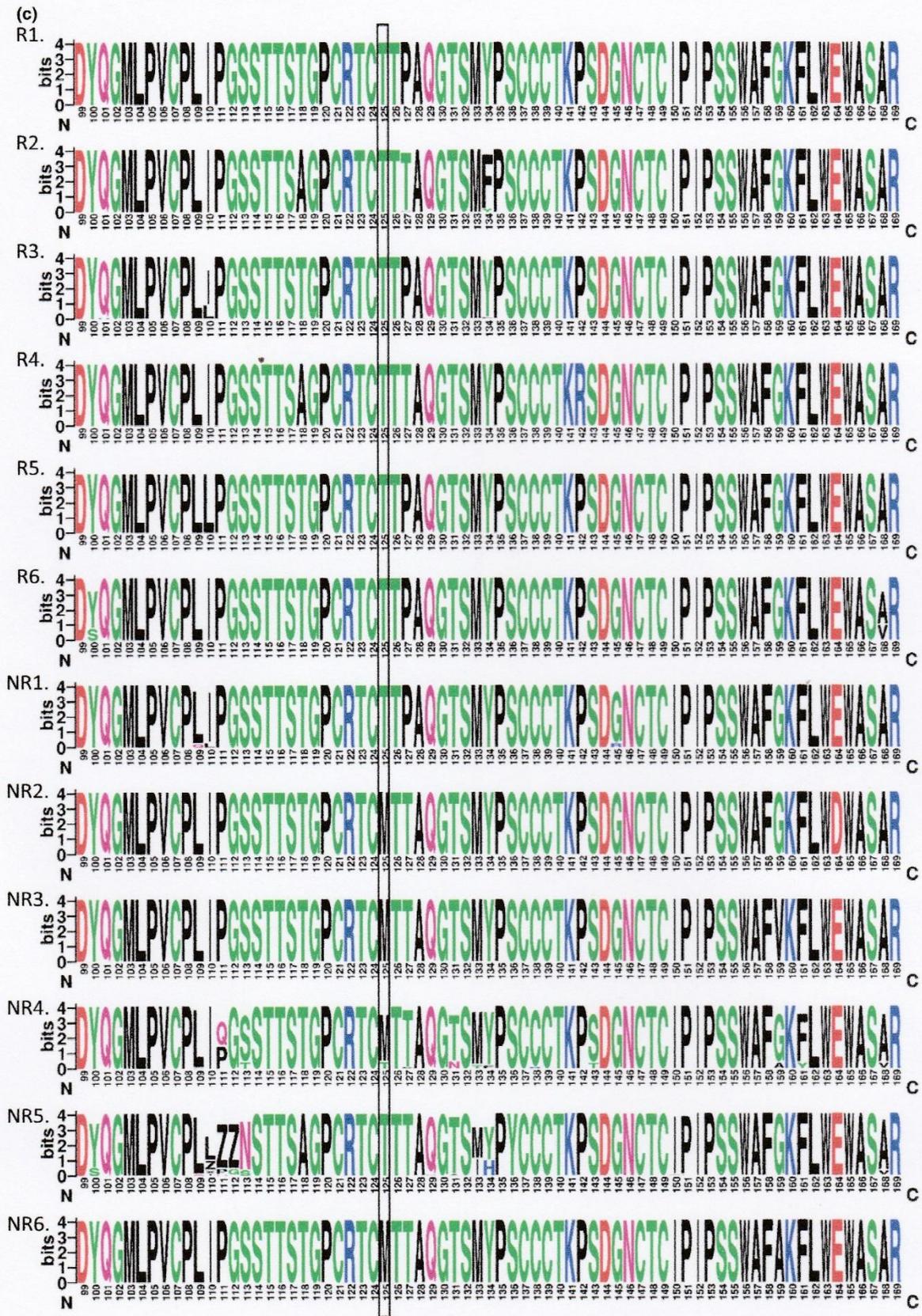


Fig. 4 Continued

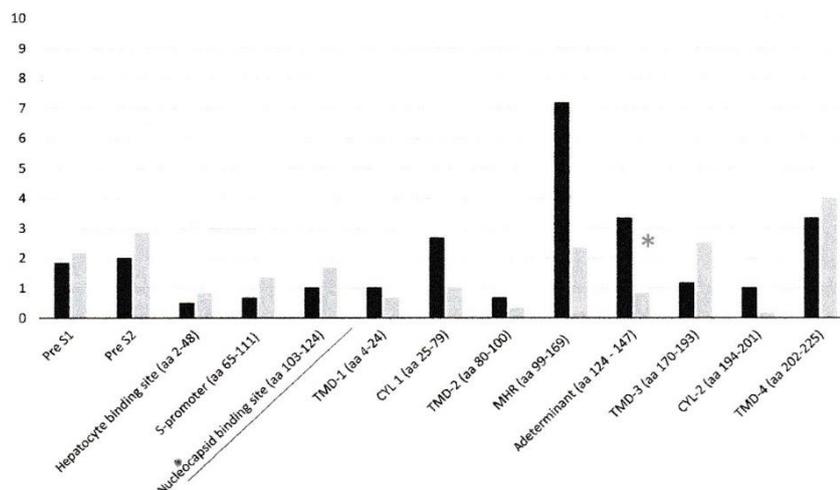


Fig. 5 Mean number of mutations within functional areas of HBV envelope, in resolvers (clear bar) and in nonresolvers (dark bar) (* $P = 0.04$) (TMD, transmembrane domain; CYL, cytosolic loop; MHR, major hydrophilic region).

clearance on NUCs has been correlated with high pretreatment alanine aminotransferase levels, older age and HBeAg loss, while for other authors, older age and inactive carrier status were the only independent predictors of HBsAg clearance [25,26]. Recent data also described a decrease of serum empty virions, correlated with HBsAg decrease, in patients who achieved HBsAg loss [27]. In this study, our aim was to investigate the possible influence of HBV envelope glycoprotein variability on HBsAg loss under treatment pressure.

In our cohort, HBV strains first investigated by direct gene sequencing showed the sT125M mutation (HBV envelope 'a' segment) more frequently in nonresolvers than in resolvers. The sT125M mutation was previously described in HBV subgenotype D3 either among HBV monoinfected patients [28] or intravenous drug users who were HIV/HBV coinfecting [29,30]. In HIV/HBV coinfecting patients, all resolvers exhibited the wild-type sT125 aa, while one patient with final HBV reactivation had the sT125M mutation [29]. Elsewhere, Velu *et al.* [31] reported the presence of sT125M and sP127T in a baby infected after vertical transmission despite HBV vaccination at birth.

We had to compare our data obtained on a small size cohort because of the scarcity of HBsAg clearance in patients chronically infected by HBV. Thus, we investigated the positions at which the aa signatures were retained in our study, in comparison with three clinical cohorts for which HBV genotype D sequences had been deposited in GenBank. As mentioned in the Results, these analyses allowed us to reinforce the relevance of our own observations according to two of the studies at positions 125, 127 and 118, even though the corresponding HBV genomic area was conserved in the third work [17]. In the cohort of Ismail *et al.*, DNA reduction or negativity under NUCs was not associated to MHR variability, while mutations in the 'a' determinant were associated to HBsAg persistence

in our cohort. This corroborates the important role of the immune response in the resolution of the infection. Interestingly, in a study performed by Rodriguez Lay *et al.* [32] on HBV strains in Cuba, mutations associated with immune escape within the S gene from HBV genotype A1, A2, C1 were also frequently reported in the B cell epitope aa 124–147 and in the MHR. These data globally suggest that the 'a' determinant, as the immunodominant region of HBsAg stabilized by a conserved disulphide bridge of cysteine residues, can play a role in HBsAg persistence or clearance. The related tridimensional folding of the protein in this region is also involved in viral entry [33,34]. Thus, mutations occurring in the close vicinity of this region may result in reduced antigenicity and/or in variable viral cellular entry and in subsequent functional *in vivo* impact. A modified detection of HBsAg by current immunoassays was reported, regarding position 125 (genotype D) [35] or positions 120, 123 and 126 (genotype B and C) [36,37]. Moreover, the residue sT125A was reported in a chronically infected patient associated with reduced antigenicity when evaluated by a phenotypic study in Huh-7 cells [38]. Using site-directed mutagenesis, it has been shown that sG119, sP120, sC121, sR122 and sC124 are required for HBV infectivity [34,39]. At last, in our study, the classification of patients according to HBsAg detection was carried out using a widely used method presenting a high sensitivity for the different viral variants [40]. However, we have to keep in mind that the exact HBsAg levels could be mis-evaluated in new emerging HBV variants, even though good technical controls are regularly performed on this commercial assay.

As the mutation sT125M, in combination with s127T or s127P, was associated with decreased predicted antigenicity, the reactivity of sera from HBV-vaccinated mice was tested in our homemade ELISA against wild-type or the sT125M-

mutated peptide. The sera from vaccinated mice showed lower reactivity to the sT125M-mutated peptide than to the wild-type peptide ($P = 0.0029$). Consistently, *in silico* analyses predicted a decreased antigenicity in the presence of the sT125M mutation. These two concordant results suggest that a lower humoral response against sT125M HBV strains could contribute to HBsAg persistence in patients. However, individual viral mutations must be analysed with caution. The evolution of HBV in a clinical setting is probably due to a multifactorial process [31,41]. In the present study, HBeAg positivity (2/6 resolvers vs 1/6 nonresolver) and HBV plasma DNA level (4.3 ± 2.5 vs 4.5 ± 0.5 log IU/mL) were not statistically associated to HBsAg clearance or persistence, respectively.

Our covariance approach showed more separating pairs in nonresolvers than in resolvers in the S and preS genes. The sT125M-sP127T connection observed by covariance investigation was consistent with the above-mentioned analyses. Interestingly, the presence of fewer mutations and separating pairs in the S gene in resolvers than in nonresolvers in our cohort is consistent with a previous study in patients infected by HBV, genotype D. In this study, a significantly lower mean pairwise genetic distance was demonstrated in genes encoding structural proteins in the event of HBsAg loss compared to control patients. This difference was higher in the 'a' determinant that we highlighted in our study [42].

In our cohort, UDS identified minor viral variants harbouring mutations in the S gene more frequently in nonresolvers than in resolvers, and more often located in areas which are crucial for the humoral immune response, that is the MHR and the 'a' determinant. The 20 aa changes in the MHR for nonresolvers are quite rare overall in HBV-infected patients (0.032–1.033%) [24]. Eight of these changes were associated with decreased antigenicity: sL109P/Q, sI110L, sS113T, sQ129H, sT131N, sM133T and sG145R [43–48]. Of the two nonresolvers without the sT125M+sP127T mutations, patient NR1 had three different variants with aa changes possibly associated with an evasion from the host immune response (sL109Q, 7.8%; sI110L, 9.9%; sG145R, 8.7%). Patient NR5 showed two major variants (60% and 25%) with deletion of, respectively, two and three aa (110–112) in the S, a truncated HBV S protein (I110*, 8%) and only 7% minor complete variants. Even though aa 110–112 are not located in the 'a' determinant, it is likely that the loss of these aa leads to a structural modification of the antigenic loop and antibody-mediated reactivity. Similarly, Greiner *et al.* [49] have demonstrated that HBsAg with modified conformation were not recognized by monoclonal antibodies specific for conformational S epitopes. Among the mutations exclusively found in the resolvers, only three of 20 were located in the MHR (sQ101H, sE164G and sA166V), and to

our knowledge, none were associated with decreased antigenicity. Moreover, in resolvers, we never observed any mutations in sites that are crucial to fixation to heparan sulphate [50].

In our cohort, the preS1 and preS2 genes showed more frequent minor variants in resolvers than in nonresolvers. In previous studies, the mean pairwise genetic distance was similar between patients exhibiting HBsAg loss and control patients in preS1/S2 [42]. Mutations in preS regions may modify the expression of HBsAg [51] and could therefore play a variable role in HBsAg clearance by modifying its antigenicity and/or viral replication cycle.

Elsewhere, mutations observed at HBsAg N-glycosylation residues in MHR seem to be involved in HBV immune escape [52]. In our cohort, only one supplementary site of N-glycosylation (Asn-X-Thr/Ser) was observed at residue 113 for NR5 patient.

In conclusion, in our cohort of patients treated with anti-HBV NUCs, nonresolvers (HBV DNA negative, HBsAg positive) showed more mutations in the MHR of the S protein compared to resolvers (HBV DNA negative, HBsAg clearance). HBV strains from nonresolvers more frequently exhibited the sT125M mutation in the S 'a' segment, combined with sP127T. The sT125M mutation was associated with a lower *in silico* predicted antigenicity and lower ELISA reactivity of HBV-vaccinated mouse sera. In nonresolvers, for viral strains without the sT125M mutation, UDS showed minor variants usually associated with decreased predicted antigenicity. These data suggest that failure to achieve HBsAg clearance under NUCs may be related, at least partially, to a difference in the molecular pattern of the HBV S gene between resolvers and nonresolvers, possibly modifying global HBV fitness.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Christine Legrand-Frossi, Sibel Berger and Myriam Bronner for their expertise on *in vivo* immunization, direct sequencing and ultra-deep sequencing, respectively.

FUNDING

Marine Eschlimann is supported by Lorraine University (Ministerial Fellowship) for her PhD work. The reagents for the experiments were obtained using a budget from Gilead Sciences (IN-FR-174-0217).

TRANSPARENCY DECLARATIONS

None to declare (all authors).

REFERENCES

- 1 Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M *et al.* Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2008; 359: 2442–2455.
- 2 Buti M, Fung S, Gane E *et al.* Long-term clinical outcomes in cirrhotic chronic hepatitis B patients treated with tenofovir disoproxil fumarate for up to 5 years. *Hepatol Int* 2015; 9: 243–250.
- 3 Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M *et al.* Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2011; 140: 132–143.
- 4 Zoutendijk R, Hansen BE, van Vuuren AJ, Boucher CA, Janssen HL. Serum HBsAg decline during long-term potent nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B and prediction of HBsAg loss. *J Infect Dis* 2011; 204: 415–418.
- 5 Zoulim F, Testoni B, Lebossé F. Kinetics of intrahepatic covalently closed circular DNA and serum hepatitis B surface antigen during antiviral therapy for chronic hepatitis B: lessons from experimental and clinical studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 1011–1013.
- 6 Blanchet M, Sureau C. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* 2006; 80: 11935–11945.
- 7 Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014; 147: 48–64.
- 8 Hayes CN, Zhang Y, Makokha GN, Hasan MZ, Omokoko MD, Chayama K. Early events in hepatitis B virus infection: from the cell surface to the nucleus. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; [Epub ahead of print].
- 9 Yan H, Zhong G, Xu G *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *ELife* 2012; 1: e00049.
- 10 Xiao F, McKeating JA, Baumert TF. A bile acid transporter as a candidate receptor for hepatitis B and D virus entry. *J Hepatol* 2013; 58: 1246–1248.
- 11 Maini MK, Bertolotti A. How can the cellular immune response control hepatitis B virus replication? *J Viral Hepat* 2000; 7: 321–326.
- 12 Wu C, Deng W, Deng L *et al.* Amino acid substitutions at positions 122 and 145 of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) determine the antigenicity and immunogenicity of HBsAg and influence in vivo HBsAg clearance. *J Virol* 2012; 86: 4658–4669.
- 13 Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol* 2010; 58: 2–266.
- 14 Tajiri K, Ozawa T, Jin A *et al.* Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. *Antiviral Res* 2010; 87: 40–49.
- 15 Datta S, Ghosh A, Dasgupta D *et al.* 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.
- 16 Ismail AM, Puhazhenth 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; 20: 1–10.
- 17 Al Baqlani SA, Sy BT, Ratsch BA *et al.* Molecular epidemiology and genotyping of hepatitis B virus of HBsAg-positive patients in Oman. *PLoS One* 2014; 9: e97759.
- 18 Mulders MN, Venard V, Njayou M *et al.* Low genetic diversity despite hyperendemicity of Hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis* 2004; 190: 400–408.
- 19 Odemuyiwa SO, Mulders MN, Oyelede OI *et al.* Phylogenetic analysis of new Hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol* 2001; 65: 463–469.
- 20 Sung JY, Tsui SKW, Tse CH *et al.* Genotype-specific genomic markers associated with primary hepatomas, based on complete genomic sequencing of Hepatitis B virus. *J Virol* 2008; 82: 3604–3611.
- 21 Deléage G, Combet C, Blanchet C *et al.* ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput Biol Med* 2001; 31: 259–267.
- 22 Parker JM, 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: 5425–5432.
- 23 Murray JM, Moenne-Loccoz R, Velay A *et al.* Genotype 1 hepatitis C virus envelope features that determine antiviral response assessed through optimal covariance networks. *PLoS One* 2013; 8: e67254.
- 24 Hayer J, Jadeau F, Deléage G *et al.* HBVdb: a knowledge database for Hepatitis B Virus. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: D566–D570.
- 25 Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B Virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137: 1593–1608.
- 26 Habersetzer F, Moenne-Loccoz R, Meyer N *et al.* Loss of hepatitis B surface antigen in a real-life clinical cohort of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Liver Int* 2015; 35: 130–139.
- 27 Luckenbaugh L, Kitrinis KM, Delaney WE, Hu J. Genome-free hepatitis B virion levels in patient sera as a potential marker to monitor response to antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2015; 22: 561–570.
- 28 Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Verbeeck J *et al.* 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; 82: 379–389.
- 29 Taffon S, Genovese D, Blasi M *et al.* HBV whole-genome mutation profile in HIV-1/HBV coinfecting patients in a long-term follow-up study. *Infection* 2014; 42: 675–687.
- 30 De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E *et al.* High level of genetic hetero-

- geneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology* 2007; 365: 113–124.
- 31 Velu V, Saravanan S, Nandakumar S *et al.* Transmission of “a” determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBs Ag carrier mothers. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61: 73–76.
 - 32 Rodríguez Lay LA, Corredor MB, Villalba MC *et al.* Genetic diversity of the Hepatitis B virus strains in Cuba: absence of West-African genotypes despite the transatlantic slave trade. *PLoS One* 2015; 10: e0125052. *
 - 33 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: 5841–5849.
 - 34 Salisse J, Sureau C. A function essential to viral entry underlies the HBV “a” determinant. *J Virol* 2009; 83: 9321–9328.
 - 35 Araujo NM, Vianna CO, Moraes MT *et al.* Expression of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) from genotypes A, D and F and influence of amino acid variations related or not to genotypes on HBsAg detection. *Braz J Infect Dis* 2009; 13: 266–271.
 - 36 Shi Y, Wei F, Hu D *et al.* Mutations in the major hydrophilic region (MHR) of hepatitis B virus genotype C in North China. *J Med Virol* 2012; 84: 1901–1906.
 - 37 Coleman PF. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 198–203.
 - 38 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: 101–108.
 - 39 Abou-Jaoudé G, Sureau C. Entry of hepatitis Delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange. *J Virol* 2007; 81: 13057–13066.
 - 40 Lou S, Pearce S, Lukaszewska T, Taylor R, Williams G, Leary T. An improved Abbott ARCHITECT[®] assay for the detection of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). *J Clin Virol* 2011; 51: 59–63.
 - 41 Li CZ, Hu JJ, Xue JY *et al.* Viral infection parameters not nucleoside analogue itself correlates with host immunity in nucleoside analogue therapy for chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 9486–9496.
 - 42 Charuworn P, Hengen PN, Aguilar Schall R *et al.* Baseline interpatient hepatitis B viral diversity differentiates HBsAg outcomes in patients treated with tenofovir disoproxil fumarate. *J Hepatol* 2015; 62: 1033–1039.
 - 43 Baclig MO, Alvarez MR, Gopez-Cervantes J, Natividad FF. Unique surface gene variants of hepatitis B virus isolated from patients in the Philippines. *J Med Virol* 2014; 86: 209–216.
 - 44 Pourkarim MR, sharifi Z, Soleimani A *et al.* Evolutionary analysis of HBV “S” antigen genetic diversity in Iranian blood donors: a nationwide Study. *J Med Virol* 2014; 86: 144–155.
 - 45 Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 2007; 127: 164–176.
 - 46 Ijaz S, Szypulska R, Andrews N, Tedder RS. Investigating the impact of hepatitis B virus surface gene polymorphism on antigenicity using ex vivo phenotyping. *J Gen Virol* 2012; 93: 2473–2479.
 - 47 Simon B, Kundi M, Puchhammer E. Analysis of mutations in the S gene of hepatitis B virus strains in patients with chronic infection by online bioinformatics tools. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 163–168.
 - 48 Ramezani F, Norouzi M, Sarizade GR *et al.* Mutation hot spots in hepatitis B surface antigen in chronic carriers from Khoozestan province, southern of Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2013; 12: 269–275.
 - 49 Greiner VJ, Manin C, Larquet E *et al.* Characterization of the structural modifications accompanying the loss of HBsAg particle immunogenicity. *Vaccine* 2014; 32: 1049–1054.
 - 50 Sureau C, Salisse J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* 2013; 57: 985–994.
 - 51 Kim BK, Choi SH, Ahn SH *et al.* Pre-S mutations of hepatitis B virus affect genome replication and expression of surface antigens. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29: 843–850.
 - 52 Yu DM, Li XH, Mom V *et al.* N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape. *J Hepatol* 2014; 60: 515–522.

ETUDE N°2

La variabilité de l'enveloppe du virus de l'hépatite B (VHB) est associée à la persistance de l'antigène HBs en cas d'infection aiguë ou chronique par le VHB de génotype A

M. Eschlimann, B. Malvé, A. Velay, H. Fenaux, S. Berger, J.P. Fripiat, F. Zoulim, M. Bensenane, J.P. Bronowicki, F. Goehringer, T. May, H. Jeulin, E. Schvoerer

Etude publiée dans *Journal of Clinical Virology*, 2017, volume 94, pages 115-122

Objectifs

De la même façon que pour la précédente étude, nous nous sommes intéressés à la variabilité des protéines d'enveloppe du VHB chez des patients infectés par des souches de VHB de génotype A (second génotype prédominant en Europe) dans le but de rechercher de nouvelles signatures moléculaires associées à la persistance de l'AgHBs. L'étude a également été élargie à différents profils cliniques de patients présentant soit une hépatite B aiguë, soit une hépatite B chronique, soit une hépatite B chronique associée à une co-infection par le VIH. Ces derniers présentant potentiellement un système immunitaire affaibli par l'infection par le VIH. Ainsi, cette seconde cohorte a été établie pour répondre à la question suivante : Est-ce que la variabilité des protéines d'enveloppe du VHB pourrait expliquer, au moins partiellement, l'évolution de l'infection par le VHB chez des patients avec ou sans traitement par NUCs ?

La variabilité des protéines d'enveloppe a été évaluée par séquençage direct et haut-débit chez 15 patients infectés par le VHB de génotype A séparés en trois sous-groupes : quatre patients infectés chroniquement sous traitement (deux « répondeurs » vs. deux « non-répondeurs »), cinq patients présentant une infection aiguë sans traitement (trois « répondeurs » vs. deux « non-répondeurs » qui ont évolué vers la chronicité) et six patients co-infectés par le VIH et le VHB sous traitement (deux « répondeurs » vs. quatre « non-répondeurs »). Des analyses *in silico* ont été réalisées afin d'identifier de potentielles signatures moléculaires sur les protéines d'enveloppe du VHB pouvant contribuer à l'évolution clinique de l'infection associée au statut AgHBs.

Résultats principaux

Tous les patients étudiés étaient infectés par le même sous-génotype A2, le plus commun en Europe [Ito *et al.*, 2016]. Le gène S avait tendance à être plus variable que la région préS ($p=0,08$). Sur la région préS, un nombre plus important de mutations majoritaires a été retrouvé chez les patients infectés chroniquement par le VHB (infection chronique et co-infection VIH) comparée aux patients avec une infection aiguë ($p=0,05$). De même, sur le gène S, un plus grand nombre de mutations majoritaires et minoritaires ont été observées chez les patients avec une infection chronique par le VHB ($p=0,05$).

L'analyse des mutations majoritaires observées chez les patients présentant une infection aiguë a mis en évidence plus de mutations sur le gène S des « non-répondeurs » que des « répondeurs » ($p=0,03$). Par ailleurs, aucune mutation n'a été observée dans la MHR des « répondeurs ». De plus, les mutations majoritaires observées sur les gènes préS/S de ce groupe sont plus souvent retrouvées dans les épitopes des lymphocytes B et T pour les « non-répondeurs » comparés aux « répondeurs » ($p=0,02$).

Une pression de sélection positive a été observée seulement sur le gène S des « non-répondeurs » mono-infectés par le VHB (mono-infection chronique par le VHB et infection aiguë ; $p=0,04$) et sur le gène S des « répondeurs » du groupe des co-infectés ($p=0,018$). Aucune pression de sélection positive n'a été observée pour la région préS.

Dans la région MHR, le nombre moyen de mutations majoritaires et minoritaires par patient était plus important chez les « non-répondeurs » (5,4 vs. 2,2 pour les « répondeurs »). Par ailleurs, 4/6 des patients « répondeurs » ne présentaient pas de mutation dans le déterminant « a », région importante reconnue par les anticorps neutralisants. La composition des différents haplotypes, présents dans la MHR de 11/13 des patients, a été évaluée. La complexité était supérieure à 0,1 pour 3/6 des « non-répondeurs » et 2/5 des « répondeurs ». Par ailleurs, sur le gène S, la complexité était plus faible chez les patients présentant une infection aiguë comparée aux patients infectés de façon chronique par le VHB ($p=0,046$). L'antigénicité prédite moyenne a été calculée pour chaque haplotype et comparée à l'antigénicité prédite moyenne de la séquence consensus A2. Une tendance à avoir plus d'haplotypes présentant une diminution de l'antigénicité prédite a été observée chez les « non-répondeurs » ($p=0,07$).

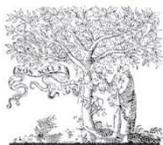
L'analyse des séquences obtenues en séquençage direct et haut-débit a permis de mettre en évidence huit mutations retrouvées que chez les « non-répondeurs » et présentes dans au moins deux groupes différents : deux dans la région préS (W4stop, $n=2$; T173A, $n=2$) et six sur le gène S (sR79H, $n=2$; sT118A, $n=3$; sF134Y, $n=2$; sY161F, $n=3$; sE164D, $n=3$; sV209L, $n=2$). Parmi ces mutations, la mutation sY161F, localisée dans la MHR, a été retrouvée exclusivement chez 3/8 des « non-répondeurs » et était associée à une diminution d'environ 28 % de l'antigénicité prédite.

Par ailleurs, des délétions ont été observées seulement chez les « non-répondeurs », toutes localisées dans des épitopes des lymphocytes B et T.

Conclusion

Dans cette étude portant sur des patients infectés par le VHB de génotype A et présentant différents profils cliniques, nous avons pu observer une plus grande variabilité des protéines d'enveloppe du VHB chez les patients présentant une persistance de l'AgHBs et plus particulièrement dans la région MHR. Par ailleurs, ces mutations étaient généralement localisées dans des épitopes importants pour la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. De plus, l'analyse des mutations observées chez les différents patients a permis de mettre en évidence huit mutations observées exclusivement chez les « non-répondeurs ». Parmi ces mutations, la mutation sY161F, retrouvée chez 3/8 des « non-répondeurs », a été associée à une diminution de l'antigénicité prédite de 28%. De plus, des délétions, localisées dans les épitopes des lymphocytes B et T, ont

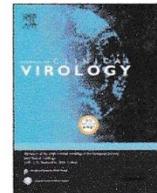
exclusivement été observées chez des « non-répondeurs ». Par cette étude, nous avons pu montrer que la persistance de l'AgHBs pouvait être, au moins partiellement, corrélée avec des mutations et des délétions observées dans des régions importantes pour la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, ces données vont dans le même sens que les résultats observés dans la première étude sur le VHB de génotype D et suggèrent que la variabilité de l'enveloppe du VHB pourrait favoriser l'échappement immunitaire quels que soient les profils cliniques de ces patients infectés par le VHB de génotype A ou D.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Full length article

The variability of hepatitis B envelope is associated with HBs antigen persistence in either chronic or acute HBV genotype A infection



Marine Eschlimann^a, Brice Malvé^b, Aurélie Velay^{a,b}, Honorine Fenau^b, Sibel Berger^b, Jean-Pol Frippiat^a, Fabien Zoulim^c, Mouni Bensenane^d, Jean-Pierre Bronowicki^d, François Goehringer^e, Thierry May^e, Hélène Jeulin^{a,b}, Evelyne Schvoerer^{a,b,*}

^a Université de Lorraine, EA 7300 Stress, Immunité, Pathogènes, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54505, France

^b Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Laboratoire de Virologie, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54511, France

^c Université de Lyon, Unité Inserm U11052, Lyon, F-69424, France

^d Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Service d'Hépatogastroentérologie, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54511, France

^e Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54511, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Deletions
HBV preS/S variability
HBV/HIV coinfection
Hepatitis B virus
Immune escape

ABSTRACT

Background: More than 240 million people are chronically infected by hepatitis B virus (HBV) worldwide. Envelope proteins play a crucial role in viral cellular entry and immune recognition. The loss of HBs antigen (HBsAg) correlated with a good clinical prognosis is rarely achieved with or without treatment (3–16%).

Objectives: HBV envelope variability was investigated according to HBsAg persistence.

Study design: The cohort consisted of 15 HBV genotype A-infected patients divided into “resolvers”, with HBsAg clearance, and “non-resolvers”, with HBsAg persistence and in subgroups: acute (n = 5, AHBV) or chronic infection (n = 4, CHBV) and HBV/HIV coinfection (n = 6, CHBV/HIV). HBV S and preS sequences were studied by direct and ultra-deep sequencing. Amino acid sequences were analyzed with bioinformatics for predicted antigenicity.

Results: In S gene, the complexity was lower in AHBV than in chronic-infected patients (p = 0.046). Major mutations, detected using direct sequencing, were more frequent in AHBV developing chronicity (p = 0.01) than in AHBV resolvers. In the Major Hydrophilic Region, more frequent mutations were observed in non-resolvers versus resolvers (p = 0.047) and non-resolvers tended to have more haplotypes with a reduced predicted antigenicity (p = 0.07). Most of the mutations in preS/S region were found rather in epitopic than in non-epitopic areas (p = 0.025). Interestingly, the mutation sY161F found in 3/8 non-resolvers was associated with a decrease in predicted antigenicity (28%; AnTheProt).

Conclusions: HBsAg persistence was correlated with mutations and deletions in areas playing a key role in immune recognition. These data suggest that variability in HBV envelope could favor immune escape in various clinical settings of HBV genotype A-infected patients.

1. Background

Despite vaccination, hepatitis B virus (HBV) infection remains difficult to eradicate [1]. HBV envelope glycoproteins, forming HBs antigen (HBsAg), are crucial for entry into hepatocyte [2], and are targeted by the immune system [3–5]. HBsAg exhibits numerous B-cells and T-cells epitopes, including the major hydrophilic region (MHR, aa s99–s169) with “a” determinant (aa s124–s147) targeted by

neutralizing antibodies [6]. Amino acid substitutions around or within the “a” determinant and/or mutations and deletions in preS region can be responsible for immune escape [7,8]. Molecular characteristics of HBV envelope proteins may thus favor viral fitness at the entry step and/or HBV escape to host immunity. Our previous data on HBV genotype D-infected patients suggested that failure to achieve HBsAg clearance under nucleos(t)ide analogues (NUCs) could be related to a differential molecular pattern of HBV S genes [9].

* Corresponding author at: Laboratoire de Virologie - CHRU de Nancy Brabois, Route de Neufchâteau, 54500 Vandoeuvre Les Nancy, France.

E-mail addresses: marine.eschlimann@hotmail.fr (M. Eschlimann), b.malve@chru-nancy.fr (B. Malvé), aurelie.velay@chru-strasbourg.fr (A. Velay), h.fenau@chru-nancy.fr (H. Fenau), s.berger@chru-nancy.fr (S. Berger), jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr (J.-P. Frippiat), fabien.zoulim@inserm.fr (F. Zoulim), mouni.bensenane@yahoo.fr (M. Bensenane), jp.bronowicki@chru-nancy.fr (J.-P. Bronowicki), f.goehringer@chru-nancy.fr (F. Goehringer), t.may@chru-nancy.fr (T. May), h.jeulin@chru-nancy.fr (H. Jeulin), e.schvoerer@chru-nancy.fr, schvoerer@gmail.com (E. Schvoerer).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.08.001>

Received 16 June 2017; Accepted 2 August 2017

1386-6532/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Objectives

Functional cure of HBV infection defined by undetectable viral load, HBsAg clearance and ideally anti-HBs antibody production is a rare event in mono or coinfecting patients (3–7% without treatment and 3–16% under treatment) [10–14]. Our hypothesis that variability of HBV envelope proteins could contribute to influence the evolution of HBV infection was here evaluated on 15 HBV genotype A-infected patients with different clinical profiles, including six HIV coinfections. According to direct sequencing and ultra-deep sequencing (UDS), more frequent mutations were observed in the MHR for “non-resolvers” (HBsAg persistence) versus “resolvers” (HBsAg clearance) and most of the mutations in preS/S region were found in epitopic areas. In non-resolvers, the mutation sY161F was associated to a decrease in predicted antigenicity. Thus, HBsAg persistence was correlated with mutations and deletions in areas playing a key role in immune recognition, suggesting that variability in HBV envelope could favor immune escape in various clinical settings of HBV genotype A-infected patients.

3. Study design

3.1. Patients

The cohort consisted of 15 patients infected with hepatitis B virus genotype A, followed in Hepato-Gastroenterology or Infectious diseases, University Hospital, Nancy, France. Informed consent was obtained for each patient and approved by the “Comité de Protection des Personnes – CPP de Lorraine” (DC-2013-1801, DC-2016-2790), in accordance with international guidelines.

The patients were classified as “resolvers” when presenting HBsAg clearance ($n = 7$), or “non-resolvers” in case of HBsAg persistence ($n = 8$), and also classified according to clinical context, gender and age. Thus three subgroups were studied: five patients developing acute hepatitis B without treatment (AHBV, three showing a loss of HBsAg paired with two evolving to chronicity, mean age 50 ± 6 years), four patients chronically infected with HBV, treated by nucleos(t)ide analogues (NUCs) (CHBV, two resolvers and two non-resolvers, mean age 68 ± 3 years), and six patients chronically coinfecting with HIV and HBV on NUCs (CHBV/HIV, two resolvers and four non-resolvers, mean age 54 ± 10 years (Table 1)).

3.2. Sequencing

HBV DNA was amplified for preS region and S gene by nested PCR and amplicons were submitted to direct sequencing (automated Sanger method) [9]. Among the 15 patients, 13 were sequenced by ultra-deep sequencing (UDS) (Ion Personal Genome Machine Sequencer; Life Technologies, Carlsbad, California) as previously described [9], with Nextgene software (reference sequence: KP234051) [15]. The cut off for the mutation frequency was set at 2%.

3.3. Bioinformatics analyses

The Mega 6 software [16] was used to analyze variations in nucleic acid and amino acid (aa) sequences by comparison with a consensus sequence A2 KP234051 [15].

HBV genotype of each strain was determined with GREG software (CHU Grenoble, France). Subgenotypes were defined by using a phylogenetic tree produced with Mega 6 with Neighbor joining method (Kimura 2-parameter) [16]. The reference sequences were drawn from Cai et al. [15] for genotypes A1, A2, A3 and A5 (KP234050–KP234053) and from NCBI database for genotype A4 (KM606737) and A6 (GQ331047).

The selection pressure was analyzed with Mega 6 (Nei-Gojobori method with Jukes-Cantor correction), using Z-test with the hypothesis $dN = dS$ (the number of non-synonymous mutations equal to the

number of synonymous mutations) [16].

The prediction of the antigenicity of aa sequences in HBV envelope was performed with AnTheProt software based on hydrophobicity, flexibility and accessibility (AnTheProt 6.7.0; <http://antheprot-pbil.ibcp.fr>; IBMC Lyon) [17,18]: higher the peak is, higher the predicted antigenic properties are.

To determine the single-nucleotide polymorphism in viral population, the percentage of each base at each position was determined for each patient. Moreover, to evaluate the viral quasispecies features, the genetic complexity was determined by calculating the Shannon entropy. The genetic complexity was first evaluated at each position for each nucleic acid (na) and amino acid (aa) position of the S gene, the preS region and the MHR. The genetic complexity was also evaluated for each haplotype within the MHR. The Shannon entropy (S_n) was calculated using the formula [19,20]:

$$S_n = \frac{-\sum_i (p_i \ln p_i)}{\ln(N) \text{ or } \ln(h)}$$

where p_i is the frequency of the aa mutations or of the haplotype within the viral population. The result was normalized by the total number of sequences analyzed at each position (N) or of haplotypes (h). S_n varied from 0 (no complexity) to 1 (maximum complexity).

3.4. Statistical analyses

Student's *t*-test and Mann Whitney *U* test were performed using GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software, San Diego, California). A *p*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

4. Results

All the patients included in this study were male, between 40 and 71 years old at the time of inclusion. All the patients were infected by HBV subgenotype A2 (Table 1).

When looking for major mutations (Sanger method) in AHBV subgroup, patients developing chronic HBV infection (non-resolvers) presented more frequent mutations in S gene than resolvers ($p = 0.03$) with no mutation in MHR for resolvers (Fig. 1). The AHBV patients also presented fewer mutations in preS region than patients with chronic infection (CHBV and CHBV/HIV; $p = 0.05$). These mutations were more often found in known B- and T-cells epitopes for AHBV non-resolvers than for resolvers ($p = 0.02$; Fig. 2) [3,21].

A positive selective pressure was observed only in S gene for non-resolvers in monoinfected subgroups (CHBV and AHBV; $p = 0.04$) and in S gene for resolvers from CHBV/HIV subgroup ($p = 0.018$). No positive selective pressure was observed in preS region.

In the MHR, the mean number of mutations (major and minor) per patient was 2.2 (0–8) in resolvers and 5.4 (1–14) in non-resolvers. The difference was statistically significant if excluding R1 that presented a higher variability than other resolver patients ($p = 0.047$). Moreover four out of six resolvers had no mutation in “a” determinant (Fig. 3).

UDS analyses generated 4,547,341 reads (133,579–275,869 per sample for S gene and 88,783–243,756 per sample for preS region) with an average of 174,898 reads/sample. The size of the reads was between 184 to 225 pb with an average of 205 pb encompassing the entire S gene and preS region. The Q score (or Phred score) was ≥ 20 for 87% of S gene sequences and 88% of preS region sequences. For the whole cohort, most of the mutations in preS/S region were found rather in epitopic than in non-epitopic areas ($p = 0.025$). There was a tendency to have more frequent mutations within the 226 aa of HBV S gene than within the 174 aa of HBV preS sequence ($p = 0.08$). UDS analysis highlighted 78 minor aa changes in S gene. More mutations were observed in S gene from patients with chronic infection than from patients with acute infection ($p = 0.05$). Interestingly, in CHBV/HIV subgroup, no minor mutation was observed in the resolver whose UDS data could

Table 1
Biological and clinical features of the HBV-infected patients.

	HBV/HIV coinfecting chronic subgroup										HBV/HIV coinfecting chronic subgroup									
	HBV monoinfected chronic subgroup					Acute hepatitis B subgroup					HBV/HIV coinfecting chronic subgroup					HBV/HIV coinfecting chronic subgroup				
	R1	R2	NR1	NR2	NR3	R3	R4	R5	NR4	R6	R7	NR6	NR7a	NR7b	NR7c					
Gender	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M					
Age (years)	67	70	64	71	47	44	46	54	59	40	64	42	61	58	57					
Sampling date	2005	1999	2002	2007	2014	2003	2007	2007	2007	2008	2013	2003	2013	2003	2003					
HBV serology	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2					
HBV Viral load (Log 10 IU mL ⁻¹)	5,8 ¹	> 8 ¹	> 5 ¹	2,94 ²	4,33 ¹	3,2 ¹	4,5 ²	6,35 ²	9,24 ²	3,16 ²	2,27 ¹	> 5,3 ¹	4,7 ¹	4,3 ¹	4,6 ¹					
HBeAg status at baseline	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+					
Anti-HBe status at baseline	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-					
HBV antiviral therapy (years)	IFNα-2β (1999), 3TC (2005)	3TC	ADV/ETV (2008)	ADV/ETV (2006)	3TC/ADV/IFN (2003), ADV/ETV (2006)	/	/	/	/	TDF/FTC (2006–2008)	TDF/FTC (2009), 3TC (2010–nowadays)	3TC (2000–2004)	tritherapy since 1996, TDF (2003–2010), TDF/FTC (2010–nowadays)	3TC (1999–2002)	3TC/TDF (2003/2006)					
Drug resistance associated mutations	/	/	/	rtM204V	rtM204V, rtL180M	/	/	/	/	/	/	rtV173L, rtL180M, rtM204V	/	rtV173L, rtM204V	/					
HBV reactivation	Yes	ND	No	ND	ND	ND	ND	ND	No	ND	No	No	No	No	No					
HIV viral load										1,05 × 10 ⁶ copies.mL ⁻¹ 2	5,19 log ¹	2,75 log ¹	3,15 log ¹	ND ¹	459 copies.mL ⁻¹					
HIV subtype										B	B	B	B	B	HIV-1					
HIV clinical stage										C3	C3	A3	C3	A3	CRF02AG					
HIV transmission mode										MSM	MSM	MSM	MSM	MSM	Hetero-sexual					
Count of CD4 ⁺ (mm ³)									74	184	482	118	359	144						

R: Resolter; NR: Non-Resolter; M: Male; DTII: Type 2 diabetes; ND: not determined; MSM: men who have sex with men.
Treatments: TDF: tenofovir; FTC: entricitabine; 3TC: lamivudine; IFN: interferon; LPV: lopinavir; RTV: ritonavir; AZT: zidovudine; EFV: efavirenz; ABC: abacavir; NVP: nevirapine; ddi: didanosine; ATV: stavudine; DRV: darunavir; NFV: nelfinavir; ADV: adefovir; ETV: entecavir.
HBV serology: HBsAg, HBeAg and anti-HBe levels were studied by Architect Abbot* (Abbott France, Rungis, France).
HBV viral load: The last available serum with a positive HBV DNA was used for all the analyses.
¹HBV viral load analyzed by Roche Cobas* (threshold at 200 copies for samples performed before 2005, at 20 UI mL⁻¹ for samples performed after 2011; Roche Diagnostics France, Meylan, France).
²HBV viral load analyzed by M2000rt Abbott* (threshold at 4 UI mL⁻¹ for samples from 2006 to October 2007 and at 10 UI mL⁻¹ for samples from 2007 to 2009; Abbott France, Rungis, France).
HIV viral load: HIV viral loads analyzed by Roche Cobas* (threshold at 200 copies for samples performed before 2005, at 20 copies.mL⁻¹ for sample after 2011; Roche Diagnostics France, Meylan, France).
²HIV viral loads analyzed by M2000rt Abbott* (threshold at 40 copies.mL⁻¹ for samples from 2006 to October 2011; Abbott France, Rungis, France).

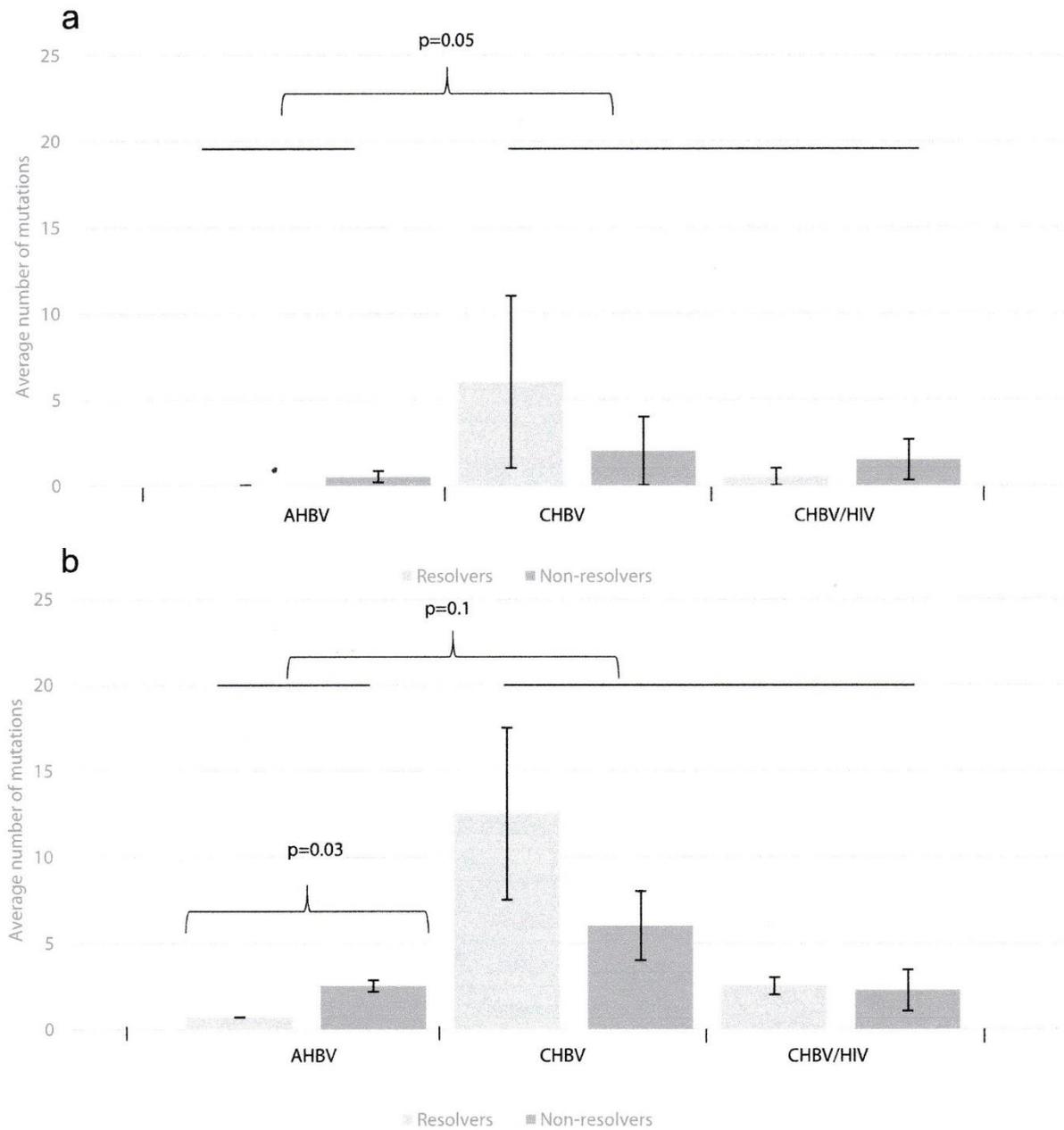


Fig. 1. Average number of mutations per patient of acute hepatitis (AHBV), chronic hepatitis monoinfected (CHBV) and coinfecting (CHBV/HIV) subgroups, identified by direct sequencing in preS region (a) and in S gene of HBV envelope proteins (b) (resolvers: HBsAg clearance, non-resolvers: HBsAg persistence).

be obtained, versus 40 minor mutations in non-resolvers. In the whole cohort, 24 minor aa changes were located in the MHR (58.5%) in non-resolvers, while only three minor mutations were observed in the MHR from resolvers ($p = 0.043$).

In the MHR, the more frequent major mutation observed exclusively and several times in non-resolvers was the sY161F. It was observed in 2/8 patients, using direct sequencing, in two different subgroups (AHBV and CHBV), while in HBVdb r35, (<http://hbvdb.ibcp.fr>) [22], the sY161F frequency was at 5.11% (65/1271) among the LHBS (Large HBV envelope proteins) genotype A sequences. Moreover, the mutation sY161F was observed in minor variants (10%) in one non-resolver patient from CHBV/HIV subgroup (NR7b). A decrease of predicted antigenic peak was observed in the S protein sequence of non-resolver patients harboring the sY161F mutation (-28%, Fig. 4).

The analysis of aa mutations identified by both direct sequencing and UDS allowed us to highlight seven other mutations observed in non-resolvers from at least two out of the three patients subgroups: two

in preS region, W4stop ($n = 2$), T173A ($n = 2$) and five in S gene, sR79H ($n = 2$), sT118A ($n = 3$), sF134Y ($n = 2$), sE164D ($n = 3$) and sV209L ($n = 2$).

The normalized Shannon entropy (S_n) was overall low (< 0.1) for all the HBsAg na and aa positions (S and preS genes). The complexity of haplotypes within the quasispecies was evaluated in the MHR for 11/13 patients (supplementary data S1). The S_n was high (> 0.1) for 3/6 non-resolvers and 2/5 resolvers, meaning for the three CHBV patients (two non-resolvers and one resolver), and for two out of the four CHBV/HIV patients (one non-resolver and one resolver). The S_n was low for the AHBV patients (NR3, $S_n = 0.065$; R3/4/5, $S_n = 0$). The complexity was thus lower in AHBV than in chronic-infected patients, CHBV and CHBV/HIV ($p = 0.046$ in S gene and $p = 0.007$ in the MHR).

When exploring a possible decrease in MHR antigenicity for non-resolvers, we calculated the mean predicted antigenicity of each haplotype and compared it to the mean antigenicity of the wild type consensus HBV A2 strain. In resolver patients, an average of 10% of

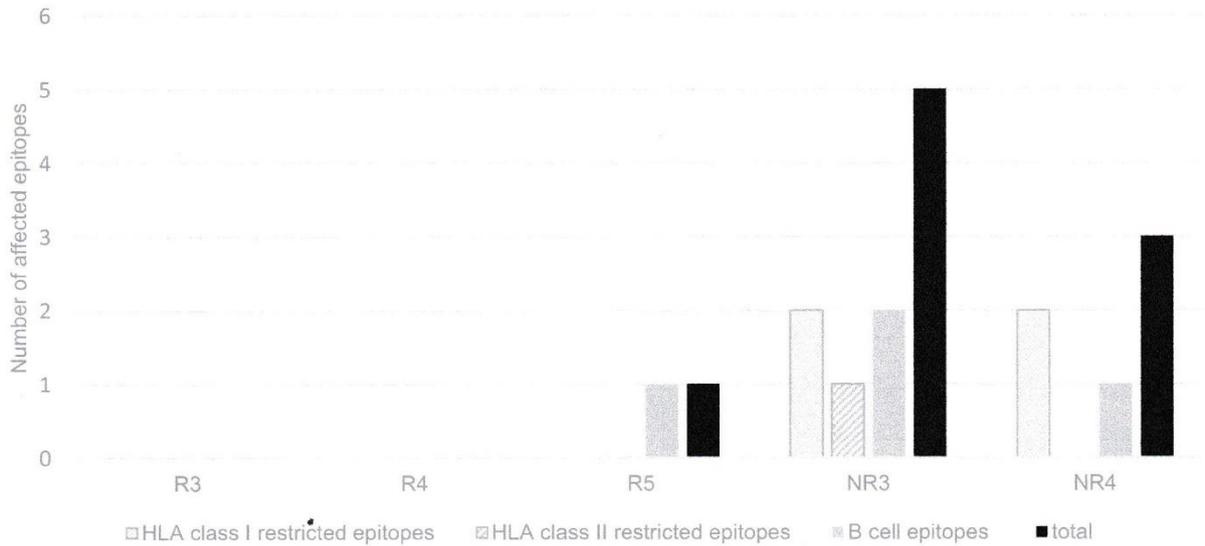


Fig. 2. Number of T-cell and B-cell epitopes affected by mutations in preS and S gene of HBV genotype A strains in acute-infected patients. (R: resolver, resolving hepatitis B, NR: non-resolver, evolving to chronicity).

haplotypes showed a reduced antigenicity compared to the wild type consensus strain, while in non-resolvers a mean of 38% of haplotypes showed a reduced antigenicity (maximum percentage reached 100%). The difference between resolvers and non-resolvers tended to be relevant ($p = 0.07$), when excluding patient R1 with highly variable MHR.

The deletions were only observed in preS region of CHBV/HIV non-

resolvers. Two patients presented large depleted areas for a high percentage of quasispecies (Fig. 5). Truncated proteins were observed in non-resolvers of different subgroups: in NR3 from AHBV subgroup (sW182stop at 4% in S gene and W4stop at 15% in preS), and in NR7b (sW182stop at 4% and sL216stop at 67% in S gene) and NR7c (sW163stop at 2% and sW182stop at 2% in S gene and W4stop at 5% and W52stop at 3% in preS region) from CHBV/HIV subgroup.

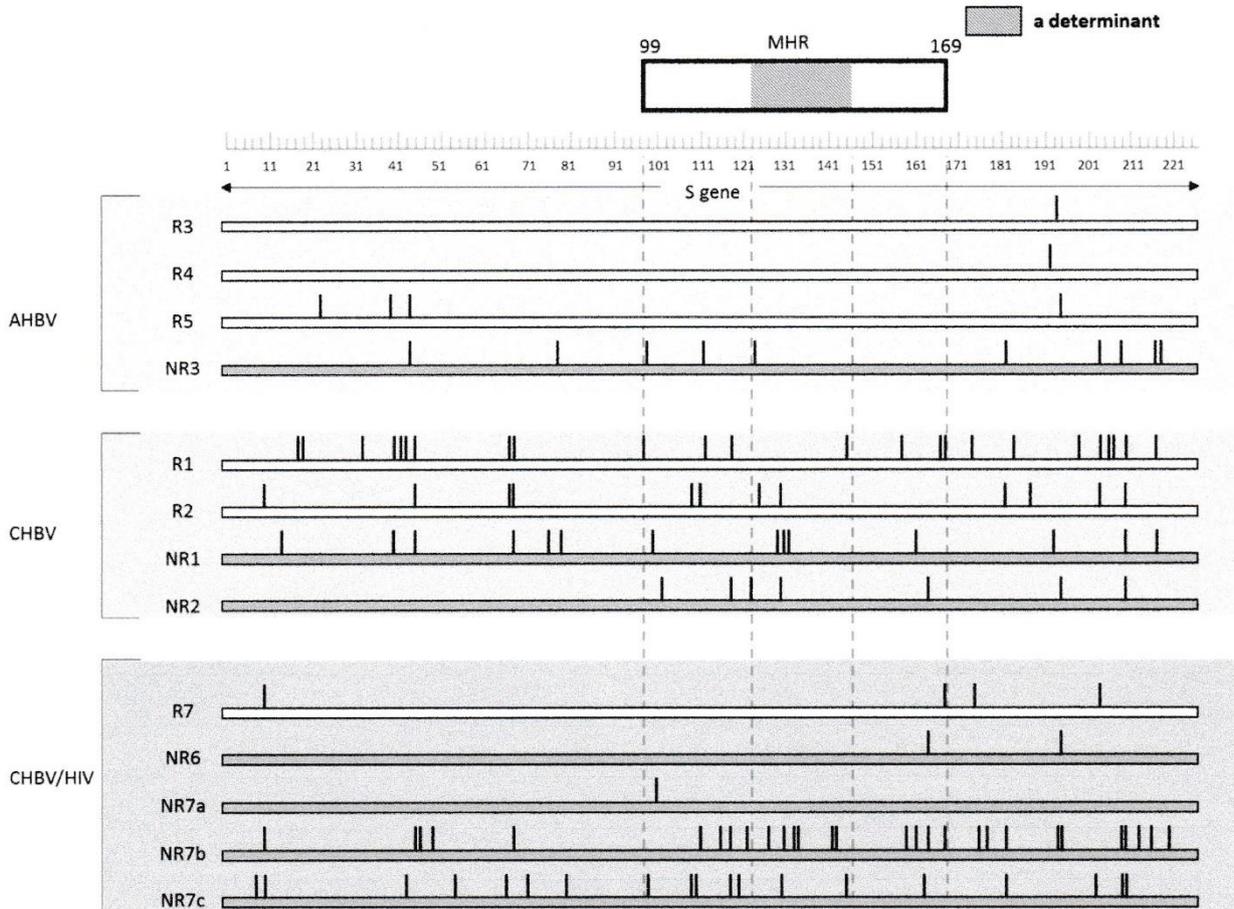


Fig. 3. Single nucleotide polymorphism observed by using ultra-deep sequencing in HBV S gene, Major Hydrophilic Region (MHR) and “a” determinant in resolver (white line) and non-resolver (dark line) patients of different sub-groups, i.e. acute hepatitis B (AHBV), treated chronic hepatitis B (CHBV) and treated HBV/HIV coinfecting (CHBV/HIV).

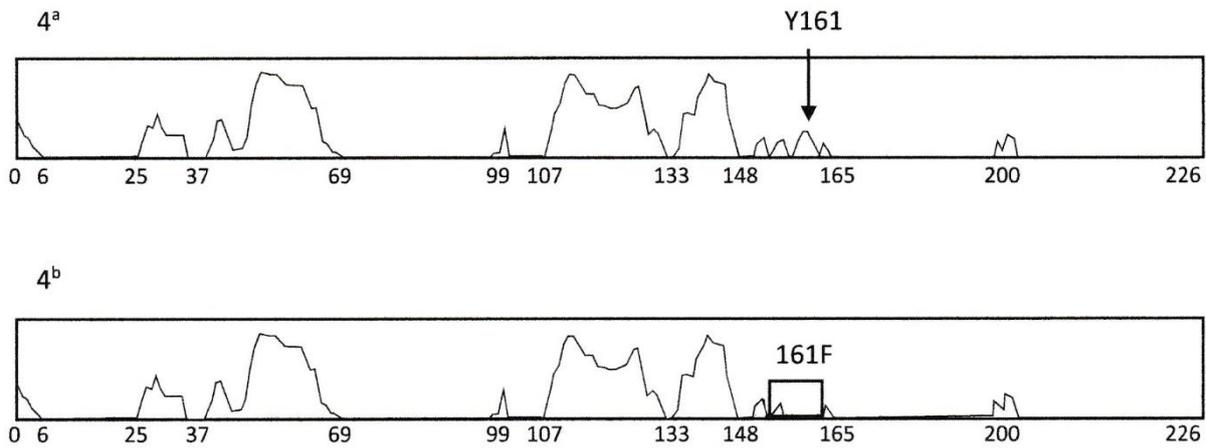


Fig. 4. Antigenic profile of S protein (aa 1–226) of genotype A2 HBV (KP234051) predicted by AnTheProt software (higher the peak is, higher the predicted antigenicity is): a) consensus sequence established by Cai et al. [15]; b) consensus sequence with mutation sY161F associated to decrease predicted antigenicity (black box).

Truncated proteins were also observed in one resolver of CHBV subgroup (R2, sW182stop at 40% in S gene).

At last, more frequent mutations were observed in the polymerase of treated patients than in patients without treatment ($p = 0.04$).

5. Discussion

All patients included in the present study were HBV genotype A, subgroup A2. Consistently with a previous study, by comparison with our previous data on HBV genotype D [9], we also observed a higher mean evolutionary divergence in HBsAg for the genotype D than for genotype A ($d = 0.011$ for S and $d = 0.0095$ for preS vs. $d = 0.001$ for S and $d = 0.001$ for preS).

As demonstrated in our previous work [9], more numerous major and minor mutations were observed in S gene than in preS region for HBV genotype A, particularly in the MHR. MHR is a key region for immune recognition and mutations in this region can modify the antigenic properties and conformation of S epitopes and promote HBsAg persistence [6]. Moreover, we observed less mutations in S gene of

patients with acute hepatitis B compared to patients with chronic hepatitis B ($p = 0.05$), which could be linked, at least partially, to a shorter exposure of the virus to the host immune system. AHBV patients who developed chronic HBV infection presented more frequent major mutations in S gene than resolvers ($p = 0.03$). When considering all sub-groups, non-resolvers presented more frequent mutations in MHR region than resolvers, consistently with previous published data [9].

Moreover, some mutations observed only in non-resolvers were characterized; five have been previously described as immune escape mutations: sY100C, sP120T, sC124Y, sM133T/I and sP142R. Mutation sM133T was responsible for the appearance of a new site of N-glycosylation (131 NST 133) which could promote HBV immune escape [23]. Eight others mutations, including one truncated protein (W4stop), were observed several time in at least two different subgroups. The mutation sY161F, located in “a” determinant, was observed in three patients from the different subgroups. This mutation decreased the predicted antigenicity of about 28%. It was found in patients chronically infected with HBV [24], was reported in case of escape from vaccination [25], in healthy young adults with occult hepatitis B [26] and in a 47-year old-

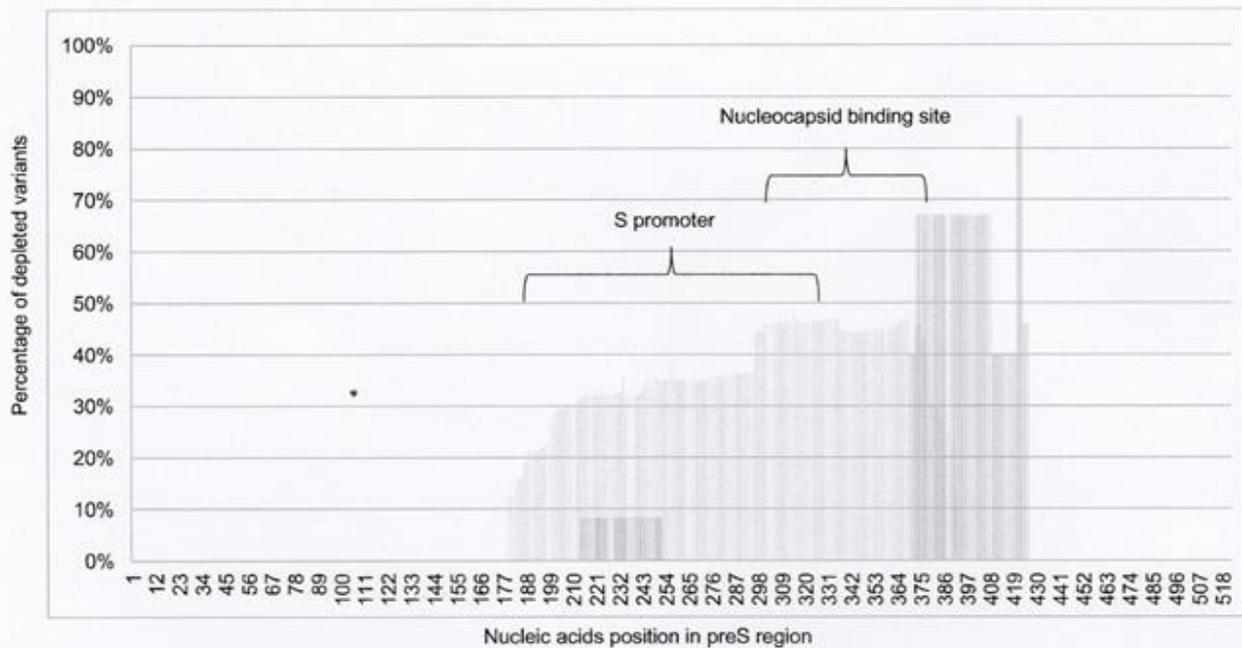


Fig. 5. Percentage of different depleted variants observed with ultra-deep sequencing in two non-resolvers of HIV coinfecting chronic subgroup (CHBV/HIV): NR7b in dark grey presented three deletions aa 141–142 (nucleic acid: 421–426) at 46%, aa 124–141 (nucleic acid: 370–423) at 40% and aa 125–136 (nucleic acid: 373–408) at 27% and NR7c in light grey presented one deletion covering aa 60–130 (nucleic acid: 178–393) at 13–47%.

woman with chronic active subgenotype A2 hepatitis B despite treatment [27]. While the residue F in position 161 is rare in genotype A (5.11%) and in genotype B (10%), this aa is predominant in genotypes C, the ancestral genotype, and D consensus [28].

In preS, the mutation W4stop that produces LHBs truncated proteins was present in two non-resolver patients of our cohort (5 and 15%). In S gene, three types of truncated proteins were observed in Cter: W163stop, L216stop, W182stop. LHBs proteins truncated in Cter can promote metabolic alterations and are associated with cirrhosis and hepatocarcinoma due to intracellular accumulation of proteins in endoplasmic reticulum (ER) stress [29,30]. Deletions were also only observed in non-resolvers of CHBV/HIV subgroup. PreS deletions decrease the production of surface proteins, promote viral persistence, and are generally associated with the progression of liver disease [31–34]. Furthermore, deletions observed in our cohort were located in B- and T-cell epitopes and might alter recognition by the immune system [31,35].

The Shannon entropy of quasispecies at each amino acid position of the MHR and of the full preS/S genes was low (< 0.1). In the MHR, mean Shannon entropy of haplotypes within the quasispecies showed differences between patient subgroups. It was lower for AHBV subgroup ($S_n = 0.016$) than in chronic-infected patients (CHBV and CHBV/HIV subgroups, $S_n = 0.17$). It could be assumed that viral populations become more complex when the infection lasts over time, as shown for HIV [36]. Considering the mean predicted antigenicity of each haplotype in the MHR, the non-resolvers presented a higher percentage of haplotypes with reduced predicted antigenicity probably favoring to immune escape.

Elsewhere, in a study from Mondal et al. [37], more non-synonymous mutations were observed in B-cells than in T-cells of chronic patients without HIV coinfection compared to HBV/HIV coinfecting patients. In our hands, this was also observed in preS gene from resolvers of the CHBV subgroup compared to CHBV/HIV resolvers (data not show).

Overall, in our HBV genotype A cohort, more mutations were observed in patients with acute infection evolving to chronicity and in chronically HBV-infected patients with HBsAg persistence compared to resolvers. These mutations were especially located in epitope domains of HBV envelope. Among the eight mutations specifically observed in non-resolvers, five were predicted with bioinformatics to show a lower binding to anti-HBs antibodies and particularly the mutation sY161F observed in three non-resolvers. Thus, the persistence of HBsAg could be, among other factors, correlated with mutations and deletions in areas which play a key role in immune recognition, possibly favoring HBV escape whatever the clinical setting.

Conflict of interest

None to declare.

Funding

Marine Eschlimann is supported by Lorraine University (Ministerial Fellowship) for her PhD work.

The reagents for the experiments were obtained using a budget from Gilead Sciences (IN-FR-174-0217).

Ethical approval

The study was approved by the "Comité de Protection des Personnes-CPP de Lorraine" (DC-2013-1801, DC-2016-2790), in accordance with international guidelines.

Acknowledgments

We thank Dr. Alain Duda for analyses and data collection on HBV/

HIV coinfecting patients and Dr Myriam Bronner for his expertise on ultra-deep sequencing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.08.001>.

References

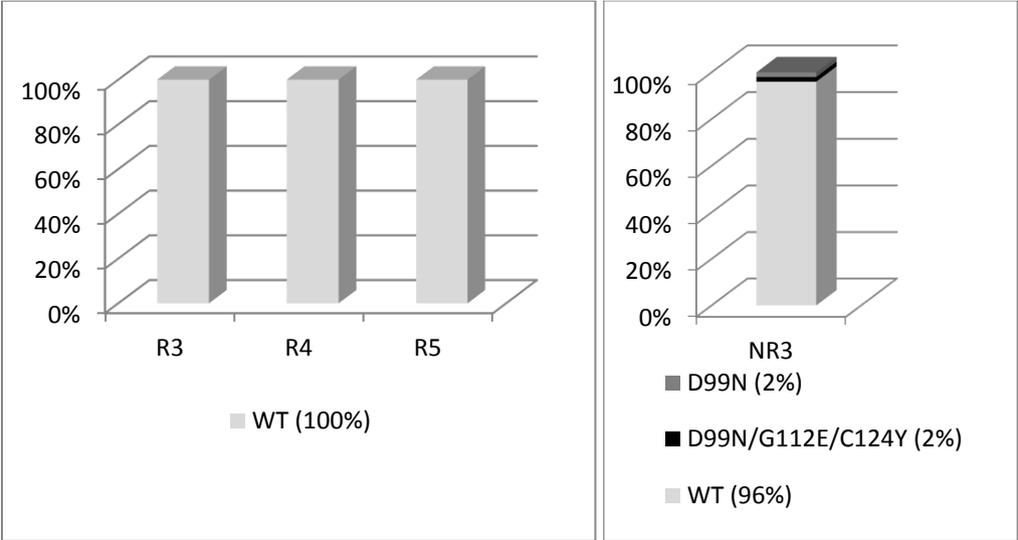
- [1] J.J. Ott, G.A. Stevens, J. Groeger, S.T. Wiersma, Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity, *Vaccine* 30 (2012) 2212–2219, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.116>.
- [2] F.A. Lempp, S. Urban, Inhibitors of hepatitis B virus attachment and entry, *Intervirology* 57 (2014) 151–157, <http://dx.doi.org/10.1159/000360948>.
- [3] C.P. Desmond, A. Bartholomeusz, S. Gaudieri, P.A. Revill, S.R. Lewin, A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics, *Antivir. Ther.* 13 (2008) 161–175.
- [4] S. Margeridon, A. Lachaux, C. Trepo, F. Zoulim, A. Kay, A quasi-mono-clonal anti-HBs response can lead to immune escape of 'wild-type' hepatitis B virus, *J. Gen. Virol.* 86 (2005) 1687–1693, <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80810-0>.
- [5] F. Ramezani, M. Norouzi, G.R. Sarizade, V. Poortahmasebi, E. Kalantar, L. Magnius, H. Norder, E. Domingo, S.M. Jazayeri, Mutation hot spots in hepatitis B surface antigen in chronic carriers from Khozestan province, southern of Iran, *J. Allergy Asthma Immunol.* 12 (2013) 269–275.
- [6] V.J. Greiner, C. Manin, E. Larquet, N. Ikhelef, F. Gréco, S. Naville, P.E. Milhiet, F. Ronzon, A. Klymchenko, Y. Mély, Characterization of the structural modifications accompanying the loss of HBsAg particle immunogenicity, *Vaccine* 32 (2014) 1049–1054, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.012>.
- [7] A. Kay, F. Zoulim, B virus genetic variability and evolution, *Virus Res.* 127 (2007) 164–176, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.021>.
- [8] C. Wu, W. Deng, L. Deng, L. Cao, B. Qin, S. Li, Y. Wang, R. Pei, D. Yang, M. Lu, X. Chen, Amino acid substitutions at positions 122 and 145 of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) determine the antigenicity and immunogenicity of HBsAg and influence in vivo HBsAg clearance, *J. Virol.* 86 (2012) 4658–4669, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06353-11>.
- [9] A. Velay, H. Jeulin, M. Eschlimann, B. Malvé, F. Goehringer, M. Bensenane, J.P. Fripiat, P. Abraham, A.M. Ismail, J.M. Murray, C. Gombert, F. Zoulim, J.P. Bronowicki, E. Schwoerer, Characterization of hepatitis B virus surface antigen variability and impact on HBs antigen clearance under nucleos(t)ide analogue therapy, *J. Viral. Hepat.* 23 (2016) 387–398, <http://dx.doi.org/10.1111/jvh.12498>.
- [10] M. Buti, S. Fung, E. Gane, N.H. Afdhal, R. Flisiak, S. Gurel, J.F. Flaherty, E.B. Martins, L.J. Yee, P. Dinh, J.D. Bornstein, G. Mani Subramanian, H.L. Janssen, J. George, P. Marcellin, Long-term clinical outcomes in cirrhotic chronic hepatitis B patients treated with tenofovir disoproxil fumarate for up to 5 years, *Hepatol. Int.* 9 (2015) 243–250, <http://dx.doi.org/10.1007/s12072-015-9614-4>.
- [11] F. Habersetzer, R. Moenne-Loccoz, N. Meyer, E. Schwoerer, P. Simo-Noumbissie, S. Draits, T.F. Baumert, M. Doffoël, Loss of hepatitis B surface antigen in a real-life clinical cohort of patients with chronic hepatitis B virus infection, *Liver. Int.* 35 (2015) 130–139.
- [12] E.J. Heathcote, P. Marcellin, M. Buti, E. Gane, R.A. De Man, Z. Krastev, G. Germanidis, S.S. Lee, R. Flisiak, K. Kaita, M. Manns, I. Kotev, K. Tchernev, P. Buggisch, F. Weibert, O.O. Kurdas, M.L. Shiffman, H. Trinh, S. Gurel, A. Snow-Lampart, K. Borroto-Esoda, E. Mondou, J. Anderson, J. Sorbel, F. Rousseau, Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B, *Gastroenterology* 140 (2011) 132–143, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.011>.
- [13] L. Martín-Carbonero, T. Teixeira, E. Poveda, Z. Plaza, E. Vispo, J. Gonzales-Lahoz, V. Soriano, Clinical and virological outcomes in HIV-infected patients with chronic hepatitis B on long-term nucleos(t)ide analogues, *AIDS* 25 (2011) 73–79, <http://dx.doi.org/10.1097/qad.0b013e328340fde2>.
- [14] R. Zoutendijk, B.E. Hansen, A.J. van Vuuren, C.A. Boucher, H.L. Janssen, Serum HBsAg decline during long-term potent nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B and prediction of HBsAg loss, *J. Infect. Dis.* 204 (2011) 415–418, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir282>.
- [15] Q. Cai, H. Zhu, Y. Zhang, X. Li, Z. Zhang, Hepatitis B virus genotype A: design of reference sequences for sub-genotypes, *Virus Genes* 52 (2016) 325–333, <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-016-1307-0>.
- [16] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 2725–2729, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- [17] G. Deléage, C. Combet, C. Blanchet, C. Geourion, ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities, *Comput. Biol. Med.* 31 (2001) 259–267.
- [18] J.M. Parker, D. Guo, R.S. Hodges, 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* 25 (1986) 5425–5432.
- [19] C. Ramírez, J. Gregori, M. Buti, D. Taberner, S. Camos, R. Casillas, J. Quer, R. Esteban, M. Homs, F. Rodríguez-Frias, A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection model, *Antivir. Res.* 98 (2013) 273–283, <http://dx.doi.org/>

- 10.1016/j.antiviral.2013.03.007.
- [20] J. Hayer, C. Rodriguez, G. Germanidis, G. Deléage, F. Zoulim, J.M. Pawlotsky, C. Combet, Ultra-deep pyrosequencing and molecular modeling identify key structural features of hepatitis B virus RNase H a putative target for antiviral intervention, *J. Virol.* 88 (2014) 574–582, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03000-13>.
- [21] Y.M. Lin, G.M. Jow, S.C. Mu, B.F. Chen, Naturally occurring hepatitis B virus B-cell and T-cell epitope mutants in hepatitis B vaccinated children, *Sci. World J.* 2013 (2013) 571875, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/571875>.
- [22] J. Hayer, F. Jadeau, G. Deléage, A. Kay, F. Zoulim, C. Combet, HBVdb: a knowledge database for hepatitis B virus, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) D566–70, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1022>.
- [23] D.M. Yu, X.H. Li, V. Mom, Z.H. Lu, X.W. Liao, Y. Han, C. Pichoud, Q.M. Gong, D.H. Zhang, Y. Zhang, P. Deny, F. Zoulim, X.X. Zhang, N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape, *J. Hepatol.* 60 (2014) 515–522, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.004>.
- [24] P. Grabarczyk, P. Garmiri, G. Liszewski, D. Doucet, E. Sulowska, E. Brojer, J.P. Allain, Polish blood transfusion centres viral study group molecular and serological characterization of hepatitis B virus genotype a and d infected blood donors in Poland, *J. Viral Hepat.* 17 (2010) 444–452, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01192.x>.
- [25] Q. Zhu, Q. Lu, S. Xiong, H. Yu, S. Duan, Hepatitis B virus S gene mutants in infants infected despite immunoprophylaxis, *Chin. Med. J. (Engl.)* 114 (2001) 352–354.
- [26] E. Darmawan, Turyadi, K.E. El-Khobar, N.K. Nursanty, M.D. Thedja, D.H. Muljono, Seroepidemiology and occult hepatitis B virus infection in young adults in Banjarmasin, Indonesia, *J. Med. Virol.* 87 (2015) 199–207, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24045>.
- [27] L. Cassino, S. Benetti, F. Fay, H. Tanno, J. Quarleri, Unsuccessful therapy with adefovir and entecavir-tenofovir in a patient with chronic hepatitis B infection with previous resistance to lamivudine: a fourteen-year evolution of hepatitis B virus mutations, *BMC Infect. Dis.* 11 (178) (2011), <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-11-178>.
- [28] D. Paraskevis, G. Magiorkinis, E. Magiorkinis, S.Y. Ho, R. Belshaw, J.P. Allain, A. Hatzakis, Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates, *Hepatology* 57 (2013) 908–916, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26079>.
- [29] M. Aragri, C. Alteri, A. Battisti, D. Di Carlo, C. Minichini, C. Sagnelli, M.C. Bellocchi, M.A. Pisaturo, M. Starace, D. Armenia, L. Carioti, M. Pollicita, R. Salpini, E. Sagnelli, C.F. Perno, N. Coppola, V. Svicher, Multiple Hepatitis B Virus (HBV) quasispecies and immune-escape mutations are present in HBV Surface Antigen and reverse transcriptase of patients with acute Hepatitis B, *J. Infect. Dis.* 213 (2016) 1897–1905, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw049>.
- [30] S. Tong, P. Revill, Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability, *J. Hepatol.* 64 (2016) S4–16, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.027>.
- [31] C.M. Lin, G.M. Wang, G.M. Jow, B.F. Chen, Functional analysis of hepatitis B virus pre-S deletion variants associated with hepatocellular carcinoma, *J. Biomed. Sci.* 19 (2012) 17, <http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-19-17>.
- [32] C.L. Lin, J.H. Kao, Hepatitis B virus genotypes and variants, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5 (2015) a021436, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021436>.
- [33] M. Sunbul, Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 5427–5434, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5427>.
- [34] Z.H. Zhang, C.C. Wu, X.W. Chen, X. Li, J. Li, M.J. Lu, Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis, *World J. Gastroenterol.* 22 (2016) 126–144, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.126>.
- [35] Z.M. Zhao, Y. Jin, Y. Gan, Y. Zhu, T.Y. Chen, J.B. Wang, Y. Sun, Z.G. Cao, G.S. Qian, H. Tu, Novel approach to identifying the hepatitis B virus pre-S deletions associated with hepatocellular carcinoma, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 13573–13581, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i37.13573>.
- [36] J. Coffin, R. Swanstrom, HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3 (2013) a012526, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a012526>.
- [37] R.K. Mondal, M. Khatun, S. Ghosh, P. Banerjee, S. Datta, S. Sarkar, B. Saha, A. Santra, S. Banerjee, A. Chowdhury, S. Datta, Immune-driven adaptation of hepatitis B virus genotype D involves preferential alteration in B-cell epitopes and replicative attenuation—an insight from human immunodeficiency virus/hepatitis B virus coinfection, *Clin. Microbiol. Infect.* 21 (710) (2015) e11–e20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.03.004>.

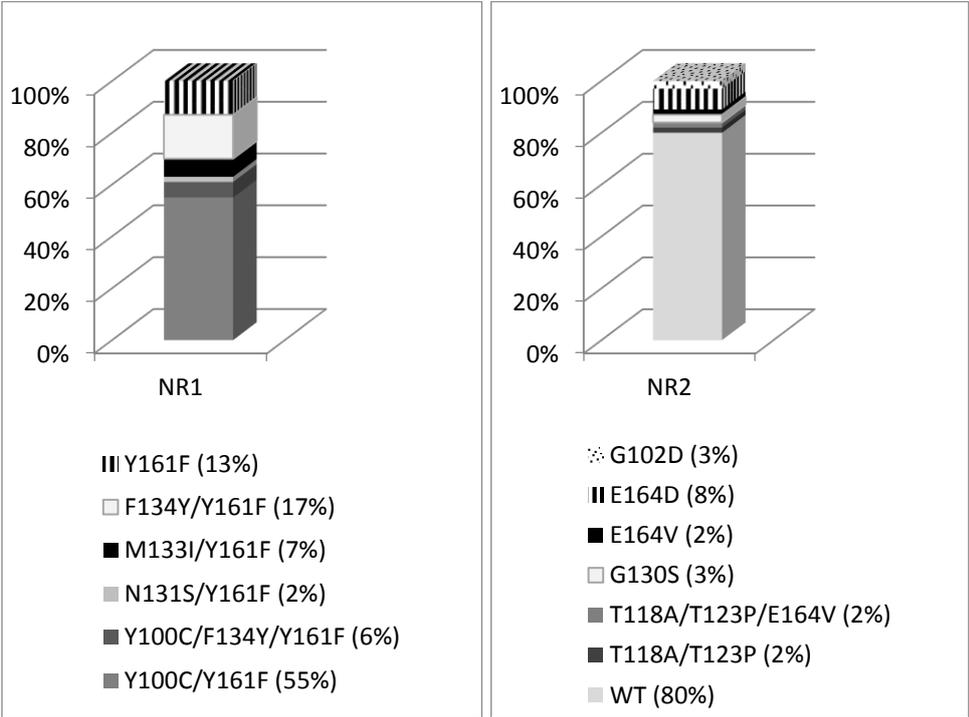
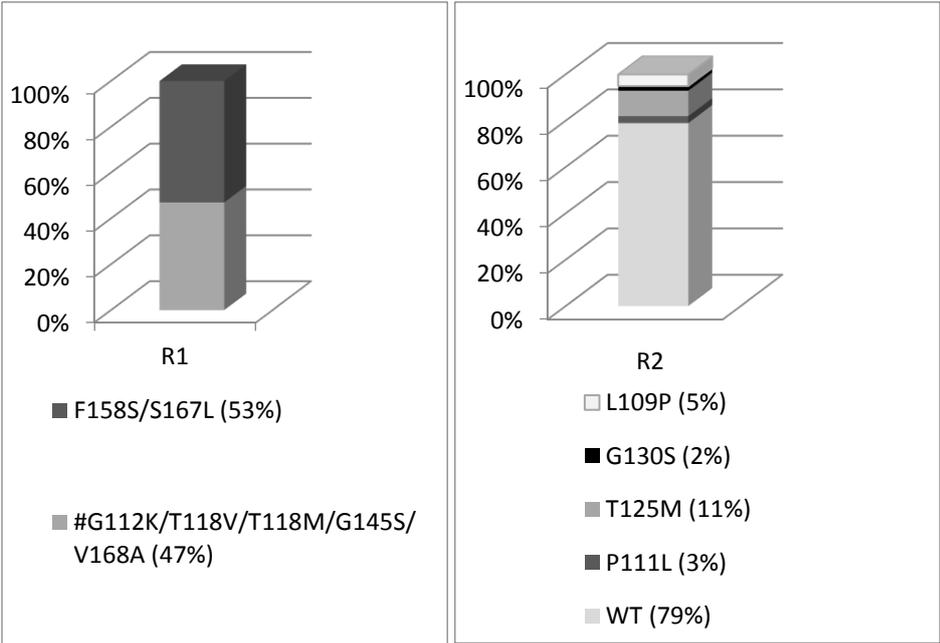
Supplementary Material

S1. Composition of the haplotypes constituting the quasispecies in the MHR (#No quantitative determination of the quasispecies; * Stop; WT = Wild Type)

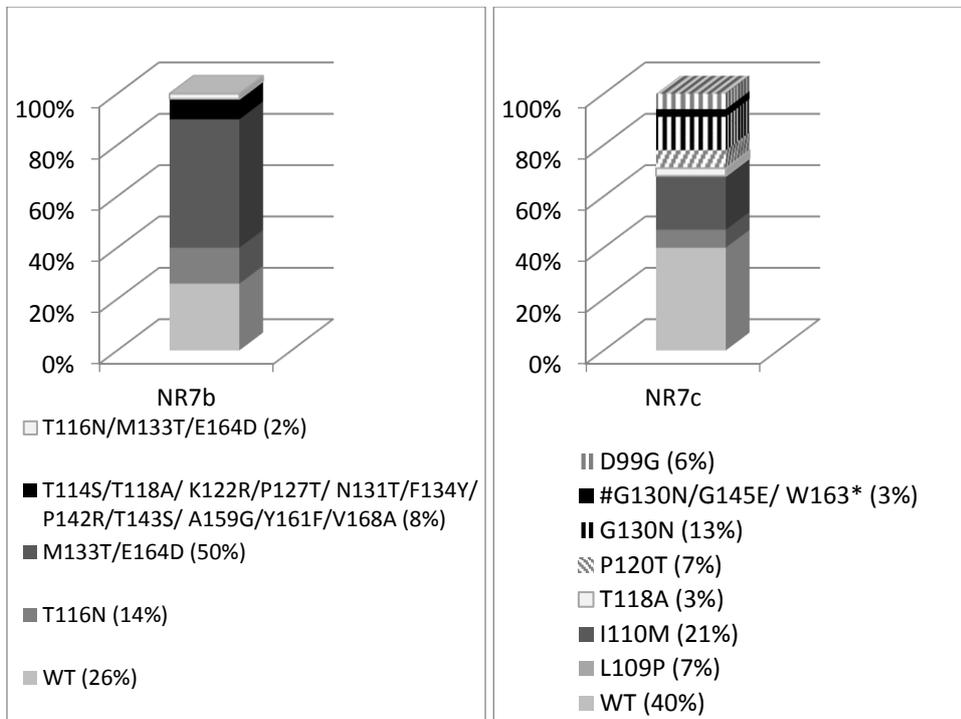
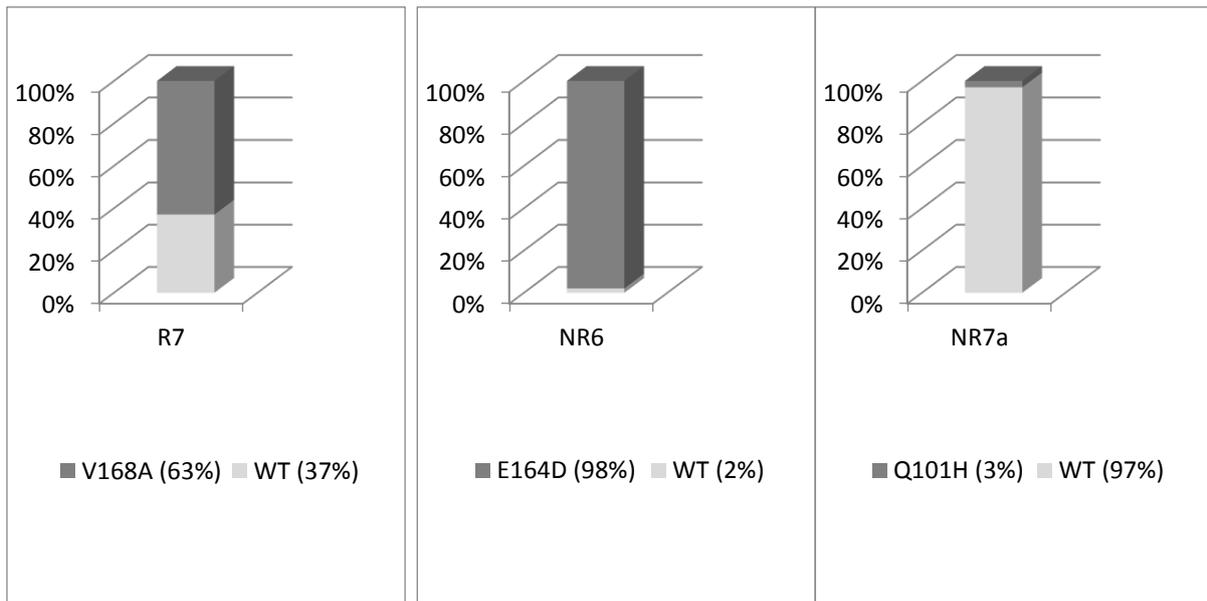
S1^a. In acute hepatitis B subgroup



S1^b.In HBV monoinfected chronic subgroup



S1^c. In HBV/HIV coinfectd chronic subgroup



ETUDE N°3

L'influence des délétions et mutations, présentes sur les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B, sur le profil sérologique et l'évolution clinique

B. Malvé, M. Eschlimann (co-premier auteur), S. Galgey, H. Fenaux, F. Zoulim, F. Goehringer, C. Rabaud, T. May, H. Jeulin, E. Schvoerer

Etude publiée dans le journal Virus Research, 2017, volume 238, pages 141-147

Objectifs

Cette troisième étude a été réalisée dans le but de souligner l'importance de la variabilité des protéines d'enveloppe du VHB, au regard de la littérature, chez des patients infectés chroniquement par le VHB depuis plusieurs années, avec ou sans pression thérapeutique et co-infectés ou non par le VIH.

Dans le cadre du suivi clinique de patients au laboratoire de Virologie du CHRU de Nancy, deux patients infectés chroniquement par le VHB de génotype C (Patient P2) et un recombinant C/G (Patient P1) ont été inclus dans l'étude. Un premier patient P1, co-infecté par le VIH et le VHB, sous traitement antirétroviral incluant des agents actifs contre le VHB et présentant une maladie hépatique sévère, a été étudié. Traité dans un premier temps par Lamivudine, une réactivation associée à une maladie hépatique avancée (fibrose et décompensation oedémato-ascitique) a été observée chez ce patient. Malgré l'ajout de Ténofovir disoproxil fumarate au traitement anti-VHB, la charge virale a persisté à des taux détectables jusqu'en 2005. En 2008, suite à une mauvaise compliance au traitement (épisode dépressif, rechute alcoolique) et à la persistance de la charge virale (8,65 logUI/mL), une cirrhose hépatique décompensée a conduit au décès du patient. Deux échantillons prélevés à différents stades de l'infection chez ce patient ont pu être étudiés (1997 et 2008).

Un second patient P2, sans prise en charge depuis 1998, présentait un profil sérologique atypique avec la présence simultanée des anticorps anti-HBs et de l'AgHBs. Ce patient diagnostiqué dans un autre hôpital en 1988 a été traité par IFN α , sans succès en 1998, et n'a pas été sous traitement anti-VHB depuis ce jour. En 2014, lors d'un épisode infectieux par *Plasmodium falciparum*, ce patient a été pris en charge au CHRU de Nancy. Il présentait une cirrhose hépatique (score F4) et une activité inflammatoire sévère associée à une destruction des hépatocytes (stade A3).

Résultats principaux

Les souches de VHB de génotypes C sont généralement observées en Asie et rarement en Europe. Le patient P2 est né au Vietnam, ce qui peut expliquer l'origine de son infection. Cependant, le patient P1 est Caucasien et n'a pas d'origine Asiatique à notre connaissance. De plus, ce patient est infecté par une souche recombinante C/G, recombinaison très rarement observée (inférieure à 1 %) [Araujo, 2015].

L'analyse des gènes préS et S a montré une très grande variabilité des protéines d'enveloppe du VHB chez les deux patients. En effet, 35 mutations ont été observées sur les gènes préS/S du VHB chez le patient P1 et 44 mutations sur les gènes préS/S des souches présentes chez le patient P2. Parmi les mutations observées chez ces deux patients, quatre sont connues pour être associées à un

échappement immunitaire du VHB : sY134N pour P1, sT123N, sI126N, sG145R pour P2. La comparaison des deux patients a permis de mettre en évidence six mutations communes : la mutation sP62L et sP203R sur le gène S et les mutations P32L, A60V, G73N et W122stop sur la région présS.

Chez le patient P1, toutes les mutations présentes à des proportions importantes étaient localisées soit dans la MHR, zone essentielle à la reconnaissance du VHB par le système immunitaire de l'hôte (sI110L, sS113T, sK122R), soit dans les épitopes des lymphocytes B et T comme les mutations sR24K, sQ30K, sT47V, sA194V [Desmond *et al.*, 2008]. L'analyse des deux échantillons à des phases différentes de l'infection par le VHB, a mis en évidence l'émergence de certaines mutations comme la mutation sQ30K, mais aussi la disparition d'autres mutations comme la mutation sK122R.

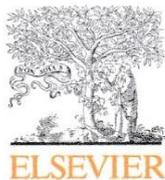
Chez le patient P2, la plupart des mutations observées étaient localisées dans des épitopes des lymphocytes B et T [Desmond *et al.*, 2008] et neuf mutations étaient retrouvées dans la MHR. De plus, plusieurs mutations observées chez le patient P2 ont été associées à une diminution de l'antigénicité prédite par le logiciel AnTheProt (exemple : sS53L, sP62L sur le gène S et P32L, A60V sur la région présS). Ces mutations pourraient expliquer la persistance de l'AgHBs en présence des anticorps anti-HBs. Par ailleurs, même si le rôle des variants minoritaires n'est pas totalement compris, leur impact sur l'évolution de l'infection devrait être suivi. Par exemple, une mutation présente à 2 % chez le patient P2 est retrouvée à 3,04 logUI/mL quand elle est reportée à la charge virale (4,74 logUI/mL).

Plusieurs délétions ont été observées dans la région présS. Chez le patient P1, nous avons observé une délétion conséquente dans la région présS2 retrouvée sur 100 % des variants de la quasi-espèce. Cette zone n'est pas essentielle au pouvoir infectieux du virus. Chez le patient P2, nous avons mis en évidence plusieurs petites délétions présentes en faible pourcentage dans la région présS1, zone fonctionnelle essentielle pour le pouvoir infectieux du virus [Lin *et al.*, 2012]. Toutes ces délétions étaient localisées dans des épitopes des lymphocytes B et T.

Conclusion

Cette étude a présenté deux patients infectés depuis plusieurs années, le patient P1 sous pression thérapeutique, mais présentant une diminution de la pression immunitaire à cause de la co-infection par le VIH et le patient P2 sans pression thérapeutique et présentant une immunité robuste. Ces deux patients présentaient une variabilité des protéines d'enveloppe du VHB importante avec plusieurs mutations et délétions retrouvées dans des épitopes des lymphocytes B et T.

Ces résultats, de façon concordante avec la littérature, renforcent notre hypothèse de travail et confirment l'importance de l'étude des protéines d'enveloppe du VHB, afin de mettre en évidence des mutations d'intérêt influençant le fitness du VHB et par conséquent, pouvant modifier l'évolution clinique de la maladie liée au VHB. Ces données peuvent également contribuer au développement futur de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant ces protéines ou encore à l'adaptation éventuelle des souches vaccinales.



Short communication

Impact of deletions and mutations in Hepatitis B virus envelope proteins on serological profile and clinical evolution



Brice Malve^{a,1}, Marine Eschlimann^{b,1}, Shaunagh Galgey^a, Honorine Fenaux^a, Fabien Zoulim^c, François Goehring^d, Christian Rabaud^d, Thierry May^d, Hélène Jeulin^{a,b}, Evelyne Schvoerer^{a,b,*}

^a Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy, Vand oeuvre-lès-Nancy, 54500, France

^b EA 7300 'Stress, Immunité, Pathogènes', Université de Lorraine, Vand oeuvre-lès-Nancy, 54500, France

^c Unité Inserm U11052, Université de Lyon, Lyon 69000, France

^d Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier R egional Universitaire de Nancy, Vand oeuvre-l es-Nancy, 54500, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Hepatitis B virus
Hepatocellular failure
preS/S variability
Deletion
Viral immune escape

ABSTRACT

The Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins are essential for viral entry into the hepatocyte and are also targets for host immune response. The study of these proteins could allow us to highlight molecular hot points influencing HBV fitness, which would subsequently modify the clinical evolution of the disease, both under anti-viral therapy or without treatment. The present short communication underlines the importance of the high variability in HBV envelope proteins, in regard with the literature and in our hands, for HBV-infected patients either on anti-HBV treatment or not. We report mutations in antigenic areas of S protein, i.e. CD8⁺/CD4⁺ T-cell epitopes and B-cell epitopes in the major hydrophilic region (MHR), such as sI126N and sG145R possibly involved in the rare coexisting Hepatitis B surface Antigen (HBsAg)/anti-HBs serological pattern. We mostly report serial mutations in preS region including preS1 deletion (aa 1–6, 31–71, 38–73, 72–104) and preS2 deletion (aa132–141) in patients with various clinical evolutions. Some of these viral envelope mutations, due to immune selection pressure, may result in a worsening of the hepatic disease.

1. Short communication

Chronic infection due to Hepatitis B virus (HBV) is a major public health issue. The efficacy of the drugs used to treat this infection, nucleos(t)ide analogues (NA) and Interferon- α (IFN- α), remains insufficient. Only a few patients will exhibit a functional HBV cure, i.e. a disappearance of HBV DNA from the blood, followed by HBs Antigen (HBsAg) clearance and ideally anti-HBs antibody production. In HBV-mono-infected patients, an annual rate of 3–11% HBsAg loss under treatment by IFN- α was reported, while for NA, the rate of HBsAg loss reaches 3–8% after two years of treatment with Tenofovir or Entecavir and 8–14% after five years of Tenofovir in HBeAg-positive patients (Buti et al., 2015; Heathcote et al., 2011; Li et al., 2017; Marcellin et al., 2008). In Human Immunodeficiency Virus (HIV)/HBV-co-infected patients, HBsAg clearance is also rare on NA, under 7.4% after a median 4.6 years of treatment (Boyd et al., 2015).

The HBV envelope glycoproteins, encoded by preS1, preS2 and S genes, are essential for viral entry into the hepatocyte (Lempp and

Urban, 2014), and are also targets for host immune response (Desmond et al., 2008; Margeridon et al., 2005; Ramezani et al., 2013). The study of these proteins could allow us to highlight molecular hot points influencing the immune response and HBV infectivity at the entry step. These molecular signatures might subsequently modify the clinical evolution of the disease, both under anti-viral therapy or without treatment. Thus, HBV envelope mutations could contribute, at least partially, to our understanding of the disease evolution (e.g. difference in host immune response, treatment response, HBsAg clearance), in various patient groups, in HBV mono-infected and in HIV/HBV co-infected patients.

In the same way, deletions in HBV genome, particularly in preS region including various epitope areas, are generally associated with liver disease progression through promotion of immune escape (Lin et al., 2012; Lin and Kao, 2015). Deletions can also decrease the production of envelope proteins and favor their retention in endoplasmic reticulum (ER) leading to ER stress and DNA damage, then to cell transformation and finally hepatocellular carcinoma (HCC) (Tong and

* Corresponding author at: Laboratoire de Virologie, CHRU Nancy-Brabois, rue du Morvan, Vand oeuvre-l es-Nancy, 54500, France.

E-mail addresses: bricemalve@gmail.com (B. Malve), marine.eschlimann@hotmail.fr (M. Eschlimann), shaunaghgalgey@rcsi.ie (S. Galgey), h.fenaux@chru-nancy.fr (H. Fenaux), fabien.zoulim@inserm.fr (F. Zoulim), f.goehring@chru-nancy.fr (F. Goehring), c.rabaud@chru-nancy.fr (C. Rabaud), t.may@chru-nancy.fr (T. May), h.jeulin@chru-nancy.fr (H. Jeulin), e.schvoerer@chru-nancy.fr (E. Schvoerer).

¹ Brice Malve and Marine Eschlimann contributed equally to this work.

Revell, 2016; Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2014). Recently, we highlighted more frequent mutations in the S gene in patients showing HBsAg persistence on nucleos(t)ide analogues and particularly a decrease on predicted antigenicity in HBs “a” determinant. This suggests a role of amino acid (aa) pattern of HBV envelope proteins in HBsAg persistence (Velay et al., 2016).

The present communication, in regard with literature and in our hands for two HBV-infected patients, allowed us to underline the high variability of HBV in envelope proteins, in patients infected for a long time, with or without therapeutic pressure and with or without HIV co-infection leading to weakened host immune response. Mutations and deletions in antigenic areas of S and preS regions may result in worsening of the hepatic disease.

Two exemplary patients were selected: the patient P1, HIV/HBV co-infected, had been on anti-retroviral therapy which included active agents against HBV during several years, while the patient P2, HBV mono-infected since 1988, had no follow up. These patients were cared for at the University Hospital of Nancy (Tropical and Infectious Diseases Service) and data were collected with the informed consent of P1, while the patient P2 could not be touched anymore. Patient P1, born in 1970, was diagnosed with HBV infection in 1997 (positive HBsAg) and with HIV in 2000 leading to anti-retroviral therapy, including lamivudine (3TC). Patient P1 was a man who had sex with men (MSM). HBV viral load remained above 5 logIU/ml, with a reactivation in 2002 on advanced hepatic disease with hepatic portal fibrosis and oedemato-ascitic decompensation. Tenofovir (TDF) was added in 2003, but a detectable viral load was still observed in 2005. In June 2008, a major depressive episode led to break of compliance with antiviral therapy and an alcoholic relapse. The patient was hospitalized for hepatocellular failure due to an acute exacerbation of chronic HBV (8.65 logIU/ml) and died from cirrhotic hepatic decompensation in July 2008 (Table 1). Patient P2, born in 1969, was referred to our center after returning from a trip to Sierra Leone in 2014. He suffered from fever, diarrhea, icterus, hypotension, hepatosplenomegaly (AST: 332 IU/L, ALT: 148 IU/L, total bilirubin: 108 mg/L), abdominal pains and thrombocytopenia (55 g/L). *Plasmodium falciparum* was detected and treated. He also showed an atypical HBV serology pattern, meaning positive HBsAg and anti-HBs with a viral load at 4.74 logIU/mL (Table 1). HBV infection was initially diagnosed in 1988 in another hospital, and the patient was unsuccessfully treated with interferon in 1998 without any anti-HBV treatment after that. In December 2014, patient P2 had a hepatic cirrhosis (score F4) with severe inflammatory

activity and hepatocyte destruction (stage A3).

Biological, clinical and therapeutic data were retrospectively collected. Molecular investigations were realized on two samples for P1: P1-sept.97 and P1-jun.08, and one sample for P2 (nov.14). HBV DNA was amplified for the preS and S genes by using the Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific) with a weak error rate (4.4×10^{-7} mutations/bp/cycle) to limit the introduction of artifactual changes during PCR. Direct sequencing and ultra-deep sequencing (UDS) were performed on HBV preS/S genes such as previously described (Velay et al., 2016). The primers used for S gene and preS region amplification appear in Table 2. For UDS, amplicons (PCR1 for S gene and PCR2 for preS region) were fragmented using the “Ion Shear™ Plus” kit, according to the supplier recommendations (Life Technologies). After libraries and emulsion PCR, UDS was performed with the Ion Personal Genome Machine (PGM) Sequencer (Life Technologies). Sequences from each read obtained by UDS were aligned to HBV genotype C (HBVdb consensus, <http://hbvdb.ibcp.fr>) using the Nextgene software (Softgenetics, State College, PAS, USA). The cut-off determined by the triplicate analysis of strains infecting the same patient sample was set at 2%. The Ion Torrent technology is known for its drawbacks for deletions, insertions and polymeric regions. To confirm mutations and deletions/insertions observed by UDS, the sequences obtained by UDS were compared to the sequences realized by direct sequencing, for the major variants (> 20%). Nucleic and amino acid sequences were analyzed using MEGA 5.2 software. The GREG+ software (Grenoble, France) was used to determine HBV genotype which was confirmed by a phylogenetic tree constructed with consensus sequences from HBVdb. HBVdb consensus sequences were used to determine the recombination with SimPlot Software (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/simplot/>). The AnTheProt software was used to predict the antigenicity of amino acid (aa) sequences (<http://antheptprot-pbil.ibcp.fr>).

The HBV strain of P2 was determined to be genotype C while P1 was infected with a HBV genotype C/G recombinant. HBV genotype C strains are generally found in Asia. Patient P2 was born in Vietnam which could explain why he was infected by HBV genotype C. Patient P1 is a Caucasian, is not of Asian origin and did not travel to Asia to our knowledge. Overall, the migratory flux could be at the origin of the dispersion of genotypes throughout the world (Tong and Revell, 2016). The recombination point between genotype C and G was found at 100 position (Fig. 1, <http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/simplot/>). Recombinant forms are often observed in hepatitis B, in almost all

Table 1
Biological and therapeutic features for P1 and P2.

	Sampling date	HBsAg (index)	HBsAb (index)	HBeAg (index)	HBeAb (index)	HBV viral load (logIU/ml)	Treatment
P1 Male Born:1970	09/27/1997	Positive	NR	Positive	Positive	5.5	None
	10/07/2000	Positive	Negative	Positive	Equivocal	NR	None
	01/20/2001	NR	NR	NR	NR	NR	NFV AZT 3TC
	03/31/2001	NR	NR	NR	NR	4.6 log	NFV AZT 3TC
	07/08/2002	NR	NR	NR	NR	NR	NVP ddi 3TC
	09/02/2002	NR	NR	NR	NR	> 5.3	NVP ddi 3TC
	01/25/2003	NR	NR	NR	NR	D	ddi 3TC TDF
	03/27/2003	Positive	Negative	Negative	Positive	ND	ddi 3TC TDF
	10/23/2003	NR	NR	NR	NR	NR	ddi 3TC TDF
	12/01/2003	Positive	Negative	Negative	Positive	2.21	ddi 3TC TDF
	07/22/2004	NR	NR	NR	NR	ND	ddi 3TC TDF
	10/20/2005	Positive	NR	Positive	Negative	D	ddi 3TC TDF
	03/16/2006	NR	NR	NR	NR	NR	FPV/RTV A3 BCETC TDF
	09/07/2006	NR	NR	NR	NR	NR	FPV/RTV A3 BCETC TDF
	03/15/2007	NR	NR	NR	NR	1.58	FPV/RTV A3 BCETC TDF
	04/24/2008	NR	NR	NR	NR	3.37	FPV/RTV A3 BCETC TDF
06/20/2008	NR	NR	NR	NR	8.65	FPV/RTV A3 BCETC TDF	
P2 Male Born:1969	11/22/2014	Positive (2616.48)	Positive (71.95)	Positive (231.51)	Negative (14.75)	4,74	None
	11/27/2014	Positive (4819.34)	Positive (38.27)	NR	NR	NR	None

Ag: antigen, Ab: antibody, D: detectable, NR: not realized, ND: not detected, NFV: Nelfinavir, AZT: Zidovudine, 3TC: Lamivudine, NVP: Nevirapine, ddi: didanosine, TDF: Tenofovir, FVP/RTV: Fosamprenavir/Ritonavir, ABC: Abacavir.

Table 2

Primers used to amplify preS/S HBV envelope proteins. The primers used for S gene amplification were P2f/979 for the first PCR, P2f/S8 and P7a/979 for the nested PCR. For preS genes, the primers P4/P7a rev were used for the first PCR and the primers P4/PreSr were used for the nested PCR (Velay et al., 2016).

Amplified gene	Primers	Sequences
S gene	P2f forward	5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'
	979 reverse	5'-CAAAAGACCCACAATTCITTTGACATACITTTCCAAT-3'
	P7 ^a forward	5'-TTGGCCAAAATTCGAGTC-3'
	S8 reverse	5'-GAAGATGAGGCATAGCAGCAGG-3'
preS region	P4 forward	5'-GCCTCATTTTGTGGTCCACATA-3'
	P7 ^a rev reverse	5'-GACTGCGAATTTTGGCCAA-3'
	PreS-R reverse	5'-TCAACAAGAAAAACMCCGCTGT-3'

genotypes (except H). The mechanism of recombination is still unclear, but it is probably a result of covalently closed circular DNA (cccDNA) homologous recombination in the nucleus, during the replication cycle, which requires simultaneous infections with different genotypes (Araujo, 2015). P1 was infected by a recombinant G/C strain, a recombinant which was poorly investigated and quite scarce in the literature (< 1% of the recombinant strains) because of a low HBV genotype G prevalence (Araujo, 2015). The available data for patient P1 don't allow us to justify a simultaneous infection by both genotypes.

Among the mutations observed in these patients, four known immune escape mutations (<http://hbv.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>) were notably observed: sY134N for P1 and sT123N , sI126N , sG145R for P2 (Avellon and Echevarria, 2006; Ireland et al., 2000).

For the patient P1, sequence analyses showed 35 point mutations in preS/S genes. All the mutations present in a high proportion of DNA copies were localized in CD8⁺ and CD4⁺T-cell published epitopes as sR24K , sQ30K , sT47V , sA194V (Desmond et al., 2008) or in major hydrophilic region (MHR) (sI110L , sS113T , sK122R). We also highlighted a progressive pattern between 1997 and 2008: a few supplementary mutations appeared or emerged from minor viral populations, such as sQ30K (from 24% in P1-sept.97 to 44% in P1-jun.08) previously described as a possible immune escape mutant (Ramezani et al., 2013). Others disappeared, such as sK122R (91% in P1-sept.97 versus 8% in P1-jun.08). The lysine (K) at HBsAg residue 122, known to hamper HBsAg recognition by antibodies, appeared under selective pressure allowing the virus to escape from the host-related immune system (Aragri et al., 2016). Several other minor mutations in preS/S gene,

with probably no positive impact on virus fitness, disappeared between 1997 and 2008. A preS2 deletion was also detected (aa132-141) (Fig. 2a/b) localized on a T-cell epitope, it was present since 1997 and still present in 2008.

The patient P2 strains presented 44 mutations in preS/S gene localized mainly in published epitopes (Desmond et al., 2008) and including nine mutations in MHR such as sQ101K , sI126N , sG145R , sV168A ; three of them were observed in more than 25% of the quasispecies (Fig. 2a/b). Some mutations were associated with a decrease in predicted antigenicity, in S domain (sS53L , sS58C , sP62L , sT63L , sS64F) and in preS1 region (D27G, P32L, E54A, N56H/W, A60V). Many minor mutations were observed in S gene. Even if the role of minor variants is not yet fully understood, their impact on viral evolution should be followed (i.e. G145R and sW172* at 3.04 logIU/mL in P2). Moreover, UDS highlighted four minor strains with various deletions (aa 1–6, 31–71, 38–73, 72–104) in preS1 region (Fig. 2b).

The comparison of mutations observed in these two patients allowed us to highlight six common mutations: sP62L, sP203R in S gene (Fig. 2a) and P32L, A60V, G73N, W122* in preS region (Fig. 2b). In HBVdb r35, a sequence panel with all patient profiles which were combined (<http://hbvdb.ibcp.fr>), most of these six common mutations were observed at less than 3% (excepted mutation A60 V and G73N observed at 29.5% and 10.3%, respectively). Thus rare mutations were observed in these both patients with different clinical profiles and different immune and therapeutic pressure levels. Among these mutations, three mutations have been associated to a large decrease in predicted antigenicity (sP62L, -30%; P32L, -46%; A60 V, -28%). In two

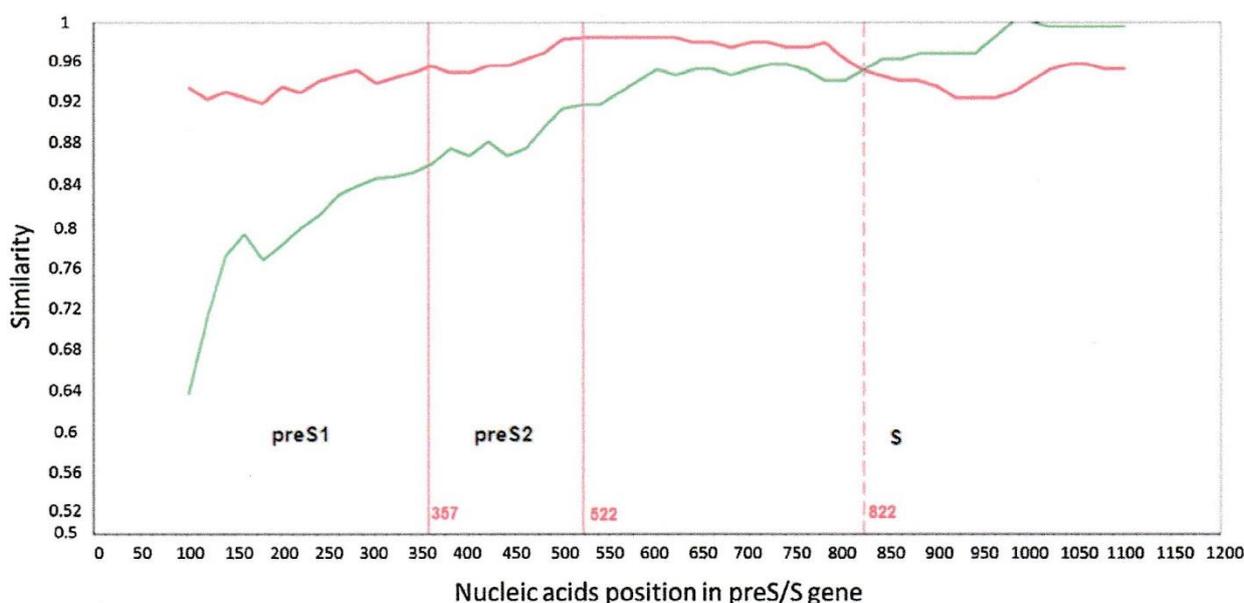


Fig. 1. SimPlot graph used to determine recombinant gene of the patient P1. Genotype C (red) presents a higher percentage until s_{100} , after which genotype G (green) dominates (X-axis shows the nucleotide sequence preS/S (1200 nucleotides), y-axis shows percentage correlation with references; break point is at nucleotide position 822 = a s_{100}). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

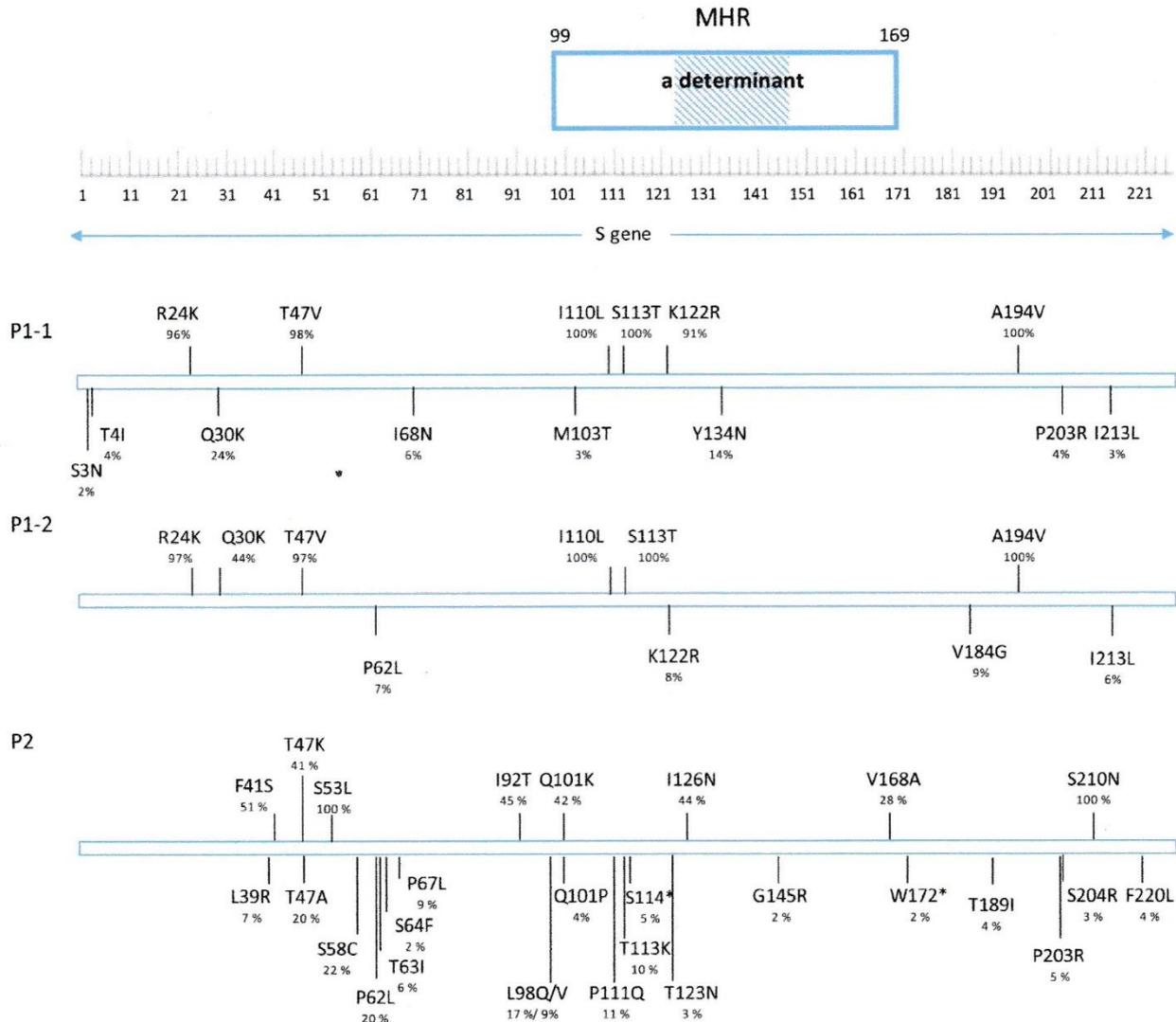


Fig. 2. Mutations detected in S gene (a) and preS region (b) of HBV strain for two samples of patient P1 (P1-1 and P1-2) and one sample of patient P2. Comparison to a genotype C reference sequence (HBVdb consensus, <https://hbvdb.ibcp.fr>) and genotype G reference sequence (HBVdb consensus, <https://hbvdb.ibcp.fr>) from 100 position for P1 and according to the functional areas of HBsAg protein (MHR: Major Hydrophilic Region; bs: binding site, Lin et al., 2012). The percentage of each mutation appears under the corresponding residues.

samples of the patient P1, some of these mutations appeared or persisted (A60V, G73N and sP62L) while others disappeared (P32L, W122* and sP203R). The mutations which appeared could be involved in the viral replication fitness. The mutations A60V and sP62L showed a decrease in predicted antigenicity (-28% and -30%, respectively). This could impact the recognition of HBV by immune system and thus, the HBV infection persistence. Oppositely, some mutations disappeared. These mutations could be deleterious for viral replicative fitness. For example, the mutations P32L and W122* seem to be associated with occult hepatitis B (immune escape) (Kim et al., 2013). HBV occult infection was shown to promote the disease progression and HBV persistence. These mutations were observed in key areas for viral infectivity (hepatocyte and nucleocapsid binding site) and could be also deleterious for HBV replicative fitness.

Thus, we presented here two patients who were infected with HBV genotype C or C/G for a long time, with or without antiviral treatment. Both presented with highly variable HBV strain in envelope proteins: mutations in antigenic areas of S protein but also serial deletions in preS region.

In S domain, mutations were essentially observed in CD8⁺ and CD4⁺ T-cell epitopes and in the MHR (B-cell epitopes). Continuous and dynamic interactions between viral replication and host immune response could explain viral changes over time, in patient P1, by the

second point 11 years later. An important aa variability in key areas of HBV envelope protein such the MHR, especially aa124-137 of the “a” determinant and the HBsAg cytotoxic lymphocyte epitope (aa87–95) (Chen et al., 2011), was associated to immune escape and can express through the emergence of another serotype as observed in patient P1 (Margeridon et al., 2005). It can also be associated with the coexistence of HBsAg and anti-HBs as observed in patient P2. In this latter patient, the UDS approach allowed us to detect nine mutations in the MHR and in the “a” determinant (sI126N, 44%; sG145R, 2%), that may interfere with HBsAg/anti-HBs binding (Coppola et al., 2015). The mutations at position s126 were frequently associated with HBsAg/anti-HBs coexistence (Liu et al., 2016). The mutation sG145R has also been reported in patients with HBsAg and anti-HBs coexistence due to the change of antigenicity (Liu et al., 2016; Xue et al., 2017). Moreover, the mutation sG145R can impair HBsAg secretion and promotes advanced liver diseases (Xue et al., 2017).

In preS domain, in both patients, most of the point mutations occurred on published linear CD4⁺/CD8⁺ T-cell epitopes and B-cell epitopes (Desmond et al., 2008).

A preS2 deletion (aa132-141) was present in 100% of the variants in both P1 sequences. Mutations of preS region are often deletions especially in preS2 because of the high variability of overlapping spacer region in reverse transcriptase and because the M protein is not crucial

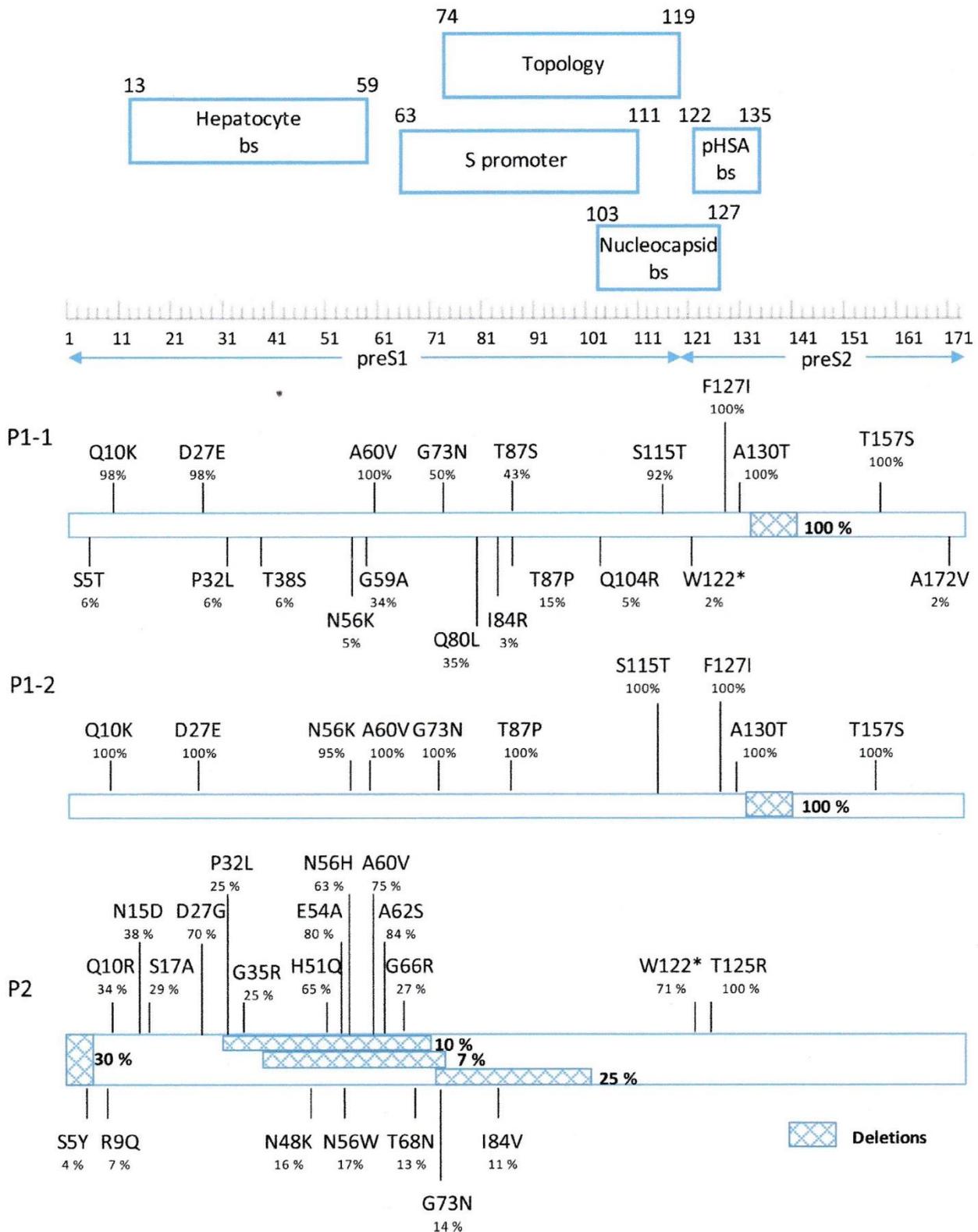


Fig. 2. (continued)

for viral entry, formation, secretion and infectivity unlike the S and L proteins (Pollicino et al., 2014). The deletions are more often found between amino acid 120 and 142 (Qu et al., 2014) and remove all or part of a critical epitope (Desmond et al., 2008; Fang et al., 2008). PreS deletions have a clinical significance with increased cirrhosis, hepatic fibrosis and acute exacerbations sometimes leading to fulminant hepatitis as seen in P1 (Coppola et al., 2015; Pollicino et al., 2014). A preS

deletion results in intracellular retention of viral envelope glycoproteins, leading to ‘ground glass hepatocytes’ (GGH). A direct cytopathic effect due to a massive presence of viral antigen inside the cells is an additional possible mechanism of liver injury which may explain fulminant hepatitis and also the association between preS deletions and progression toward cirrhosis (Coppola et al., 2015; Pollicino et al., 2014). These deletions are also associated with a higher risk of HCC

(3.77 fold) due to oxidative stress in the endoplasmic reticulum causing damages and genomic instability (Coppola et al., 2015; Lee et al., 2015; Pollicino et al., 2014). PreS deletions are more common in genotype C (Coppola et al., 2015) and are likely linked to the coexistence of HBsAg and anti-HBs (Huang et al., 2010).

In P2, there were four preS1 deletions in minor strains associated with non-deleted virus because of the essential role of preS1 domain. PreS1 deletions were more often observed in patients showing a positive HBeAg and can be interpreted as a marker of disease progression (such as P2), as well as coexisting HBsAg/anti-HBs, while preS2 deletions (GGH type II) were noticed in negative HBeAg patients and are characteristic of the advanced stages of chronic liver disease (such as P1) (Lee et al., 2015; Pollicino et al., 2014). Interestingly, the analysis of the region 3'X gene/5' preC gene (nucleic acid 1681–2044) of patient P1 highlighted three mutations associated with the severity of the disease, the mutations T1753C, A1762T and G1764A. Moreover, A1762T and G1764A were associated with a decrease in HBeAg expression. These mutations persisted from 1997 to 2008 (data not show) (Kim et al., 2016).

Overall, the clinical consequences of some of these mutations and deletions tend to be recognized. In the one hand, the current vaccination is potentially inefficient against these viral strains and the risk of horizontal and sexual transmission cannot be excluded. As an example, individuals such as P2 and their family and close circle should be monitored carefully (Leong et al., 2016). On the other hand, patients with coexisting HBsAg/anti-HBs should be closely monitored for HCC development during the follow-up of their infection (Seo et al., 2014). Interestingly, the rare concomitant HBsAg/anti-HBs pattern (2.43–8.9%) (Liu et al., 2016) has been recently associated to more advanced hepatitis and fibrosis (such as P2) (Leong et al., 2016) and several studies suggested a higher risk of HCC, independently of other known risk factors (Jang et al., 2009; Seo et al., 2014). The mechanism is still unclear but it was hypothesized that the coexistence of HBsAg and anti-HBs may increase the risk of HCC through frequent preS deletions (Seo et al., 2014).

As a conclusion, we presented two patients who were infected for a long time, one (P1) was on therapeutic pressure but showed a decreased immune pressure due to HIV co-infection, while the second patient (P2) without therapeutic pressure had a stronger immunity. These two patients presented characteristics which were rarely analyzed in the literature: C/G recombination, concomitant HBsAg/anti-HBs pattern. They both presented a high viral diversity with several mutations in epitopic areas and deletions in preS located in B- and T-cell epitopes. Some of these mutations have a clinical significance and could have a potential impact on disease management. A close monitoring of patients with a high variability in the “a” determinant (potential vaccine-escape mutants) or presenting large deletions, especially preS deletions, could be recommended in the context of clinical research. Furthermore, for patients with concomitant HBsAg/anti-HBs pattern, a prevention of the transmission of fit HBV variants in vaccinated people should be taken into account. This reinforces the hypothesis that studies of HBV envelope proteins could highlight molecular hot points influencing HBV fitness, which would subsequently modify the clinical evolution of HBV-related disease.

Supportive foundations

None.

Conflict-of-interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Aragi, M., Alteri, C., Battisti, A., Di Carlo, D., Minichini, C., Sagnelli, C., Bellocchi, M.C., Pisaturo, M.A., Starace, M., Armenia, D., Carioti, L., Pollicita, M., Salpini, R., Sagnelli, E., Perno, C.F., Coppola, N., Svicher, V., 2016. Multiple Hepatitis B Virus (HBV) quasiespecies and immune-escape mutations are present in HBV Surface Antigen and reverse transcriptase of patients with acute Hepatitis B. *J. Infect. Dis.* 213, 1897–1905. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw049>.
- Araujo, N.M., 2015. Hepatitis B virus intergenotypic recombinants worldwide: an overview. *Infect. Genet. Evol.* 36, 500–510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.024>.
- Avellon, A., Echevarria, J.M., 2006. Frequency of hepatitis B virus ‘a’ determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J. Med. Virol.* 78 (1), 24–36. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20516>.
- Boyd, A., Gozlan, J., Mialhes, P., Lascoux-Combe, C., Cam, M.S., Rougier, H., Zoulim, F., Girard, P.M., Lacombe, K., 2015. Rates and determinants of hepatitis B ‘e’ antigen and hepatitis B surface antigen seroclearance during long-term follow-up of patients co-infected with HIV and hepatitis B virus. *AIDS* 29 (15), 1963–1973. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0000000000000795>.
- Buti, M., Fung, S., Gane, E., Afdhal, N.H., Flisiak, R., Gurel, S., Flaherty, J.F., Martins, E.B., Yee, L.J., Dinh, P., Bornstein, J.D., Mani Subramanian, G., Janssen, H.L., George, J., Marcellin, P., 2015. Long-term clinical outcomes in cirrhotic chronic hepatitis B patients treated with tenofovir disoproxil fumarate for up to 5 years. *Hepatol. Int.* 9 (2), 243–250. <http://dx.doi.org/10.1007/s12072-015-9614-4>.
- Chen, Y., Qian, F., Yuan, Q., Li, X., Wu, W., Guo, X., Li, L., 2011. Mutations in hepatitis B virus DNA from patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *J. Clin. Virol.* 52, 198–203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.07.011>.
- Coppola, N., Onorato, L., Minichini, C., Di Caprio, G., Starace, M., Sagnelli, C., Sagnelli, E., 2015. Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants. *World J. Hepatol.* 7 (27), 2729–2739. <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v7.i27.2729>.
- Desmond, C.P., Bartholomeusz, A., Gaudieri, S., Revill, P.A., Lewin, S.R., 2008. A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. *Antivir. Ther.* 13, 161–175.
- Fang, Z.L., Sabin, C.A., Dong, B.Q., Wei, S.C., Chen, Q.Y., Fang, K.X., Yang, J.Y., Huang, J., Wang, X.Y., Harrison, T.J., 2008. Hepatitis B virus pre-S deletion mutations are a risk factor for hepatocellular carcinoma: a matched nested case-control study. *J. Gen. Virol.* 89, 2882–2890. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.2008/002824-0>.
- Heathcote, E.J., Marcellin, P., Buti, M., Gane, E., De Man, R.A., Krastev, Z., Germanidis, G., Lee, S.S., Flisiak, R., Kaita, K., Manns, M., Kotzev, I., Tchernev, K., Buggisch, P., Weibert, F., Kurdas, O.O., Shiffman, M.L., Trinh, H., Gurel, S., Snow-Lampart, A., Borroto-Esoda, K., Mondou, E., Anderson, J., Sorbel, J., Rousseau, F., 2011. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 140 (1), 132–143. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.011>.
- Huang, X., Qin, Y., Zhang, P., Tang, G., Shi, Q., Xu, J., Qi, F., Shen, Q., 2010. PreS deletion mutations of hepatitis b virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies. *J. Med. Virol.* 82, 23–31. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21669>.
- Ireland, J.H., O'Donnell, B., Basuni, A.A., Kean, J.D., Wallace, L.A., Lau, G.K., Carman, W.F., 2000. Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology* 31 (5), 1176–1182. <http://dx.doi.org/10.1053/he.2000.6407>.
- Jang, J.S., Kim, H.S., Kim, H.J., Shin, W.G., Kim, K.H., Lee, J.H., Kim, H.Y., Kim, D.J., Lee, M.S., Park, C.K., Jeong, B.H., Kim, Y.S., Jang, M.K., 2009. Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. *J. Med. Virol.* 81, 1531–1538. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21577>.
- Kim, H., Lee, S.A., Kim, D.W., Lee, S.H., Kim, B.J., 2013. Naturally occurring mutations in large surface genes related to occult infection of hepatitis B virus genotype C. *PLoS One* 8 (1), e54486. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054486>.
- Kim, H., Lee, S.A., Kim, B.J., 2016. X region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World J. Gastroenterol.* 22 (24), 5467–5478. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i24.5467>.
- Lee, S.A., Kim, K.J., Kim, H., Choi, W.H., Won, Y.S., Kim, B.J., 2015. Hepatitis B virus preS1 deletion is related to viral replication increase and disease progression. *World J. Gastroenterol.* 21 (16), 5039–5048. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i16.5039>.
- Lempf, F., Urban, S., 2014. Inhibitors of hepatitis B virus attachment and entry. *Intervirology* 57, 151–157. <http://dx.doi.org/10.1159/000360948>.
- Leong, J., Lin, D., Nguyen, M.H., 2016. Hepatitis B surface antigen escape mutations: indications for initiation of antiviral therapy revisited. *World J. Clin. Cases* 4 (3), 71–75. <http://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v4.i3.71>.
- Li, M.H., Zhang, L., Qu, X.J., Lu, Y., Shen, G., Wu, S.L., Chang, M., Liu, R.Y., Hu, L.P., Li, Z.Z., Hua, W.H., Song, S.J., Xie, Y., 2017. Kinetics of hepatitis b surface antigen level in chronic hepatitis b patients who achieved hepatitis B surface antigen loss during pegylated interferon alpha-2a treatment. *Chin. Med. J. (Engl.)* 130 (5), 559–565. <http://dx.doi.org/10.4103/0366-6999.200554>.
- Lin, C.L., Kao, J.H., 2015. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring. Harb. Perspect. Med.* 5, a021436. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021436>.
- Lin, C.M., Wang, G.M., Jow, G.M., Chen, B.F., 2012. Functional analysis of hepatitis B virus pre-s deletion variants associated with hepatocellular carcinoma. *J. Biomed. Sci.* 19, 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-19-17>.
- Liu, Y., Zhang, L., Zhou, J.Y., Pan, J., Hu, W., Zhou, Y.H., 2016. Clinical and virological characteristics of chronic hepatitis B patients with coexistence of HBsAg and Anti-HBs. *PLoS One* 11 (1), e0146980. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146980>.
- Marcellin, P., Heathcote, E.J., Buti, M., Gane, E., de Man, R.A., Krastev, Z., Germanidis, G., Lee, S.S., Flisiak, R., Kaita, K., Manns, M., Kotzev, I., Tchernev, K., Buggisch, P., Weibert, F., Kurdas, O.O., Shiffman, M.L., Trinh, H., Washington, M.K., Sorbel, J., Anderson, J., Snow-Lampart, A., Mondou, E., Quinn, J., Rousseau, F., 2008. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N.*

- Engl. J. Med. 359 (23), 2442–2455. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa0802878>.
- Margeridon, S., Lachaux, A., Trepo, C., Zoulim, F., Kay, A., 2005. A quasi-monoclonal anti-HBs response can lead to immune escape of 'wild-type' hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt. 6), 1687–1693. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80810-0>.
- Pollicino, T., Cacciola, I., Saffiotti, F., Raimondo, G., 2014. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *J. Hepatol.* 61, 408–417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.04.041>.
- Qu, L.S., Liu, J.X., Liu, T.T., Shen, X.Z., Chen, T.Y., Ni, Z.P., Lu, C.A., 2014. Association of hepatitis B virus pre-S deletions with the development of hepatocellular carcinoma in qidong, China. *PLoS One* 9 (5), e98257. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098257>.
- Ramezani, F., Norouzi, M., Sarizade, G.R., Poortahmasebi, V., Kalantar, E., Magnus, L., Norder, H., Domingo, E., Jazayeri, S.M., 2013. Mutation hot spots in hepatitis B surface antigen in chronic carriers from Khozestan province, southern of Iran. *J. Allergy Asthma. Immunol.* 12 (3), 269–275.
- Seo, S.I., Choi, H.S., Choi, B.Y., Kim, H.S., Kim, H.Y., Jang, M.K., 2014. Coexistence of hepatitis b surface antigen and antibody to hepatitis b surface may increase the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection: a retrospective cohort study. *J. Med. Virol.* 86, 124–130. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23779>.
- Tong, S., Revill, P., 2016. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J. Hepatol.* 64, S4–S16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.027>.
- Velay, A., Jeulin, H., Eschlimann, M., Malve, B., Goehring, F., Bensenane, M., Fripiat, J.P., Abraham, P., Ismail, A.M., Murray, J.M., Combet, C., Zoulim, F., Bronowicki, J.P., Schvoerer, E., 2016. Characterization of hepatitis B virus surface antigen variability and impact on HBs antigen clearance under nucleos(t)ide analogue therapy. *J. Viral Hepatitis* 23, 387–398. <http://dx.doi.org/10.1111/jvh.12498>.
- Xue, Y., Wang, M.J., Yang, Z.T., Yu, D.M., Han, Y., Huang, D., Zhang, D.H., Zhang, X.X., 2017. Clinical features and viral quasispecies characteristics associated with infection by the hepatitis B virus G145R immune escape mutant. *Emerg. Microb. Infect.* 6, e15. <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2017.2>.
- Zhang, A.H., Lai, C.L., Huang, F.Y., Seto, W.K., Fung, J., Wong, D.K.H., Yuen, L.F., 2017. Deep sequencing analysis of quasispecies in the HBV pre-S region and its association with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-017-1334-1>. Epub ahead of print.
- Zhao, Z.M., Jin, Y., Gan, Y., Zhu, Y., Chen, T.Y., Wang, J.B., Sun, Y., Cao, Z.G., Qian, G.S., Tu, H., 2014. Novel approach to identifying the hepatitis B virus pre-S deletions associated with hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 20, 13573–13581. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i37.13573>.

DISCUSSION

Dans cette partie finale du mémoire, nous n'aborderons volontairement que certains aspects de nos travaux sélectionnés pour leur importance dans l'approche de la variabilité du VHB.

Ainsi, dans un premier temps, nous essaierons de faire une synthèse des éléments à prendre en compte pour une analyse critique et pertinente des souches virales par **séquençage haut-débit**. Ces techniques en plein essor, qui continuent à progresser, doivent être suivies de bio-analyses qui mériteraient d'être peu à peu standardisées en fonction des objectifs poursuivis : analyse approfondie des quasi-espèces virales, régions du génome étudié plus ou moins variables, conséquences fonctionnelles biologiques pour les virus et impact dans la prise en charge viro-clinique des infections virales.

Dans un deuxième temps, nous mettrons en lumière les faits marquants des **résultats originaux de nos travaux**, qui ont été présentés dans la section précédente 'Présentation des articles publiés ou soumis'. Nous en ferons ressortir des données comparées entre elles et des perspectives dans la prise en compte de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du VHB pour une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection, une meilleure maîtrise du diagnostic virologique et de la prise en charge viro-clinique des patients infectés.

I. La variabilité des protéines d'enveloppe du VHB explorée par séquençage haut-débit.

1. Présentation générale

Le principe de base du séquençage haut-débit est la combinaison (ou parallélisation) de réactions de séquençage permettant de connaître par de courtes lectures (« reads ») d'une « librairie », une séquence d'un génome complet ou une partie de génome ciblée par PCR [Audebert *et al.*, 2014].

Afin d'étudier la variabilité de souches virales pouvant influencer l'évolution clinique d'une maladie virale, le séquençage haut-débit est une alternative optimale à la détection de souches virales minoritaires (inférieures à 15-20 %) non détectées en séquençage direct. Une plus grande quantité de données est donc générée avec le séquençage haut-débit comparé au séquençage direct. Le séquençage haut-débit permet la détermination de la fréquence de nombreux variants d'une quasi-espèce virale, ce qui n'était pas possible avec les méthodes de clonage-séquençage [Ramirez *et al.*, 2013], à moins de réaliser l'analyse d'un très grand nombre de clones, au-delà de 100 environ, ce qui est chronophage et coûteux.

La diminution des coûts de séquençage haut-débit au cours du temps a permis de rendre cette méthode, prometteuse sur le plan technique, accessible dans le domaine de la recherche clinique. Actuellement, la recherche de mutations liées à des cellules cancéreuses est l'application prépondérante de la méthode de séquençage haut-débit [Audebert *et al.*, 2014].

Dans le domaine des maladies infectieuses, cet outil pourrait être utilisé en cas d'infections ne pouvant pas être élucidées par les méthodes habituelles. Le séquençage haut-débit pourrait être un outil clé en routine dans la prise en charge d'infections provoquées par des bactéries multi-résistantes, par exemple [Audebert *et al.*, 2014]. En effet, il pourrait permettre de détecter des mutations référencées qui sont associées à des résistances qui n'auraient pas pu être détectées avec les méthodes classiques moins sensibles. De plus, il pourrait mettre en évidence de nouvelles mutations associées aux mécanismes de résistance et de virulence. Par ailleurs, le séquençage haut-débit pourrait être utilisé pour prédire et prévenir l'évolution d'une infection, d'une maladie [Audebert *et al.*, 2014].

Cependant, le séquençage haut-débit possède également ces limites. Plusieurs éléments ne sont pas standardisés comme la correction des erreurs de séquençage qui varie selon les méthodes utilisées, l'analyse des haplotypes sur des fragments supérieurs à la taille des lectures, les différents modèles statistiques à appliquer, les bonnes règles de bio-analyse d'une façon générale. L'enjeu

essentiel actuel des méthodes de séquençage est la bio-analyse des milliers, millions de séquences obtenues. De plus, les méthodes d'analyse des données sont controversées actuellement.

2. Différentes méthodes de séquençage haut-débit

Les méthodes de séquençage disponibles à ce jour diffèrent selon leurs modes de détection : le pyroséquençage pour la société Roche, la synthèse de nucléotides fluorescents « terminateurs » réversibles pour la société Illumina, la lecture de la variation de pH associée à la libération d'un ion H⁺ lors de la polymérisation d'un nucléotide pour la société Ion Torrent [Audebert *et al.*, 2014]. La méthode SOLiD repose sur une PCR en émulsion comme la méthode 454 de Roche, mais le séquençage s'effectue par ligation des oligonucléotides et la détection de fluorescence. Par ailleurs, elles ont chacune des caractéristiques techniques différentes (temps de run, nombre de bases par lecture, nombre de lectures générées par run), et présentes chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Nous ne développerons pas ici les techniques de séquençage haut-débit de troisième génération.

Les différents avantages, inconvénients et les caractéristiques techniques des méthodes de séquençage haut-débit actuellement sur le marché sont présentés dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Les différentes caractéristiques des méthodes de séquençage haut-débit actuellement sur le marché [Glenn, 2011].

	454 Roche	Illumina	SOLiD (Life Technologies)	Ion Torrent (Life Technologies)
Temps de run	10 heures- 1 jour	5 heures – 11 jours	1 jour – 15 jours	2 heures – 7 heures
Nombre de bases par lecture maximal	1000	2 x 250	75	200-400
Millions de lecture par run	1	3,4-3000	1400	0,1-80
Erreurs principales	Substitutions Homopolymères	Rares Substitutions	Biais A-T	Insertions/délétions homopolymères
Taux d'erreurs	1 %	0,1-0,5 %	> 0,01-0,06 %	1-1,8 %
Précision	97,4 % - 99,9 %	96,7 % - 100 %	99,6 %-99,8 %	99,97 %
Principaux avantages	Séquençage de longs fragments	Taux d'erreur inférieur à 0,5 % Larges domaines d'applications Coût	Taux d'erreur inférieur à 1 %	Détecteur électronique Nucléotides non marqués Rapidité Simple coût
Principaux inconvénients	Taux d'erreurs Coût Débit limité	Temps du run Lecture courtes Taille des données générées	Lectures courtes	Taux d'erreurs (1-1,8 %) Temps de préparation des échantillons

Lors de nos analyses en séquençage haut-débit, deux facteurs limitants ont été soulevés. Le premier concerne la fragmentation des échantillons d'ADN avec les contraintes d'un nombre maximal de bases par lecture qui ne permet pas d'analyser la composition en haplotypes (composition en bases sur un même brin d'ADN), sur des régions supérieures au nombre de bases par lecture. Le second facteur limitant a été la détermination du seuil de détection des variants minoritaires pouvant avoir un impact sur l'évolution viro-clinique directe ou au long cours. Nous nous attarderons dans les deux paragraphes qui suivent sur ces deux éléments à prendre en compte.

3. L'analyse des haplotypes

La contrainte de la longueur des lectures pour les méthodes de séquençage haut-débit peut influencer l'analyse des variants viraux. Des étapes de fragmentation sont souvent nécessaires pour répondre aux exigences des méthodes de séquençage actuelles. Pour déterminer le pourcentage d'une mutation à une position spécifique, l'étape de fragmentation n'est pas une étape limitante à l'analyse des variants. Cependant, pour déterminer les haplotypes, correspondant aux différents variants des quasi-espèces où des mutations sont co-localisées sur le même génome viral, les fragments générés doivent correspondre à la longueur du gène à analyser. Par exemple, lors de nos analyses, nous avons utilisé la technique Ion Torrent qui contraint à fragmenter le génome en fragments de 200 pb. Cependant, la protéine S du VHB a une longueur de 600 pb et nous ne pouvions pas affirmer qu'une mutation en position 60 était retrouvée sur le même haplotype (brin/variant) que la mutation en position 360, par exemple. Pour pouvoir exploiter des données sur haplotypes, nous nous sommes ainsi focalisés sur une partie du génome dont la longueur correspondait à la taille d'une lecture. L'utilisation de méthodes de séquençage haut-débit avec une taille de lecture plus élevée doit être préconisée pour l'étude des haplotypes.

Toutefois, des techniques de séquençage haut-débit après fragmentation peuvent être utilisées sur le terrain médical par exemple, quand des études viro-cliniques préliminaires ont pu valider la présence de mutations avec un impact pratique (exemple, résistance du VIH aux traitements antirétroviraux), même sans la connaissance des haplotypes précis. Dans ces cas, une émergence de souches virales sous traitement portant les mutations de résistance validera *a posteriori* les conséquences présumées des mutations détectées de façon systématique en lecture groupée « verticale » de tous les « reads » (échec thérapeutique).

4. Le seuil de détection

Le seuil de détection des variants viraux, seuil à partir duquel un sens biologique peut être accordé à une mutation, est une question récurrente dans l'analyse de la variabilité virale. À partir de quel seuil une mutation peut-elle avoir un effet biologique, voire clinique direct ou à long terme ?

Les études réalisées sur le VIH ont admis qu'un mutant résistant présent à 5 % dans la population virale lors du séquençage haut-débit par pyroséquençage pouvait prédire l'échec thérapeutique des antirétroviraux [Mohamed *et al.*, 2014a ; Trabaud *et al.*, 2017]. Par ailleurs, des études comparatives du séquençage direct et haut-débit (pyroséquençage) ont montré que le séquençage direct permettant généralement de détecter des variants dont la fréquence était supérieure à 15-20 %, mais ne détectait pas certains variants présents à 21 %, 23 % et 25 % en séquençage haut-débit. Dans l'étude de Mohamed *et al.*, 2014b, un seuil de 1 % a été envisagé pour mieux caractériser les populations virales et identifier des mutations de résistance supplémentaires pour ainsi, aider le clinicien à fournir un traitement plus approprié pour le patient [Mohamed *et al.*, 2014b].

Une seconde étude de Lauck *et al.*, 2012, réalisée sur les souches de VHC, a montré, sur un modèle *in vivo*, que des variants viraux de VHC résistants aux antiviraux, généralement détectés dans des proportions inférieures à 1 %, pouvaient augmenter sous pression thérapeutique.

L'étude de Ramirez *et al.* (2013) a comparé des études de séquençage haut-débit (pyroséquençage) avec les résultats observés en clonage séquençage sur des souches de VHB. Ces analyses ont déterminé un seuil de détection à 0,25 % pour des fragments de 500 pb. En effet, tous les sites polymorphiques supérieurs à 0,25 % étaient retrouvés en séquençage haut-débit. Cependant, des études antérieures avaient estimé le seuil à 0,05 % pour des fragments de 200 pb. La taille du fragment séquencé est importante à prendre en compte. En effet, une taille de fragments plus longue pourrait favoriser l'accumulation des erreurs [Ramirez *et al.*, 2013].

Une étude réalisée par Pena *et al.* (2016), à l'aide du séquençage haut-débit Illumina, a montré que les séquences très rares d'insert de BCoV (coronavirus respiratoire bovin) (0,01 %) présent dans un mélange maîtrisé pour sa composition étaient détectables par la méthode de séquençage haut-débit Illumina.

Dans les études de microbiologie environnementale, des limites de détection plus faibles sont envisagées pour mettre en évidence les diverses populations d'organismes, même minoritaires, présentes dans un échantillon ou observer leur évolution au cours du temps. Cependant les taux d'erreurs actuels des méthodes présentes sur le marché ne permettent pas de détecter des populations à de très faible pourcentage sans envisager les risques d'introduire des erreurs d'analyses. Les taux d'erreur des différentes techniques sur le marché devront être améliorés.

Les méthodes de séquençage haut-débit combinées avec des analyseurs de données (basés sur des études statistiques) sont actuellement en cours d'étude et permettraient de diminuer le seuil de détection à 0,05 % [Hedskog *et al.*, 2010] voire 0,005-0,01 % (ViVan) [Isakov *et al* 2015].

II. La variabilité des protéines d'enveloppe du VHB et l'évolution de l'infection évaluée par la persistance de l'AgHBs.

1. Comparaison de la cohorte de patients infectés par le VHB de génotype A ou D

La clairance de l'AgHBs chez les patients atteint d'une infection chronique par le VHB n'est que très rarement observée, même sous traitement anti-VHB. Les facteurs pouvant influencer la persistance ou la clairance de l'AgHBs n'ont pas encore été totalement élucidés. Notre hypothèse de travail était que l'étude de la variabilité des protéines d'enveloppe pourrait expliquer, au moins partiellement, l'évolution de l'infection par le VHB évaluée par la persistance de l'AgHBs.

Nous avons eu l'opportunité d'étudier deux cohortes de patients infectés par le VHB de génotype D et le VHB de génotype A. La première cohorte de VHB de génotype D portait sur des patients infectés chroniquement par le VHB sous traitement antiviral et la seconde cohorte de VHB de génotype A a été élargie à différents profils de patients présentant soit une infection à VHB chronique, soit une infection à VHB aigüe, soit une co-infection par le VHB et le VIH. Notre objectif était de rechercher des mutations signatures dans les glycoprotéines d'enveloppe du VHB pouvant influencer l'évolution de l'infection chez différents profils de patients. Nous rappelons ici que, pour nos travaux, les patients « répondeurs » sont définis par une clairance de l'AgHBs, sous traitement antiviral ou non, alors que les patients « non-répondeurs » montraient une persistance de l'AgHBs.

1.1. Clairance de l'AgHBs et réponse immunitaire de l'hôte

Dans la littérature, la clairance de l'AgHBs est plus fréquemment retrouvée chez les adultes présentant une infection chronique par le VHB de génotype A comparé au génotype D [Sanchez-Tapias *et al.*, 2002]. Cependant, la progression vers la chronicité après une infection à VHB aigüe chez l'adulte est plus importante chez les patients infectés par le VHB de génotype A [Croagh *et al.*, 2015]. La comparaison des VHB de génotypes A et D en Europe a montré une plus grande hétérogénéité génétique entre les patients infectés par le VHB de génotype D comparés aux patients infectés par le VHB de génotype A [Aragri *et al.*, 2016]. Ceci a également été observé en comparant nos deux cohortes. En effet, l'hétérogénéité génétique entre les patients était plus forte pour les patients infectés par le génotype D ($d=0,012$ pour S et $d=0,0095$ pour préS) que le génotype A ($d=0,001$ pour S et préS). Les patients présentant une infection aigüe par le VHB de génotype A semblent présenter

une réponse immunitaire plus faible que les autres génotypes [Ito *et al.*, 2016]. Par ailleurs, le VHB de génotype A se réplique plus lentement que les autres génotypes. La réplication plus lente du virus a été associée à une faible réponse immunitaire cellulaire et à une augmentation de la probabilité de la persistance de l'infection [Grossman et Paul, 2000 ; Mondal *et al.*, 2015 ; Ito *et al.*, 2016].

L'analyse des mutations observées sur les protéines d'enveloppe des cohortes de patients infectés par le VHB de génotype A et de génotype D a montré un plus grand nombre de mutations dans le gène S des « non-répondeurs » comparé aux « répondeurs », et plus particulièrement dans la zone fonctionnelle majeure MHR. Cette région est cruciale pour la réponse immunitaire humorale et les mutations dans cette région peuvent modifier la conformation des épitopes S et les propriétés antigéniques des protéines d'enveloppe favorisant la persistance de l'AgHBs [Greiner *et al.*, 2014]. De plus, certaines de ces mutations étaient associées à une diminution de l'antigénicité prédite par le logiciel AnTheProt favorisant la persistance de l'AgHBs (exemple : huit mutations pour les génotypes D).

Parmi les mutations d'échappement décrites sur le site <http://hbv.geno2pheno.org/index.php>, cinq mutations d'échappement ont été retrouvées lors de nos travaux chez les « non-répondeurs » infectés par du VHB de génotype A et cinq chez les « non-répondeurs » infectés par du VHB de génotype D. Cependant, aucune mutation n'a été retrouvée chez les « répondeurs » infectés par du VHB de génotype A et une seule chez les « répondeurs » infectés par du VHB de génotype D (sP142R).

En outre, l'apparition de nouveaux sites de N-glycosylation favorise l'échappement immunitaire [Yu *et al.*, 2014]. Des mutations impliquées dans l'apparition de nouveaux sites de N-glycosylation (Asparagine-X-Thréonine/Sérine, avec X différent de la proline) ont été observées seulement chez les patients « non-répondeurs » des cohortes A et D. En effet, une N-glycosylation supplémentaire a été observée en position 113 (sS113T) chez un « non-répondeur » infecté par le VHB de génotype D. Pour les souches de génotype A, trois mutations présentes aux positions 116 (sT116N), 130 (sG130N) et 133 (sM133T) ont été retrouvées chez trois « non-répondeurs ». Ces nouveaux sites de N-glycosylation, influençant la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte, pourraient favoriser la persistance de l'infection.

1.2. Signatures moléculaires dans les glycoprotéines du VHB

Dans la cohorte de patients infectés par du VHB de génotype D sous traitement antiviral, le couple de mutations **sT125M/sP127T** a été retrouvé chez 4/6 des « non-répondeurs », mais jamais chez les « répondeurs ». Cette mutation a été associée à une diminution de l'antigénicité prédite par bio-informatique de 28 %. Par ailleurs, une moins bonne réactivité des anticorps vaccinaux face aux peptides mutés en sT125M par rapport à un peptide sauvage a été observée (p=0,0029). Ainsi ces

résultats suggèrent que la mutation sT125M pourrait être associée à une plus faible réponse humorale contre la mutation sT125M qui va contribuer à la persistance de l'AgHBs chez les patients. La mutation sT125M a précédemment été décrite chez des patients chroniquement infectés par le VHB de génotype D3 et chez un patient usager de drogues par voie intraveineuse qui était co-infecté par le VIH [De Maddalena *et al.*, 2007 ; Pourkarim *et al.*, 2010 ; Taffon *et al.*, 2014]. Par ailleurs, les mutations sT125M/sP127T ont été observées chez un bébé né d'une mère infectés par le VHB malgré la vaccination anti-HBV réalisée à la naissance [Velu *et al.*, 2008]. Ce couple de mutations sur la protéine d'enveloppe du VHB pourrait favoriser l'échappement immunitaire et par conséquent la persistance de l'infection. Dans la cohorte de patients infectés par du VHB de génotype A, la mutation sT125M a été retrouvée chez un « répondeur ». Cependant, elle était représentée à un faible pourcentage (5 %) et n'était pas associée à la mutation sP127T.

Dans la cohorte de patients infectés par du VHB de génotype A, la mutation **sY161F**, localisée dans le déterminant « a », a été retrouvée chez 3/8 des « non-répondeurs ». L'acide aminé F est plus hydrophobe que l'acide aminé Y, retrouvé dans la séquence consensus sauvage de génotype A. Par ailleurs, la mutation est responsable d'une diminution de l'antigénicité prédite de 28 %. Ainsi, cette mutation pourrait être responsable d'une faible reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Cette mutation a déjà été décrite dans la littérature chez des patients infectés chroniquement par le VHB de génotype A1, A2, A3, mais également par du VHB de génotype B [Grabarczyk *et al.*, 2010 ; Cassino *et al.*, 2011 ; Skelton *et al.*, 2012 ; Darmawan *et al.*, 2015 ; Candotti *et al.*, 2016]. Par exemple, la mutation sY161F a été retrouvée chez 29,5 % des patients inclus dans une cohorte Polonaise, qui étaient naïfs de traitement et présentaient une persistance de l'AgHBs [Grabarczyk *et al.*, 2010]. Cette mutation a également été associée à un échappement à la vaccination chez des enfants nés de mères infectées par le VHB vaccinés à la naissance [Zhu *et al.*, 2001]. Elle a également été retrouvée chez des jeunes adultes présentant une hépatite occulte [Darmawan *et al.*, 2015]. Par ailleurs, l'acide aminé F est retrouvé dans la séquence consensus des génotypes C et D, qui sont connus pour être associés au développement d'une maladie hépatique plus sévère [Paraskevis *et al.*, 2013].

La mutation **sE164D** a été retrouvée chez 3/8 des « non-répondeurs » de la cohorte de patients infectés par du VHB de génotype A et chez un « non-répondeur » de la cohorte de patients atteints par du VHB de génotype D. Cette mutation, généralement retrouvée chez les patients infectés chroniquement par le VHB, est associée à la mutation sI195M. La mutation sE164D diminue la capacité de fixation des anticorps anti-HBs sur l'AgHBs *in vitro* [Torresi *et al.*, 2002]. Par ailleurs, en raison du chevauchement de la protéine S avec la polymérase du VHB, ces mutations sont associées à la résistance aux traitements par la Lamivudine et/ou l'Entécavir (rtL180M, rtM204V +/- rt V173L) [Torresi *et al.*, 2002].

Ainsi, nos travaux, en accord avec des données de la littérature, ont montré que la variabilité des protéines d'enveloppe du VHB pouvait influencer la persistance du VHB dans le contexte varié de différents profils cliniques. Des délétions, généralement associées à la sévérité de la maladie, ont également été observées majoritairement chez les patients « non-répondeurs ». La question des délétions sera développée dans la section suivante portant sur des souches de VHB de génotype C.

La variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du VHB et des signatures moléculaires au sein de ces protéines, corrélée à la persistance ou à la clairance de l'AgHBs, pourrait donc modifier l'évolution viro-clinique de la maladie, avec ou sans traitement antiviral. Ainsi, les protéines d'enveloppe pourraient contribuer, au moins partiellement, à la compréhension de l'évolution de la maladie quant aux réponses immunitaires de l'hôte, aux réponses thérapeutiques et par conséquent permettre de mieux appréhender la clairance ou la persistance de l'AgHBs chez les patients.

2. La cohorte des patients infectés par du VHB de génotype C

L'étude réalisée sur les deux patients infectés par du VHB de génotypes C, en plus de données collectées dans la littérature, a permis d'insister sur l'importance de la variabilité des protéines d'enveloppe chez des patients infectés chroniquement par le VHB depuis plusieurs années, présentant une maladie hépatique sévère, avec (patient P1) ou sans traitement (patient P2) et présentant une co-infection par le VIH (patient P1) ou non (patient P2).

En effet, ces deux patients présentaient une variabilité importante au sein des protéines d'enveloppe du VHB. Les mutations observées chez ces deux patients se retrouvent essentiellement dans les régions antigéniques de la protéine (épitopes des lymphocytes B et T), et plus particulièrement dans la région MHR qui est essentielle à la reconnaissance par les lymphocytes B du système immunitaire. Par ailleurs, certaines mutations retrouvées chez ces patients ont été décrites dans la littérature comme permettant au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte (sQ30K, sY134N pour le patient P1 et sT123N, sI126N et sG145R pour P2 [Ireland *et al.*, 2000 ; Avellon et Echevarria, 2006 ; Ramezani *et al.*, 2013]). Ces mutations pourraient également expliquer la persistance de l'infection chez ces patients. De plus, certaines mutations ont été associées à une diminution de l'antigénicité prédite par le logiciel AnTheProt, plus particulièrement chez le patient P2 (sS53L, sS58C, sG145R, sV168A sur le gène S ; D27G, P32L, E54A, N56H/W et A60V sur la région prés). Toutes ces données sont en faveur d'un échappement du virus au système immunitaire de l'hôte favorisant la persistance de l'infection par le VHB.

Le rôle des variants minoritaires, lors d'une infection par le VHB, n'est actuellement pas bien compris. Cependant, leur impact sur l'évolution clinique des patients devrait être suivi dans le cadre de travaux de recherche viro-clinique. En effet, même s'ils sont faiblement représentés dans la quasi-

espèce virale, le pourcentage de variants ramené à la charge virale du patient peut tout de même représenter une quantité importante de virus possédant des mutations chez un même patient (exemple du patient P2 : sG145R représentant seulement 2 % de la population virale rapporté à la charge virale du patient P2 correspond à 3,04 logUI/mL de ce variant). De plus, l'accumulation de plusieurs variants viraux présents en faible pourcentage, mais qui possèdent des propriétés d'échappement peut favoriser la persistance virale.

La comparaison des mutations observées chez ces deux patients a permis de mettre en évidence six mutations communes (sP62L et sP203R sur le gène S et P32L, A60V, G73N et W172stop sur la région prés). Les mutations sP62L, P32L et A60V sont associées à une diminution de l'antigénicité prédite de 28 à 46 %. En analysant les deux échantillons récupérés pour le patient P1, certaines mutations persistent ou apparaissent (A60V, G73N et sP62L) tandis que d'autres disparaissent (P32L, W172stop et sP203R). Une analyse de la littérature de l'influence de ces mutations sur le pouvoir infectieux du virus a permis d'émettre des hypothèses sur la persistance ou la disparition de certaines mutations en lien avec le fitness du VHB. Des modifications multifactorielles du virus et de son environnement pourraient être impliquées dans la sélection de ces mutations.

Parmi les mutations qui apparaissent ou persistent sur les souches virales du patient P1, les mutations A60V et P62L ont montré une diminution de l'antigénicité prédite par le logiciel AnTheProt. Cette diminution de l'antigénicité prédite pourrait influencer la reconnaissance du VHB par le système immunitaire de l'hôte et favoriser la propagation du virus et la persistance de l'infection. La mutation G73N, quant à elle, n'est pas associée à une diminution de l'antigénicité prédite, mais se retrouve dans le promoteur des protéines S du VHB [Lin *et al.*, 2012]. Tout comme les délétions retrouvées dans cette région, cette mutation pourrait être responsable d'une diminution de la production des protéines d'enveloppe du VHB, favoriser leur rétention dans le réticulum endoplasmique et par conséquent la transformation des cellules et la progression de la maladie hépatique observée chez les patients P1 et P2 [Lin *et al.*, 2012 ; Lin et Kao, 2015 ; Sunbul, 2014 ; Zhang *et al.*, 2016a].

En parallèle, **certaines mutations disparaissent**. Ces mutations pourraient s'avérer délétères pour la réplication du VHB. la mutation P32L a été associée à une diminution de l'antigénicité prédite (-46 %) et a été décrite dans la littérature dans certains cas d'hépatite occulte [Kim *et al.*, 2013]. Cette mutation a également été décrite comme associée à la mutation W122stop qui disparaît également chez le patient P1 [Kim *et al.*, 2013]. Les infections occultes par le VHB favorisent généralement la progression de la maladie et la persistance de l'infection. Cependant, ces deux mutations se retrouvent dans des zones importantes pour le pouvoir infectieux du virus, le site de fixation aux hépatocytes et celui de l'attachement à la nucléocapside. Elles pourraient être ainsi

délétères pour le fitness répliatif du VHB (réduction de la sécrétion du virus, réduction de la propagation du virus) [Lin *et al.*, 2012]. La mutation sP203R disparaît également chez le patient P1. Cette mutation ne semble pas présenter un avantage sélectif pour le virus (elle n'est présente qu'à 5 % chez la population virale du patient P2). Par ailleurs, cette mutation, par chevauchement des cadres de lecture, se retrouve dans le sous-domaine structurel et fonctionnel « palm » de la polymérase virale [Ding *et al.*, 2016].

Des **délétions** dans la région prés ont également été retrouvées chez ces patients et sont localisées dans les épitopes des lymphocytes B et T du système immunitaire de l'hôte. Une délétion présente chez 100 % des variants viraux de la quasi-espèce a été retrouvée dans la région prés2 du patient P1. De nombreuses délétions se retrouvent dans cette région qui n'est pas cruciale pour l'entrée du virus dans les cellules, sa formation et son pouvoir infectieux contrairement aux autres protéines [Pollicino *et al.*, 2014]. Les délétions dans prés2 ont été associées à des stades avancés de la maladie hépatique chronique [Pollicino *et al.*, 2014]. Le patient P2, quant à lui, présente quatre souches minoritaires présentant des délétions dans la région prés1. Ces délétions sont associées à des variants majoritaires non délétés car la région prés1 est essentielle au pouvoir infectieux du virus. Les délétions dans prés1 peuvent également être un marqueur de la progression de la maladie [Pollicino *et al.*, 2014 ; Lee *et al.*, 2015b]. Les délétions dans prés sont généralement associées à une augmentation des fibroses hépatiques, des cirrhoses et des exacerbations aiguës conduisant parfois à des hépatites fulminantes [Coppola *et al.*, 2015 ; Pollicino *et al.*, 2014]. Les délétions dans prés entraînent une diminution de la production des protéines d'enveloppe du VHB et favorisent leur rétention dans le réticulum endoplasmique, conduisant à des dommages au niveau de l'ADN et à la transformation des cellules hépatiques en cellules GGH (« Ground Glass Hepatocyte ») et par conséquent au développement de CHC [Zhao *et al.*, 2014 ; Tong et Reville, 2016 ; Zhang *et al.*, 2017b].

Le patient P2 présente un profil sérologique atypique avec les AgHBs et les anticorps anti-HBs présents de façon simultanée (2,43-8,9 % des patients chroniques) [Liu *et al.*, 2016]. Ce patient présente neuf mutations dans la MHR comme les mutations sI126N et sG145R, déjà signalées chez des patients présentant ce même profil [Liu *et al.*, 2016 ; Xue *et al.*, 2017]. Ces mutations peuvent interférer dans la reconnaissance de l'AgHBs par les anticorps anti-HBs [Coppola *et al.*, 2015]. De plus, la mutation sG145R peut diminuer la sécrétion d'AgHBs et favoriser le développement des maladies hépatiques [Xue *et al.*, 2017]. Ce patient présente aussi plusieurs délétions dans la région prés1 (aa 1-6, 31-71, 38-73, 72-104), localisées dans les épitopes des lymphocytes B et T. La vaccination anti-VHB actuelle pourrait s'avérer inefficace contre ces souches virales et le risque de transmission horizontale ne peut pas être exclu chez ces patients. Ainsi, les individus présentant ce profil atypique, mais également sa famille et son entourage proche devraient être suivis attentivement [Leong *et al.*, 2016]. De plus, ces patients devraient être dépistés régulièrement pour

le développement de CHC. En effet, plusieurs études ont montré que ces individus présentaient généralement une hépatite avancée et une fibrose, mais également un plus grand risque de développer un CHC qui pourrait être associé aux délétions fréquemment retrouvées dans la région prÉS [Jang *et al.*, 2009 ; Huang *et al.*, 2010 ; Seo *et al.*, 2014 ; Leong *et al.*, 2016].

Ces deux patients présentent une diversité virale importante avec plusieurs mutations dans les régions épitopiques et des délétions dans la région prÉS qui sont, elles-mêmes, localisées dans des épitopes des lymphocytes B et T. Certaines de ces mutations pourraient influencer l'évolution et donc la prise en charge de la maladie. Ainsi, un suivi rapproché des patients présentant une variabilité importante dans le déterminant « a », potentiellement associée à un échappement immunitaire, ou présentant des délétions dans la région prÉS pourrait être recommandé dans un contexte de recherche clinique.

CONCLUSION

- En conclusion, pour détecter des variants minoritaires spécifiques, les méthodes de séquençage présentant un plus faible taux d'erreur sont à préconiser comme la technique Illumina. Par ailleurs des seuils de détection pourraient être évalués en fonction du but recherché. Un seuil de détection plus élevé pourrait être préconisé pour détecter des mutations ayant un effet clinique direct rapide. Un seuil de détection plus faible pourrait être envisagé pour voir l'évolution à long terme des souches virales, de leurs propriétés biologiques et de leur impact sur la physiopathologie des infections. Pour analyser la composition en haplotypes d'une population virale, des méthodes de séquençage avec un nombre de bases par lecture recouvrant la partie du génome à analyser devraient être utilisées. Dans ce contexte, des outils statistiques faisant intervenir les méthodes de « contigs » pourraient être également envisagés. Actuellement, les analyses par séquençage haut-débit sont controversées. Il n'existe pas de référentiel pour des modes opératoires portant sur des méthodes d'analyse des données conséquentes obtenues avec ces méthodes. Toutes les données obtenues ne sont pas utilisées au mieux et certaines informations intéressantes peuvent être perdues. Il est important d'établir des méthodes de référence pour l'étude des quasi-espèces virales (seuil de détection d'intérêt biologique et clinique, reconstitution des haplotypes, estimation de la fréquence des mutations) [Ramirez *et al.*, 2013]. Ainsi, il sera intéressant de confronter les expériences de plusieurs équipes pour mettre au point des méthodes d'analyse de référence, des recommandations de bonne pratique en fonction des disciplines de travail.

- Les résultats obtenus chez les 29 patients inclus dans nos travaux, à différents stades de l'infection par le VHB, et avec différents profils cliniques et thérapeutiques mettent en évidence une très grande variabilité des gènes préS/S du VHB, spontanément ou sous pression thérapeutique. Dans les cohortes de patients infectés par le VHB de génotype A ou D que nous avons étudiées, pour des patients à un stade d'infection par le VHB chronique ou aigu, la persistance de l'AgHBs ou l'évolution vers la chronicité étaient corrélées avec la présence de mutations et délétions dans des zones jouant un rôle important dans la reconnaissance du virus par le système immunitaire. Ces données suggèrent que la variabilité de l'enveloppe du VHB peut favoriser l'échappement immunitaire quels que soient les profils cliniques et le génotype du VHB. Ces résultats renforcent notre hypothèse de travail et confirment l'importance de l'étude des protéines d'enveloppe du VHB afin de mettre en évidence des mutations d'intérêt influençant le fitness du VHB et par conséquent, modifiant l'évolution clinique de la maladie liée au VHB. Ces données peuvent également contribuer au développement futur de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant ces protéines à l'étape d'entrée du VHB dans l'hépatocyte ou encore à l'adaptation éventuelle des souches vaccinales.

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Communications affichées :

« Impact of deletions and mutations in hepatitis B virus envelope proteins on serological profile and clinical evolution », **M. Eschlimann**, B. Malve, S. Galgey, H. Fenaux, F. Zoulim, F. Goehringer, C. Rabaud, T. May, H. Jeulin, E. Schvoerer. 4th ANRS HBV cure workshop- Paris 2017.

« Hepatitis B envelope variability of genotype A strains correlated with HBsAg persistence in patients with acute or chronic hepatitis B and in HBV/HIV co-infected patients », **M. Eschlimann**, H. Jeulin, A. Velay, B. Malve, H. Fenaux, A. Duda, M. Bensenane, F. Goehringer, J.P. Fripiat, T. May, J.P. Bronowicki, F. Zoulim, E. Schvoerer. 9^{ème} conférence Euro-Global Gastroenterology Conference and Hepatitis Vaccines - Valence, Espagne 2016.

« Influence of Hepatitis B, genotype A, virus envelope variability on HBs antigen (HBsAg) clearance in HBV mono-infected patients or patients co-infected with human immunodeficiency virus », **M. Eschlimann**, H. Jeulin, A. Velay, B. Malve, H. Fenaux, A. Duda, M. Bensenane, F. Goehringer, J.P. Fripiat, T. May, J.P. Bronowicki, F. Zoulim, E. Schvoerer. 3rd ANRS HBV cure workshop - Paris 2016.

« Influence of the genomic variability of hepatitis B virus in env/pol gne on HBs Antigen persistence or clearance in patients with chronic hepatitis B under antiviral treatment or not », **M. Eschlimann**, H. Jeulin, A. Velay, B. Malve, M. Bensenane, J.P. Fripiat, F. Zoulim, J.P. Bronowicki, E. Schvoerer. HBV Molecular Congress - Bad Nauheim, Allemagne 2015.

« L'antigène HBcr, nouveau marqueur évolutif de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B? » **M. Eschlimann**, H. Jeulin, A. Velay, B. Malve, J.P. Fripiat, J.P. Bronowicki, E. Schvoerer. 16^{ème} Journée Nationale d'Infectiologie - Nancy 2015.

« Emergence du virus de l'hépatite E chez l'Homme et dans l'environnement dans le Nord-Est de la France », H. Fenaux, M. Chassaing, O. Blanger, H. Jeulin, S. Berger, **M. Eschlimann**, C. Gantzer, I. Bertrand, E. Schvoerer. Journées Francophones de Virologie - Paris 2017.

« Influence of genotype A Hepatitis B virus envelope variability on HBs antigen (HBsAg) persistence in patients mono-infected or co-infected with human immunodeficiency », H. Jeulin, **M. Eschlimann**, A. Velay, B. Malve, H. Fenaux, A. Duda, M. Bensenane, F. Goehringer, J.P. Fripiat, T. May, J.P. Bronowicki, F. Zoulim, E. Schvoerer. 6th European Congress of Virology – Hambourg, Allemagne 2016.

« Study of the Hepatitis E virus emergence in North Eastern France on environmental and human samples », H. Fenaux, **M. Eschlimann**, H. Jeulin, S. Berger, M. Bensenane, J.P. Bronowicki, C. Gantzer, I. Bertrand, E. Schvoerer. 5th Food and Environmental Virology conference – Japon 2016.

« Influence de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur la clairance de l'AgHBs chez les patients co-infectés par le VIH », A. Duda, H. Jeulin, F. Goehringer, A. Velay, **M. Eschlimann**, J.P. Fripiat, E. Schvoerer. 16^{ème} Journée Nationale d'Infectiologie - Nancy 2015.

« La mutation T125M sur l'antigène de surface du virus de l'hépatite B peut moduler la clairance de l'antigène HBs au cours du traitement par analogues nucléos(t)idiques », A. Velay, H. Jeulin, B. Malve, **M. Eschlimann**, M. Bensenane, F. Zoulim, J.P. Fripiat, J.P. Bronowicki, E. Schvoerer. 9^{ème} journée de la recherche biomédicale - Nancy 2014.

« The mutation sT125M in HBV surface antigen can modulate the antigen clearance under treatment by anti-HBV nucléos(t)ide analogues », A. Velay, H. Jeulin, B. Malve, **M. Eschlimann**, M. Bensenane, F. Zoulim, J.P. Fripiat, J.P. Bronowicki, E. Schvoerer. 3rd World congress on controversies in the management of viral hepatitis – Berlin, Allemagne 2014, 3^{ème} prix.

Communications orales :

« Variabilité des gènes des glycoprotéines de surface du virus de l'hépatite B étudiées par séquençage haut-débit et clairance de l'antigène HBs sous analogues nucléos(t)idiques », **M. Eschlimann**, H. Jeulin, A. Velay, M. Bensenane, J. Murray, F. Zoulim, J.P. Fripiat, J.P. Bronowicki, E. Schvoerer. 15^{ème} réunion du réseau national hépatites de l'ANRS - Paris 2015.

« Influence des caractéristiques des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B (VHB) sur la clairance de l'AgHBs sous traitement anti-VHB », H. Jeulin, **M. Eschlimann**, A.Velay, B. Malve, F. Goehringer, M. Bensenane, J.P. Fripiat, F. Zoulim, C. Combet, J.P. Bronowicki, E. Schvoerer. 10^{ème} journée de la recherche hospitalo-universitaire : ma recherche en 300s TQC - Nancy 2015.

« Influence des caractéristiques des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B (VHB) sur la clairance de l'AgHBs avec ou sans traitement anti-VHB », E. Schvoerer, **M. Eschlimann**, H. Jeulin, A. Velay, B. Malve, F. Goehringer, M. Bensenane, J.P. Fripiat, F. Zoulim, C. Combet, J.P. Bronowicki. Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie Anti Infectieuse (RICAI) - Paris 2015.

« Hepatitis C and B: Key role of envelope glycoproteins in viral persistence », E. Schvoerer, A. Velay, H. Jeulin, **M. Eschlimann**, L. Cadot, M. Bensenane, F. Zoulim, J.P. Fripiat, J.P. Bronowicki, 15th Saar-Lox-Lux workshop on virus research - Nancy 2014.

Manuscrits :

Acceptés :

« The variability of hepatitis B envelope is associated with HBs antigen persistence in either chronic or acute HBV genotype A infection », **M. Eschlimann**, B. Malve, A. Velay, H. Fenaux, S. Berger, J.P. Fripiat, F. Zoulim, M. Bensenane, J.P. Bronowicki, F. Goehringer, T. May, H. Jeulin, E. Schvoerer. *Journal of Clinical Virology* 2017 ; 94 : 115-122.

« Impact of deletions and mutations in Hepatitis B virus envelope proteins on serological profile and clinical evolution », B. Malve, **M. Eschlimann (co premiers auteurs)**, S. Galgey, H. Fenaux, F. Zoulim, F. Goehringer, C. Rabaud, T. May, H. Jeulin, E. Eschvoerer. *Virus Research* 2017 ; 238 : 141-147.

« Characterization of hepatitis B virus surface antigen variability and impact on HBs antigen clearance under nucleos(t)ide analogue therapy », A. Velay, H. Jeulin (co premiers auteurs), **M. Eschlimann**, B. Malvé, F. Goehringer, M. Bensenane, J.P. Fripiat, P. Abraham, A. M. Ismail, J. M. Murray, C. Combet, F. Zoulim, J.P. Bronowicki, E. Schvoerer. *Journal of Viral Hepatitis* 2016 ; 23(5) : 387-398.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abbas Z, Abbas M, Abbas S, Shazi L. Hepatitis D and hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatol.* **2015** ; 7(5) : 777-86.

Abdelnabi Z, Saleh N, Baraghithi S, Glebe D, Azzeh M. Subgenotypes and mutations in the s and polymerase genes of hepatitis B virus carriers in the West Bank, palestine. *PLOS ONE* **2014** ; 9(12) : e113821.

Ait-Goughoulte M, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. *Viruses* **2010** ; 2(7) : 1394-410.

Alfaite D, Dény P, Durantel D. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral. Res.* **2015** ; 122 : 112-29.

Allweiss L, Dandri M. Experimental *in vitro* and *in vivo* models for the study of human hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **2016** ; 64(1 Suppl) : S17-31.

Aragri M, Alteri C, Battisti A, Di Carlo D, Minichini C, Sagnelli C et al. Multiple Hepatitis B Virus (HBV) quasispecies and immune-escape mutations are present in HBV Surface Antigen and reverse transcriptase of patients with acute Hepatitis B. *J. Infect. Dis.* **2016** ; 213: 1897-905.

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.

Araujo NM. Hepatitis B virus intergenotypic recombinants worldwide: an overview. *Infect. Genet. Evol.* **2015** ; 36 : 500–510.

Audebert C, Hot D, Lemoine Y, Caboche S. High-throughput sequencing: towards a genome-based diagnosis in infectious diseases. *Med. Sci. (Paris)* **2014** ; 30(12) : 1144-51.

Avellon A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus ‘a’ determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J. Med. Virol.* **2006** ; 78 (1) : 24–36.

Baclig MO, Alvarez MR, Gopez-Cervantes J, Natividad FF. Unique Surface Gene Variants of Hepatitis B Virus Isolated From Patients in the Philippines. *Journal of Medical Virology* **2014** ; 86: 209-216.

Ballarin R, Cucchetti A, Russo FP, Magistri P, Cescon M, Cillo U, et al. Long term follow-up and outcome of liver transplantation from hepatitis B surface antigen positive donors. *World J. Gastroenterol.* **2017** ; 23(12) : 2095-2105.

Balmasova IP, Yushchuk ND, Mynbaev OA, Alla NR, Malova ES, Shi Z, Gao CL. Immunopathogenesis of chronic hepatitis B. *World J. Gastroenterol.* **2014** ; 20(39) : 14156-71.

Baroni GS, D’Ambrosio L, Curto P, Casini A, Mancini R, Jezequel AM, et al. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* **1996** ; 23 : 1189-1199.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983** ; 220(4599) : 868-71.

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

Béguelin C, Moradpour D, Sahli R, Suter-Riniker F, Lüthi A, Cavassini M, et al. Hepatitis delta-associated mortality in HIV/HBV-coinfected patients. *J. Hepatol.* **2017** ; 66(2) : 297-303.

Bertoletti A, Ferrari C. Adaptive immunity in HBV infection. *J. Hepatol.* **2016** ; 64(1 Suppl) : S71-83.

Bertoletti A, Gehring AJ. Immune therapeutic strategies in chronic hepatitis B virus infection: virus or inflammation control? *PLoS Pathog.* **2013** ; 9(12) : e1003784.

Biswas S, Candotti D, Allain JP. Specific amino acid substitutions in the S protein prevent its excretion *in vitro* and may contribute to occult hepatitis B virus infection. *Journal of Virology* **2013** ; 87(14): 7882-7892.

- Blank A**, Markert C, Hohmann N, Carls A, Mikus G, Lehr T, *et al.* First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. *J. Hepatol.* **2016** ; 65(3) : 483-9.
- 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.
- Boger J**, Emini EA, Schmidt A. Surface probability profile: An heuristic approach to the selection of synthetic peptide antigens. *Reports on the Sixth International Congress in Immunology (Toronto)* **1986** ; p.250.
- Bogomolov P**, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova M, *et al.* Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study. *J. Hepatol.* **2016** ; 65(3) : 490-8.
- Boyd A**, Gozlan J, Mialhes P, Lascoux-Combe C, Cam MS, Rougier H, *et al.* Rates and determinants of hepatitis B 'e' antigen and hepatitis B surface antigen seroclearance during long-term follow-up of patients coinfecting with HIV and hepatitis B virus. *AIDS* **2015** ; 29 (15) : 1963–1973.
- Brezillon N**, Brunelle MN, Massinet H, Giang E, Lamant C, DaSilva L, *et al.* Antiviral activity of Bay 41-4109 on hepatitis B virus in humanized Alb-uPA/SCID mice. *PLOS ONE* **2011** ; 6(12) : e25096.
- Bruss V.** A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J. Virol.* **1997** ; 71 : 9350–9357.
- Bruss V.** Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* **2007** ; 13(1) : 65-73.
- Budkowska A**, Bedossa P, Groh F, Louise A, Pillot J. Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain. *J. Virol.* **1995** ; 69 : 840–8.
- Burns GS, Thompson AJ.** Viral hepatitis B: clinical and epidemiological characteristics. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* **2014** ; 30 ; 4(12) : a024935.
- Buti M**, Fung S, Gane E, Afdhal NH, Flisiak R, Gurel S, *et al.* Long-term clinical outcomes in cirrhotic chronic hepatitis B patients treated with tenofovir disoproxil fumarate for up to 5 years. *Hepatol. Int.* **2015** ; 9 : 243–250.
- Buti M**, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Esteban R. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *J. Clin. Virol.* **2005** ; 34 (Suppl 1): S79-82.
- Cai Q**, Zhu H, Zhang Y, Li X, Zhang Z. Hepatitis B virus genotype A: design of reference sequences for sub-genotypes, *Virus Genes* **2016** ; 52 : 325-33.
- Candotti D**, Diarra B, Bisseye C. Molecular characterization of hepatitis B virus in blood donors from Burkina Faso: Prevalence of quasi-subgenotype A3, genotype E, and mixed infections. *J. Med. Virol.* **2016** ; 88 : 2145–2156.
- Cassino L**, Benetti S, Fay F, Tanno H, Quarleri J. Unsuccessful therapy with adefovir and entecavir-tenofovir in a patient with chronic hepatitis B infection with previous resistance to lamivudine: a fourteen-year evolution of hepatitis B virus mutations. *BMC Infect. Dis.* **2011** ; 11 : 178.
- Castelain S**, Descamps V, Brochot E, Helle F, Duverlie G, Nguyen-Khac E *et al.* High association of T1858-G1896 precore mutations with impaired base pairing and high hepatitis B virus DNA levels in HBeAg-negative chronically infected patients. *Arch Virol.* **2017** ; [Epub ahead of print].
- Cerec V**, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, *et al.* Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* **2007** ; 45(4) : 957-67.
- Chauchereau A, Harel-Bellan A.** Inactivation fonctionnelle des gènes par ARN interférence . *Hématologie* **2004** ; 10(1) : 68-79.

- Chen BF.** Different pre-S deletion patterns and their association with hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* **2016** ; 22(35): 8041-9.
- Chen EQ, Feng S, Wang ML, Liang LB, Zhou LY, Du LY, Yan LB, Tao CM, Tang H.** Serum hepatitis B core-related antigen is a satisfactory surrogate marker of intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B. *Sci. Rep.* **2017** ; 7(1) : 173.
- Chen SJ, Zhao YX, Fang Y, Xu WZ, Ma YX, Song ZW, et al.** Viral deletions among healthy young Chinese adults with occult hepatitis B virus infection. *Virus. Res.* **2012** ; 163: 197-201.
- Chen Y, Qian F, Yuan Q, Li X, Wu W, Guo X, Li L.** Mutations in hepatitis B virus DNA from patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *J. Clin. Virol.* **2011** ; 52: 198– 203.
- Chen YCJ, Delbrook K, Dealwis C, Mimms L, Mushahwar IK, Mandecki W.** Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *Biochemistry* **1996** ; 93: 1997-2001.
- Cheung KS, Seto WK, Wong DK, Lai CL, Yuen MF.** Relationship between HBsAg, HBcrAg and hepatocellular carcinoma in patients with undetectable HBV DNA under nucleos(t)ide therapy. *J. Viral Hepat.* **2017** [Epub ahead of print].
- Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF.** Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol. Biol.* **2010** ; 58 : 2-266.
- Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, Filippi P, McLachlan A, Palmiter RD, et al.** A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* **1985** ; 230(4730): 1157-60.
- Chook JB, Ngeow YF, Khang TF, Ng KP, Tiang YP, Mohamed R.** Comparative analysis of viral genomes from acute and chronic hepatitis B reveals novel variants associated with a lower rate of chronicity. *J. Med. Virol.* **2013** ; 85(3): 419–424.
- Chun HM, Mesner O, Thio CL, Bebu I, Macalino G, Agan BK, et al.** HIV outcomes in Hepatitis B virus coinfecting individuals on HAART. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2014**; 66: 197-205.
- Cole AG.** Modulators of HBV capsid assembly as an approach to treating hepatitis B virus infection. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2016** ; 30 : 131-137.
- Coleman PF.** Detecting Hepatitis B surface antigen mutants. *Emerging Infectious Diseases* **2006** ; 12(2): 198-203.
- Coppola N, Onorato L, Minichini C, Di Caprio G, Starace M, Sagnelli C et al.** Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants. *World J. Hepatol.* **2015** ; 7(27): 2729-2739.
- Cornberg M, Wong VW, Locarnini S, Brunetto M, Janssen HL, Chan HL.** The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. *J. Hepatol.* **2017** ; 66(2) : 398-411.
- Croagh CM, Desmond PV, Bell SJ.** Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World J. Hepatol.* **2015** ; 7 : 289-303.
- Croagh CM, Lubel JS.** Natural history of chronic hepatitis B: phases in a complex relationship. *World J. Gastroenterol.* **2014** ; 20(30) : 10395-404.
- Cui C, Shi J, Hui L, Xi H, Zhuoma, Quni, et al.** The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J. Gen. Virol.* **2002** ; 83(Pt 11): 2773-7.
- Dandri M, Lütgehetmann M.** Mouse models of hepatitis B and delta virus infection. *J. Immunol. Methods* **2014** ; 410 : 39-49.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M.** Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1970** ; 1(7649) : 695-8.
- Darmawan E, Turyadi, El-Khobar KE, Nursanty NK, Thedja MD, Muljono DH.** Seroepidemiology and occult hepatitis B virus infection in young adults in Banjarmasin, Indonesia. *J. Med. Virol.* **2015** ; 87 : 199-207.

- Dash S**, Rao KV, Joshi B, Nayak NC, Panda SK. Significance of natural polymerized albumin and its receptor in hepatitis B infection of hepatocytes. *Hepatology* **1991** ; 13 : 134–42.
- De Falco S**, Ruvoletto MG, Verdoliva A, Ruvo M, Raucci A, Marino M, *et al.* Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **2001** ; 276 : 36613–2.
- De Maddalena C**, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D, Schiavini M, Milazzo L, *et al.* High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology* **2007** ; 365 : 113–24.
- Delaney WE**, Edwards R, Colledge D, Shaw T, Furman P, Painter G, Locarnini S. Phenylpropenamide derivatives AT-61 and AT-130 inhibit replication of wild-type and lamivudine-resistant strains of hepatitis B virus *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002** ; 46(9) : 3057–60.
- Deléage G**, Combet C, Blanchet C, Geourion C. ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput. Biol. Med.* **2001** ; 31 : 259–67.
- Deng Q**, Zhai JW, Michel ML, Zhang J, Kong YY, Qin J, *et al.* Identification and characterization of peptides that interact with hepatitis B virus via the putative receptor binding site. *J. Virol.* **2007** ; 81 : 4244–54.
- 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.
- Ding F**, Miaoc XL, Li YX, Daia JF, Yu HG. Mutations in the S gene and in the overlapping reverse transcriptase region in chronic hepatitis B Chinese patients with coexistence of HBsAg and anti-HBs. *The Brazilian J. Infect. Dis.* **2016** ; 20(1) : 1–7.
- Ding H**, Liu B, Zhao C, Yang J, Yan C, Yan L, *et al.* Amino acid similarities and divergences in the small surface proteins of genotype C hepatitis B *Viruses* between nucleos(t)ide analogue-naïve and lamivudine-treated patients with chronic hepatitis B. *Antiviral Res.* **2014** ; 102: 29-34.
- Domingo E**, Sabo D, Taniguchi T, Weissmann C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell.* **1978** ; 13(4): 735-44.
- Dong C**, Qu L, Wang H, Wei L, Dong Y, Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res.* **2015** ; 118 : 110–117.
- Dore GJ**, Soriano V, Rockstroh J, Kupfer B, Tedaldi E, Peters L, *et al.* Frequent hepatitis B virus rebound among HIV-hepatitis B virus-coinfected patients following antiretroviral therapy interruption. *AIDS* **2010** ; 24(6) : 857–65.
- Drexler JF**, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, *et al.* Bats carry pathogenic hepadna *Viruses* antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **2013** ; 110(40) : 16151-6.
- Ducancelle A**, Pivert A, Bertrais S, Boursier J, Balan V, Veillon P, *et al.* Different precore/core mutations of hepatitis B interact with, limit, or favor liver fibrosis severity. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016** ; 31(10): 1750–1756.
- EASL.** EASL **2017**: Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **2017** ; pii: S0168-8278(17) 30185-X.
- Fanale-Belasio E**, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann. Ist. Super Sanita.* **2010** ; 46(1) : 5-14.
- Fares MA**, Holmes EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J. Mol. Evol.* **2002** ; 54(6): 807–14.
- Fedorowicz-Stronska O**, Kapusta J, Czyz M, Kaczmarek M, Pniewski T. Immunogenicity of parenterally delivered plant-derived small and medium surface antigens of hepatitis B virus. *Plant. Cell. Rep.* **2016** ; 35(5) : 1209-12.

- Feld JJ**, Colledge D, Sozzi V, Edwards R, Littlejohn M, Locarnini SA. The phenylpropenamide derivative AT-130 blocks HBV replication at the level of viral RNA packaging. *Antiviral Res.* **2007** ; 76(2) : 168-77.
- Fourati S, Pawlotsky JM**. Recent advances in understanding and diagnosing hepatitis B virus infection. *F1000Res.* **2016** ; 5 : pii: F1000 Faculty Rev-2243.
- Franco A**, Paroli M, Testa U, Benvenuto R, Peschle C, Balsano F, *et al*. Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1992** ; 175 : 1195–205.
- Friedman SL, Arthur MJ**. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J. Clin. Invest.* 1989 ; 84 : 1780-1785.
- 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.
- Gane EJ**, Lim YS, Gordon SC, Visvanathan K, Sicard E, Fedorak RN, *et al*. The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **2015** ; 63(2) : 320-8.
- Gao Y**, Zhang TY, Yuan Q, Xia NS. Antibody-mediated immunotherapy against chronic hepatitis B virus infection. *Hum. Vaccin Immunother.* **2017** [Epub ahead of print].
- Gehring AJ, Ann D'Angelo J**. Dissecting the dendritic cell controversy in chronic hepatitis B virus infection. *Cell. Mol. Immunol.* **2015** ; 12(3) : 283-91.
- Gencay M**, Hübner K, Gohl P, Seffner A, Weizenegger M, Neofytos D, *et al*. Ultra-deep sequencing reveals high prevalence and broad structural diversity of hepatitis B surface antigen mutations in a global population. *PLOS ONE* **2017** ; 12(5) : e0172101.
- Glebe D, König A**. Molecular Virology of Hepatitis B Virus and Targets for Antiviral Intervention. *Intervirolgy* **2014** ; 57:134–140.
- Glebe D**, Urban S, Knoop EV, Çag N, Krass P, Grün S, Bulavaite A, Sasnauskas K, Gerlich WH. *Gastroenterology* **2005** ; 129 : 234–245.
- Glebe D, Urban S**. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J. Gastroenterol.* **2007** ; 13(1) : 22-38.
- Glebe D**. Attachment sites and neutralizing epitopes of hepatitis B virus. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* **2006** ; 52(1) : 3-21.
- Glebe D**. Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view. *World J. Gastroenterol.* **2007** ; 13(1) : 8-13.
- Glenn TC**. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* **2011** ; 11(5) : 759-69.
- Gong ZJ**, De Meyer S, van Pelt J, Hertogs K, Depla E, Soumillion A, *et al*. Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepatology* **1999** ; 29 : 576–84.
- Goto T**, Kato N, Yoshida H, Otsuka M, Moriyama M, Shiratori Y, *et al*. Synergistic activation of the serum response element-dependent pathway by hepatitis B virus x protein and large-isoform hepatitis delta antigen. *J. Infect. Dis.* **2003** ; 187(5) : 820-8.
- Grabarczyk P**, Garmiri P, Liszewski G *et al*. Molecular and serological characterization of hepatitis B virus genotype A and D infected blood donors in Poland. *J. Viral. Hepat.* **2010** ; 17 : 444-52.
- Greiner VJ**, Manin C, Larquet E, Ikhelef N, Gréco F, Naville S *et al*. Characterization of the structural modifications accompanying the loss of HBsAg particle immunogenicity. *Vaccine* **2014** ; 32 : 1049-54.
- Grimm D**, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol. Int.* **2011** ; 5 : 644–653.

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

Grossman Z, Paul WE. Self-tolerance: context dependent tuning of T cell antigen recognition. *Semin. Immunol.* **2000** ; 12 : 197-203.

Guidotti LG, Isogawa M, Chisari FV. Host-virus interactions in hepatitis B virus infection. *Curr. Opin. Immunol.* **2015** ; 36 : 61-6.

Günther S. Genetic variation in HBV infection : genotypes and mutants. *J. Clinical Microbiology* **2006** ; 36(suppl.1) : S3-S11.

Guo H, Xu C, Zhou T, Block TM, Guo JT. Characterization of the host factors required for hepadnavirus covalently closed circular (ccc) DNA formation. *PLOS ONE* **2012** ; 7(8) : e43270.

Habersetzer F, Moenne-Loccoz R, Meyer N, Schvoerer E, Simo-Noumbissie P, Dritsas S, *et al.* Loss of hepatitis B surface antigen in a real-life clinical cohort of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Liver. Int.* **2015** 35 : 130-9.

Hara M, Kono H, Furuya S, Hirayama K, Tsuchiya M, Fujii H. Interleukin-17A plays a pivotal role in cholestatic liver fibrosis in mice. *J. Surg. Res.* **2013**; 183: 574-582.

Hassemer M, Finkernagel M, Peiffer KH, Glebe D, Akhras S, Reuter A, *et al.* Comparative characterization of hepatitis B virus surface antigen derived from different hepatitis B virus genotype. *Virology* **2017** ; 502: 1-12.

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 : D566-70.

Hayer J, Rodriguez C, Germanidis G, Deléage G, Zoulim F, Pawlotsky JM. Ultradeep pyrosequencing and molecular modeling identify key structural features of hepatitis B virus RNase H, a putative target for antiviral intervention. *J. Virol.* **2014** ; 88 : 574-82.

Hayes CN, **Chayama K**. HBV culture and infectious systems. *Hepatol. Int.* **2016** ; 10(4) : 559-66.

Hayes CN, Zhang Y, Makokha GN, Hasan MZ, Omokoko MD, Chayama K. Early events in hepatitis B virus infection: from the cell surface to nucleus. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **2016** ; 31 : 302-309.

He XT, Xu HQ, Wang XM, He XS, Niu JQ, Gao PJ. Association between polymorphisms of the APOBEC3G gene and chronic hepatitis B viral infection and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2017** ; 23(2) : 232-241.

Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, Gane E, De Man RA, Krastev Z, *et al.* Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **2011** ; 140 : 132-43.

Hedskog C, Mild M, Jernberg J, Sherwood E, Bratt G, Leitner T, *et al.* Dynamics of HIV-1 quasispecies during antiviral treatment dissected using ultra-deep pyrosequencing. *PLOS ONE* **2010** ;5(7) : e11345.

Hézode C. Histoire naturelle de l'hépatite B. *Virologie* **2010** ; 14(supplément 1) : S5-S11.

Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res.* **1998** ; 154 : 315-29.

Hoekstra R, Nibourg GA, van der Hoeven TV, Ackermans MT, Hakvoort TB, van Gulik TM, *et al.* The HepaRG cell line is suitable for bioartificial liver application. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2011** ; 43(10) : 1483-9.

Hoelz A, Debler EW, Blobel G. The structure of the nuclear pore complex. *Annual review of biochemistry* **2011** ; 80 : 613-43.

Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981** ; 78(6) : 3824-8.

Hsieh YH, Su IJ, Wang HC, Tsai JH, Huang YJ, Chang WW, et al. Hepatitis B virus pre-S2 mutant surface antigen induces degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through c-Jun activation domain-binding protein 1. *Mol. Cancer. Res.* **2007** ; 5(10) : 1063-72.

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(1): 101-108.

Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J. Hepatol.* **2012a** ; 57: 720-729

Huang HC, Chen CC, Chang WC, Tao MH, Huang C. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J. Virol.* **2012b** ; 86 : 9443-53.

Huang X, Qin Y, Zhang P, Tang G, Shi Q, Xu J, Qi F et Shen Q. PreS Deletion Mutations of Hepatitis B Virus in Chronically Infected Patients With Simultaneous Seropositivity for Hepatitis-B Surface Antigen and Anti-HBs Antibodies. *Journal of Medical Virology* **2010** ; 8: 23–31.

Iavarone M, Trabut JB, Delpuech O, Carnot F, Colombo M, Kremsdorf D, et al. Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and nontumour liver cells using laser capture microdissection. *J. Hepatol.* **2003** ; 39: 253-261.

Ijaz S, Szypulska R, Andrews N, Tedder RS. Investigating the impact of hepatitis B virus surface gene polymorphism on antigenicity using ex vivo phenotyping. *J. Gen. Virol.* **2012** ; 93 : 2473–2479.

Imai M, Yanase Y, Nojiri T, Miyakawa Y, Mayumi M. A receptor for polymerized human and chimpanzee albumins on hepatitis B virus particles co-occurring with HBeAg. *Gastroenterology* **1979** ; 76 : 242–7.

Ireland JH, O'Donnell B, Basuni AA, Kean JD, Wallace LA, Lau GK, et al. Reactivity of 13 *in vitro* expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology* **2000** ; 31 (5) : 1176–1182.

Isakov O, Bordería AV, Golan D, Hamenahem A, Celniker G, Yoffe L, et al. Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *Bioinformatics* **2015** ; 31(13) : 2141-50.

Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, et al. Novel robust *in vitro* hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am. J. Pathol.* **2015** ; 185(5):1275–1285.

Ito K, Yotsuyanagi H, Sugiyama M, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, et al. Geographic distribution and characteristics of genotype A hepatitis B virus infection in acute and chronic hepatitis B patients in Japan. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016** ; 31 : 180-9.

Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T et al. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* **2014** ; 59: 89–97.

Jang JS, Kim HS, Kim HJ, Shin WG, Kim KH, Lee JH, et al. Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. *J. Med. Virol.* **2009** ; 81, 1531–1538.

Jardi R, Rodriguez-Frias F, Schaper M, Giggi E, Taberner D, Homs M, et al. Analysis of hepatitis B genotype changes in chronic hepatitis B infection: Influence of antiviral therapy. *J. Hepatol.* **2008** ; 49 : 695–701.

Jeulin H, Velay A, Murray J, Schvoerer E. Clinical impact of hepatitis B and C virus envelope glycoproteins. *World J. Gastroenterol.* **2013** ; 19(5) : 654-64.

- Joshi D, O'Grady J, Dieterich D, Gazzard B, Agarwal K.** Increasing burden of liver disease in patients with HIV infection. *Lancet* **2011** ; 377 : 1198-209.
- Jung SY, Kim YJ.** C-terminal region of HBx is crucial for mitochondrial DNA damage. *Cancer Lett.* **2013** ; 331: 76-83.
- Juniastuti, Utsumi T, Aksono EB, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, et al.** Predominance of precore mutations and clinical significance of basal core promoter mutations in chronic hepatitis B virus infection in Indonesia. *Biomed Rep.* **2013** ; 1(4): 522-528.
- Kay A, Zoulim F.** Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Research* **2007** ; 127: 164–176.
- Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H, Kornepati AV, Bogerd HP, Nie T, et al.** Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology* **2015**; 476:196–205.
- Kim H, Lee SA, Kim BJ.** X region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World J. Gastroenterol.* **2016** ; 22 (24) : 5467–5478.
- Kim H, Lee SA, Kim DW, Lee SH, Kim BJ.** Naturally occurring mutations in large surface genes related to occult infection of hepatitis B virus genotype C. *PLOS ONE* **2013** ; 8 (1) : e54486.
- Kitab B, Essaid El Feydi A, Afifi R, Trepo C, Benazzouz M, Essamri W.** Variability in the precore and core promoter regions of HBV strains in Morocco: characterization and impact on liver disease progression. *PLOS ONE.* **2012** ; 7(8): e42891.
- Klumpp K, Lam AM, Lukacs C, Vogel R, Ren S, Espiritu C, et al.** High-resolution crystal structure of a hepatitis B virus replication inhibitor bound to the viral core protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015** ; 112(49) : 15196-201.
- Ko C, Michler T, Protzer U.** Novel viral and host targets to cure hepatitis B. *Curr. Opin. Virol.* **2017** ; 24 : 38-45.
- Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, et al.** Oral prenylation inhibition with lonafarnib **Koh** in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect. Dis.* **2015** ; 15(10) : 1167-74.
- Kramvis A, Kew M, François G.** Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* **2005** ; 23 (19): 2409-23.
- Kramvis A.** Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology* **2014** ; 57(3-4): 141-50.
- Kyte J, Doolittle RF.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982 ; 157(1) : 105-32.
- Lai CL, Ahn SH, Lee KS, Um SH, Cho M, Yoon SK, et al.** Phase IIb multicentred randomised trial of besifovir (LB80380) versus entecavir in Asian patients with chronic hepatitis B. *Gut.* **2014** ; 63 : 996–1004.
- Lai MW, Liang KH, Lin WR, Huang YH, Huang SF, Chen TC et al.** Hepatocarcinogenesis in transgenic mice carrying hepatitis B virus pre-S/S gene with the sW172* mutation. *Oncogenesis* **2016** ; 5(12): e273.
- Lam AM, Ren S, Espiritu C, Kelly M, Lau V, Zheng L, Hartman GD, Flores OA, Klumpp K.** HBV Capsid Assembly Modulators, but not Nucleoside Analogs, Inhibit the Production of Extracellular Pregenomic RNA and Spliced RNA Variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017** ; pii: AAC.00680-17.
- Lanford RE, Wooddell C I, Chavez D, Oropeza C, Chu Q, Hamilton H et al.** Arc-520 Rnai therapeutic reduces hepatitis B virus Dna, S antigen and e antigen in a chimpanzee with a very high viral titer. *Hepatology* **2013** ; 58 : 707A.
- Lauck M, Alvarado-Mora MV, Becker EA, Bhattacharya D, Striker R, Hughes AL, et al.** Analysis of hepatitis C virus intrahost diversity across the coding region by ultradeep pyrosequencing. *J. Virol.* **2012** ; 86(7) : 3952-60

- Lazarevic**, I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations : Recent advances. *World J. Gastroenterology* **2014** ; 20(24): 7653-7664.
- Lee SA**, Kim H, Won YS, Seok SH, Na Y, Shin HB, *et al.* Male-specific hepatitis B virus large surface protein variant W4P potentiates tumorigenicity and induces gender disparity. *Mol. Cancer* **2015a** ; 3 : 14:23.
- Lee SA**, Kim KJ, Kim DW, Kim BJ. Male-Specific W4P/R Mutation in the Pre-S1 Region of Hepatitis B Virus, Increasing the Risk of Progression of Liver Diseases in Chronic Patients. *J. Clin. Microbiol.* **2013** ; 51(12): 3928–3936.
- Lee SA**, Kim KJ, Kim H, Choi WH, Won YS, Kim BJ. Hepatitis B virus preS1 deletion is related to viral replication increase and disease progression. *World J. Gastroenterol.* **2015b** ; 21 (16) : 5039–5048.
- Leistner CM**, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell. Microbiol.* **2008** ; 10 : 122–133.
- Lempp FA**, **Urban S.** Inhibitors of Hepatitis B Virus Attachment and Entry. *Intervirology* **2014** ; 57 : 151–157.
- Lempp FA**, Wiedtke E, Qu B, Roques P, Chemin I, Vondran FW, *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of Hepatitis B Virus infection in macaque and pig hepatocytes. *Hepatology* **2017** [Epub ahead of print].
- Leong J**, Lin D, Nguyen MH. Hepatitis B surface antigen escape mutations: indications for initiation of antiviral therapy revisited. *World J. Clin. Cases* **2016** ; 4 (3) : 71–75.
- Lepère-Douard C**, **Gripon P.** Entrée du virus de l'hépatite B. *Virologie* **2010** ; 14 (4) : 269-284.
- Levero M**, Testoni B, Zoulim F. HBV cure: why, how, when? *Curr. Opin; Virol.* **2016** ; 18 : 135-43.
- Levero M**, **Zucman-Rossi J.** Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **2016** ; 64(1 Suppl) : S84-101.
- Li H**, Sheng C, Wang S, Yang L, Liang Y, Huang Y, *et al.* Removal of Integrated Hepatitis B Virus DNA Using CRISPR-Cas9. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017b** ; 7 : 91.
- Li N**, Zhang P, Yang C, Zhu Q, Li Z, Li F, *et al.* Association of genetic variation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide with chronic hepatitis B virus infection. *Genet. Test Mol. Biomarkers* **2014** ; 18(6) : 425-9.
- Li MH**, Zhang L, Qu XJ, Lu Y, Shen G, Wu SL, *et al.* Kinetics of hepatitis b surface antigen level in chronic hepatitis b patients who achieved hepatitis B surface antigen loss during pegylated interferon alpha-2a treatment. *Chin. Med. J. (Engl).* **2017c** ; 130(5) : 559–565.
- Li W**, **S. Urban S.** Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: basic insights and clinical implications. *J. Hepatol.* **2016** ; 64(1 Suppl) : S32-40.
- Li X**, Zhao J, Yuan Q, Xia N. Detection of HBV Covalently Closed Circular DNA. *Viruses* **2017a**; 9(6) : pii: E139.
- Li YJ**, Wang HL, Li TS. Hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection: interaction among human immunodeficiency virus infection, chronic hepatitis B virus infection, and host immunity. *Chin. Med. J. (Engl)* **2012** ; 125(13) : 2371-7.
- Li YW**, Yang FC, Lu HQ, Zhang JS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface protein. *World J. Gastroenterol.* **2016** ; 22(6) : 1943-52.
- Liao FT**, Lee YJ, Ko JL, Tsai CC, Tseng CJ, Sheu GT. Hepatitis delta virus epigenetically enhances clusterin expression via histone acetylation in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Gen. Virol.* **2009** ; 90(Pt 5) : 1124-34.
- Liao Y**, Hu X, Chen J, Cai B, Tang J, Ying B, *et al.* Precore mutation of hepatitis B virus may contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *PLOS ONE* **2012** ; 7(6): e38394.

- Lin CL, Kao JH.** The clinical implications of hepatitis B virus genotype : Recent advances. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **2011** ; 26: 123-130.
- Lin CL, Kao JH.** Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring. Harb. Perspect. Med.* **2015** ; 5(5): a021436.
- Lin CL, Kao JH.** Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2017** ; [Epub ahead of print].
- Lin CM, Wang GM, Jow GM, Chen BF.** Functional analysis of hepatitis B virus preS deletion variants associated with hepatocellular carcinoma. *J. Biomed. Sci.* **2012** ; 19 : 17.
- Lin YM, Jow GM, Mu SC, Chen BF.** Naturally occurring hepatitis B virus B-cell and T-cell epitope mutants in hepatitis B vaccinated children. *Scientific World Journal* ; **2013** : 571875.
- Littlejohn M, Locarnini S, Yuen L.** Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* **2016** ; 6(1) : a021360.
- Liu C, Chang L, Jia T, Guo F, Zhang L, Ji H, Zhao J, Wang L.** Real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA quantification may require two different targets. *Viol. J.* **2017** ; 14(1) : 94.
- Liu X, Hao R, Chen S, Guo D, Chen Y.** Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome. *J. Gen. Virol.* **2015**; 96:2252–2261.
- Liu Y, Zhang L, Zhou JY, Pan J, Hu W, Zhou YH.** Clinical and virological characteristics of chronic hepatitis B patients with coexistence of HBsAg and Anti-HBs. *PLOS ONE* **2016** ; 11(1): e0146980.
- Liu Z, Dai X, Wang T, Zhang C, Zhang W, Zhang W, et al.** Hepatitis B virus PreS1 facilitates hepatocellular carcinoma development by promoting appearance and self-renewal of liver cancer stem cells. *Cancer Lett.* **2017** ; 400 : 149-160.
- Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L.** Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin. Cancer Biol.* **2013** ; 23(6 Pt B) : 561-75.
- Locarnini SA, Yuen L.** Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antiviral Therapy* **2010** ; 15: 451-461.
- Loustaud-Ratti V, Wagner A, Carrier P, Marczuk V, Chemin I, Lunel F, et al.** Distribution of total DNA and cccDNA in serum and PBMCs may reflect the HBV immune status in HBsAg+ and HBsAg- patients coinfecting or not with HIV or HCV. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2013** ; 37(4) : 373-83.
- Lucifora J, Esser K, Protzer U.** Ezetimibe blocks hepatitis B virus infection after virus uptake into hepatocytes. *Antiviral Res.* **2013** ; 97 : 195–197.
- Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Stadler D, Heikenwalder M, Protzer U.** Specific degradation of nuclear hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Med. Sci. (Paris)* **2014** ; 30(8-9) : 724-6.
- Lurman A.** Eine icterus epidemic. *Berl. Klin. Wochenschr.* **1885** ; 22 : 20–3.
- Maasoumy B, Wiegand SB, Jaroszewicz J, Bremer B, Lehmann P, Deterding K, et al.** Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) levels in the natural history of hepatitis B virus infection in a large European cohort predominantly infected with genotypes A and D. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015** ; 21(6) : 606.e1-10.
- Macovei A, Petrareanu C, Lazar C, Florian P, Branza-Nichita N.** Regulation of hepatitis B virus infection by Rab5, Rab7, and the endolysosomal compartment. *J. Virol.* **2013** ; 87 : 6415-27.
- Macovei A, Radulescu C, Lazar C, Petrescu S, Durantel D, Dwek RA, et al.** Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J. Virol.* **2010** ; 84 : 243-53.
- Madalinski K, Sylvan SP, Hellstrom U, Mikołajewicz J, Dzierzanowska-Fangrat K.** Presence of anti-preS1, anti-preS2, and anti-HBs antibodies in newborns immunized with Bio-Hep-B vaccine. *Med. Sci; Monit.* **2004** ; 10(1) : P110-7.

- Madigan M, Martinko J.** Brock : Biologie des micro-organismes. *Pearson Education Inc. France.* **2017** ; 11ème éditions. Chap : 9, 22, 24 et 26.
- Maini MK, Gehring AJ.** The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection. *J. Hepatol.* **2016** ; 64(1 Suppl) : S60-70.
- Mallet V, Hamed K, Schwarzing M.** Prognosis of patients with chronic hepatitis B in France (**2008-2013**): A nationwide, observational and hospital-based study. *J. Hepatol.* **2017** ; 66 : 514-520.
- Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Gane E, de Man RA, Krastev Z, et al.** Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **2008** ; 359(23) : 2442–2455.
- Marvie P, Lisbonne M, L'helgoual'c'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al.** Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J. Cell. Mol. Med.* **2010** ; 14 : 1726-1739.
- Mathet VL, Feld M, Espinola L, Sanchez DO, Ruiz V, Mando O, et al.** Hepatitis B Virus S Gene Mutants in a Patient With Chronic Active Hepatitis With Circulating Anti-HBs Antibodies. *Journal of Medical Virology* **2003** ; 69 : 18-26.
- Matsuoka M, Tsukamoto H.** Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* **1990** ; 11 : 599-605.
- Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, et al.** Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J. Clin. Microbiol.* **2009** ; 47: 1476–1483.
- Matsuzaki T, Tatsuki I, Otani M, Akiyama M, Ozawa E, Miuma S, et al.** Significance of hepatitis B virus core-related antigen and covalently closed circular DNA levels as markers of hepatitis B virus re-infection after liver transplantation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013** ; 28(7) : 1217-22.
- Mayerat C, Mantegani A, Frei PC.** Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J. Viral Hepat.* **1999** ; 6: 299–304.
- Mehdi H, Kaplan MJ, Anlar FY, Yang X, Bayer R, Sutherland K, et al.** Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J. Virol.* **1994** ; 68 : 2415–24.
- Mohamed S, Penaranda G, Gonzalez D, Camus C, Khiri H, Boulmé R, et al.** Clinical impact of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on HIV-1 drug resistance genotype interpretation after virological failure. *BMC Infectious Diseases* **2014b**; 14(2) : O1.
- Mohamed S, Penaranda G, Gonzalez D, Camus C, Khiri H, Boulmé R, et al.** Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure. *AIDS* **2014a** ; 28(9) : 1315-24.
- Momméja-Marin H, Zylberberg H Pol S.** Vaccination prophylactique contre l'hépatite B : actualité et avenir. *Gastroentero. Clin. Bio.* **2011** ; 23 : 452-463.
- Mondal RK, Khatun M, Ghosh S, Banerjee P, Datta S, Sarkar S, et al.** Immune-driven adaptation of hepatitis B virus genotype D involves preferential alteration in B-cell epitopes and replicative attenuation-an insight from human immunodeficiency virus/hepatitis B virus coinfection. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015** ; 21 : 710.e11-20.
- Morikawa K, Suda G, Sakamoto N.** Viral life cycle of hepatitis B virus: host factors and druggable targets. *Hepatology Research* **2016** ; 46 : 871–877.
- Mu D, Yan L, Tang H, Liao Y.** A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system. *Biotechnol. Lett.* **2015** ; 37(10) : 2063-73.

Mulders MN, Venard V, Njayou M, Edorh AP, Bola Oyefolu AO, Kehinde MO, et al. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J. Infect; Dis.* **2004** ; 190(2) : 400-8.

Murphy CM, Xu Y, Li F, Nio K, Reszka-Blanco N, Li X, et al. Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell. Rep.* **2016** ; 16(11) : 2846-54.

Neurath AR, Strick N, Sproul P. Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J. Exp. Med.* **1992** ; 175 : 461-9.

Neurath AR, Strick N. Antigenic mimicry of an immunoglobulin A epitope by a hepatitis B virus cell attachment site. *Virology* **1990** ; 178 : 631-4.

Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, et al. Hepatitis B and D *Viruses* exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* **2014** ; 146(4) : 1070-83.

Odemuyiwa SO, Mulders MN, Oyedele OI, Ola SO, Odaibo GN, Olaleye DO, et al. 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.

Oehler N, Volz T, Bhadra OD, Kah J, Allweiss L, Giersch K, et al. Binding of hepatitis B virus to its cellular receptor alters the expression profile of genes of bile acid metabolism. *Hepatology* **2014** ; 60(5) : 1483-1493.

Ogawa T, Kawada N, Ikeda K. Effect of natural interferon α on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *Hepatol. Int.* **2009** ; 3 : 497-503.

OMS 2016a. Organisation Mondiale de la Santé « Hépatite D, Aide-mémoire » [en ligne] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/hepatitis-d/fr/>, consulté le 10/07/2017.

OMS 2016b. Organisation Mondiale de la Santé « VIH/sida, Aide-mémoire N°306 » [en ligne] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/fr/>, consulté le 10/07/2017.

OMS 2017. Organisation Mondiale de la Santé « Hépatite B, Aide-mémoire N°204 » [en ligne] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/fr/>, consulté le 10/07/2017.

Papastergiou V, Lombardi R, MacDonald D, Tsochatzis EA. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. *Curr. Hepatology Rep.* **2015** ; 14 : 171-178.

Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SY, Belshaw R, Allain JP, et al. Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology* **2013** ; 57 : 908-16.

Parker JM, 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, Hourieux C, Roingeard P. Morphogénèse du virus de l'hépatite B. *Virologie* **2008** ; 12(6) : 453-64.

Pei Y, Wang C, Yan SF, Liu G. Past, Current, and Future Developments of Therapeutic Agents for Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J. Med. Chem.* **2017** [Epub ahead of print]

Pena J, Chen-Harris H, Allen JE, Hwang M, Elsheikh M, Mabery S, et al. Sendai virus intra-host population dynamics and host immunocompetence influence viral virulence during *in vivo* passage. *Virus Evol.* **2016** ; 2(1) : vew008.

Petersen J, Thompson AJ, Levrero M. Aiming for cure in HBV and HDV infection. *J. Hepatol.* **2016** ; 65(4) : 835-48.

Pezzano SC, Torres C, Fainboim HA, Bouzas MB, Schroder T, Giuliano SF, et al. Hepatitis B virus in Buenos Aires, Argentina: Genotypes, virological characteristics and clinical outcomes. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011** ; 17: 223-231.

- Piroth L, Pol S, Mialhes P, Lacombe K, Lopes A, Fillion A et al.** Therapeutic management and evolution of chronic hepatitis B: does HIV still have an impact? The EPIB **2012** study. *Liver Int.* **2015** ; 35 : 1950-8.
- Pniewski T, Czyż M, Wyrwa K, Bociąg P, Krajewski P, Kapusta J.** Micropropagation of transgenic lettuce containing HBsAg as a method of mass-scale production of standardised plant material for biofarming purposes. *Plant. Cell. Rep.* **2017** ; 36(1) : 49-60.
- Pol S.** Épidémiologie et histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B. *Hépatogastro.* **2007** ; 14 : numéro spécial.
- Pollicino T, Cacciola I, Saffiotti F, Raimondo G.** Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *J. Hepatol.* **2014** ; 61(2): 408-17.
- Pontisso P, Ruvoletto MG, Tiribelli G, Gerlich WH, Ruol A, Alberti A.** The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *J. Gen. Virol.* **1992** ; 73 : 2041-5.
- Pourkarim MR, Sharifi Z, Soleimani A, Amini-Bavil-Olyae S, Dek Fakhr AE, Sijmons S, et al.** Evolutionary Analysis of HBV "S" Antigen Genetic Diversity in Iranian Blood Donors: A Nationwide Study. *Journal of Medical Virology* **2014** ; 86: 144-155.
- Rajbhandari R, Jun T, Khalili H, Chung RT, Ananthkrishnan AN.** HBV/HIV coinfection is associated with poorer outcomes in hospitalized patients with HBV or HIV. *J. Viral Hepat.* **2016** ; 23 : 820-9.
- Ramezani A, Banifazl M, Mohraz M, Rasoolinejad M, Aghakhani A.** Occult hepatitis B virus infection: A major concern in HIV-infected patients: Occult HBV in HIV. *Hepat.* **2011** ; 11(1) : 7-10.
- Ramezani F, Norouzi M, Sarizade GR, Poortahmasebi V, Kalantar E, Magnus L, et al.** Mutation hot spots in hepatitis B surface antigen in chronic carriers from Khozestan province, southern of Iran. *Iran J. Allergy Asthma. Immunol.* **2013** ; 12(3): 269-75.
- Ramirez C, Gregori J, Buti M, Tabernero D, Camos S, Casillas R, et al.** A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection model. *Antiviral Research* **2013** ; 98 : 273-283.
- Rao HY, Wei L, Wang JH, Fei R, Jiang D, Zhang Q, et al.** Inhibitory effect of human interferon-beta-1a on activated rat and human hepatic stellate cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2010** ; 25 : 1777-1784.
- Rehermann B.** Natural Killer Cells in Viral Hepatitis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2015** ; 1(6) : 578-588.
- Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG.** Delta antigen: The association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and ribonucleic acids in the serum of delta infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980** ; 77 : 6124-6128.
- Rizzetto M.** Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* **2015** ; 5(7) : a021576.
- Roggendorf M, Kosinska AD, Liu J, Lu M.** The Woodchuck, a Nonprimate Model for Immunopathogenesis and Therapeutic Immunomodulation in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* **2015** 28 ; 5(12).
- Roman S, Tanaka Y, Khan A, Kurbanov F, Kato H, Mizokami M, et al.** Occult hepatitis B in the genotype H-infected Nahuas and Huichol native Mexican population. *J. Med. Virol.* **2010** ; 82: 1527-1536.
- Saayman S, Ali SA, Morris KV, Weinberg MS.** The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015** ; 15(6) : 819-30.
- Sakurai F, Mitani S, Yamamoto T, Takayama K, Tachibana M, Watashi K, et al.** Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an *in vitro* model of human hepatitis B virus infection. *Sci; Rep.* **2017** ; 7 : 45698.

Salpini R, Surdo M, Warner N, Cortese MF, Colledge D, Soppe S, *et al.* Novel HBsAg mutations correlate with hepatocellular carcinoma, hamper HBsAg secretion and promote cell proliferation *in vitro*. *Oncotarget* **2017** ; 8(9) : 15704-15715.

Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* **2002** ; 123 : 1848-1856.

Sandhu P, Haque M, Humphries-Bickley T, Ravi S, Song J. Hepatitis B Virus Immunopathology, Model Systems, and Current Therapies. *Front. Immunol.* **2017** ; 8 : 436.

Scholtes C, Icard V, Amiri M, Chevallier-Queyron P, Trabaud MA, Ramière C, *et al.* 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, Mills K, Weiss TS, Urban S. Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* **2012** ; 55(2) : 373-383.

Scott LJ, **Chan HLY**. Tenofovir Alafenamide: A Review in Chronic Hepatitis B. *Drugs* **2017** ; 77(9) : 1017-1028.

Seeger C, **Mason WS**. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000** ; 64 (1) : 51-68.

Seo SI, Choi HS, Choi BY, Kim HS, Kim HY, Jang MK. Coexistence of Hepatitis B Surface Antigen and Antibody to Hepatitis B Surface May Increase the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B Virus Infection: A Retrospective Cohort Study. *Journal of Medical Virology* **2014** ; 86, 124–130.

Serigado JM, Izzy M, Kalia H. Novel therapies and potential therapeutic targets in the management of chronic hepatitis B. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017** [Epub ahead of print].

Servant-Delmas A, Mercier M, Girault A, Laperche S. Impact clinique, thérapeutique et diagnostique de la diversité génétique du virus de l'hépatite B. *Virologie* **2007** ; 11 (4): 297-307.

Shan M, Shen Z, Sun H, Zheng J, Zhang M. The enrichment of HBV immune-escape mutations during nucleoside/nucleotide analogue therapy. *Antivir. Ther.* **2017** ; [Epub ahead of print].

Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, *et al.* Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect. Genet. Evol.* **2013** ; 16: 355-361.

Shirvani-Dastgerdi E, **Tacke F**. Molecular interactions between hepatitis B virus and delta virus. *World J. Virol.* **2015** ; 4(2) : 36-41.

Shouval D, Roggendorf H, Roggendorf M. Enhanced immune response to hepatitis B vaccination through immunization with a Pre-S1/Pre-S2/S vaccine. *Med. Microbiol. Immunol.* **2015** ; 204(1) : 57-68.

Simmonds P, **Midgley S**. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. *J. Virol.* **2005** ; 79: 15467–15476.

Simon B, Kundi M, Puchhammer E. Analysis of Mutations in the S Gene of Hepatitis B Virus Strains in Patients with Chronic Infection by Online Bioinformatics Tools. *Journal of Clinical Microbiology* **2013** ; 51(1): 163-168.

Skelton M, Kew MC, Kramvis A. Distinct mutant hepatitis B virus genomes, with alterations in all four open reading frames, in a single South African hepatocellular carcinoma patient. *Virus Res.* **2012** ; 163 : 59-65.

Sohn JA, Litwin S, Seeger C. Mechanism for cccDNA Synthesis in HepadnaViruses. *PLOS ONE* **2009** ; 4(11) : e8093.

Somiya M, Liu Q, Yoshimoto N, Iijima M, Tatematsu K, Nakau T, *et al.* Cellular uptake of hepatitis B virus envelope L particles is independent of sodium taurocholate cotransporting polypeptide, but dependent on heparan sulfate proteoglycan. *Virology* **2016** ; 497 : 23-32.

- Song G**, Yang R, Rao H, Feng B, Ma H, Jin Q, Wei L. Serum HBV core-related antigen is a good predictor for spontaneous HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B patients. *J. Med. Virol.* **2017** ; 89(3) : 463-468.
- Song JE**, Kim DY. Diagnosis of hepatitis B. *Ann. Transl. Med.* **2016** ; 4(18) : 338.
- Stefas I**, Rucheton M, D'Angeac AD, Morel-Baccard C, Seigneurin JM, Zarski JP, *et al.* Hepatitis B virus Dane particles bind to human plasma apolipoprotein H. *Hepatology* **2001** ; 33 : 207–17.
- Steuer HM**, Daffis S, Lehar SM, Palazzo A, Tharinger H, Frey C, *et al.* Functional activation of NK and CD8⁺ T cells *in vitro* by the toll-like receptor 7 agonist GS-9620. *Hepatology*, **2015** ; 62 : 1187A.
- Stoeckl L**, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B, Oess S, Will H, *et al.* Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B Viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006** ; 103 : 6730-4.
- Strick-Marchand H**, Dusséaux M, Darche S, Huntington ND, Legrand N, Masse-Ranson G, *et al.* A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes. *PLOS ONE* **2015** ; 10(3) : e0119820.
- Su JJ**, Wang LH, Hsieh WC, Wu HC, Teng CF, Tsai HW, Huang W. The emerging role of hepatitis B virus pre-S2 deletion mutant proteins in HBV tumorigenesis. *J. Biomed. Sci.* **2014** ; 21:98.
- Su M**, Xiang K, Li Y, Li Y, Deng J, Xu X, *et al.* Higher detection rates of amino acid substitutions in HBV reverse transcriptase/surface protein overlapping sequence is correlated with low serum HBV DNA and HBsAg levels in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with subgenotype B2. *Infection, Genetics and Evolution* **2016** ; 40: 275-281.
- Sun HY**, Sheng WH, Tsai MS, Lee KY, Chang SY, Hung CC. Hepatitis B virus coinfection in human immunodeficiency virus-infected patients: a review. *World J. Gastroenterol.* **2014** ; 20(40) : 14598-614.
- Sunbul M**. Hepatitis B virus genotypes : Global distribution and clinical importance. *World J. Gastroenterol.* **2014** ; 20 (18): 5427-5434.
- Sung JJY**, Tsui SKW, Tse CH, Ng EYT, Leung KS, Lee KH, *et al.* 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**, Guerra B, Lanford RE. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J. Virol.* **1993** ; 67(1) : 366-72.
- Sureau C**, Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* **2016** ; 64(1 Suppl) : S102-16.
- Sureau C**, Salisse J. A Conformational Heparan Sulfate Binding Site Essential to Infectivity Overlaps with the Conserved Hepatitis B Virus a-Determinant. *Hepatology* **2013** ; 57(3) : 985-94.
- Suzuki F**, Miyakoshi H, Kobayashi M, Kumada H. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients. *J. Med. Virol.* **2009** ; 81(1) : 27-33.
- Svicher V**, Cento V, Bernassola M, Neumann-Fraune M, Van Hemert F, Chen M, *et al.* Novel HBsAg markers tightly correlate with occult HBV infection and strongly affect HBsAg detection. *Antiviral Res.* **2012** ; 93: 86-93.
- Taffon S**, Genovese D, Blasi M, Pierotti P, Degli Esposti A, Catone S, Chionne P, Pulimanti B, Candido A, Dettori S, *et al.* HBV whole-genome mutation profile in HIV-1/HBV coinfecting patients in a long-term follow-up study. *Infection* **2014** ; 42 : 675–687.
- Tajiri K**, Ozawa T, Jin A Tokimitsu Y, Minemura M, Kishi H, Sugiyama T *et al.* Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. *Antivir. Res.* **2010** ; 87 : 40-9.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013** ; 30 : 2725-9.

Tang YZ, Liu L, Pan MM, Wang YM, Deng GH. Evolutionary pattern of full hepatitis B virus genome during sequential nucleos(t)ide analog therapy. *Antiviral Res.* **2011** ; 90(3): 116-25.

Taylor JM. Host RNA circles and the origin of hepatitis delta virus. *World J. Gastroenterol.* **2014** ; 20(11) : 2971-8.

Thibault V, Servant-Delmas A, Ly TD, Roque-Afonso AM, Laperche S. Performance of HBsAg quantification assays for detection of Hepatitis B virus genotypes and diagnostic escape-variants in clinical samples. *J. Clin. Virol.* **2017** ; 89 : 14-21.

Toh ST, Jin Y, Liu L, Wang J, Babrzadeh F, Gharizadeh B, *et al.* Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations. *Carcinogenesis* **2013** ; 34: 787-798.

Tong S, **Revill** P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J. Hepatol.* **2016** ; 64(1 Suppl) : S4-16.

Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgtton K, Zhuang H, Locarnini SA, *et al.* Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* **2002**; 293: 305-313.

Trabaud MA, Icard V, Ramière C, Tardy JC, Sccholtes C, André P. Comparaison of HIV-1 drug-resistance genotyping by Ultra-Deep Sequencing and Sanger sequencing using clinical samples. *J. Med. Virol.* **2017** [Epub ahead of print].

Treichel U, Meyer zum Buschenfelde KH, Stockert RJ, Poralla T, Gerken G. The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J. Gen. Virol.* **1994** ; 75 : 3021–9.

Tsukiyama-Kohara K, **Kohara** M. Tupaia belangeri as an experimental animal model for viral infection. *Exp. Anim.* **2014** ; 63(4) : 367-74.

Tuteja A, Siddiqui AB, Madan K, Goyal R, Shalimar, Sreenivas V, *et al.* Mutation Profiling of the Hepatitis B Virus Strains Circulating in North Indian Population. *PLOS ONE* **2014** ; 9(3): 1-12.

Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV into Hepatocytes. *Gastroenterology* **2014** ; 147(1) : 48-64.

Urban S., Schulze A., Dandri M., Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **2010** ; 52(2) : 282-4.

Urone N, Di Marco V, Cacopardo B, Craxì A, Ferraro D. Impact of HBV genotypes A and D genetic variability on infection evolution. *Infect. Genet. Evol.* **2015** ; 33: 281-7.

van Bömmel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Krüger DH, Berg T, *et al.* Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology* **2015** ; 61(1) : 66-76.

Velay A, Jeulin H, Eschlimann M, Malvé B, Goehringer F, Bensenane M, *et al.* Characterization of hepatitis B virus surface antigen variability 289 and impact on HBs antigen clearance under nucleos(t)ide analogue therapy. *J. Viral. Hepat.* **2016** ; 23 : 387-98.

Velay A. 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 de doctorat en Sciences de la vie et de la santé **2015**.

Velu V, Nandakumar S, Shanmugam S, Jadhav SS, Kulkarni PS, Thyagarajan SP. Comparison of three different recombinant hepatitis B vaccines: GeneVac-B, Engerix B and Shanvac B in high risk infants born to HBsAg positive mothers in India. *World J. Gastroenterol.* **2017** ; 13(22) : 3084-9.

Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, *et al.* 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.

Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, Li Y, Wang SS, Torok NJ, *et al.* Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2010** ; 298 : G101-G106.

Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, Heydmann L, Weiss A, Renaud M, *et al.* A targeted functional RNAi screen uncovers Glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D *Viruses*. *Hepatology*, **2016a** ; 63(1) : 38-48.

Verrier ER, Colpitts CC, Schuster C, Zeisel MB, Baumert TF. Cell culture models for the investigation of hepatitis B and D virus infection. *Viruses* **2016c** ; 8 : 261.

Verrier ER, Colpitts CC, Sureau C, Baumert TF. Hepatitis B virus receptors and molecular drug targets. *Hepatol. Int.* **2016b** ; 10(4) : 567-73.

Villet S, Billioud G, Pichoud C, Lucifora J, Hantz O, Sureau C, *et al.* *In vitro* characterization of viral fitness of therapy resistant HBV. *Gastroenterology*. **2009** ; 136 : 168-76.

Volz T, Allweiss L, Ben MBarek M, Warlich M, Lohse AW, Pollok JM, *et al.* The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **2013** ; 58(5) : 861-7.

Von Heijne G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **1992** ; 8 : 249-254.

von Weizsacker F, Kock J, MacNelly S, Ren S, Blum HE, Nassal M. The tupaia model for the study of hepatitis B virus: direct infection and HBV genome transduction of primary tupaia hepatocytes. *Methods Mol. Med.* **2004** ; 96 : 153-61.

Wang B, Li W, Guo K, Xiao Y, Wang Y, Fan J. miR-181b promotes hepatic stellate cells proliferation by targeting p27 and is elevated in the serum of cirrhosis patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012a** ; 421 : 4-8.

Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, *et al.* Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J. Hepatol.* **2016** ; 65(4) : 700-10.

Wang ML, **Tang H**. Nucleos(t)ide analogues causes HBV S gene mutations and carcinogenesis. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2016** ; 15(6): 579-586.

Wang M, Xi D, Ning Q. Virus-induced hepatocellular carcinoma with special emphasis on HBV. *Hepatol. Int.* **2017** ; 11(2) : 171-180.

Wang XY, Wei ZM, Wu GY, Wang JH, Zhang YJ, Li J *et al.* *In vitro* inhibition of HBV replication by a novel compound, GLS4, and its efficacy against adefovir-dipivoxil-resistant HBV mutations. *Antivir. Ther.* **2012b** ; 17(5) : 793-803.

Wang Y, Shan X, Liang Z, Shan Y, Huang W, Zhang D, *et al.* Deep sequencing analysis of HBV genotype shift and correlation with antiviral efficiency during adefovir dipivoxil therapy. *PLOS ONE* **2015** ; 10: e0131337.

Wargo AR, **Kurath G**. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. *Curr. Opin. Virol.* **2012** ; 2(5): 538-45.

Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M, Kim S, Ahlquist P. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007** ; 104 : 10205-10210.

- Watashi K**, Urban S, Li W, Wakita T. NTCP and Beyond opening the door to unveil Hepatitis B entry. *Int. J. Mol. Sci.* **2014** ; 15 : 2892-2905.
- Watashi K**. HBV slow maturation process leads to infection. *Trends Microbiol.* **2016** ; 24(8) : 597-9.
- Weber B**. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* **2005** ; 32(2): 102-12.
- Weber O**, Schlemmer KH, Hartmann E, Hagelschuer I, Paessens A, Graef E, *et al.* Inhibition of human hepatitis B virus (HBV) by a novel non-nucleosidic compound in a transgenic mouse model. *Antiviral Res.* **2002** ; 54(2) : 69-78.
- Wei F**, Zheng Q, Li M, Wu M. The association between hepatitis B mutants and hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **2017** ; 96(19): e6835.
- Wei Y**, Ganem D. Activation of heterologous gene expression by the large isoform of hepatitis delta antigen. *J. Virol.* **1998** ; 72(3) : 2089-96.
- Wei Y**, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol. Biol. (Paris)* **2010** ; 58(4) : 267-72.
- Welling GW**, Weijer WJ, van der Zee R, Welling-Wester S. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* **1985** ; 188(2) : 215-8.
- Wilkins T**, Zimmerman D, Schade RR. Hepatitis B: diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician* **2010** ; 81(8) : 965-72.
- Williams V**, Brichler S, Radjef N, Lebon P, Goffard A, Hober D, *et al.* Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J. Gen. Virol.* **2009** ; 90(Pt 11) : 2759-67.
- Wilson EM**, Tang L, Kottlil S. Eradication Strategies for Chronic Hepatitis B Infection. *Clin. Infect. Dis.* **2016** ; 62 (Suppl 4) : S318-25.
- Wu C**, Deng W, Deng L, Cao L, Qin B, Li S *et al.* Amino Acid Substitutions at Positions 122 and 145 of Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Determine the Antigenicity and Immunogenicity of HBsAg and Influence *In vivo* HBsAg Clearance. *Journal of Virology* **2012** ; 86(8) : 4658-4669.
- Wu C**, Zhang X, Tian Y, Song J, Yang D, Roggendorf M, *et al.* Biological significance of amino acid substitutions in hepatitis B surface antigen (HBsAg) for glycosylation, secretion, antigenicity and immunogenicity of HBsAg and hepatitis B virus replication. *Journal of General Virology* **2010** ; 91 : 483-492.
- Wu GY**, Zheng XJ, Yin CC, Jiang D, Zhu L, Liu Y, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication by Bay 41-4109 and its association with nucleocapsid disassembly. *J. Chemother.* **2008** ; 20(4) : 458-67.
- Wu S**, Yan P, Yang T, Wang Z, Yan Y. Epidemiological profile and risk factors of HIV and HBV/HCV co-infection in Fujian Province, southeastern China. *J. Med. Virol.* **2017** ; 89(3) : 443-449.
- Xia Y**, Stadler D, Ko C, Protzer U. Analyses of HBV cccDNA Quantification and Modification. *Methods Mol. Biol.* **2017** ; 1540 : 59-72.
- Xiang KH**, Zhao CY, Li Y, Su MZ, Wang QY, Deng J, *et al.* Impacts of HBV rtH55R polymerase substitution on viral replication and rtM204I/V resistance to nucleoside/nucleotide antiviral drugs. *Antivir. Ther.* **2017**, [Epub ahead of print].
- Xiao F**, McKeating JA, Baumert TF. A bile acid transporter as a candidate receptor for hepatitis B and D virus entry. *J. Hepatol.* **2013** ; 58(6) : 1246-8.
- 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.

Xu H, Zhao M, Lou G, Zheng M, Cao Q, Chen Z. New point mutations in surface and core genes of hepatitis B virus associated with acute on chronic liver failure identified by complete genomic sequencing. *PLOS ONE* **2015** ; 10(4): e0123139.

Xue Y, Wang MJ, Yang ZT, Yu DM, Han Y, Huang D, et al. Clinical features and viral quasispecies characteristics associated with infection by the hepatitis B virus G145R immune escape mutant. *Emerging Microbes & Infections* **2017** ; 6: e15.

Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **2012** ; 1 : e00049.

Yano Y, Azuma T, Hayashi Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J. Hepatol.* **2015** ; 7(3): 583-92.

Yu DM, Li XH, Mom V, Lu ZH, Liao XW, Han Y, et al. N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape. *J. Hepatol.* **2014**; 60: 515-22.

Yuen M F, Kim D J, Weilert F, Chan HLY, Lalezari JP, Hwang SG, et al. Phase 1b efficacy and safety of NVR 3-778, a first-in-class HBV core inhibitor, in HBeAg-positive patients with chronic HBV infection. *Hepatology*, **2015** ; 62(6) : 1385A-1386A.

Yuen MF, Kim J, Kim CR, Ngai V, Yuen JC, Min C, et al. A randomized placebo-controlled, dose-finding study of oral LB80380 in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B. *Antivir. Ther.* **2006** ; 11 : 977–983.

Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Sorrentino C, Lo Presti A, Tanzi E, Ciccozzi M, Galli M. Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient travelling companion or a recent encounter? *World J. Gastroenterol.* **2014** ; 20(24) : 7622-34.

Zehender G, Svicher V, Gabanelli E, Ebranati E, Veo C, Lo Presti A, et al. Reliable timescale inference of HBV genotype A origin and phylodynamics. *Infect. Genet. Evol.* **2015** ; 32 : 361-9.

Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, Sureau C, Beck J, Levrero M, et al. Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions--report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut.* **2015** ; 64(8) : 1314-26.

Zhang AH, Lai CL, Huang FY, Seto WK, Fung J, Wong DKH, et al. Deep sequencing analysis of quasispecies in the HBV pre-S region and its association with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* **2017b** [Epub ahead of print].

Zhang E, Zhang X, Liu J, Wang B, Tian Y, Kosinska AD, et al. The expression of PD-1 ligands and their involvement in regulation of T cell functions in acute and chronic woodchuck hepatitis virus infection. *PLOS ONE* **2011** ; 6(10) : e26196.

Zhang F, Tang X, Garcia T, Lok AS, Wang Y, Jia H, et al. Characterization of contrasting features between hepatitis B virus genotype A and genotype D in small envelope protein expression and surface antigen secretion. *Virology* **2017a** ; 503: 52-61.

Zhang M, Ge G, Yang Y, Cai X, Fu Q, Cai J, et al. Decreased antigenicity profiles of immune-escaped and drug-resistant hepatitis B surface antigen (HBsAg) double mutants. *Virology Journal* **2013** ; 10: 292-300.

Zhang TY, Yuan Q, Zhao JH, Zhang YL, Yuan LZ, Lan Y, et al. Prolonged suppression of HBV in mice by a novel antibody that targets a unique epitope on hepatitis B surface antigen. *Gut.* **2016b** ; 65(4) : 658-71.

Zhang Z, Gao Z, Hu W, Yin S, Wang C, Zang Y, Chen J, Zhang J, Dong L. 3,3'-Diindolylmethane ameliorates experimental hepatic fibrosis via inhibiting miR-21 expression. *Br. J. Pharmacol.* **2013** ; 170 : 649-660.

Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, Li X, Li J, Lu MJ. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **2016a** ; 22: 126-44.

Zhao ZM, Jin Y, Gan Y, Zhu Y, Chen TY, Wang JB, et al. Novel approach to identifying the hepatitis B virus pre-S deletions associated with hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2014** ; 20: 13573-81.

Zheng J, Lin X, Wang X, Zheng L, Lan S, Jin S, *et al.* In Silico Analysis of Epitope-Based Vaccine Candidates against Hepatitis B Virus Polymerase Protein. *Viruses* **2017** ; 9(5) : pii: E112.

Zhou TC, Li X, Li L, Li XF, Zhang L, Wei J. Evolution of full-length genomes of HBV quasispecies in sera of patients with a coexistence of HBsAg and anti-HBs antibodies. *Sci. Rep.* **2017** ; 7(1): 661.

Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* **2014** ; 20(23) : 7312-24.

Zhu Q, Lu Q, Xiong S, Yu H, Duan S. Hepatitis B virus S gene mutants in infants infected despite immunoprophylaxis. *Chin. Med. J. (Engl)* **2001** ; 114 : 352-4.

Zou ZQ, Wang L, Wang K, Yu JG. Innate immune targets of hepatitis B virus infection. *World J. Hepatol.* **2016** ; 8(17) : 716-25.

Zoutendijk R, Hansen BE, van Vuuren AJ, Boucher CA, Janssen HL. Serum HBsAg decline during long-term potent nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B and prediction of HBsAg loss. *J. Infect. Dis.* **2011** ; 204 : 415-8.

Zulfiqar HF, Javed A, Sumbal, Afroze B, Ali Q, Akbar K, *et al.* HIV Diagnosis and Treatment through Advanced Technologies. *Front Public Health.* **2017** ; 5 : 32.

Résumé en Français

L'hépatite B chronique touche environ 257 millions de personnes dans le monde. La perte de l'antigène HBs (AgHBs), marqueur de guérison fonctionnelle, n'est que très rarement observée, même sous traitement antiviral (3-16 %). **Les protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B (VHB)**, formant l'AgHBs, sont très variables et cruciales pour le pouvoir infectieux du virus de l'hépatite B (VHB) et la physiopathologie. Nous avons émis l'hypothèse que cette variabilité pourrait expliquer, au moins partiellement, l'évolution de l'infection par le VHB, évaluée par la clairance de l'AgHBs, chez des patients traités ou non par analogues nucléos(t)idiques anti-VHB. Chez 29 patients infectés par différents génotypes du VHB (A, C et D), présentant différents profils cliniques (infection aiguë ou chronique, co-infection VHB/VIH) et thérapeutiques, une très grande variabilité des protéines d'enveloppe du VHB a été mise en évidence. Chez ces patients, la persistance de l'AgHBs était corrélée avec la présence de mutations et délétions localisées dans des régions des protéines d'enveloppe virale jouant un rôle important dans la reconnaissance du virus par le système immunitaire. Ces résultats renforcent l'hypothèse que l'étude des protéines d'enveloppe du VHB pourrait mettre en évidence des signatures moléculaires influençant le fitness du VHB et par conséquent l'évolution clinique de la maladie liée à l'infection par le VHB.

Mots clés : Antigène HBs, Echappement immunitaire, Séquençage haut-débit, Variabilité, Virus de l'hépatite B.

Résumé en Anglais

Chronic hepatitis B affects about 257 million people worldwide. The loss of HBS antigen (HBsAg), a marker of the functional cure, is very rarely observed, even on anti-HBV treatment (3-16%). **The hepatitis B virus (HBV) envelope proteins** (HBsAg) are highly variable and crucial for the viral infectivity and pathogeny. We hypothesized that the HBV variability in the envelope proteins could explain, at least partially, the evolution of HBV infection, evaluated by HBsAg clearance, in patients treated or not by anti-HBV nucleos(t)idic analogues. For 29 patients infected with different HBV genotypes (A, C and D), presenting different clinical profiles (acute or chronic infection, HBV/HIV co-infection) and therapies, a very high variability of HBV envelope proteins was observed. In these patients, the persistence of HBsAg was correlated with the presence of mutations and deletions located in areas that play a key role in the viral recognition by the immune system. These results reinforce the hypothesis that the study of HBV envelope proteins could highlight molecular signatures influencing HBV fitness which would subsequently modify the clinical evolution of HBV-related disease.

Key words: HBs Antigen, Immune escape, Ultra-deep sequencing, Variability, Hepatitis B virus.