



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-thesesexercice-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>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2014

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional
Le 27 Octobre 2014

Par **Brice MALVE**
né le 01 Août 1983 à Nancy (54)

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

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Etude des caractéristiques moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B par séquençage direct à partir d'une cohorte de patients suivis au CHU de Nancy.

Membres du Jury

Président : Mme le Professeur FINANCE Chantal, PU-PH CHU Nancy

Juges : Mme le Docteur JEULIN Hélène, MCU-PH CHU Nancy (Directeur de Thèse)

Mme le Professeur SCHVOERER Evelyne, PU-PH CHU Nancy

M le Professeur BRONOWICKI Jean-Pierre, PU-PH CHU Nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2014-2015

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Brigitte LEININGER-MULLER

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Chantal FINANCE

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Béatrice FAIVRE

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Hôpital :

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Monique ALBERT

Pierre DIXNEUF

Mariette BEAUD

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérald CATAU

Thérèse GIRARD

Jean-Claude CHEVIN

Maurice HOFFMANN

Jocelyne COLLOMB

Michel JACQUE

Bernard DANGIEN

Pierre LABRUDE

Marie-Claude FUZELLIER

Lucien LALLOZ

Françoise HINZELIN

Pierre LECTARD

Marie-Hélène LIVERTOUX

Vincent LOPPINET

Bernard MIGNOT

Marcel MIRJOLET

Jean-Louis MONAL

Maurice PIERFITTE

Blandine MOREAU

Janine SCHWARTZBROD

Dominique NOTTER

Louis SCHWARTZBROD

Christine PERDICAKIS

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Marie-France POCHON

Annie PAVIS

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ENSEIGNANTS*Section
CNU***Discipline d'enseignement***PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENOUESSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Environnement et Santé</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>

ENSEIGNANTS (suite)	<i>Section CNU</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
Florence DUMARCAZ	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	85/86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Hygiène sanitaire</i>
Francine KEDZIEREWICZ	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86	<i>Droit en Santé</i>
Faten MERHI-SOUSSI	87	<i>Hématologie</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Gabriel TROCKLE	86	<i>Pharmacologie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>
Colette ZINUTTI	85	<i>Pharmacie galénique</i>

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
--------------------	----	-------------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>
--------------------	----	----------------

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



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

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

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

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

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

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



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

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury,

Président du Jury
Mme Chantal FINANCE

PU-PH, laboratoire de Virologie, CHU de Nancy

Merci pour l'aide que vous avez pu m'apporter au cours de mes études à la faculté de Pharmacie ainsi que pour votre grande disponibilité lors de mon passage au laboratoire de Virologie.

Vous m'avez fait de plus l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Soyez assurée de mon grand respect et de ma sincère reconnaissance.

Directeur de Thèse
Mme Hélène JEULIN

MCU-PH, laboratoire de Virologie, CHU de Nancy

Je te remercie grandement pour avoir dirigé ce travail avec efficacité tout au long de sa réalisation. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Merci également pour ta disponibilité et ton aide depuis les étapes techniques à la faculté en passant par l'analyse des séquences ou encore pour les relectures et corrections du manuscrit.

Sois assurée de mon grand respect et de ma sincère reconnaissance.

Juges

Mme Evelyne SCHVOERER

PU-PH, laboratoire de Virologie, CHU de Nancy

Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce travail. Merci pour votre confiance, votre implication ainsi que pour votre accueil au laboratoire de Virologie.

Veuillez trouver ici le témoignage de mon grand respect et de ma profonde gratitude.

M Jean-Pierre BRONOWICKI

PU-PH, service d'Hépato-gastro-entérologie, CHU de Nancy

C'est pour moi un grand honneur de vous compter parmi les juges.

J'apprécie que vous puissiez juger mon travail en qualité de clinicien et spécialiste.

Veuillez trouver ici l'expression de mes très sincères remerciements.

A toutes celles et ceux qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail,

A l'ensemble des membres du laboratoire de Virologie,

Dr Véronique VENARD, MCU-PH

Merci pour votre accueil et votre grande disponibilité.

Dr Aurélie VELAY, AHU

Merci pour ton aide, ta disponibilité et les connaissances que tu m'as apportées en lien avec ce travail.

Aux techniciennes, cadre et ingénieur du laboratoire,

Merci pour votre gentillesse et votre aide pour certaines étapes techniques.

Au Professeur Jean-Pol FRIPPIAT et à l'ensemble de l'équipe de l'unité Stress Immunité Pathogènes (SIMPA)

Merci pour votre accueil, votre aide et la mise à disposition de votre matériel lorsqu'il y en avait besoin.

Au Docteur Mouni BENSENANE, PH (Hépato-gastro-entérologie)

Je vous remercie sincèrement de votre aide et du temps que vous avez pris pour nous apporter les renseignements relatifs aux patients de l'étude.

A mes proches, mes amis, ma famille,

A mes parents bien sûr sans qui je ne serais pas qui je suis. *Merci beaucoup d'être là, pour votre soutien et votre patience au cours de mes années d'étude.*

A ma sœur Claire, Thomas (et Théo). *Je sais que l'on peut compter sur vous. Je suis fier de votre réussite.*

A toute ma famille.

A Danièle et Bernard GRANDVALLET, à leurs familles, qui m'ont toujours accueilli les bras ouverts. *Merci beaucoup à vous.*

A Céline, Thomas l'opossum (et Sacha). *Merci pour tous les moments que nous passons avec vous.*

A Aurélie évidemment. *Je te remercie d'être la personne que tu es, pour ton dynamisme, ta gentillesse, ton soutien et pour la patience dont tu as toujours fait preuve.*

Et aussi à **mes amis**,

Aux internes et à toutes les personnes que j'ai rencontrées au cours de mes différents stages. *J'ai passé de belles années grâce à vous et j'en garderai sans aucun doute quelques amitiés solides.*

TABLE DES MATIERES

INDEX DES TABLEAUX.....	3
INDEX DES FIGURES	4
INTRODUCTION.....	7
GENERALITES	8
I. Le Virus de l'hépatite B.....	8
1.1. Historique	8
1.2. Morphologie et structure	9
1.4. Le cycle de réplication virale	17
1.5. Variabilité et mutations	25
II. L'infection à VHB	36
2.1. Epidémiologie	36
2.2. Histoire naturelle de l'infection.....	40
2.3. Physiopathologie	43
2.5. Sérologie et diagnostic	45
2.6. Traitements et prévention anti-VHB	48
OBJECTIF DU TRAVAIL.....	63
MATERIEL ET METHODE.....	64
I. Patients étudiés.....	64
II. Extraction de l'ADN viral	68
III. Amplification des gènes S et pré-S	69
3.1 Généralités.....	69
3.2 Amorces utilisées	70
3.3 Protocole.....	72
IV. Migration sur gel d'agarose	74
V. Purifications et séquençage.....	75
5.1 Première purification.....	75
5.2 PCR de séquençage	75
5.3 Deuxième purification.....	78
5.4 Séquençage.....	78
VI. Analyse des résultats.....	79
6.1 Logiciel MEGA 6.0	79

6.2 Logiciel GREG +	81
6.3 VESPA	81
6.3 Logiciel ANTHEPROT	82
RESULTATS	83
I. Caractéristiques des patients	84
II. Patients sous traitement.....	84
2.1 Mutations recensées	84
2.2 Profil d'antigénicité sur Antheprot.....	86
III. Patients non traités	88
3.1 Mutations recensées	88
3.2 Profil d'antigénicité sur Antheprot.....	91
DISCUSSION	93
I. Patients sous traitement	95
1.1 Patients de génotype A	96
1.2 Patients de génotype D	97
II. Patients non traités.....	101
2.1 Patients de génotype A	101
2.2 Patients de génotype D	102
III. Total des patients	103
CONCLUSION.....	105
BIBLIOGRAPHIE	108
ANNEXES.....	I

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Les sérotypes du VHB.....	26
Tableau 2. Caractéristiques des génotypes et sous types du VHB.....	27
Tableau 3. Fréquence des mutants BCP et précore suivant le génotype.....	34
Tableau 4. Génotypes, modes de transmission et prévalence dans le monde	40
Tableau 5. Estimation du temps de perte de l'Ag HBs chez des patients traités par Entécavir ou Ténofovir et présentant une réponse virologique	56
Tableau 6. Analyse des résistances croisées entre analogues nucléos(t)idiques dans le cadre de l'hépatite B chronique.....	58
Tableau 7. Cohorte des patients sous traitement (analogues nucléos(t)idiques de la RT).....	66
Tableau 8. Cohorte des patients non traités	66
Tableau 9. Patients ne réalisant pas la clairance de l'Ag HBs non appariés à des patients d'intérêts.	67
Tableau 10. Caractéristiques des amorces	71
Tableau 11. Caractéristiques des patients	99
Tableau 12. Mutations détectées au niveau du domaine MHR de la protéine S.....	99

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Phylogénie des Hepadnaviridae	8
Figure 2. Structure du virus de l'hépatite B	9
Figure 3. Organisation du génome viral	10
Figure 4. Structure cristalline du dimère de protéine C privée de la partie C-terminale.....	11
Figure 5. Aspect des particules subvirales et virales en microscopie électronique à transmission	12
Figure 6. Représentation linéaire du génome et des protéines d'enveloppe du VHB	13
Figure 7. Représentation schématique de la topologie des protéines L, M et S au niveau de la membrane virale	14
Figure 8. Topologie transmembranaire des protéines d'enveloppe du VHB au niveau du réticulum endoplasmique et interactions enveloppe/nucléocapside.....	15
Figure 9. Structure de la boucle antigénique AGL au sein de l'antigène HBs.....	17
Figure 10. Modèle putatif d'entrée du VHB dans l'hépatocyte	19
Figure 11. Réplication du génome viral	22
Figure 12. Le cycle de réplication virale du VHB	24
Figure 13. Arbre phylogénétique composé des génotypes humains et des souches simiennes. Association génotype/sérototype	26
Figure 14. Cartographie des mutations décrites dans la région précore et promoteur basal du core (BCP) du VHB	33
Figure 15. Prévalence de l'infection à VHB	36
Figure 16. Répartition mondiale des différents génotypes	37
Figure 17. Arbre phylogénétique de 175 séquences de génome VHB. Génotypes et répartition géographique	38
Figure 18. Estimation du taux de prévalence du portage de l'Ag HBs en France	39
Figure 19. Histoire naturelle du VHB	41
Figure 20. Infection chronique par le virus de l'hépatite B : phases de l'infection	42
Figure 21. Les différents marqueurs lors d'une hépatite B aiguë	46
Figure 22. Les différents marqueurs lors d'une hépatite B chronique	47
Figure 23. Chronologie d'apparition des traitements anti-VHB	48
Figure 24. Mécanisme d'action des analogues. Exemple de l'Adéfovir (PMEA)	50

Figure 25. Fréquence de la rechute après arrêt d'un traitement par analogues nucléos(t)idiques chez les patients Ag HBe –	52
Figure 26. Influence du génotype sur la réponse à un traitement par IFN-PEG 2a	52
Figure 27. Résultats sur des patients hépatite B chronique Ag HBe+ à 6 mois après un traitement de 12 mois (48 semaines) par interféron et à 12 mois (48 ou 52 semaines) d'un traitement par analogue nucléos(t)idique	54
Figure 28. Résultats sur des patients hépatite B chronique Ag HBe- à 6 mois après un traitement de 12 mois (48 semaines) par interféron et à 12 mois (48 ou 52 semaines) d'un traitement par analogue nucléos(t)idique	54
Figure 29. Proportion de patients ayant présenté une clairance de l'AgHBs au cours du traitement	56
Figure 30. Mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques au niveau des domaines fonctionnels B, C, D, E de la reverse transcriptase dont le gène se superpose avec celui des protéines d'enveloppe	59
Figure 31. Principe de l'extraction de l'ADN VHB par easyMAG	68
Figure 32. Etapes successives d'un cycle de PCR	69
Figure 33. Séquençage des gènes préS et S (RT). Emplacement des amorces utilisées par rapport aux cadres de lecture préS/S et Pol	71
Figure 34. Exemple de migration sur gel d'électrophorèse	74
Figure 35. Purification sur colonne. Fixation de l'ADN sur une membrane de silice	75
Figure 36. Principe de la PCR de séquençage	76
Figure 37. Identification du ddNTP par transfert d'énergie fluorescente par résonance	78
Figure 38. Exemple d'assignation des nucléotides aux pics de fluorescence correspondants	79
Figure 39. Chevauchement des pics (A), pics ne revenant pas à la ligne de base (C) et séquence lisible (B)	80
Figure 40. Exemple d'alignement de séquences dans Mega 6 (gène S → P2f S8 P7a 979)	80
Figure 41. Code génétique dégénéré et exemple de base dégénérée (C ou T = Y)	81
Figure 42. Représentation graphique de quelques paramètres sur Antheprot	82
Figure 43. Numérotation et chevauchement des protéines d'intérêts	83
Figure 44. Comparaison des profils d'antigénicité des séquences de référence pour les protéines codées par les domaines S (génotypes A, D, C) et préS (génotype A, D)	86
Figure 45. Principaux mutants d'échappement immunitaire localisés sur le domaine S	94

Figure 46. Localisation des régions indispensables à l'infectivité du virus (entrée) dont le « Receptor Binding Site » et des principaux épitopes B et T spécifiques sur les domaines pré-S1 et pré-S2	94
Figure 47. Profil d'antigénicité <i>in silico</i> en fonction de la séquence des acides aminés 107 à 146 de la protéine S du VHB (T125M en violet clair, T125T en violet foncé)	99
Figure 48. Comparaison de la réactivité ELISA des sérum de souris vaccinées vis-à-vis d'un peptide de génotype D sauvage (blanc) ou muté (noir).....	100
Figure 49. Variants (minoritaires) de la protéine S détectés par UDS	101

INTRODUCTION

La fréquence de l'hépatite chronique B, qui touche environ 400 millions de personnes dans le monde, reste élevée malgré l'existence d'un vaccin préventif et de traitements puissants. L'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) qui conduit fréquemment à une hépatite B active, peut se compliquer de cirrhose et est associée à un risque augmenté de carcinome hépatocellulaire. Le traitement visant à éradiquer le virus lors de l'hépatite B chronique est de longue durée. Les molécules les plus utilisées sont les analogues nucléos(t)idiques, pour leur puissance antivirale et leur bonne tolérance.

Le VHB est un virus enveloppé. Les glycoprotéines d'enveloppe du VHB jouent un rôle essentiel dans le cycle viral, en particulier pour l'étape d'entrée du VHB dans les cellules permissives, contribuant à la spécificité tissulaire virale. L'antigène (Ag) HBs du VHB, porté par ces glycoprotéines, correspond aux antigènes externes viraux qui sont les premiers en contact avec la réponse immunitaire de l'hôte lors de l'infection primaire. Ces protéines contiennent des régions variables et des régions conservées, ces dernières pouvant être ciblées par des stratégies d'immunisation préventive ou thérapeutique nouvelles.

L'hépatite B chronique est définie par la persistance (au-delà de 6 mois) de l'antigène HBs dans le sérum des patients. La clairance de cet antigène est un évènement rare chez les patients infectés chroniquement, qu'ils soient, ou non, traités par analogues nucléos(t)idiques. Notre hypothèse est que parmi les facteurs viraux influençant la clairance ou la persistance de l'Ag HBs, les protéines d'enveloppe virales, essentielles à l'entrée du virus dans les hépatocytes et cibles de l'immunité de l'hôte, peuvent jouer un rôle indirect.

Nos travaux visent donc à identifier des signatures moléculaires au sein des protéines d'enveloppe du VHB (résidus d'acides aminés) liées à la persistance de l'Ag HBs. Les séquences protéiques du VHB (obtenues à partir des séquences nucléotidiques) sont corrélées aux différentes évolutions de l'Ag HBs sérique en présence ou en absence de traitement.

D'après nos résultats, des anticorps monoclonaux ciblant des épitopes clés des glycoprotéines d'enveloppe virales seront produits et testés *in vitro* pour leur pouvoir neutralisant.

GENERALITES

I. Le Virus de l'hépatite B

1.1. Historique

Le virus de l'hépatite B ou VHB appartient à la famille des *Hepadnaviridae* qui constitue un ensemble de petit virus à ADN hépatotropes caractérisés par leur étroite spécificité d'hôte, la production en excès de particules subvirales, leur petit génome circulaire et leur stratégie de réplication basée sur une étape de transcription inverse observée aussi chez les *Retroviridae*. On distingue deux genres : les *Orthohepadnavirus* qui infectent l'homme et d'autres mammifères et les *Avihepadnavirus* qui infectent les oiseaux (*figure 1*).

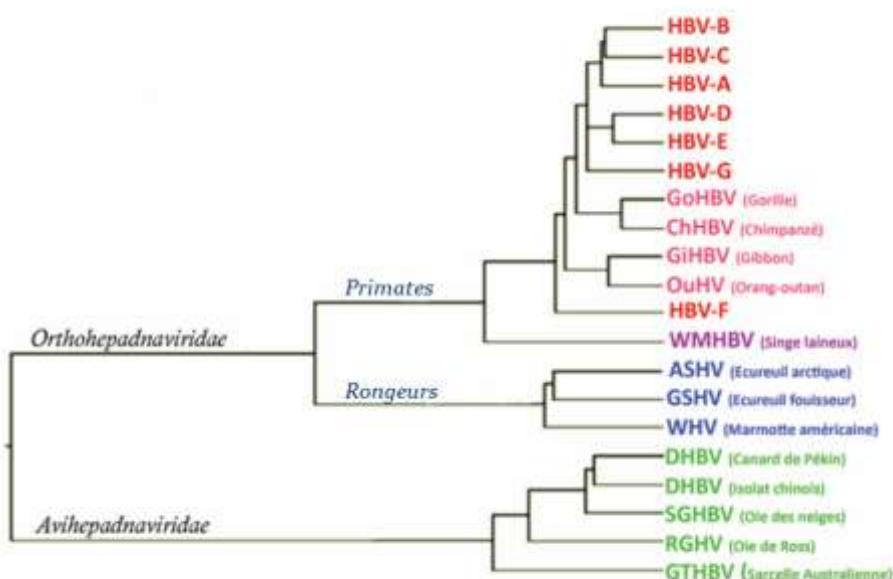


Figure 1. Phylogénie des Hepadnaviridae (d'après Doerr HW & Gerlich WH, 2002)

En 1947 MacCallum évoqua l'origine virale de cas de jaunisses observés chez des patients ayant reçu des produits contenant du sérum humain. Il proposa le terme d'hépatite B pour la distinguer de l'hépatite A oro-fécale (MacCallum & Findley, 1947).

Puis en 1965, au cours d'une étude systématique de sérum de patients polytransfusés permettant de détecter la précipitation d'anticorps contre certains antigènes, Blumberg mis en évidence un nouvel antigène dans le sérum d'un patient aborigène et l'anticorps précipitant dans le sérum d'un patient transfusé (Blumberg *et al*, 1965). Il montra ensuite la relation entre cet antigène « Australia » rebaptisé ensuite HBs et l'hépatite B.

Vint ensuite, chez des patients porteurs de l'antigène HBs, la découverte des particules subvirales non infectieuses (Bayer *et al*, 1968) et en 1970 de la particule infectieuse complète (Dane *et al*, 1970).

La première séquence complète du génome du VHB a été publiée en 1979 (Galibert *et al*, 1979).

Ces découvertes permirent notamment la mise au point d'une première génération de vaccins à partir de plasmas riches en antigène HBs puis grâce au clonage la production en masse de vaccins obtenus par recombinaison génétique.

1.2. Morphologie et structure

Le virion infectieux, également appelé particule de Dane, est une petite particule sphérique (42 nm de diamètre). Elle est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées des glycoprotéines de surface. A l'intérieur de cette enveloppe se situe une nucléocapside icosaédrique appelée « core » (36 nm) contenant notamment le génome du virus auquel est fixée de manière covalente une polymérase virale (*figure 2*).

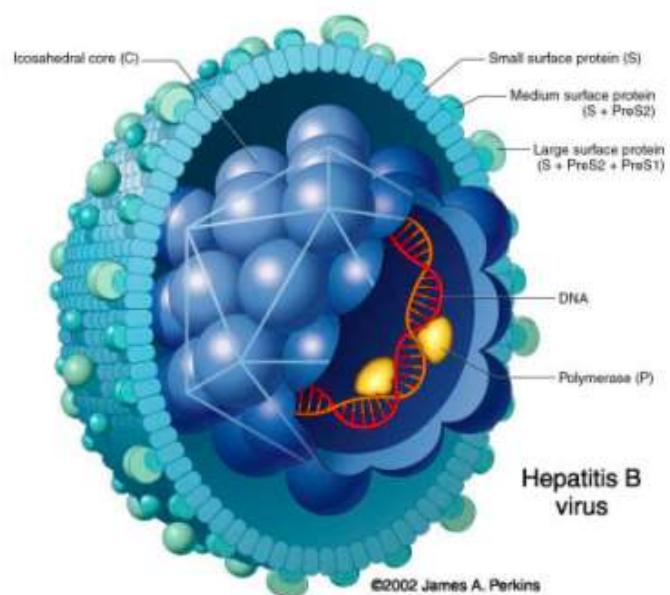


Figure 2. Structure du virus de l'hépatite B

Le génome du VHB constitué d'environ 3200 nucléotides est, le plus petit parmi les virus animaux connus. Il est composé d'une molécule d'ADN circulaire relâché partiellement bicaudénaire. Le brin long codant (polarité -) comporte 4 cadres de lecture ou « open reading

frames » (ORFs), le brin court non codant (polarité +) a une extrémité 5' fixe comportant une courte séquence d'ARN et une extrémité 3' variable (Galibert *et al*, 1979) (*figure 3*).

Le maintien de la forme circulaire de l'ADN est assuré par l'appariement des extrémités 5' des deux chaînes au niveau d'une région d'une longueur de 200 nucléotides appelée région cohésive. De part et d'autre de cette région se situent des séquences directement répétées de 11 nucléotides DR1 (à l'extémité 5' du brin (-)) et DR2 (à l'extémité 5' du brin (+)) jouant un rôle majeur dans l'initiation de la synthèse de chacun des deux brins d'ADN. La polymérase virale est fixée par ailleurs au niveau de l'extrémité 5' du brin (-) (*figure 3*).

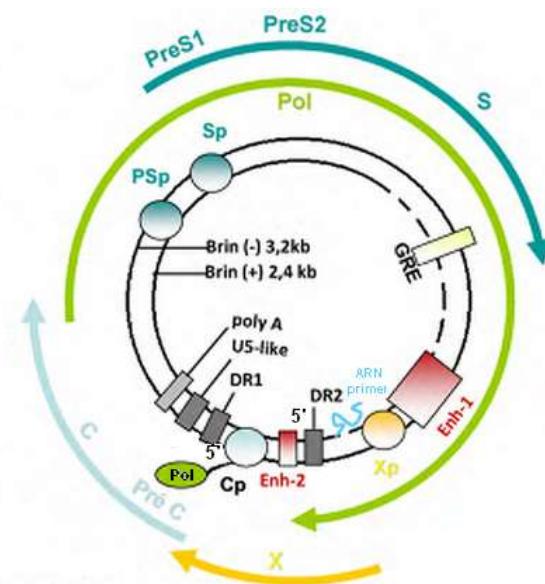


Figure 3. Organisation du génome viral

Malgré sa petite taille le génome peut coder pour sept protéines différentes grâce à l'organisation très compacte des régions codantes en cadre de lectures qui se chevauchent.

- L'ORF C/préC code pour la **protéine core C** (183-195 aa) qui est l'élément structurel de base de la capsid et porte l'antigène HBc et la **protéine précore**, précurseur de l'antigène sécrété HBe qui semble impliqué dans les phénomènes de persistance virale. La protéine C peut se diviser en deux parties : une partie N-terminale (149-161 aa) indispensable à l'auto-assemblage de la capsid et une partie C-terminale (34 aa), riche en résidus arginine, permettant l'encapsidation du génome viral. L'élément de base est un dimère, relié par un pont disulfure (C61), dont la partie N-terminale forme un T (*figure 4*) (Bruss, 2007).

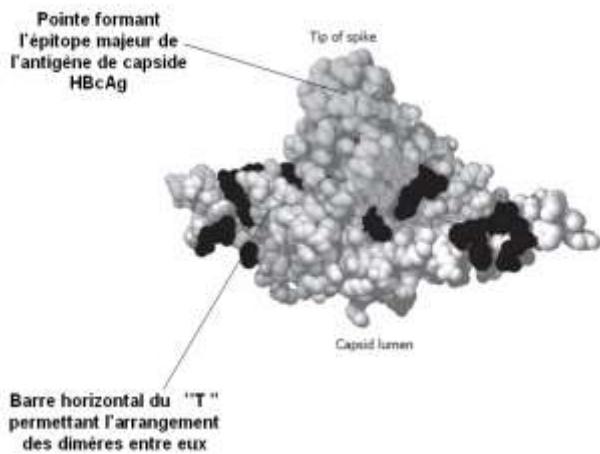


Figure 4. Structure cristalline du dimère de protéine C privée de la partie C-terminale
(d'après Bruss, 2007)

- L'ORF P code pour une protéine multifonctionnelle, la **polymérase virale**, qui comprend plusieurs domaines impliqués dans la réPLICATION : la protéine N-terminale (TP) qui permet la liaison avec l'extrémité 5' du brin (-) d'ADN, la région ADN polymérase qui a également une activité de transcriptase inverse (rôle important du motif peptidique YMDD), le domaine RNase H qui est responsable de la dégradation de l'ARN préGénomique lors de la synthèse du brin (-) de l'ADN viral et un domaine Spacer (Wei *et al*, 2010). Il est intéressant de noter que ce cadre de lecture se chevauche avec tous les autres (*figure 3*). Des mutations de la polymérase peuvent notamment affecter le gène S avec des implications sur l'infectivité du virus et la pathogénie de la maladie hépatique.
- L'ORF S/préS comprend les régions pré-S1, pré-S2 et S. Il permet de coder pour 3 types de protéines de surface. La **protéine majoritaire S** (région S) constituée de 226 acides aminés, la **protéine moyenne M** (S + pré-S2) constituée de 281 acides aminés et la **grande protéine L** (S + pré-S2 + pré-S1) de longueur variable selon le génotype (389 à 400 aa) (la variabilité de pré-S1 est rendue possible car il chevauche la région Spacer qui peut elle-même supporter une grande variabilité sans que cela ne soit délétère pour le virus). L'enveloppe de la particule virale est constituée majoritairement de protéine S, d'environ 20% de protéine M et est enrichie en protéine L (20-30%) (Bruss, 2007).

On peut signaler ici qu'un trait caractéristique des infections à hépadnavirus est la production en large excès de particules d'enveloppe défectueuses ou particules subvirales (elles peuvent être parfois 1000 fois plus nombreuses que les particules virales). Ces particules de la forme de bâtonnets ou de billes (*figure 5*) n'ont pas de potentiel infectieux car elles sont dépourvues de nucléocapside mais peuvent jouer un rôle dans la réponse immunitaire. Elles pourraient notamment faciliter la dissémination du virus et son maintien dans l'organisme en réduisant le pool d'anticorps neutralisants disponibles.

Les particules sphériques ont un diamètre moyen de 22 nm et sont constituées de 80 à 90% de protéine S mais seulement de quelques traces de protéine L. Elles sont les plus représentées dans le sérum des patients (98 à 99% des particules virales). Les particules filamenteuses ont une longueur variable allant jusqu'à 100 nm. Elles sont plus riches en protéines L (10-30%) ce qui leur confère leur aspect (Glebe & Urban, 2007).

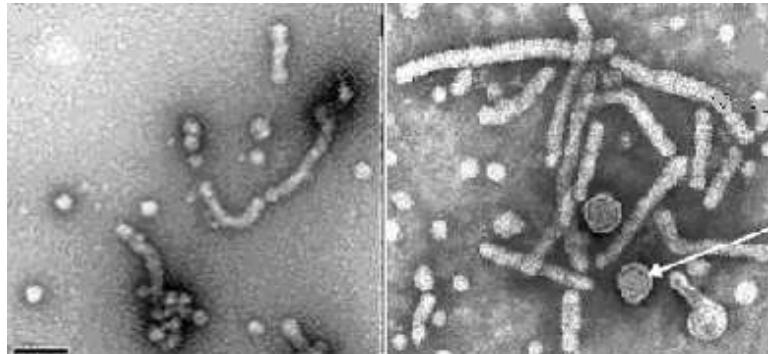


Figure 5. Aspect des particules subvirales et virales en microscopie électronique à transmission (d'après Patient *et al*, 2007)

- L'ORF X code pour une petite protéine (145-154 aa) essentielle pour la réplication virale. **La protéine X** est en effet un transactivateur transcriptionnel capable d'activer un grand nombre de promoteurs viraux et cellulaires et collaborant avec des facteurs de transcription cellulaires permettant ainsi d'augmenter l'expression des gènes du VHB lors de la réplication. Elle peut également moduler la transduction du signal, le cycle cellulaire, les voies de dégradation des protéines, l'apoptose et la stabilité génétique. On lui attribue donc aussi un rôle dans l'oncogenèse (Wei *et al*, 2010).

Le génome est donc entièrement codant. Ainsi tous les signaux de régulation incluant les promoteurs (4), les « enhancers » ou activateurs de la transcription (enh-1 et enh-2), les sites

d'initiation de la transcription, le signal de polyadénylation sont totalement intégrés dans les régions codantes (Wei *et al*, 2010).

1.3. Les glycoprotéines d'enveloppe

Structure

L'enveloppe du VHB est donc constituée, comme nous l'avons vu précédemment, de 3 glycoprotéines codées par un même cadre de lecture.

La transcription est initiée au niveau d'un promoteur en amont de l'ORF S/préS et également au niveau d'un promoteur interne en amont du deuxième site de traduction (AUG) (*figure 6*). La traduction du plus grand ARNm permet la synthèse de la grande **protéine L** (S+pré-S2+pré-S1) de longueur variable selon le génotype (389 aa pour le génotype D et 400 aa pour le génotype A). La traduction des plus petits transcrits aboutit à la moyenne **protéine M** (S+pré-S2) longue de 281 aa et à la petite **protéine S** (S) de 226 aa selon le site d'initiation de la traduction utilisé (*figure 6*). Les 3 protéines présentent une partie C-terminale hydrophobe commune de 57 acides aminés au niveau du domaine S capable de s'intégrer aux membranes lipidiques (Bruss, 2007).

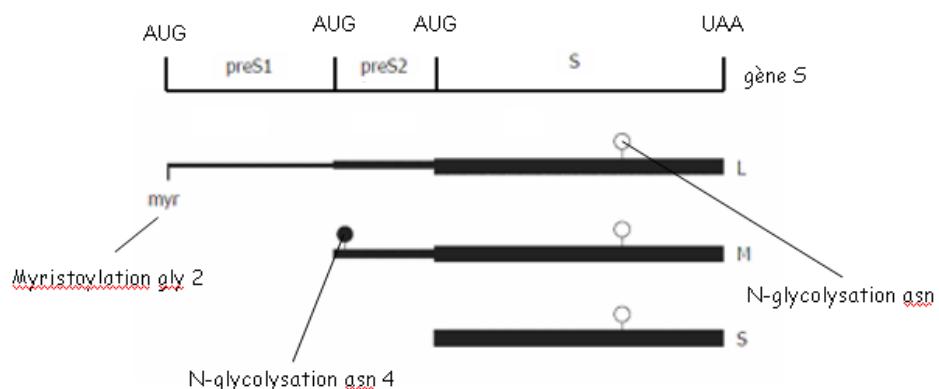


Figure 6. Représentation linéaire du génome et des protéines d'enveloppe du VHB
(d'après Bruss, 2007)

On trouve par ailleurs un site de N-glycosylation au niveau d'un résidu asparagine (sN146) du domaine S. La protéine M présente un site de N-glycosylation supplémentaire en pré-S2 (s2N4) et pour certains génotypes un site d'O-glycosylation (s2T37). La protéine L est myristoylée au niveau d'un résidu glycine (s1G2) (*figure 6*). Il s'agit de modifications post-traductionnelles (Bruss, 2007).

Ces glycoprotéines sont insérées au niveau de la membrane de l'enveloppe virale et adoptent une conformation spatiale bien définie. On trouve au niveau de la région S commune 4 hélices α transmembranaires « TM » hydrophobes permettant l'ancrage dans la bicoche lipidique de l'enveloppe ou dans la membrane du réticulum endoplasmique ainsi qu'une boucle antigénique (AGL) (aa 99-169) exposée en surface de la particule dont on verra le rôle dans le pouvoir infectieux (*figure 7*).

La protéine M présente une partie N-terminale plus longue constituée du domaine pré-S2. Le domaine pré-S1 de la protéine L présente une région très conservée (acides aminés 2 à 75) importante pour l'entrée du virus (*figure 7*). On verra également que cette dernière peut présenter 2 topologies transmembranaires différentes ayant des fonctions différentes (Le Duff *et al*, 2009).

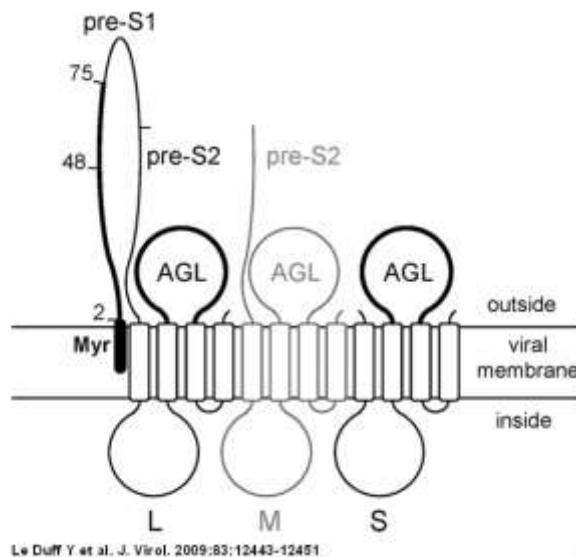


Figure 7. Représentation schématique de la topologie des protéines L, M et S au niveau de la membrane virale (d'après Le Duff *et al*, 2009)

Synthèse

La synthèse de ces protéines a lieu au niveau du réticulum endoplasmique (RE) où elles acquièrent leur topologie complexe (*figure 8*).

Lors de la traduction la protéine S s'insère dans la membrane du RE grâce à un 1^{er} signal N-terminal constitué des acides aminés 8 à 22. Un 2^{ème} signal (acides aminés 80 à 98) dirige la translocation de la chaîne en aval à travers la membrane du RE (vers la lumière) alors que la partie en amont reste dans le cytosol, le signal forme un domaine transmembranaire dans la

bicouche lipidique. Les 55 acides aminés de la partie C-terminale sont intégrés dans la membrane grâce à leur hydrophobie et orientés vers la lumière du RE (*figure 8*).

Cette configuration a pour conséquence la formation d'une boucle du côté cytosolique (aa 23-79) et d'une boucle glycosylée qui va porter l'épitope conformationnel majeur de l'antigène HBs au niveau de la lumière du RE. Après bourgeonnement cet épitope sera localisé sur la surface externe de la particule virale.

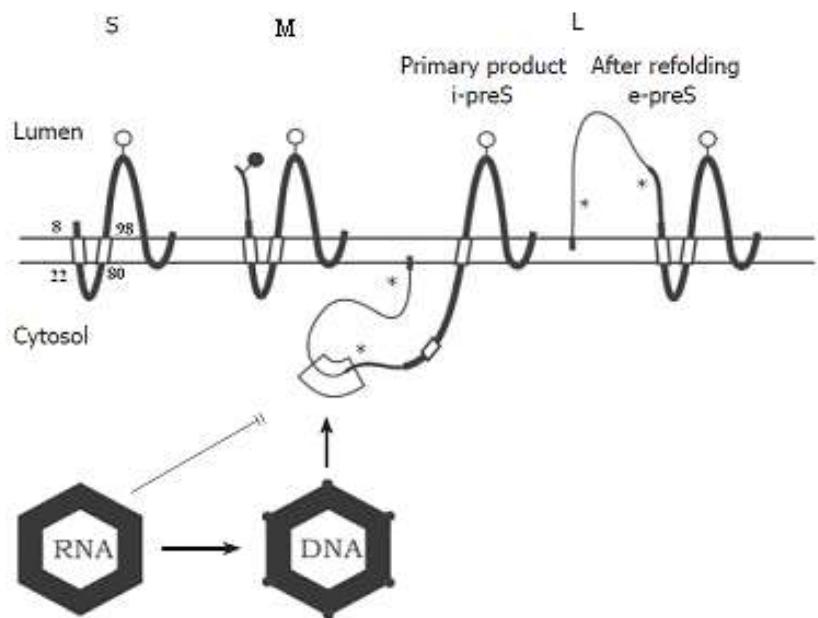


Figure 8. Topologie transmembranaire des protéines d'enveloppe du VHB au niveau du réticulum endoplasmique et interactions enveloppe/nucléocapside (Bruss, 2007)

La topologie transmembranaire de la protéine M est identique. Le domaine pré-S2 est transloqué dans la lumière du RE probablement sous l'action du 1^{er} signal (*figure 8*).

La protéine L adopte une topologie transmembranaire plus étonnante. Elle est myristoylée au niveau du résidu glycine 2 ce qui permet un ancrage supplémentaire dans la membrane du RE (*figure 8*). Les domaines pré-S1 et pré-S2 restent initialement dans le cytosol au cours de la traduction. Le 2^{ème} signal du domaine S permet l'ancrage et provoque la translocation de la séquence en aval qui sera N-glycosylée. Il s'agit de la conformation i-préS.

Après la traduction, la moitié des chaînes L change de topologie transmembranaire. Le domaine pré-S se retrouve dans la lumière du RE (flip-flop) sous l'action probable du 1^{er} signal N-terminal qui traverse la membrane dans une conformation similaire à M et S. Il s'agit alors de la conformation e-préS (*figure 8*) (Bruss, 2007).

Fonctions principales

- Les protéines d'enveloppe jouent un rôle important dans la **morphogenèse** du virus. Après bourgeonnement les domaines pré-S des chaînes L de conformation i-préS se retrouvent à l'intérieur du futur virion. Des séquences particulières de pré-S mais aussi de la boucle cytosolique du domaine S vont permettre l'assemblage des virions. Elles vont interagir avec les nucléocapsides matures et servir de matrice à leur enveloppement. Les nucléocapsides immatures contenant encore de l'ARN pré génomique ne peuvent pas interagir (*figure 8*) (Bruss, 2007).

- De plus deux éléments importants des protéines d'enveloppe semblent être des **déterminants majeurs du pouvoir infectieux**. Les protéines L et S sont indispensables alors que la protéine M ne semble avoir ici qu'un rôle accessoire.

Le 1^{er} déterminant se situe sur les protéines L au niveau du **domaine pré-S1** N-terminal entre les acides aminés 2 à 75. Il s'agit notamment des pré-S1 exposés à la surface du virion après bourgeonnement des chaînes L e-préS. Ce déterminant comprend notamment la glycine 2 myristoylée, un site de liaison à un récepteur cellulaire permettant l'**entrée** du virus (*1.4 Le cycle de réplication viral*) nommé RBS (« Receptor Binding Site ») entre les positions 2 et 48 et un domaine de fonction inconnue mais essentiel entre les acides aminés 49 et 75. Différentes études ont en effet montré que des peptides synthétiques myristoylés correspondant à la région N-terminale 2-48 pouvaient se lier à la membrane des hépatocytes et bloquer *l'infection in vitro* et *in vivo* par compétition (Barerra *et al*, 2005 ; Gripon *et al*, 2005 ; Glebe *et al*, 2006 ; Le Duff *et al*, 2009 ; Meier *et al*, 2013).

Le 2^{ème} déterminant, identifié récemment, se situe au niveau de la **boucle antigénique (AGL)** des trois protéines d'enveloppe plus particulièrement au niveau du déterminant « a » (aa 124-149) au cœur de la région hydrophile majeure (*figure 9*). Il participe lui aussi à l'**entrée** du virus dans l'hépatocyte de manière indépendante (voir cycle cellulaire). Il s'agit d'un déterminant conformation-dépendant. Il existe une corrélation entre le réseau de ponts disulfures de l'AGL, la conformation du déterminant « a » et l'infectivité. La substitution de résidus cystéine par des sérines au niveau du déterminant « a » ou l'utilisation d'inhibiteurs de disulfure isomérase peut en effet bloquer l'entrée du virus et faire perdre l'infectivité du virion. La cystéine 147 semble d'ailleurs être indispensable.

L'AGL de la protéine S semble avoir un poids plus important par rapport à celle de la protéine L. Cela s'explique par la stoechiométrie relative des 2 protéines au niveau de l'enveloppe virale (Le Duff *et al*, 2009).

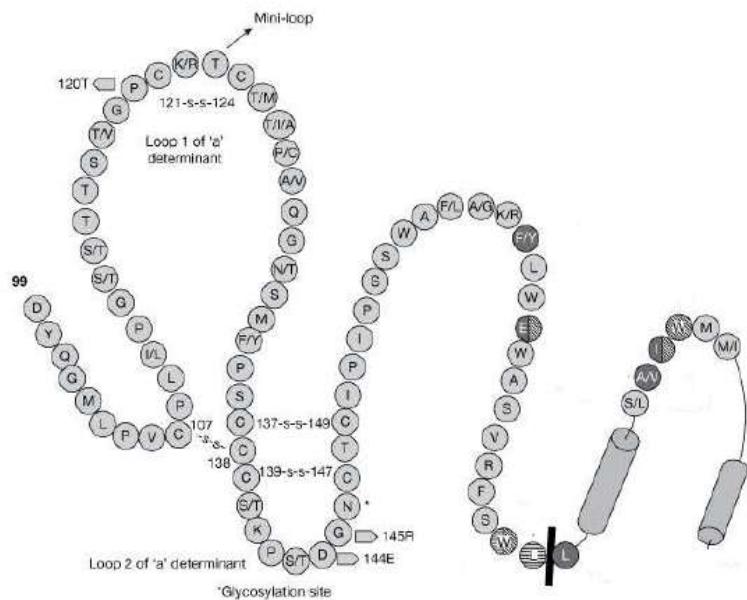


Figure 9. Structure de la boucle antigénique AGL au sein de l'antigène HBs
(d'après Locarnini & Yuen, 2010)

- Enfin les protéines de surface sont essentielles à la **stimulation de la réponse immunitaire** de l'hôte puisqu'elles portent des épitopes B et T spécifiques.

Les domaines pré-S1 et pré-S2 forment des épitopes linéaires B et T. Les anticorps anti-préS1 et préS2 sont souvent absents chez les porteurs chroniques du virus et semblent jouer un rôle important dans la clairance virale (Tai *et al*, 2002). Le domaine S (Ag HBs) forme quant à lui un complexe multiprotéique grâce à des ponts disulfures inter- et intramoléculaires (résidus cystéines de la boucle antigénique). La partie antigénique principale de l'antigène HBs est donc le déterminant « a » (aa 124-149) de l'AGL constitué d'épitopes conformationnels, cibles d'anticorps hautement neutralisants (AC anti-HBs). La protéine S porte également des épitopes T spécifiques comme P1 (aa 16-33) et P4 (aa 213-226) reconnus par les LT helper (Jeulin *et al*, 2013).

1.4. Le cycle de réplication virale

Nous allons voir que la principale originalité du cycle de réplication du VHB est qu'il utilise une étape de transcription inverse à partir d'un ARN pré génomique et non un mécanisme

semi-conservatif pour la réPLICATION de son génome. Le VHB est un virus hépatotrope. La réPLICATION à lieu exclusivement dans l'hépatocyte (**figure 12**).

L'entrée du virus

La phase initiale de l'entrée (**figure 12, 1**) est l'attachement énergie-dépendant de la particule virale à une structure accessible exposée à la surface de la cellule hôte. Cet attachement primaire est réversible et caractérisé par une faible affinité (Glebe & Urban, 2007). Il semble que le virion se lie à des composants essentiels de la matrice extra cellulaire semblables aux glycosaminoglycans (GAGs) nommés héparane sulfate (HS) protéoglycans (HSPGs) par l'intermédiaire d'un site de liaison (HS binding site) localisé en surface au niveau du déterminant « a » de la boucle antigénique (AGL). On peut noter que ce site de liaison fut d'abord rattaché au domaine pré-S1 des protéines L (Sureau & Salisse, 2013).

Il s'agit d'une liaison de type interaction électrostatique. Les HSPGs étant des molécules chargées négativement les acides aminés de la boucle antigénique chargés positivement ont une importance cruciale notamment les résidus R122 et K141. En effet la substitution des ces résidus par une alanine diminue l'activité de liaison alors que l'ajout d'une charge positive ou la perte d'une charge négative l'augmente.

D'autre part la conformation particulière de l'AGL liée à son réseau de ponts disulfures (voir ci-dessus) est indispensable et permet l'exposition des charges positives à la surface du virus (Sureau & Salisse, 2013).

Cette première phase d'attachement n'explique cependant pas le tropisme cellulaire et la spécificité d'espèce du VHB.

Elle est en fait suivie d'une seconde phase (**figure 12, 2**) au cours de laquelle le virion passe à un récepteur plus spécifique de l'hépatocyte. Le virus va mettre en jeu le RBS situé en pré-S1 au niveau des protéines L (*1.3 Les glycoprotéines d'enveloppe*). Ce dernier va interagir spécifiquement avec un récepteur transmembranaire exprimé essentiellement dans le foie : le Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) (Yan *et al*, 2012). Cette liaison est probablement irréversible. Le NTCP est un membre de la famille 10 des récepteurs solubles (SLC10), système de transport principal des acides biliaires du sang vers le foie, et est localisé sur la membrane basolatérale de l'hépatocyte. C'est une glycoprotéine de 349 acides aminés comprenant 7 à 9 domaines transmembranaires (**figure 10**). Les auteurs confirmèrent le rôle du NTCP en utilisant des lignées cellulaires n'exprimant pas la protéine et obtinrent une réduction de l'infection. Ils ont également démontré le rôle probable des acides aminés 157 à 165 du NTCP.

Le fait que l'infection ne soit pas totalement supprimée dans les lignées cellulaires sans NTCP montre qu'il y a probablement d'autres facteurs d'hôte (*figure 10*) permettant l'entrée du virus et expliquant le tropisme hépatique et la spécificité d'espèce du VHB (Xiao *et al*, 2013).

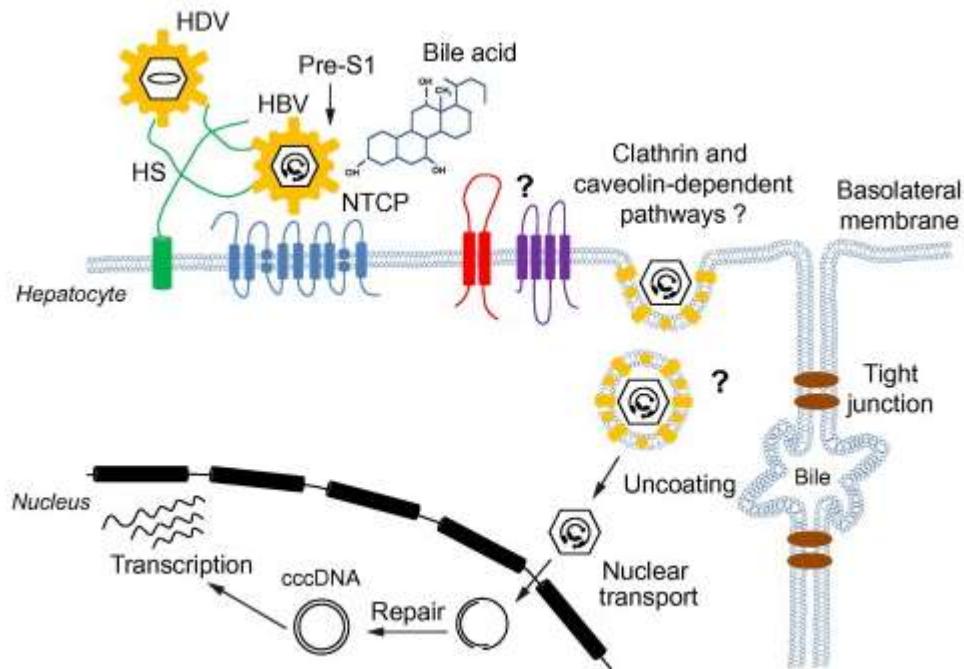


Figure 10. Modèle putatif d'entrée du VHB dans l'hépatocyte
(d'après Xiao *et al*, 2013)

Les étapes ultérieures à l'attachement primaire et à la liaison spécifique du virion à l'hépatocyte sont aujourd'hui en grande partie inexpliquées. Deux voies différentes d'entrée ont été proposées.

La première est l'internalisation par endocytose (*figure 12, 3A*) suivie de la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme. Cette libération pourrait faire intervenir des TLM (Translocation Motif), situés en C-terminal de pré-S2, qui permettraient la translocation de la particule à travers la membrane endosomale (Stoeckl *et al*, 2006). D'autre part cette endocytose pourrait dépendre de protéines telles que la clathrine et/ou la cavéoline (*figure 10*) mais cela demande à être confirmé.

La deuxième voie est la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique de l'hépatocyte (*figure 12, 3B*) après un changement conformationnel permettant la libération directe de la nucléocapside dans le cytoplasme (*figure 12, 4*) (Urban *et al*, 2010).

Transport des nucléocapsides dans le noyau

Les nucléocapsides vont emprunter le réseau de microtubules et atteindre le centre organisateur des microtubules (MOCT) à proximité du noyau et des pores nucléaires (**figure 12, 5**). L'accumulation de capsides au niveau de l'enveloppe nucléaire facilite les interactions entre les protéines du NPC (Nuclear Pore Complex) et la séquence NLS (Nuclear Localization Signal) située sur la partie C-terminale de la protéine C.

Les nucléocapsides vont ensuite se désassembler en dimères de protéine C au sein du pore nucléaire et libérer le génome viral, sous forme d'ADN relâché circulaire (ADNrc), dans le noyau cellulaire par des mécanismes encore inconnus (**figure 12, 6**) (Urban *et al*, 2010).

Réparation du brin d'ADNrc

Une fois le brin d'ADNrc dans le noyau, la polymérase virale fixée de manière covalente au génome va permettre la complétion du brin (+). La polymérase virale est ensuite détachée du brin (-) et l'amorce d'ARN utilisée pour la synthèse du brin (+) est dégradée grâce à des enzymes cellulaires (**figure 12, 7**) (Urban *et al*, 2010).

Conversion du brin d'ADNrc en ADNccc

L'ADNrc est ensuite transformé en une forme circulaire double brin stable et persistante appelée ADNccc (« covalently closed circular DNA ») par des enzymes cellulaires (**figure 12, 8**). Cette molécule prend la forme d'un mini chromosome non intégré mais dont l'intégration dans le génome est possible. Elle présente une structure chromatine-like avec un surenroulement typique en collier de perles autour d'histones et d'autres protéines (protéines de capsid). On peut signaler que l'absence d'ADNccc dans certaines lignées cellulaires utilisées pour la recherche suggère que des facteurs spécifiques à l'hôte peuvent réglementer la formation de l'ADNccc.

La persistance de l'ADNccc dans le noyau des hépatocytes joue un rôle dans le portage chronique du virus (Urban *et al*, 2010).

La transcription

L'ADNccc va en effet servir de matrice pour la transcription des gènes viraux par l'ARN polymérase II cellulaire (**figure 12, 9**). Il va notamment utiliser la machinerie cellulaire pour produire tous les ARN viraux nécessaires à la synthèse protéique et à la réPLICATION virale. En

effet ce processus est régulé par des facteurs de transcription de l'hôte comme le C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) ou les HNF (Hepatocyte Nuclear Factors) mais aussi des protéines virales (core, protéine X) qui ont la capacité de moduler l'expression des gènes en interagissant avec les promoteurs des 4 cadres de lectures chevauchants (ORFs) et les deux régions « enhancer ». D'autre part il existe une corrélation entre les niveaux de virémie et le niveau d'acétylation des histones H3/H4 ce qui indique que des mécanismes épigénétiques peuvent aussi réguler l'activité transcriptionnelle (Urban *et al*, 2010).

On observe alors 4 transcrits majeurs dont un ARNm de 3.5kb légèrement plus grand que le génome (la région redondante terminale de 120nt contient une deuxième copie de DR1, le signal d'encapsidation ε et la queue polyA) codant pour la protéine C, la polymérase et qui servira de matrice pour la transcription inverse. Il est nommé ARNm prégénomique (ARNpg). Il y a aussi 3 ARNm subgénomiques : un ARNm de 2.1kb qui est le transcrit principal du gène S codant pour l'antigène de surface (protéine S et M), un ARNm de 2.4kb codant pour la grande protéine d'enveloppe L et un ARNm de 0.8kb codant pour la protéine X (Wei *et al*, 2010).

La traduction et l'assemblage des nucléocapsides

Tous les transcrits HBV ressemblent aux transcrits cellulaires. Ils sont coiffés en 5' et polyadénylés à une position commune en 3'. Cette polyadénylation est dirigée par un signal unique et commun polyA situé dans l'ORF préC/C. Le traitement des ARNm ainsi que leur stabilisation, le transport hors du noyau (*figure 12, 10*) et le recrutement des facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction (eIF) permettant la liaison des ribosomes en 5' sont alors exclusivement médiés par des facteurs cellulaires de l'hôte.

Au niveau cytoplasmique la protéine X et les 3 protéines d'enveloppe (S, M, L) sont traduites à partir des ARN subgénomiques (*figure 12, 11*) (Urban *et al*, 2010).

L'ARNpg va quant à lui permettre la traduction de la polymérase virale et de la protéine C et donc l'auto-assemblage des dimères de protéine C pour former la capsidé (*figure 12, 12*). La polymérase virale va se lier au niveau du signal d'encapsidation ε en 5' de l'ARNpg. Des interactions entre ce complexe ARNpg-polymérase et la région C-terminale riche en arginine de la protéine C vont ensuite permettre l'encapsidation de ce complexe avec des kinases et des

protéines chaperonnes cellulaires utiles au repliement correct de la polymérase virale et à une meilleure interaction avec les protéines de capsidé (Bruss, 2007).

RéPLICATION DU GÉNOME VIRAL

À ce stade les nucléocapsides contiennent un ARNpg auquel est fixée la polymérase virale au niveau de la région ε. L'étape de transcription inverse (*figure 12, 13*) est initiée par la liaison covalente entre un résidu du domaine TP de la polymérase virale et une courte amorce d'ADN synthétisée en complément d'une séquence de ε.

La synthèse du brin (-) débute alors et l'ARNpg est dégradé simultanément par l'activité RNase H de la polymérase à l'exception de la séquence DR1 de 11nt protégée par la coiffe en 5' qui va être transloquée et s'apparier à la région homologue DR2 en 5' du brin (-). Cela va servir d'amorce pour l'elongation du brin (+) par la polymérase virale en parallèle de la circularisation du brin (-) due à l'appariement des séquences répétées DR1 en 3' et 5' (*figure 11*).

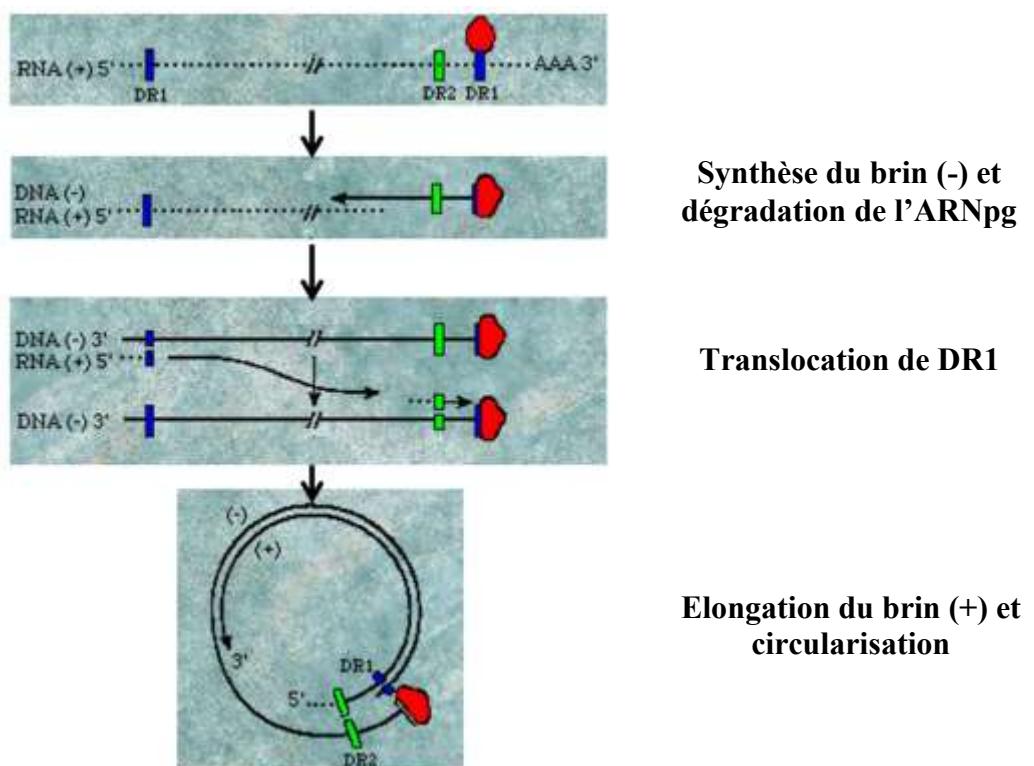


Figure 11. RéPLICATION DU GÉNOME VIRAL (d'après web.stanford.edu)

Dans le même temps les capsides immatures contenant l'ARNpg deviennent des capsides matures contenant de l'ADNrc partiellement bicaténaire. Cela se manifeste par des changements structuraux au niveau de la paroi de la capsidé (Bruss, 2007). Les

nucléocapsides matures ont alors deux devenirs possibles. Elles peuvent être réimportées dans le noyau pour former de nouvelles molécules d'ADNccc (*figure 12, 14A*) ou être enveloppées pour la sécrétion (Urban *et al*, 2010).

Enveloppement des nucléocapsides et sécrétion virale

Les protéines d'enveloppe S, M et L vont s'insérer dans la membrane du réticulum endoplasmique lors de la traduction et adopter leur topologie transmembranaire complexe. (*1.3 Les glycoprotéines d'enveloppe*). Ces protéines vont ensuite s'accumuler sur la membrane d'un compartiment pré-golgien et permettre le bourgeonnement des particules virales complètes et des particules subvirales en excès dans la lumière de ce compartiment. L'enveloppe virale ne dérive donc pas de la membrane plasmique des cellules infectées.

En présence d'une faible concentration en protéine L le bourgeonnement produit les particules subvirales en forme de billes.

L'assemblage du virion infectieux résulte de l'enveloppement de la nucléocapside mature (*figure 12, 14B*). Il se fait dans des zones membranaires enrichies en protéine L grâce à une interaction spécifique entre une protéine de la capsidé mature et un domaine court du pré-S1 des protéines L cytosoliques (conformation i-préS) (*1.3 Les glycoprotéines d'enveloppe*). Ce mécanisme garantie au virus de s'entourer d'une enveloppe enrichie en protéines L, indispensables à son pouvoir infectieux, après que la moitié ait changé de conformation (conformation e-préS). Ainsi les particules virales n'entrent pas en compétition avec les particules vides sphériques majoritaires, pauvres en protéine L, lors des processus de reconnaissance des hépatocytes et d'entrée. Les particules subvirales en forme de filaments se forment aussi dans des zones enrichies en protéine L mais requièrent aussi une dilatation importante de la membrane du compartiment en raison probablement de l'accumulation maximale des protéines d'enveloppe à ce niveau (Bruss, 2007).

Les virions et les particules subvirales sont ensuite sécrétés par voie constitutive dans des corps multivésiculaires (MVB) (*figure 12, 16*) (Urban *et al*, 2010).

On peut enfin noter que l'amplification de l'ADNccc (*figure 12, 15*) se déroule très probablement durant les phases précoces de l'infection et est dirigée par l'import des nucléocapsides synthétisés vers le noyau. Au cours de l'infection l'expression des protéines L augmente ce qui favorise l'enveloppement des nucléocapsides et les oriente vers la voie de la sécrétion (Urban *et al*, 2010).

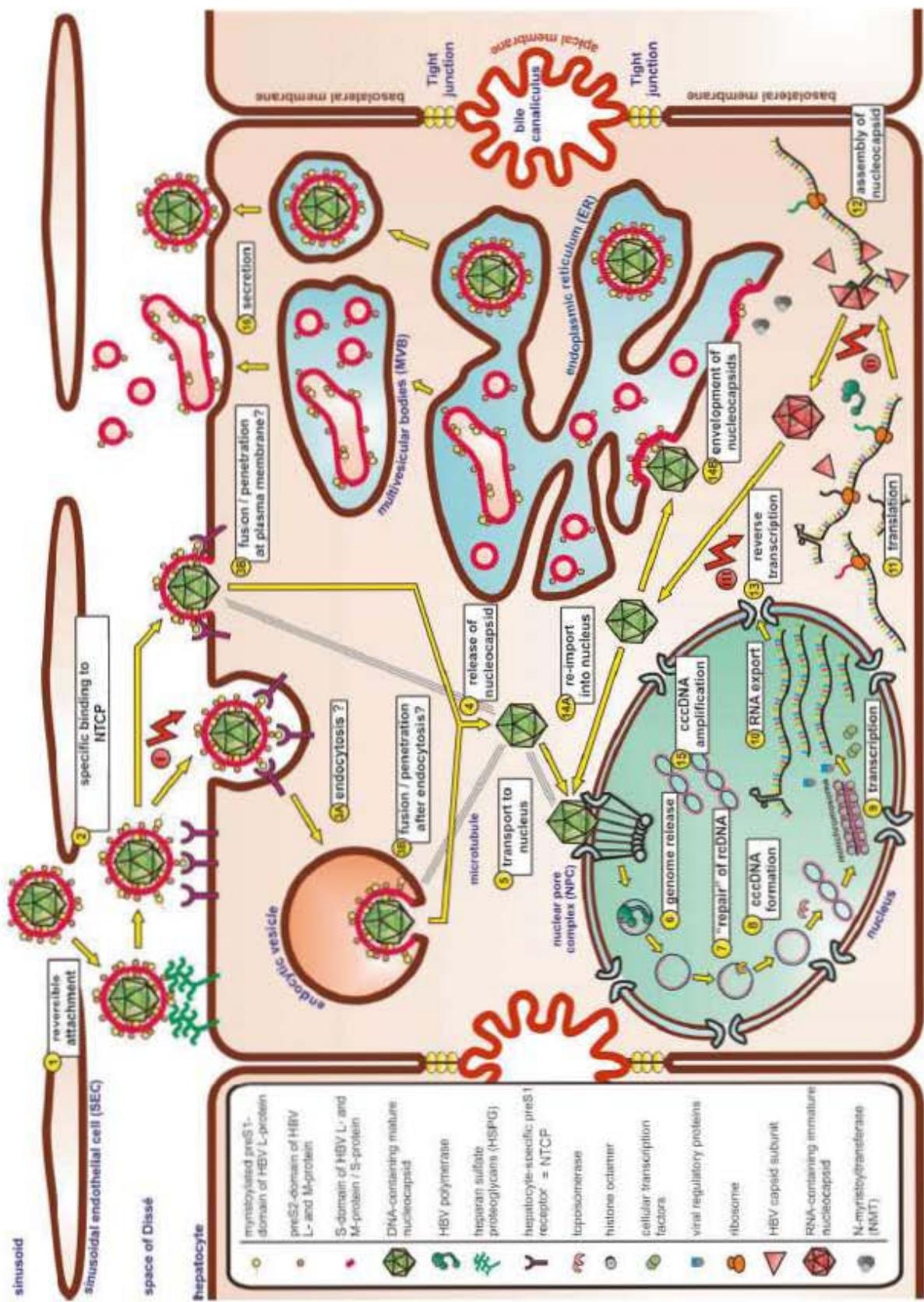


Figure 12. Le cycle de réplication virale du VHB (d'après Urban et al, 2010)

1.5. Variabilité et mutations

Nous avons vu qu'il existe une grande diversité de virus dans la famille des *Hepadnaviridae*. Les virus humains sont cependant très proches des virus retrouvés chez certains grands singes de l'Ancien Monde et présentent près de 80% de similitudes avec les virus des rongeurs et environ 40% avec les virus aviaires.

On peut donc supposer que les hépadnavirus existaient déjà il y a plusieurs millions d'années chez un ancêtre commun avant la séparation des espèces. Cette longévité a permis l'émergence de la diversité au sein de cette famille de virus et plus particulièrement parmi les virus humains (VHB) malgré les contraintes sévères imposées par l'organisation très compacte du génome en cadres de lectures chevauchants. La mutation d'une protéine pouvant en effet entraîner la mutation d'une autre protéine (Kay *et al*, 2007).

Cette variabilité s'explique par la stratégie de réPLICATION du virus qui passe par une étape de transcription inverse. La polymérase virale étant dépourvue d'activité correctrice il se produit un grand nombre d'erreurs aléatoires avec un taux de substitution nucléotidique par site et par an estimé à $1.4 \text{ à } 5.10^{-5}$. Ce taux est proche de celui retrouvé chez certains virus à ARN (*Retroviridae*) mais 10^4 fois plus élevé que chez les autres virus à ADN (Kramvis *et al*, 2005).

On peut diviser cette variabilité en deux catégories. D'une part une variabilité génotypique qui est le résultat de l'évolution progressive du génome en l'absence de pression de sélection au cours de laquelle les virus les plus robustes survivent aux dépens des plus faibles, elle se traduit par l'existence de sérotypes, génotypes, sous types, variants de polymorphisme. Il existe d'autre part une variabilité phénotypique qui résulte de l'adaptation rapide du virus à la pression de sélection (réponse immunitaire de l'hôte, vaccination, traitements antiviraux) et qui favorise l'émergence de mutants, même moins robustes (Kay *et al*, 2007).

1.5.1 Variabilité génotypique

Sérotypes

La première classification des différents isolats de VHB était basée sur les différences de réactivité de l'Ag HBs avec des panels standards d'antisera.

Le déterminant « a » (aa 124-147), composé des principaux épitopes conformationnels, commun à toutes les souches n'intervient pas dans la classification. Celle-ci repose essentiellement sur les déterminants d/y et r/w définis par la nature des acides aminés en

positions 122 et 160. D'autres résidus comme l'acide aminé en position 127 sont importants. On définit alors 10 sérotypes différents de VHB (*tableau 1*).

Sérotype	Séquence AgHBs
<i>ayw1</i>	122R 160K 127P (134F et/ou 159A)
<i>ayw2</i>	122R 160K 127P
<i>ayw3</i>	122R 160K 127T
<i>ayw4</i>	122R 160K 127L
<i>ayr</i>	122R 160R
<i>adw2</i>	122K 160K 127P
<i>adw3</i>	122K 160K 127T
<i>adw4q-</i>	122K 160K 127L 178Q
<i>adrq+</i>	122K 160R 177V 178P
<i>adrq-</i>	122K 160R 177A

Tableau 1. Les sérotypes du VHB (Kay *et al*, 2007).

Génotypes

Le séquençage complet du génome a permis d'établir progressivement une classification plus précise tenant compte de l'intégralité de la séquence nucléotidique et non plus uniquement de la variabilité de l'Ag HBs.

Un génotype est défini par une divergence de séquence d'au moins 8%. On en recense actuellement huit (A-H) en attendant l'éventuelle officialisation de génotypes I (Tran *et al*, 2008 ; Olinger *et al*, 2008 ; Yu *et al*, 2010) et J (Tatematsu *et al*, 2009). On peut noter qu'il existe une certaine corrélation entre sérotypes et génotypes qui n'est cependant pas parfaite (*figure 13*).

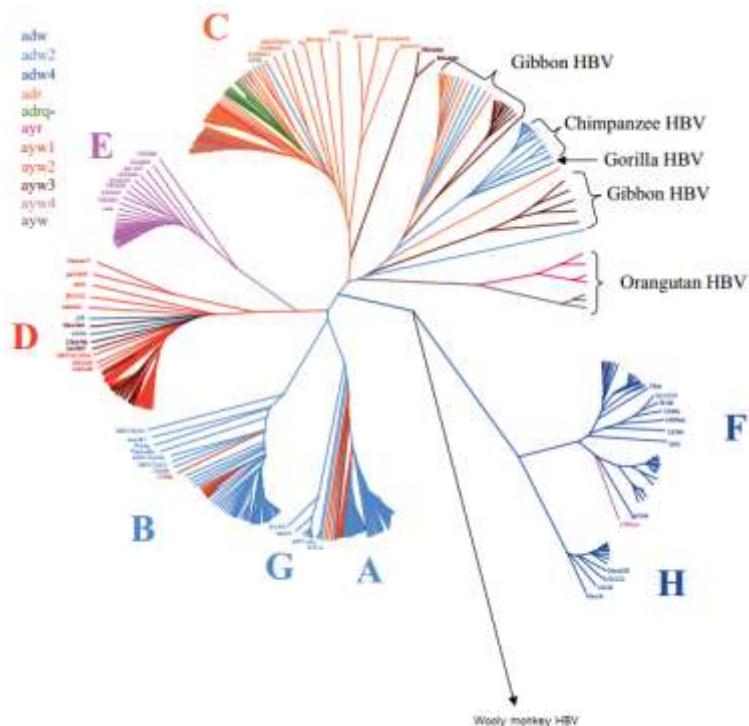


Figure 13. Arbre phylogénétique composé des génotypes humains et des souches simiennes. Association génotype/sérototype (d'après Norder *et al*, 2004)

Il est probable qu'à l'origine le VHB s'est disséminé dans la population humaine et a suivi les mouvements migratoires des populations. Les différentes souches ont alors évoluées indépendamment les unes des autres ce qui explique le lien entre génotypes et zones géographiques (*2.1 Epidémiologie*).

Il existe également une grande variabilité au sein de chaque génotype que l'on divise alors en sous-types (*tableau 2*) et dont l'origine semble également géographique. Chaque sous-type comprend lui-même de nombreux variants de polymorphisme.

En plus des variations de séquence certains génotypes diffèrent par leur taille (3182 nt pour le génotype D à 3248 nt pour le génotype G) en raison d'insertions ou délétions. Cela peut affecter une ou plusieurs protéines virales en raison du chevauchement des cadres de lecture (*tableau 2*).

Génotype	Sous-type	Sérotype	Variations			
			Génome (nt)	Pol (aa)	AgHBc (aa)	PreS1 (aa)
A	A1 (Aa)	adw2 , ayw1	3221	845	185	400
	A2 (Ae)	adw2 , ayw1				
B	B1 (Bj)	adw2	3215	843	183	400
	B2 (Ba)	adw2 , adw3				
C	B3	adw2 , ayw1	3215	843	183	400
	B4	ayw1 , adw2				
C	C1	adrq+ , ayr, adw2, ayw1	3215	843	183	400
	C2	adrq+ , ayr				
D	C3	adrq-, adrq+	3182	832	183	389
	D1	ayw2 , adw1, ayw1				
D	D2	ayw3 , ayw1	3182	832	183	389
	D3	ayw3 , ayw2, ayw4				
D	D4	ayw2 , ayw3				
		ayw4 , ayw2	3212	842	183	399
E	F1a	adw4 , ayw4	3215	843	183	400
	F1b	adw4				
F	FII	adw4	3215	843	183	400
	FIII	adw4				
G	FIV	adw4	3248	842	195	399
		adw2				
H		adw4	3215	843	183	400

Tableau 2. Caractéristiques des génotypes et sous types du VHB (Kay et al, 2007)

On peut noter également que certains isolats sont difficiles à classifier lorsque l'on analyse la séquence de leur génome car il existe des recombinaisons intragénotypiques et intergénotypiques contribuant aussi à la variabilité du virus.

1.5.2 Variabilité phénotypique

Les mutants du VHB sont généralement moins robustes que les souches de virus sauvage. Certaines mutations peuvent en effet affecter potentiellement l'assemblage, la stabilité ou l'infectivité du virion mais lui confèrent une meilleure adaptation à l'hôte et à la pression de sélection.

Ceci est démontré par le fait que ces mutants sont rarement transmis et qu'ils n'émergent pas en l'absence de pression de sélection. Les mutants de résistance aux traitements disparaissent d'ailleurs rapidement lorsque le traitement est arrêté (Kay *et al*, 2007).

Enfin quel que soit le type d'hépatite B chronique (active, inactive,...) c'est le portage prolongé qui favorise les interactions entre le virus et l'hôte et l'émergence de mutants.

Mutants pré-S1 et pré-S2

La plupart des mutations affectant le domaine pré-S sont des délétions. Il faut noter que ces mutations sont possibles car pré-S chevauche avec une région du gène P appelée spacer qui peut elle-même supporter une grande variabilité parce qu'elle joue un rôle dans la flexibilité de la polymérase mais n'intervient pas dans l'activité enzymatique.

Les mutants pré-S1 constituent généralement des populations virales minoritaires car bien que pouvant se répliquer ils ont généralement besoin d'un virus « helper » qui va compléter en protéine sauvage. Ceci est dû aux contraintes imposées par les fonctions importantes de pré-S1 (rôle des résidus 2-75 N-terminaux dans l'attachement à l'hépatocyte, morphogenèse et sécrétion du virion, présence du promoteur S en 3').

En revanche il y moins de contraintes à l'apparition de mutants pré-S2 que l'on retrouve plus fréquemment. Il peut s'agir de délétions, substitutions ou mutations non sens qui vont empêcher la synthèse de la protéine ou altérer des épitopes des lymphocytes B et T.

Les délétions ou substitutions touchant les épitopes des LTc ou LTh se situant sur pré-S1 et pré-S2 pourraient favoriser l'échappement immunitaire.

Ces mutants sont sélectionnés par le système immunitaire de l'hôte lors d'infections chroniques, on les retrouve souvent chez des patients traités par interféron.

Ils sont difficilement transmissibles et ne jouent probablement qu'un faible rôle dans l'évolution naturelle du virus si l'on excepte le génotype D qui a pu émerger malgré une

délétion de 33 nt au début du domaine preS1 (les sites de reconnaissance hépatocytaire sont intacts et la protéine est viable) (Kay *et al*, 2007).

Mutants de la protéine S

L'antigène HBs est, comme nous l'avons évoqué précédemment, la cible principale de la neutralisation virale par les anticorps anti-HBs induits naturellement ou par vaccination.

Cette pression immunitaire a pour conséquence l'apparition de mutants de la protéine S généralement au niveau de la région hydrophile majeure (99-169) formée de 3 boucles reliées par des ponts disulfures et exposée en surface de la particule.

La majorité des mutations rapportées sont de simples substitutions d'acides aminés au niveau du déterminant « a » (124-149) qui contient la plupart des épitopes pour les anticorps neutralisants. Ces mutants sont dits « d'échappement vaccinal » bien qu'ils peuvent être aussi retrouvés chez des personnes non vaccinées dans des populations virales minoritaires avant d'émerger sous pression immunitaire. On peut également en observer chez des patients transplantés hépatiques chez qui on utilise des immunoglobulines anti-HBs en prophylaxie.

Le premier mutant décrit, le plus étudié et de loin le plus fréquent comporte la substitution G145R. On peut citer de manière non exhaustive d'autres mutants associés à un échappement immunitaire : I/T126A/N, A128V, Q129H/R, G130N, M133L/T, K141E, S143L, D144A/H/E (Kay *et al*, 2007).

La plupart des ces variants ont une affinité réduite pour des anticorps monoclonaux dirigés contre le déterminant « a », il peut donc exister une diminution voire une absence de réactivité avec certains tests commerciaux de détection de l'Ag HBs. Aujourd'hui les tests sont très fiables et utilisent des cocktails d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux capables de reconnaître aussi les Ag HBs mutés (Kay *et al*, 2007).

De rares cas de délétions ainsi que de petites insertions dans la 1^{ère} boucle de l'Ag HBs (c'est-à-dire hors du déterminant « a ») ont aussi été rapportées. Ces dernières chez des patients détectés faussement négatifs pour l'Ag HBs ce qui montre que même en dehors du déterminant « a » des mutations peuvent affecter la structure de l'antigène (Carman *et al*, 1995).

On décrit encore d'autres substitutions en dehors du déterminant « a » comme P120S/T mais aussi Y100C, Q101H, S117N, T118R et même certaines en dehors de la région hydrophile majeure comme F183C qui provoque une réduction de l'affinité pour des anticorps monoclonaux (Oon *et al*, 1999).

Les autres déterminants « d/y » et « r/w » caractérisant les sérotypes et définis comme nous l'avons vu par le polymorphisme des résidus 122 et 160 peuvent également être importants pour la réponse immunitaire. Plusieurs cas d'échappement immunitaire ont été rapportés chez des patients où coexistaient des souches de sérotypes différents. Il est peu probable que ces patients aient été infectés successivement par ces différentes souches. L'émergence d'un second sérotype est donc certainement le résultat de la sélection par les anticorps d'un « mutant » en position 122 ou 160. Il faut cependant signaler que ce phénomène ne peut se produire que chez des patients dont la réponse humorale est restreinte et dirigée contre un seul épitope. En effet une étude sur un sérum contrôle venant d'une personne vaccinée a démontré que quelques soient les modifications protéiques en 122 et 160 aucune altération de la reconnaissance n'a été observée. Ceci montre le rôle des facteurs d'hôte (réponse immunitaire propre) et de la relation étroite entre l'hôte et le virus dans les phénomènes d'échappement (Margeridon *et al*, 2005).

Il est aussi important de noter que bien que certains mutants soient défectifs d'autres se répliquent parfaitement, sont stables dans le temps (notamment sous pression immunitaire) et peuvent être transmis. La plupart des transmissions rapportées sont verticales (mère/enfant et hôte/greffe) mais certaines sont horizontales.

De plus le taux d'erreurs important lors de la réPLICATION et le fait qu'un seul point de mutation est souvent suffisant devraient conduire à la prédominance de ces mutants notamment depuis l'augmentation de la pression de sélection par la vaccination de masse. Or ce n'est pas le cas. Il existe plusieurs explications différentes. Si l'inoculum est faible le mutant minoritaire peut être éliminé avant d'émerger, de plus il doit intégrer le pool d'ADNccc avant de pouvoir se propager ce qui est plus difficile si la mutation est à l'origine de déficiences et enfin la réponse immunitaire anti-HBs de l'hôte peut être dirigée contre d'autres épitopes que le muté. Les mutants de l'Ag HBs sont donc essentiels à l'échappement immunitaire mais pas suffisant car ils ne peuvent émerger que chez des patients dont la réponse anti-HBs est limitée et restreinte à certains épitopes (Kay *et al*, 2007).

Au cours de la réponse immunitaire il ne faut pas non plus oublier le rôle central des lymphocytes T helper (CD4+) capables de sécréter des cytokines et facteurs de croissance afin d'initier la réponse humorale (LB et anticorps) dont nous venons de voir l'importance et la réponse cellulaire (LTc-CD8+).

Aussi différentes régions de la protéine S contiennent des épitopes des LTh (au moins 4) et des LTc et de plus en plus de mutations d'échappement immunitaire sont décrites y compris au niveau de ces épitopes (Ramezani *et al*, 2013).

Les mutants des protéines d'enveloppe virale preS/S émergent donc sous pression immuno-thérapeutique (vaccination, immunoglobulines anti-HBS et réponse immunitaire de l'hôte surtout lorsque celle-ci est imparfaite).

Mutants preC/C/BCP

L'ORF preC/C possède 2 codons d'initiations en positions 1814 et 1901 sous le contrôle d'un promoteur commun (promoteur basal du core BPC) dont l'activité est modulée par les *enhancers* enh-1 et enh-2.

L'initiation de la transcription du 1^{er} codon donne naissance à un petit ARNm PC traduit en une pré-protéine précore-core dont la maturation protéolytique au niveau du réticulum endoplasmique aboutit à une protéine nommée **Ag HBe** sécrétée au niveau du compartiment sanguin.

La transcription du 2^{ème} codon donne naissance à l'ARNpg qui sert entre autre à la synthèse de la protéine de capsidé (protéine C) ou **Ag HBc** (*1.4 Le cycle de réplication virale*).

L'Ag HBe n'est pas essentiel à la réplication, sécrétion et infectivité mais est impliqué dans les phénomènes de persistance virale. En effet il induirait dans un premier temps un état d'immunotolérance (surtout chez le nouveau-né et l'enfant) en agissant comme unurre pour les lymphocytes T et protégeant ainsi les hépatocytes infectés qui exposent l'Ag HBc à leur surface. Puis dans un second temps lors d'une phase de clairance immunitaire il devient une cible majeure pour le système immunitaire entraînant l'élimination des hépatocytes infectés sécrétant l'Ag HBe (*2.1 Histoire naturelle de l'infection*).

La séroconversion en anticorps anti-HBe caractérise généralement la fin de la réplication virale et le début d'une phase de portage inactif pouvant aboutir à la résolution de la maladie. Cependant on retrouve aujourd'hui de plus en plus de patients anti-HBe positifs et Ag HBe négatifs présentant une réplication virale. Ces véritables hépatites B chroniques actives Ag HBe négatives correspondent à la sélection de **mutants précore** par la réponse immunitaire de l'hôte. Ces souches virales sont incapables de synthétiser l'antigène HBe (Ducancelle *et al*, 2011).

Ces hépatites chroniques prédominent largement en Afrique noire, dans le bassin méditerranéen et au Moyen-Orient et deviennent la forme majoritaire des infections chroniques à VHB en France mais aussi dans le monde (Ducancelle *et al*, 2011).

De nombreux mutants de la protéine core (Ag HBc) s'accumulent également au cours de l'infection chronique (insertions, substitutions, délétions) notamment au niveau de régions ciblées par les lymphocytes T et B et traduisent un échappement au système immunitaire de l'hôte, ils sont généralement défectifs et ne peuvent être transmis (à l'exception des génotypes A et G qui ont acquis naturellement une insertion de 2 et 12 codons au niveau du gène C (*tableau 2*)) (Kay *et al*, 2007).

Ce n'est pas le cas des mutants précores qui sont très stables et peuvent être transmis. Ainsi des infections de novo par ces mutants ont aussi été décrites (Wagner *et al*, 2004). Cependant le risque d'hépatite chronique chez l'enfant né de mère HBe – est généralement moins élevé que dans le cas des mères hépatites chroniques HBe + ; la virémie est généralement plus basse chez ces patientes et l'absence d'Ag HBe n'induit pas la tolérance immunitaire favorable à la chronicité (Kay *et al*, 2007).

Il existe deux classes de mutants qui affectent l'expression de l'Ag HBe :

- **les mutants précores** pour lesquels l'expression de l'Ag HBe est **totalemenabolie**.

La mutation la plus fréquente (95% des cas) transforme le codon 28 de la région preC en codon stop (non sens) ce qui arrête la transcription de l'ARNm PC. Cela correspond à la substitution **G1896A**.

Cette mutation est rare pour les génotypes A, F et H (*tableau 3*). Le nucléotide 1896 se trouve en effet aussi au niveau du signal d'encapsidation ε de l'ARNpg où il interagit avec le nucléotide 1858 pour former une structure secondaire nécessaire à l'encapsidation de l'ARNpg. Pour les génotypes B, D, E, C le nucléotide 1858 est un T et peut parfaitement interagir avec le nucléotide 1896 muté ce qui n'est pas le cas des génotypes A, F, H qui ont un C en 1858. L'encapsidation et la réplication seraient alors déstabilisées. Il faudrait pour ces génotypes une deuxième mutation (C1858T) pour avoir un mutant précore viable (Kay *et al*, 2007).

Il existe de nombreuses autres mutations (substitutions, non sens, décalage du cadre de lecture) de la région précore qui modifient la traduction de l'ARNm PC (*figure 14*).

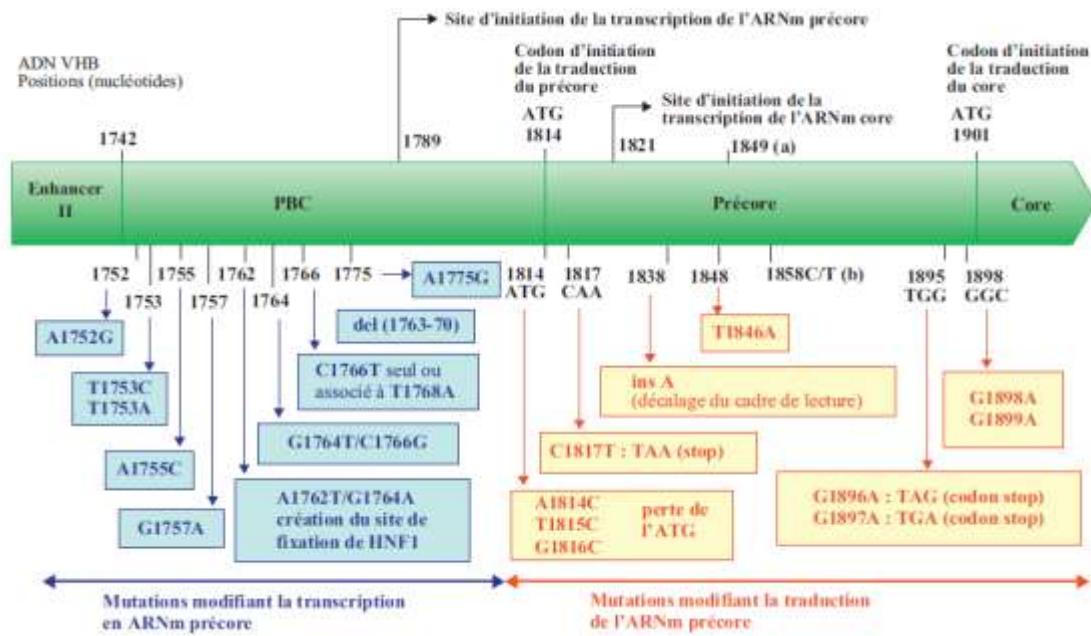


Figure 14. Cartographie des mutations décrites dans la région précore et promoteur basal du core (BCP) du VHB (Ducancelle et al, 2011)

- **les mutants du promoteur basal du core (BCP)** pour qui la transcription de l'ARNm PC va être modifiée entraînant à minima une **diminution de la synthèse de l'Ag HBe**. La mutation du BCP la plus retrouvée chez des patients anti-HBe+/Ag HBe- est la double substitution **A1762T/G1764A**.

Le BCP possède des sites de fixation pour des facteurs nucléaires de transcription qui peuvent favoriser la transcription des ARNm PC et/ou ARNpg. Il semble que la double mutation élimine ces sites et induise une baisse de la réplication virale (ARNpg) et de l'expression de l'Ag HBe (ARNm PC). Inversement dans un contexte favorable la double mutation peut créer un site pour un autre facteur de transcription (HNF1) dont l'activité est aussi associée à une diminution des ARNm PC mais à une réplication virale *in vitro* normale voire augmentée.

D'autres mutations ont été décrites (*figure 14*) qui, associées à la double mutation précédente, peuvent entraîner une baisse encore plus importante de la sécrétion d'Ag HBe. On observe encore dans certains cas une réplication virale *in vitro* normale voire largement augmentée. Ce dernier point peut paraître surprenant lorsque l'on sait que ces patients HBe- ont généralement une charge virale plus basse (10 à 100 fois). Cela s'explique probablement *in vivo* par l'élimination plus efficace des cellules infectées

en raison de la diminution de l'Ag HBe (baisse de l'immunotolérance) alors que la réPLICATION élevée dans les rares cellules restantes va assurer la chronicité. Les mutants BCP ont d'ailleurs souvent été impliqués dans des maladies sévères du foie et hépatites fulminantes en raison de réponses immunitaires exacerbées (Kay *et al*, 2007).

En dehors des infections de novo les mutants précores/BCP émergent au cours de l'histoire naturelle de l'hépatite B chronique sous **pression immunitaire de l'hôte** (LTc anti-HBe). Les populations virales sauvages sont remplacées progressivement par les mutants notamment au moment de la séroconversion anti-HBe (qui ciblent les hépatocytes hébergeant le virus sauvage) (Pawlotsky, 2005).

Comme nous l'avons évoqué précédemment la fréquence de ces mutations est variable en fonction du génotype. Il est intéressant de noter que le génotype G possède à l'état sauvage les mutations BPC et précore et ne peut donc jamais synthétiser l'Ag HBe. Une étude à montrée que lors de mono-infections aiguës par le génotype G les patients étaient bien Ag HBe-/AC anti-HBe-. Cependant certains patients infectés chroniquement par le génotype G étaient Ag HBe+. Il est possible que les 12 acides aminés supplémentaires de l'Ag HBc aient une séroréactivité « Ag HBe-like » ou bien que le génotype G n'aboutisse à la chronicité qu'en cas de co-infection avec un autre virus (souvent de génotype A) supplémentant en Ag HBe (favorable à la persistance) (Kay *et al*, 2007).

Genotype/subtype	None	BCP	Codon 28	Both
A	80(56%)	54(38%)	1(1%)	7(5%)
B	61(43%)	13(9%)	47(33%)	21(15%)
B1	10(31%)	1(3%)	18(56%)	3(9%)
B2	42(47%)	10(11%)	23(25%)	17(18%)
B3	4(67%)	0	2(33%)	0
B4	5(42%)	2(17%)	4(33%)	1(8%)
C	77(30%)	125(48%)	13(5%)	46(18%)
C1	51(28%)	78(42%)	11(6%)	44(24%)
C2	23(31%)	47(64%)	2(3%)	2(3%)
C3	3(100%)	0	0	0
D	62(41%)	23(15%)	41(27%)	25(17%)
E	29(78%)	4(11%)	0	4(11%)
F	34(83%)	2(5%)	1(2%)	4(10%)
G	0(0%)	0(0%)	0(0%)	13(100%)
H	7(70%)	3(30%)	0(0%)	0(0%)
Primates	41(89%)	0(0%)	5(11%)	0(0%)

Tableau 3. Fréquence des mutants BCP et précore suivant le génotype (Kay *et al*, 2007)

Le rôle des mutants PC et BCP sur l'évolution de la maladie et la sévérité des lésions hépatiques restent encore à préciser aujourd'hui. Cependant des études ont montré que des

mutants PC/BCP étaient très souvent incriminés dans des tableaux d'hépatites aiguës graves et fulminantes. La diminution de l'Ag HBe romprait la tolérance immunitaire provoquant une nécrose importante des hépatocytes porteurs de l'Ag HBC.

De même au cours des infections chroniques d'autres études ont montré l'association entre mutants précores et score de fibrose élevé (F3/F4) avec notamment une prévalence plus élevée de fibroses sévères et cirrhoses décompensées.

Le rôle potentiel des mutations PC/BCP dans la survenue d'un carcinome hépatocellulaire a également été envisagé avec des études qui ont montré l'association significative entre la présence de ces mutations (notamment des combinaisons de mutations) et le risque de CHC (Ducancelle *et al.*, 2011).

Mutants de la protéine X

De nombreuses mutations affectent également la protéine X au cours de l'infection. Certaines sont liées aux mutations du promoteur basal du core (BCP) en raison du chevauchement des séquences (A1762T/G1764A → V131I et F132Y). On en connaît très peu sur l'impact de ces mutations sur la protéine et les voies de transduction.

Mutants de la polymérase

Les mutants de la polymérase émergent sous pression thérapeutique avec l'utilisation des analogues nucléos(t)idiques dont la cible est précisément l'enzyme virale. Nous reviendrons sur ces mutants dans la partie (2.6.4 *Mutants de résistance aux traitements*).

Pour conclure sur la variabilité du VHB il faut rappeler que l'une des caractéristiques du virus est la dualité de son génome (*1.4 Le cycle de réplication virale*). Les mutations générées apparaissent dans un premier temps au niveau de l'ADNrc suite à l'étape de transcription inverse puis, pour être transmises de manière stable, elles doivent intégrer le pool d'ADNccc soit par recyclage nucléaire soit en infectant de nouveau hépatocytes.

Le nouveau mutant est alors en compétition avec un large excès d'autres génomes de virus sauvages ou mutés. Cela implique l'émergence de nouveaux mutants plus lente qu'avec d'autres virus et des effets phénotypiques retardés. La deuxième conséquence est la présence chez les patients chroniquement infectés de plusieurs « quasi-espèces » qui peuvent évoluer au cours de l'infection chronique selon les pressions qu'elles subissent. Ce patrimoine génétique collectif nommé pool génétique permet en effet l'expression du phénotype le plus approprié (Kay *et al.*, 2007).

II. L'infection à VHB

2.1. Épidémiologie

Le VHB, malgré la disponibilité d'un vaccin efficace et bien toléré depuis 1986 reste un problème majeur de santé publique. En effet plus de 2 milliards de personnes dans le monde présentent une sérologie évoquant une infection ancienne ou en cours à VHB. On estime que 400 millions ont une infection chronique et risquent de développer des pathologies hépatiques liées au virus (essentiellement cirrhose et carcinome hépatocellulaire).

D'autre part l'infection par le virus de l'hépatite B fait entre 500 000 et 1 200 000 morts chaque année (WGO, 2008).

La prévalence du VHB est cependant variable d'une région à l'autre du monde. On distingue généralement dans la littérature des régions d'endémie haute (prévalence Ag HBs $\geq 8\%$), moyenne (2-8%) et faible (< 2%). Récemment une nouvelle catégorie de très basse endémie a émergé (Beutels, 2001).

La prévalence de l'infection varie ainsi de plus de 10% de la population en Afrique sub-saharienne et en Asie du Sud-est à moins de 1% en Europe occidentale et en Amérique du Nord. Globalement environ 45% de la population mondiale vit dans des zones de haute endémicité (Dawson, 2005) (*figure 15*).

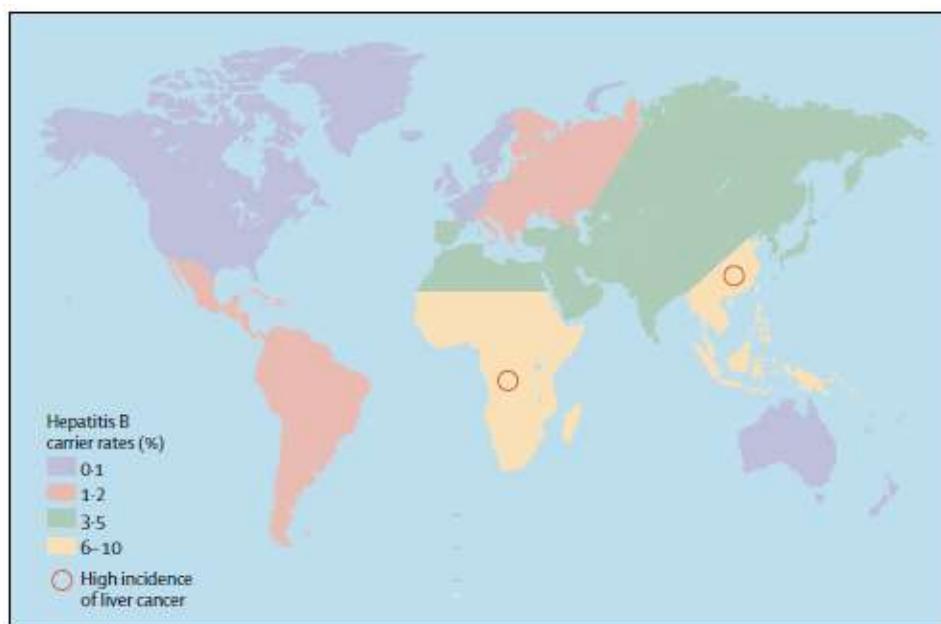


Figure 15. Prévalence de l'infection à VHB (d'après Dawson, 2005)

Comme nous l'avons évoqué précédemment le VHB présente une grande variabilité de séquence. On connaît donc aujourd’hui 8 génotypes de VHB (A-H), reflets de l’hétérogénéité de l’antigène HBs, caractérisés par une divergence de leurs séquences respectives de plus de 8% ou d’au moins 4% pour le gène de surface (S, pré-S1, pré-S2).

Ces 8 génotypes ont une distribution géographique différente dans le monde (*figure 16 et 17*). Le génotype A se situe essentiellement en Europe Occidentale (A2), Amérique du Nord (A2) et Afrique (A1). Les génotypes B et C sont caractéristiques de l’Asie (Chine, Japon, Asie du sud-est) et de l’Océanie alors que le génotype D a une répartition mondiale mais prédomine dans le bassin méditerranéen. Le génotype E est très présent en Afrique de l’ouest et a été observé dans de rares cas en France et Grande-Bretagne probablement en raison de l’immigration, le génotype F est plus caractéristique des populations autochtones d’Amérique du Sud. Le génotype H est lui confiné aux populations amérindiennes d’Amérique centrale ainsi qu’à la Polynésie.

On en connaît très peu sur la répartition du génotype G qui n’a à ce jour été retrouvé que chez des patients isolés en Europe, Amérique du nord et Japon.

L’origine ethnique et le pays d’origine des individus porteurs de VHB peuvent ainsi être associés à certains génotypes (Kramvis *et al*, 2005).

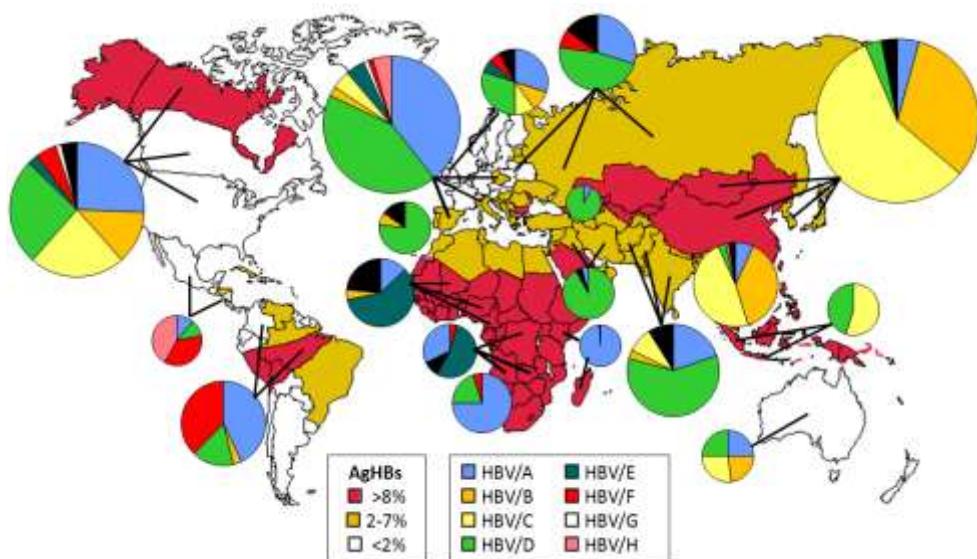


Figure 16. Répartition mondiale des différents génotypes (d’après Kurbanov *et al*, 2010)

Il faut bien sûr noter qu’au cours des dernières décennies la mondialisation de l’économie, l’explosion des moyens de transport et l’augmentation des flux migratoires des pays pauvres vers les pays riches tendent à éroder ces distinctions dans la distribution géographique des différents génotypes. On trouve par exemple beaucoup de génotypes B et C aux USA chez

des porteurs d'origine asiatique et H chez des latino-américains ou encore la coexistence des génotypes A et E dans le bassin méditerranéen reflet de populations d'origine africaine (Hannoun *et al*, 2002).

La connaissance de ces génotypes est bien évidemment importante d'un point de vue épidémiologique mais peut également avoir un impact clinique. Certaines études ont par exemple montré que les patients infectés par un VHB de génotype C développent plus fréquemment et plus précocement des pathologies chroniques du foie (notamment carcinome hépatocellulaire) que les patients infectés par les VHB de génotypes B et D. Le taux de séroconversion HBe est d'ailleurs plus bas chez les patients porteurs du génotype C et le taux d'ADN viral y est plus élevé et de manière prolongée. Le génotype B est lui associé à plus d'hépatites fulminantes et épisodes sévères d'exacerbations aigues d'hépatite B chronique (Chan *et al*, 2003).

Il a également été suggéré que le génotype A conduit à plus d'infections chroniques que le génotype D dans des pays où coexistent les 2 génotypes (Mayerat *et al*, 1999). Cependant le suivi au long terme de patient porteurs chroniques en Espagne a montré que le taux de clairance virale spontanée était significativement plus élevé pour les génotypes A (Sanchez-Tapias *et al*, 2002).

On peut enfin noter qu'aucune corrélation n'a été à ce jour définie entre le génotype HBV et la réponse à la thérapie antivirale (Kay *et al*, 2007).

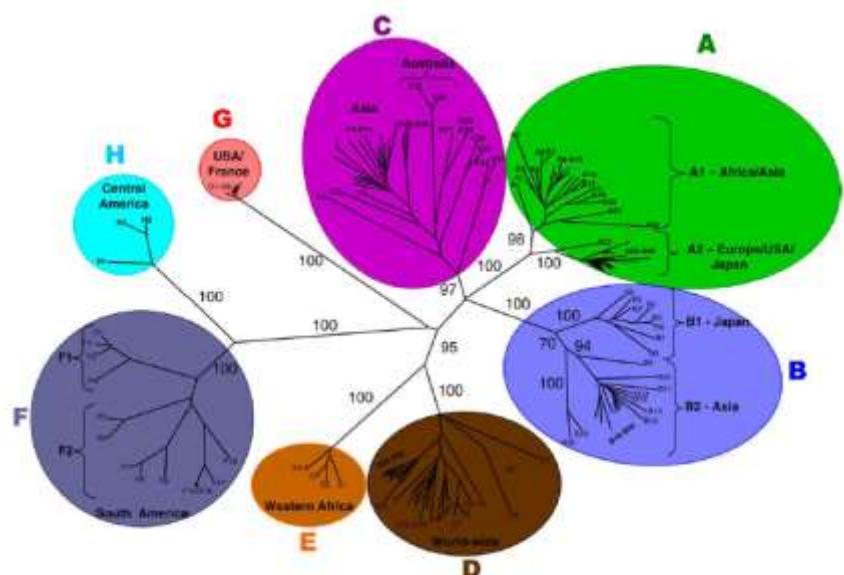


Figure 17. Arbre phylogénétique de 175 séquences de génome VHB. Génotypes et répartition géographique (Kramvis *et al*, 2005)

Concernant la France nous avons vu que celle-ci se situe dans une zone de très basse endémie. Une enquête nationale a été conduite en 2004 sur la population générale. Celle-ci a permis d'estimer la prévalence de l'antigène HBs à 0.68% (**figure 18**) ce qui correspondait à 300 000 cas d'hépatite B chronique. Parmi ces personnes 45% se savaient positives vis-à-vis de l'antigène HBs. Par ailleurs la prévalence des anticorps anti-HBc était de 7.3% indiquant que plus de 3 millions de personnes ont été en contact avec le VHB.

L'incidence en France est quant à elle de 30 000 à 60 000 nouveaux cas par an chez les plus de 20 ans dans 90% des cas (Meffre, INVS 2006).



Figure 18. Estimation du taux de prévalence du portage de l'Ag HBs en France (2003-2004) (INVS, 2006)

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

Une enquête nationale réalisée en 2004-2005 sur la mortalité liée à l'hépatite B a permis d'imputer 1507 décès au virus ce qui correspond à un taux de mortalité de 2.6 pour 100 000. Ce taux de décès est 2.5 fois plus important chez l'homme que chez la femme avec un âge moyen de 65 ans. Le stade de la maladie au moment du décès est au moins une cirrhose dans 93% des cas et un carcinome hépatocellulaire sur cirrhose dans 33% des cas (Péquignot *et al*, 2008).

Il est également intéressant de se faire une idée de la répartition des différents génotypes en France. On peut pour cela s'appuyer sur les résultats d'une enquête menée chez les donneurs de sang français entre 2005 et 2010. Il a été retrouvé 42,4% de génotype D, 27,2% de

génotype A, 16,8% de génotype E, 6,5% de génotype C, 6,3% de génotype B et 0,7% de génotype F. Cette répartition est restée stable au cours des dernières années.

L'origine géographique des donneurs est bien corrélée à certains génotypes comme nous l'avons vu précédemment (Laperche *et al*, 2012).

2.2. Histoire naturelle de l'infection

Le virus de l'hépatite B est présent dans les fluides corporels (sang, salive, sécrétions sexuelles, lait maternel) de tout individu atteint d'infection chronique ou aiguë. Il est très résistant dans le milieu extérieur, on estime ainsi qu'il est 10 fois plus contaminant que le VHC et 100 fois plus contaminant que le VIH.

Génotype	Régions géographiques	Mode de transmission principal	Infection chronique (%)	Age médian de conversion de l'HB
A	Europe de l'Ouest	Sexuel, Utilisation de drogues par voie intraveineuse	< 1	20
	Amérique du N			
	Afrique du Sud			
B	Extrême Orient	Vertical	1-12	40
	Asie du Sud Est			
C	Extrême Orient	Vertical	1-10	30
	Asie du Sud Est			
D	Inde	Vertical "aiguilles," sexuel, nosocomial	< 1-5	20
	Moyen Orient			
	Europe du Sud			
E	Afrique	Horizontal, nosocomial	3-25	< 10
F	Amérique du Sud	Sexuel, vertical?	1	?
	Polynésie			

Tableau 4. Génotypes, modes de transmission et prévalence dans le monde
(d'après Allain, 2006)

Les modes de transmission du VHB sont variés : sexuel, parentéral (utilisation de drogues IV, dons du sang dans certains pays, hémodialyse, accidents d'exposition au sang, piercing, tatouages,...), horizontal (contact étroit au sein d'une collectivité, jeux d'enfants) et vertical (le risque de transmission mère enfant est d'autant plus élevé que la charge virale de la mère est élevée) (WGO, 2008).

Ces voies de contamination ont une répartition inégale dans le monde (*tableau 4*). En Asie où la plupart des patients ont une charge virale élevée ($>10^5$ copies/mL) le risque de transmission verticale est très important. A contrario des études menées en Afrique de l'Ouest sur la charge virale de femmes en âge de procréer ont montré que seulement une minorité était susceptible de transmettre verticalement le virus. Les charges virales élevées sont plutôt

retrouvées chez les jeunes enfants nouvellement infectés lors de transmissions horizontales. En Europe le VHB est surtout contracté à l'âge adulte par voie sexuelle ou par injection de drogues en IV.

L'histoire naturelle de l'hépatite B est décrite dans la *figure 19* ci-dessous. L'infection chronique est définie par la présence de l'antigène HBs depuis au moins 6 mois dans le sérum d'un individu. Elle fait suite à une infection aiguë, asymptomatique dans 60 à 80% des cas, qui échappe au contrôle par le système immunitaire de l'hôte. La présentation clinique est très variable d'une personne à l'autre avec des porteurs totalement asymptomatiques. L'évolution naturelle est la destruction plus ou moins rapide du parenchyme hépatique avec risque de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire pouvant aboutir au décès du patient. Les facteurs de mauvais pronostics sont relatifs au virus (génotype, mutant pré-C, co-infection VIH, VHC, VHD), à l'hôte (âge avancé au diagnostic, sexe masculin, sévérité de l'atteinte hépatique) ou externes (alcoolisme, tabagisme).

Il faut noter que le taux de passage à la chronicité suite à une infection aiguë est lié à l'âge du sujet au moment du contagé. En effet celui-ci est proche de 100% chez le nouveau-né puis décroît de 20 à 50% chez l'enfant et jusqu'à 1 à 5% chez l'adulte immunocompétent. Ceci est en relation avec la maturation du système immunitaire. Il y donc plus d'hépatite B chronique dans les pays où la transmission durant l'enfance est plus importante (*tableau 4*) (Allain, 2006).

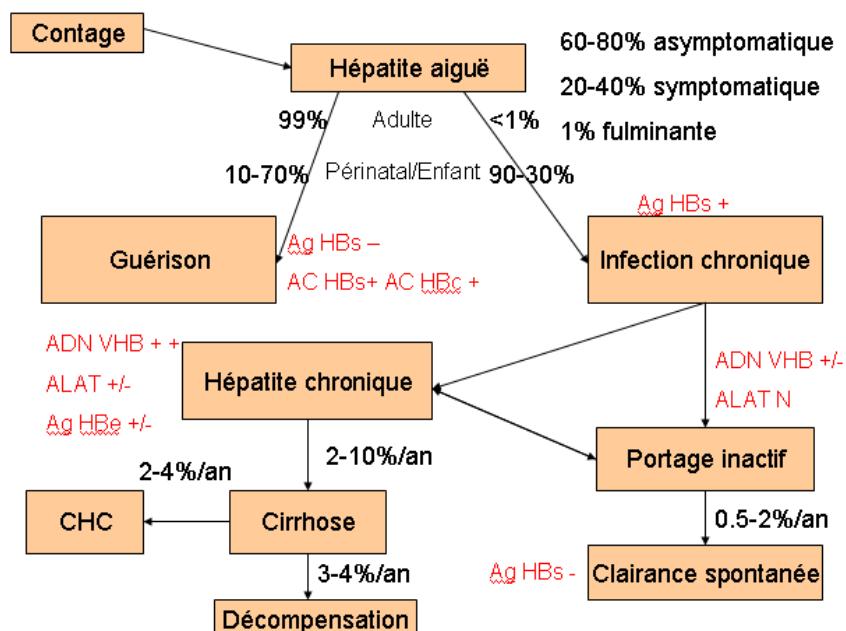


Figure 19. Histoire naturelle du VHB (d'après Fattovich *et al*, 2008)

Si l'on se focalise sur l'histoire naturelle de l'hépatite B chronique en dehors de tout traitement, on décrit généralement plusieurs phases successives déterminées par les interactions entre la réplication virale et la réponse immunitaire de l'hôte (*figure 20*).

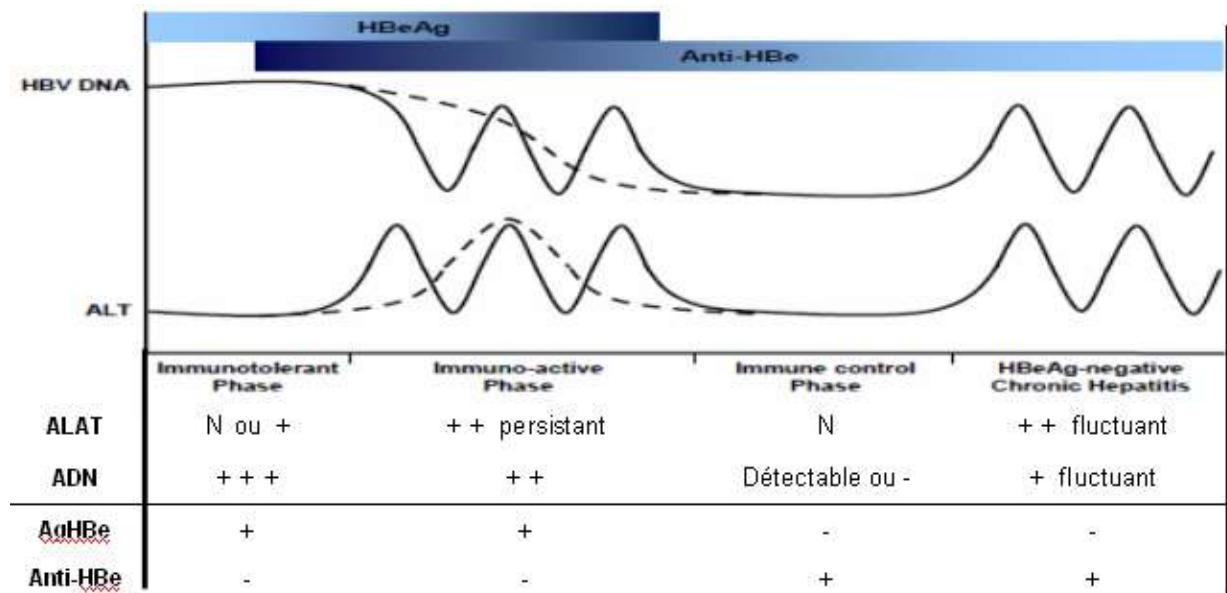


Figure 20. Infection chronique par le virus de l'hépatite B : phases de l'infection
(d'après Buster & Janssen, 2006)

La première phase est une **phase d'immunotolérance** au cours de laquelle les patients ont généralement un antigène HBe positif. La réplication virale est intense et la réponse immunitaire de l'hôte minimale. Il n'y a pas d'inflammation ni nécrose hépatique. Les niveaux de transaminases dans le sérum sont normaux. La durée de cette période est variable. Elle peut durer de nombreuses années chez les individus infectés en période périnatale ou tôt dans l'enfance (très fréquent en Asie), elle est généralement très courte ou absente lors d'une infection à l'âge adulte. Les patients sont hautement contagieux au cours de cette phase.

S'ensuit alors une **phase de réaction immune ou clairance immunitaire** qui peut durer de quelques mois à quelques années. Elle survient plus rapidement et plus fréquemment chez les personnes infectées à l'âge adulte. La réplication virale est moins intense mais l'ADN du VHB est toujours détectable et peut rester à des niveaux élevés. La tendance est toutefois la décroissance progressive de l'ADN. On observe aussi une cytotoxicité hépatique modérée à sévère, comme en témoigne l'élévation dans le sérum des transaminases hépatiques, associée à des niveaux variables de fibroses sur les biopsies hépatiques. Ces phénomènes sont liés à la réponse immunitaire de l'hôte présente mais incomplète.

Une conséquence importante est la séroconversion de l'antigène HBe en anticorps anti-HBe correspondant au passage à la **phase de contrôle immunitaire ou de portage inactif**

caractérisée par une virémie très faible voire indétectable, des transaminases normales et un niveau de fibrose minimal. L'évolution est favorable à long terme avec un faible risque de cirrhose ou de CHC dans la plupart des cas. Dans le cas idéal peut survenir **la clairance spontanée de l'antigène HBs** associée ou non à la séroconversion en anticorps anti-HBs. L'ADN est généralement indétectable. Lorsqu'il est détectable à un faible niveau dans le foie ou dans le sérum on parle d'infection à VHB occulte.

Comme l'ADNccc superenroulé du virus persiste dans le foie un certain nombre de porteurs inactifs peuvent réactiver spontanément ou après immunosuppression active. Il peut s'agir du virus sauvage (HBe positif) mais dans la plupart des cas il s'agit de la sélection d'un mutant précore. C'est **la phase d'hépatite chronique antigène HBe négative** avec fluctuation de la virémie (généralement moins élevée que chez les patients HBe positifs), des transaminases et de l'activité inflammatoire hépatique. Il est parfois difficile de distinguer ces patients des vrais porteurs inactifs puisqu'ils connaissent aussi des phases de rémission spontanée. Mais contrairement aux porteurs inactifs ces patients ont une hépatite active et le risque d'évolution progressive vers la cirrhose est souvent plus élevé que chez les patients antigène HBe positifs (Fattovich *et al*, 2008).

2.3. Physiopathologie

L'hépatite B est une pathologie hépatique nécroinflammatoire de sévérité variable. En effet après une phase aiguë, symptomatique ou non, les patients évoluent comme nous l'avons vu vers la guérison spontanée ou vers la chronicité. Cette dernière va du simple portage inactif à l'hépatite chronique associée à une inflammation et à des épisodes intermittents de destruction hépatocytaire.

Le virus de l'hépatite B n'est cependant pas directement cytopathogène. Nous allons ainsi voir le rôle crucial de la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis des antigènes viraux dans le devenir d'une infection aiguë par le VHB.

Des études ont montré, au cours des premières phases de l'infection, l'absence de transcription intrahépatique de gènes inductibles par l'interféron (ISG) et donc l'absence de mécanismes antiviraux intracellulaires. Ceci démontre que le virus n'induit pas de réponse immunitaire innée. Cette « invisibilité » est probablement le reflet de sa stratégie de réPLICATION et permet son expansion généralisée dans le foie durant la phase précoce.

L'infection peut ensuite être contrôlée par la réponse immunitaire adaptative ou spécifique. La clairance virale est alors le résultat de l'action des lymphocytes T cytotoxiques (LT-CD8+) dirigés contre les antigènes du virus. Ils vont provoquer, par contact direct, la lyse des cellules infectées et donc être responsable des lésions au niveau du foie qui se manifestent notamment par l'accroissement des transaminases. Ils sont également à l'origine de mécanismes non cytopathogènes en sécrétant des cytokines comme l'interféron γ (IFN γ) ou le TNF α capables d'inhiber la réplication intracellulaire du virus. D'autres cytokines comme les interférons α ou β peuvent aussi participer à la clairance virale. Ces bras immunitaires multiples expliquent que l'infection est presque toujours contrôlée chez l'adulte immunocompétent.

Cependant l'afflux important et synchrone de LT-CD8+, nécessaire à la clairance, ne peut se faire sans un amorçage précoce de la réponse cellulaire en LT-CD4+ c'est-à-dire avant ou au moins au début de la phase de propagation virale. Des études ont montré que les forts inocula favorisent cet amorçage grâce à la présence de particules subvirales en large excès.

Les lymphocytes T-CD4+ initient également la réponse humorale. Les anticorps anti-HBs dirigés contre l'antigène d'enveloppe apparaissent alors plus tardivement. Ils contribuent donc peu à la première phase de la clairance virale mais empêchent la propagation à partir de rares cellules infectées après la résolution de l'infection et sont protecteurs vis à vis d'une réinfection (Chisari et al, 2010).

Dans certains cas l'amorçage précoce des LT-CD4+ ne se fait pas. C'est le cas lors de dysfonctionnements de l'immunité (anomalies qualitatives et/ou quantitatives) ou avec les faibles inocula. La faible réponse en LT-CD8+ qui s'ensuit favorise alors la chronicité.

Des facteurs propres au virus peuvent également être impliqués dans les mécanismes de persistance virale. Chez le nouveau-né, dont le taux d'infection chronique est presque de 100%, un état de tolérance immunitaire peut s'instaurer suite au passage transplacentaire de la protéine précore Ag HBe. On peut noter ici que les enfants nés de mère Ag HBe- et ayant subi une réplication virale font généralement une hépatite aiguë durant la période néonatale qui sera ensuite évacuée. Ce cas de figure est cependant rare car ces femmes ont généralement une virémie basse et transmettent peu l'hépatite B à leurs enfants.

D'un point de vue plus général la persistance de l'antigène HBe est un facteur de persistance virale. Il peut en effet diminuer la réponse immunitaire notamment la réponse humorale et cellulaire anti-HBc.

D'autres protéines peuvent être associées à la persistance virale. L'antigène HBs peut être tolérogène à forte dose (niveaux bas de LT-CD8+ anti-HBs chez ces patients), la protéine X surexprimée peut inhiber l'activité du protéasome cellulaire et donc interférer avec son rôle dans la présentation de l'antigène.

Enfin le statut d'organe immunotolérant du foie et la longue demi-vie des cellules hépatocytaires et du pool d'ADNccc contribuent à la persistance (Chisari et al, 2010).

D'autre part au cours des hépatites B chroniques actives les patients sont exposés au risque de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire (CHC). En effet la réponse immunitaire inefficace entraîne des réactivations périodiques et fluctuations des transaminases. Cette destruction hépatocytaire associée à un bas niveau de régénération entraîne la fibrose et expose au risque de cirrhose.

De plus s'ajoute à cette mitogénèse importante un risque de mutagenèse. L'inflammation chronique entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène pouvant causer des dommages oxydatifs de l'ADN, des déréglementations de la transcription et altérer les fonctions de réparation et de détoxification cellulaire ce qui provoque au cours du temps des changements génétiques et chromosomiques multiples. A cela s'ajoute le risque d'intégration de l'ADN du VHB dans certaines zones clés du génome ainsi que l'action de la protéine X virale qui peut transactiver des gènes cellulaires associés au contrôle de croissance cellulaire, interférer avec des facteurs de transcription, des suppresseurs de tumeurs (p53) et des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. L'ensemble de ces mécanismes est à l'origine de la carcinogenèse au cours de l'infection par le virus de l'hépatite B.

(Chisari et al, 2010).

2.5. Sérologie et diagnostic

Hépatite B aiguë

Au cours de la **phase précoce** d'une hépatite B aiguë on peut détecter la présence de l'Ag HBs, de l'Ag HBe et de l'ADN viral. La **phase aiguë ou d'état** est marquée par l'apparition des anticorps anti-HBc de type IgG et IgM. S'ensuit alors une **phase de convalescence** marquée par la décroissance progressive de l'Ag HBs, de l'Ag HBe, de l'ADN viral et des anti-HBc-IgM avec apparition des anticorps anti-HBe. **L'infection guérie** est caractérisée par l'apparition des anticorps anti-HBs, l'ADN viral pouvant être encore faiblement positif.

L'infection ancienne est définie par la présence des anticorps anti-HBc associée à un ADN viral non détectable. Les anticorps anti-HBs et anti-HBe peuvent persister ou disparaître (*figure 21*).

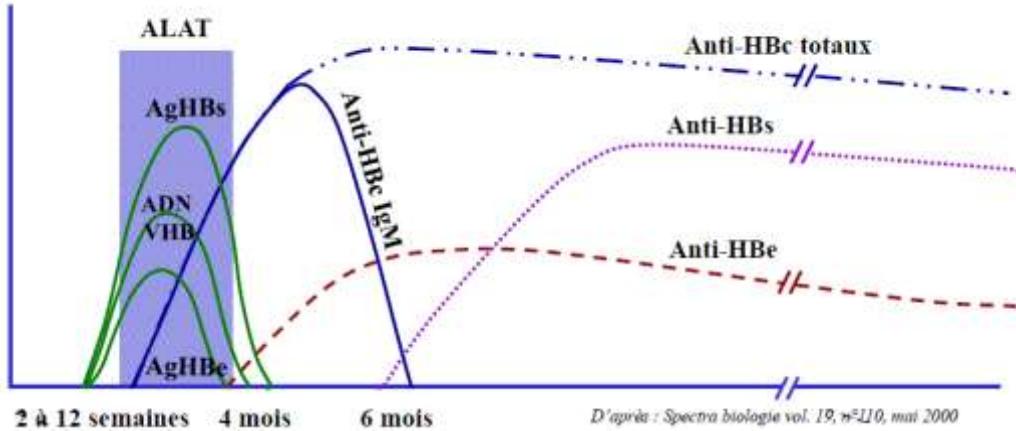


Figure 21. Les différents marqueurs lors d'une hépatite B aiguë

Le diagnostic d'une hépatite B aiguë repose alors sur le dosage **des transaminases, de l'Ag HBs, des anti-HBc IgM, des anti-HBe**. On peut doser également l'**Ag HBe** dont la persistance est prédictive d'une évolution vers la chronicité.

L'apparition des anticorps **anti-HBs** après négativation des antigènes marque la guérison. Le dosage de l'ADN viral par biologie moléculaire (PCR) ne présente pas d'intérêt.

Hépatite B chronique

Suite à un épisode d'hépatite B aiguë non résolue avec persistance de l'ADN viral, de l'Ag HBe et de l'Ag HBs **au-delà de 6 mois**, l'hépatite B chronique s'installe (**Ag HBs + et anti-HBc +**) et démarre par la **phase d'immunotolérance** plus ou moins longue caractérisée par l'Ag HBe positif, la charge virale élevée et les transaminases normales, s'ensuit alors la **phase d'immunoélimination** avec Ag HBe positif, charge virale un peu moins élevée, transaminases élevées et des anticorps anti-HBc IgM pouvant parfois se positiver à nouveau.

La **phase de latence virale** (portage inactif) fait suite à une immunoélimination efficace et s'accompagne de la séroconversion dans le système « e » (Ag HBe négatif, anti-HBe positif) avec charge virale très basse ou indétectable et transaminases normales.

Il peut s'ensuivre une **réactivation virale** (charge virale élevée, transaminases élevées et anti-HBc IgM pouvant se positiver), la **sélection d'un mutant pré-C** (charge virale élevée,

transaminases fluctuantes, Ag HBe négatif) et parfois la **clairance spontanée de l'AgHBs et/ou non la séroconversion** (Ag HBs négatif, anti-HBs positif) (*figure 22*).

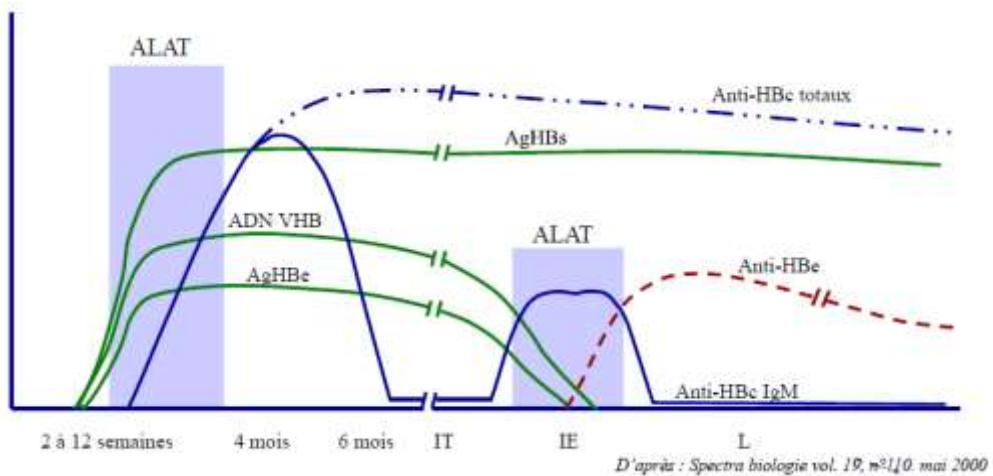


Figure 22. Les différents marqueurs lors d'une hépatite B chronique

Le diagnostic de l'hépatite B chronique repose sur le dosage de l'**Ag HBs** suivi **d'un test de confirmation avec persistance au-delà de 6 mois**.

On dose également l'**Ag HBe** et les **anticorps anti-HBe**.

Les anticorps anti-HBc sont positifs, les IgM sont souvent négatifs, les anticorps anti-HBs négatifs. Leurs dosages présentent peu d'intérêt pour le diagnostic.

Lors d'un premier bilan d'hépatite B chronique on mesure également **l'ADN viral (charge virale)** par biologie moléculaire (hybridation, PCR) afin d'évaluer le niveau de réplication virale.

La détermination de la charge virale est également essentielle dans la décision d'instaurer un traitement ou non. Elle fait aussi partie du suivi régulier des patients : porteurs chroniques inactifs (annuel), patients réplicatifs non traités, patients traités (efficacité du traitement, prédition de la réponse, détection précoce d'une résistance).

Elle permet aussi lors du bilan d'un anticorps anti-HBc isolé de distinguer l'infection ancienne résolue (avec perte des anticorps anti-HBs) de l'infection occulte (avec Ag HBs négatif).

En parallèle il faut évaluer la sévérité de la maladie hépatique par un **bilan biologique hépatique** incluant le dosage des transaminases (ASAT, ALAT), des γ GT, des phosphatases alcalines (PAL), de la bilirubine, de l'albumine sérique, la numération de formule sanguine et

le temps de prothrombine (TP). Le suivi des **transaminases** doit être longitudinal puisque tous les patients hépatite B chroniques n'ont pas constamment des transaminases élevées (niveau d'ALAT normal au cours de la phase d'immunotolérance et chez les porteurs inactifs et normal par intermittence chez certains patients Ag HBe -).

Sont recherchés également les autres causes de maladie hépatique chronique comme les co-infections avec le VIH, VHC, VHD et co-morbidités (alcoolisme, maladies auto-immunes, maladies métaboliques). Le statut sérologique VHA est également important afin de vacciner le patient si nécessaire.

Une **biopsie hépatique** est souvent recommandée afin d'évaluer le niveau d'activité nécroinflammatoire et de fibrose sauf en cas de cirrhose évidente ou chez les patients pour qui le traitement est indiqué indépendamment du grade d'activité et de fibrose.

La biopsie peut parfois être utile pour faire la distinction entre une hépatite B aiguë sévère et un épisode de réactivation d'une hépatite B chronique (EASL, 2012).

Il existe également un intérêt grandissant pour les **méthodes non invasives** d'évaluation de la fibrose hépatique notamment chez les patients pour qui la biopsie n'est pas recommandée (porteurs inactifs, décision de traitement indépendante du score de fibrose, cirrhotiques) (EASL, 2012). On peut citer l'élastographie impulsionnelle (Fibroscan®) ou les tests utilisant des marqueurs sériques comme le Fibrotest®.

2.6. Traitements et prévention anti-VHB

2.6.1. Les molécules et leurs cibles

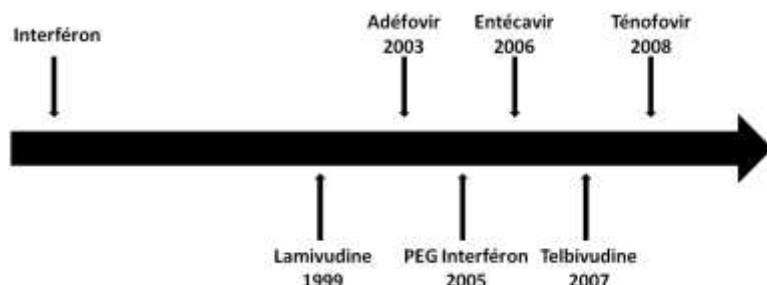


Figure 23. Chronologie d'apparition des traitements anti-VHB

- **Interféron α -2a (Roferon A®) et interféron α -2b (Intron A®)**
- **PEG Interféron α -2a (Pegasys®):** l'interféron est couplé au polyéthylène glycol (PEG) ce qui permet une diminution de la clairance rénale et une meilleure biodisponibilité avec des concentrations plasmatiques stables et prolongées. Cela permet notamment une injection par semaine au lieu de trois.

L'interféron α est un interféron de type I. C'est une cytokine synthétisée par pratiquement toutes les cellules de l'organisme et dont la transcription est activée par l'ARN bicaténaire produit au cours d'un cycle de multiplication viral. L'interféron se fixe alors sur un récepteur spécifique de la cellule ce qui va activer un facteur de transcription capable d'induire l'expression d'au moins 30 gènes habituellement silencieux (ISG). Quatre protéines actives sur les virus ont été identifiées (OAS, PKR, Mx, ADAR-1). Ces protéines antivirales (PAV) ciblent les ARNm et vont respectivement les hydrolyser, bloquer la traduction, bloquer la transcription ou les modifier.

L'interféron α possède en plus de son activité antivirale une activité immunomodulatrice. Il va en effet augmenter l'expression des gènes des molécules de classe I du CMH ce qui favorise la présentation des peptides viraux à la surface cellulaire et leur reconnaissance par les LTc. Il va également activer les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK.

- **Lamivudine (Zeffix®):** analogue nucléosidique de la cytidine qui inhibe la transcriptase inverse (2',3-didéoxy-3'-thiacytidine ou 3TC). Molécule très utilisée car bien tolérée mais présente comme inconvénient principal l'apparition très fréquente de mutations de résistance dans le gène de la polymérase (20%/an). Il faut donc éviter l'utilisation en 1^{ère} intention et en monothérapie.
- **Adéfovirus dipivoxil (Hepsera®):** analogue nucléotidique de l'adénosine monophosphate qui inhibe la transcriptase inverse. Il présente l'avantage de ne pas avoir de résistances croisées avec la lamivudine mais favorise aussi l'apparition de mutants résistance.
- **Entécavir (Baraclude®):** analogue nucléosidique de la guanosine qui inhibe la transcriptase inverse. Bonne efficacité antivirale, molécule très bien tolérée avec une

barrière génétique élevée (moins de 1% de résistance à 4 ans) mais barrière génétique basse chez les patients déjà résistants à la lamivudine.

- **Telbivudine (Sebivo®)** : analogue nucléosidique de la thymidine qui inhibe la transcriptase inverse et qui présente une efficacité antivirale supérieure à celle de la lamivudine mais inférieure à celle de l'entécavir et du ténofovir. On observe en plus des résistances croisées avec la lamivudine et l'émergence rapide de résistance. Cette molécule n'a finalement qu'une faible place dans le traitement de l'hépatite B chronique.
- **Ténofovir (Viread®)** : analogue nucléotidique de l'adénosine monophosphate qui inhibe la transcriptase inverse et qui est probablement le plus puissant des traitements anti-VHB avec une barrière génétique élevée. Il faut cependant évaluer sa tolérance rénale et osseuse à long terme.

Les analogues nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse sont des prodrogues qui nécessitent une double ou triple phosphorylation par des kinases cellulaires pour devenir efficaces. Lorsqu'au cours de l'étape de transcription inverse la polymérase virale incorpore un analogue l'elongation de la chaîne d'ADN se trouve bloquée puisque la molécule incorporée ne peut former de liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant (*figure 24*).

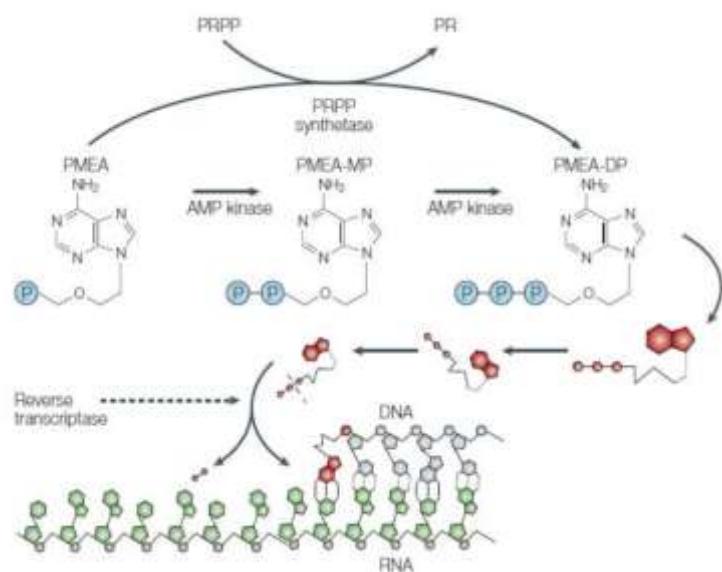


Figure 24. Mécanisme d'action des analogues. Exemple de l'Adéfovir (PMEA)

2.6.2. Conduite du traitement

Quels sont les objectifs à atteindre ?

L'objectif du traitement est l'amélioration de la qualité de vie et de la survie du patient en limitant l'évolution de la maladie vers la fibrose, la cirrhose et les stades plus avancés de la maladie (cirrhose décompensée et CHC) conduisant généralement au décès du patient. Il faut pour cela supprimer de manière soutenue la réPLICATION virale.

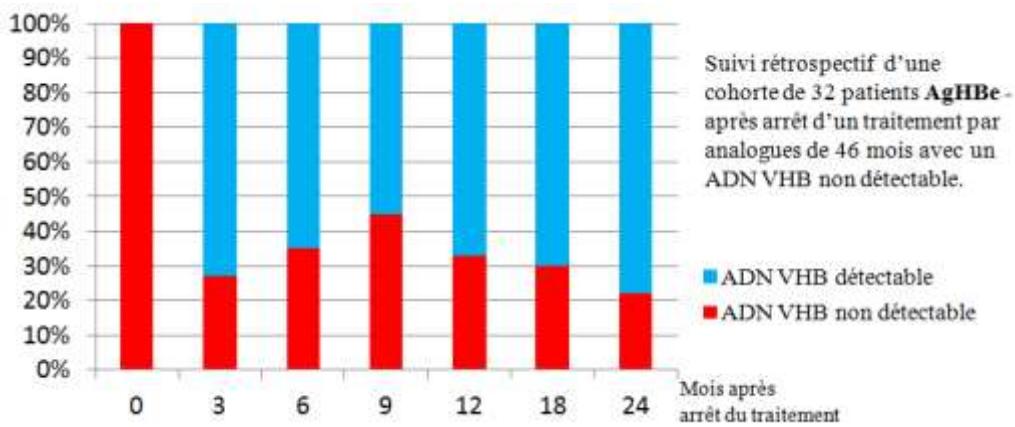
En pratique cela revient à s'assurer de la diminution de l'ADN du VHB ($<3 \log \text{ UI/mL}$), de la diminution des transaminases (ASAT, ALAT) et de la stabilisation voire de la régression des lésions histologiques.

Les objectifs secondaires étant la séroconversion anti-HBe (chez les patients Ag HBe+) et la clairance de l'Ag HBs avec éventuellement apparition des anticorps anti-HBs (événements beaucoup plus rares) permettant d'envisager l'arrêt du traitement chez certains patients.

On a donc pour résumer :

- un objectif idéal qui est la clairance soutenue de l'Ag HBs **après arrêt du traitement** avec ou sans séroconversion anti-HBs associée à la rémission complète et soutenue de l'activité hépatique. Les traitements actuels ne permettent de l'atteindre que rarement.
- un objectif satisfaisant qui est l'induction d'une réponse virologique (charge virale non détectable) et d'une réponse biochimique (ALAT normalisées) soutenues **après arrêt du traitement** associées à une séroconversion anti-HBe chez les patients Ag HBe+.
- un objectif minimal qui est la rémission virologique (charge virale indétectable) maintenue sous **thérapie antivirale longue durée** chez les patients Ag HBe- et chez les patients Ag HBe+ qui ne réalisent pas la séroconversion (pour ces patients la réactivation est fréquente si le traitement est arrêté (*figure 25*)).

On voit bien à travers ces objectifs qu'il existe deux stratégies thérapeutiques différentes. Un traitement de durée limitée par analogues nucléos(t)idiques ou par interféron-PEG (~48 semaines) qui, malgré sa mauvaise tolérance, peut permettre une réponse prolongée pour les patients ayant le plus de chances de faire une séroconversion anti-HBe et pour certains patients Ag HBe-. Un traitement au long cours par analogues nucléos(t)idiques pour les autres patients. Pour éviter l'apparition de mutants de résistance il faut privilégier pour une première ligne en monothérapie les molécules ayant la barrière génétique la plus élevée (entécavir, ténofovir) (EASL, 2012).



Il existe par ailleurs des facteurs prédictifs de réponse aux thérapies antivirales actuelles qui peuvent être utiles pour guider l'initiation d'un traitement et le choix de le maintenir ou non. Les facteurs prédictifs de bonne réponse précédant l'initiation du traitement sont la charge virale (faible), le niveau de transaminases (élevé), le score d'activité à la biopsie hépatique (élevé) et le génotype pour le traitement par interféron (*figure 26*). Pendant le traitement il est utile de suivre la décroissance de la charge virale à 12 semaines (interféron), 24 ou 48 semaines mais aussi le niveau d'Ag HBe et le niveau d'Ag HBs dont la décroissance peut être prédictive de la séroconversion anti-HBe et de la perte de l'Ag HBs.

Il ne faut cependant pas oublier que l'hépatite B chronique ne peut actuellement pas être complètement éradiquée en raison de la persistance d'ADNccc dans le noyau des hépatocytes infectés pouvant expliquer les réactivations (EASL, 2012).

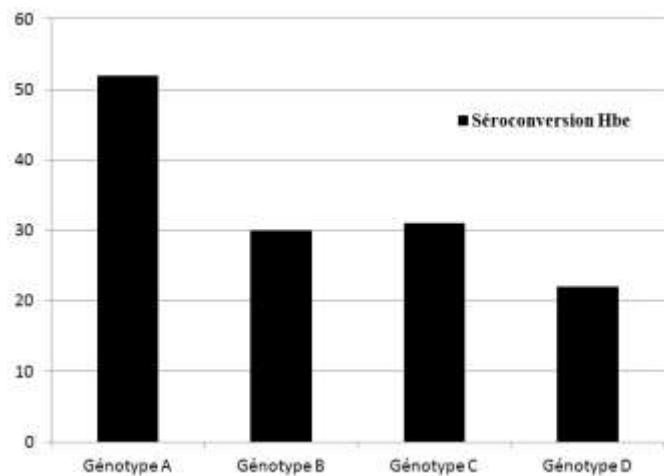


Figure 26. Influence du génotype sur la réponse à un traitement par IFN-PEG 2a (52 semaines) (Cooksley et al, EASL 2005)

Quels patients doivent être traités ?

- Patients dans la phase d'immunotolérance (Ag HBe+, transaminases normales et stables, charge virale élevée) **uniquement** si évidence de **maladie hépatique** et éventuellement pour les patients de **plus de 30 ans avec antécédents familiaux de cirrhose ou CHC**.
- Patients hépatite B chronique active Ag HBe+ ou Ag HBe- avec **charge virale supérieure à 2000 UI/mL, transaminases élevées et au moins fibrose et/ou activité modérée à la biopsie hépatique** ($\geq A2$ et/ou $\geq F2$ Metavir).
- Patients hépatite B chronique active Ag HBe+ ou Ag HBe- avec **transaminases au moins deux fois supérieures à la normale et une charge virale supérieure à 20 000 UI/mL même sans biopsie hépatique**.
- Patients avec **cirrhose compensée et charge virale détectable** quelque soit le niveau de transaminases.
- Patients avec **cirrhose décompensée et charge virale détectable** qui requièrent un traitement urgent par analogues nucléos(t)idiques et doivent envisager la transplantation hépatique dans certains cas.

Les patients porteurs inactifs et ayant une charge virale inférieure à 20 000 UI/mL ne requièrent généralement pas de traitement ni de biopsie hépatique mais doivent bénéficier d'une surveillance rapprochée au cours des 3 premières années (transaminases, charge virale) avant d'être suivis comme les autres porteurs inactifs (EASL, 2012).

Quelques chiffres

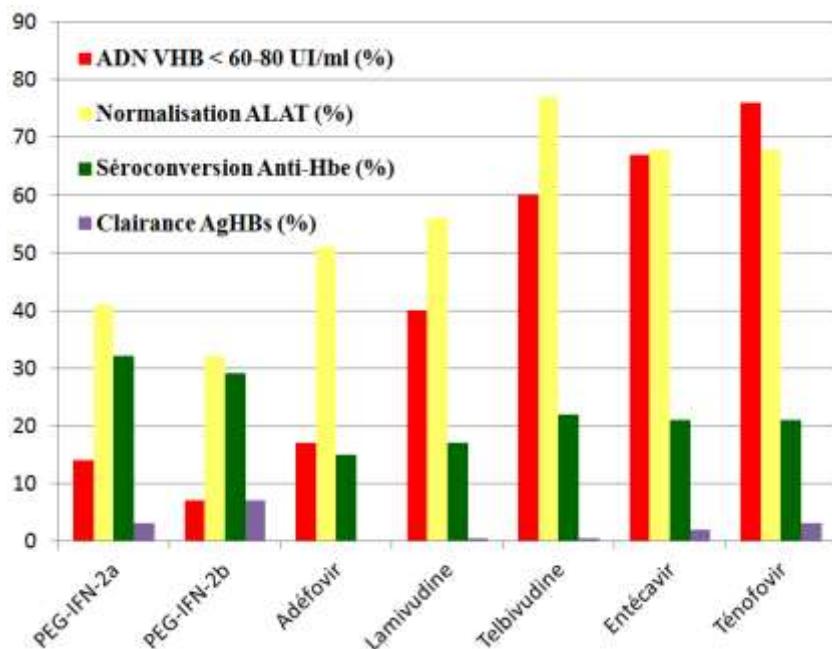


Figure 27. Résultats sur des patients hépatite B chronique **Ag HBe+** à 6 mois après un traitement de 12 mois (48 semaines) par interféron et à 12 mois (48 ou 52 semaines) d'un traitement par analogue nucléos(t)idique (d'après EASL, 2012)

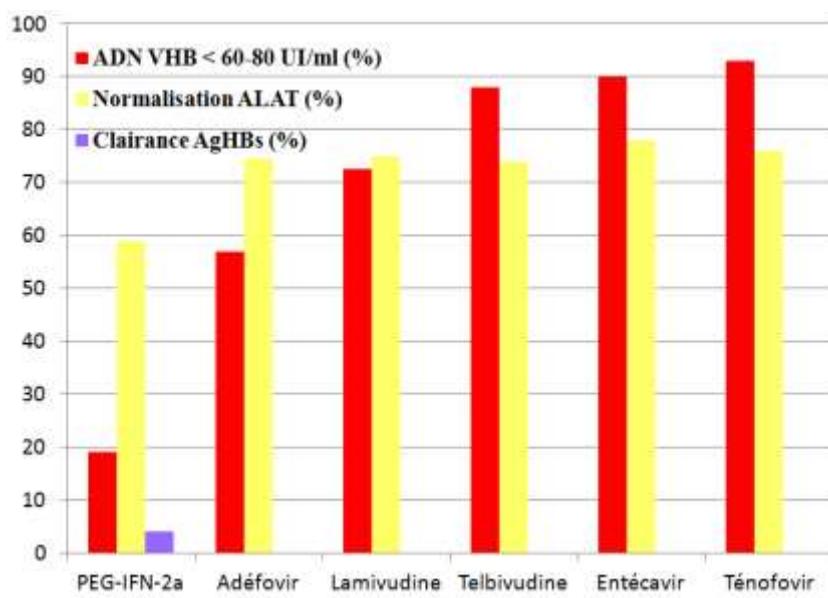


Figure 28. Résultats sur des patients hépatite B chronique **Ag HBe-** à 6 mois après un traitement de 12 mois (48 semaines) par interféron et à 12 mois (48 ou 52 semaines) d'un traitement par analogue nucléos(t)idique (d'après EASL, 2012)

On observe que chez les patients Ag HBe+ le taux de séroconversion HBe reste faible à 1 an de traitement (*figure 27*), l’interféron pégylé offrant les meilleurs résultats (environ 30% de séroconversion **durable après arrêt**). Pour les patients traités par analogues ce taux va augmenter avec la poursuite continue du traitement (sauf si émergence de résistance).

L’adéfovir et l’interféron sont les molécules dont l’efficacité globale est la plus faible en terme de décroissance de la charge virale alors que l’entécavir et le ténofovir sont les plus puissantes. L’efficacité est globalement plus importante chez les patients Ag HBe- (*figure 28*). L’interféron pégylé permet d’obtenir le plus haut taux de clairance de l’Ag HBs à 1 an. Ce taux va encore augmenter après arrêt du traitement chez les patients ayant une réponse virologique soutenue mais aussi au cours du temps chez les patients traités par analogues de manière continue. D’autre part les patients Ag HBe- ont des taux de clairance de l’Ag HBs inférieurs à ceux des patients Ag HBe+ (*figure 28*). Il est d’ailleurs exceptionnel d’observer cette clairance au cours des 4-5 premières années chez les patients Ag HBe- traités par analogues (EASL, 2012).

2.6.3. Clairance de l’Ag HBs sous traitement

Comme nous l’avons déjà dit la clairance soutenue de l’antigène HBs est l’objectif idéal mais n’est que rarement atteint. Contrairement à la charge virale qui est le reflet de la réPLICATION du génome le titre en Ag HBs reflète le niveau et l’activité de l’ADNccc intrahépatique qui est un modèle pour la transcription des gènes viraux et notamment ceux codant pour les protéines d’enveloppes virales et subvirales. Ceci explique pourquoi la réponse virologique (charge virale indéetectable) n’est pas obligatoirement synonyme de clairance soutenue de l’Ag HBs. Cependant la réponse virologique soutenue est nécessaire à la clairance de l’Ag HBs. C’est en effet à cette condition que les thérapies antivirales (interféron et analogues) peuvent conduire à la réduction temps-dépendant de l’ADNccc intrahépatique et de l’Ag HBs sérique (Hosaka *et al*, 2013).

Il semble qu’il existe des facteurs favorisants la clairance de l’Ag HBs. Nous avons déjà vu que les patients ayant reçu une thérapie par interféron ont un taux de clairance plus élevé à 1 an. Ceci se confirme également sur une plus longue période (*figure 29*). On peut expliquer cela par la flambée des transaminases suite à cette thérapie et par les changements dans la réponse immunitaire de l’hôte résultant de l’activité immunomodulatrice de l’interféron (Hosaka *et al*, 2013).

D'autre part les patients de génotype A sont associés un taux de clairance plus élevé ce qui peut s'expliquer par le fait qu'ils répondent mieux au traitement par interféron (*figure 26*).

Par ailleurs les patients ayant un niveau basal en transaminases (ALAT) élevé connaissent un plus fort taux de clairance de l'Ag HBs. Ceci est vrai pour les patients ayant reçu l'interféron mais aussi pour les patients sous analogues nucléos(t)idiques (*tableau 5*) pour lesquels on observe aussi une décroissance rapide de l'ADN viral et de l'antigène HBe (Hosaka *et al*, 2013). Rappelons que l'élévation des transaminases est la conséquence de la réponse immunitaire efficace de l'hôte contre les hépatocytes infectés (LT cytotoxiques).

Notons également que la diminution initiale de l'Ag HBs, notamment au cours des 6 premiers mois de traitement, est un facteur prédictif de perte de l'Ag HBs sous analogues nucléos(t)idiques. (Hosaka *et al*, 2013).

projection	AgHBe-	AgHBe+	AgHBe+ ALAT élevées
Temps jusqu'à perte de l'AgHBs (années)	38.9	36.4	19.5

Tableau 5. Estimation du temps de perte de l'Ag HBs chez des patients traités par Entécavir ou Ténofovir et présentant une réponse virologique (Zoutendijk *et al*, 2011)

On peut donc conclure que l'effet antiviral direct du traitement permettant le maintien d'une charge virale basse voire indétectable ainsi que la réponse immunitaire efficace de l'hôte sont nécessaires à la clairance de l'Ag HBs sous interféron ou analogues nucléos(t)idiques.

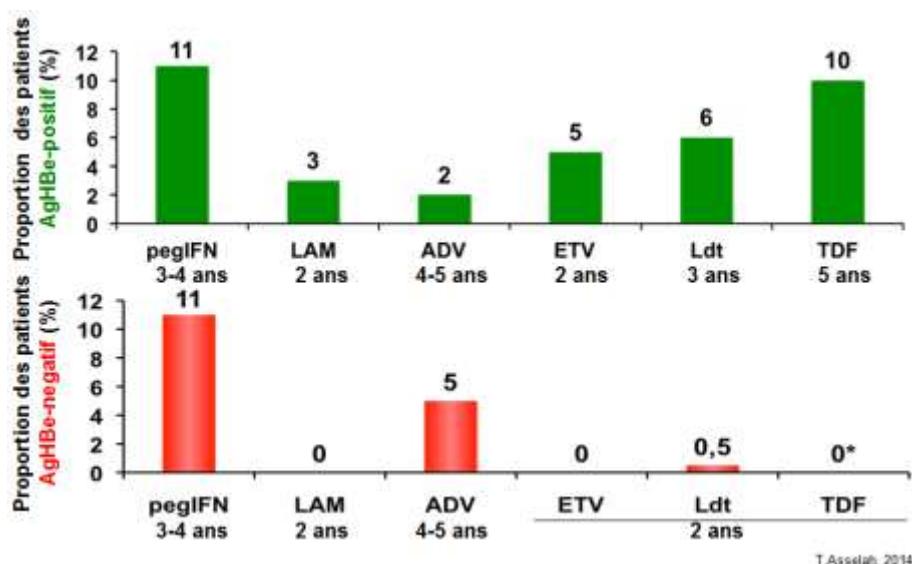


Figure 29. Proportion de patients ayant présenté une clairance de l'AgHBs au cours du traitement (T.Asselah, 2014)

Il semble aussi que la proportion de patients perdant l'Ag HBs soit plus élevée chez les patients Ag HBe+ sans que l'on sache expliquer pourquoi (*figure 29*).

On observe également que le taux de clairance de l'Ag HBs sous traitement (*figure 29*) est très peu différent de celui du taux de clairance spontanée des patients non traités (0.5-2%/an) (Fattovich et al, 2008). Ces derniers sont généralement des porteurs inactifs dans une phase de contrôle immunitaire faisant suite à une phase d'immuno-élimination efficace. Chez ces patients le maintien de la charge virale à un niveau très faible ainsi que la clairance de l'Ag HBs sont essentiellement liés à la réponse immunitaire de l'hôte.

2.6.4. Mutants de résistance aux traitements

Nous avons vu que l'infection chronique par le virus de l'hépatite B est caractérisée par une forme de persistance intrahépatique ou ADNccc qui est la matrice de transcription principale des ARNm viraux.

Cependant les analogues nucléos(t)idiques qui agissent sur l'étape de transcription inverse ont peu d'impact sur l'étape de transcription à partir du cccDNA et sur la synthèse des protéines virales. La concentration sérique en antigènes (Ag HBs, Ag HBe) peut d'ailleurs être très forte même si la charge virale est indétectable.

Le traitement est donc généralement long afin d'éviter un rebond viral en cas d'arrêt précoce. Ceci, en plus du fait que les analogues nucléos(t)idiques soient fréquemment utilisés en monothérapie, favorise l'émergence de mutants de résistances au sein des quasi-espèces virales sous pression thérapeutique (Locarnini *et al*, 2010).

Pour la lamivudine la prévalence de la résistance augmente très rapidement pour atteindre 80% après 4 ans de monothérapie (Locarnini *et al*, 2010). Les mutants de résistance présentent la substitution rtM204V/I au niveau du motif YMDD du domaine C de la transcriptase inverse ce qui va diminuer l'efficacité thérapeutique de la molécule en raison de l'encombrement stérique du site catalytique de l'enzyme virale. Comme ces substitutions affectent l'activité enzymatique et les capacités de réplication du virus des mutations compensatoires rétablissant un certain niveau de réplication ont été décrites (rtV173L et rtL180M) (Kay *et al*, 2007).

Les résistances surviennent moins rapidement au cours d'un traitement par adéfovirus (environ 6% après 3 ans) (Locarnini *et al*, 2010) et cette molécule présente l'avantage de ne pas présenter de résistance croisée avec la lamivudine (*tableau 6*).

Les mutants de résistance sont composés des mutations rtN236T et/ou rtA181T/V au niveau respectivement des domaines catalytiques D et B (Kay *et al*, 2007).

L'entécavir est une molécule avec une barrière génétique élevée avec de rares cas de résistance (< 1% après 4 ans) mais cette barrière est beaucoup plus basse chez des patients déjà résistant à la lamivudine (5,8% après 1 an chez les patients traités par lamivudine) (Locarnini *et al*, 2010) avec l'apparition rapide de combinaisons de mutations rtI169T et rtM250V, ou rtT184G et rtS202I (s'ajoutant donc à rtL180M et rtM204V) (Kay *et al*, 2007).

La telbivudine présente un taux de résistance élevé (29% à 2 ans chez les patients Ag HBe+ et 11% chez les patients Ag HBe-). La résistance est croisée avec la lamivudine : mutation primaire rtM204I (*tableau 6*). Des mutations secondaires comme rtL180M peuvent accompagner cette mutation signature dans 2 à 5% des cas (Locarnini *et al*, 2010).

Comme l'entécavir dont la résistance nécessite au moins 3 mutations, le ténofovir présente une barrière génétique très élevée. Aucune mutation n'a à ce jour été associée à une résistance chez les patients naïfs de tout traitement recevant du ténofovir.

On peut cependant signaler une réduction de la sensibilité clinique et virologique avec les mutations rtA181T/V et rtN236T associées à la résistance à l'adéfovir (Locarnini *et al*, 2010) (*tableau 6*). Deux cas de résistance au ténofovir ont également été identifiés chez des patients co-infectés VIH/VHB recevant de la lamivudine et du ténofovir. En plus des mutations de résistance à la lamivudine la mutation rtA194T a été retrouvée. Ceci n'a cependant pas été confirmé par d'autres études (Kay *et al*, 2007).

Mutation effect	Resistance mutation				
	Lamivudine/telbivudine-resistant (L180M with or without M204V/I)	Adefovir-resistant (N236T)	Adefovir-resistant (A181T/V)	Entecavir-resistant	Telbivudine-resistant
Confers complete resistance	Telbivudine	-	-	Lamivudine, Lamivudine telbivudine	
Confers some degree of reduced sensitivity to listed drugs	Entecavir	Tenofovir disoproxil fumarate	Lamivudine, telbivudine, tenofovir disoproxil fumarate	Entecavir	
Drugs remaining fully active	Adefovir, tenofovir disoproxil fumarate	Entecavir, lamivudine, telbivudine	Entecavir, tenofovir disoproxil fumarate	Adefovir, tenofovir disoproxil fumarate	Adefovir, tenofovir disoproxil fumarate

Tableau 6. Analyse des résistances croisées entre analogues nucléos(t)idiques dans le cadre de l'hépatite B chronique (Locarnini & Yuen, 2010)

Les mutations de résistance sont réparties sur 8 codons au niveau de 4 domaines fonctionnels de la polymérase (B, C, D, E) (*figure 30*).

Des études ont montré qu'il existe 4 voies de résistance aux antiviraux. La voie des L-nucléoside associée à la mutation rtM204V/I impliquant la résistance à la lamivudine et à la telbivudine. La voie des phosphonates identifiée par la substitution rtN236T impliquant la résistance à l'adéfovir et une diminution de sensibilité au ténofovir. Une voie « partagée » avec la mutation rtA181T/V associée à la résistance aux L-nucléosides (lamivudine, telbivudine), à l'adéfovir et à la diminution de sensibilité au ténofovir. Et enfin la voie de résistance à l'entécavir chez les patients naïfs de tout traitement identifiée par la détection des mutations rtL180M et rtM204I/V avec en plus au moins une substitution de rtT184, rtS202 ou rtM250.

Chez certains patients diverses combinaisons ou permutations de ces quatre voies ont été observées impliquant une multirésistance aux thérapies anti-VHB (Locarnini *et al*, 2010).

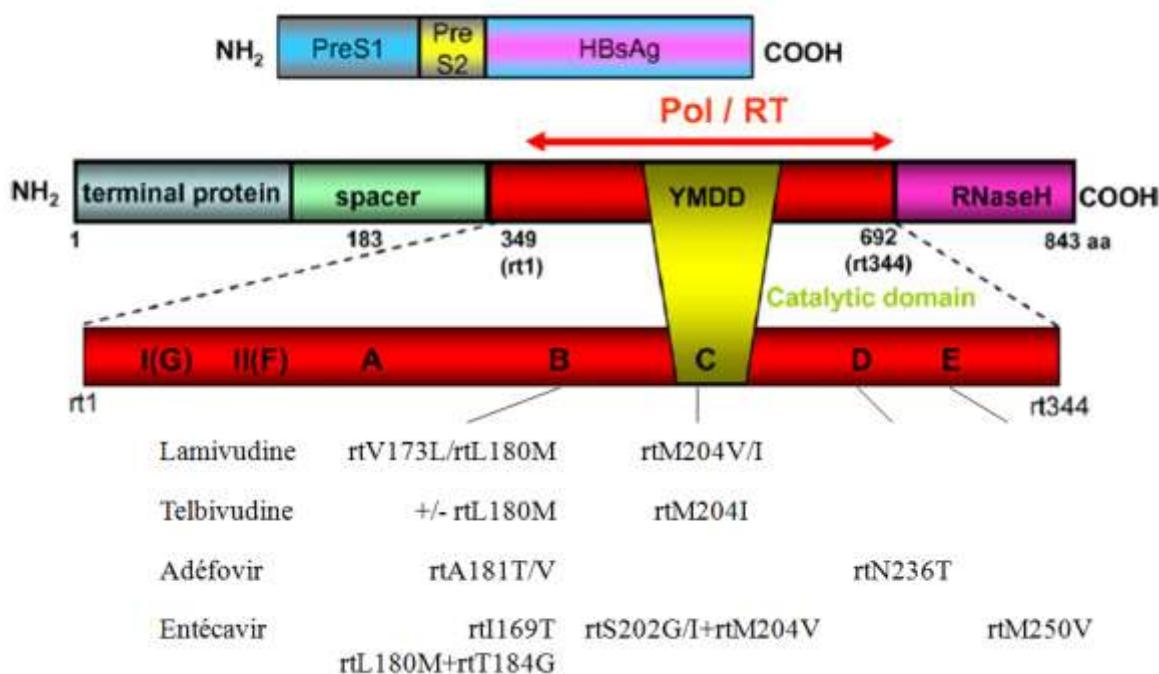


Figure 30. Mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques au niveau des domaines fonctionnels B, C, D, E de la reverse transcriptase dont le gène se superpose avec celui des protéines d'enveloppe (PreS1, PreS2, Ag HBs) (d'après Kay *et al*, 2007)

Nous savons aussi que les gènes codant pour la transcriptase inverse et les protéines d'enveloppe (notamment la protéine S) ont des cadres de lecture qui se superposent (*figure 30*). Ainsi certaines mutations de la transcriptase inverse peuvent résulter de mutations de la protéine S et inversement.

Certaines études ont par exemple montré que les patients de sérotype *ayw* (génotype D et E surtout) ont 20 fois moins de risques de développer une résistance à la lamivudine que les patients de sérotype *adw* probablement en raison des altérations de l'Ag HBs provoquées par les mutations de résistance sur la transcriptase inverse (Kay *et al*, 2007).

Les mutations de résistance aux analogues peuvent par ailleurs affecter la conformation de l'Ag HBs et diminuer son antigénicité. Les substitutions relatives à la résistance à la lamivudine (rtM204V/sI195M, rtM204I/sW196S, rtM204I/sW196L et rtV173L/sE164D) peuvent par exemple altérer la réactivité de l'Ag HBs vis-à-vis des anticorps induits par le vaccin (Torresi *et al*, 2002).

Un dernier point important est de savoir si ces mutants sont stables et peuvent être transmis à un sujet naïf. On sait par exemple que si un mutant de résistance à la lamivudine émerge, puis que le traitement est arrêté, le virus sauvage remplacera rapidement le mutant. Il faut cependant savoir si cela est dû à une réversion avec l'apparition de nouvelles erreurs de la polymérase lors de la production de l'ADNrc. Dans ce cas le mutant est instable et ne peut persister que chez un patient traité. Par contre si la réapparition du virus sauvage est due à sa persistance au sein du pool d'ADNccc du patient cela signifie que le mutant peut être transmis de manière stable à un sujet naïf chez qui il ne sera pas en compétition (Kay *et al*, 2007).

Il semble que ces mutants soient relativement stables d'un point de vue génétique notamment grâce aux mutations compensatoires (Locarnini *et al*, 2010).

2.6.5. Vaccination et échappement

Le premier vaccin contre l'hépatite B, d'origine plasmatique a été mis au point en 1976. Cette première génération de vaccin a été remplacée à la fin des années 1980 par des vaccins recombinants issus du génie génétique.

La vaccination est un moyen efficace de prévenir l'hépatite B et ses complications, en particulier les cancers primitifs du foie. Il protège aussi indirectement contre l'hépatite delta qui peut compliquer une hépatite B chronique (INPES, 2012).

Les vaccins utilisés actuellement sont hautement immunogènes avec l'apparition des anticorps protecteurs (anti-HBs) à un titre considéré comme protecteur (>10 mUI/mL) chez plus de 95% des sujets vaccinés (Locarnini *et al*, 2010). Les titres sont d'ailleurs souvent très élevés pouvant dépasser 1000 mUI/mL. Les facteurs de moindre réponse à la vaccination sont l'âge (au-delà de 40 ans), le sexe (masculin), l'obésité, le tabagisme et certains groupes HLA (INPES, 2012).

Les vaccins commercialisés actuellement contiennent les antigènes des glycoprotéines d'enveloppe virales et plus particulièrement ceux situés sur le déterminant « a » de l'Ag HBs (Locarnini *et al*, 2010). On peut citer par exemple le vaccin Genhevac B Pasteur® constitué d'une suspension purifiée et inactivée d'Ag HBs contenant les protéines S et M (épitopes des domaines S et pré-S), les vaccins Engerix B® et HBVaxPro® contenant de l'Ag HBs purifié (protéine S). Il existe également des vaccins combinés comme l'hexavalent Infanrix Hexa® ou le vaccin combiné hépatite A/B Twinrix®. Les vaccins sont tous adsorbés sur hydroxyde d'aluminium (INPES, 2012).

En 1992 l'OMS avait recommandé la mise en place de programmes de vaccination généralisée contre l'hépatite B qui devaient être appliqués avant 1995 dans les pays de haute et moyenne endémie et avant 1997 dans les pays de faible endémie. Il était notamment recommandé la vaccination des nourrissons dans tous les pays du monde en précisant que la vaccination des adolescents pouvait être envisagée en addition ou alternativement (INPES, 2012).

Ce programme, mis en place en France en 1994, complétait l'immunisation des sujets à risques et permettait d'envisager une diminution de 90% de l'incidence dans les vingt années à venir et son élimination à long terme. Il a cependant été suspendu en 1998 en raison du risque allégué d'affections démyélinisantes centrales (aucune étude ne montre clairement aujourd'hui l'association entre vaccination contre l'hépatite B et sclérose en plaque).

Aujourd'hui le dépistage est obligatoire chez la femme enceinte au 6^{ème} mois de grossesse pour prévenir la transmission périnatale par la vaccination du nouveau-né dont la mère est porteuse de l'Ag HBs.

La vaccination est également obligatoire pour certains groupes de professionnels de santé des établissements privés ou publics.

La vaccination reste recommandée en priorité chez les nourrissons ainsi que chez les personnes à risque (personnes en institutions, détenus, toxicomanes, voyageurs en zone de forte endémie, polytransfusés, greffés, dialysés, entourage d'un porteur chronique, ...) (INPES, 2012).

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

Dans le monde le programme de vaccination universelle des nourrissons a été mis en œuvre dans soixante-dix pays. De nombreuses enquêtes épidémiologiques démontrent son efficacité (diminution du taux de portage chez les enfants de moins de 10 ans à Taïwan de 9,8% en 1984 à 1,3% en 1994, diminution de l'incidence du CHC à Taïwan et en Corée après seulement 10 années) (INPES, 2012).

Le suivi au long cours de ces programmes de vaccination, notamment dans les pays de forte endémie comme la Chine, la Thaïlande et Taïwan, a donc démontré leur efficacité mais a aussi permis l'observation d'un certain nombre d'échecs imputés à la sélection et à l'augmentation de l'incidence des mutants d'échappement à la vaccination (Locarnini *et al*, 2010). Si ces mutants sont très fréquents dans les pays à forte endémie avec un programme d'immunisation infantile on en retrouve dans de nombreux autres pays et aussi en Europe (INPES, 2012).

Il semble par ailleurs que l'utilisation d'immunoglobulines à la naissance accélère la sélection des mutants d'échappement vaccinal (Locarnini *et al*, 2010).

Comme nous l'avons déjà évoqué (1.5.2 *Variabilité phénotypique*) ces mutants correspondent à l'apparition d'un certain nombre de substitutions au niveau et autour du déterminant « a » comme G145R pouvant conduire à une altération de l'antigénicité de l'Ag HBs (Locarnini *et al*, 2010). Nous avions également cité, de manière non exhaustive, d'autres mutations au sein du déterminant « a » : I/T126A/N, A128V, Q129H/R, G130N, M133L/T, K141E, S143L, D144A/H/E (Kay *et al*, 2007), et même en dehors comme P120S/T mais aussi Y100C, Q101H, S117N, T118R, F183C (Oon *et al*, 1999).

De nombreuses autres mutations d'échappement vaccinal ont été décrites dans la littérature. Une étude a par exemple observé la transmission de variants du déterminant « a » chez des enfants nés de mères porteuses de l'Ag HBs malgré une immunisation à la naissance. Les substitutions T125M, I126T, P127T, T131N, F134Y ont notamment été retrouvées (Velu *et al*, 2008).

OBJECTIF DU TRAVAIL

A l'heure actuelle, les traitements anti-VHB sont imparfaitement efficaces et dotés d'effets secondaires non négligeables. Les protéines d'enveloppe virales, essentielles à l'entrée du virus dans les hépatocytes et cibles de l'immunité de l'hôte, sont à ce titre des cibles thérapeutiques potentielles contre le VHB.

Le but du travail de notre équipe de recherche est de mettre en évidence des signatures moléculaires sur les glycoprotéines d'enveloppe virales, c'est-à-dire des mutations pouvant impacter la réponse immunitaire ou le pouvoir infectieux du virus (via l'étape d'entrée cellulaire) et qui seraient caractéristiques de l'évolution clinique de la maladie sous traitement antiviral ou en absence de traitement. Ces signatures moléculaires permettront de définir des sites essentiels des glycoprotéines d'enveloppe du VHB à cibler par des inhibiteurs d'entrée.

L'étude d'un premier groupe de patients traités par analogues nucléos(t)idiques a suggéré une mutation d'intérêt : la mutation sT125M de la protéine S du VHB associée à la persistance de l'Ag HBs. La position 125 étant située dans une zone ciblée par l'immunité humorale de l'hôte et à proximité d'un site important pour le pouvoir infectieux, ces résultats préliminaires étaient en cohérence avec l'hypothèse que parmi les facteurs viraux influençant la clairance ou la persistance de l'Ag HBs, les protéines d'enveloppe virales peuvent jouer un rôle indirect.

L'objectif de mon travail a été d'enrichir la cohorte de patients atteints d'une hépatite B chroniques sous traitement antiviral, et d'initier une nouvelle cohorte de patients atteints d'une hépatite B chronique mais non traités.

Les données de séquençage PreS/S du VHB des patients présentant une clairance de l'Ag HBs ont été comparées aux données de patients appariés présentant une persistance de l'Ag HBs. L'analyse des données a notamment porté sur l'impact de ces mutations sur l'antigénicité.

MATERIEL ET METHODE

I. Patients étudiés

Nous avons mené notre étude sur des patients **porteurs chroniques** du virus de l'hépatite B. Ces patients ont été exclusivement sélectionnés au Centre Hospitalier Universitaire de Nancy au sein du service d'HGE (Hépato-Gastro-Enterologie) généralement suivis en consultation. Nous avons étudié deux groupes de patients d'intérêt pour lesquels a été observée **la clairance de l'antigène HBs**. Il s'agit de patients rares (2.6.3 *Clairance de l'AgHBs sous traitement*) ce qui explique le petit nombre de patients étudiés.

La clairance de l'Ag HBs est un évènement qui survient très rapidement chez les patients résolvant leur hépatite B aiguë grâce à une réponse immunitaire efficace de l'hôte (2.3 *Physiopathologie*). A contrario la chronicité est définie par la persistance de l'Ag HBs au-delà de 6 mois (2.2. *Histoire naturelle de l'infection*). Cependant chez les porteurs chroniques, qu'ils soient traités ou non, il est possible d'observer dans de rares cas la clairance de l'Ag HBs. Cet évènement est certainement lié ici aux interactions entre les facteurs d'hôte (réponse immunitaire notamment) et certains facteurs propres au virus. Il ne faut en effet pas oublier que l'infection chronique est caractérisée par l'apparition et l'émergence de mutants au sein des « quasi-espèces » virales hébergées par l'hôte (1.5. *Variabilité et mutations*). Nous avons donc décidé d'étudier chez tous les patients sélectionnés la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe virales dont nous avons vu précédemment l'importance en termes d'immunogénicité et d'infectivité (entrée du virus dans l'hépatocyte).

Le 1^{er} groupe de patients étudiés est constitué de ceux ayant obtenu la clairance de l'antigène HBs **sous traitement antiviral** (inhibiteurs nucléos(t)idiques de la RT). Il s'agit de patients répondant bien au traitement (ADN VHB indétectable). Ces patients viennent s'ajouter à d'autres déjà recueillis lors d'une première étude. Ils ont été comparés à des patients contrôles (hépatite B chronique active sous traitement antiviral avec ADN VHB indétectable mais antigène HBs qui reste positif dans le sang et dont la cinétique n'est pas prédictive de la perte de l'Ag HBs) appariés selon l'âge, le sexe et le génotype de la souche virale.

Le 2^{ème} groupe est celui des patients **non traités**. Ce sont donc des patients ayant obtenu spontanément la clairance de l'antigène HBs parmi les porteurs inactifs (0.5-2%/an) (2.2. *Histoire naturelle de l'infection*). Les patients contrôles correspondants, toujours appariés

selon l'âge, le sexe et le génotype, sont donc des patients non traités sans clairance de l'antigène HBs et dont la cinétique n'est pas prédictive de la perte de l'Ag HBs (Ag HBs maintenu à un niveau élevé au cours du temps et sans décroissance observée). Il s'agit également de porteurs inactifs de l'antigène HBs.

L'objectif du travail était donc de réaliser pour chacun de ces patients le séquençage des gènes pré-S1, pré-S2 et S codant pour les glycoprotéines S, M et L d'enveloppe.

Avant cela il a fallu sélectionner les patients. Les patients susceptibles de perdre leur Ag HBs sont suivis au laboratoire de virologie. Lorsque l'un de ces patients réalise la clairance il est affecté à l'une ou l'autre des cohortes selon qu'il soit traité ou non. Il faut ensuite rechercher un ou plusieurs patients contrôles (hépatite B chronique Ag HBs+) appariés selon le sexe et l'âge et s'assurer également qu'ils soient traités ou non. Cette recherche se fait grâce au logiciel GLIMS du CHU Nancy parmi les patients d'HGE ayant eu un Ag HBs positif.

Une fois les patients sélectionnés (intérêts = clairance de l'Ag HBs et contrôles = persistance de l'Ag HBs) il a fallu rechercher dans leurs échantillons conservés à -20°C des sérums dans lesquels la charge virale était encore quantifiable en vue de réaliser le séquençage du génome viral.

Nous avons évoqué précédemment que les patients intérêts et contrôles devaient aussi être appariés selon le génotype du virus. Il faut noter que cet appariement ne peut se faire qu'à l'issue de la réaction séquençage qui permet aussi la détermination du génotype de la souche. Ainsi un certain nombre de patients contrôles (Ag HBs +) n'ont pu être appariés à leur patient d'intérêt en raison de la divergence des génotypes viraux. Les données de ces patients qui ne réalisent pas la clairance de l'Ag HBs ont également été analysées (le séquençage du gène pré-S n'a cependant pas été réalisé pour ces patients) (*tableau 9*).

Le groupe des patients traités comprend deux patients « clairance sous traitement » auxquels ont été associés un ou plusieurs patients contrôles. Nous avions recueilli un troisième patient « clairance sous traitement » dont la charge virale trop faible n'a pas permis le séquençage (*tableau 7*).

Le groupe des patients non traités comprend quatre patients « clairance spontanée » et leurs contrôles excepté un pour qui nous n'avons pas trouvé de contrôle apparié selon l'âge (patient plus âgé que les autres) et le génotype viral. Là encore un autre patient dont le séquençage n'a pas fonctionné aurait pu venir s'ajouter à la cohorte (*tableau 8*).

Patients d'intérêt		Patients contrôles	
Identifiant (génotype)	JR092005 (A)	BM072002 (A)	
Sexe	M	M	
Naissance	1949	1952	
Traitements	Lamivudine (3TC) : oct. 2005	Adéfovir/Entécavir : 2008	
Clairance AgHBs	OUI (mars 2006)	NON	
	29/09/2005	18/07/2002	
Echantillon	5.80 log UI/mL	> 5 log UI/mL	
Identifiant (génotype)	BF012002 (D)	BA122008 (D)	TJ032009 (D)
Sexe	F	F	F
Naissance	1974	1975	1971
Traitements	Lamivudine: mai 2002-déc. 2003	Ténofovir : nov. 2008	Ténofovir : juin 2011
Clairance AgHBs	OUI (sept. 2004)	NON	NON
	18/01/2002	12/12/2008	05/03/2009
Echantillon	> 5 log UI/mL	4.95 log UI/mL	4.53 log UI/mL
Identifiant (génotype)	CA022011 (?)		
Sexe	M		
Naissance	1946		
Traitements	Entécavir		
Clairance AgHBs	OUI		
	10/02/2011		
Echantillon	1.53 log UI/mL		
→ Echec du séquençage (charge virale faible). Patient non étudié			

Tableau 7. Cohorte des patients sous traitement (analogues nucléos(t)idiques de la RT)

Patients d'intérêt		Patients contrôles	
Identifiant (génotype)	BM052006 (D)	BI042011 (D)	
Sexe	M	M	
Naissance	1968	1968	
Clairance AgHBs	OUI (mars 2008)	NON	
	26/05/2006	14/04/2011	
Echantillon	3.63 log UI/mL	3.13 log UI/mL	
Identifiant (génotype)	CA021995 (D)		
Sexe	M		
Naissance	1937		
Clairance AgHBs	OUI		
	06/02/1995		
Echantillon	2.96 log UI/mL		
Identifiant (génotype)	MM022011 (D)	SA122011 (D)	
Sexe	M	M	
Naissance	1965	1966	
Clairance AgHBs	OUI (déc. 2013)	NON	
	22/02/2011	13/12/2011	
Echantillon	3.05 log UI/mL	5.58 log UI/mL	
Identifiant (génotype)	TD042002 (A)	GS022014 (A)	
Sexe	M	M	
Naissance	1952	1969	
Clairance AgHBs	OUI (janv. 2011)	NON	
	15/04/2002	06/02/2014	
Echantillon	1.67 log UI/mL	4.33 log UI/mL	
Identifiant (génotype)	CI112000 (?)		
Sexe	M		
Naissance	1956		
Clairance AgHBs	OUI (oct. 2006)		
	08/11/2000		
Echantillon	2.82 log UI/mL		
→ Echec du séquençage. Patient non étudié			

Tableau 8. Cohorte des patients non traités

		Patients sous traitement	Patients non traités
Identifiant (génotype)		GV112006 (D)	GJ122011 (D)
Sexe		M	M
Naissance		1949	1955
Traitement		Lamivudine (sept. 2009-sept. 2011) Ténofovir (fév. 2010)	/
Clairance AgHBs		NON	NON
Echantillon		28/11/2006 4.8 log UI/mL	12/12/2011 5.14 log UI/mL
Identifiant (génotype)		VB092011 (D)	VL032012 (C)
Sexe		M	M
Naissance		1948	1945
Traitement		Lamivudine/Adéfovir (2006-déc. 2011) Entécavir (déc. 2011)	/
Clairance AgHBs		NON	NON
Echantillon		07/09/2011 5.19 log UI/mL	28/03/2012 3.22 log UI/mL
Identifiant (génotype)		KT082003 (D)	
Sexe		M	
Naissance		1947	
Traitement		Adéfovir (mai 2004- jan. 2009) Ténofovir (jan. 2009)	
Clairance AgHBs		NON	
Echantillon		11/08/2003 > 5 log UI/mL	

Tableau 9. Patients ne réalisant pas la clairance de l'Ag HBs non appariés à des patients d'intérêts.

Il faut également signaler que les patients de notre étude sont des patients mono-infectés ayant des sérologies négatives pour le VIH, le virus de l'hépatite C et le virus de l'hépatite D.

II. Extraction de l'ADN viral

La première étape est l'extraction de l'ADN du virus à partir des échantillons de sérum patients. On utilise pour cela l'automate NucliSENS[©] easyMAG de Biomérieux qui permet d'extraire les acides nucléiques AN (ADN et ARN) à partir de différents types de prélèvements liquides (plasma, sérum, sang total, urine, LBA, aspirations nasales, crachat, liquide amniotique, LCR...).

L'échantillon est dans un premier temps mélangé à un tampon de lyse contenant du thiocyanate de guanidine, un puissant agent dénaturant des protéines qui va permettre la libération des acides nucléiques ainsi que la neutralisation des nucléases présentes dans le milieu.

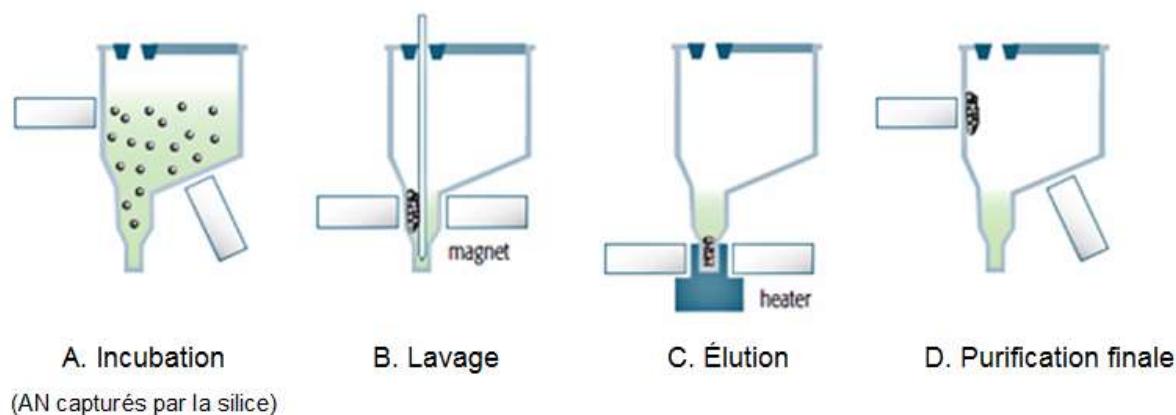


Figure 31. Principe de l'extraction de l'ADN VHB par easyMAG

Le processus démarre alors avec l'ajout de billes de silice magnétique sur lesquelles vont se fixer les acides nucléiques chargés négativement dans un milieu fortement salin de force ionique élevée (*figure 31, A*). La silice magnétique est ensuite lavée à plusieurs reprises au moyen de 2 tampons de lavage (*figure 31, B*). Les acides nucléiques sont ensuite élués de la silice magnétique par diminution de la force ionique et concentrés dans un volume spécifique de tampon d'élution. Ce processus d'élution est accéléré par le rinçage à haute température de la silice magnétique dans le tampon (*figure 31, C*). Les billes sont ensuite séparées du tampon d'élution grâce au système d'aimantation (*figure 31, D*). La solution obtenue concentrée en ADN viral peut être conservée à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Nous avons généralement réalisé l'extraction à partir de 500 μ l de sérum patient et élué dans un volume finale de 50 μ l.

Pour certains patients dont la charge virale était faible nous avons procédé à une étape préalable de centrifugation (30mn, 24000g) puis l'extraction a été réalisée sur un culot de volume variable selon la charge virale et le volume d'échantillon disponible.

III. Amplification des gènes S et pré-S

3.1 Généralités

Après extraction de l'ADN viral nous avons amplifié les régions d'intérêt du génome (S d'une part et d'autre part préS qui comprend pré-S1 et pré-S2) par PCR (polymerase chain reaction). Cette technique de biologie moléculaire est basée sur les propriétés de synthèse enzymatique des ADN polymérasées ADN dépendantes ainsi que sur les propriétés d'hybridation et de déshybridation de l'ADN double brin qui dépendent toutes de la température. La réaction d'amplification se fait donc grâce à des transitions de températures répétées de manière cyclique en mettant le mélange réactionnel dans un thermocycleur.

Après une phase initiale de chauffage (94-98°C de 1 à 9 mn) permettant notamment la dénaturation initiale de l'ADN double brin, l'homogénéisation du milieu par agitation thermique ainsi que l'activation de certaines polymérasées de type « hot start » chaque cycle comportera 3 phases successives (*figure 32*).

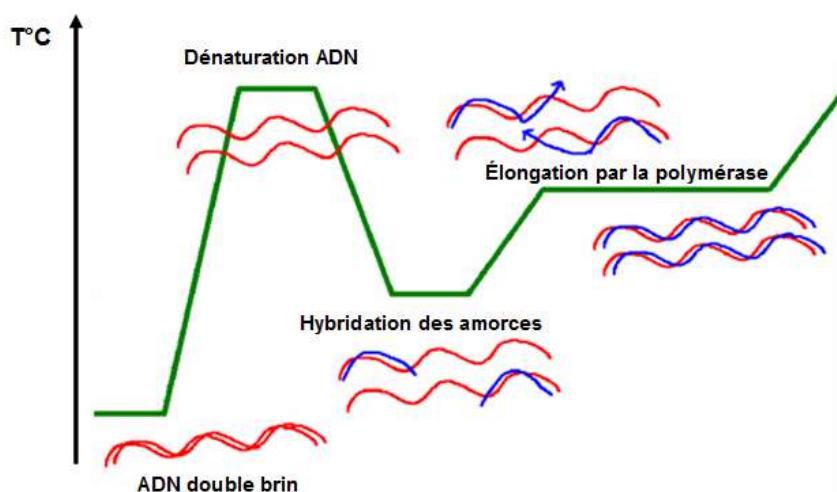


Figure 32. Etapes successives d'un cycle de PCR

La première phase (94-98°C pendant 20 à 30 s) est la **dénaturation** de l'ADN double brin en ADN simple brin. Les liaisons H ne pouvant se maintenir à une température supérieure à

80°C. La deuxième phase (40-70°C pendant 20 à 40 s) est l'**hybridation** des amores aux brins d'ADN matrice à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Les amores choisies doivent être le plus spécifique possible des séquences d'ADN à apparier, elles ne doivent pas s'apparier entre elles et doivent avoir des températures de fusion les plus proches possibles (dépendant du % GC). La dernière phase (72°C pendant 4 à 120 s) est l'**élongation** au cours de laquelle la polymérase va synthétiser à partir des amores le brin d'ADN complémentaire grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu. La durée de cette phase va dépendre de la taille de l'amplicon. Après le dernier cycle une phase d'élongation finale (5 à 15 mn) va permettre de s'assurer qu'il ne reste plus d'ADN simple brin dans le milieu.

La technique utilisée dans notre étude est une PCR semi-nichée en point final. Il s'agit en fait de deux PCR successives (PCR1 et PCR2). La première permet l'amplification de la région d'intérêt grâce à un premier couple d'amores et la seconde utilise un ou plusieurs autres couples d'amores se liant à des séquences situées à l'intérieur du premier amplicon.

Cette technique permet de limiter l'amplification de régions aspécifiques (le produit final interagit avec deux couples d'amores donc deux niveaux de spécificité). Elle est également plus sensible. Nous verrons aussi qu'elle permet d'obtenir des fragments de taille inférieure à 600pb indispensables à l'étape finale de séquençage nucléotidique.

3.2 Amores utilisées

Gène S

Pour la PCR1 nous avons utilisé des amores de la littérature utilisées chez des patients infectés par du VHB de génotype A ou D. Il s'agit des amores **P2f** (sens) et **979** (antisens) (Olinger *et al*, 2006) (*tableau 10*). Nous obtenons alors un premier amplicon de 902pb couvrant entièrement la région S (*figure 33*).

La deuxième étape comprend ici deux PCR différentes que l'on nomme PCR2a et PCR2b. Pour la PCR2a les amores sont **P2f** (sens) et **S8** (antisens) (Sung *et al*, 2008) et pour la PCR2b **P7a** (sens) (Sung *et al*, 2008) et **979** (antisens). Nous obtenons alors deux amplicons de respectivement 337 et 659pb. Ces deux séquences se chevauchent et couvrent l'ensemble de la région S.

D'autre part le chevauchement des cadres de lecture du VHB va permettre également le séquençage d'une grande partie du gène de la transcriptase inverse (RT) (environ 800pb sur 1032) (*figure 33*).

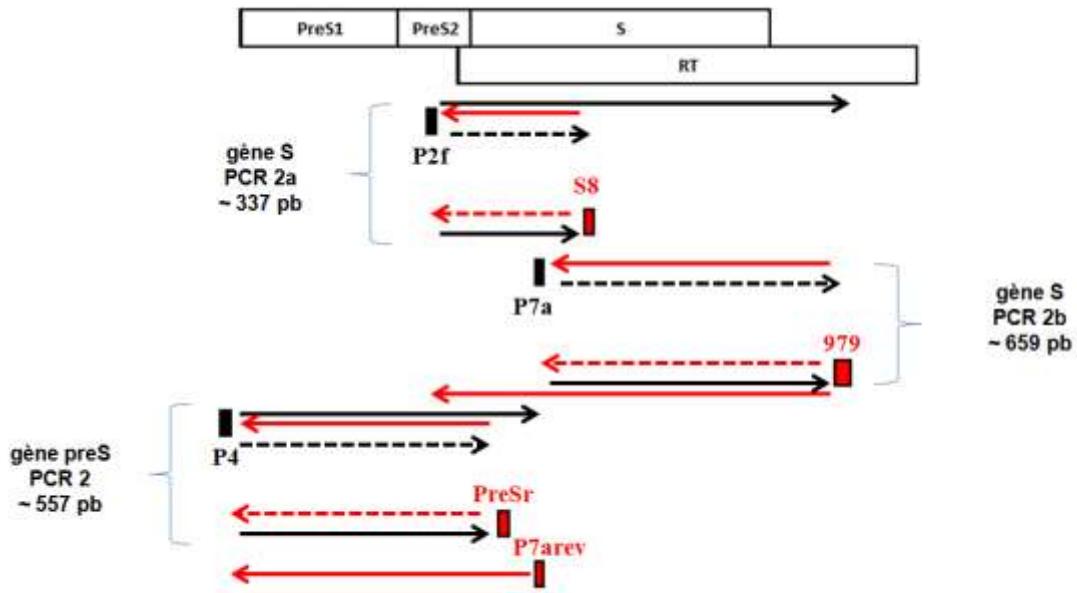


Figure 33. Séquençage des gènes préS et S (RT). Emplacement des amorces utilisées par rapport aux cadres de lecture préS/S et Pol

Gène préS

La PCR1 permet l'amplification d'un fragment de 578pb couvrant intégralement la région preS en utilisant les amorces **P4** (sens) et **P7arev** (antisens) (Sung *et al.*, 2008). La PCR2 va amplifier un fragment de l'amplicon précédemment obtenu grâce aux amorces **P4** (sens) et **PreSr** (antisens) (Olinger *et al.*, 2008). L'amplicon obtenu a une taille de 557pb (*figure 33*).

Amorce	Séquence 5' à 3' (sens d'elongation) Gène S (et RT)	G/C %	Tm
P2f <i>Olinger et al.</i>	5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'	65%	66°C
S8 <i>Sung et al.</i>	5'-GAAGATGAGGCATAGCAGCAGG-3'	54,50%	51,6°C
P7a <i>Sung et al.</i>	5'-TTGGCCAAAATTTCGCAGTC-3'	47,40%	56°C
979 <i>Olinger et al.</i>	5'-CAAAAGACCCACAATTCTTGACATACTTCCAAT-3'	34,30%	54,7°C
Gène préS			
P4 <i>Sung et al.</i>	5'-GCCTCATTGTGGGTACCCATA-3'	47,80%	78,2°C
P7arev	5'-GACTGCGAATTGGCCAA-3'	47,40%	56°C
PreSr <i>Olinger et al.</i>	5'-TCAACAAGAAAAACMCCGCCGT-3'	/	/

Tableau 10. Caractéristiques des amorces : séquence, %GC, température de fusion

3.3 Protocole

Les réactifs utilisés pour les réactions d'amplification des gènes S et préS sont :

- l'eau distillée stérile pour biologie moléculaire
- le **master mix 2X Phusion® (Thermo Scientific ref. F-531)** qui comprend notamment le tampon, les dNTPs, le MgCl₂ indispensable cofacteur de l'enzyme et une ADN polymérase (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) qui permet une amplification très fidèle (taux d'erreur 50 fois inférieur à celui de la Taq polymérase). Elle possède en effet une activité 3' → 5' exonucléase en plus de son activité 5' → 3' polymérase. Elle est donc bien adaptée aux réactions de séquençage pour lesquelles la séquence en ADN doit être le plus exact possible après amplification.
- le **DMSO** (diméthylsulfoxyde) qui permet d'augmenter le rendement de la réaction en réduisant la formation de structures secondaires.
- **les amorces sens et antisens à 10 µM**

a) PCR1

Gène S

- 0.75 µl d'amorce sens *P2f*
 - 0.75 µl d'amorce antisens *979*
 - 0.6 µl de DMSO
 - 12.5 µl de master mix Phusion®
 - Eau distillée qsp 20 µl
- on ajoute 5 µl d'extrait d'ADN**

Gène préS

- 0.75 µl d'amorce sens *P4*
 - 0.75 µl d'amorce antisens *P7arev*
 - 0.6 µl de DMSO
 - 12.5 µl de master mix Phusion®
 - Eau distillée qsp 20 µl
- on ajoute 5 µl d'extrait d'ADN**

Remarque : pour les échantillons dont la **charge virale était faible** (inférieure à 3 log UI/mL) nous avons augmenté la quantité d'ADN en ajoutant 8 μ l d'extrait et jusqu'à 10 μ l pour les charges très faibles (inférieure à 2 log UI/mL). Il faut dans ce cas retirer la quantité d'eau correspondante.

L'ADN est ensuite amplifié sur le thermocycleur selon le programme suivant :

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

b) PCR 2 semi-nichée(s)

Gène S

- 0.75 μ l d'amorce sens *P2f*(2a) ou *P7a* (2b)
 - 0.75 μ l d'amorce antisens *S8* (2a) ou *979* (2b)
 - 0.6 μ l de DMSO
 - 12.5 μ l de master mix Phusion®
 - Eau distillée qsp 20 μ l
- on ajoute 5 μ l de produit de PCR1**

Gène preS

- 0.75 μ l d'amorce sens *P4*
 - 0.75 μ l d'amorce antisens *PreSr*
 - 0.6 μ l de DMSO
 - 12.5 μ l de master mix Phusion®
 - Eau distillée qsp 20 μ l
- on ajoute 5 μ l de produit de PCR1**

Remarque : pour les échantillons dont la **charge virale était forte** avec présence de larges bandes et bandes aspécifiques en gel d'électrophorèse (*figure 34*) nous avons ajouté 5 μ l de **produit de PCR1 dilué au 1/10^{ème}**.

L'ADN est ensuite amplifié sur le thermocycleur selon le programme suivant :

98°C 5 minutes (phase initiale)	1 cycle
98°C 30 secondes (dénaturation)	35 cycles
62°C 20 secondes (hybridation)	
72°C 30 secondes (élongation)	
72°C 7 minutes (élongation finale)	1 cycle

IV. Migration sur gel d'agarose

La migration sur gel permet de s'assurer que la réaction de PCR s'est bien déroulée en visualisant les amplicons attendus ainsi que d'éventuelles amplifications non spécifiques.

Nous avons utilisé pour cela des gels d'agarose 1.5% enrichis en GelRed™ qui est un agent intercalant de l'ADN devant permettre la détection de la molécule en émettant une fluorescence proportionnelle à la quantité.

Dans un premier temps il faut déposer 5 µl de produit par puits (4 µl de produit amplifié et 1 µl d'agent alourdisseur). La migration dure ensuite 35 minutes sous 100V. L'ADN, chargé négativement, va migrer vers l'anode et être séparé suivant sa taille.

Les bandes d'intérêt sont ensuite repérées sous UV grâce à l'émission de la fluorescence et identifiées grâce à la migration en parallèle d'un marqueur de taille (« 100pb DNA Ladder », Invitrogen™).

Pour rappel les bandes devant être observées pour chaque échantillon testé sont :

- une bande à 337 pb (PCR2a, gène S)
- une bande à 659 pb (PCR2b, gène S)
- une bande à 557 pb (PCR2, gène préS)

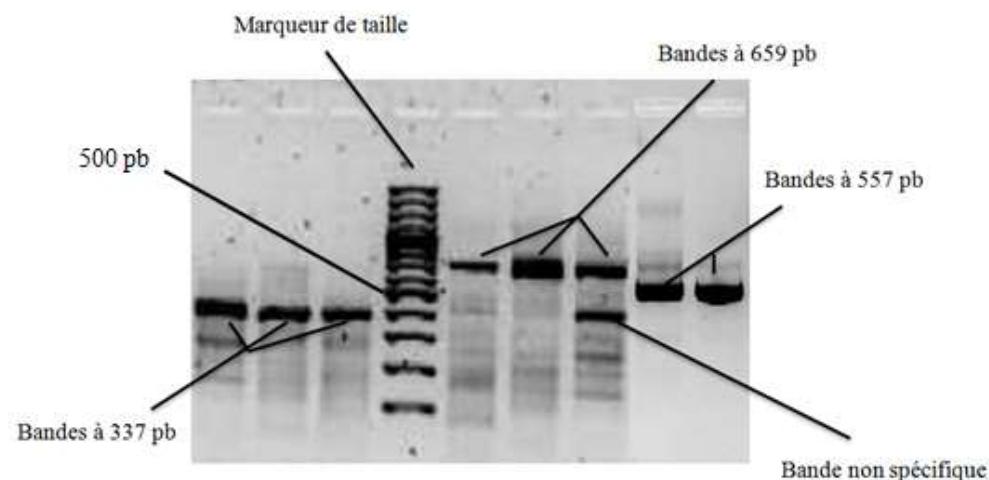


Figure 34. Exemple de migration sur gel d'électrophorèse

V. Purifications et séquençage

5.1 Première purification

Après les réactions d'amplification des gènes S et préS une étape de purification est nécessaire. Nous avons utilisé pour cela le kit « QIAquick PCR Purification » QIAGEN pouvant purifier très simplement des ADN de 70 pb à 10 kb.

La purification se fait grâce à une membrane de silice (résine échangeuse d'ions) fixée au milieu d'une colonne (*figure 35*). L'ADN chargé négativement (à pH optimal) va se fixer à la membrane. Des étapes successives de lavages à l'éthanol vont permettre de se débarrasser des excès de dNTPs ainsi que des amorces. L'ADN est ensuite élué avec de l'eau distillée stérile et récupéré après centrifugation (*annexe 1*).

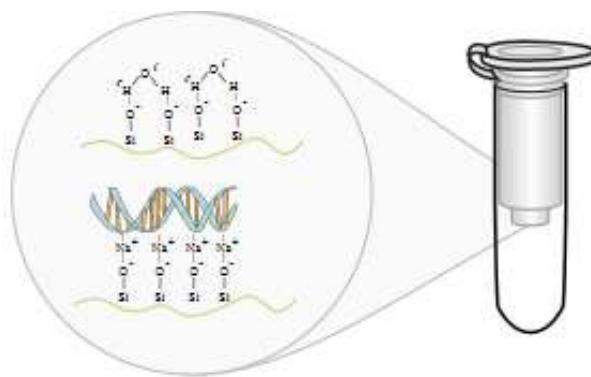


Figure 35. Purification sur colonne. Fixation de l'ADN sur une membrane de silice

5.2 PCR de séquençage

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Nous utilisons pour cela une méthode basée sur celle de F. Sanger qui est une méthode de synthèse enzymatique sélective à partir d'un **ADN simple brin** à séquencer.

Chaque cycle de PCR va comporter une étape de **dénaturation** permettant de séparer l'ADN double brin en ADN simple brin puis une étape **d'hybridation** au cours de laquelle l'amorce (sens ou antisens) va se fixer à son brin correspondant pour initier **l'elongation** par une Taq polymérase. La polymérase va alors incorporer les nucléotides (dNTPs) libres présents dans le milieu. Mais la particularité de cette PCR de séquençage est l'incorporation concomitante et aléatoire par cette même polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTPs) eux aussi présents dans le milieu réactionnel. Lorsque l'un de ces ddNTPs est incorporé dans

la chaîne, le nucléotide suivant ne peut pas se lier (pas de liaison phosphodiester possible) et l'elongation est interrompue.

La compétition dans le milieu réactionnel entre les dNTPs et les ddNTPs ainsi que l'optimisation du rapport ddNTP/dNTP permet l'incorporation d'un ddNTP à toutes les positions possibles.

On obtient donc à l'issue de la PCR de séquençage (ou plutôt des PCR car il y a en fait une réaction par amorce) un pool de toutes les combinaisons possibles d'ADN simples brins (*figure 36*).

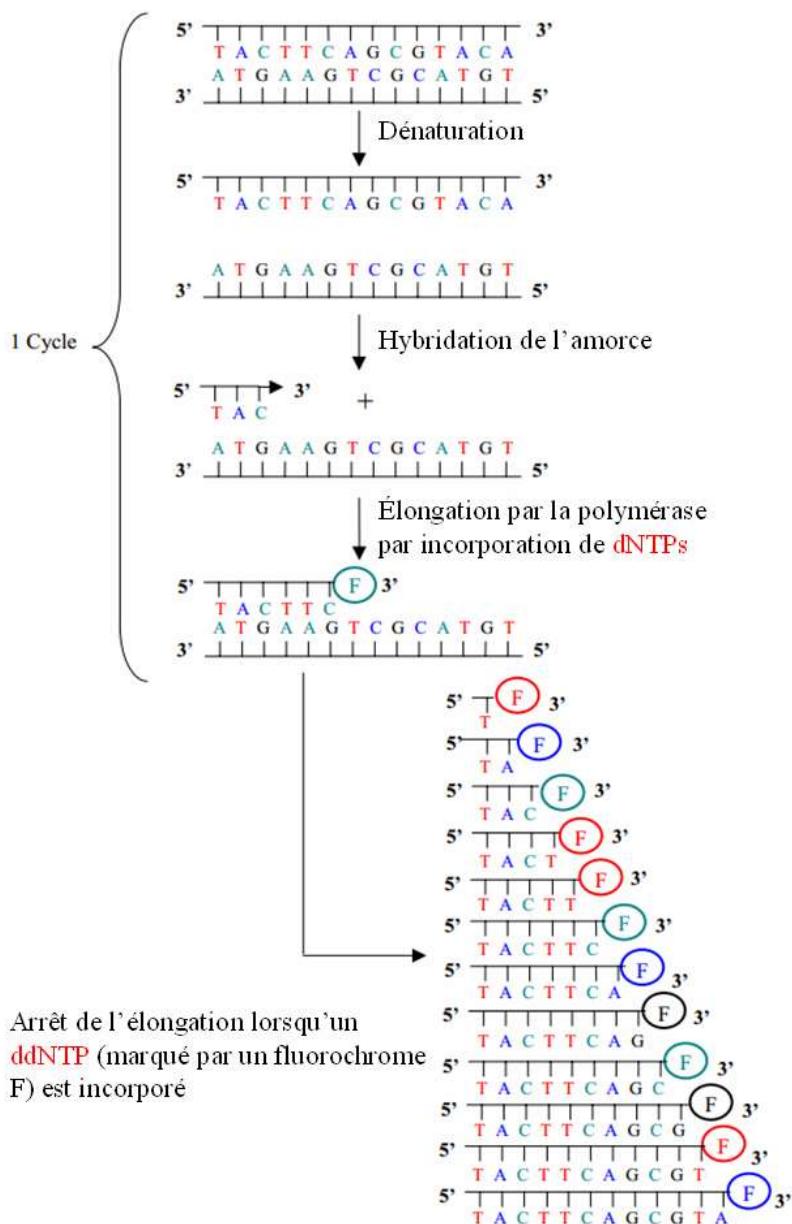


Figure 36. Principe de la PCR de séquençage (d'après <http://cochin.inserm.fr/>)

Les réactifs que nous avons utilisés pour ces PCRs de séquençage sont :

- l'eau distillée stérile pour biologie moléculaire
- le **BigDye Terminator® (ABI)** contenant les dNTPs, les ddNTPs marqués par des fluorochromes et l'ADN polymérase (Taq polymérase)
- un tampon salin **BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer**
- **les amorces sens et antisens à 1 µM**

Les mélanges réactionnels sont préparés ainsi :

Gène S (4 PCRs)

- 3.2 µl d'amorce (P2f ou 979 ou S8 ou P7a)
 - 2 µl BigDye Terminator®
 - 1 µl de tampon
 - Eau distillée qsp 12 µl
- on ajoute 3 µl de produit de PCR2a (P2f/S8) ou PCR2b (P7a/979)**

Gène preS (2 PCRs)

- 3.2 µl d'amorce (P4 ou PreSr)
 - 2 µl BigDye Terminator®
 - 1 µl de tampon
 - Eau distillée qsp 12 µl
- on ajoute 3 µl de produit de PCR2**

La PCR de séquençage se déroule ensuite sur le thermocycleur selon le programme suivant :

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

5.3 Deuxième purification

Cette étape de purification est indispensable. Elle permet d'éliminer les différents réactifs de la PCR de séquençage et notamment les ddNTPs marqués non incorporés.

Nous avons utilisé pour cela le kit DyeEx® 2.0 spin de QIAGEN. La méthode, simple et rapide, consiste à faire passer le produit de PCR à travers un gel par centrifugation. Les composés non désirables pour la suite sont retenus dans le gel (*annexe 2*).

5.4 Séquençage

Cette ultime étape technique est réalisée sur le séquenceur automatique ABI 3100. L'automate comporte 16 puits permettant l'analyse concomitante de 16 échantillons d'ADN purifié par « run ».

Chaque échantillon va subir une migration électrophorétique au sein d'un capillaire afin de séparer les fragments d'ADN simple brin issus de la PCR de séquençage selon leur masse moléculaire (taille). Les fragments les plus petits vont migrer plus rapidement que les grands. L'électrophorèse capillaire offre une grande rapidité de migration et sa résolution importante permet la distinction de fragments ne différant entre eux que d'une paire de bases.

Au cours de la migration les brins d'ADN vont passer les uns après les autres devant un rayon laser à argon servant à identifier les ddNTPs terminaux grâce à un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) de la technologie Big Dye Terminator. Sur chaque ddNTP sont fixés deux fluorochromes reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (fluorochrome donneur) commun aux 4 ddNTPs alors que le second est une dichlororhodamine (fluorochrome accepteur) différent pour chaque type de ddNTP.

Le fluorochrome donneur est excité par le rayon laser et va émettre une énergie fluorescente (515-520 nm) captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui va être excité à son tour et émettre un spectre de longueurs d'onde spécifique du ddNTP (*figure 37*).

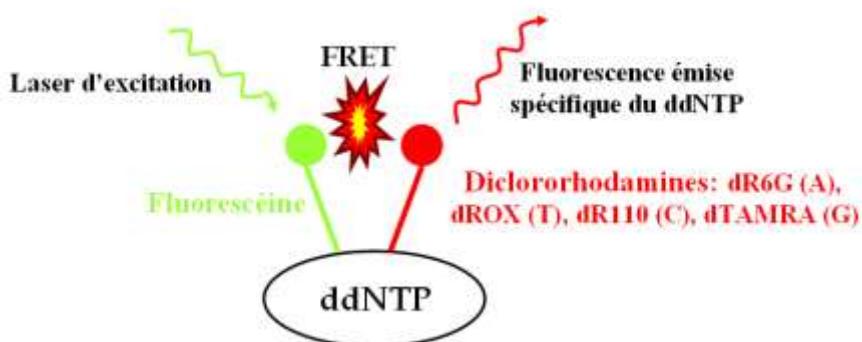


Figure 37. Identification du ddNTP par transfert d'énergie fluorescente par résonance

La lumière fluorescente est émise perpendiculairement au faisceau laser et passe à travers un filtre (qui va sélectionner uniquement la fluorescence provenant des capillaires) puis est décomposée et dirigée vers un système de détection par une lentille concave.

Les données spectrales sont collectées et stockées au cours de la migration puis sont automatiquement extraites et analysées par un logiciel qui va permettre une bonne assignation des bases (A, T, G, C) et donc proposer une séquence. Cette assignation tient compte notamment de la différence de mobilité des différents fluorochromes, de l'espacement moyen entre deux pics et des différences d'intensité de fluorescence entre les différents fluorochromes.

On récupère donc à l'issue du séquençage et pour chaque PCR un spectre d'émission associé à une séquence nucléotidique (sens ou antisens) brute (*figure 38*). Ces données vont ensuite être analysées grâce à différents logiciels.

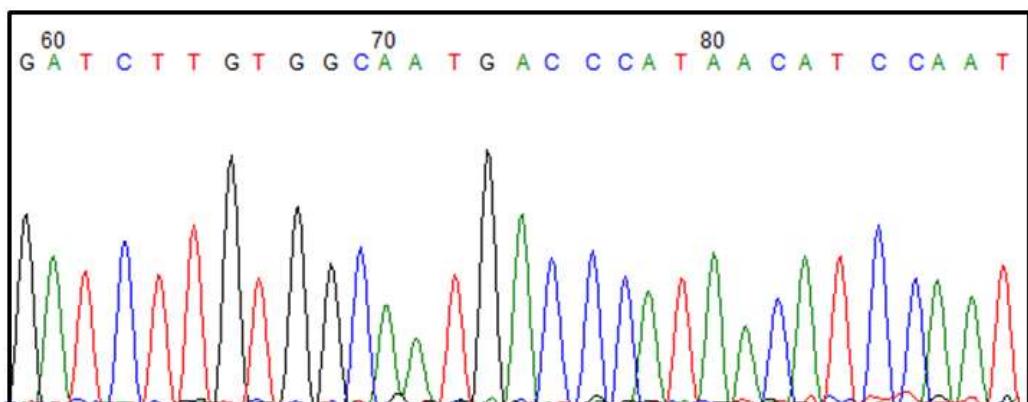


Figure 38. Exemple d'assignation des nucléotides aux pics de fluorescence correspondants

VI. Analyse des résultats

6.1 Logiciel MEGA 6.0

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) est un logiciel de bioinformatique que nous avons utilisé pour ses fonctions d'alignement de séquences à partir des données brutes précédemment obtenues pour chaque patient.

Pour le **gène S (RT)** nous avons donc obtenu 4 séquences brutes correspondant aux 4 amores utilisées : P2f (sens)/S8 (antisens) pour le début du gène et P7a (sens)/979 (antisens) pour la fin du gène avec une zone de chevauchement.

Pour le **gène préS** nous avons obtenu 2 séquences brutes correspondant aux amores utilisées : P4 (sens)/PreSr (antisens) recouvrant la totalité du gène (*figure 33*).

La 1^{ère} étape consiste à « nettoyer » les séquences brutes en supprimant les parties illisibles et en ne gardant que les séquences associées à des pics de fluorescence d'intensité correcte revenant à la ligne de base et bien distincts les uns des autres (*figure 39*).

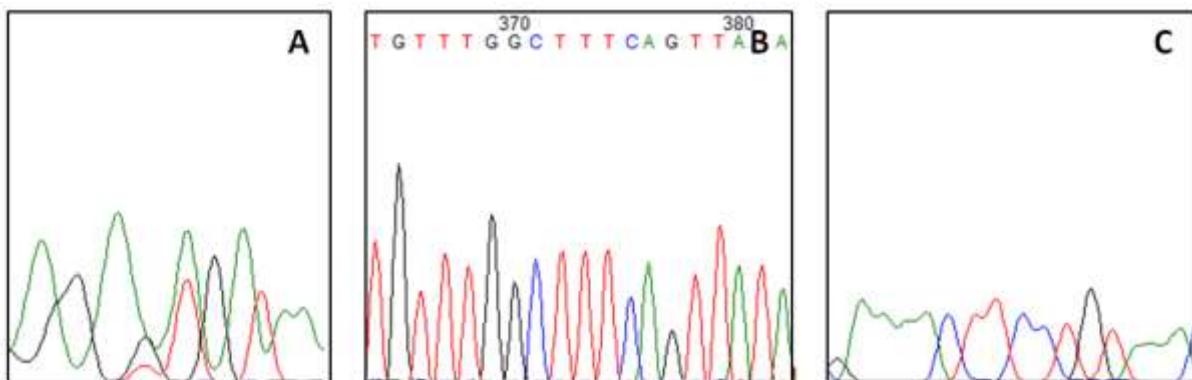


Figure 39. Chevauchement des pics (A), pics ne revenant pas à la ligne de base (C) et séquence lisible (B)

Comme nous voulons déterminer la séquence sens (5' → 3') de chaque gène il est indispensable de retourner les séquences antisens et de remplacer chaque base par sa base complémentaire. Il existe pour cela une fonction « Reverse Complement ».

Les séquences nettoyées sont ensuite transférées dans l'interface d'alignement du logiciel avec une séquence de référence du gène correspondant (*figure 40*). Il faut alors vérifier que les différentes séquences proposées soient identiques entre elles et s'assurer en parallèle que chaque base corresponde bien au pic de fluorescence adéquat. Il peut parfois arriver que deux bases différentes se situent au niveau du même nucléotide, on parle alors de base dégénérée et on lui attribue une lettre selon la nomenclature internationale (*figure 41*). La présence de bases dégénérées signifie que plusieurs populations d'ADN ont été séquencées. Cela correspond à la coexistence de plusieurs souches virales chez le patient ou à des mutations au cours des différentes PCR.

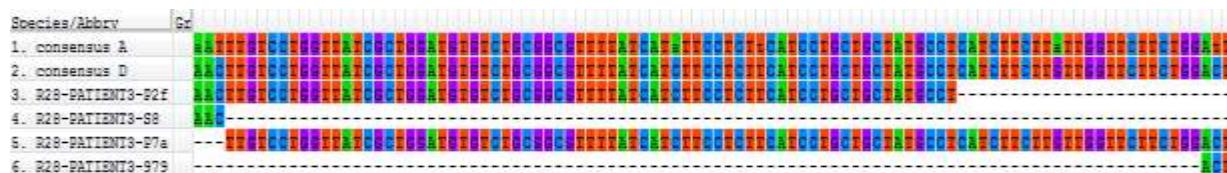


Figure 40. Exemple d'alignement de séquences dans Mega 6 (gène S → P2f S8 P7a 979)

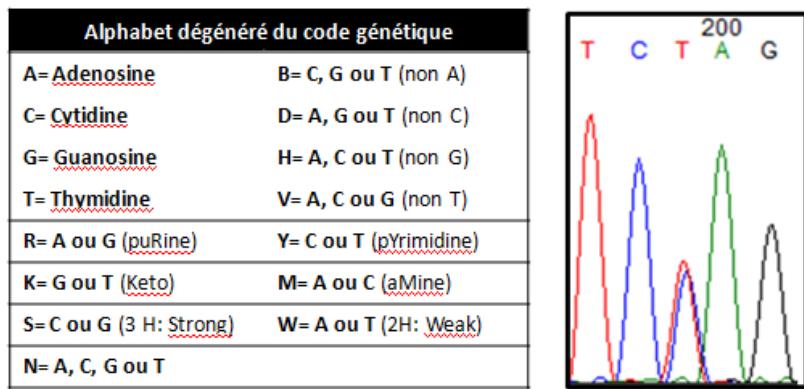


Figure 41. Code génétique dégénéré et exemple de base dégénérée (C ou T = Y)

Une fois la séquence nucléotidique vérifiée il est possible de la traduire en séquence protéique grâce à une fonction du logiciel.

On obtient donc finalement pour chaque patient **une séquence consensus en acides nucléiques et en acides aminés** pour les **génés S, RT** (~ 830 pb/ 1032) et **préS**.

6.2 Logiciel GREG +

Le logiciel GREG+ (site administré par le CHU de Grenoble) permet à partir des séquences protéiques S et/ou RT obtenues précédemment d'identifier d'éventuelles mutations de la transcriptase inverse (mutations de résistances aux traitements) et certaines mutations d'intérêts de l'antigène HBs.

Il permet également d'identifier **le génotype du virus pour chaque patient**, donnée indispensable pour l'appariement entre patients d'intérêts et contrôles et pour l'analyse des résultats.

6.3 VESPA

VESPA (Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis) est un programme informatique disponible sur internet (hcv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html).

Il permet de comparer une ou plusieurs séquences de référence à une ou plusieurs séquences d'intérêts (en acides nucléiques ou acides aminés). Il calcule ainsi la fréquence de chaque acide aminé (ou nucléotide) dans chacune des 2 cohortes et met en évidence les différences de séquence entre les 2 cohortes (Korber *et al*, 1992).

On a donc pour chaque patient comparé la séquence obtenue (S, préS et RT) à une séquence consensus de référence (S, préS et RT) du génotype correspondant (A, D ou C). On a ainsi pu comparer **les profils de mutations des protéines S et préS pour chaque groupe patient**.

6.3 Logiciel ANTHEPROT

ANTHEPROT (Deléage *et al*, 2001) est un logiciel gratuit et autonome destiné à l'analyse des séquences protéiques.

Il s'agit d'un programme interactif doté d'une interface graphique utilisateur qui permet une manipulation commode des données et de la séquence protéique. Il est également capable de se connecter à un serveur WEB afin d'effectuer une comparaison de séquences à grande échelle à partir de banques de données régulièrement mises à jour.

De nombreux outils et procédés y sont disponibles : analyse physico-chimique de la protéine (pH, courbe de titration, charge, hydrophobie/hydrophilie,...), prédition de structures secondaires et des domaines transmembranaires, accessibilité, différents modes de représentation tridimensionnelle,...

L'outil qui nous intéresse le plus pour notre étude est la **prédition de l'antigénicité de la protéine** selon la méthode Parker et la représentation graphique de ce profil d'antigénicité (*figure 42*). Cette méthode permet en effet de mettre en évidence les sites de surface d'une protéine et d'évaluer leur niveau d'antigénicité en intégrant les 3 échelles les plus pertinentes : l'hydrophilie HPLC (Parker), l'accessibilité (Janin) et les valeurs B de flexibilité (Karplus & Schultz) (Parker *et al*, 1986).

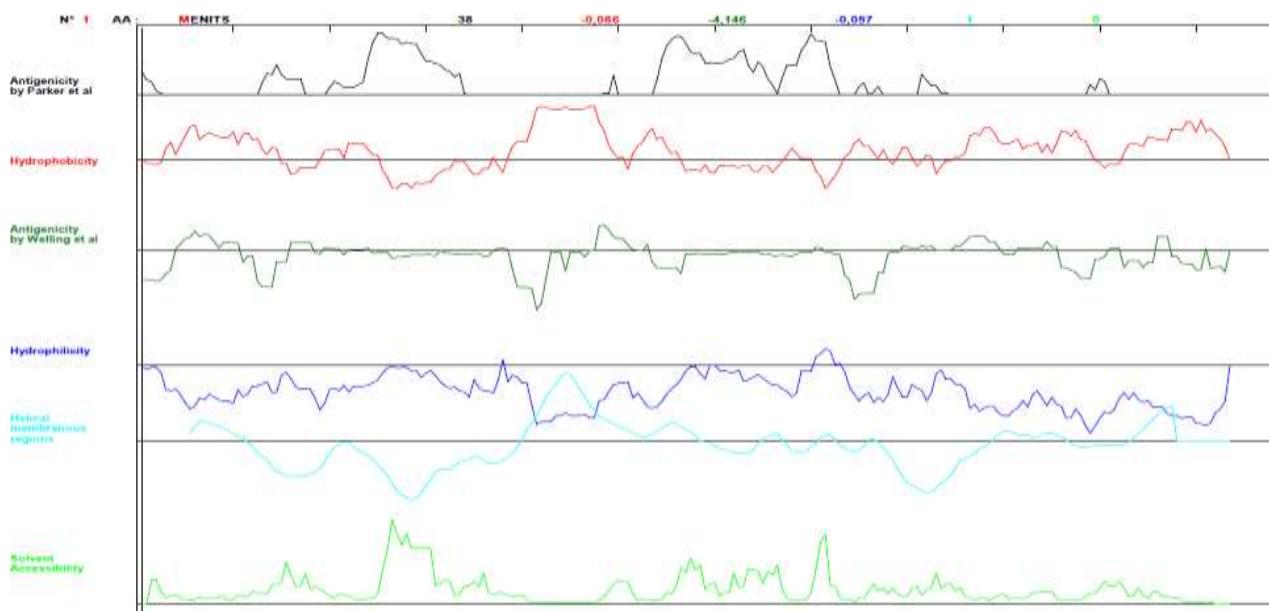


Figure 42. Représentation graphique de quelques paramètres sur Antheprot : antigénicité Parker (noir), hydrophobie (rouge), antigénicité Welling (vert), hydrophilie (bleu foncé), domaines transmembranaires en hélice α (bleu clair), accessibilité (vert clair). Séquence protéique en abscisse.

RESULTATS

Nous avons donc réalisé le séquençage des gènes S, pré-S1 et pré-S2 pour chacun des patients. Les séquences obtenues se situent en *Annexe 4*.

Il a fallu dans un premier temps recenser l'ensemble des mutations observées pour chacun des patients par comparaison avec une séquence de référence. Les séquences de référence utilisées se situent également en *Annexe 3*. Nous utiliserons une numérotation unique pour le domaine protéique préS (pré-S1+pré-S2) qui comporte 174 acides aminés pour les génotypes A/C et 163 acides aminés pour le génotype D en raison de la délétion de 11 acides aminés au début de pré-S1 (*figure 43*). Nous nous baserons sur la numérotation du génotype D (**1:163**), les 11 acides aminés supplémentaires des génotypes A/C seront numérotés en négatif (**-11:-1**). La protéine S est constituée de 226 acides aminés (**1:226**) et la transcriptase inverse de 344 acides aminés (**1:344**).

Nous avons vu que chez certains patients plusieurs populations virales pouvaient coexister ce qui peut se traduire par la présence de bases dégénérées (deux bases à la même position) et par conséquent deux acides aminés différents à la même position. Nous utiliserons le code international des acides aminés pour nommer une mutation (ex : L109Q) ; la présence d'une double population sera également signalée (ex : L42L/P).

Nous verrons également qu'en raison du chevauchement des séquences une mutation au niveau de la protéine S peut induire une mutation au niveau de la RT (*figure 43*).

La deuxième étape est la prédiction du profil d'antigénicité de chaque protéine sur le logiciel Antheprot.

Nous analyserons ensuite ces résultats dans la partie DISCUSSION.

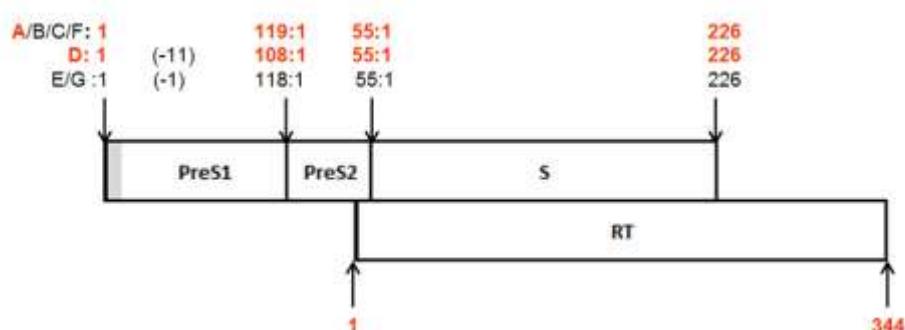


Figure 43. Numérotation et chevauchement des protéines d'intérêts.

I. Caractéristiques des patients

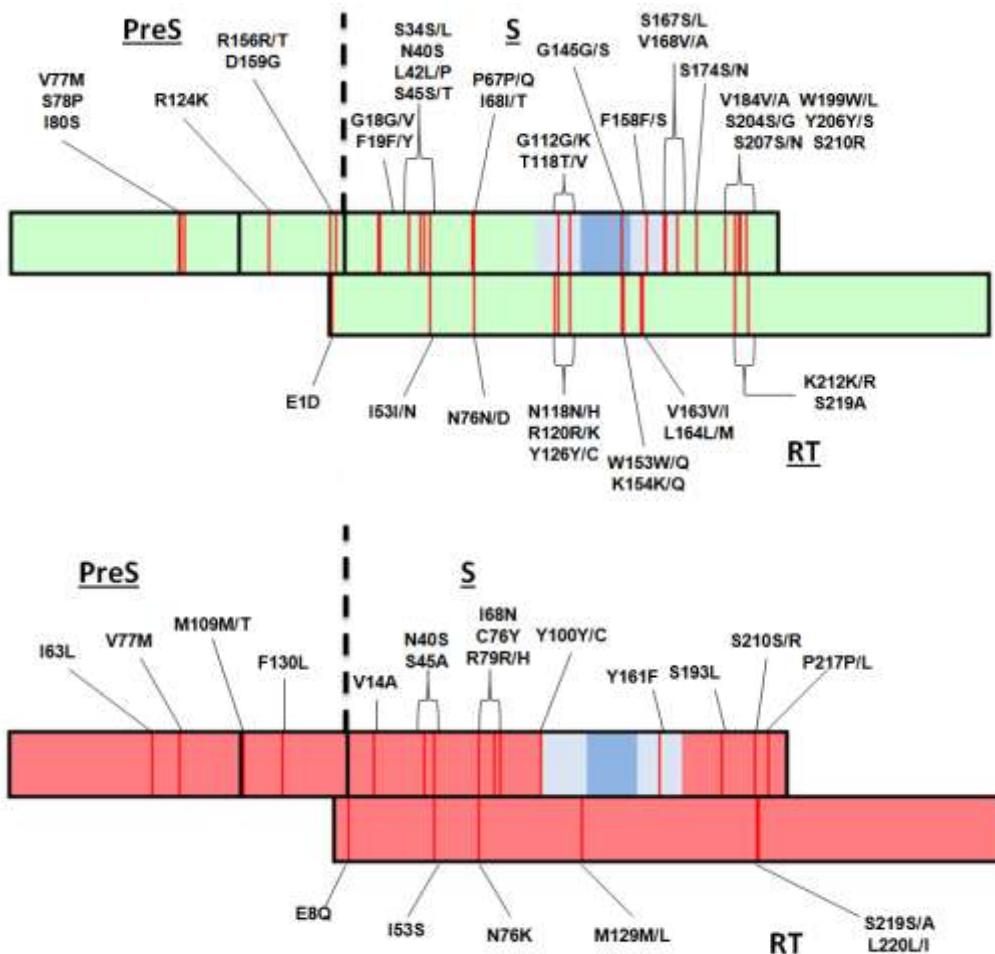
	Clairance AgHBs	n=	Age moyen	Sexe	AgHBe -	Charge virale moyenne	Génotype
Patients traités	OUI	2	51 (39-64)	1 H; 1 F	n=2	5.9 log UI/ml	1 A; 1 D
	NON	3	47 (38-61)	1 H; 2 F	n=3	5.16 log UI/ml	1 A; 2 D
Patients non traités	OUI	4	57 (45-76)	4 H	n=4	2.83 log UI/ml	1 A; 3 D
	NON	3	45 (44-47)	3 H	n=3	4.35 log UI/ml	1 A; 2 D
Non appariés	Clairance AgHBs	n=	Age moyen	Sexe	AgHBe -	Charge virale moyenne	Génotype
Patients traités	NON	3	65 (64-66)	3 H	n=3	5.33 log UI/ml	3 D
	NON	2	63 (58-68)	2 H	n=2	4.18 log UI/ml	1 D; 1 C

II. Patients sous traitement

2.1 Mutations recensées

Ci-dessous sont présentées les mutations retrouvées chez les patients traités de génotype A à savoir JR092005 ayant présenté une clairance de l'Ag HBs et son contrôle apparié BM072002.

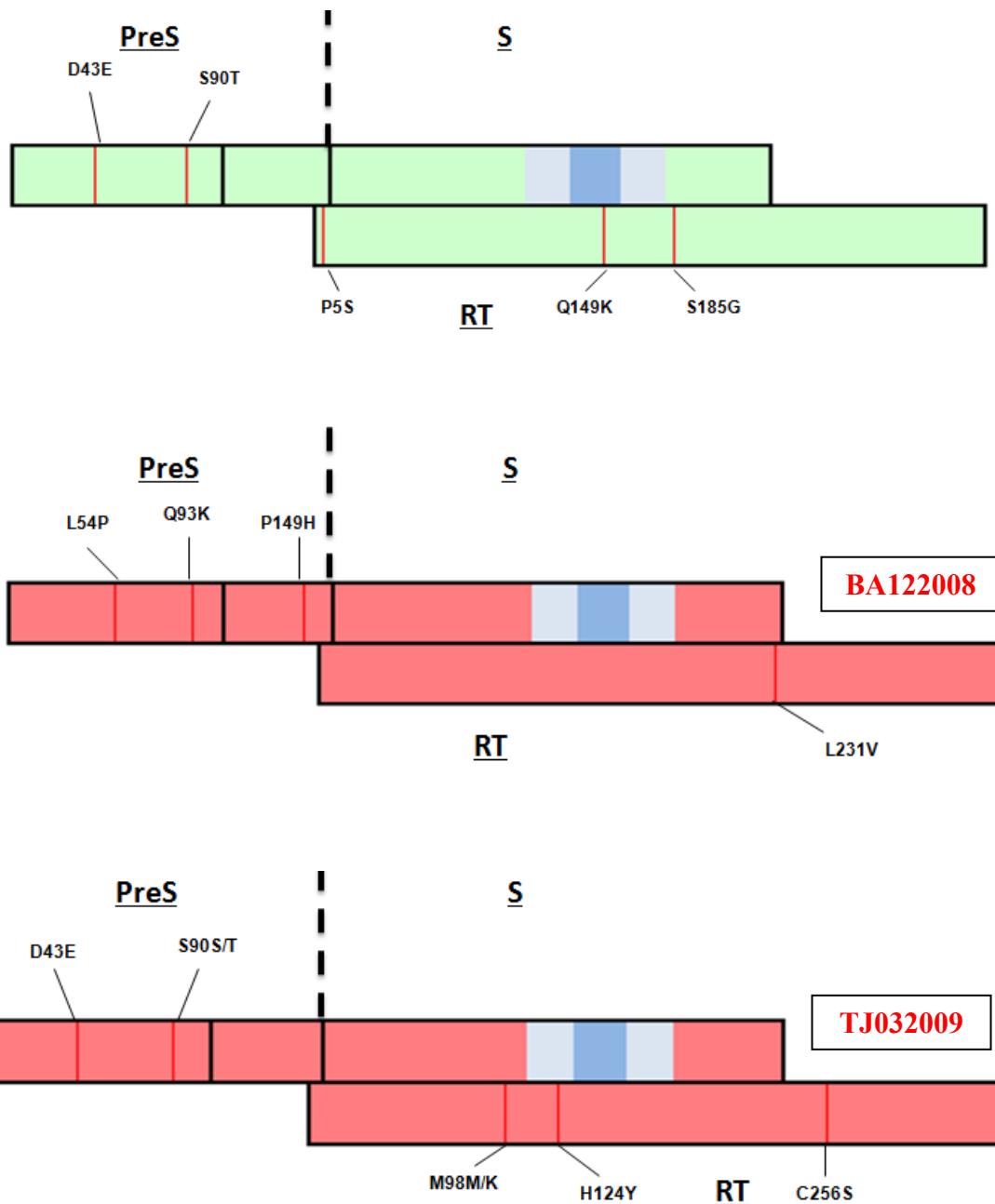
JR092005/ BM072002 (génotype A)



Ces deux patients sont les plus âgés de la cohorte (64 et 61 ans). Ils présentent tous les deux de nombreuses mutations des domaines S et préS. On observe également chez JR092005 la présence importante de doubles populations virales.

Ci-dessous sont présentées les mutations retrouvées chez les patients traités de génotype D à savoir BF012002 auquel nous avons pu appairer deux patients contrôles BA122008 et TJ032009.

BF012002/ BA122008/ TJ032009 (génotype D)



Ces patients sont plus jeunes que les précédents (39, 38 et 42 ans). Ils présentent très peu de mutations des glycoprotéines d'enveloppe. On n'observe d'ailleurs aucune mutation au niveau du domaine S.

2.2 Profil d'antigénicité sur Antheprot

Nous avons donc évalué pour chaque patient le profil antigénique des protéines codées par les domaines S et préS grâce à une représentation graphique (antigénicité selon Parker).

Il convient tout d'abord de signaler que les profils antigéniques diffèrent selon le génotype viral, et ceci de façon variable selon la protéine. Si les profils des génotypes A et D sont relativement proches en ce qui concerne la protéine S ils diffèrent par exemple de celui d'un génotype C. Le profil d'antigénicité de la séquence protéique codée par préS est par contre très différent entre les génotypes A et D même en ne tenant pas compte de la délétion de 11 acides aminés au début de la séquence d'un génotype D.

Nous avons représenté ces profils d'antigénicité en les superposant sur deux plans différents (A devant D d'une part et D devant A d'autre part) afin de mieux observer les différences (*figure 44*).

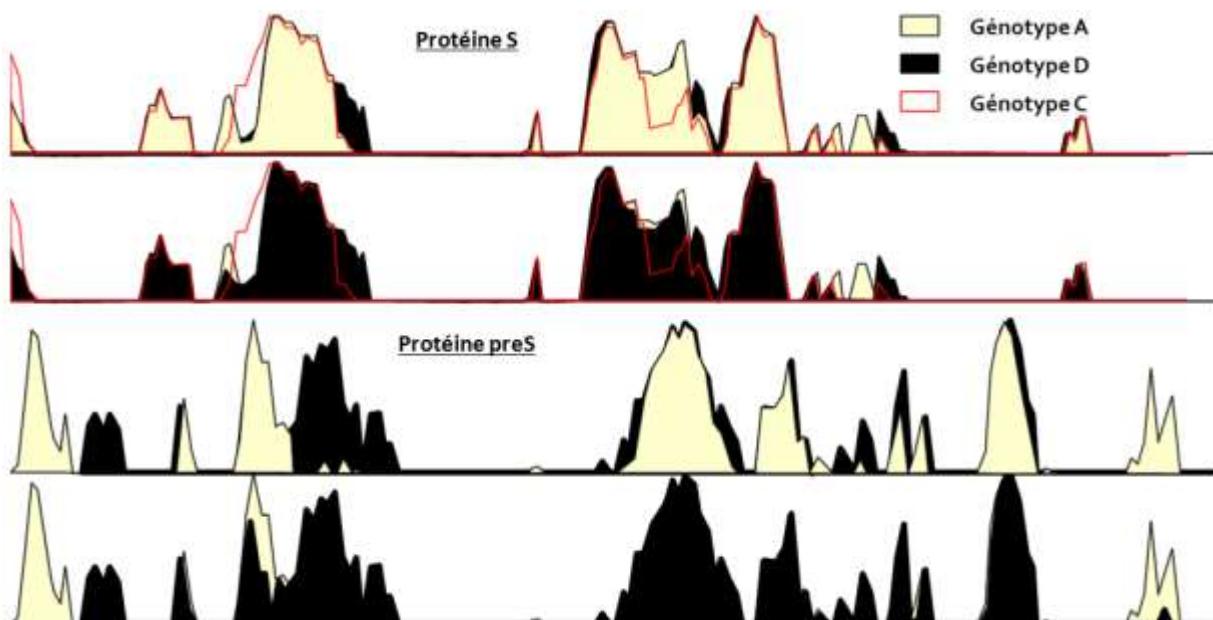
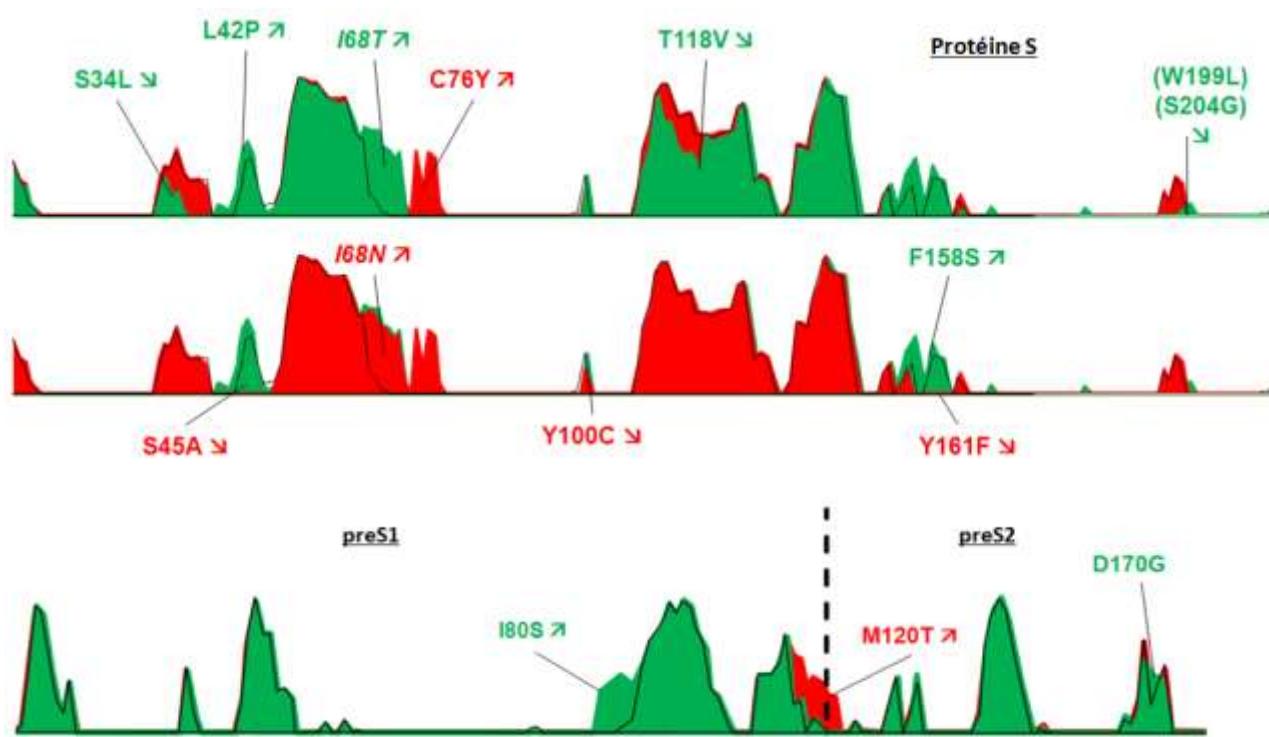


Figure 44. Comparaison des profils d'antigénicité des séquences de référence pour les protéines codées par les domaines S (génotypes A, D, C) et préS (génotype A, D).

Pour chacun des couples de patients (intérêt/contrôle) nous avons obtenu la prédiction de l'antigénicité des domaines S et préS grâce au logiciel Antheprot. Nous allons présenter ces résultats en superposant les graphiques dans les deux sens lorsque cela est nécessaire (intérêt sur contrôle et/ou contrôle sur intérêt). Le profil de la séquence de référence correspondante (génotype A ou D) sera représenté en trait noir continu.

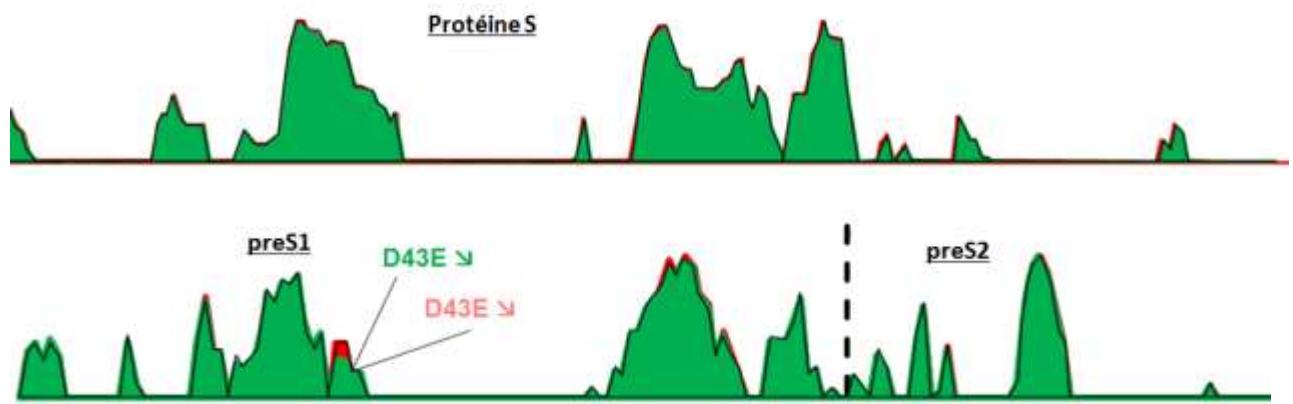
Comme précédemment nous présenterons d'abord les résultats des patients de génotype A puis ceux des patients de génotype D.

JR092005/ BM072002 (génotype A)



On observe chez le patient d'intérêt (clairance de l'Ag HBs) des modifications importantes du profil d'antigénicité mais très peu de mutations entraînant une diminution de l'antigénicité prédictive hormis la mutation T118V se situant au cœur de la région hydrophile majeure. Le patient contrôle comporte les mutations S45A et Y161F à l'origine d'une diminution de l'antigénicité *in silico*. La mutation Y100C ne semble avoir qu'un impact minime *in silico* mais nous verrons qu'elle peut être impliquée dans des phénomènes d'échappement immunitaire.

BF012002/ BA122008/ TJ032009 (génotype D)



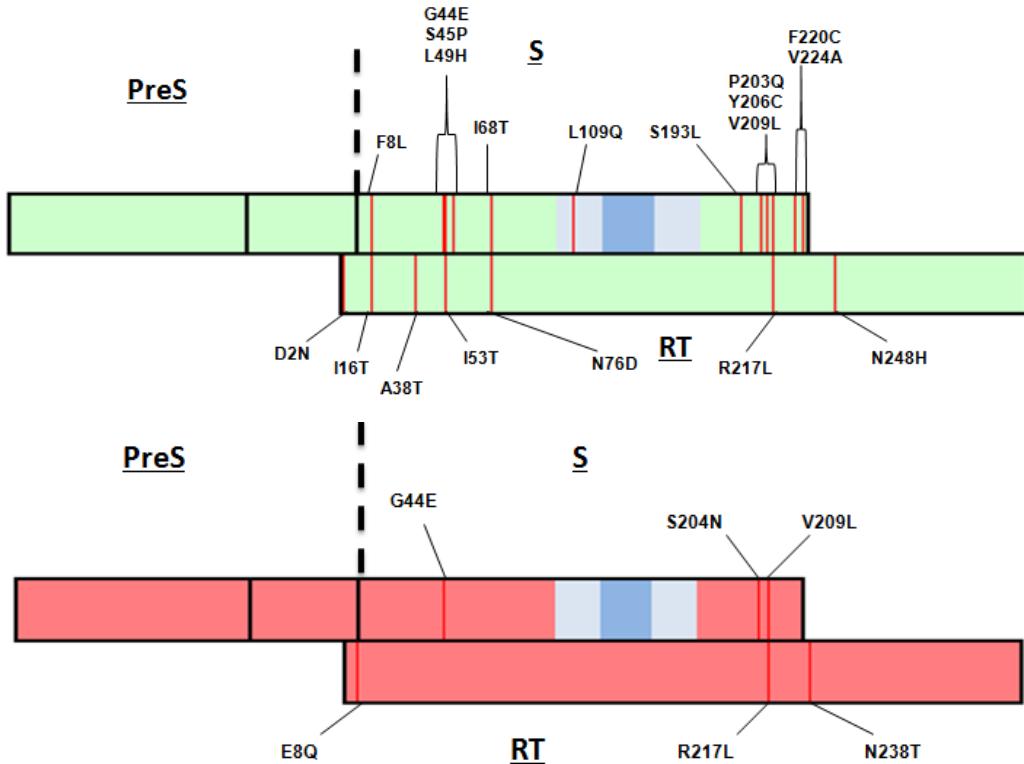
Pour les patients de génotype D sous traitement nous avons vu précédemment qu'ils présentaient très peu de mutations (notamment au niveau du domaine S). Il est donc logique d'obtenir des profils d'antigénicité prédictive inchangés par rapport à la séquence de référence si l'on excepte la mutation D43E du domaine pré-S1 retrouvée chez le patient d'intérêt (BF012002) et un des patients contrôle (TJ032009).

III. Patients non traités

3.1 Mutations recensées

Nous présenterons dans un premier temps les mutations retrouvées chez les 2 patients de génotype A (TD042002 et son contrôle GS022014).

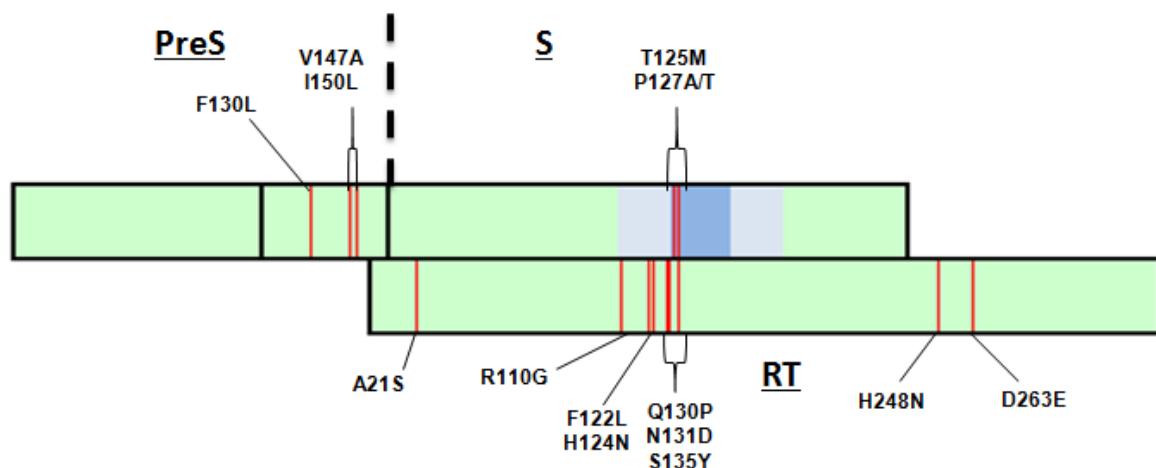
TD042002/ GS022014 (génotype A)



Nous observons ici, pour ces patients de génotype A, plus de mutations chez le patient d'intérêt que chez le patient contrôle au niveau du domaine S. Ces deux patients ne présentent aucune mutation du domaine préS.

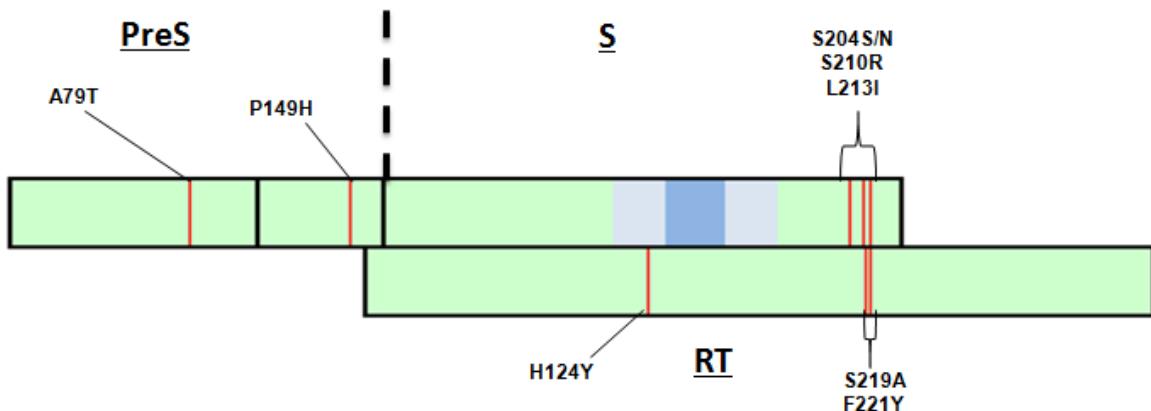
Nous présentons ensuite ci-dessous les mutations retrouvées chez les patients de génotype D non traités : CA021995 pour lequel nous n'avons pas de contrôle apparié, BM052006 et son contrôle BI042011, MM022011 et son contrôle SA122011

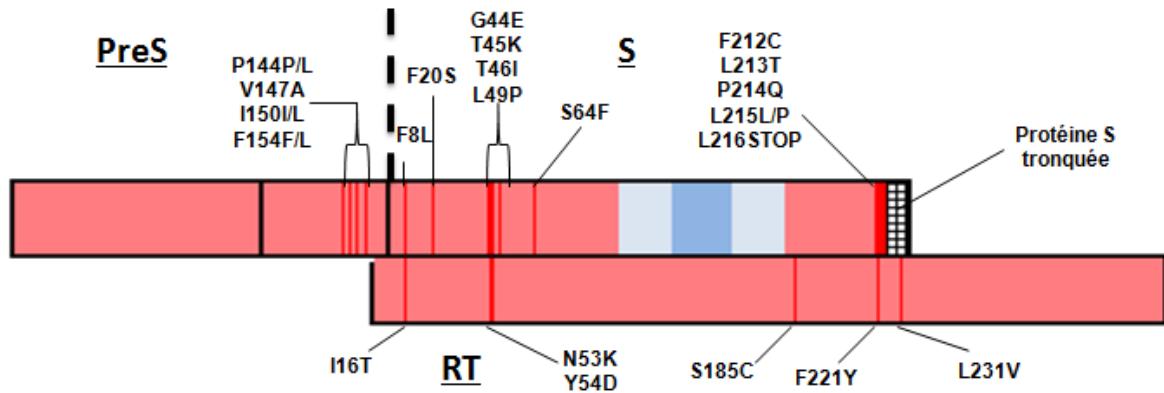
CA021995 (génotype D)



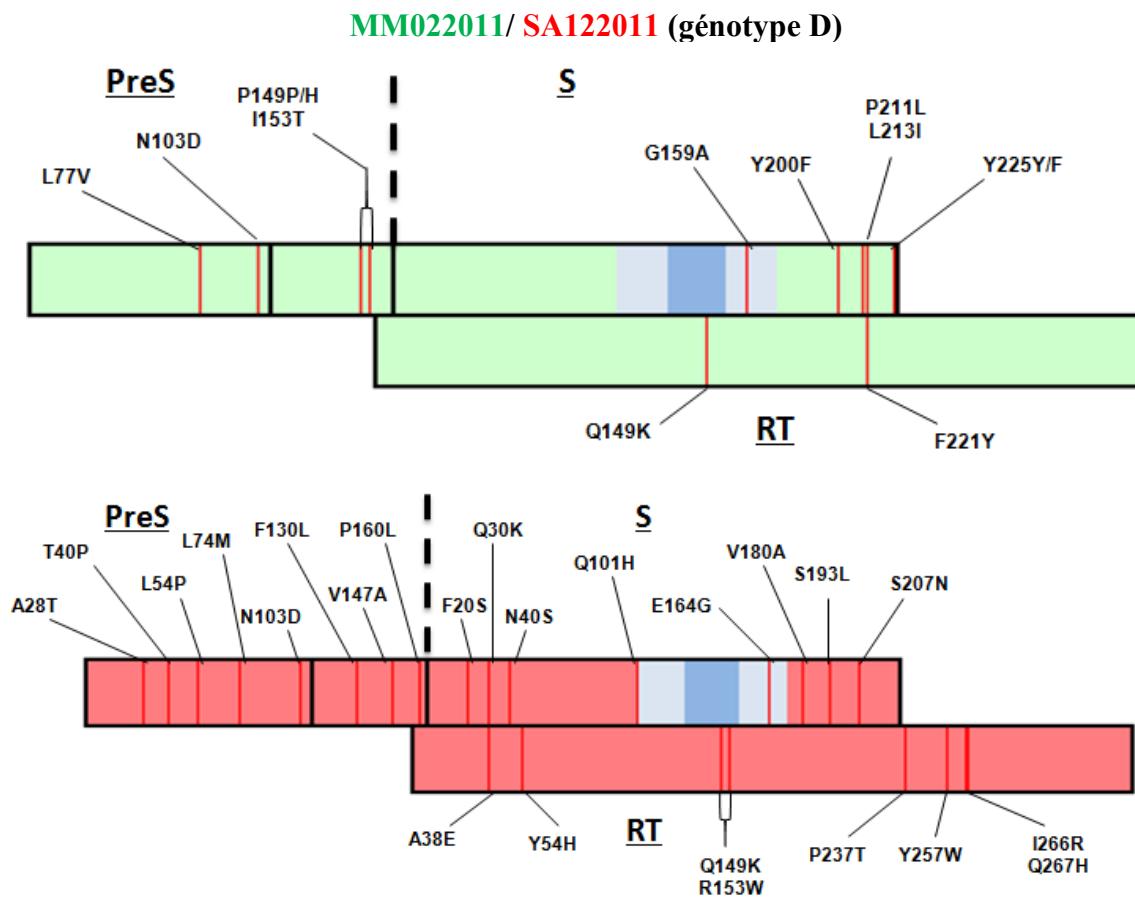
CA021995 présente très peu de mutations sur les glycoprotéines d'enveloppe. Signalons la mutation T125M située au niveau de la région hydrophile majeure (MHR) associée à la mutation P127A/T. Nous reparlerons ultérieurement de ces mutations.

BM052006/ BI042011 (génotype D)





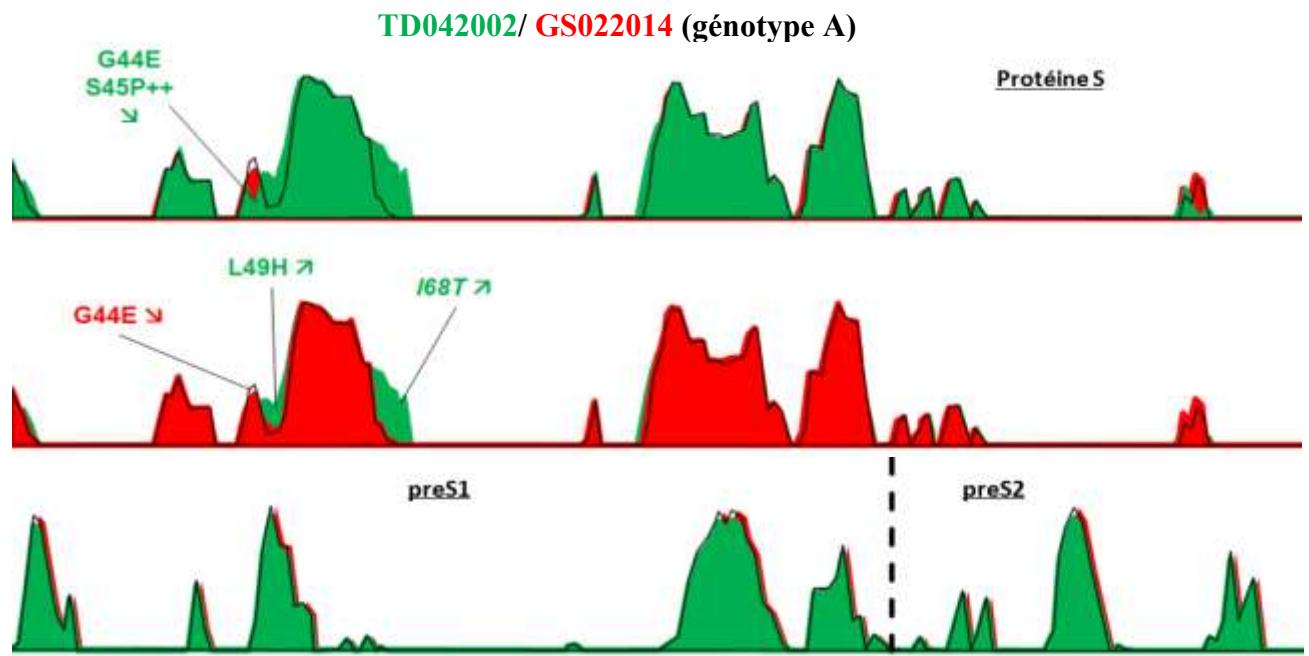
Ici le patient d'intérêt BM052006 présente peu de mutations des domaines S et préS contrairement au patient contrôle BI042011. On peut noter que ce dernier a une protéine S tronquée en raison de la mutation non sens L216*.



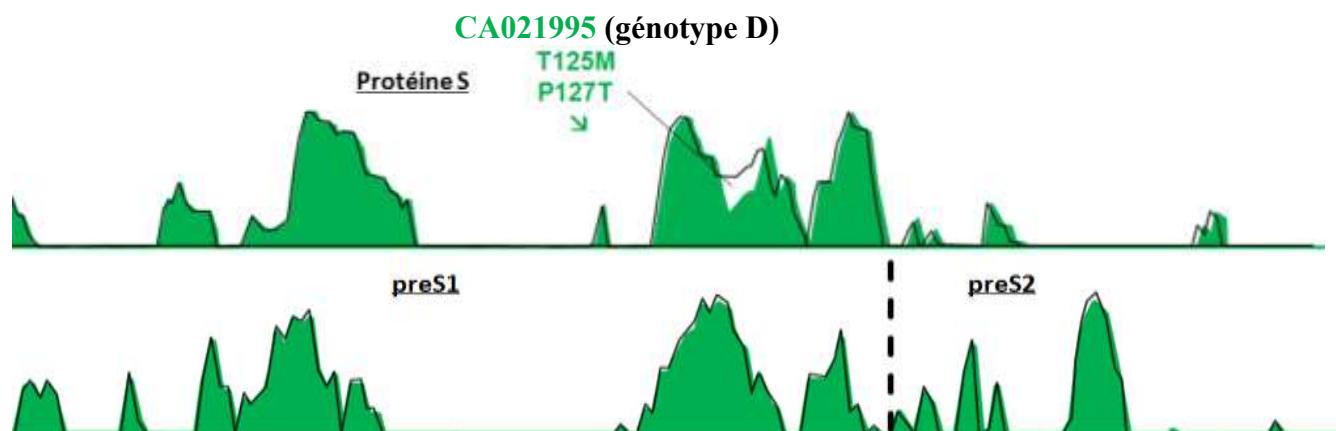
Comme précédemment le patient contrôle SA122011 présente plus de mutations que le patient d'intérêt MM022011 et plus particulièrement au niveau du domaine préS.

3.2 Profil d'antigénicité sur Antheprot

Ci-dessous le profil d'antigénicité prédictive des patients non traités de génotype A (TD042002 et son contrôle GS022014). Nous présenterons ensuite les profils des patients de génotype D (CA021995, BM052006 et son contrôle BI042011, MM022011 et son contrôle SA122011).

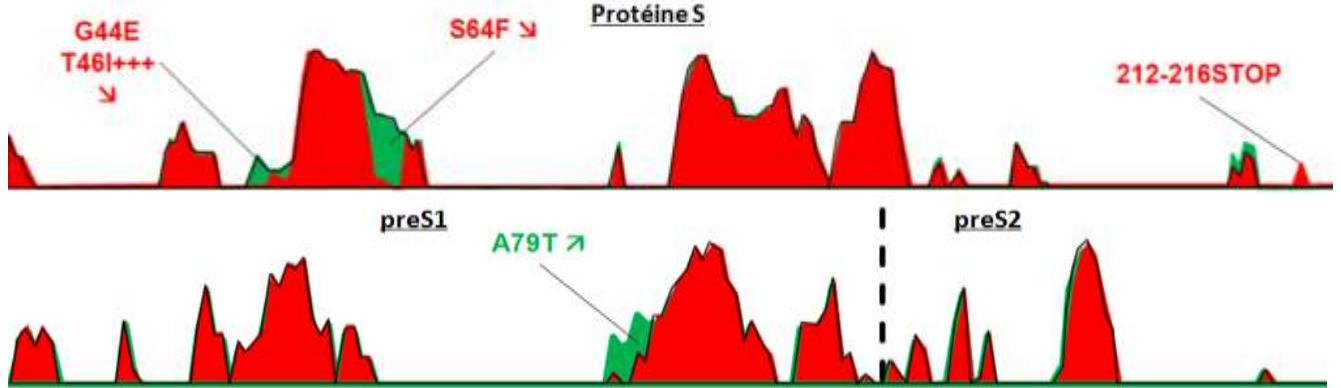


Les mutations recensées chez ces patients de génotype A ont peu d'impact sur les profils d'antigénicité (diminution minime due à la mutation S45P chez le patient d'intérêt et G44E chez les deux patients). Les profils du domaine préS ne sont pas impactés car ces patients n'ont pas de mutation au niveau de ce domaine.



Ce patient d'intérêt réalisant la clairance de l'Ag HBs a très peu de mutation modifiant les profils antigéniques des glycoprotéines d'enveloppe. Les mutations T125M et P127T dans la région hydrophile majeure de la protéine S diminuent cependant l'antigénicité prédictive.

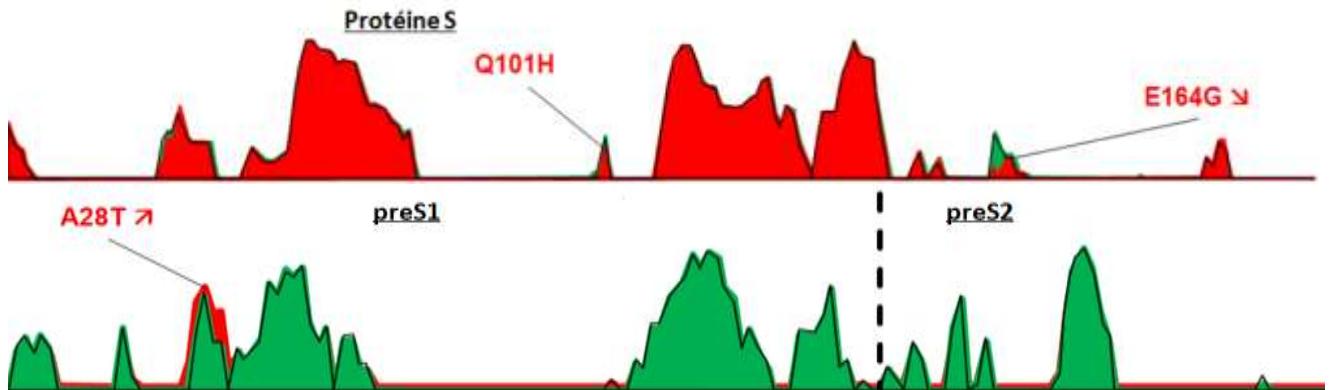
BM052006/ BI042011 (génotype D)



On observe ici une diminution de l'antigénicité prédictive de la protéine S chez le patient contrôle BI042011 en raison des mutations G44E, T46I et S64F. Ce patient présente par ailleurs une protéine S tronquée (L216*).

Le patient d'intérêt BM052006 ne présente pas de diminution de l'antigénicité prédictive sur le domaine S et même une augmentation de l'antigénicité prédictive sur le domaine preS1 (A79T)

MM022011/ SA122011 (génotype D)



Il y a peu de mutations qui impactent le profil d'antigénicité prédictive chez ces deux patients. Signalons la mutation E164G au niveau de la région hydrophile majeure (MHR) de la protéine S chez le patient contrôle SA122011.

DISCUSSION

L'objectif de notre étude est donc l'analyse pour chaque patient de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe virale (S, M et L) c'est-à-dire l'analyse des mutations apparaissant au cours de l'infection chronique au niveau des gènes pré-S1, pré-S2 et S afin de déterminer si ces facteurs propres à l'enveloppe du virus peuvent en partie influer sur la clairance de l'antigène HBs ou au contraire favoriser sa persistance.

Comme nous l'avons déjà évoqué ces glycoprotéines sont des cibles majeures de la réponse immunitaire.

Le domaine S, commun aux 3 protéines, comporte les principaux épitopes B reconnus par des anticorps hautement neutralisants localisés essentiellement au niveau de la région hydrophile majeure (aa 99-169) et plus particulièrement au niveau du déterminant « a » (aa 124-149). On y trouve également des épitopes pouvant être présentés aux lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) par des molécules CMH de classe I ou d'autres présentés aux lymphocytes T helper (CD4+) par des molécules CMH de classe II. Ces derniers sont indispensables à l'initiation des réponses humorale et cellulaire. Des mutants de ces épitopes T spécifiques ont déjà été décrits comme responsables potentiels d'échappement immunitaire chez des individus vaccinés (Bauer *et al*, 2002).

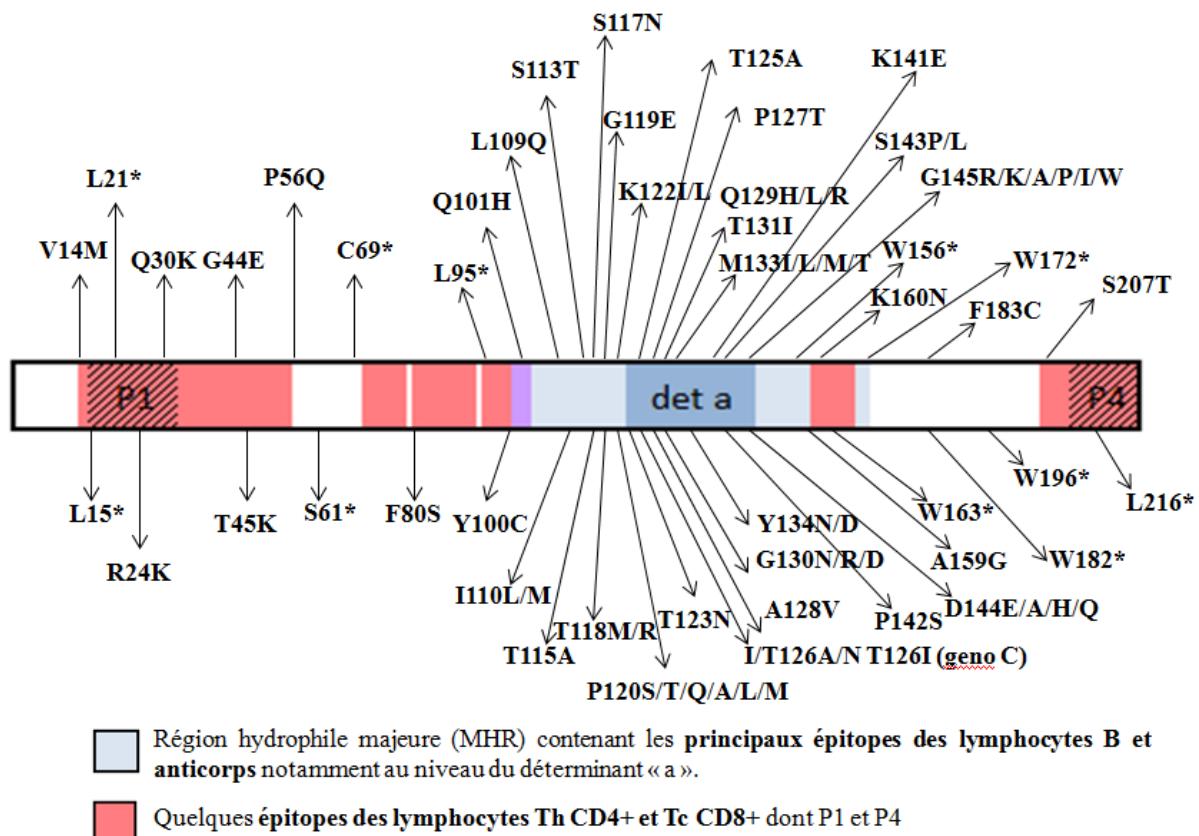
Les domaines pré-S1 (L) et pré-S2 (L et M) sont également exposés à la surface de la particule virale. Ils portent aussi des épitopes B spécifiques cibles d'anticorps neutralisants anti-préS1 et anti-préS2 ainsi que de nombreux épitopes T spécifiques (Kim *et al*, 2000).

Ainsi l'apparition de mutations ponctuelles ou délétions sur le domaine préS peut modifier de manière significative le devenir de l'infection et favoriser la persistance si ces modifications aboutissent à la perte d'épitopes immuns (Huy *et al*, 2003 ; Mu *et al*, 2008).

Pour notre étude nous avons donc recensé les principales mutations responsables d'échappement immunitaire et/ou vaccinal ainsi que les principaux épitopes B et T spécifiques décrits dans la littérature.

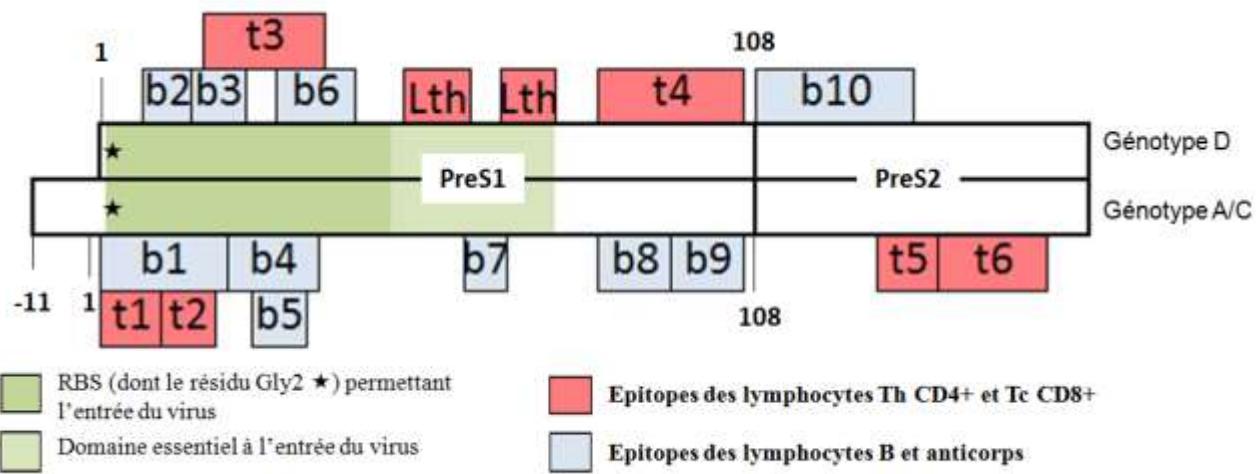
Pour la protéine S la plupart de ces mutations se situent au niveau du déterminant « a » mais un certain nombre de mutations est également retrouvé en dehors de la région hydrophile majeure principalement au niveau d'épitopes T spécifiques (*figure 45*).

Concernant les domaines pré-S1 et pré-S2 peu de mutations d'échappement sont décrites nommément dans la littérature si ce n'est qu'elles sont localisées au niveau des épitopes T et B spécifiques (*figure 46*).



D'après Baclig et al., 2014; Kay et al., 2007; Oon et al., 1999; Zhang et al., 2013; Pourkarim et al., 2014; Ljaz et al., 2012; Locarnini et Yuen, 2010; Wu et al., 2012; Shuaibu, 2014; Hsu et al., 2011; Yu et al., 2014; Simon et al., 2012; Ramezani et al., 2013; Pan et al., 2014; Bauer et al., 2002; Min et al., 1996; Fan et al., 2001; Li et al., 2013; Huang et al., 2014.

Figure 45. Principaux mutants d'échappement immunitaire localisés sur le domaine S



D'après Chen et al., 2005; Kim et al., 2000

Figure 46. Localisation des régions indispensables à l'infectivité du virus (entrée) dont le « Receptor Binding Site » et des principaux épitopes B et T spécifiques sur les domaines pré-S1 et pré-S2

Nous avons donc confronté ces données de la littérature (immunité cellulaire et humorale) ainsi que les profils d'antigénicité *in silico* (immunité humorale) des domaines S (principalement MHR et déterminant « a »), pré-S1 et pré-S2 avec les mutations retrouvées dans les différents groupes de patients étudiés. Pour rappel le groupe des patients sous traitement comprend 2 patients clairance et 6 patients contrôles dont 3 patients non appariés. Le groupe des patients non traités comprend 4 patients clairance et 5 patients contrôles dont 2 non appariés.

On a ainsi pu voir si l'on retrouvait des mutations particulières dans certains groupes de patients et déterminer le nombre de mutations ayant un rôle potentiel dans l'échappement immunitaire pour chacun des groupes de patients. On distinguera ici les mutations d'échappement immunitaire décrites dans la littérature associée à une diminution du profil d'antigénicité prédict *in silico*, les mutations décrites dans la littérature sans impact sur le profil Antheprot, les autres mutations au niveau d'épitopes B et T spécifiques avec et sans diminution du profil prédict d'antigénicité également intéressantes à relever puisqu'elles se situent sur des cibles de la réponse immunitaire de l'hôte même si elles n'ont probablement pas toutes un impact réel et enfin les mutations associées à une diminution de l'antigénicité prédictive sur Antheprot seule.

I. Patients sous traitement

En préambule signalons que les patients de ce groupe, qu'ils réalisent ou non la clairance de l'Ag HBS, sont tous des patients traités par analogues nucléos(t)idiques. Comme nous l'avons vu précédemment le séquençage du gène S permet par chevauchement le séquençage (en grande partie) du gène de la transcriptase inverse (RT) et donc l'analyse des mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques (2.6.3. *Mutants de résistance aux traitements*).

Nous n'avons observé aucune mutation de résistance chez l'ensemble des patients de notre étude.

Il faut cependant noter que pour des raisons techniques nous avons dû choisir pour chacun de nos patients des sérums prélevés avant l'initiation du traitement permettant la négativation de l'ADN +/- la clairance de l'Ag HBs afin d'avoir une charge virale suffisamment importante pour réaliser le séquençage. Nous ne pouvons donc pas étudier l'influence de la pression thérapeutique du dernier traitement mis en place sur la séquence S/RT du virus. Néanmoins le fait qu'après la mise en place du traitement tous les patients aient gardé une charge virale non quantifiable montre qu'il n'y a pas eu de rebond virologique donc pas d'émergence d'un

mutant de résistance. Les patients contrôles sont par ailleurs tous traités par entécavir ou ténofovir qui sont des molécules ayant une barrière génétique élevée. On ne peut donc pas expliquer la persistance de l'Ag HBs chez ces patients par une résistance au traitement.

1.1 Patients de génotype A

Le génotype A représente environ 27% des souches de VHB en France.

Nous avons 1 patient clairance associé à son contrôle (JR092005/ BM072002).

Patients traités (génotype A)	Bibliographie	Mutation décrite			Position dans un épitope LT/LB		Non décrite	Total	Nombre de mutations moyen/patient
		Antigénicité <i>in silico</i>	Diminuée	Stable ou augmentée	Diminuée	Stable ou augmentée			
Patients clairance AgHBs (1)	PreS	/	/	/	1	/	1	1	9
	S	/	1	1	5	1	8	8	
Patients persistance AgHBs (1)	PreS	/	/	/	3	/	3	3	12
	S	1	/	2	6	/	9	9	

Ces patients présentent tous deux un grand nombre de mutations notamment au niveau des épitopes T et B spécifiques. On n'observe cependant pas de différences notables entre les deux patients. Il est bien sûr difficile de ne comparer que deux patients. Il faudrait disposer d'une cohorte plus importante de patients de génotypes A. On peut signaler la présence, chez le patient contrôle, de la mutation Y100C souvent impliquée dans l'échappement au système immunitaire et aux tests de détection de l'Ag HBs.

De plus le patient clairance sous traitement (JR092005) présente une histoire particulière vis-à-vis de l'infection par le virus de l'hépatite B par rapport aux autres patients clairance de l'étude. Il s'agit en effet d'un épisode de réactivation virale sous chimiothérapie pour un lymphome. Le virus issu du pool d'ADNccc de ce patient précédemment infecté est en fait la combinaison de plusieurs quasi-espèces (probablement une souche sauvage et un ou plusieurs mutants) comme en témoignent le nombre important de bases dégénérées retrouvées lors de l'analyse des séquences des gènes S, pré-S1 et pré-S2. Ce qui se traduit par la présence de plusieurs acides aminés pour une même position (*2.1 Mutations recensées*) rendant l'interprétation des résultats difficile.

1.2 Patients de génotype D

Le génotype D est le principal génotype en France. Il représente environ 42 % des souches de VHB.

Nous disposons d'un patient clairance sous traitement associé à deux contrôles appariés (**BF012002/BA122008/TJ032009**) ainsi que trois patients contrôles sous traitement non appariés (**GV112006, VB092011, KT082003**) pour lesquels nous avons réalisé le séquençage du gène S mais pas du gène preS.

Patients traités (génotype D)	Bibliographie	Mutation décrite		Position dans un épitope LT/LB		Non décrite	Total	Nombre de mutations moyen/patient
	Antigénicité <i>in silico</i>	Diminuée	Stable ou augmentée	Diminuée	Stable ou augmentée			
Patients clairance AgHBs (1)	PreS	/	/	/	1	1	2	2
	S	/	/	/	/	/	0	0
Patients persistance AgHBs (2)	PreS	/	/	/	4	1	5	2.5
	S	/	/	/	/	/	0	0

Nous n'observons là encore pas de différence notable entre ces trois patients appariés. Leurs protéines d'enveloppe sont très proches de celles d'une souche de virus sauvage avec très peu de mutations. Il n'y a d'ailleurs aucune mutation de la protéine S.

Il ne faut pas perdre de vue que la clairance virale et la clairance de l'Ag HBs sont liées à la relation étroite entre les facteurs viraux et les facteurs d'hôtes.

Pour expliquer la différence de réponse chez des patients appariés par l'âge et le sexe vis-à-vis de souches virales quasi identiques et en l'absence de résistances aux analogues nucléos(t)idiques on peut alors évoquer l'impact de certains facteurs d'hôtes comme l'état du système immunitaire et l'efficacité de sa réponse. La réponse humorale peut par exemple être restreinte ou au contraire largement polyclonale. On peut également évoquer les différences génétiques interindividuelles comme le polymorphisme du système HLA qui peut se traduire par des différences d'aptitude à répondre efficacement à une stimulation antigénique donnée et donc des différences de susceptibilité à une même maladie. La présentation d'un même épitope aux lymphocytes T par une molécule du CMH de classe I ou II varie d'un individu à l'autre (*Immunologie fondamentale et immunopathologie ASSIM 2013*).

Nous avons également intégré dans notre étude les trois patients contrôles sous traitement non appariés. Les résultats sont dans le tableau ci-dessous en tenant compte du fait que le gène préS n'a pas été analysé pour ces patients.

Patients traités dont contrôles non appariés (génotype D)	Bibliographie	Mutation décrite		Position dans un épitope LT/LB		Non décrite	Total	Nombre de mutations moyen/patient
	Antigénicité <i>in silico</i>	Diminuée	Stable ou augmentée	Diminuée	Stable ou augmentée	Diminuée		
Patients clairance AgHBs (1)	PreS	/	/	/	1	1	2	2
	S	/	/	/	/	/	0	0
Patients persistance AgHBs (2+3)	PreS	/	/	/	4	1	5	2.5
	S	/	4	1	5	/	10	2

L'intégration de ces patients fait que les deux populations sont différentes en termes d'âge, de sexe et de nombre d'individus et ne sont donc plus comparables. On peut simplement observer un nombre accru de mutations au niveau des épitopes T du domaine S dans la population des patients contrôles dont les mutations Q30K chez deux patients et R24K chez un patient associées à un possible échappement immunitaire (Ramezani *et al*, 2013).

Comme pour le génotype A nous ne disposons que d'un patient clairance sous traitement de génotype D. Là encore il faut disposer d'une cohorte plus importante pour confirmer les observations et mettre en évidence d'éventuelles mutations particulières associées à un plus fort taux de persistance de l'antigène HBs en n'oubliant pas l'importance des facteurs d'hôte. L'équipe de recherche du laboratoire de virologie a déjà travaillé sur cinq patients clairance sous traitement de génotype D et leurs contrôles. Le patient étudié ici (et son contrôle) vient donc s'ajouter à ces travaux antérieurs que nous allons évoquer.

Travaux antérieurs

Il s'agissait d'étudier l'influence de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe sur la clairance de l'Ag HBs chez des patients de génotype D sous traitement par analogue nucléos(t)idiques.

La réponse immunitaire humorale vis-à-vis des glycoprotéines d'enveloppe étant l'objet principal de cette étude nous nous comparerons plus particulièrement au gène S et notamment à la région hydrophile majeure (MHR) où sont concentrés les principaux épitopes B spécifiques.

Il y avait donc six patients clairance sous traitement associés à leurs contrôles respectifs dont le couple de patients évoqué ici (**BF012002/BA122008**) qui s'inscrit dans le cadre de l'étude.

HBs Ag clearance	n=	Median age (years)	Gender	Treatments	HBc Ag clearance	Mean viral load
Resolvers	6	56 (39-76)	4 ♂ ; 2 ♀	Monotherapy n=5/6	n=5	6.85 log UI/mL
Non resolvers	6	58 (38-76)	4 ♂ ; 2 ♀	Monotherapy n=3/6	n=5	5.51 log UI/mL

Tableau 11. Caractéristiques des patients (Jeulin et al, 2014)

Patient	Mutations in S protein (MHR)	Patient	Mutation in S protein (MHR)
Resolver-1	none	Non resolver-1	None
Resolver-2	T118A, P127T, Y134F	Non resolver-2	T125M, P127T, E164D
Resolver-3	None	Non resolver-3	T125M, P127T, G159V
Resolver-4	T118A, P127T, P142R	Non resolver-4	T125M, P127T
Resolver-5	none	Non resolver-5	T118A, P127T, M133I, Y134H, S136Y
Resolver-6	none	Non resolver-6	T125M, P127T, G159A

Tableau 12. Mutations détectées au niveau du domaine MHR de la protéine S (BF012002/BA122008 en rouge). (Jeulin et al, 2014)

Dans cette cohorte on observe plus de mutations de la région hydrophile majeure chez les patients contrôles (avec persistance de l'Ag HBs) que chez les patients présentant une clairance de l'Ag HBs. La majorité des patients clairance (4/6) ne présentent d'ailleurs aucune mutation de cette région (*tableau 12*).

Plus particulièrement on retrouve fréquemment la mutation T125M chez les patients contrôles (4/6) alors que l'on ne la retrouve pas chez les patients ayant éliminé l'Ag HBs. Cette mutation, toujours associée à la mutation P127T chez ces patients, a été étudiée plus en détail. Il a été observé tout d'abord une diminution du profil d'antigénicité prédictive *in silico* (Antheprot) (*figure 47*).

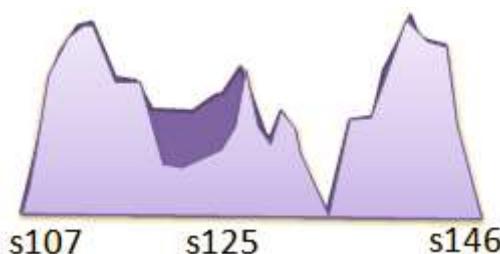


Figure 47. Profil d'antigénicité *in silico* en fonction de la séquence des acides aminés 107 à 146 de la protéine S du VHB (T125M en violet clair, T125T en violet foncé)

Cette hypothèse a aussi été étudiée sur un modèle animal (souris). La réactivité du sérum de souris vaccinées contre le VHB a été testée en présence d'un peptide sauvage et d'un peptide muté (T125M) par technique ELISA. Il a été observé une diminution de la réactivité en

présence du peptide muté (*figure 48*) ce qui confirme la diminution de l'antigénicité due à la mutation T125M.

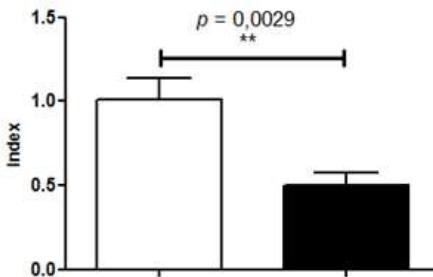


Figure 48. Comparaison de la réactivité ELISA des sérum de souris vaccinées vis-à-vis d'un peptide de génotype D sauvage (blanc) ou muté (noir)

Ces données préliminaires ont permis de conclure que l'échec de la clairance de l'Ag HBs chez des patients sous analogues nucléos(t)idiques pouvait être dû à des différences moléculaires au niveau du gène S pouvant modifier la réponse immunitaire, comme par exemple la mutation sT125M qui est associée à une diminution de l'antigénicité de la protéine S (*Jeulin et al, 2014*).

Pour revenir plus particulièrement sur les deux patients étudiés ici (**BF012002/BA122008**) qui ne présentent pas de différence structurale entre les glycoprotéines d'enveloppe (*tableau 12*) signalons qu'il s'agit des patients les plus jeunes de la cohorte des patients sous traitement (39 et 38 ans) (*tableau 11*). On peut donc supposer que l'infection virale évolue depuis moins longtemps chez ces patients ce qui peut expliquer le fait que l'on retrouve moins de mutations cumulées au niveau du génome viral.

Pour expliquer la différence de réponse entre ces deux patients au profil antigénique identique nous avons évoqué l'impact possible de facteurs d'hôte (âge, immunité) mais aussi viraux or si la technique de séquençage que nous avons utilisé (*MATERIEL ET METHODE*) permet l'étude de la population virale majoritaire elle ne permet en aucun cas l'étude de l'ensemble des « quasi-espèces » comprenant les variants minoritaires (*1.5.2 Variabilité phénotypique*). On peut donc se demander aussi s'il n'existerait pas des différences entre les variants minoritaires de ces patients. La réponse à cette question peut être apportée par la technique UDS (*Ultra Deep Sequencing*) basée sur les technologies NGS (*Next-Generation Sequencing*). Cette technique de séquençage haut débit permet plus de 10000 lectures par paire de bases au sein de l'échantillon fournissant ainsi des informations sur la structure de la population virale

et sur les mutations à très basse fréquence. Elle a été testée sur deux patients clairance et deux patients persistance dont le couple **BF012002/BA122008** (*figure 49*).

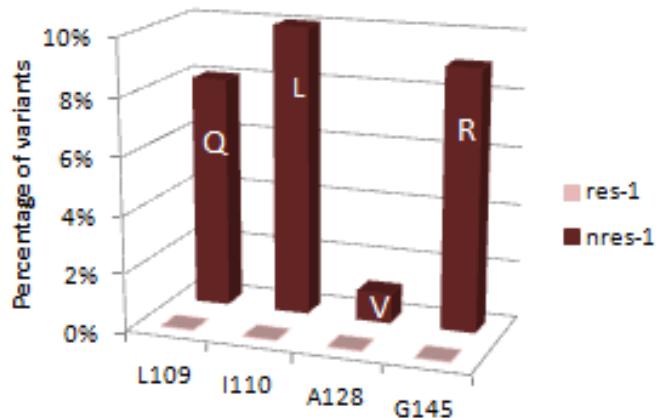


Figure 49. Variants (minoritaires) de la protéine S détectés par UDS (BF012002/BA122008)

On observe alors quatre mutations de la protéine S chez le patient contrôle (nres=non résolveur) mais aucun variant minoritaire chez le patient clairance (res=résolveur) (*Jeulin et al, 2014*). Parmi celles-ci les mutations connues L109Q (*Ramezani et al, 2013*), I110L (*Ijaz et al., 2012*), A128V (*Kay et al, 2007*) et surtout G145R (*Kay et al, 2007*) pouvant être responsables d'échappement immunitaire. Ainsi ces variants minoritaires de la protéine S dans l'échantillon analysé ont pu contribuer à l'échappement du virus au contrôle immunitaire.

II. Patients non traités

Les patients non traités ou « clairance spontanée de l'Ag HBs » étudiés ici sont les premiers patients d'une nouvelle cohorte. Ce sont pour la plupart des porteurs inactifs du virus de l'hépatite B.

2.1 Patients de génotype A

Nous avons là encore 1 seul patient clairance associé à son contrôle (**TD042002/ GS022014**).

Patients non traités (génotype A)	Bibliographie	Mutation décrite		Position dans un épitope LT/LB		Non décrite	Total	Nombre de mutations moyen/patient
	Antigénicité <i>in silico</i>	Diminuée	Stable ou augmentée	Diminuée	Stable ou augmentée			
Patients clairance AgHBs (1)	PreS	/	/	/	/	/	0	0
	S	1	1	1	3	/	6	6
Patients persistance AgHBs (1)	PreS	/	/	/	/	/	0	0
	S	1	/	/	/	/	1	1

Le fait de ne disposer que d'un patient génotype A ne nous permet pas de procéder à une analyse significative des résultats. Ce patient et son contrôle pourront cependant constituer le point de départ d'une cohorte à incrémenter.

Nous n'observons aucune mutation du domaine préS chez ces deux patients et à l'inverse de notre hypothèse de travail on observe plus de mutations impactant potentiellement la réponse immunitaire chez le patient clairance dont les mutations G44E (retrouvée aussi chez le patient contrôle) et L109Q (Ramezani *et al*, 2013) de la région MHR du domaine S.

2.2 Patients de génotype D

Nous disposons de trois patients « clairance spontanée de l'Ag HBs » dont deux appariés à des contrôles (**BM052006/BI042011** et **MM022011/ SA122011**) et un pour lequel nous n'avons pas trouvé de contrôle apparié selon l'âge (**CA021995**).

Les résultats pour les patients appariés de notre cohorte sont dans le tableau ci-dessous.

Patients non traités (génotype D)	Bibliographie		Mutation décrite		Position dans un épitope LT/LB		Non décrite	Total	Nombre de mutations moyen/patient
	Antigénicité <i>in silico</i>	Diminuée	Stable ou augmentée	Diminuée	Stable ou augmentée	Diminuée			
Patients clairance AgHBs (3)	PreS	/	/	/	7	/	7	2.3	4
	S	1	/	1	3	/	5	1.7	
Patients persistance AgHBs (2)	PreS	/	/	/	11	/	11	5.5	14
	S	1	5	2	8	1	17	8.5	

On observe chez les patients non traités de génotype D plus de mutations d'intérêts chez les patients qui ne réalisent pas la clairance de l'Ag HBs. On y retrouve notamment plus de mutations au niveau des épitopes T et B aussi bien dans le domaine S que dans le domaine préS. Il y également plus de mutations décrites dans la littérature comme responsables d'un échappement immunitaire. On retrouve ainsi parmi les deux patients contrôles les mutations sQ30K (deux fois), sG44E, sT45K, sQ101H et aussi sL216* à l'origine d'une protéine S tronquée au niveau de l'épitope P4 des lymphocytes T. On observe aussi chez ces patients les mutations sT46I, sS64F et sE164G associées à une diminution plus ou moins importante de l'antigénicité prédictive *in silico*.

Inversement on retrouve moins de mutations chez les patients réalisant la clairance de l'Ag HBs. Cependant on constate la présence de la mutation sT125M associée à la mutation sP127T chez l'un de ces patients (**CA021995**) (le plus âgé de l'étude) qui ne présente par

ailleurs aucune autre mutation de la protéine S. Or cette mutation semble favoriser la persistance de l'Ag HBs plutôt que sa clairance d'après les résultats décrits précédemment pour la cohorte des patients sous traitement. Cela démontre qu'une mutation ponctuelle de la protéine S ne peut pas toujours expliquer à elle seule la persistance de l'Ag HBs. On pourrait plutôt penser à une association de mutations défavorables au sein d'un ou plusieurs épitopes des domaines S et préS associées à des facteurs d'hôte (réponse immunitaire propre à chaque individu).

Parmi les patients non traités de génotype D nous disposons également d'un patient contrôle non apparié (**GJ122011**) pour lequel nous avons réalisé le séquençage du gène S mais pas du gène préS. Nous n'avons pas intégré ce patient aux résultats précédent. Signalons tout de même que ce patient ne réalisant pas la clairance de l'Ag HBs présente différentes mutations au niveau des épitopes des lymphocytes Q30K, Q51R, S207N/T, I208T (Bauer *et al*, 2002 ; Fan *et al*, 2001 ; Ramezani *et al*, 2013).

III. Total des patients

Nous avons regroupé dans le tableau ci-dessous les résultats concernant uniquement les patients de génotype D c'est-à-dire les patients sous traitements (T) appariés (**BF012002/BA122008/TJ032009**) et les contrôles non appariés (**GV112006, VB092011, KT082003**) ainsi que les patients non traités (NT) appariés (**BM052006/BI042011** et **MM022011/ SA122011**) et non appariés (**CA021995, GJ122011**).

Total de tous les patients (génotype D)	Bibliographie		Mutation décrite		Position dans un épitope LT/LB		Non décrite	Total	Nombre de mutations moyen/patient
	Antigénicité <i>in silico</i>	Diminuée	Stable ou augmentée	Diminuée	Stable ou augmentée	Diminuée			
Patients clairance AgHBs (4) 1T/3NT	PreS	/	/	/	8	1	9	2.25	3.5
	S	1	/	1	3	/	5	1.25	
Patients persistance AgHBs (4+4) 5T/3NT	PreS	/	/	/	15	1	16	4	7.9
	S	1	11	3	15	1	31	3.9	

Ces résultats confirment ce que nous avons déjà observé précédemment au sein des 2 cohortes de patients (traités et non traités) c'est-à-dire le nombre plus important de mutations associées

à un échappement immunitaire (12 vs 1) et/ou au niveau des épitopes des LT/LB (15 vs 8 sur préS et 18 vs 4 sur S) chez les patients ne réalisant pas la clairance de l'Ag HBs.

Nous pouvons également pour finir aborder le cas d'un patient contrôle non traité de génotype C (**VL032012**) pour lequel l'analyse du gène S a mis en évidence la mutation non sens W182*. Cette mutation peut être associée à un échappement immunitaire et est fréquemment impliquée dans la persistance et la progression de la maladie (cirrhose et carcinome hépatocellulaire) surtout chez les patients de ce génotype.

CONCLUSION

L'hépatite B chronique est caractérisée par l'échappement du virus à la réponse immunitaire de l'hôte lorsque celle-ci est incomplète et inefficace (très fréquent lorsque la contamination survient au cours de la petite enfance). La maladie peut alors s'installer et se définit par la persistance de l'Ag HBs (antigène majeur porté par les glycoprotéines d'enveloppe) au-delà de 6 mois. L'Ag HBs étant le reflet de la persistance et de l'activité de l'ADNccc intrahépatique. Nous avons aussi vu que le portage chronique du virus pouvait être à l'origine de l'apparition de mutations et de l'émergence de ces mutants au cours du temps au sein des quasi-espèces virales.

La résolution de l'infection est alors caractérisée par la clairance de cet antigène HBs, aussi bien pour les patients sous analogues nucléos(t)idiques que pour les patients porteurs inactifs non traités. Dans les deux cas il s'agit d'un événement rare pouvant survenir chez certains patients à condition que le taux d'ADN viral soit maintenu à des niveaux très faibles (après la phase d'immunoélimination efficace chez les porteurs inactifs ou par les analogues nucléos(t)idiques). Cet événement est lié à l'interaction entre des facteurs d'hôte et des facteurs propres au virus. L'objectif de notre étude était la mise en évidence de certains de ces facteurs viraux au niveau des glycoprotéines d'enveloppe. En effet ces glycoprotéines jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire humorale mais aussi cellulaire puisqu'elles exposent en surface du virion de nombreux épitopes. Elles sont également indispensables au pouvoir infectieux du virion (notamment l'entrée dans la cellule). Nous avons ainsi étudié l'impact de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du virus sur la clairance de l'antigène HBs.

Au cours de cette étude mais aussi des travaux antérieurs nous avons pu effectivement observer un nombre plus important de mutations au sein des épitopes T et B spécifiques parmi les patients non répondeurs comparé aux patients réalisant la clairance de l'Ag HBs notamment pour les patients de génotype D (le plus fréquent en France). Ceci pourrait participer à un phénomène d'échappement immunitaire.

En particulier il a été observé chez les patients de génotype D traités par analogues nucléos(ti)diques et ne présentant pas de clairance de l'Ag HBs un nombre plus important de mutations au sein de la région hydrophile majeure (MHR) de la protéine S qui regroupe les principaux épitopes conformationnels des anticorps neutralisants. La mutation sT125M

semble notamment associée à un plus fort taux de persistance de l'Ag HBs. Elle induit par ailleurs une diminution de l'antigénicité prédictive *in silico* ainsi qu'une diminution de la réactivité ELISA vis-à-vis d'anticorps de souris vaccinées.

Dans la cohorte des patients non traités (génotype D) on observe également chez les patients « persistance de l'AgHBs » un nombre plus important de mutations pouvant être associées à un échappement immunitaire. Ces mutations sont surtout localisées au niveau des épitopes T et B aussi bien sur le domaine S que sur le domaine préS. On peut citer les mutations sF20S, sQ30K, sS207T mais aussi des mutations non sens comme sL216*. La mutation non sens sW182* a par ailleurs été observée chez un patient de génotype C.

La clairance de l'Ag HBs est donc un événement pouvant survenir lorsque le taux d'ADN viral est maintenu à des niveaux très faibles. Cependant un grand nombre de patients ne réalisent pas cette clairance malgré cela et il semblerait que l'on puisse l'expliquer en partie par des facteurs propres à la souche virale qu'ils hébergent et plus particulièrement des mutations au niveau des glycoprotéines d'enveloppes pouvant interférer avec la réponse immunitaire.

Pour confirmer ces observations il faudra bien sûr augmenter le nombre de patients dans chacune des cohortes avec des patients de génotype D mais aussi des patients de génotype A trop peu nombreux actuellement pour pouvoir être analysés spécifiquement. Les patients clairance de l'Ag HBs étant des patients rares il peut être aussi intéressant d'augmenter le nombre de patients contrôles chez qui les mutations ont été majoritairement observées.

Il ne faut pas oublier non plus que la clairance de l'Ag HBs est un phénomène multifactoriel qui dépend de facteurs viraux mais aussi de facteurs propres à l'hôte (système immunitaire, âge) et de l'interaction entre tous ces facteurs. Ainsi nous avons pu observer dans notre étude des patients ne réalisant pas la clairance de l'Ag HBs malgré l'absence de mutations au niveau des protéines d'enveloppe ou inversement des patients présentant une ou plusieurs mutations défavorables (comme la sT125M) et réalisant malgré tout la clairance de l'Ag HBs. Une même mutation ponctuelle peut parfois s'avérer défavorable chez une personne dont la réponse immunitaire est restreinte et n'avoir que peu d'effets chez une personne dont la réponse immunitaire est forte et dirigée contre de nombreux épitopes. L'augmentation du

nombre de patients permettrait ainsi de limiter l'impact de la variabilité interindividuelle de la réponse immunitaire.

Une perspective intéressante serait également l'analyse pour chaque groupe de patients de l'ensemble des « quasi espèces » virales y compris des variants minoritaires par UDS. Nous avons vu que l'on pouvait retrouver des mutations d'échappement immunitaire parmi ces variants leurs offrant ainsi la possibilité d'émerger sous pression immunitaire et de favoriser la persistance de l'Ag HBs.

Enfin il peut également être contributif d'étudier d'autres groupes de patients clairance comme les patients ayant eu une hépatite B aiguë résolue (clairance de l'Ag HBs en moins de 6 mois) ou encore les patients ayant une co-infection VHB/VIH traités par analogues nucléos(t)idiques.

BIBLIOGRAPHIE

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

ASSIM (Collège des enseignants d'immunologie). Immunologie fondamentale et immunopathologie. Enseignements thématique et intégré-Tissu lymphoïde et sanguin/Immunopathologie et immuno-intervention. *Elsevier Masson*, 2013, 260 p. (Collection « les cours de L2-L3 Médecine »).

Bacig 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 Feb, 86(2): 209-216.

Barrera A, Guerra B, Notvall L, Lanford RE. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol*, 2005, 79 (15): 9786- 9798.

Bauer T, Weinberger K, Jilg W. Variants of two major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals. *Hepatology*, 2002 Feb, 35(2): 455-465.

Bayer ME, Blumberg BS, Werner B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature*, 1968, 218: 1057-1059.

Beutels P. Economic evaluations of hepatitis B immunization: a global review of recent studies (1994–2000). *Health Econ*, 2001, 10:751–774.

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA*, 1965, 191: 541-546.

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

Buster EH, Janssen HL, Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection—immune modulation or viral suppression? *Neth J Med*, 2006, 64: 175–185.

Carman WF, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L, Decker R. Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet*, 1995, 345 (8962): 1406-1407.

Chan HL, Wong ML, Hui AY, Hung LC, Chan FK, Sung JJ, et al. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients. *J Clin Microbiol.*, 2003, 41:1277-1279.

Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology*, 2006 Apr, 130(4): 1153-1168.

Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol*, 2010, 58: 258–266.

Cooksley WG, Piratvisuth T, Lee SD, Mahachai V, Chao YC, Tanwandee T, Chutaputti A, Chang WY, Zahm FE, Pluck N. Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*, 2003 Jul, 10(4): 298-305.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1, 1970, 1: 695-698.

Dawson AJ. An ethical argument in favour of routine hepatitis B vaccination in very low-incidence countries. *Lancet Inf Dis.*, 2005, 5: 120-125.

Deléage G, Combet C, Blanchet C, Geourjon C. ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput Biol Med*, 2001 Jul, 31 (4): 259-267.

Doerr HW, Gerlich WH. Medizinische Virologie. Stuttgart, Allemagne: Thieme, 2002, 440 p.

Ducancelle A, Pivert, Lunel-Fabiani. Les mutants précore et du promoteur basal du core du virus de l'hépatite B. *Virologie*, 2011, 15(2) : 100-114.

EASL (European Association for the Study of the Liver). Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 2012, vol. 57 j: 167-185.

Fan YF, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT, Lei HY, Shiao AL, Su IJ. Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. *Hepatology*, 2001 Jan, 33(1): 277-286.

Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J. Hepatol.*, 2008, 48: 335-352.

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: 646-650.

Glebe D. Attachment sites and neutralising epitopes of hepatitis B virus. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2006 Mar, 52(1): 3-21.

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

Gripion P, Cannie I, Urban S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol*, 2005, 79 (3): 1613-1622.

Hannoun C, Krosgaard K, Horal P, Lindh M. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J Infect Dis.*, 2002, 186:752-759.

Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Clearance of hepatitis B surface

- antigen during long-term nucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study. *J Gastroenterol*, 2013, 48: 930–941.
- 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 Jul, 54(1): 101-108.
- Huang SF**, Chen YT, Lee WC, Chang IC, Chiu YT, Chang Y, Tu HC, Yuh CH, Matsuura I, Shih LY, Lai MW, Wu HD, Chen MF, Yeh CT. Identification of transforming hepatitis B virus S gene nonsense mutations derived from freely replicative viruses in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2014 Feb, 9(2): e89753.
- Huy TT**, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Shrestha PK, Zhong ZH, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K. High Prevalence of Hepatitis B Virus Pre-S Mutant in Countries Where It Is Endemic and Its Relationship with Genotype and Chronicity. *J Clin Microbiol.*, 2003 Dec, 41(12): 5449-5455.
- 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 Nov, 93(Pt 11): 2473-2479.
- INPES**. Guide des vaccinations. Edition 2012. [En ligne]. Disponible sur : http://www.inpes.sante.fr/10000/themes/vaccination/guide-vaccination_2012/pdf/GuideVaccinations2012_Vaccination_contre_hepatite_B.pdf (Page consultée le 02/09/2014)
- Jeulin H**, Velay A, Malve B, Eschliman M, Bensenane M, Zoulim F, Fripiat JP, Bronowicki JP, Schvoerer E. The mutation T125M in HBV surface antigen can modulate the antigen clearance under treatment by anti-HBV nucleos(t)ide analogues. *3rd World Congress on Controversies in the Management of Viral Hepatitis (C-Hep)*. Berlin, Germany: 1-3 mai 2014. *C-Hep Young Investigators Poster 3rd Prize*.
- Jeulin H**, Velay A, Murray J, Schvoerer E. Clinical impact of hepatitis B and C virus envelope glycoproteins. *World J Gastroenterol*, 2013 Feb, 19(5): 654-664.
- Kay A**, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Research*, 2007, 127: 164–176.
- Kim JH**, Park JH, Lee YJ, Cho EW, Bae YS, Kim KL. In vitro binding analysis of hepatitis B virus preS-derived putative helper T-cell epitopes to MHC class II molecules using stable HLA-DRB1*0405/DRA*0101 transfected cells. *IUBMB Life*, 2000 Dec, 50(6): 379-384.
- Korber B**, Myers G. Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1992 Sep, 8(9): 1549-1560.
- Kramvis A**, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*, 2005, 23(19): 2409–2423.
- Kurbanov F**, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res*, 2010 Jan, 40(1): 14-30.

Laperche S, Servant-Delmas A, Gallian P, Pillonel J. La surveillance de la diversité des virus VIH, VHB et VHC chez les donneurs de sang français entre 2000 et 2010. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire [Bull Epidemiol Hebd]*, 2012, 39-40:447-452.

Le Duff Y, Blanchet M, Sureau C. The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *J Virol.*, 2009 Dec, 83(23): 12443-51.

Li X, Liu Y, Xu Z, Wan Z, Bai S, Mao P, Mao Y, Xin S, Xu D. A complete genomic analysis of hepatitis B virus isolated from 516 Chinese patients with different clinical manifestations. *J Med Virol*, 2013 Oct, 85(10): 1698-1704.

Locarnini SA, Yuen L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antivir Ther*, 2010, 15(3 Pt B):451-461.

MacCallum, Findley. Homologous Serum Hepatitis. *Lancet* 8, 1947.

Margeridon S, Lachaux A, Trepo C, Zoulim F, Kay A. "A quasi-monoclonal anti-HBs response can lead to immune escape of 'wild-type' hepatitis B virus." *J Gen Virol*, 2005, 86 (Pt 6): 1687-1693.

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

Meffre C. Prévalence des hépatites B et C en France en 2004. *Saint Maurice : Institut de veille sanitaire (INVS)*, 2006. 176 p.

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

Min WP, Kamikawaiji N, Mineta M, Tana T, Kashiwagi S, Sasazuki T. Identification of an epitope for T-cells correlated with antibody response to hepatitis B surface antigen in vaccinated humans. *Hum Immunol*, 1996 Apr, 46(2): 93-99.

Mu SC, Lin YM, Jow GM, Chen BF. Occult hepatitis B virus infection in hepatitis B vaccinated children in Taiwan. *J Hepatol*, 2009 Feb, 50(2): 264-272.

Norder H, Courouce AM, Coursaget P et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 2004, 47: 289-309.

Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, Yousukh A, Samountry B, Thammavong T, Toriyama K, Muller CP. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(11): 1777-1780.

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

Oon CJ, Chen WN, Koh S, Lim GK. Identification of hepatitis B surface antigen variants with alterations outside the “a” determinant in immunized Singapore infants. *J. Infect. Dis.*, 1999, 179 (1) : 259-263.

Pan X, Ding H, Zhou X, Tien P. Identification of hepatitis B virus-specific CTL epitopes presented by HLA-A*33:03 in peripheral blood mononuclear cells from patients and transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014 Jun, 449(1): 135-140.

Parker JMR, Guo D, Hodges RS. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry*, 1986, 25: 5425-5432.

Patient R, Houroux C, Sizaret PY, Trassard S, Sureau C, Roingeard P. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol*, 2007 Apr, 81(8):3842-3851.

Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *Journal of Clinical Virology*, 2005, 34 Suppl. 1: 125-129.

Péquignot F, Hillon P, Antona D et al. Estimation nationale de la mortalité associée et imputable à l'hépatite C et à l'hépatite B en France métropolitaine en 2001. *J.Hepatol*, 2008, 48 : 200-207.

Pourkarim MR, Sharifi Z, Soleimani A, Amini-Bavil-Olyaei S, Elsadek Fakhr A, Sijmons S, Vercauteren J, Karimi G, Lemey P, Maes P, Alavian SM, Van Ranst M. Evolutionary analysis of HBV "S" antigen genetic diversity in Iranian blood donors: a nationwide study. *J Med Virol*, 2014 Jan, 86(1): 144-155.

Ramezani F, Norouzi M, Sarizade GR, Poortahmasebi V, Kalantar E, Magnus L, Norder H, Domingo E, Jazayeri SM. Mutation Hot Spots in Hepatitis B Surface Antigen in Chronic Carriers from Khoozestan Province, Southern of Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2013, 12(3): 269-275.

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 Dec, 123(6): 1848-1856.

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 Jan, 51(1): 163-168.

Stoeckl L, Funk A et al. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 2006, 103 (17): 6730-6734.

Sung JJ, Tsui SK, Tse CH, Ng EY, Leung KS, Lee KH, Mok TS, Bartholomeusz A, Au TC, Tsoi KK, Locarnini S, Chan HL. Genotype-specific genomic markers associated with primary hepatomas, based on complete genomic sequencing of hepatitis B virus. *J Virol*, 2008 Apr, 82(7): 3604-3611.

Sureau C., Salisse J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2013, 57(3): 985-994.

Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C. Hypermodification and Immune Escape of an Internally Deleted Middle-Envelope (M) Protein of Frequent and Predominant Hepatitis B Virus Variants. *Virology*, 2002, 292: 44-58.

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*, 2009, 83(20): 10538-10547.

Taylor JM. Virus entry mediated by hepatitis B virus envelope proteins. *World J Gastroenterol*, 2013 Oct, 19(40): 6730-6734.

Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgton K, Zhuang H, Locarnini SA, Fyfe J, Sozzi T, Jackson DC. 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 Feb 15, 293(2): 305-313.

Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*, 2008, 82(11): 5657-5663.

Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology*, 2010, vol. 52 j: 282-284.

Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, Kumarasamy T, Thyagarajan SP. Transmission of "a" determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. *Jpn J Infect Dis*, 2008 Jan, 61(1): 73-76.

Wagner A, Denis F, Ranger-Rogez S, Loustaud-Ratti V, Alain S. Hepatitis B virus genotypes. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2004, 19: 330-342

Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol*, 2010, 58: 267-272.

WGO (World Gastroenterology Organisation), Practice guideline Hepatitis B, 2008.

Wu C, Deng W, Deng L, Cao L, Qin B, Li S, Wang Y, Pei R, Yang D, Lu M, Chen X. 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 Apr, 86(8): 4658-4669.

Wu C, Zhang X, Tian Y, Song J, Yang D, Roggendorf M, Lu M, Chen X. 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. *J Gen Virol*, 2010 Feb, 91(Pt 2): 483-492.

- 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.
- Yan H**, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 2012, e00049–e00049.
- Yu DM**, Li XH, Mom V, Lu ZH, Liao XW, Han Y, Pichoud C, Gong QM, Zhang DH, Zhang Y, Deny P, Zoulim F, Zhang XX. N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape. *J Hepatol.*, 2014 Mar, 60(3): 515-522.
- Yu H**, Yuan Q, Ge SX, Wang HY, Zhang YL, Chen QR, Zhang J, Chen PJ, Xia NS. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One*, 2010, 5(2): e9297.
- Zhang M**, Ge G, Yang Y, Cai X, Fu Q, Cai J, Huang Z. Decreased antigenicity profiles of immune-escaped and drug-resistant hepatitis B surface antigen (HBsAg) double mutants. *Virol J*, 2013 Sep, 10: 292.
- 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 Aug 1, 204(3) : 415-418.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Protocole de purification pré-séquençage.

Ajouter dans un tube Eppendorf de 1.5 mL : 25 µL produit de PCR+ 125 µL de tampon PB

Agiter au vortex + centrifugation brève

Déposer ce mélange sur une colonne QIAGEN

Centrifuger à 17900 g pendant 1 minute

Placer la colonne sur un nouveau tube vide et ajouter 750 µL de tampon PE

Centrifuger à 17900 g pendant 1 minute

Placer la colonne sur un nouveau tube vide

Centrifuger à 17900 g pendant 1 minute

Eluer l'ADN en ajouter sur la colonne 25 µL de tampon EB

Centrifuger à 17900 g pendant 1 minute

Conserver l'ADN purifié à – 20 °C pour la PCR de séquençage

ANNEXE 2 : Protocole de purification post-séquençage.

Vortexer la colonne, la dévisser d'un quart de tour et en casser la partie inférieure

Mettre la colonne dans un tube collecteur

Centrifuger 3 minutes à 750 g

Transférer la colonne sur un tube Eppendorf

Déposer la totalité du produit de PCR de séquençage au centre de la colonne et la refermer

Centrifuger 3 minutes à 750 g

Jeter la colonne et conserver l'Eppendorf

ANNEXE 3 : Séquences de référence utilisées

Génotype A	S	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNHSPTSC PPICPGYRWMCRLRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTSTGPKTCTTPAQQNS MFPSCCCTKPTDGNCTCIPSSWAFAKYLWEWASVRFWSLLVVFVQWFVGLSPTVWLSAI WMMWYWGPSPSYLSIVSPFPIFLPIFFCLWVYI
	preS	MGGWSSKPRKGMTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAAANQVGVG AFGPGLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDHPQAMQWNSTA FHQALQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVPAPNIASHISSARTGDPVTN
	RT	EDWGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGITRVSWPKFAV PNLQLSLTNLSSNLSWLSLDVSAAFYHPLHPAAMPHLLIGSSGLSRYVARLSSNSRINNNQYG TMQNLHDSCSRQLYVSLMLLYKTGYWKLHLYSHPIVLGFRKIPMGVGLSPFLAQFTSAICSV VRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHRESLYTAVTNFLSLGIHLPNPKTKRWGYSLNFMGY IIGSWGTLQPQDHIVQKIKHCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQ AKQAFTSPTYKAFLSKQYMNLYPVARQ
Génotype D	S	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTSC PPICPGYRWMCRLRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPKRTCTTPAQQTS MYPSCCCTKPSDGNCIPSSWAFGKFLWEWASARFWSLLVVFVQWFVGLSPTVWLSVI WMMWYWGPSPSYLSILSPFLPLPIFFCLWVYI
	preS	MQQNLSSTSPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPKDTWPDANKVGAGAGFLGFTPPHG GLLGWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPR VRGLYFPAGGSSSGTVPNPVPTTVSPSIISRSIGDPALN
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGNYRVSWPKFA VPNLQLSLTNLSSNLSWLSLDVSAAFYHPLHPAAMPHLLVGSSGLSRYVARLSSNSRIFNHQH GTMQNLHDSCSRNLYVSLMLLYQTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLAQFTSAICSV VRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESFTAFTVNFLSLGIHLPNPKTKRWGYSLHFMGY VIGCYGSLPQDHITQKIKECFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQ SKQAFTSPTYKAFLCKQYLNLYPVARQ
Génotype C	S	MENTTSFGLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTSNHSPTSC PPICPGYRWMCRLRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLPGTSTTSTGPKTCTIPAAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCIPSSWAFARFLWEWASVRFWSLLVVFVQWFVGLSPTVWLSVI WMMWYWGPSPSYNILSPFLPLPIFFCLWVYI
	preS	/
	RT	/

N. B. : Les séquences de référence utilisées pour les gènes S et preS sont des consensus de séquences recueillies dans la base HBVdb (<https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/>): 1856 séquences pour le génotype A et 3042 séquences pour le génotype D.

Les séquences du gène de la RT sont des séquences utilisées par le logiciel GREG+ : AF297624.1 pour le génotype A et AF121241.1 pour le génotype D.

ANNEXE 4 : Séquences en acides aminés des patients de l'étude (NR= non réalisé)

JR092005 (A)	S	MENITSGFLGPLLVLIQAVYFLLTRILTIPQSLLDWWTSLSFPGGTPVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFLILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPKSTTSVGPCKTCT TPAQGNSMFPSCCCCTKPTDSNCTCIPIPSSWASAKYLWEWALARFSWLNLVPFVQWFAG LSPTVWLSAIWMMLYWGPGLSNIVRPFIPILLPIFFCLWVYI
	preS	MGGWSSKPRKGGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAANQV GVGAFCGPLTPPHGGILGWSPQAQGILTMTMPTSPPPASTNRQSGRQPTPISSPLRDHPQAM QWNSTAFHQALQDPKVRGLYFPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISATTGGPVTN
	RT	DDWGPCDDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFDSQFSRGNTRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSDLSLSDVSAAFYHPLHPAAMPHLLIGSSGLSRYVARLSSHSKIN NNQCGTMQNLHDSCSRQLYVSLMLLYKTYGQQLHLYSHPIIMGFRKIPMGVGLSPFLLAQ FTSAICSVVRAFPHCLAFSYMDDVVLGARSVQHREALYTAVTNFLSLGIHLNPNKTKR WGYSLNFMGYIIGSWGTLQPQDHIVQKIKHCFRKL
BM072002 (A)	S	MENITSGFLGPLLAQAGFLLTRILTIPQSLLDWWTSLSFLGGAPVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMYLRFIIFLFLILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTSTGPCKTCT TPAQGNSMFPSCCCCTKPTDGNCCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASVRFWSLSSLVPFVQWFVG LSPTVWLLAIWMMWYWGPSLYSIVRPFIPILLPIFFCLWVYI
	preS	MGGWSSKPRKGGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAANQV GVGAFCGPLTPPHGGLLGSWSPQAQGILTMTMSTIPPPASTNRQSGRQPTPISSPLRDHPQAT QWNSTAFHQALQDPRVVRGLYLPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISARTGDPVTN
	RT	EDWGPCDQHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFDSQFSRGNTRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSDLSLSDVSAAFYHPLHPAAMPHLLIGSSGLSRYVARLSSNSRIN NNQYGTQLNLDSCSRQLYVSLMLLYKTYGWLHLYSHPIVILGFRKIPMGVGLSPFLLAQ FTSAICSVVRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHREALYTAVTNFLSLGIHLNPNKTKR WGYSLNFMGYIIGSWGTLQPQDHIVQKIKHCFRKL
BF012002 (D)	S	MENITSGFLGPLLVLIQAGFLLTRILTIPQSLLDWWTSLSNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFLILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTSTGPCRTCTT PAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGL SPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPPIFFCLWVYI
	preS	MGQNLSTSNPGLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNDTWEANKVGAGAFGLGFTPP HGGLLGWSPQAQGILQTL PANPPASTNRQTRQPTPLSPLRNTHPQAMQWNSTTFHQT LQDPRVRLGFPAGGSSSGTVNPVPTVSPISSIFSRIGDPALN
	RT	EDWGSCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFDSQFSRGNYRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSDLSLSDVSAAFYHPLHPAAMPHLLIGSSGLSRYVARLSSNSRI FNHQHGTMQNLHDSCSRNLYVSLMLLYKTFGRKLHYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQ FTGAICSVVRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESFTAVENTFLSLGIHLNPNKTKR WGYSLHFMDGYVIGCYGSLPQDHIIQKIKECFRKL
BA122008 (D)	S	MENITSGFLGPLLVLIQAGFLLTRILTIPQSLLDWWTSLSNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFLILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTSTGPCRTCTT PAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGL SPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPPIFFCLWVYI
	preS	MGQNLSTSNPGLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNDTWEANKVGAGAFGPGFTPP HGGLLGWSPQAQGILQTL PANPPASTNRQSGRKPTPLSPLRNTHPQAMQWNSTTFHQT LQDPRVRLGFPAGGSSSGTVNPVPTVSHISSIFSRIGDPALN
	RT	EDWGSCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFDSQFSRGNYRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSDLSLSDVSAAFYHPLHPAAMPHLLIGSSGLSRYVARLSSNSRI FNHQHGTMQNLHDSCSRNLYVSLMLLYQTFGRKLHYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQ FTSAICSVVRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESFTAVENTFLSLGIHLNPNKTKR WGYSLHFMDGYVIGCYGSLPQDHIIQKIKECFRKL
TJ032009 (D)	S	MENITSGFLGPLLVLIQAGFLLTRILTIPQSLLDWWTSLSNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFLILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTSTGPCRTCTT PAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGL SPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPPIFFCLWVYI
	preS	MGQNLSTSNPGLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNDTWEANKVGAGAFGLGFTPP HGGLLGWSPQAQGILQTL PANPPASTNRQTRQPTPLSPLRNTHPQAMQWNSTTFHQT LQDPRVRLGFPAGGSSSGTVNPVPTVSPISSIFSRIGDPALN
	RT	EDWGSCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFDSQFSRGNYRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSDLSLSDVSAAFYHPLHPAAKPHLLVGSSGLSRYVARLSSNSRIF NYQHGTMQNLHDSCSRNLYVSLMLLYQTFGRKLHYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQF TSAICSVVRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESFTAVENTFLSLGIHLNPNKTKR WGYSLHFMDGYVIGSYGSLPQDHIIQKIKECFRKL

ANNEXE 4 suite : Séquences en acides aminés des patients de l'étude

TD042002 (A)	S	MENITSGLLGPLLVHQAGFFLLTRILTIPQLDSWWTSNLGEPPVCHGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCCTCTT PAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCCTCIPSSWAFAKYLWEWASVRFWSLSSLPFVQWFVGL SPTVWLLAIWMMWYWGQSLCSILSPFIPLLPICFCCLWAYI
	preS	MGGWSSKPRKGGMGTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAAANQV GVGAFGPGLTPPHGILGWSPQAQGILTTVSTIPPASTNRQSGRQPTPISPLRDHPQAM QWNSTAFHQALQDPRVRGGLYFPAGGSSGTVPAPNIASHISSISARTGDPVTN
	RT	ENWGPCDEHGEHHIRTPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTESRLVVDFSQFSRGITRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSDLWSLDVSAAFYHPLHPAAMPHLLIGSSGLSRYVARLSSNSRIN NNQYGTMQNLHDSCSRQLYVSLMLLYKTYGWKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLA QFTSAICSVVRRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLYTAVTNFLSLGIHLNPNTKTR WGYSLNFMGYIIGSWGTLQPQDHIVQKIKH
GS022014 (A)	S	MENITSGFLGPLLVHQAGFFLLTRILTIPQLDSWWTSNLGESPVCLGQNSQSPTSNHSP SCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCCTCTP AQGNSMFPSCCCTKPTDGNCCTCIPSSWAFAKYLWEWASVRFWSLSSLPFVQWFVGLS PTVWLSAIWMMWYWGPNLYSILSPFIPLLPICFFCLWVYI
	preS	MGGWSSKPRKGGMGTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAAANQV GVGAFGPGLTPPHGILGWSPQAQGILTTVSTIPPASTNRQSGRQPTPISPLRDHPQAM QWNSTAFHQALQDPRVRGGLYFPAGGSSGTVPAPNIASHISSISARTGDPVTN
	RT	EDWGPCDQHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGITRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSNLWSLDVSAAFYHPLHPAAMPHLLIGSSGLSRYVARLSSNSRIN NNQYGTMQNLHDSCSRQLYVSLMLLYKTYGWKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLA QFTSAICSVVRRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLYTAVTNFLSLGIHLNPNTKTR WGYSLNFMGYIIGSWGTLQPQDHIVQKIKHCFRKL
BM0520067 (D)	S	MENITSGFLGPLLVHQAGFFLLTRILTIPQLDSWWTSNLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTT PAQGTSMYMPSCCCTKPSDGNCCTCIPSSWAFGKFLWEWASARFWSLSSLPFVQWFVGL SPTVWLSVIWMMWYWGPNLYSILSPFIPLLPICFFCLWVYI
	preS	MGQNLSTSNNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPP HGGLLGWSPQAQGILQTLPTNPPPASTNRQSGRQPTPLSPLRNTHPQAMQWNSTTFHQ LQDPRVRGGLYFPAGGSSGTVPVPVTTSHISSIFSRIQDPALN
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGNYRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSNLWSLDVSAAFYHPLHPAAMPHLLVGSSGLSRYVARLSSNSR FNYQHGTMQNLHDSCSRNLYVSLMLLYQTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLA FTSAICSVVRRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLYTAVTNFLSLGIHLNPNTKTR WGYSLNFMGYVIGCYGSLPQDHIIQKIKECFRKL
BI042011 (D)	S	MENITSGFLGPLLVHQAGFSLLTRILTIPQLDSWWTSNLGEKIVCPGQNSQSPTSNHSP FCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTP AQGTSMYMPSCCCTKPSDGNCCTCIPSSWAFGKFLWEWASARFWSLSSLPFVQWFVGLS PTVWLSVIWMMWYWGPNLYSILSPCTQP*PIFFCLWVYI
	preS	MGQNLSTSNNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPP HGGLLGWSPQAQGILQTLPTNPPPASTNRQSGRQPTPLSPLRNTHPQAMQWNSTTFHQ LQDPRVRGGLYFPAGGSSGTVPVLTASPLSSILSRIQDPALN
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGKDRVS KFAVPNLQSLTNLLSSNLWSLDVSAAFYHPLHPAAMPHLLVGSSGLSRYVARLSSNSR IFNHQHGTMQNLHDSCSRNLYVSLMLLYQTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLA QFTCAICSVVRRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLYTAVTNFLSLGIHLNPNTKTR RGYSLNFMGYVIGCYGSLPQDHIIQ
CA021995 (D)	S	MENITSGFLGPLLVHQAGFFLLTRILTIPQLDSWWTSNLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCM TTAQGTSMYMPSCCCTKPSDGNCCTCIPSSWAFGKFLWEWASARFWSLSSLPFVQWFVG LSPTVWLSVIWMMWYWGPNLYSILSPFIPLLPICFFCLWVYI
	preS	MGQNLSTSNNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPP HGGLLGWSPQAQGILQTLPTNPPPASTNRQSGRQPTPLSPLRNTHPQAMQWNSTTFHQ LQDPRVRGGLYLPAGGSSGTVPVPVTTASPLSSIFSRIQDPALN
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRIPRTPSRTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGNYRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSNLWSLDVSAAFYHPLHPAAMPHLLVGSSGLSGYVARLSSNSR LNNQHGTMPDLHDYCSRNLYVSLMLLYQTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLA FTSAICSVVRRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLYTAVTNFLSLGIHLNPNTKTR WGYSLNFMGYVIGCYGSLPQEIIQKIKECF

ANNEXE 4 suite : Séquences en acides aminés des patients de l'étude

MM022011 (D)	S	MENITSGFLGPLLVLIQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFIPLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTSTGPCRTCTT PAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFAKFLWEASARFSWLSLLVPFVQWFVGL SPTVWLSVIWMMWFWGPSPSILSFLPPIFFCLWVFI
	preS	MGQNLSTSNPLGFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPP HGGLLGWSPQAQGILQTVPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQAMQWNSTTFHQQT LQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVPVPVPTVSHISSTFSRIGDPALN
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGNYRVSWPK FAVPNLQSLTNLSSNLSWLSLDVSAAFYHLPLHPAAMPHLLVGSSGLSRYVARLSSNSRI FNHQHGTMQNLHDSCSRNLVVSLLLYKTFGRKLHLYSHPIIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQ FTSAICSVVRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLYTAVTNFLSLGIHLNPNKTKR WGYSLFHMGYVIGCYGSLPQDHIIQKIKECFRK
SA122011 (D)	S	MENITSGFLGPLLVLIQAGFFLLTRILTIPKSLDSWWTSLSFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFIPLLCLIFLLVLLDYHGMPLPVCPLIPGSSTSTGPCRTCTT PAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFGKFLWGASARFSWLSLLVPFAQWFVGL SPTVWLLVIWMMWFWGPSPSILSFLPPIFFCLWVYI
	preS	MGQNLSTSNPLGFPDHQLDPAFRANTTNPWDNFNPNKDPWPDANKVGAGAFGPGFTPP HGGLLGWSPQAQGIMQTL PANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRDTHPQAMQWNSTTFHQQT LQDPRVRGLYLPAGGSSSGTVPVPVPTTASPISSIFSRIGDALN
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGNYRVSWPK FAVPNLQSLTNLSSNLSWLSLDVSAAFYHLPLHPAAMPHLLVGSSGLSRYVARLSSNSRI FNHQHGTMQNLHDSCSRNLVVSLLLYKTFGWKLHLYSHPIIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQ FTSAICSVVRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESFTAATVNFLSLGIHLNTNKTKR WGYSLFHMGYVIGCYGSLPQDHIIQKIKECFRK
GV112006 (D)	S	MENITSGLLGPLLVLIQAGFFLLTRILTIPKSLDSWWTSLSFLGGTTVCRGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFIPLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTSTGPCRTCTT PAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFGKFLWEASARFSWLSLLVPFVQWFVGL SPTVWLSVIWMMWFWGPSPSILSFLPPIFFCLWVYI
	preS	NR
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRTPRTPSRVVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGNDRVSWPK FAVPNLQSLTNLSSNLSWLSLDVSAAFYHLPLHPAAMPHLLVGSSGLSRYVARLSSNSRI FNHQHGTMPNLHDSCSRNLVVSLLLYQTFGRKLHLYSHPIIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQ FTSAICSVVRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESFTAATVNFLSLGIHLNPNKTKR WGYSLFNMGYVIGGGYGSLPQEHIILKIKECFRK
VB092011 (D)	S	MENITSGFLGPLLVLIQAGFFLLTKILTIPQSLDSWWTSLSFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFIPLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTSTGPCRTCTT PAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFGKFLWEASARFSWLSLLVPFVQWFVGL SPIAWSVIWMMWFWGPNLFTNLSPFLPPIFFCLWVYI
	preS	NR
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRIPRTPSRVVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGNYRVSWPK FAVPNLQSLTNLSSDLSWLSLDVSAAFYHLPLHPAAMPHLLVGSSGLSRYVARLSSNSRI NHQHGTLPNLHDSCSRNLVVSLLLYQTFGRKLHLYSHPIIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQFT SAICSVVRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESFTAATVNFLSLGIHLNPNKTKRWG YNLNFMGYVIGCHGTLPQEHIRVKIK
KT082003 (D)	S	MENITSGFLGPLLVLIQAGFFLLTRILTIPKSLDSWWTSLSFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFIPLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTSTGPCRTCTT PAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFGKFLWAASARFSWLSLLVPFVQWFVGH SPTVWLSVIWMMWFWGPSPSILSFLPPLLIFFCLWAYI
	preS	NR
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDFSQFSRGNNRVSWPK FAVPNLQSLTNLSSNLSWLSLDVSAAFYHLPLHPAAMPHLLVGSSGLSRYVARLSSNSRI FNHQHGTLPNLHDSCSRNLVVSLLLYKTFGRKLHLYSHPIIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQFT TSAICSVVRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESFTAATVNFLSLGIHLNPNKTKRWG GYSLHFMGYVIGCHGSLPQEHIILKIKECFRK

ANNEXE 4 suite : Séquences en acides aminés des patients de l'étude

GJ122011 (D)	S	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPKSLSWWTSLNFLGGTTVCLGRNSQSPTSNHSP TSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTT PAQGTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGL SPTVWLLVIWMMWYWGPSLNNTLSPFLPLLPIFFCLWVYI
	preS	NR
	RT	EDWGPCAEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTESRLVVDFSQFSRGNYRVSWPK FAVPNLQSLTNLLSSNLSWLSLDVSAAFYHLPLHPAAMPHLLVGSSGLSGYVARLSSNSRI FNHQHGTQLQNLHDSCSRNLYVSLLLYQTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQF TSAICSVVRRAFPHCLAFSYMDDVVGLGAKSEQHLESLFTAVENTFLSLGIHLNPNKTKRW GYSLHFMDGYVIGCYGSLPQDIIIQKIKECFRKLPV
VL032012 (C)	S	MESTASGFLGPLRVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNLQSPTSNHSL TSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFIILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTI PAQGTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFARFLWEWASVRFWSWLSLRVPFAQ*FVGLS PTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILNPFLPLLPIFFCLWVYI
	preS	NR
	RT	NR

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 27/10/2014

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par : MALVE Brice

Sujet : Etude des caractéristiques moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B par séquençage direct à partir d'une cohorte de patients suivis au CHU de Nancy.

Jury :

Président : Mme FINANCE, Professeur
Directeur : Mme JEULIN, Maître de Conférences
Juges : Mme SCHVOERER, Professeur
M. BRONOWICKI, Professeur

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

Mme C Finance.

Mme H Jeulin.



Vu et approuvé,

Nancy, le 26.09.2014

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,

Francine PAULUS

Vu,
Nancy, le 26/09/2014

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

Mme C Finance.

Mme H Jeulin.

Vu,
Nancy, le 26.09.2014

Le Président de l'Université de Lorraine,



N° d'enregistrement : 6680

N° d'identification :

TITRE

**Etude des caractéristiques moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe
du virus de l'hépatite B par séquençage direct à partir d'une
cohorte de patients suivis au CHU de Nancy.**

Thèse soutenue le 27 octobre 2014
Par Brice Malve

RESUME :

Malgré la disponibilité d'un vaccin efficace, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est un problème majeur de santé publique et reste difficile à éradiquer. La clairance de l'Ag HBs, qui est un évènement rare chez les patients infectés chroniquement, est également un objectif thérapeutique difficile à atteindre chez les patients traités par analogues nucléos(t)idiques (NUCs). Parallèlement aux facteurs liés à l'hôte, des facteurs viraux, encore peu explorés à ce jour, peuvent être impliqués. Notre objectif est d'étudier l'impact de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du VHB sur la clairance de l'Ag HBs chez des patients sous NUCs et des patients non traités.

Nous avons étudié au cours de ce travail douze patients infectés par le VHB. Six d'entre eux ont présenté une clairance de l'Ag HBs et cinq ont été appariés à un 'contrôle' (persistance de l'Ag HBs) de même âge, sexe et génotype. Nous avons distingué les 7 patients non traités (2 génotype A, 5 génotype D) des 5 patients sous NUCs (2 génotype A, 3 génotype D). Parmi ces derniers un couple de patients appariés de génotype D est venu s'ajouter à dix patients étudiés précédemment. Les séquences en acides aminés des domaines S et préS du VHB ont été obtenues par séquençage direct pour ces 12 patients. L'antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du VHB a été étudiée par prédiction bio-informatique (logiciel Antheprot).

Le séquençage direct a permis d'identifier au sein de nos 2 groupes de patients (notamment chez les patients de génotype D) un nombre plus important de mutations pouvant être potentiellement associées à un échappement immunitaire (épitopes des LT/LB avec ou sans diminution de l'antigénicité *in silico*) chez les patients 'persistance de l'Ag HBs'.

Nos données suggèrent donc que le profil moléculaire des gènes S, pré-S1 et pré-S2 du VHB diffère entre les patients présentant une clairance de l'Ag HBs, spontanée ou sous traitement par analogues nucléos(t)idiques, et ceux chez qui l'Ag HBs persiste. Les mutations retrouvées chez ces derniers peuvent notamment être à l'origine d'un phénomène d'échappement immunitaire comme cela a été démontré *in silico* et *in vivo* pour la mutation sT125M chez les patients traités.

MOTS CLES : virus de l'hépatite B, variabilité, glycoprotéines d'enveloppe, séquençage direct, clairance de l'Ag HBs, analogues nucléos(t)idiques.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<u>Dr H JEULIN</u>	<u>Laboratoire de Virologie</u> <u>CHU Brabois Nancy</u>	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème 1

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle