



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

2015

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 10 Juillet 2015

par **ALAIN DUDA**
né le 11 Mars 1987 à Soissons (02)

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

**THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

Influence de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur la clairance de l'Ag HBs chez des patients co-infectés par le VIH 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)
Mme le Professeur SCHVOERER Evelyne, PU-PH CHU Nancy
M le Professeur MAY Thierry, PU-PH CHU Nancy
M le Docteur GOEHRINGER François, PH CHU Nancy

FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2014-2015

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable de la Communication

Responsable de la Cellule de Formation Continue et individuelle

Responsable de la Commission d'agrément des maîtres de stage

Responsables des échanges internationaux

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Bertrand RIHN

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES -
PRATICIENS HOSPITALIERS**

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

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>Eau, Santé, Environnement</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		
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 DUMARCAY	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, Sécurité 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 environnementale</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' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

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

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

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

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



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

Remerciements

Aux membres du Jury,

**Mme Chantal FINANCE
Président du Jury
PU-PH, laboratoire de Virologie, CHU de Nancy**

Merci pour votre aide, votre écoute et votre grande disponibilité au cours de ces quatre années d'internat et surtout durant mon stage de virologie. Merci également pour vos conseils au cours de mon mandat de représentant des internes où nous avions partagé par ailleurs de nombreuses discussions sur l'évolution du DES de biologie médicale en Lorraine.

Ce fut un réel plaisir de travailler auprès de vous.

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.

**Mme Hélène JEULIN
Directeur de Thèse
MCU-PH, laboratoire de Virologie, CHU de Nancy**

Je te remercie grandement pour ton dynamisme et ton efficacité dans la réalisation de ce travail. Merci également pour ta disponibilité et ton aide dans toutes les étapes critiques que j'ai rencontré tout au long de cette année. Je pense notamment aux relectures des séquences, la réalisation des arbres phylogénétiques en passant par la réalisation d'un poster.

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

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, vos précieuses connaissances que vous m'avez fait partager ainsi que pour votre accueil au laboratoire de Virologie. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance profonde.

M Thierry MAY

PU-PH, Maladies infectieuses et tropicales, 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.

M François GOEHRINGER

PH, Maladies infectieuses et tropicales, CHU de Nancy

Merci pour votre collaboration dans la recherche d'informations liées aux patients de cette étude mais aussi pour votre enthousiasme vis-à-vis de mon travail et pour avoir accepté de le juger. Veuillez accepter mes remerciements et soyez assuré de toute ma sympathie.

Je saisir l'occasion qui m'est donnée de remercier tous ceux qui m'ont soutenu de leur mieux durant mon long apprentissage de la vie et qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A mes parents bien sûr, sans qui je ne serai pas qui je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir soutenu durant toutes ces études et de m'avoir appris le goût du travail et de la rigueur. Ça y est, vous n'avez plus à vous tourmenter, le « petit » dernier a enfin terminé ses études.

A mes sœurs, merci d'avoir été à l'écoute et d'avoir eu la patience dans les moments délicats de mes études. Même si on ne se comprend pas toujours et si je ne sais pas toujours vous le dire, sachez que je serai toujours là pour vous. Merci également d'avoir fait de moi un tonton heureux et comblé. Bisous aux trois petits monstres!

A ma grand-mère, qui n'a pas pu venir et qui aurait été fière de me voir devenir docteur.

A Elodie évidemment... Pour ta gentillesse, ta patience, ton soutien à tous les instants et la confiance que tu m'accordes. Mais également pour ton dynamisme à toute épreuve et tous ces moments de complicité. Je te remercie d'être la personne que tu es.

A Dominique et Paul, merci pour votre gentillesse et de m'avoir accueilli toujours les bras ouverts dans votre famille.

Aux professionnels, médecins et pharmaciens, qui m'ont accueilli dans leurs services et m'ont enseigné le savoir-faire et le savoir être du pharmacien d'abord, puis du biologiste. Je pense notamment à **Mme Demoré, Tahar, Anne, Brigitte et également Julien Broseus et Anthony**.

Aux équipes techniques, qui m'ont accueilli, intégré et fait partager leur expérience et leur bonne humeur. Particulièrement à **l'équipe de virologie** où je suis très attaché et où j'ai découvert des personnes dynamiques et toujours disponibles quand j'en avais besoin pour certaines techniques ou pour la recherche de tubes... Merci notamment à **Nathalie et Christine** pour toutes les discussions et les moments passés à la pause café. Enfin, un grand merci à **Anaïs** bien sûr, pour tout ce que tu es : le petit soleil de la PFGM. Le stage n'aurait pas eu la même saveur sans ta présence.

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 Dr Véronique VENARD, MCU-PH

Merci pour votre accueil et votre grande disponibilité.

Au Dr Aurélie VELAY,

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

A Sibel et à Christine, ingénieurs de la PFGM et PFID,
Merci pour votre gentillesse et vos conseils pour certaines étapes techniques.

A mes amis de fac : Will, Marion, Julien, Geoffrey, Laurent, Maxime, Marie et Marion G (et bien sûr à toutes vos moitiés). Pour ces belles années passées à vos côtés sur les bancs de la fac ou à la bibliothèque pour les révisions, mais également et surtout à toutes les soirées à découvrir de jour en jour les mystères de l'œnologie... je crois qu'on a encore beaucoup de travail, il va falloir continuer à s'entraîner. Nous avons tous pris des chemins différents, je suis fier de chacun d'entre vous et j'espère que notre amitié durera encore de longues années.

A toutes les personnes qui ont comptées durant mon internat :

Julien : pour tous les moments passés ensemble que ce soit en stage ou en dehors. Tu m'as fait partager tes connaissances infinies du monde cinématographique. Merci aussi d'avoir immortalisé de grands moments de folie avec ces photos et vidéos, ça nous fait beaucoup de souvenirs. Je pense que tu as de quoi réaliser ton premier court métrage. Merci également d'être là à toutes les petites soirées improvisés dont nous avons le secret. Et enfin merci pour ton efficacité dans la correction des fautes d'orthographes.

Loic : pour la sagesse et le calme dont tu fais preuve à tout instant et pour ces moments à Metz à discuter de choses rigolotes ou non. Merci pour la compréhension et la compassion que tu as eu envers moi. Merci également d'avoir accepter de devenir le trésorier de l'AIPHIN, je sais que notre collaboration se passera toujours bien... surtout point de vue organisation soirée à l'aveugle.

Arnaud Maget : pour son sourire si communicatif et pour l'organisation de vacances de ski de folies!! Merci d'avoir travaillé à mes côtés en tant que vice président de l'AIPHIN, tu représentes pour moi la joie de vivre. Carpe diem.

Nico et Anaëlle : pour le trio que l'on a formé le temps d'une soirée et pour toutes les répétitions où c'était un réel bonheur de faire de la musique avec vous. Je serai très heureux de reprendre prochainement les répétitions en vue d'un futur concert...

A tous les joueurs de foot et/ou les habitués du tatamis :

Brice, pour ta gentillesse et ta délicatesse au judo ainsi que pour ta volonté hors du commun. **Alexandre**, pour le balayage réussi une fois (bon, j'ai pas osé te dire que j'avais glissé) et pour ta classe footballistique, mais aussi pour les petites soirées œnologiques improvisés et le mms qu'on s'envoie de temps en temps. **Brieuc**, pour ton organisation des soirées foot et ton professionnalisme et enfin **Rémy** surtout pour le sport à la télévision et les verres partagés à des heures délicates de la journée.

A Marie W : Merci pour le covoiturage et pour ta patience vis-à-vis de mes retards le matin.

A tous les autres co-internes : Lucile et Lucille, FX, Alex, Delphine, Benoit, Hélène, Arnaud P...

A tous mes autres amis avec qui j'ai partagé de grands moments : Aurélien, Célia, Alex, Pierre Lainé, Mickaël, Paul...

Et pour tous ceux que je n'ai pas cité par oubli mais qui ont compté pour moi, merci!!

Table des matières

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	11
INDEX DES FIGURES	15
INDEX DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABREVIATIONS	18
INTRODUCTION	20
PARTIE 1 : GENERALITES SUR LE VIRUS DE L'HEPATITE B, LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE, ET LA CO-INFECTION.....	21
LE VIRUS DE L'HEPATITE B	22
1 <i>Historique</i>	22
2 <i>Structure du virus</i>	22
2.1 Les particules virales	22
2.2 Le génome	24
3 <i>Les glycoprotéines d'enveloppe</i>	25
3.1 Structure	25
3.2 Synthèse	27
3.3 Fonctions	28
4 <i>Le cycle cellulaire</i>	30
4.1 Pénétration dans l'hépatocyte	30
4.2 Décapsidation	31
4.3 Synthèse de l'ADNccc	31
4.4 Transcription	31
4.5 Traduction et formation de capsides	31
4.6 Réplication du génome virale	32
4.7 Libération de virions	33
5 <i>Variabilité du VHB</i>	34
5.1 Variabilité génotypique	34
5.1.1 Génotypes	34
5.1.2 Sérotypes	35
5.2 Variabilité phénotypique	35
5.2.1 Variabilité des gènes préS/S	35
5.2.2 Variabilité du gène PréC/C	36
5.2.3 Variabilité du gène X	36
5.2.4 Variabilité du gène Pol	37
6 <i>Epidémiologie et transmission</i>	37
7 <i>Histoire naturelle de la maladie</i>	40
7.1 Physiopathologie	40
7.2 Clinique	40
7.2.1 Hépatite aiguë	40
7.2.2 Hépatite fulminante	40
7.2.3 Hépatite chronique	41
7.2.3.1 La phase d'immunotolérance :	42
7.2.3.2 La phase dite "immunoactive" ou de réaction immune :	42
7.2.3.3 La phase dite de "basse réplication virale" :	42
7.2.3.4 La phase dite de "réactivation" :	42
7.3 Hépatite occulte	43
7.4 Réponses immunitaires au cours de l'infection par le VHB	43
7.4.1 Réponse innée	43
7.4.2 Réponse adaptative	43
7.5 Carcinogenèse hépatique	45
8 <i>Diagnostic</i>	46

8.1	Marqueurs sérologiques	46
8.1.1	Ag HBs.....	46
8.1.2	Ac anti-HBs.....	47
8.1.3	Ag HBc.....	47
8.1.4	Ac anti-HBc totaux et Ig M	47
8.1.5	Ag HBe.....	47
8.1.6	Ac anti-HBe.....	48
8.1.7	Ag HBcr	48
8.2	Détection et quantification de l'ADN viral	48
8.3	Marqueurs hépatiques.....	48
8.4	Profil sérologique d'une hépatite B aiguë	49
8.5	Profil sérologique d'une hépatite B chronique	50
9	Traitements et prise en charge	50
9.1	Objectifs du traitement	50
9.2	Indications du traitement	51
9.3	Les molécules utilisées contre le VHB	52
9.3.1	Les immunomodulateurs	52
9.3.1.1	Interféron alpha (IFN α)	52
9.3.1.2	Interféron pégylé (Pegasys®)	53
9.3.2	Les analogues nucléos(t)idiques	53
9.3.2.1	Lamivudine (Zeffix®)	54
9.3.2.2	Adéfovir dipivoxy (Hepsera®)	54
9.3.2.3	Entécavir (Baraclude®)	55
9.3.2.4	Telbivudine (Sebivo®)	55
9.3.2.5	Ténofovir (Viread®)	56
9.3.2.6	Emtricitabine	56
9.3.3	Nouvelles approches thérapeutiques	56
9.4	Traitements et impacts sur les objectifs thérapeutiques	58
9.5	Résistances aux analogues nucléos(t)idiques	59
9.5.1	Résistance à la Lamivudine	60
9.5.2	Résistance à l'Adéfovir	60
9.5.3	Résistance à la Telbivudine	60
9.5.4	Résistance à l'Entécavir	60
9.5.5	Résistance à l'Emtricitabine	61
9.5.6	Résistance au Ténofovir	61
10	Prévention	63
10.1	La vaccination	63
10.2	L'immunothérapie	64
LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE.....	65	
1	Historique.....	65
2	Structure et organisation génomique du VIH.....	65
2.1	Structure du VIH	65
2.2	Organisation génomique du VIH	67
3	Cycle de réplication du VIH	67
3.1	Entrée du virus dans la cellule	67
3.2	Transcriptase inverse	68
3.3	Intégration	68
3.4	Transcription et traduction	68
3.5	Assemblage et maturation	68
4	Variabilité du VIH	69
4.1	Origine du VIH	70
4.2	Classification du VIH	70
4.3	Distribution géographique du VIH	71
5	Epidémiologie	72
5.1	Modes de transmission du VIH	72
5.2	Epidémiologie mondiale	72
5.3	Epidémiologie en France	73
6	Physiopathologie	74
6.1	Les cellules cibles	74
6.2	Immunopathologie	75
6.3	Réponses immunitaires mises en place contre le VIH	76

6.3.1	Réponse humorale	76
6.3.2	Réponse cellulaire	77
6.4	Catégories cliniques du CDC	78
7	<i>Traitement</i>	78
7.1	Les molécules actives contre le VIH	78
7.2	Objectifs et indications du traitement	80
LA CO-INFECTION VIH/VHB.....		81
1	<i>Epidémiologie</i>	81
2	<i>Physiopathologie et interaction entre les deux virus</i>	82
2.1	Impacts du VIH sur l'hépatite B	82
2.2	Impacts du VHB sur la progression de l'infection par le VIH	83
3	<i>Prise en charge thérapeutique</i>	84
3.1	Objectifs et indications thérapeutiques	84
3.2	Stratégies thérapeutiques	85
PARTIE 2 : TRAVAIL PERSONNEL.....		87
OBJECTIFS DU TRAVAIL		88
MATERIEL ET METHODE		89
1	<i>Sélection des patients</i>	89
2	<i>Réalisation des sérologies et charges virales VHB</i>	90
3	<i>Extraction des acides nucléiques : automate Easymag</i>	91
3.1	Principe	91
3.2	Technique	92
4	<i>Amplification des gènes S et préS</i>	92
4.1	Généralités	92
4.2	Choix des amorces	94
4.3	Protocole	96
5	<i>Vérification de la taille des fragments amplifiés : migration sur gel d'agarose</i>	97
6	<i>Purifications et séquençage</i>	98
6.1	Première purification	98
6.2	PCR de séquençage	98
6.3	Deuxième purification	100
7	<i>Séquençage</i>	100
8	<i>Interprétation des résultats du séquençage par analyse bio informatique</i>	101
8.1	Logiciel MEGA 6.0	101
8.2	Logiciel GREG +	102
8.3	Site Internet Pubmed avec la fonction BLAST (d'après http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	102
8.4	VESPA	102
8.5	Création d'une séquence consensus pour les gènes préS/S du VHB de génotype E	103
8.6	Logiciel ANTHEPROT	103
RESULTATS ET DISCUSSION		105
1	<i>Présentation de la cohorte</i>	105
2	<i>Analyse phylogénique des souches VIH et VHB des patients inclus dans l'étude</i>	106
3	<i>Modalités de l'analyse bioinformatique des données</i>	108
4	<i>Patient de génotype D</i>	112
4.1	Présentation du cas	112
4.2	Mutations détectées	114
4.3	Profils antigéniques sur Antheprot	115
4.4	Comparaison avec des patients mono-infectés	117
4.5	Conclusion	118
5	<i>Patients de Génotype A</i>	120
5.1	Sous cohorte A/1	120
5.1.1	Présentation des cas	120
5.1.2	Mutations détectées	122
5.1.3	Profils antigéniques sur Antheprot	123
5.1.4	Discussion	123
5.2	Sous cohorte A/2	125
5.2.1	Présentation des cas	125
5.2.2	Mutations détectées	127
5.2.3	Profils antigéniques sur Antheprot	129

5.2.4	Discussion	131
5.3	Conclusion	133
6	<i>Patients de génotype E</i>	135
6.1	Patient d'intérêt et patient apparié porteur chronique	135
6.1.1	Présentation des patients.....	135
6.1.2	Mutations détectées	136
6.1.3	Profils antigéniques sur Antheprot	137
6.1.4	Discussion	138
6.2	Patients contrôles non appariés	139
6.2.1	Présentation des patients.....	139
6.2.2	Mutations détectées	140
6.2.3	Profils antigéniques sur Antheprot	141
6.2.4	Discussion	142
6.3	Conclusion	143
7	<i>Synthèse et discussion</i>	144
CONCLUSION		148
BIBLIOGRAPHIE.....		149
ANNEXES		158

Index des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure du virus de l'hépatite B	23
Figure 2 : Aspect des particules subvirales et virales en microscopie électronique à transmission	23
Figure 3 : Représentation schématique du génome du VHB	25
Figure 4 : Représentation linéaire du génome et des protéines d'enveloppe du VHB	26
Figure 5 : Représentation des protéines de surface au sein du virion complet	26
Figure 6 : Représentation schématique de la topologie des protéines L, M et S au niveau de la membrane virale	27
Figure 7 : Topologie transmembranaire des protéines d'enveloppe du VHB au niveau du réticulum endoplasmique et interactions enveloppe/nucléocapside	28
Figure 8 : Représentation des trois déterminants infectieux et des trois protéines de surface du VHB	29
Figure 9 : Structure de la boucle antigénique AGL au sein de l'Ag HBs	30
Figure 10 : Réplication du génome viral	32
Figure 11 : Le cycle de réplication virale du VHB et sites d'action des antiviraux	33
Figure 12 : Mutant pré-Core du virus de l'hépatite B	36
Figure 13 : Prévalence de l'Ag HBs dans le monde	38
Figure 14 : Répartition mondiale des différents génotypes de VHB	38
Figure 15 : Histoire naturelle du VHB	41
Figure 16 : Réponse immunitaire cellulaire contre le VHB	44
Figure 17 : Rôle des protéines de surface du VHB dans la réponse immunitaire contre l'infection	45
Figure 18 : Algorithme décisionnel du diagnostic des hépatite B	49
Figure 19 : Cinétique des marqueurs au cours d'une hépatite B aiguë	49
Figure 20 : Cinétique des marqueurs au cours d'une hépatite B chronique	50
Figure 21 : Chronologie d'apparition des traitements anti VHB	52
Figure 22 : Structure de la lamivudine	54
Figure 23 : Structure de l'Adéfovir et du Ténofovir	54
Figure 24 : Structure de l'entécavir	55
Figure 25 : Structure de la telbivudine	55
Figure 26 : Lipopeptide analogue de la région PréS1 exemple du Myrcludex B	57
Figure 27 : Mutations de résistance pour le 3TC (LAM), ADV, ETV, et LdT localisées dans le gène de la polymérase du VHB	59
Figure 28 : Fréquences d'émergence de mutations aux analogues nucléos(t)idiques en fonction de la durée de traitement	61
Figure 29 : Impact des mutations de la polymérase sous analogues nucléos(t)idiques sur le gène S	62
Figure 30 : Structure du VIH-1	66
Figure 31 : Organisation du génome du VIH-1	67
Figure 32 : Cycle de réplication du VIH	69
Figure 33 : Origines du VIH	70
Figure 34 : Distribution géographique mondiale des différents sous types de VIH	72
Figure 35 : Estimation du nombre d'adultes et d'enfants infectés par le VIH en 2013	73
Figure 36 : Prévalence de l'infection par le VIH	74
Figure 37 : Évolution du taux de LT CD4 et de la charge virale au cours de l'infection par le VIH	75
Figure 38 : Causes et conséquences de l'activation immunitaire au cours du VIH	77
Figure 39 : Cycle de réplication du VIH avec les sites d'actions des antirétroviraux	79
Figure 40 : Liste des antirétroviraux disponibles	80
Figure 41 : Effets de l'infection par le VIH sur l'hépatite B	83
Figure 42 : Effets de l'infection par le VHB sur la progression de l'infection par le VIH	84
Figure 43 : Principe des sondes Taqman	91
Figure 44 : Principe de l'extraction de l'ADN du VHB par easyMAG	92
Figure 45 : Etapes successives d'un cycle de PCR	93
Figure 46 : Amorce P7a (jaune) alignée grâce au logiciel Mega avec les génotypes A, D, E	94
Figure 47 : Schéma des PCR permettant le séquençage de la région S	94

Figure 48 : Séquençage des gènes préS et S (RT). Emplacement des amorces utilisées par rapport aux cadres de lecture préS/S et Pol.....	95
Figure 49 : Schéma des PCR permettant le séquençage de la région préS.....	95
Figure 50 : Exemple de migration sur gel	97
Figure 51 : Principe de la PCR de séquençage.....	99
Figure 52 : Représentation schématique d'un cycle de PCR de séquençage.	99
Figure 53 : Exemple de séquences nucléotidiques sur Mega du brin sens P2F et anti sens S8 et présence de base dégénérée pour un même patient (C ou T = Y).....	101
Figure 54 : Exemple d'alignement de séquences dans Mega 6	102
Figure 55 : Représentation graphique de quelques paramètres sur Antheprot.	104
Figure 56 : Arbre phylogénétique des séquences de la protéase et de la reverse transcriptase du VIH	106
Figure 57 : Arbre phylogénétique des séquences des gènes préS /S du VHB	107
Figure 58 : Représentation graphique des gènes préS et S du VHB	108
Figure 59 : Suivi biologique et thérapeutique anti VHB et VIH au cours du temps de FJC	113

Index des tableaux

Tableau 1 : Principaux avantages et inconvénients des molécules utilisées dans le traitement de l'hépatite B chronique.....	57
Tableau 2 : Profils des mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques	61
Tableau 3 : Classification de l'infection par le VIH pour les adultes et les adolescents.....	78
Tableau 4 : Listing des patients étudiés	105
Tableau 5 : Comparaison de la distribution des génotypes VHB retrouvés chez les co-infectés dans l'EPIB 2012 et notre cohorte.	108
Tableau 6 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de FJC	112
Tableau 7 : Liste des mutations retrouvées chez le patient d'intérêt FJC et des patients mono infectés par le VHB qui ont obtenu une clairance de l'Ag HbS.	117
Tableau 8 : Liste des mutations retrouvées chez les patients mono infectés avec persistance de l'Ag HbS.....	118
Tableau 9 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de KH052008.....	120
Tableau 10 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de KK102008	121
Tableau 11 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de HG012003	121
Tableau 12 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de GM082013	125
Tableau 13 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de MJ052003	126
Tableau 14 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de GD072006	126
Tableau 15 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de LJM092003	127
Tableau 16 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de DC092013	127
Tableau 17 : Mutations retrouvées chez les patients de génotypes A	133
Tableau 18 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de MW062008	135
Tableau 19 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de GA072013	136
Tableau 20 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de HM1996	139
Tableau 21 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de FG102001	139
Tableau 22 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de OL022008	140
Tableau 23 : Mutations retrouvées chez les patients de génotype E	143
Tableau 24 : Mutations retrouvées chez les patients d'intérêt	144
Tableau 25 : Mutations retrouvées chez les patients non répondeurs	145

Liste des abréviations

AA : Acide aminé

Ac : Anticorps

ADN : Acide déxoribonucléique

ADNccc : Covalently closed circular DNA

ADV : Adéfovir

Ag : Antigène

AGL : Boucle antigénique

ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNpg : ARN prégenomique

CDC: Centers for Disease Control and prevention

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CV : Charge virale

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

ddNTP : Didésoxribonucléotide triphosphate

ETV : Entécavir

FTC : Emtricitabine

HAS : Haute Autorité de Santé

hNTCP : Human sodium taurochlorate cotransporting polypeptide

IFN : Interféron

INTI : Inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse

INNTI : Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

InVS : Institut National de Veille Sanitaire

Kb : Kilo base

LdT : Telbivudine

LT : Lymphocyte T

LTc : LT cytotoxiques

MHR : région hydrophile majeur

NK : Natural killer

Nt : Nucléotide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONU : Organisation des Nations Unies

ORF : Open reading frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pol : polymérase

RE : Réticulum endoplasmique

RT : Transcriptase inverse

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

SIV : Virus de l'immunodéficience simienne

TDF : Ténofovir

TI : Transcriptase inverse

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VHD : Virus de l'hépatite Delta

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

YMDD : Tyrosine (Y) Méthionine (M) Acide Aspartique (D) Acide Aspartique (D)

3TC : Lamivudine

+ : Positif

- : Négatif

Introduction

Malgré l'existence d'un vaccin efficace, les infections chroniques dues au virus de l'hépatite B (VHB) touchent environ 240 millions de personnes dans le monde. Le nombre de personnes vivant avec le virus de l'immunodéficiency humaine (VIH) est quant à lui estimé à 35 millions dans le monde. En raison de modes de contamination similaires, environ 7% des patients infectés par le VIH présentent des marqueurs d'infection chronique par le VHB (présence de l'antigène HBs pendant plus de six mois et/ou de l'ADN du VHB).

L'infection par le VHB, responsable de lésions hépatiques sévères, est considérée comme une cause majeure de mortalité et de morbidité pour les patients séropositifs pour le VIH. Les interactions entre VIH, VHB, système immunitaire et traitements antiviraux sont complexes.

Des analogues nucléos(t)idiques ayant une double activité anti-VIH et anti-VHB sont utilisés dans la prise en charge thérapeutique de ces patients co-infectés VIH/VHB en plus des antirétroviraux spécifiques du VIH. L'objectif thérapeutique est identique à celui d'une mono-infection par le VHB, c'est-à-dire obtenir une charge virale VHB indétectable à long terme et idéalement une négativation de l'antigène (Ag) HBs, ce qui est rare, notamment en cas de co-infection par le VIH.

Les glycoprotéines d'enveloppe du VHB, composées de l'Ag HBs, jouent un rôle essentiel dans le cycle viral et dans la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis du virus.

Notre objectif est d'étudier l'influence de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du VHB sur la clairance de l'Ag HBs chez des patients co-infectés VIH/VHB traités par analogues nucléos(t)idiques spécifiques du VHB. Nos travaux visent à mettre en évidence des signatures moléculaires au sein des protéines d'enveloppe du VHB ayant un lien avec la clairance ou la persistance de l'Ag HBs chez des patients co-infectés VIH/VHB.

En fonction de nos résultats, de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les épitopes clés des glycoprotéines d'enveloppe pourraient être étudiées.

Partie 1 : Généralités sur le virus de l'hépatite B, le virus de l'immunodéficience humaine, et la co-infection

Le Virus de l'Hépatite B

1 Historique

C'est en 1964 que Blumberg détecte un nouvel antigène dans le sérum d'un aborigène australien, dit antigène Australia. Cet agent sera plus tard décrit comme étant un marqueur d'une hépatite virale post-transfusionnelle. L'antigène est rebaptisé antigène HBs (Ag HBs) en lien avec le virus de l'hépatite B (VHB) (Blumberg *et al.*, 1965).

En 1970, Dane met en évidence les particules virales complètes (Dane *et al.*, 1970), et il faut attendre 1986 pour voir apparaître le premier vaccin obtenu par génie génétique contre le VHB.

2 Structure du virus

Le virus de l'hépatite B appartient à la famille des *Hepadnaviridae*. Cette famille se caractérise par sa haute spécificité d'espèce, son tropisme cellulaire (hépatocyte), ainsi que sa structure génomique particulière (Glebe and Urban, 2007). On distingue deux genres au sein de cette famille, les *Orthohepadnavirus* spécifiques de l'homme et du chimpanzé et les *Avihepadnavirus* que l'on retrouve chez certains oiseaux comme le héron cendré et le canard de Pékin.

Le VHB est le plus petit virus animal enveloppé à acide désoxyribonucléique (ADN), il comporte 3200 paires de bases. La stratégie de réplication implique une étape de transcriptase inverse de la polymérase virale qui est similaire à celle qu'utilisent les virus issus de la famille des *Retroviridae* (Pollicino *et al.*, 2014).

2.1 Les particules virales

On distingue dans le sérum d'un patient infecté, trois types de particules : les particules virales infectieuses (particules de Dane) et les particules non infectieuses. Ces dernières correspondent à des billes et bâtonnets constitués d'enveloppes vides et sont présentes en large excès (1000 fois plus par rapport aux particules infectieuses).

Les particules de Dane qui constituent le virion complet (42 nm) sont composées d'une nucléocapside icosaédrique contenant le génome viral ainsi que la polymérase associée aux protéines du core du VHB. Le tout étant maintenu par une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées les protéines de surface du virus (figure 1).

Les billes et bâtonnets (figure2), majoritairement recouverts d'Ag HBs, jouent un rôle de leurre important pour le système immunitaire puisqu'elles vont notamment réduire le pool d'anticorps neutralisants disponibles. (Glebe and Urban, 2007)

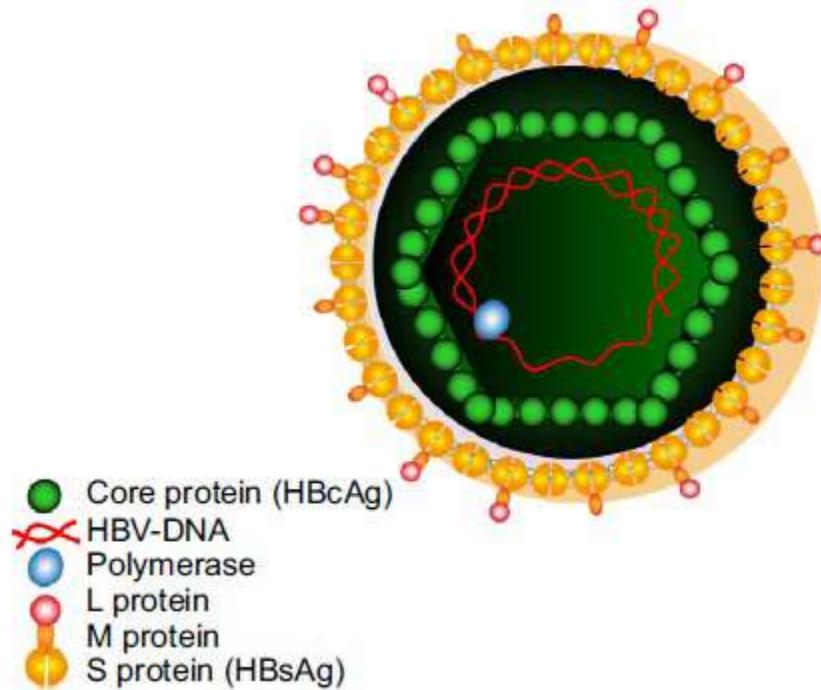


Figure 1 : Représentation schématique de la structure du virus de l'hépatite B (Pollicino *et al.*, 2014)

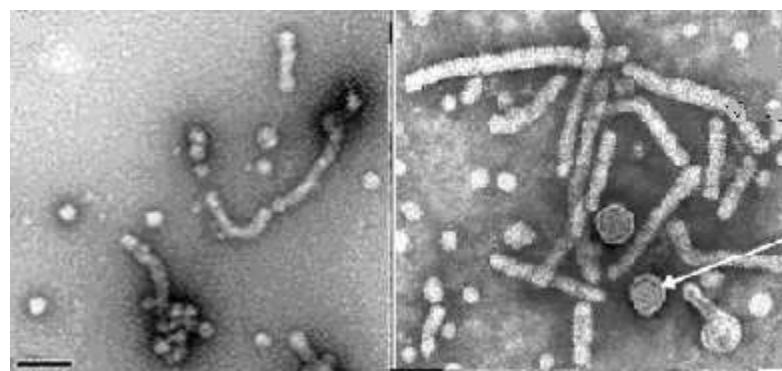


Figure 2 : Aspect des particules subvirales et virales en microscopie électronique à transmission (Patient *et al.*, 2007)

2.2 Le génome

Le génome est constitué d'un ADN circulaire partiellement bicaténaire. On distingue le brin long de polarité négative possédant quatre cadres ouverts de lectures ou "open reading frames " (ORFs) qui se chevauchent et codent pour quatre ARN messagers. On distingue un autre brin : le brin court non codant de polarité positive avec une extrémité 5' fixe et une extrémité 3' variable. L'organisation compacte du génome en cadres de lecture chevauchants lui permet de coder pour sept protéines différentes. Chaque nucléotide code au moins une protéine virale et parfois jusqu'à quatre protéines distinctes. Les quatre ARN possèdent le même site de terminaison, caractérisé par une séquence de polyadénylation (figure 3) (Petit and Trepo, 2014).

Description des ORFs :

ORF préS/S : contenant les régions préS1, préS2 et S codant les trois protéines de surface; la protéine majoritaire S (région S) constituée de 226 acides aminés, la protéine moyenne M (région préS2/S) de 281 acides aminés, et la grande protéine L (région préS1/préS2/S) de longueur variable en fonction des génotypes (Bruss, 2007).

ORF préC/C : contenant les régions préC/C et codant pour deux protéines, la protéine préC/C ou précore, précurseur de l'antigène HBe (Ag HBe) impliqué dans la persistance virale et la protéine C ou Core qui est l'élément structurel de base de la capsid et porte l'antigène HBC (Ag HBC). La protéine C de 183 à 185 acides aminés possède une partie C terminale basique permettant des interactions entre la capsid et l'ADN viral encapsidé et une partie N terminale indispensable à l'auto assemblage de la capsid (Locarnini and Yuen, 2010).

ORF P : Le gène P qui code pour une polymérase virale (Pol) d'environ 850 acides aminés couvre 80% du génome et chevauche au moins partiellement tous les autres cadres de lecture. En conséquence, des mutations de la Pol peuvent notamment affecter le gène S avec des implications sur l'infectivité du virus et la pathogénie de la maladie hépatique.

Cette polymérase possède de multiples activités, nous pouvons distinguer quatre domaines protéiques. Le domaine "protéine terminale" ou PT qui amorce la synthèse du brin négatif, le domaine Spacer qui assure la flexibilité de la Pol, le domaine "transcriptase inverse/ADN polymérase ADN dépendante" et enfin le domaine RNaseH responsable de la dégradation de l'ARN prégnomique essentielle pour la réPLICATION virale (Locarnini and Yuen, 2010).

ORF X : le Gène X code la protéine X de 154 acides aminés ayant des propriétés transactivatrices de la transcription de gènes cellulaires et viraux. Cette protéine aurait un rôle dans le développement du carcinome hépatocellulaire ou CHC chez les patients infectés chroniquement par le VHB (Wei *et al.*, 2010).

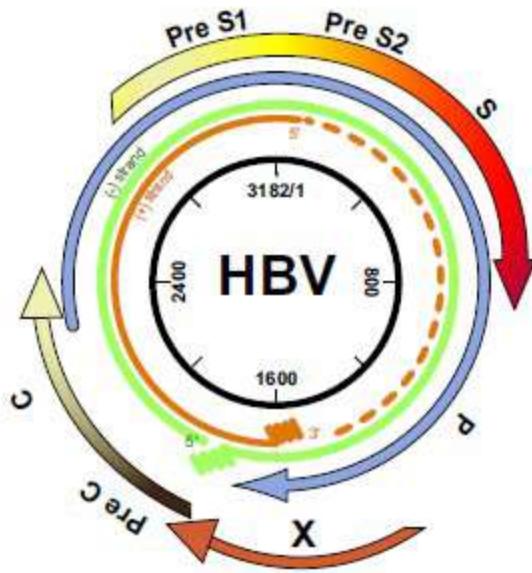


Figure 3 : Représentation schématique du génome du VHB (Pollicino *et al.*, 2014)

3 Les glycoprotéines d'enveloppe

3.1 Structure

Trois protéines de surface codées par la même région préS/S vont constituer l'enveloppe du VHB. Il s'agit des protéines L (Large), M (Medium), S (Small).

Ces protéines, de tailles différentes, ont un domaine commun : la protéine S de 226 acides aminés (AA) codée par la région S (Petit and Trepo, 2014) (figure 4).

La protéine S, constituant majeur de l'enveloppe, possède un site de N-glycosylation au niveau du résidu asparagine en position 146.

La protéine M (préS2 + S) contient 55 AA supplémentaires sur la partie N-terminale par rapport à la protéine S correspondant à la région préS2. Il existe également un site de N-glycosylation en position 4 uniquement présent sur la protéine M et non pas sur la protéine L et certains génotypes possèdent un site d'O-glycosylation en position 37 (AA absent chez le génotype A) (Schmitt *et al.*, 2004).

Enfin, la longueur de la protéine L (préS1 + préS2 + S) est variable en fonction des génotypes, elle contient entre 108 et 119 AA supplémentaires sur la partie N-terminale par rapport à la protéine M, correspondant à la région préS1 (Bruss, 2007).

La protéine L est donc composée de 400 AA pour le génotype A, 399 pour le génotype E et 389 pour le génotype D. Elle possède également un site de myristylation à son extrémité N-terminale au niveau d'un résidu glycine en position 2 (figure 5).

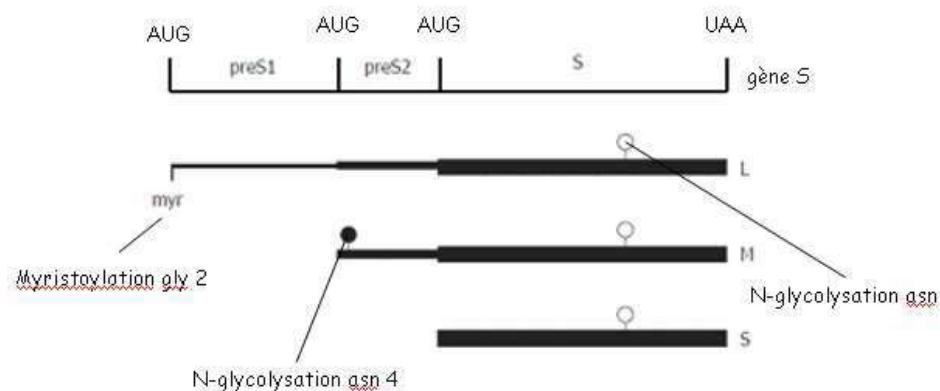


Figure 4 : Représentation linéaire du génome et des protéines d'enveloppe du VHB (Bruss, 2007)

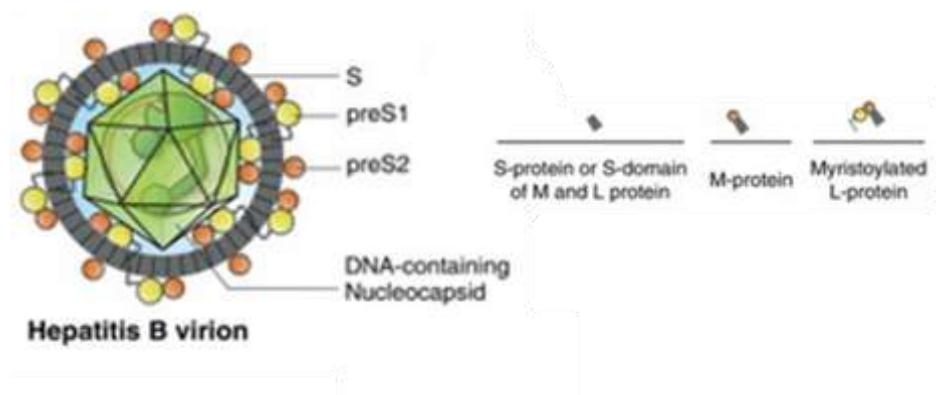


Figure 5 : Représentation des protéines de surface au sein du virion complet (Baumert *et al.*, 2014)

La protéine S est composée de quatre hélices α transmembranaires "TM" hydrophobes permettant l'ancrage de l'enveloppe dans la bicoche lipidique ou dans la membrane du réticulum endoplasmique ainsi que d'une boucle antigénique (AGL) (aa 99- 172) située entre TM2 et TM3.

L'AGL ou région hydrophile majeur (MHR) se trouve à la surface des particules virales. Les résidus cystéines présents vont permettre la formation de ponts disulfures assurant la structure et la conformation tridimensionnelle de l'AGL.

On observe une région très conservée en préS1 (AA 2-75) indispensable pour l'entrée du virus (Le Duff *et al.*, 2009) (figure 6).

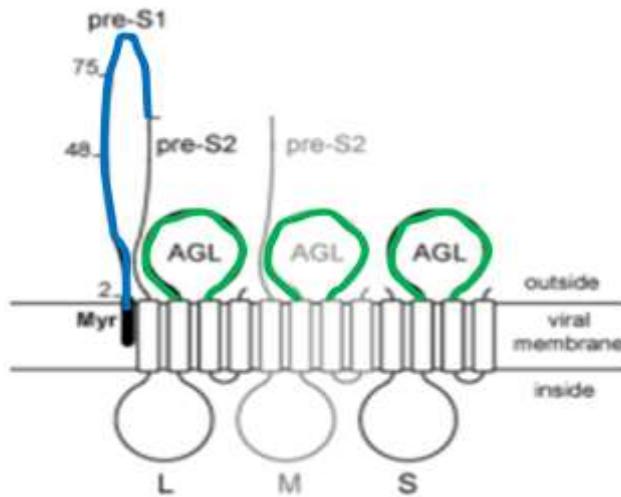


Figure 6 : Représentation schématique de la topologie des protéines L, M et S au niveau de la membrane virale (Le Duff *et al.*, 2009)

3.2 Synthèse

La synthèse de ces protéines se produit dans le réticulum endoplasmique (RE) (figure 7).

Grâce au premier signal N-terminal constitué des AA 8 à 22, la protéine S va pouvoir s'insérer dans la membrane du RE. Un autre signal (AA 80-98) permet une translocation en aval dans la lumière du RE, ce qui formera la boucle antigénique, alors que la boucle en amont (AA 23-79) reste dans le cytosol. Après bourgeonnement, la boucle antigénique sera localisée sur la surface externe du virus.

Concernant la protéine M, la topologie est la même que celle de la protéine S, le domaine préS2 est quant à lui transloqué dans la lumière du RE.

Pour la protéine L, le résidu Glycine en position 2 est myristoylé ce qui permet un ancrage supplémentaire dans la membrane du RE. Les régions préS1 et préS2 restent d'abord intracytoplasmique, il s'agit de la conformation i-préS.

Après la traduction, la topologie transmembranaire des chaînes L change pour la moitié d'entre elles et le domaine préS se retrouve dans la lumière du RE par un phénomène de flip-flop. Il s'agit alors de la conformation e-préS (Bruss, 2007).

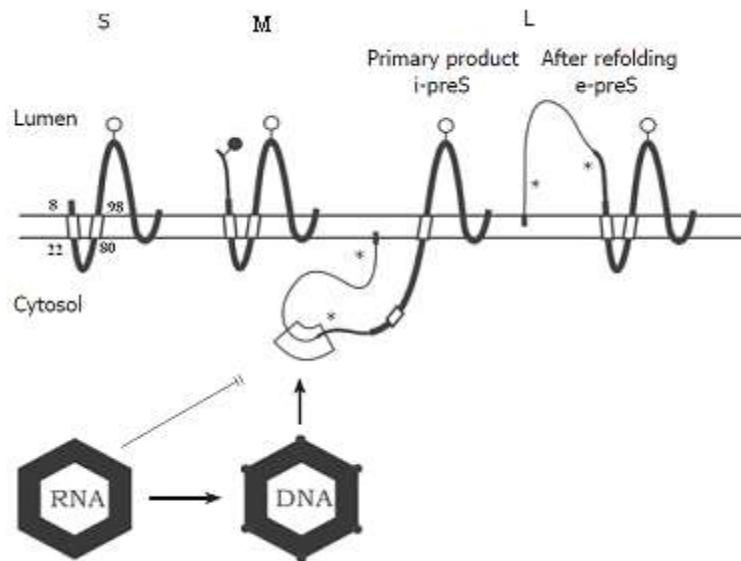


Figure 7 : Topologie transmembranaire des protéines d'enveloppe du VHB au niveau du réticulum endoplasmique et interactions enveloppe/nucléocapside (Bruss, 2007)

3.3 Fonctions

D'après les données de la littérature, les glycoprotéines d'enveloppe sont impliquées dans l'entrée du virus dans les hépatocytes et sont la cible de l'immunité humorale et cellulaire. Elles ont également un rôle dans la morphogénèse du virus (Baumert *et al.*, 2014).

En effet des séquences particulières de préS mais aussi de l'AGL du domaine S vont permettre l'assemblage des virions en provoquant des interactions avec les nucléocapsides matures.

Les protéines S et L sont indispensables au pouvoir infectieux du VHB alors que la protéine M semble n'avoir qu'un rôle accessoire.

On distingue trois déterminants majeurs du pouvoir infectieux (figure 8) :

- Le premier déterminant du pouvoir infectieux se trouve dans la région préS1 de la protéine L entre les AA 2 à 75. En effet, il a été démontré par des expériences de mutagénèse ou par compétition avec des peptides synthétiques que la myristylation en position 2 est essentielle pour la reconnaissance et l'entrée du virus dans sa cellule cible. Les AA 2 à 48 seraient nécessaires pour la fixation sur le récepteur human sodium taurocholate cotransporting polypeptide (hNTCP). De plus, des études récentes ont montré une forte spécificité d'interaction entre un peptide synthétique contenant la région très conservée d'AA 9 à 15 avec

le hNTCP (Meier *et al.*, 2013). La région contenant les AA de 49 à 75 est essentielle mais sa fonction reste encore inconnue (Baumert *et al.*, 2014).

- Le deuxième déterminant se situe dans l'AGL des trois protéines d'enveloppe et plus particulièrement au niveau du déterminant "a" (AA 124-149) et participe à l'entrée du virus de façon indépendante. En effet, la présence de résidus cystéines et la formation de ponts disulfures vont favoriser l'infectivité du virus. Une mutation au niveau de la cystéine 147 peut bloquer l'entrée du virus (Le Duff *et al.*, 2009).
- Le troisième déterminant du pouvoir infectieux se situe au niveau de TM1 de la protéine L et pourrait avoir un rôle dans la fusion de la particule virale avec les cellules (Baumert *et al.*, 2014).

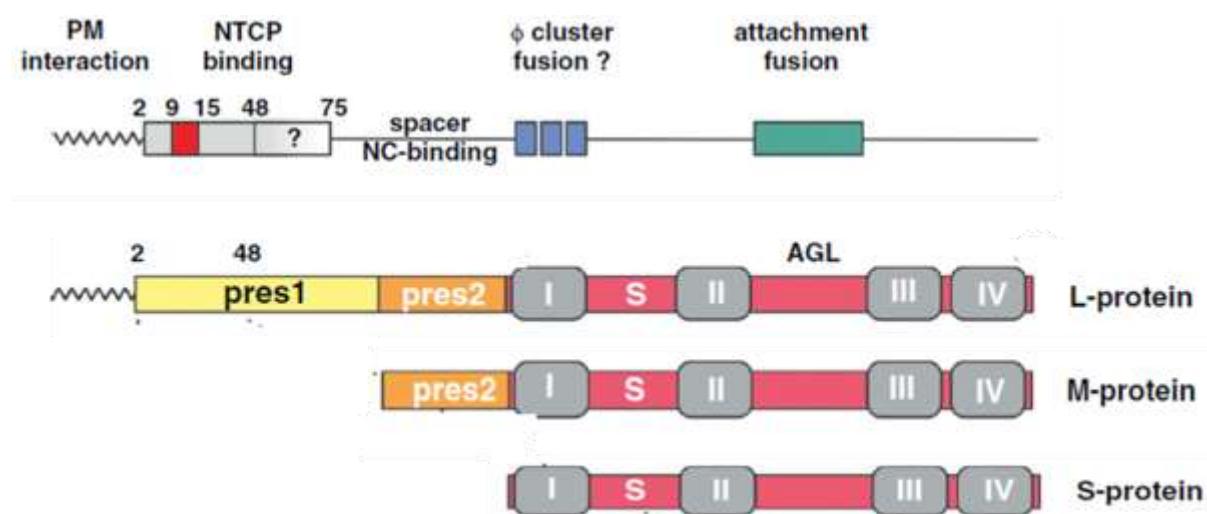


Figure 8 : Représentation des trois déterminants infectieux et des trois protéines de surface du VHB (Baumert *et al.*, 2014)

Les glycoprotéines d'enveloppe du virus sont la cible de l'immunité cellulaire et humorale car elles portent des épitopes B et T spécifiques présents au niveau des régions préS1/2 et S (Desmond *et al.*, 2008) (Chen *et al.*, 2006). Les épitopes vont être présentés par les molécules du complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I ou II aux Lymphocytes T par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique. Les lymphocytes CD4 ou CD8 vont interagir entre eux pour induire une réponse immunitaire adaptée et permettre une éradication de l'infection.

Les domaines préS1/2 forment des épitopes linéaires B et T et les anticorps spécifiques de cette région semblent jouer un rôle dans la clairance virale (Kim *et al.*, 2000).

Le déterminant "a" est la partie antigénique principale de la protéine S grâce au complexe multiprotéique formé par les ponts disulfures (figure 9). Il constitue la cible majeure des anticorps anti-HBs neutralisants. La protéine S est également porteuse d'épitopes T spécifiques reconnus par les LT helper comme P1 (AA 16 à 33) et P4 (AA 213-226) (Jeulin *et al.*, 2013).

La réponse immunitaire face à ces épitopes va déterminer l'évolution de l'infection par le VHB.

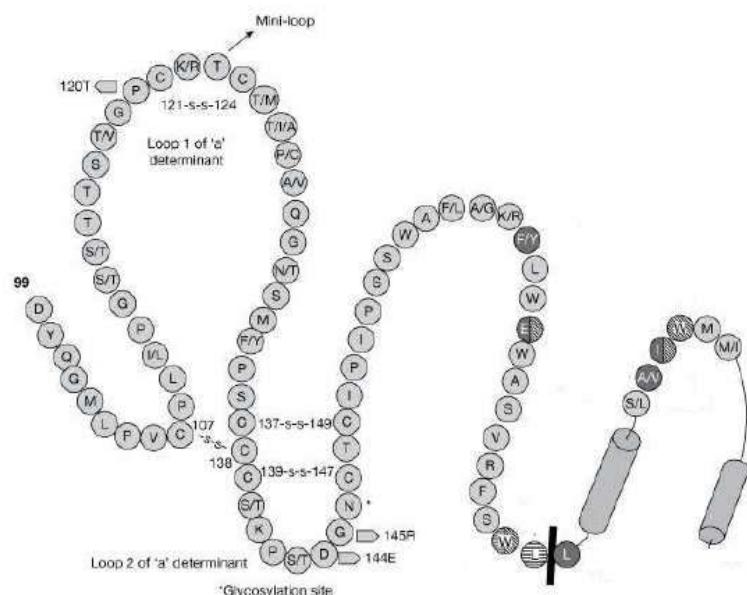


Figure 9 : Structure de la boucle antigénique AGL au sein de l'Ag HBs (Locarnini and Yuen, 2010)

4 Le cycle cellulaire

Du fait de son tropisme cellulaire, le cycle de réPLICATION du VHB a lieu exclusivement dans les hépatocytes, on retrouve malgré tout de l'ADN viral dans d'autres sites comme les cellules mononucléées sanguines, le pancréas ou les reins (Pontisso *et al.*, 2008).

4.1 Pénétration dans l'hépatocyte

Après une première étape d'attachement non spécifique des glycoprotéines d'enveloppe aux héparanes sulfates cellulaires par l'intermédiaire de liaisons de type interaction électrostatique (Glebe and Urban, 2007) (Sureau and Salisse, 2013), une deuxième phase permet aux protéines de surface (et notamment celles contenant la région préS1) de se lier spécifiquement et de manière irréversible au récepteur hNTCP (human sodium taurocholate cotransporting polypeptide) exprimé à la surface des hépatocytes

(Yan *et al.*, 2012) (Xiao *et al.*, 2013). Le hNTCP est une glycoprotéine multitransmembranaire présentant jusqu'à dix boucles extracellulaires et localisée au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes. C'est un transporteur sodium dépendant des acides biliaires du sang vers le foie permettant ainsi le maintien d'une circulation entérohépatique. L'étape d'internalisation étant mal connue, deux mécanismes sont envisagés. Le premier étant la fusion de l'enveloppe du virus à la membrane cellulaire (Urban *et al.*, 2010) et le second mécanisme est l'endocytose de la particule virale par l'hépatocyte (Stoeckl *et al.*, 2006).

4.2 Décapsidation

Après entrée dans la cellule, la capsid virale est prise en charge par le réseau de microtubules dans le but d'arriver à proximité du noyau et des pores nucléaires. Des interactions entre les protéines du core et les pores nucléaires vont engendrer un signal permettant la décapsidation et la translocation nucléaire de l'ADNrc. La nucléocapside va se désassembler en dimère de protéine C et va libérer le génome dans le noyau cellulaire par des mécanismes encore inconnus (Urban *et al.*, 2010).

4.3 Synthèse de l'ADNccc

Dans le noyau, le brin court est complété par la polymérase virale, l'ADNrc est ensuite transformé en une forme circulaire double brin stable et persistante appelée ADNccc (« covalently closed circular DNA ») par des enzymes cellulaires (Sohn *et al.*, 2009). Cet ADNccc est extrêmement stable dans le noyau des hépatocytes et forme un mini-chromosome non intégré de 3,5 kb mais dont l'intégration dans le génome cellulaire est possible. La persistance de cet ADNccc dans le noyau joue un rôle essentiel dans le portage chronique du virus.

4.4 Transcription

L'ADNccc va servir de matrice pour la transcription des ARN viraux grâce à l'ARN polymérase II cellulaire. On distingue quatre transcrits majeurs, un ARNm pré génomique ou ARNpg de 3,5 kb qui code pour les protéines de capsid et la polymérase et trois ARNm subgénomiques de 2,4 - 2,1 et 0,8 kb, codant pour les protéines d'enveloppes préS1-préS2-S et la protéine X (Wei *et al.*, 2010).

4.5 Traduction et formation de capsides

Les ARNm transcrits sont traduits en protéines dans le cytoplasme de l'hépatocyte grâce à la machinerie cellulaire de l'hôte. Tous les ARNm transcrits sont similaires aux transcrits eucaryotes, ils

sont coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. La molécule de l'ARNpg est encapsidée grâce à la liaison de la Pol au niveau du signal d'encapsidation ε en 5' de l'ARNpg. La nucléocapside est formée et contient l'ARNpg associé à la Pol et à des kinases cellulaires.

Une fois les protéines d'enveloppe L, M et S traduites à partir des ARN subgénomiques, celles-ci transitent par l'appareil de Golgi et s'expriment à la surface du réticulum endoplasmique (RE) (Urban *et al.*, 2010).

4.6 RéPLICATION DU GÉNOME VIRALE

L'étape de transcription inverse est initiée par la liaison covalente entre un résidu du domaine TP de la polymérase virale et une courte amorce d'ADN synthétisée (3 nucléotides) en complément d'une séquence de ε. Les trois nucléotides complémentaires de la séquence à l'extrémité de la région DR1 vont s'y hybrider, et permettre ainsi à la Pol de continuer la transcription inverse de l'ARNpg en ADN brin négatif. L'ARNpg est dégradé simultanément par l'activité RNase H de la polymérase à l'exception de la séquence DR1 de 11 nt protégée par la coiffe en 5' qui va être transloquée et s'apparier à la région homologue DR2 en 5' du brin négatif. Cela va servir d'amorce pour l'élongation du brin positif par la polymérase virale en parallèle de la circularisation du brin négatif due à l'appariement des séquences répétées DR1 en 3' et 5' (figure 10), (Urban *et al.*, 2010).

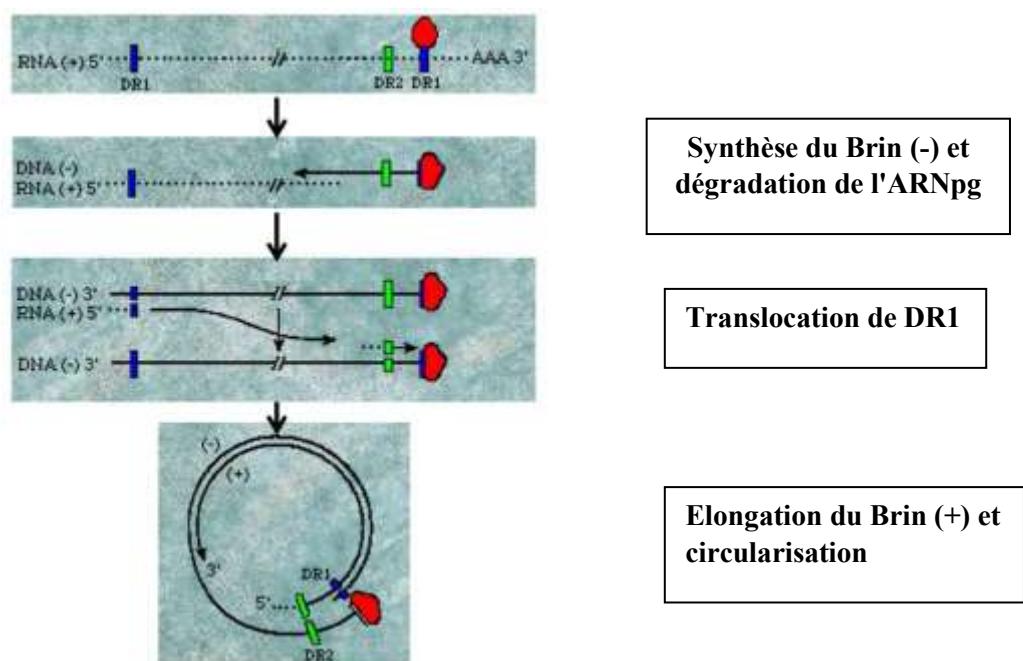


Figure 10 : RéPLICATION DU GÉNOME VIRAL (d'après web.stanford.edu)

4.7 Libération de virions

Les nucléocapsides matures contenant l'ADNrc vont s'associer avec les protéines d'enveloppe au niveau du RE par bourgeonnement pour donner des particules virales complètes.

Il faut préciser que l'enveloppe virale ne dérive pas de la membrane plasmique des cellules infectées.

La présence de la protéine L comme protéine matrice est nécessaire pour assurer l'enveloppement de la capsidie virale et se fait grâce à une interaction spécifique entre un domaine court de préS1 et la nucléocapside. L'enveloppement enrichi en protéines L est indispensable pour garantir le pouvoir infectieux du virus alors qu'en présence d'une faible concentration en protéine L, le bourgeonnement produit les particules subvirales en forme de billes. Ce système permet aux particules virales de ne pas être en compétition avec les particules subvirales majoritaires lors des processus de reconnaissance des hépatocytes.

Un autre devenir des nucléocapsides est de retourner au noyau pour être recyclées et renforcer le pool d'ADNccc (Beck and Nassal, 2007).

Les virions complets formés sont quant à eux secrétés hors de la cellule (figure 11).

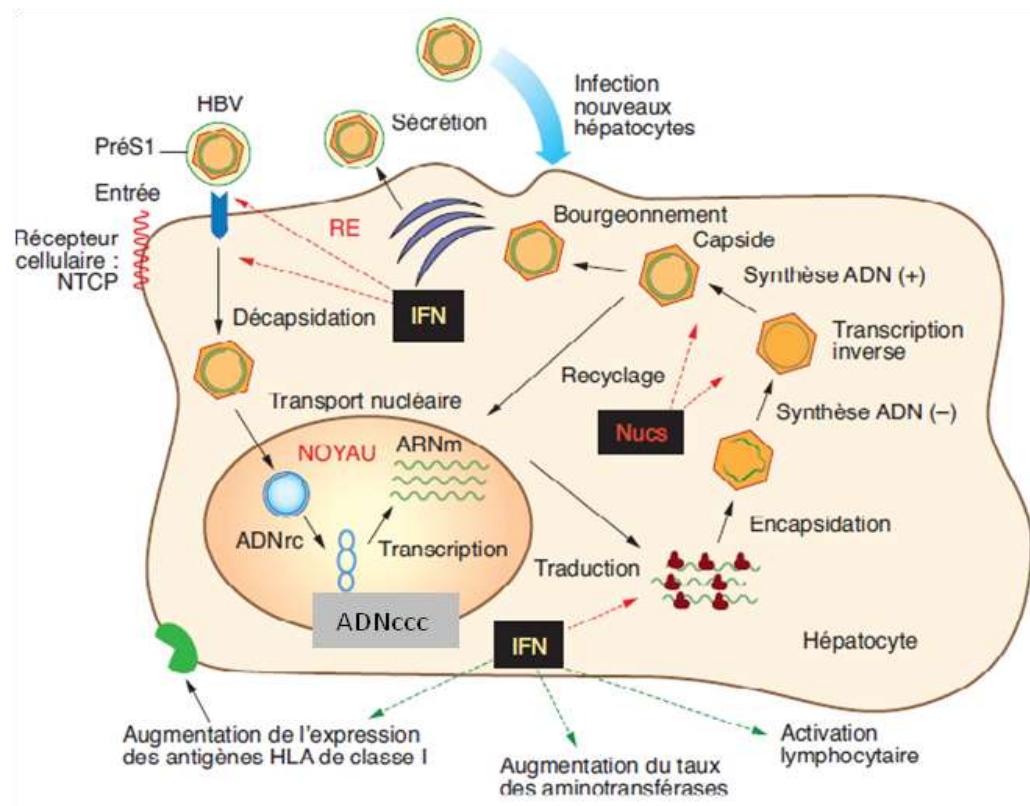


Figure 11 : Le cycle de réPLICATION VIRALE DU VHB et sites d'action des antiviraux (Petit and Trepo, 2014)

5 Variabilité du VHB

La grande variabilité du VHB peut être expliquée par des caractéristiques propres au virus utilisées lors de son mode de réPLICATION. D'une part il possède une transcriptase inverse sans activité correctrice et d'autre part le niveau de production de virions est très important, de l'ordre de 10^{12} produits par jour chez un individu infecté de manière chronique (Nowak *et al.*, 1996).

Ainsi, il existe un grand nombre d'erreurs aléatoires avec un taux de substitutions par site et par cycle estimé à $6,3 \cdot 10^{-4}$. Toutes les mutations ponctuelles possibles sur le génome de 3200 nucléotides sont générées chaque jour. Ce taux de substitution est proche de celui retrouvé chez les virus à ARN et il est 100 fois plus élevé qu'un virus à ADN.

On parle de variabilité génotypique suite à l'évolution progressive du génome en l'absence de pression de sélection, et qui est à l'origine de la formation des différents génotypes et sérotypes.

On parle également de variabilité phénotypique qui apparaît suite à une pression de sélection (réponse immunitaire de l'hôte, vaccination, et traitements antiviraux) et qui va être à l'origine de l'émergence de mutants.

5.1 Variabilité génotypique

5.1.1 Génotypes

On dénombre actuellement 10 génotypes du VHB répertoriés de A à J et possédant entre eux au moins 8% de divergence par rapport à leur séquence nucléotidique complète (Lin and Kao, 2011). Les génotypes I et J ne sont pas encore totalement officialisés (Tatematsu *et al.*, 2009) (Huy *et al.*, 2008).

Certains génotypes sont divisés en sous-types présentant entre 4 et 8% de variabilité génomique (par exemple, on parle de sous-type D1, D2, D3, D4 pour le génotype D).

Les génotypes diffèrent par leur taille : le génotype D a le plus petit génome avec 3182 nt, alors que le génotype G contient 3248 nt. Ces différences sont les conséquences d'insertions et/ou délétions observées au cours de l'évolution (Kay and Zoulim, 2007).

Des recombinaisons intragénotypiques et intergénotypiques existent et sont aussi responsables de la variabilité du virus.

Le VHB s'est probablement disséminé dans la population humaine et a suivi les mouvements migratoires des populations. Ainsi, les différentes souches ont évolué indépendamment les unes des autres.

5.1.2 Sérotypes

Il existe deux autres déterminants au sein de l'Ag HBs en plus du déterminant "a" qui sont à l'origine de la classification des différents sérotypes. Il s'agit des déterminants d/y et w/r qui sont définis selon la nature des acides aminés en position 122 et 160. Quatre sous-types principaux sont ainsi décrits : ayr, adr, adw, ayw (Okamoto *et al.*, 1987). La connaissance de ces sérotypes n'a qu'un intérêt épidémiologique.

5.2 Variabilité phénotypique

Une pression de sélection peut être à l'origine de l'apparition de certains mutants phénotypiques. La majorité des variants sont défectifs et ne peuvent se répliquer. Certaines mutations sont donc sans influence. Il existe tout de même au sein de l'organisation compacte du génome des points chauds de mutation comme le déterminant "a" de l'Ag HBs, le gène de la polymérase, et le promoteur du gène C et la région préC. Cela participe à la formation de quasi-espèces du VHB capables d'évoluer selon la pression de l'immunité et/ou des actions thérapeutiques. Les variants les plus adaptés sont donc sélectionnés et peuvent être transmis le plus souvent de façon verticale (mère/enfant et hôte/greffe) (Kay and Zoulim, 2007).

5.2.1 Variabilité des gènes préS/S

Les mutations concernant les régions préS sont souvent des délétions qui peuvent être stables et associées à certains génotypes. Le génotype D a une délétion de 33 nt sur le domaine préS1 sans que cela affecte son pouvoir infectieux. La région préS2 peut subir de nombreuses mutations sous forme de délétions, substitutions, ou autres qui peuvent altérer les épitopes des lymphocytes B et T et être ainsi responsables d'un échappement immunitaire (Kay and Zoulim, 2007). Enfin, certaines délétions au niveau de la zone préS entraînent une accumulation de particules au niveau du réticulum endoplasmique, avec stress oxydatif et un risque accru de CHC (Chen *et al.*, 2007).

Le déterminant "a" est un épitope majeur de la protection contre l'infection, étant la cible des anticorps neutralisants induits naturellement ou par vaccination. Les mutations retrouvées dans ce domaine sont souvent de simples substitutions mais peuvent être à l'origine d'un échappement immunitaire et d'un défaut de détection de l'Ag HBs par les tests diagnostics. En effet, les variants sélectionnés ont une affinité réduite avec les anticorps neutralisants. La conformation de l'épitope change, le rendant inaccessible aux anticorps. La mutation la plus décrite et reconnue est la G145R qui est responsable d'un échappement vaccinal (Kay and Zoulim, 2007).

5.2.2 Variabilité du gène PréC/C

Le cadre de lecture préC/C possède deux codons d'initiation en position 1814 et 1901 qui sont à l'origine de la synthèse de l'Ag HBe et de l'Ag HBc sous le contrôle du promoteur basal du core. Des mutations dans cette zone peuvent affecter l'expression de l'Ag HBe. De plus en plus de patients présentant une sérologie type Ag HBe - /Ac anti-HBe + ainsi qu'une réPLICATION virale sont retrouvés. On parle alors de mutants pré-Core. La mutation G1896A est à l'origine d'un codon Stop qui va abolir la synthèse de l'Ag HBe (figure 12), alors que les mutations A1762T et G1764A situées sur le promoteur vont diminuer fortement l'expression de l'Ag HBe (Ducancelle *et al.*, 2011). On peut retrouver ces mutants en phase aiguë lorsque le virus à l'origine de la contamination est un tel variant, ou en phase chronique après sélection du variant par le système immunitaire.

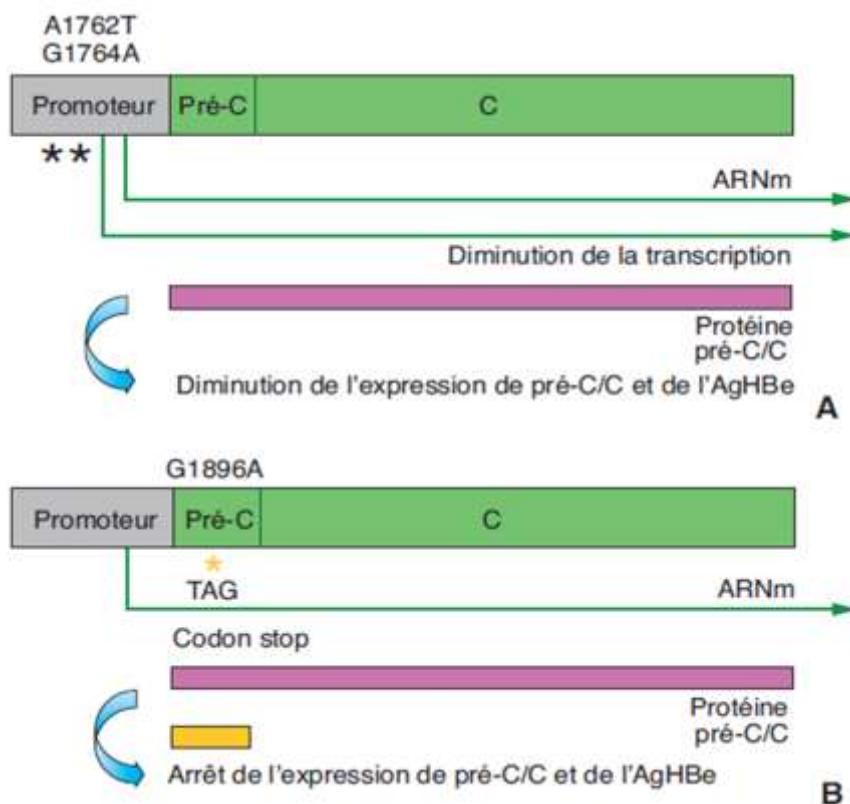


Figure 12 : Mutant pré-Core du virus de l'hépatite B. (A : mutants dans le promoteur du gène Core et B : mutants de la région pré-Core) (Petit and Trepo, 2014)

5.2.3 Variabilité du gène X

En raison du chevauchement des séquences, de nombreuses mutations peuvent affecter la protéine X. Malgré tout, l'impact de celles-ci reste encore mal déterminé.

5.2.4 Variabilité du gène Pol

Du fait de sa longueur, le gène de la polymérase est soumis à des variations importantes qui peuvent retentir non seulement sur l'activité polymérase mais aussi sur l'expression des gènes dont il partage la séquence génomique. Ainsi, suite à l'utilisation d'analogues nucléos(t)idiques, des mutants de la polymérase peuvent émerger, notamment au niveau du site catalytique de la transcriptase inverse. Le cadre de lecture chevauchant celui de l'Ag HBs, une mutation sélectionnée par un analogue nucléos(t)idique peut avoir un impact au niveau de l'Ag HBs et ainsi influencer la réponse immune (Torresi *et al.*, 2002).

Au cours de l'infection chronique, de nombreuses mutations peuvent apparaître sur les différentes régions du génome. Ces mutations vont participer à la formation de quasi-espèces qui évoluent selon les pressions qu'elles subissent. Une mutation doit intégrer le pool d'ADNccc avant de pouvoir être stable et se propager. Ce système permet donc l'expression du phénotype le plus approprié en fonction de la pression exercée (Kay and Zoulim, 2007).

6 Epidémiologie et transmission

Malgré l'utilisation d'un vaccin efficace depuis 1986, l'hépatite B demeure un problème majeur de santé publique. Deux milliards de personnes ont été en contact avec le virus. Selon l'OMS, 240 millions sont porteurs d'une hépatite B chronique, principalement dans les pays en voie de développement et en Asie. Chaque année, environ 700 000 personnes meurent des suites d'une infection par le VHB, soit par hépatite aiguë, soit par cirrhose ou carcinome hépatocellulaire.

La prévalence du VHB est variable d'une région à l'autre du monde. On distingue trois zones en fonction de la prévalence de l'Ag HBs, on parle de pays à forte endémie si le taux est supérieur à 8%, de moyenne endémie si le taux est compris entre 2 et 7% et de faible endémie en cas de taux inférieur à 2% (Petit and Trepo, 2014) (figure 13).

Ainsi, en Afrique Subsaharienne et en Asie du Sud Est, la prévalence de l'AgHBs est à plus de 10%. Alors qu'en Europe et en Amérique du Nord, le taux est inférieur à 1%.

Les dix génotypes VHB différents décrits à ce jour, ont une répartition différente à travers le monde (figure 14). Le génotype A est principalement retrouvé en Amérique du Sud, en Europe du Nord et en Afrique. Les génotypes B et C sont prédominants en Asie. Le génotype D prédomine dans le bassin méditerranéen malgré une répartition mondiale. La distribution des autres génotypes est plus restreinte. Le génotype E est localisé en Afrique de l'Ouest, le génotype F en Amérique du Sud, et le génotype H est confiné en Amérique centrale. Le génotype G a une répartition qui n'est pas encore établie, on le retrouve en Europe, en Amérique du Nord et au Japon.

Ainsi, l'origine géographique des patients peut être associée à certains génotypes du VHB.

Cependant, depuis la deuxième moitié du XXe siècle et l'évolution des moyens de transport et la mondialisation, de plus en plus de flux migratoires des pays pauvres vers les pays riches sont observés (figure 13). Ces flux tendent à modifier la distinction dans la distribution géographique des différents génotypes. On retrouve des génotypes B et C aux USA chez les porteurs d'origine asiatique, et des génotypes A et E en Europe chez les porteurs d'origine africaine (Hannoun *et al.*, 2002).

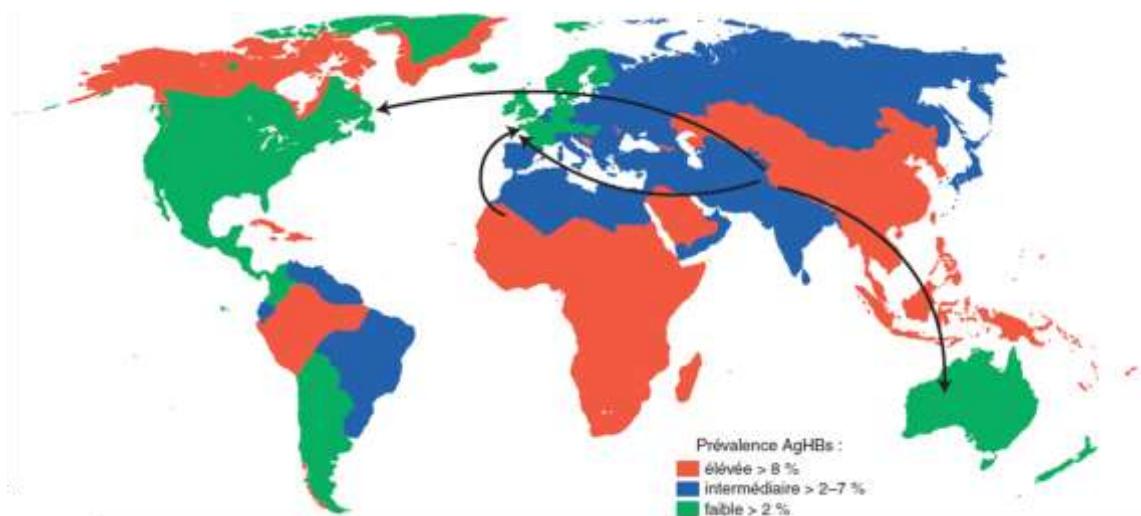


Figure 13 : Prévalence de l'Ag HBs dans le monde (Petit and Trepo, 2014) Les flèches montrent l'effet de migration des pays de forte endémie vers l'Europe, l'Amérique du Nord et l'Australie.

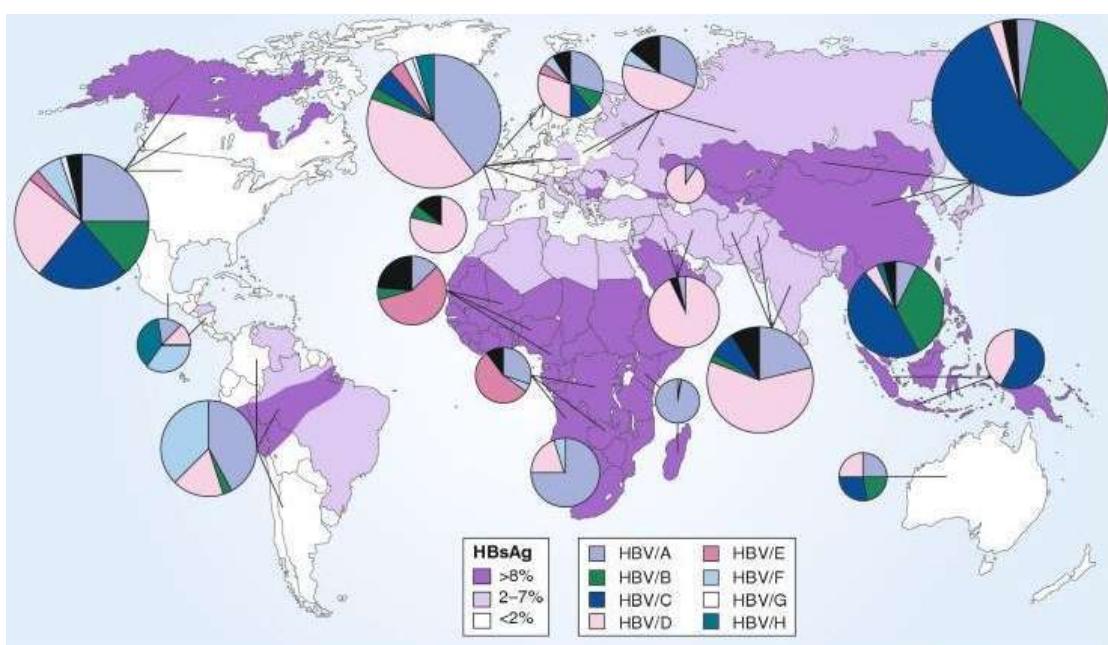


Figure 14 : Répartition mondiale des différents génotypes de VHB (Kurbanov *et al.*, 2010)

Nous avons vu que le génotype viral avait un intérêt épidémiologique mais il peut également être associé à une évolution clinique. Le génotype viral peut avoir un impact sur la progression de la maladie et la réponse aux traitements antiviraux (Kim *et al.*, 2011).

En effet, il y aurait plus de CHC et de cirrhoses chez les patients porteurs de VHB de génotype C que le génotype B. De plus, les patients porteurs d'un génotype D auraient une maladie hépatique d'évolution plus sévère que les génotypes A (Desmond *et al.*, 2008) (Fattovich *et al.*, 2008).

En France, selon une enquête réalisée en 2004 par l'INVS sur la population générale, environ 280 000 personnes sont infectées par le VHB de façon chronique et seulement 45% d'entre elles connaissent leur statut sérologique. La prévalence du portage de l'Ag HBs est estimée à 0,65% et la présence d'un anticorps anti-HBc, qui est le reflet d'un contact avec le VHB, a été relevé dans 7,3% dans la population soit 3 millions de personnes concernées (Meffre C and DMI, 2006).

Le VHB est ainsi responsable d'environ 1500 décès chaque année en France.

Une étude réalisée chez les donneurs de sang dépistés positifs pour l'Ag HBs a permis d'avoir une idée de la répartition des génotypes du VHB en France. On retrouve 42% de génotype D, 27% de génotype A, et 17% de génotype E (Laperche S *et al.*, 2012).

Le mode de transmission du VHB se fait par l'intermédiaire de fluides corporels. Le virus est présent à une concentration élevée dans le sang des sujets ayant une hépatite B aiguë ou chronique. Il est présent également dans les sécrétions génitales et le sperme, mais aussi dans la salive, le lait, les urines, les larmes. Dans les pays riches, la transmission sexuelle semble jouer un rôle important, malgré tout, l'exposition au sang constitue le principal mode de transmission.

Le risque d'infection lié à une piqûre est de 20 à 30% et dépend directement du niveau de réPLICATION virale. On considère que la contagiosité sanguine du VHB est 10 fois supérieure à celle du virus de l'hépatite C, et 100 fois plus élevée que celle du VIH.

Dans les pays en voie de développement, le facteur le plus important dans la dissémination de l'infection est la transmission materno-foetale. Elle est associée à un risque élevé de passage à la chronicité pour les nouveaux nés, de l'ordre de 90 à 100% si la mère présente une hépatite réPLICATIVE au moment de l'accouchement. Ce taux peut être abaissé entre 10 et 20% en l'absence de marqueur de réPLICATION. A noter que dans les pays riches comme dans les pays en voie de développement, la transmission horizontale n'est pas négligeable et serait la source de transmission inexpliquée dans environ 30% des cas.

7 Histoire naturelle de la maladie

7.1 Physiopathologie

L'histoire naturelle de l'infection par le VHB est décrite par la figure 15. L'infection aiguë par le VHB est le plus souvent asymptomatique, seulement 10% des personnes infectées présentent les signes cliniques d'une hépatite. L'évolution vers la chronicité va dépendre notamment de l'âge du patient mais aussi de son statut immunitaire. En effet le passage à la chronicité est proche de 100% chez le nouveau né, puis décroît de 20 à 50% chez l'enfant ainsi qu'en cas d'immunosuppression comme lors d'une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou lors de chimiothérapie. Plus d'hépatites chroniques sont retrouvées dans les pays où la transmission materno-fœtale ou durant l'enfance est prépondérante (Allain, 2006). Chez l'immunocompétent, ce taux est diminué à 10%.

Le VHB n'étant pas un virus cytopathogène, c'est l'intensité de la réponse immunitaire face au virus qui est responsable des lésions hépatocytaires retrouvées, mais c'est aussi une composante clé dans l'élimination du virus. Un équilibre existe entre le virus et la réponse immunitaire de l'hôte. (cf chapitre réponses immunitaires au cours de l'infection par le VHB) (Michel, 2014).

7.2 Clinique

7.2.1 Hépatite aiguë

Une hépatite aiguë symptomatique est retrouvée dans 10% des cas et se traduit par un ictere, des urines foncées, une asthénie, des nausées et vomissements et des douleurs abdominales. Ces signes cliniques sont la conséquence de l'inflammation aiguë du foie. La symptomatologie est directement liée à l'âge et l'infection est le plus souvent asymptomatique chez le jeune enfant (Michel, 2014).

7.2.2 Hépatite fulminante

Dans de très rares cas (0,1%), si la réponse immunitaire à médiation cellulaire est trop excessive, une hépatite fulminante peut survenir. Elle se traduit par une nécrose hépatique massive avec des signes d'insuffisance hépatocellulaire grave. La mortalité est de 70% en l'absence de greffe hépatique.

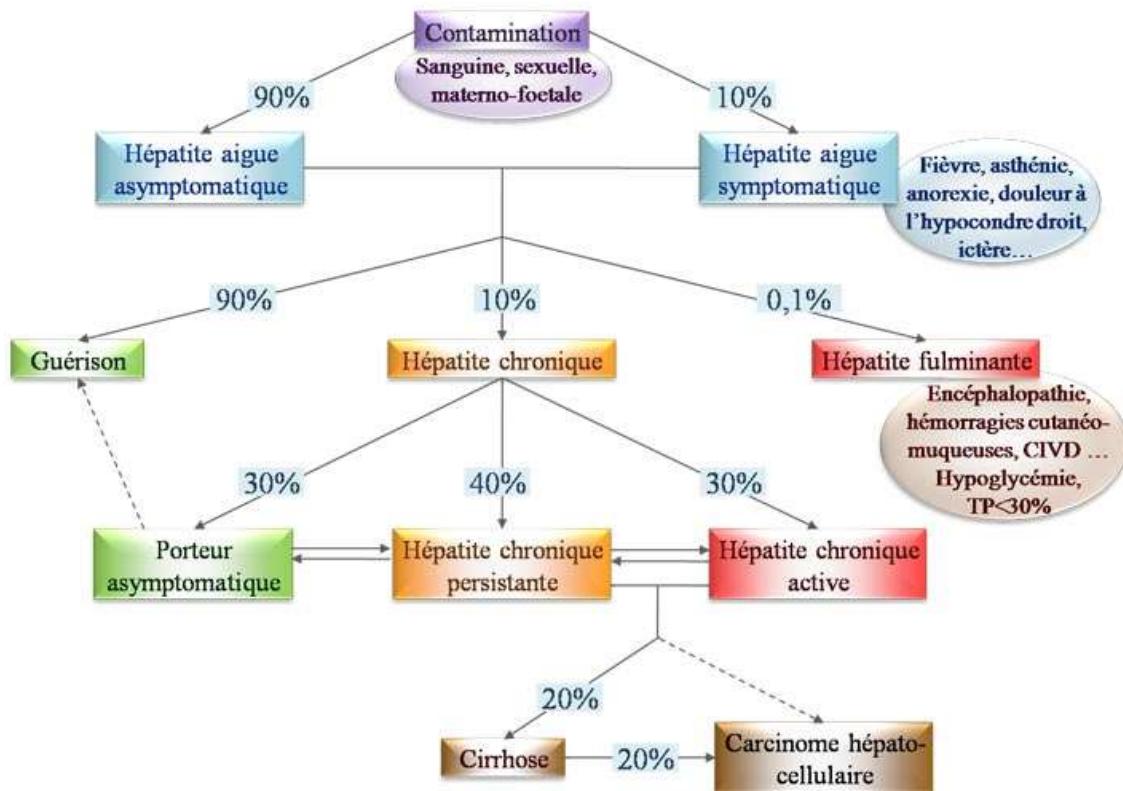


Figure 15 : Histoire naturelle du VHB (d'après MemoBio©)

7.2.3 Hépatite chronique

L'hépatite chronique se développe au décours d'une hépatite aiguë, symptomatique ou non, qui échappe au contrôle par le système immunitaire. Elle est définie par la persistance au delà de six mois de l'Ag HBs. La présentation clinique est très variable d'une personne à une autre, avec une majorité de porteurs totalement asymptomatiques. L'évolution naturelle se fait vers une destruction plus ou moins rapide du parenchyme hépatique avec risque de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire (CHC) aboutissant au décès du patient.

Il n'est pas rare que le diagnostic d'hépatite chronique soit tardif et repose sur l'apparition des complications cliniques de la cirrhose (ascite, ictere, hypertension portale et hémorragie digestive).

Parmi les facteurs de mauvais pronostic figurent :

- génotype C du VHB
- mutant pré-C
- co-infection VIH, Virus de l'hépatite D, Virus de l'hépatite C
- âge avancé
- sexe masculin
- alcoolisme
- tabagisme

Plusieurs phases successives sont décrites pour expliquer l'histoire naturelle de l'hépatite B chronique en dehors de tout traitement (Buster and Janssen, 2006).

7.2.3.1 La phase d'immunotolérance :

Cette phase est caractérisée par une réPLICATION intense du VHB, la présence de l'Ag HBe et une réponse immunitaire faible. On ne retrouve pas d'inflammation ni de nécrose hépatique, les transaminases sont proches de la normale. La durée de cette phase varie en fonction de l'âge de l'infection. En effet, elle peut durer des années chez un individu infecté en période périnatale alors qu'elle est très courte chez l'adulte.

7.2.3.2 La phase dite "immunoactive" ou de réaction immune :

Durant cette phase, le système immunitaire s'active et la réPLICATION virale devient moins intense. Les enzymes hépatiques augmentent, et les lésions hépatiques sont de sévérité variable. Une évolution vers la fibrose est possible et un risque important de développer une cirrhose ou un CHC demeure (Michel, 2014). Cette phase peut durer de nombreuses années ou s'interrompre sans raisons connues. Dans ce cas, une séroconversion dans le système HBe est possible et correspond au passage vers la phase dite de "basse réPLICATION virale" ou "portage inactif de l'Ag HBs".

7.2.3.3 La phase dite de "basse réPLICATION virale" :

Cette phase est caractérisée par une faible virémie, des transaminases à un niveau physiologique, et la présence d'Ac anti-HBe. On parle d'hépatite chronique inactive. Le risque de développer une cirrhose ou un CHC est très faible et cette phase est souvent associée à une évolution favorable à long terme de l'infection. La clairance de l'Ag HBs associée ou non à l'apparition des Ac anti-HBs est possible mais reste très rare.

7.2.3.4 La phase dite de "réactivation" :

Etant donné que le virus persiste dans les hépatocytes sous forme d'ADNccc, un certain nombre de porteurs inactifs peuvent réactiver, en particulier en cas d'immunodépression. Cette phase est caractérisée par une nécro inflammation du foie et des charges virales élevées souvent dues à des virus VHB mutants (pré-Core). Le risque de cirrhose et de CHC est élevé.

Pour finir il est à noter que tous les patients ne passent pas systématiquement par toutes ces phases, en effet l'infection chronique est très polymorphe et l'histoire de la maladie variable d'un sujet à l'autre. La guérison se définit par la clairance de l'Ag HBs et la séroconversion vers le statut anti-HBs qui est obtenue chez 1% des porteurs chroniques par an, en l'absence de traitement (Michel, 2014).

7.3 Hépatite occulte

L'hépatite occulte est définie par la présence d'une charge virale VHB détectable dans le sérum et/ou le foie et l'absence de l'Ag HBs. La plupart du temps, les Ac anti-HBc sont les seuls marqueurs sérologiques retrouvés positifs : on parle de core isolé. L'absence de détection de l'Ag HBs par les tests diagnostics résulte de modifications sur le déterminant "a" ou de la production des protéines de surface en quantité trop faible pour permettre la détection.

L'hépatite occulte est plus fréquente chez le co-infecté par le VIH que chez le monoinfecté (Araujo *et al.*, 2008).

La présence d'un core isolé doit systématiquement faire rechercher la présence d'ADN du VHB dans le sérum, car dans certaines situations cliniques spécifiques, comme un état d'immunodépression, un risque de réactivation majeure existe.

L'intérêt d'un traitement préemptif anti-VHB peut alors être discuté.

7.4 Réponses immunitaires au cours de l'infection par le VHB

7.4.1 Réponse innée

Lors des premières phases de l'infection, le virus échappe complètement à la réponse immunitaire innée. En effet, des études ont montré l'absence de mécanismes antiviraux intracellulaires comme l'absence de production d'interféron par les hépatocytes (Jeulin *et al.*, 2013). Le foie est un organe de tolérance, il est capable de prévenir toute attaque trop importante du système immunitaire qui pourrait le mettre en danger. Les cellules infectées produisent des cytokines immunosuppressives comme l'IL 10 ou le TGF β . Ainsi les fonctions antivirales des lymphocytes NK, naturellement retrouvés en grande quantité dans le foie, sont inhibées (Michel, 2014).

L'absence de réponse immunitaire innée permettrait une expansion du VHB dans les hépatocytes durant la phase précoce.

7.4.2 Réponse adaptative

Une réponse adaptative ou spécifique se met rapidement en place suite à la phase précoce et permet ainsi de contrôler l'infection. Les antigènes du VHB vont être phagocytés par les cellules présentant l'Ag (comme les cellules dendritiques) puis dégradés et présentés par les molécules du CMH classe I ou CMH classe II aux lymphocytes T CD8 et CD4 respectivement. Ainsi la réponse immunitaire cellulaire spécifique est amorcée (figure 16).

Lors de l'infection aiguë résolutive, les réponses des lymphocytes T cytotoxiques CD8 et des lymphocytes T auxiliaires CD4 sont vigoureuses, polyclonales et spécifiques de la majorité des protéines virales. Les LT CD8 cytotoxiques reconnaissent les épitopes portés par les molécules de

CMH I à la surface des hépatocytes. Ils sont responsables des lésions hépatiques, par lyse des hépatocytes par contact direct, et de la libération des transaminases. Ils jouent également un rôle dans la synthèse de cytokines comme l'Interferon γ et du TNF α . Ces cytokines ont des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la réPLICATION intracellulaire du virus. D'un autre point les LT CD4 sont les chefs d'orchestre du système immunitaire : ils permettent d'amplifier la réponse des LT CD8 nécessaires à la clairance virale, et d'initier la réponse humorale (Ganem and Prince, 2004).

Les lymphocytes B spécifiques des antigènes vont être activés par l'intermédiaire de l'IL2 pour devenir des plasmocytes sécrétant des anticorps neutralisants. Les anticorps spécifiques de l'enveloppe virale (Ac anti-HBs) vont également jouer un rôle majeur dans l'immunité protectrice contre le VHB (Petit and Trepo, 2014).

La destruction des cellules infectées par les LT cytotoxiques, associée à la neutralisation des virions et particules virales par les anticorps circulants va permettre la résolution de l'infection aiguë. Ces différentes réponses expliquent que l'infection est le plus souvent bien contrôlée chez le sujet immunocompétent.

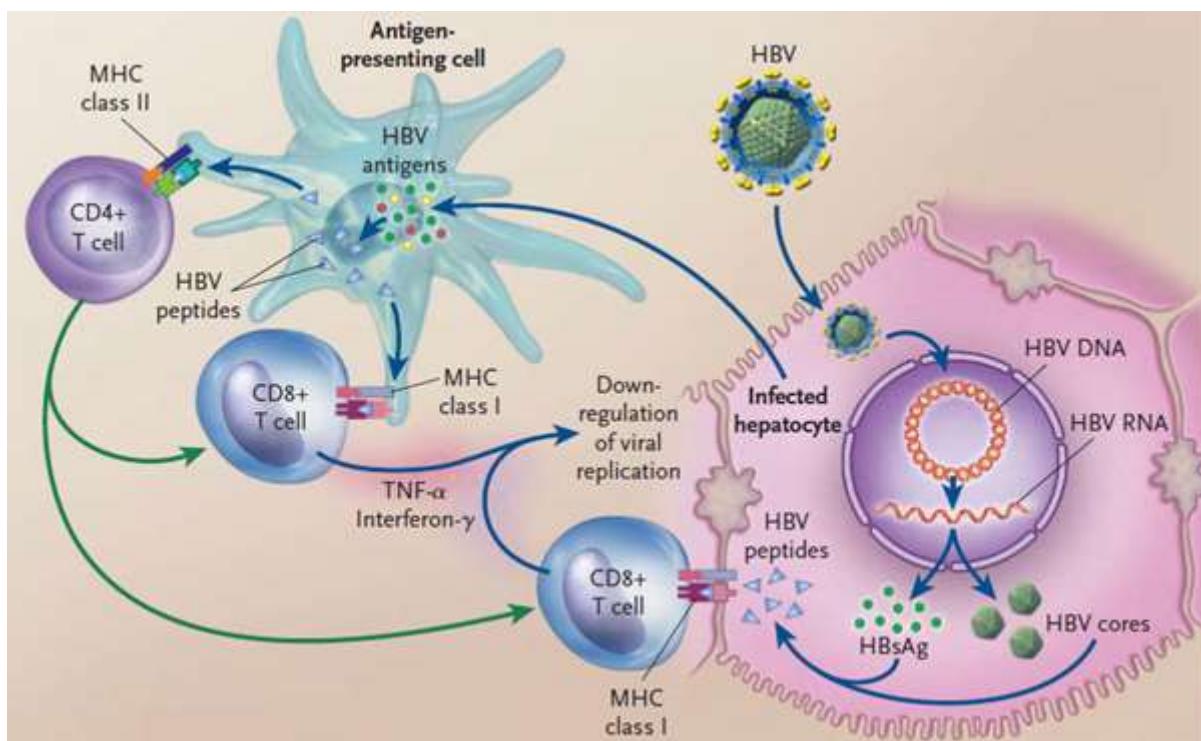


Figure 16 : Réponse immunitaire cellulaire contre le VHB (Ganem and Prince, 2004)

Une réponse immunitaire non coordonnée va, à l'inverse, favoriser le passage à la chronicité. Dans ce cas, la fonction des lymphocytes est altérée avec une perte de prolifération en réponse aux Ag du VHB et une diminution voire une absence de sécrétion des cytokines antivirales (figure 17) (Michel, 2014).

Les lymphocytes T régulateurs (LT reg), connus pour leur capacité à supprimer l'activation, la différenciation et la prolifération des cellules immunitaires, sont considérés comme des acteurs majeurs de la réponse immunitaire non adaptée lors de l'infection chronique. En effet, ces cellules T reg ont été retrouvées en grand nombre dans le foie des porteurs chroniques du VHB (Fu *et al.*, 2007). Ils sont à l'origine d'une diminution de la communication entre les LT CD4 et LT CD8. Les anticorps anti-HBs ne sont pas détectables et la réponse cellulaire T est faible et peu spécifique.

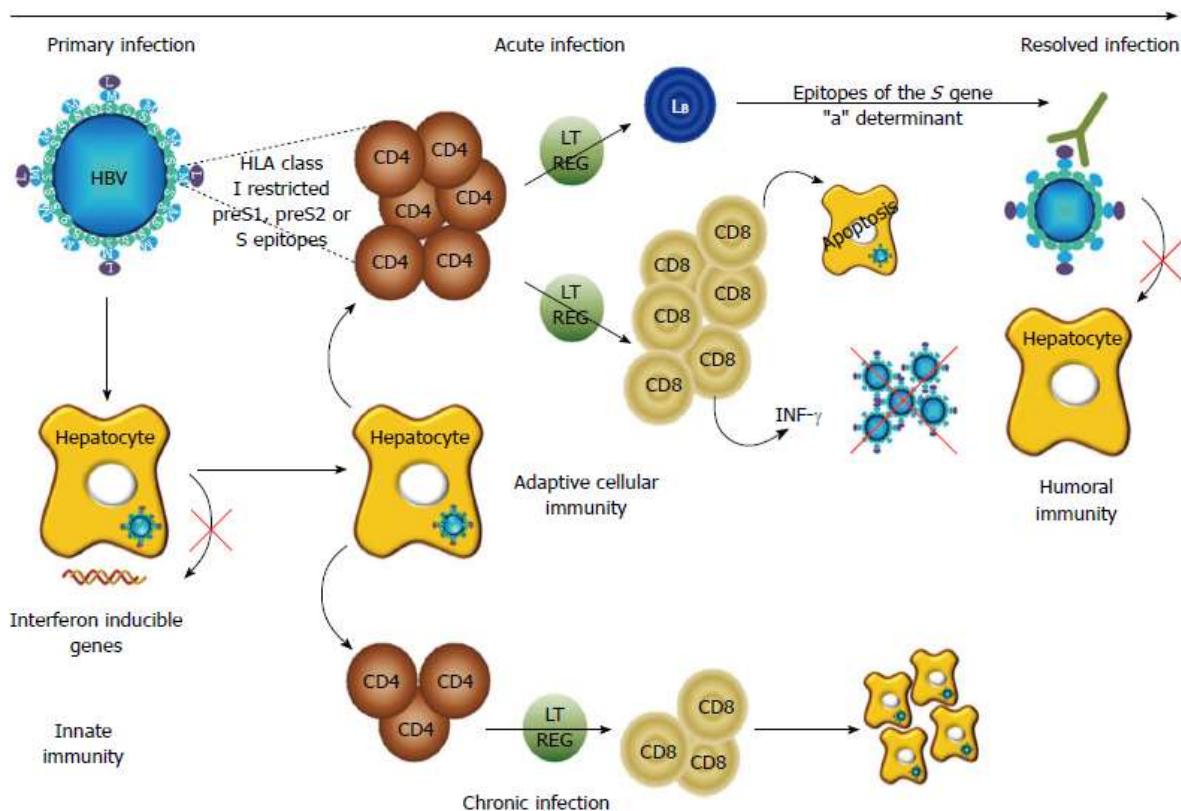


Figure 17 : Rôle des protéines de surface du VHB dans la réponse immunitaire contre l'infection (Jeulin *et al.*, 2013)

7.5 Carcinogenèse hépatique

Le CHC est le stade terminal de l'infection chronique par le VHB. Une corrélation existe entre la prévalence de l'Ag HBs et le développement de CHC. Le VHB est donc un virus oncogène.

Le développement du CHC lié à l'infection par le VHB est un processus multifactoriel. D'une part, la cytolysé hépatique va favoriser la prolifération et la régénération cellulaire. Le foie est un organe avec une grande capacité de régénération. Cependant celle-ci va entraîner la fibrose et va ainsi exposer au risque de cirrhose. Les mitoses répétées vont être à l'origine de l'émergence de cellules cancéreuses. On parle de mécanismes indirects, avec une composante immuno-dépendante, dans le développement du CHC lié au VHB.

D'autre part, lors de l'infection chronique, l'intégration de l'ADN du VHB dans le génome cellulaire est possible. Il en résulte une instabilité chromosomique et une dérégulation de l'activité de gènes cellulaires par cis-activation ou mutagenèse insertionnelle. De plus, la protéine HBx possède de nombreuses activités impliquées dans l'oncogenèse. Elle est capable d'interagir sur la transcription des gènes, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Elle peut inhiber la protéine p53 qui est connue pour avoir un rôle suppresseur de tumeur. Malgré toutes ses fonctions, la protéine HBx n'est pas considérée comme un oncogène mais est plutôt caractérisée comme un cofacteur de la carcinogenèse. Par ailleurs, il est décrit que les formes tronquées des protéines HBx et S peuvent jouer un rôle critique dans la carcinogénèse (Huang *et al.*, 2014). On parle ici de mécanismes directs, avec une composante non immuno-dépendante dans le développement du CHC.

L'association entre les mécanismes directs et indirects est à l'origine de la carcinogenèse lors de l'infection chronique par le VHB (Quetier and Kremsdorf, 2014).

8 Diagnostic

8.1 Marqueurs sérologiques

Nous disposons de plusieurs marqueurs sérologiques qui permettent de faire le diagnostic de l'infection par le VHB. En fonction du stade de la maladie nous retrouvons des profils sérologiques différents (figure18).

8.1.1 Ag HBs

L'Ag HBs est un marqueur de contagiosité, il se positivise deux à quatre semaines après le contage avant tout signe de cytolysé hépatique. C'est donc un marqueur précoce. La clairance de l'Ag HBs signe une évolution favorable de l'infection, alors que la persistance au delà de six mois signe une hépatite B chronique. Des kits commerciaux pour la détection de l'Ag HBs sont de deux types, on parle de test qualitatif ou de test quantitatif. Un test de confirmation ou de neutralisation est nécessaire devant tout Ag HBs détecté positif lors d'un premier examen dans le but de confirmer la spécificité de la réaction Ag/Ac. Malgré des tests très sensibles, la présence de faux négatifs reste possible en raison de mutations situées sur le gène S.

L'Ag HBs doit être recherché de manière systématique au cours du sixième mois de grossesse ou dans le cadre de la qualification biologique d'un don de produits dérivés du sang ou d'une qualification d'organes. Il est nécessaire de réaliser la recherche d'autres marqueurs complémentaires en cas de positivité de l'Ag HBs (Ag HBe et Ac anti-HBe, Ac anti-HBc).

8.1.2 Ac anti-HBs

Ce sont les anticorps neutralisants dirigés contre l'Ag HBs. Leur présence signe la guérison de l'infection ou une immunité post vaccination. Selon l'OMS, le seuil de protection est de 10 UI/L pour la population générale et de 100 UI/L pour le personnel de santé. Des sérologies avec Ag et Ac anti HBs peuvent coexister dans de très rares cas, comme lors d'une hépatite fulminante, lors de réactivation virale chez le sujet immunodéprimé, ou chez l'enfant né de mère infectée porteur d'un Ag HBs muté qui résiste à la vaccination.

Le taux d'Ac anti-HBs peut diminuer et passer en dessous du seuil de 10 UI/L en cas d'immunodépression. De faibles taux peuvent également être observés chez le mauvais répondant vaccinal.

8.1.3 Ag HBc

L'Ag HBc ne peut pas être détecté dans le sérum des patients infectés. Il est retrouvé dans les biopsies hépatiques par des techniques d'immuno-fluorescence. Sa place comme marqueur d'infection reste très limitée.

8.1.4 Ac anti-HBc totaux et Ig M

Les Ac anti-HBc totaux constituent le meilleur marqueur sérologique de contagion par le VHB. Ils apparaissent dès le deuxième mois de l'infection et sont détectés quelle que soit la symptomatologie ou l'évolution de la maladie. La présence d'IgM anti-HBc permet de faire le diagnostic d'une hépatite aiguë. Malgré tout, il est possible d'observer une détection de ces immunoglobulines lors d'un épisode de réactivation aiguë d'une hépatite B chronique.

Dans certains cas, seuls les Ac anti-HBc totaux sont retrouvés positifs, on parlera de Core isolé. Ce profil est observé dans trois cas : hépatite occulte avec un Ag HBs négatif mais une charge virale détectable, hépatite ancienne guérie avec disparition des Ac anti-HBs, ou réaction faussement positive.

8.1.5 Ag HBe

L'Ag HBe est considéré comme un marqueur de réPLICATION virale. La cinétique de cet antigène est proche de l'Ag HBs. La clairance de l'Ag HBe suivie de l'apparition de l'Ac anti-HBe précède la séroconversion de l'Ag HBs. Chez le mutant pré-Core, l'absence de détection de l'Ag HBe et la présence d'Ac anti-HBe ne sont pas en faveur d'une hépatite non réplicative. La réalisation d'une charge virale VHB permettra de faire la distinction entre une séroconversion des marqueurs HBe et un mutant pré-Core.

8.1.6 Ac anti-HBe

La présence d'Ac anti-HBe peut être associée à une réPLICATION faible ou élevée selon la présence d'un mutant pré-Core.

8.1.7 Ag HBcr

L'antigène Core related du VHB est un nouveau marqueur utilisé en pratique courante dans les pays asiatiques. Il est le reflet de l'ADNccc intra hépatique et peut être utilisé comme marqueur de réactivation précoce (Maasoumy *et al.*, 2015).

8.2 Détection et quantification de l'ADN viral

La recherche d'ADN viral est réalisée dans le sérum par des techniques de polymerase chain reaction (PCR) en temps réel. Ce marqueur est le reflet de la réPLICATION virale et permet de suivre la réponse aux traitements antiviraux. Il n'est pas utilisé dans un but diagnostic même s'il permet le dépistage précoce de l'infection. Il permet en outre de faire la distinction entre les porteurs sains et les porteurs chroniques asymptomatiques, c'est aussi un élément déterminant pour la sélection des patients qui vont être traités. Les seuils de sensibilité varient selon les techniques et les résultats sont exprimés selon un standard commun en unité internationale par litre (UI/L), ce qui permet de comparer les résultats et faciliter le suivi virologique. Ce marqueur est également utilisé dans la qualification biologique des organes.

8.3 Marqueurs hépatiques

L'atteinte hépatique est évaluée par la mesure des transaminases (aspartate aminotransférase ASAT et alanine aminotransférase ALAT) mais aussi par le dosage de l'albumine, de la bilirubine et du taux de prothrombine (TP).

Une biopsie hépatique est souvent recommandée et permet de définir le degré de nécro-inflammation hépatique et de fibrose, mais cette technique reste toute de même invasive. Les méthodes non invasives ont de plus en plus leur place dans l'évaluation de la fibrose hépatique, en utilisant des marqueurs sériques (Fibrotest®) ou par mesure d'élastographie (Fibroscan®) (Petit and Trepo, 2014).

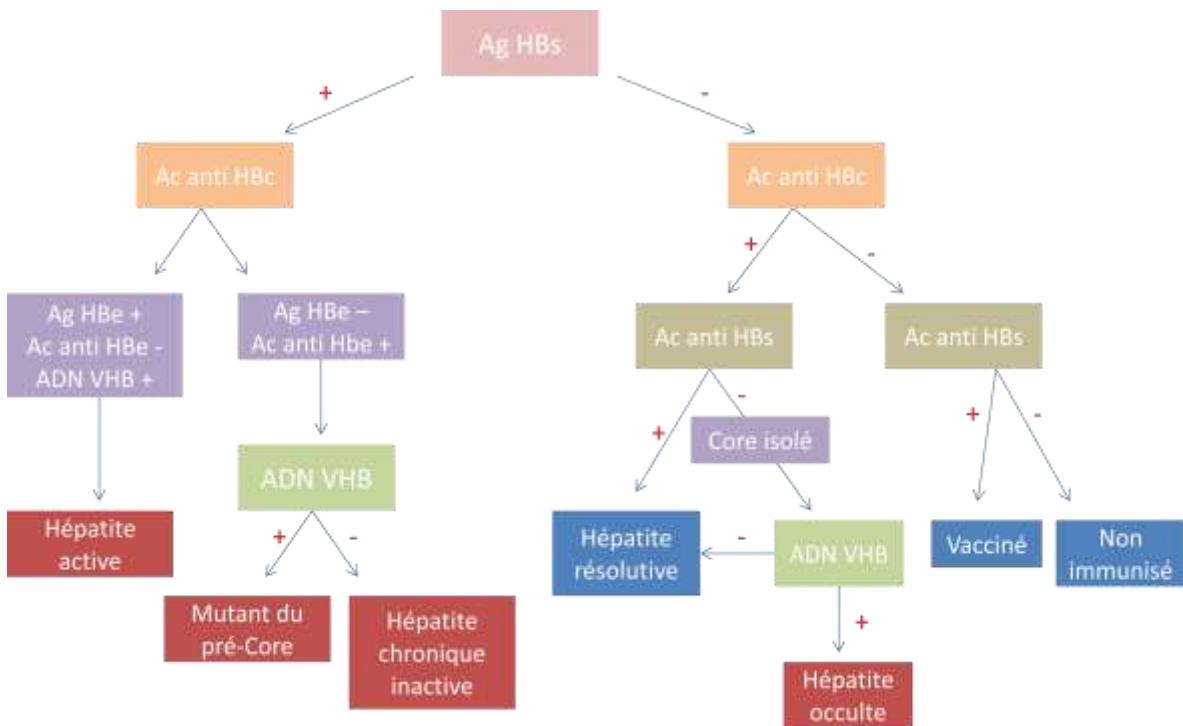


Figure 18 : Algorithme décisionnel du diagnostic des hépatite B (selon HAS, 2011)

8.4 Profil sérologique d'une hépatite B aiguë

Le diagnostic d'une hépatite B aiguë repose sur le dosage des transaminases ainsi que l'Ag HBs, l'Ag HBe et surtout les **Ac IgM anti-HBc**. La charge virale ne présente pas d'intérêt dans ce contexte.

L'évolution favorable est annoncée par la normalisation des transaminases, la disparition de l'Ag HBs et de l'Ag HBe et par l'apparition successive des Ac anti-HBe et anti-HBs (Petit and Trepo, 2014) (figure 19).

L'hépatite B aiguë est une maladie à déclaration obligatoire depuis 2003.

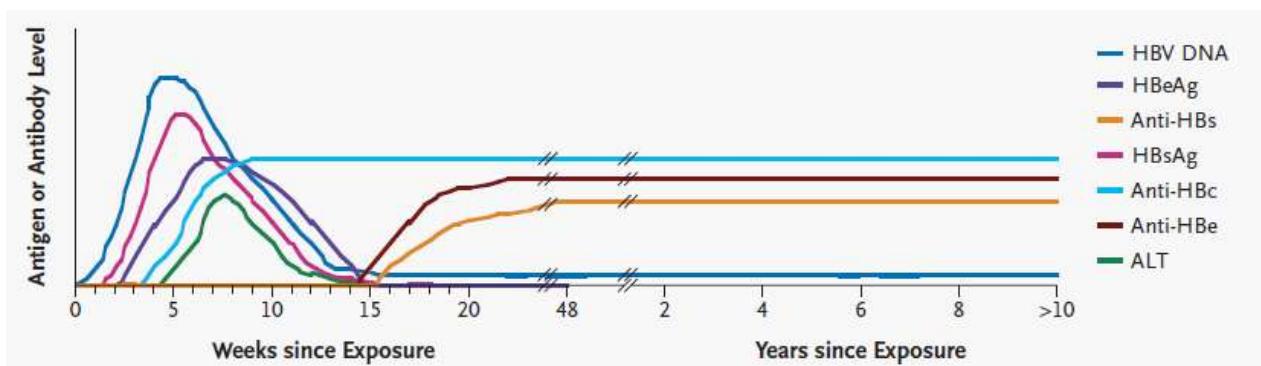


Figure 19 : Cinétique des marqueurs au cours d'une hépatite B aiguë (Ganem and Prince, 2004)

8.5 Profil sérologique d'une hépatite B chronique

Le diagnostic est posé sur la détection des Ac anti-HBc et sur la persistance de l'Ag HBs, confirmée à six mois (figure 20). La sérologie Ag HBe/anti-HBe permet de distinguer les différentes phases et différentes formes cliniques de l'infection chronique. Durant la phase d'immunotolérance, on retrouve un Ag HBe positif et des transaminases normales. Au contraire, dans la phase d'immunoélimination, l'Ag HBe est toujours positif mais la séroconversion anti-HBe est en cours, et les transaminases sont élevées. La phase de latence virale correspond à un portage inactif. Le dosage de la charge virale est également nécessaire pour évaluer le niveau de réPLICATION du virus lors d'un premier bilan d'une hépatite chronique. Les autres causes de maladies hépatiques chroniques sont recherchées comme les co-infections VIH, VHC, VHD ainsi que les co-morbidités (alcool, maladies auto immunes, maladies métaboliques) (Petit and Trepo, 2014).

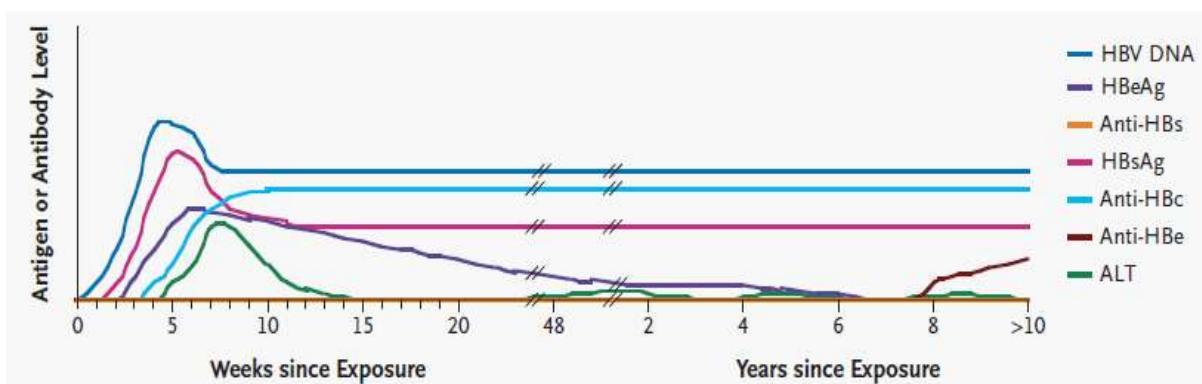


Figure 20 : Cinétique des marqueurs au cours d'une hépatite B chronique (Ganem and Prince, 2004)

9 Traitement et prise en charge

9.1 Objectifs du traitement

Les objectifs du traitement sont de limiter l'évolution de la maladie vers la fibrose, la cirrhose et le CHC, ce qui permet à long terme d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients. Les traitements actuels ne permettent pas d'éliminer le virus, en raison notamment de la persistance de l'ADNccc dans les hépatocytes et de la réponse immunitaire imparfaite, mais visent à supprimer la réPLICATION virale et à réduire la maladie hépatique (EASL, 2012).

Ainsi, l'évaluation de la réponse au traitement se fait selon trois critères :

- critère virologique : défini par un contrôle de la réPLICATION virale, avec une négativation de l'ADN du VHB, la disparition de l'Ag HBe, l'acquisition des Ac anti-HBe et enfin par la clairance de l'Ag HBs,

- critère biochimique : défini par la normalisation des transaminases,
- critère histologique : défini par la baisse du score nécrotico-inflammatoire sans aggravation de la fibrose.

L'objectif ultime, difficilement atteint, est d'obtenir une clairance de l'Ag HBs avec ou sans apparition d'Ac anti-HBs après arrêt du traitement.

Un objectif plus réaliste est de supprimer la réPLICATION virale et de normaliser les transaminases de manière efficace et durable après arrêt du traitement associé à la séroconversion de l'Ag HBe.

Enfin, l'objectif minimal est l'obtention d'une réponse virologique avec une charge virale indétectable maintenue sous traitement de longue durée quel que soit le statut de l'Ag HBe (EASL, 2012).

9.2 Indications du traitement

Les indications pour traiter les patients porteurs chroniques du VHB sont basées sur une combinaison de trois facteurs : la charge virale VHB, le taux de transaminases et la sévérité de la maladie hépatique. Le statut de l'Ag HBe n'est pas pris en compte dans les différentes indications.

Il existe cinq profils pouvant justifier une indication de traitement en fonction de la combinaison des facteurs :

- Patients en phase d'immunotolérance : patients de plus de 30 ans avec un historique familial de cirrhose ou de CHC et uniquement si la biopsie est révélatrice de maladie hépatique.
- Patients avec hépatite chronique active : charge virale supérieure à 2 000 UI/mL, un taux de transaminases supérieur à la normale, et au moins une fibrose modérée et une nécro-inflammation du foie évaluées par biopsie ou méthode non invasive.
- Patients avec hépatite chronique active : charge virale supérieure à 20 000 UI/mL et transaminases supérieures à deux fois la normale, même sans biopsie hépatique.
- Patients avec cirrhose compensée et charge virale détectable, le taux de transaminases n'est pas pris en compte.
- Patients avec cirrhose décompensée et charge virale détectable.

Les patients porteurs chroniques inactifs ayant une charge virale inférieure à 20 000 UI/mL et des transaminases normales ne requièrent pas de biopsie ni de traitements. Ils sont suivis de façon rapprochée au cours des trois premières années (EASL, 2012).

9.3 Les molécules utilisées contre le VHB

Deux types de traitements peuvent être utilisés contre le VHB : les immunomodulateurs et les analogues nucléos(t)idiques. Leur utilisation va permettre de supprimer la réplication virale et de stimuler la réponse immunitaire spécifique du VHB (figure 11, 21) (tableau 1).

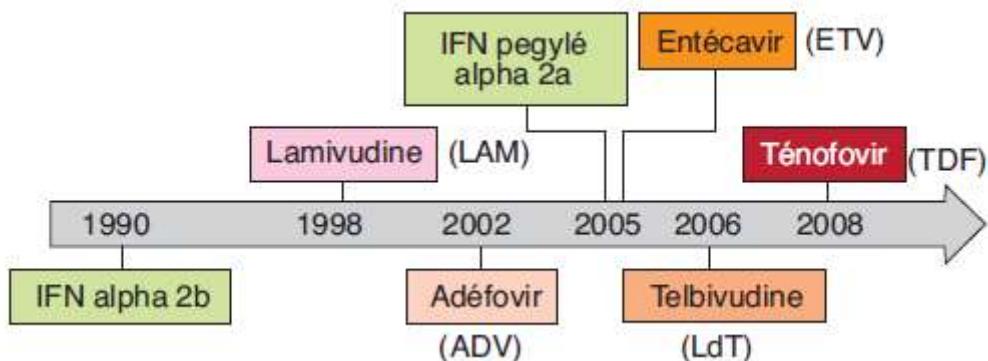


Figure 21 : Chronologie d'apparition des traitements anti VHB (Petit and Trepo, 2014)

9.3.1 Les immunomodulateurs

9.3.1.1 Interféron alpha (IFN α)

Deux spécialités peuvent être utilisées : Interféron α -2a (Roferon A[®]) et Interféron α -2b (Intron A[®])

L'IFN α est une cytokine aux propriétés antivirales et immunomodulatrices, synthétisée par l'ensemble des cellules de l'organisme et notamment les lymphocytes T. Lors de sa production, induite par la présence du génome du VHB, l'IFN se fixe sur un récepteur spécifique de la cellule et induit, via un facteur de transcription, l'expression de protéines actives sur le virus. Ces protéines vont bloquer la transcription et la traduction des ARNm d'origines virales. D'autre part, l'activité immunomodulatrice de l'IFN se traduit par une augmentation de l'expression des molécules de CMH de classe I à la surface des hépatocytes. Ainsi, les peptides viraux sont plus facilement exposés et reconnus par les LT cytotoxiques (LTc). L'IFN peut également favoriser la maturation des LTc et l'activation des cellules immunitaires (Takkenberg *et al.*, 2010). De nombreux effets indésirables existent (fièvre, syndrome pseudo grippal et dépression) et peuvent être responsables d'une mauvaise tolérance et d'un arrêt de traitement.

9.3.1.2 Interféron pégylé (Pegasys®)

L'IFN α pégylé est un IFN α couplé au polyéthylène glycol (PEG), ce qui a l'avantage de diminuer les effets secondaires et d'augmenter la demi-vie et la biodisponibilité de la molécule. Une injection par semaine est nécessaire au lieu de trois avec la forme classique.

La forme retard pégylée a également une efficacité supérieure. La durée du traitement par IFN est limitée à 48 semaines, mais une réponse prolongée après l'arrêt du traitement est possible. Le taux de séroconversion Ag HBe est élevé à court terme (de l'ordre de 30%) et la séroconversion de l'Ag HBs est obtenue dans 3 à 7% des cas (EASL, 2012).

La réponse virologique est définie par une charge virale VHB inférieure à 2 000 UI/mL après six mois de traitement et qui persiste 12 mois après l'arrêt.

Le principal avantage de l'IFN est qu'il n'induit pas de résistance vis à vis du VHB.

9.3.2 Les analogues nucléos(t)idiques

Ces molécules vont inhiber la transcriptase inverse du VHB. Ce sont des prodrogues qui ont besoin d'une double ou triple phosphorylation par des kinases cellulaires pour être actives. Ces analogues vont être incorporés à la place des nucléotides habituels par la transcriptase inverse, ce qui va entraîner un arrêt de l'elongation de la chaîne d'ADN. En effet, les analogues sont incapables de former de liaisons phosphodiesters avec le nucléotide suivant.

Ils ont une bonne efficacité et rapidité d'action. La puissance de l'effet antiviral permet d'avoir une charge virale indétectable rapidement. Ils ont par ailleurs l'avantage d'être bien tolérés et administrés par voie orale. Malheureusement, ils ne font que suspendre la réPLICATION virale. Ainsi tout arrêt thérapeutique ou défaut d'observance peut entraîner un rebond virologique. La durée du traitement par analogue est donc indéfinie et doit être maintenue à long terme.

Le risque d'émergence de souches résistantes à l'analogue utilisé s'accroît irrémédiablement après l'introduction de l'antiviral. Le risque apparaît plus ou moins rapidement selon la molécule et sa barrière génétique.

Plusieurs réponses virologiques sont attendues suite à l'utilisation des analogues :

- Non réponse primaire : définie par la non décroissance d'au moins 1 log d'UI/mL de charge virale VHB après trois mois de traitement.
- Réponse virologique : définie par une charge virale indétectable à la semaine 48 (S48) après l'introduction du traitement.
- Réponse virologique partielle : définie par la décroissance d'au moins 1 log d'UI/mL, mais d'une charge virale détectable à S48.

- Rebond virologique : définit par une augmentation de 1 log d'UI/mL, évocateur d'une résistance aux traitements.

Six analogues nucléos(t)idiques sont actuellement disponibles pour traiter l'hépatite B chronique.

9.3.2.1 Lamivudine (Zeffix®)

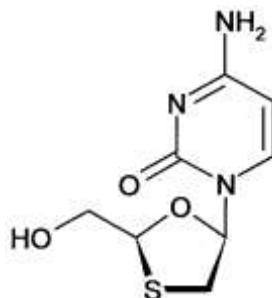
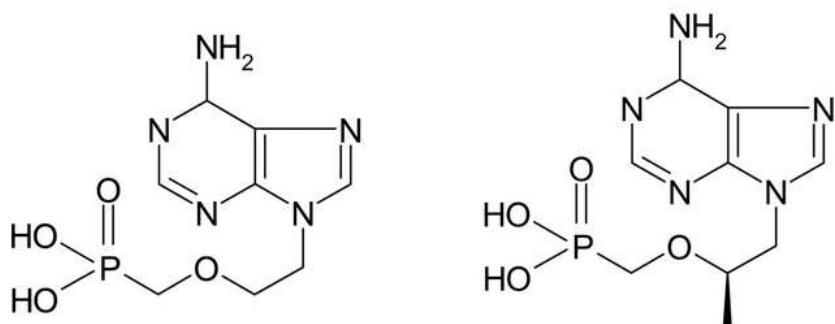


Figure 22 : Structure de la lamivudine

La lamivudine ou 3TC est un analogue nucléosidique de la cytidine efficace sur le VIH et le VHB (figure 22). C'est une molécule avec un excellent profil de tolérance. Malheureusement, le risque d'émergence de résistance est très fréquent et s'accroît rapidement lors d'une utilisation prolongée pour atteindre 70% après cinq ans. Il faut donc privilégier l'utilisation de cette molécule en 2^{ème} intention. Chez les porteurs de l'Ag HBe, la séroconversion à 48 semaines de traitement est de 17% et la réponse virologique est obtenue dans 40% des cas. Enfin, la perte de l'Ag HBs est très rare (EASL, 2012).

9.3.2.2 Adéfovir dipivoxyl (Hepsera®)



Adefovir

Tenofovir

Figure 23 : Structure de l'Adéfovir et du Ténofovir

C'est un analogue nucléotidique de l'adénosine monophosphate qui va agir comme inhibiteur compétitif au sein de la polymérase virale (figure 23). L'adéfoviro dipivoxy est une prodrogue de l'adéfoviro (ADV).

Il n'y a pas de résistance croisée avec le 3TC, cependant le risque d'émergence de résistance est élevé (29% après 5 ans de traitement). L'efficacité de l'adéfoviro est proche de la lamivudine puisqu'on retrouve des taux de réponse et de séroconversions similaires. L'inconvénient de cette molécule est l'induction d'une insuffisance rénale dans 20% des cas (EASL, 2012).

9.3.2.3 Entécavir (Baraclude®)

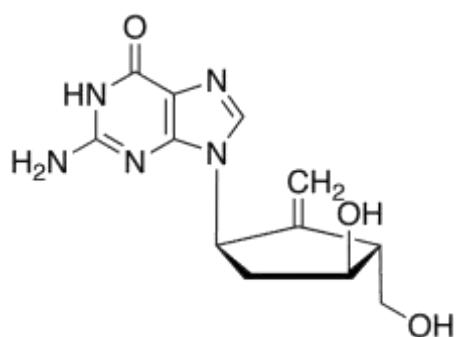


Figure 24 : Structure de l'entécavir

L'entécavir (ETV) est un analogue nucléosidique de la guanosine (D-cyclopentane), efficace sur le VHB et avec un effet antiviral partiel sur le VIH (figure 24). Il a l'avantage de présenter une efficacité antivirale, une réponse histologique ainsi qu'un taux de séroconversion de l'Ag HBe supérieur à ce qui est observé avec le 3TC ou l'ADV.

ETV possède une barrière génétique élevée, en effet, le mécanisme de résistance à cet antiviral est complexe car il dépend de plusieurs mutations. On retrouve moins de 1% de résistance en 4 ans. Cependant, chez les patients déjà résistants au 3TC, la survenue d'une résistance complète à l'entécavir s'accélère par addition de mutations de la polymérase (EASL, 2012).

9.3.2.4 Telbivudine (Sebivo®)

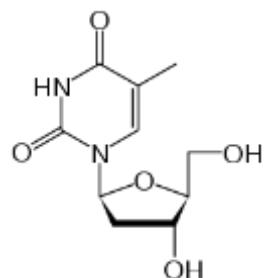


Figure 25 : Structure de la telbivudine

La telbivudine (LdT) est un analogue nucléosidique de la thymidine actif seulement sur le VHB (figure 25). L'efficacité antivirale est supérieure au 3TC mais reste inférieure à l'ETV ou au ténofovir. De plus, des résistances croisées avec le 3TC sont possibles, et l'émergence rapide de résistances peut être observée. La telbivudine ne constitue pas une molécule de choix et sa place reste très limitée dans le traitement de l'hépatite B (EASL, 2012).

9.3.2.5 Ténofovir (Viread®)

Le ténofovir (TDF) est un analogue nucléotidique de l'adénosine monophosphate actif aussi bien sur le VIH que le VHB. Il est donc un candidat idéal pour le traitement de la co-infection VIH/VHB. La différence de structure entre TDF et ADV est l'ajout d'un groupement méthyl en position 11 sur le TDF (figure 23) (van Hemert *et al.*, 2014).

Le TDF présente une barrière génétique élevée : aucune résistance n'est décrite à ce jour. Il permet le contrôle de la réPLICATION dans plus de 80% des cas. C'est probablement la molécule la plus efficace dans le traitement de l'hépatite B. Chez les porteurs de l'Ag HBe, la séroconversion est observée dans 21% des cas et la clairance de l'Ag HBs est obtenue dans 3% des cas après un an de traitement et dans 14% après cinq ans (Buti *et al.*, 2015). Un cas de séroconversion de l'Ag HBs a été observée chez les patients Ag HBe - (Buti *et al.*, 2015). L'inconvénient du TDF est l'apparition dans de rares cas d'effets secondaires d'origine rénale.

9.3.2.6 Emtricitabine

L'emtricitabine (FTC) est un analogue nucléosidique de la désoxycytidine proche de la lamivudine. Il s'agit d'un dérivé fluoré du 3TC, actif sur le VIH et le VHB. Son efficacité et le risque d'émergence de résistance sont similaires au 3TC. Cette molécule est couramment utilisée chez le patient co-infecté en combinaison avec le ténofovir dans la spécialité Truvada®.

9.3.3 Nouvelles approches thérapeutiques

Nous avons vu, malgré l'utilisation des traitements actuels, que l'infection chronique par le VHB n'est pas complètement guérissable, notamment en raison de la persistance de l'ADNccc et de séquences intégrées dans le génome cellulaire. Il est donc nécessaire d'identifier des cibles potentielles afin de développer des nouvelles drogues pouvant être associées à celles déjà utilisées. Les nouvelles cibles thérapeutiques actuellement à l'étude visent l'entrée du virus, l'ADNccc, la formation de la capsid et la réponse du système immunitaire (Petit and Trepo, 2014).

L'entrée du virus est une étape cruciale dans la réPLICATION du virus. Depuis la découverte récente du hNTCP et du rôle de la région PréS1 dans sa reconnaissance, de nombreux lipopeptides analogues de

la protéine L ont été développés. Parmi ceux-ci, on peut citer le Myrcludex B, qui est le premier inhibiteur d'entrée du virus du VHB créé. Le Myrcludex B est un lipopeptide myristoïlé en position 2 et comportant 48 AA dérivés de la région PréS1 (figure 26). Des études ont montré son intérêt dans l'inhibition de la propagation du VHB *in vivo*, mais aussi dans la réduction du pool d'ADNccc dans les hépatocytes infectés (Volz *et al.*, 2013).

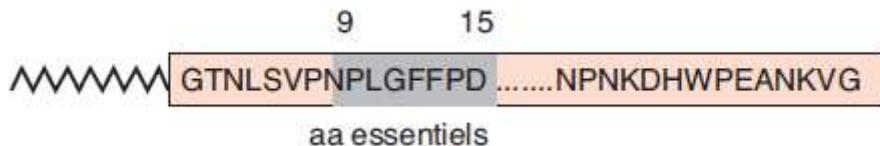


Figure 26 : Lipopeptide analogue de la région PréS1 exemple du Myrcludex B (Petit and Trepo, 2014)

Une autre stratégie serait de cibler l'ADNccc et notamment la régulation épigénétique de l'activité transcriptionnelle. Toutefois, aucune drogue n'existe encore.

La formation de la capsid est également une source potentielle pour la création d'une approche thérapeutique. Des dérivés de phénylpropenamide ont été développés et ont montré une capacité d'inhibition de la réPLICATION virale. Cependant, ces molécules restent toxiques (Petit and Trepo, 2014).

Enfin, il est possible d'envisager de stimuler la réponse immunitaire spécifique du VHB, qui est défaillante lors de l'infection chronique, par des approches vaccinales thérapeutiques. On note par exemple l'utilisation de vecteurs viraux dérivés d'Adénovirus codant plusieurs Ag du VHB. Ces stratégies sont encore au stade d'essai et en attente de résultats (Michel, 2014).

Tableau 1: Principaux avantages et inconvénients des molécules utilisées dans le traitement de l'hépatite B chronique (EASL, 2012).

	(PEG-)IFN	Analogues nucléos(t)idiques
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> Durée définie 48 semaines Absence de résistance Haut niveau de séroconversion HBe et HBs 	<ul style="list-style-type: none"> Bonne efficacité antivirale Bonne tolérance Administration orale
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> Efficacité antivirale modérée Mauvaise tolérance Administré par injection sous cutanée 	<ul style="list-style-type: none"> Durée indéfinie Risque d'émergence de résistance

9.4 Traitements et impacts sur les objectifs thérapeutiques

Deux stratégies thérapeutiques différentes sont utilisées pour la prise en charge de l'hépatite B chronique : un traitement à durée limitée de 48 semaines à base de PEG-IFN α ou un traitement au long cours à base d'analogues nucléos(t)idiques. Dans le cas d'utilisation d'analogues, l'ETV ou le TDF, en tant que molécules à haute barrière génétique, sont à utiliser en première ligne pour éviter l'apparition de résistances (EASL, 2012).

Des facteurs prédictifs de réponses aux traitements anti-VHB existent et peuvent être utilisés pour guider l'initiation d'un traitement et le choix de le continuer ou non. Il est préférable d'utiliser l'IFN en cas de CV faible, de présence de l'Ag HBe, d'un taux de transaminases élevées et /ou d'une infection par un virus de génotype A ou B. Chez ces patients, son utilisation est prédictive d'une meilleure réponse.

Au contraire, il serait préférable d'utiliser les analogues nucléos(t)idiques lorsque la CV est élevée avec une cytolysse modérée, dans le but d'inhiber rapidement la réPLICATION virale. Il est utile de suivre la décroissance du niveau de l'Ag HBe et l'Ag HBs au cours du traitement qui peut être prédictive d'une séroconversion et d'une clairance de l'Ag HBs (Hosaka *et al.*, 2013).

Chez les patients Ag HBe +, le PEG-IFN α permet une séroconversion anti-HBe dans 30% des cas, alors que sous analogues nucléos(t)idiques, ce taux atteint 20%. La clairance de l'Ag HBs est obtenue dans 3 à 7% des cas sous IFN α et atteint 2% sous ETV et 3% sous TDF au bout d'un an de traitement. Ce taux peut encore augmenter après arrêt du traitement chez les patients ayant une réponse virologique soutenue sous IFN α , mais aussi au cours du temps avec l'utilisation des analogues de façon continue (EASL, 2012).

Chez les patients Ag HBe -, le taux de clairance de l'Ag HBs est inférieur à celui des patients Ag HBe +, quelle que soit la molécule utilisée. Aucune clairance de l'Ag HBs n'est d'ailleurs observée après 1 an de traitement avec l'utilisation des analogues, alors que la CV est indétectable dans 90% des cas avec l'ETV et le TDF (EASL, 2012). Cela signifie que la réponse virologique n'est pas obligatoirement synonyme de la perte de l'Ag HBs, mais elle est nécessaire pour en atteindre l'objectif (Hosaka *et al.*, 2013).

D'autre part, les patients ayant un taux de transaminases (surtout ALAT) élevé, auront un taux de clairance de l'Ag HBs plus fort, quel que soit le traitement utilisé. En effet, d'après une estimation, la perte de l'Ag HBs apparaîtrait au bout de 19,5 ans en cas de porteurs chroniques avec Ag HBe + et transaminases élevées. Le temps serait de 36,4 ans en cas de transaminases normales et de 38,9 ans en cas d'Ag HBe - (Zoutendijk *et al.*, 2011). Rappelons que le taux de transaminases est corrélé à l'activité de la réponse immunitaire spécifique et notamment des LTc qui lysent les hépatocytes infectés.

La clairance de l'Ag HBs dépend donc de plusieurs facteurs, comme le maintien d'une CV faible voire indétectable obtenue sous traitement, mais aussi de la réponse immunitaire spécifique de l'hôte.

9.5 Résistances aux analogues nucléos(t)idiques

Au cours de la réPLICATION, le VHB est soumis à la survenue de nombreuses mutations spontanées, causées par la transcriptase inverse qui est dépourvue d'activité correctrice. Nous avons vu, dans le chapitre variabilité du VHB, que la totalité des nucléotides du génome pouvait être substituée chaque jour. Ainsi, l'accumulation de ces mutations va induire la formation de "quasi-espèces" chez le porteur chronique du VHB. Ces quasi-espèces vont évoluer en fonction de la réponse immunitaire de l'hôte, mais aussi en fonction de la pression de sélection induite par les traitements. Rappelons que toutes les mutations ne vont pas conférer un avantage sélectif au VHB. Seule l'espèce la mieux adaptée à l'hôte et son environnement perdure.

L'utilisation des analogues nucléos(t)idiques au long cours en monothérapie va favoriser l'émergence de mutations qui auront un impact non négligeable sur le fitness viral. Ces mutations touchent les domaines fonctionnels (B, C, D, E) de la polymérase (figure 27). La mise en évidence de ces mutations s'est faite grâce au développement du génotypage du gène codant pour la transcriptase inverse. Toutes les mutations n'ont pas le même impact : certaines induisent seules la résistance, d'autres sont dites compensatrices, enfin, elles devront dans certains cas être associées pour conférer une résistance (voir tableau 2).

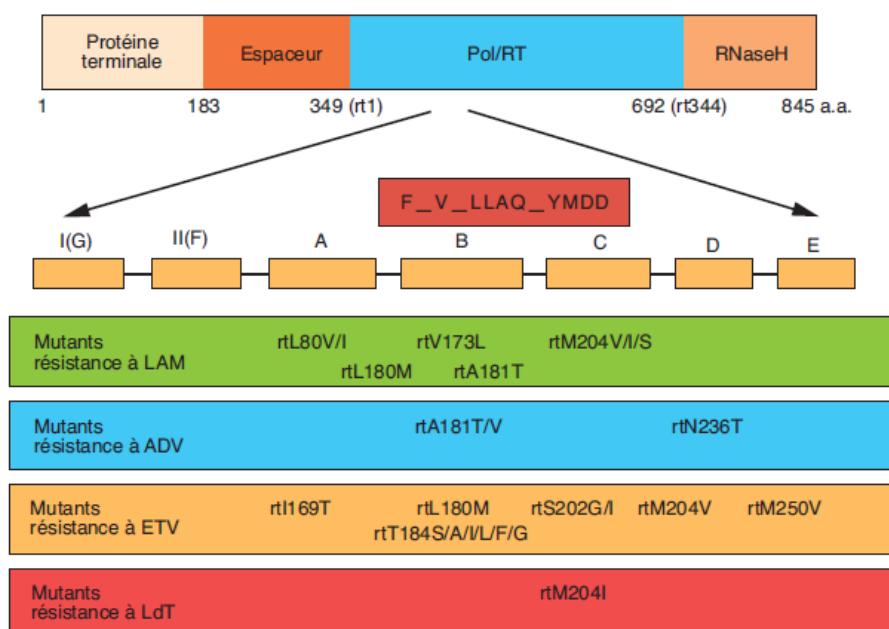


Figure 27 : Mutations de résistance pour le 3TC (LAM), ADV, ETV, et LdT localisées dans le gène de la polymérase du VHB (Petit and Trepo, 2014).

9.5.1 Résistance à la Lamivudine

Les mutants de résistance au 3TC se situent en position 204 de la polymérase au sein du domaine C du site actif YMDD. L'apparition de la mutation rtM204V/I/S va induire d'emblée une résistance de haut niveau au 3TC. Cependant, elle entraîne une diminution de l'activité transcriptase inverse et de la capacité de réPLICATION du virus muté. D'autres mutations dites compensatrices sont souvent associées, comme la rtL180M ou la rtV173L et permettent de rétablir le fitness du virus. L'émergence de résistances apparaît très rapidement avec l'utilisation du 3TC, avec une prévalence de 24% après un an de traitement et 70% à cinq ans (figure 28), (Petit and Trepo, 2014).

9.5.2 Résistance à l'Adéfovir

Les mutations induites par l'utilisation de l'ADV se situent dans une autre région de la Pol : dans les domaines D et B. Il s'agit des mutations rtN236T (domaine D) et/ou rtA181T/V (domaine B). La prévalence de résistance est plus faible qu'avec le 3TC, et l'émergence de mutants est plus tardive (3% après deux ans de traitement, et 29% après cinq ans). Un avantage de l'ADV est qu'il ne présente pas de résistance croisée avec le 3TC (Kay and Zoulim, 2007).

9.5.3 Résistance à la Telbivudine

Cette molécule présente une résistance croisée avec le 3TC : la mutation rtM204V/I. L'apparition de cette mutation est rapide et la prévalence de résistance au LdT est élevée : de 4% en un an à 17% en deux ans (Petit and Trepo, 2014).

9.5.4 Résistance à l'Entécavir

C'est une molécule très puissante avec une barrière génétique élevée. En effet, la prévalence de la résistance est de 1% après quatre ans. Malgré tout, en cas de résistance au 3TC, l'émergence de résistance à l'ETV est beaucoup plus rapide (5,8% après un an chez les patients déjà traités par 3TC) (Locarnini and Yuen, 2010). L'existence d'une résistance au 3TC constitue donc un prérequis à l'émergence de résistance à l'ETV. Cette résistance apparaît suite à une combinaison de plusieurs mutations : la rtI169T, rtM250V ou rtT184G et rtS202I, associées donc à la rtL180M et rtM204V (figure 27), (tableau 2), (Kay and Zoulim, 2007).

9.5.5 Résistance à l'Emtricitabine

C'est une molécule proche du 3TC qui agit sur la même cible thérapeutique. Elle présente donc le même profil de résistance (rtM204V/I/S + rtL180M + rtV173L) et l'émergence de mutants est rapide : proche de 16% après un an de traitement.

9.5.6 Résistance au Ténofovir

C'est la molécule la plus efficace car elle présente une barrière génétique très élevée. Aucune mutation de résistance au TDF n'a été décrite à ce jour. Néanmoins, une réduction de la sensibilité peut être observée suite à une résistance à l'ADV et donc de la présence des mutations rtA181T/V et rtN236T (Locarnini and Yuen, 2010).

Tableau 2 : Profils des mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques (EASL, 2012)

HBV variants	Level of susceptibility				
	Lamivudine	Telbivudine	Entecavir	Adefovir	Tenofovir
Wild-type	S	S	S	S	S
M204V	R	S	I	I	S
M204I	R	R	I	I	S
L180M + M204V	R	R	I	I	S
A181T/V	I	S	S	R	S
N236T	S	S	S	R	I
L180M + M204V/I ± I169T ± V173L ± M250V	R	R	R	S	S
L180M + M204V/I ± T184G ± S202I/G	R	R	R	S	S

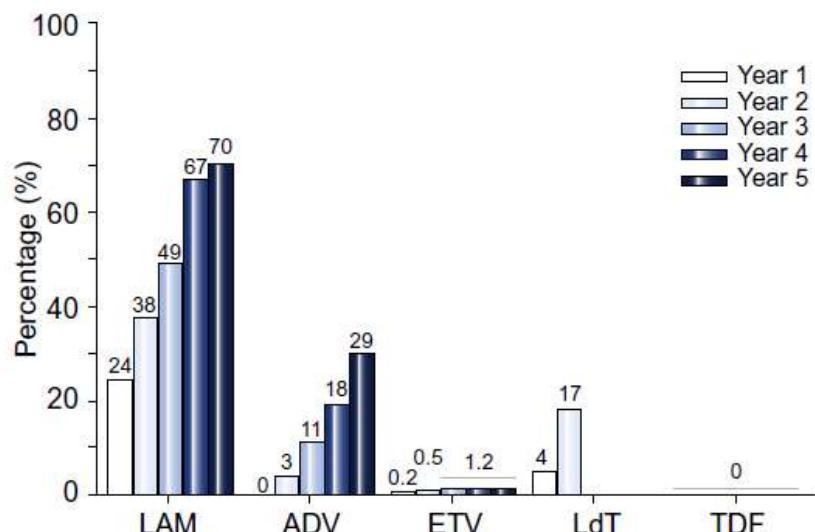


Figure 28 : Fréquences d'émergence de mutations aux analogues nucléos(t)idiques en fonction de la durée de traitement (EASL, 2012).

Les cadres de lecture des gènes du VHB se chevauchant, une mutation qui apparaît sur la polymérase peut avoir un impact sur les gènes codant les protéines d'enveloppe (figure 29). Ainsi, les mutations retrouvées sur le gène S peuvent affecter la conformation de l'Ag HBs et induire un échappement immunitaire aux Ac anti-HBs. En cas de résistance au 3TC, les mutations I195M, W196S/L et E164D sont retrouvées sur le gène S, et vont diminuer l'affinité des anticorps pour l'Ag HBs (Torresi *et al.*, 2002).

Ces mutants peuvent être transmis à un sujet naïf de traitement par analogues, si des mutations compensatoires viennent stabiliser le virus (Locarnini and Yuen, 2010). Ainsi, avant toute initiation de traitement, la question du recours au génotypage à la recherche de mutations de résistance peut être discutée. Par ailleurs, il est intéressant de préciser que si une mutation de résistance émerge durant un traitement et que le traitement est arrêté, c'est la souche sauvage qui deviendra rapidement dominante et remplacera le mutant, sans que le traitement puisse à nouveau être utilisé.

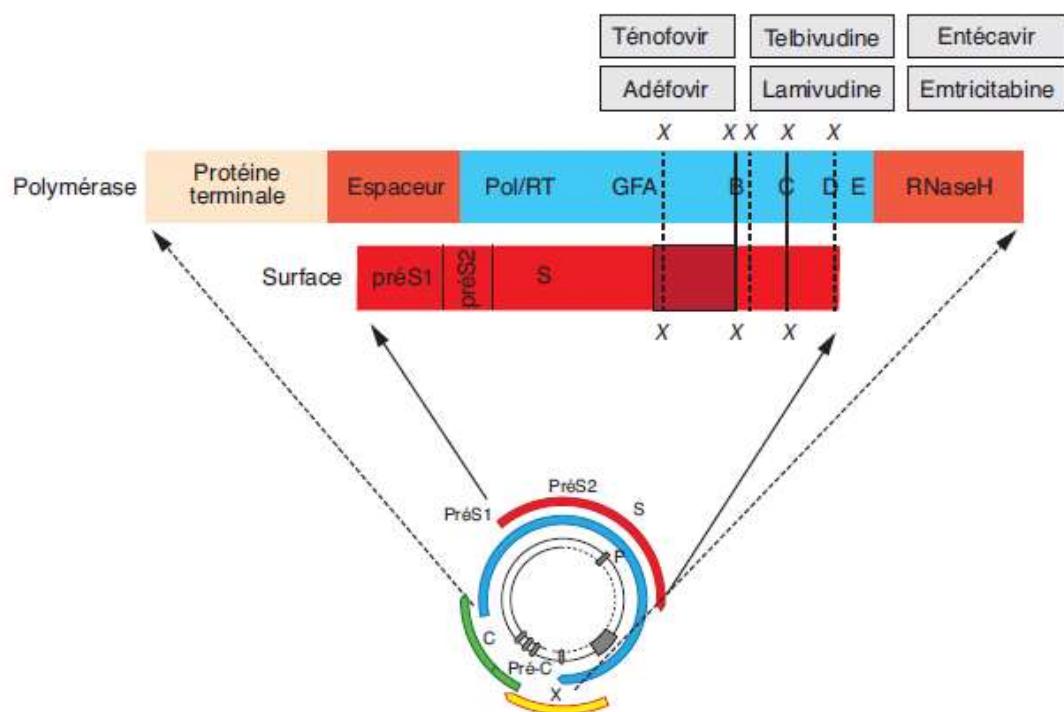


Figure 29 : Impact des mutations de la polymérase sous analogues nucléos(t)idiques sur le gène S (Locarnini, 2008)

10 Prévention

Plusieurs types de préventions existent pour éviter la transmission de l'hépatite B. De part son mode de transmission, un des moyens de prévention repose sur des mesures générales qui visent à prévenir les maladies sexuellement transmissibles et les expositions au sang. La vaccination ainsi que l'immunothérapie sont des moyens très efficaces pour limiter la transmission.

10.1 La vaccination

Le vaccin contre l'hépatite B est le premier vaccin recombinant issu du génie génétique, il a été commercialisé en 1986. L'idée est d'injecter des extraits d'Ag HBs produits par des levures ou des cellules ovariennes du hamster chinois (cellules CHO) qui vont exprimer les gènes codant les protéines d'enveloppe S ou PréS. Il existe des vaccins monovalents, comme le Genhevac B Pasteur® contenant les protéines S et M et Engerix B® ainsi qu'HBVaxPRO® contenant la protéine S. Twinrix® est un vaccin bivalent qui protège également contre l'hépatite A. Enfin, il existe un vaccin hexavalent Infanrix Hexa® qui est un vaccin combiné : diphtérie, téтанos, poliomyélite, coqueluche acellulaire, *haemophilus influenzae* B et hépatite B. Ils sont tous adsorbés sur hydroxyde d'aluminium (INPES, 2012).

Les vaccins sont hautement immunogènes. On observe un taux de réponse dans 95% des cas avec une apparition d'anticorps protecteurs : les Ac anti-HBs. On considère un taux d'anticorps protecteur à partir de 10 mUI/mL. Ces anticorps sont également protecteurs vis à vis du virus de l'hépatite D, qui peut compliquer une hépatite B chronique par surinfection ou co-infection. Les facteurs influençant une mauvaise réponse sont : l'âge (après 25 ans), le sexe (homme), l'obésité, le tabagisme et le traitement par hémodialyse (INPES, 2012). L'innocuité de ce vaccin est remarquable, malgré sa mise en cause en France, sans fondement scientifique, dans la survenue d'affections démyélinisantes centrales. Aucune étude n'a montré clairement à l'heure actuelle le lien entre la vaccination et la sclérose en plaque.

En France, la vaccination est obligatoire pour les professionnels de santé et elle est recommandée chez les personnes à risque comme : les détenus, les toxicomanes, les greffés, les dialysés et l'entourage d'un porteur chronique. Le dépistage de l'Ag HBs est obligatoire chez la femme enceinte de six mois. Le but est de prévenir la transmission maternofoetale par la vaccination et l'immunothérapie à tout nouveau-né dont la mère est porteuse de l'Ag HBs.

L'utilisation en masse du vaccin, depuis de nombreuses années dans de nombreux pays, a permis de diminuer de façon très significative le taux de portage de l'Ag HBs chez les enfants de moins de dix ans et de diminuer l'incidence du CHC dans les pays asiatiques notamment (Locarnini and Yuen, 2010).

Mais cette utilisation s'est accompagnée de l'émergence de souches portant des mutations sur le gène S qui entraînent un échappement à la vaccination. Ainsi, chez la mère infectée, les souches avec de telles mutations vont émerger suite à la vaccination néonatale chez l'enfant et vont favoriser son infection. De plus, l'utilisation combinée d'immunoglobulines à la naissance va accélérer la sélection des mutants d'échappement vaccinal (Locarnini and Yuen, 2010). De nombreuses substitutions au niveau et autour du déterminant "a" apparaissent chez ces mutants et sont décrites comme pouvant conférer une résistance à la vaccination. On peut citer les mutations G145R, A128V, Q129H/R, G130N, M133L/T, Y100C, Q101H (Chong-Jin *et al.*, 1999) (Kay and Zoulim, 2007), ainsi que les mutations T125M, I126T, P127T, T131N, F134Y retrouvées dans une étude chez des enfants nés de mères porteuses de l'Ag HBs malgré une immunisation à la naissance (Velu *et al.*, 2008).

10.2 L'immunothérapie

Les immunoglobulines spécifiques anti-HBs proviennent de donneurs immunisés contre le VHB. Elles sont utilisées pour l'immunisation passive après exposition au virus, en complément de la vaccination, notamment en cas de contamination accidentelle pour un sujet non vacciné et chez le nouveau né de mère porteuse de l'Ag HBs. Ces immunoglobulines ne confèrent qu'une protection transitoire et doivent être relayées par les anticorps induits par la vaccination.

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

1 Historique

En juin 1981, le Syndrome d'Immunodéficience Acquise, ou SIDA, est décrit pour la première fois chez des jeunes homosexuels américains (Gottlieb *et al.*, 1981). En 1983, une équipe de recherche française codirigée par les professeurs Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier va identifier un nouveau virus à l'origine de ce syndrome : le virus de l'immunodéficience acquise ou VIH-1 (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Cette découverte a été couronnée par l'attribution du Prix Nobel de médecine en 2008. En 1986, le VIH-2 est isolé chez deux patients portugais ayant séjournés en Afrique de l'ouest (Clavel *et al.*, 1986). De nombreuses molécules efficaces contre le virus ont depuis vu le jour comme la zidovudine en 1985 et l'apparition des antiprotéases en 1995. La création de vaccins préventifs anti-VIH est l'objectif attendu dans les prochaines années.

2 Structure et organisation génomique du VIH

Le VIH appartient à la famille des *Retroviridae*. Cette famille se caractérise par son génome à ARN, la présence d'une transcriptase inverse et son intégration au sein du génome cellulaire sous forme d'ADN proviral. On distingue trois sous familles :

- les oncovirus : associés à des tumeurs et des leucémies,
- les lentivirus : associés à des maladies à évolution lente par destruction des cellules infectées,
- les spumavirus, associés à aucune pathologie connue.

Le VIH est un lentivirus. Il existe deux sous types : le VIH-1, à l'origine de la pandémie actuelle et le VIH-2. L'homologie entre ces deux virus au niveau génomique est de l'ordre de 50% (Charpentier *et al.*, 2011).

2.1 Structure du VIH

Le VIH est un virus enveloppé de 120 nm de diamètre à acide ribonucléique (ARN) comportant environ 9600 paires de bases. La particule virale est composée de plusieurs éléments (figure 30) :

- L'enveloppe : formée d'une double couche lipidique d'origine cellulaire et de deux glycoprotéines (gp) virales. Les protéines sont désignées par leur poids moléculaire. La glycoprotéine de surface, gp120, présente un poids moléculaire de 120 kDa et la glycoprotéine

transmembranaire, gp41, présente un poids moléculaire de 41 kDa. Une matrice protéique, contenant les protéines p17 est présente sur la face interne de l'enveloppe.

- La capsidé, en forme de trapèze, et la nucléocapsidé : composées respectivement des protéines p24 et p7. Elles renferment le génome viral ainsi que les trois enzymes nécessaires à la réPLICATION.
- Le génome viral : composé de deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive et protégé par la nucléocapsidé.
- La transcriptase inverse ou RT : enzyme (p51/66) qui permet la transcription de l'ARN viral en ADN double brin et qui ne possède pas d'activité correctrice.
- L'intégrase : enzyme (p32) qui permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire.
- Les protéases : enzymes (p11) qui permettent la maturation des protéines.

Les poids moléculaires des protéines et enzymes sont différents entre le VIH-1 et VIH-2. Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-2 sont les gp105 et gp36.

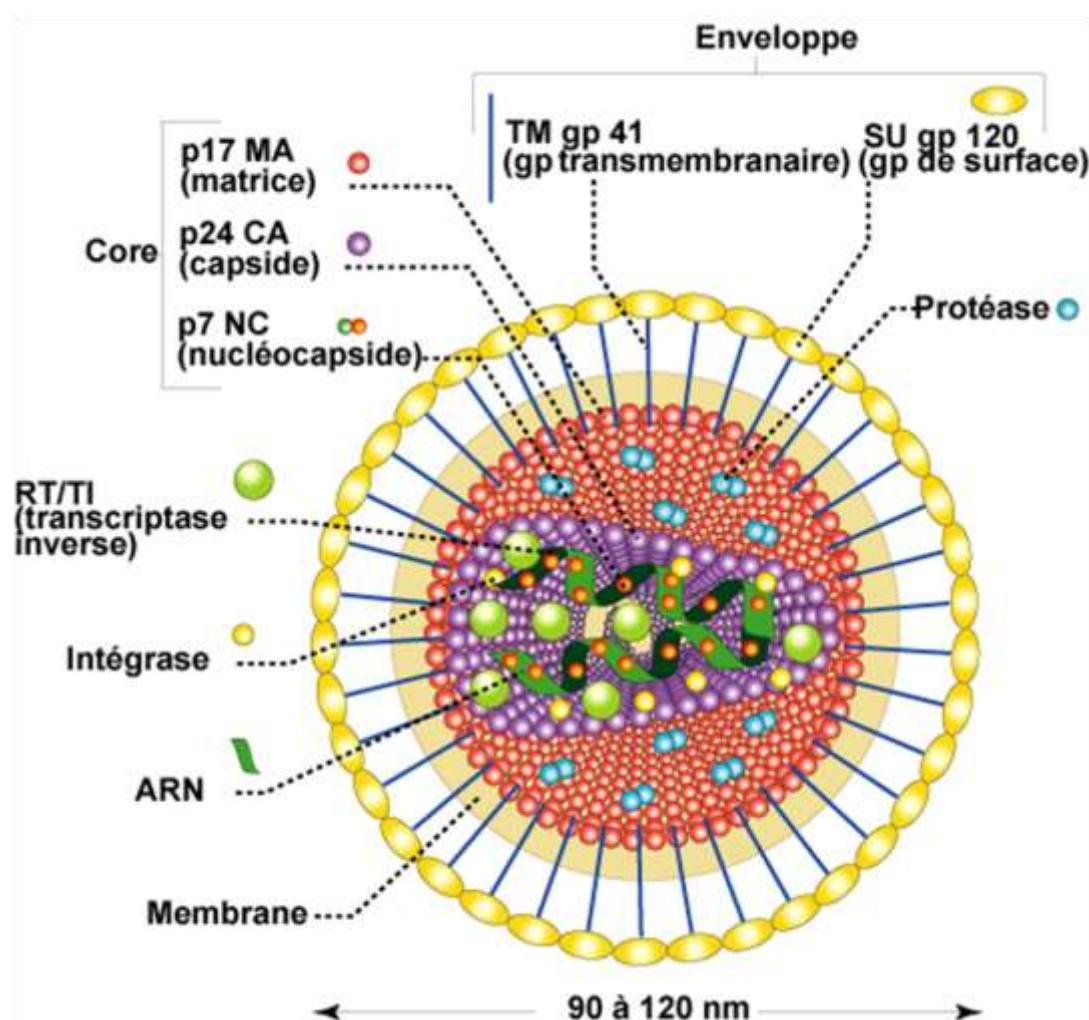


Figure 30 : Structure du VIH-1 (J.M Huraux *et al.*, 2003)

2.2 Organisation génomique du VIH

Comme tous les *Retroviridae*, le génome est composé de trois gènes de structures : *gag*, *pol* et *env* et de nombreux gènes régulateurs (figure 31).

Le gène *gag* code pour les protéines de matrice, de capsid et de nucléocapside. Le gène *pol* code pour les trois enzymes nécessaires à la réPLICATION, à savoir la transcriptase inverse, l'intégrase et les protéases. Enfin, le gène *env* code pour les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41.

Les gènes régulateurs vont coder des protéines qui interagissent avec le cycle de réPLICATION viral dans les cellules infectées. Parmi ces gènes, on peut citer les gènes *tat*, *vif*, *vpr*, *rev*, *nef* et *vpu*.

A chaque extrémité du génome, des séquences répétées nommées long terminal repeat (LTR) sont retrouvées et jouent un rôle dans l'intégration du virus et dans l'initiation de sa transcription (Charpentier *et al.*, 2011).

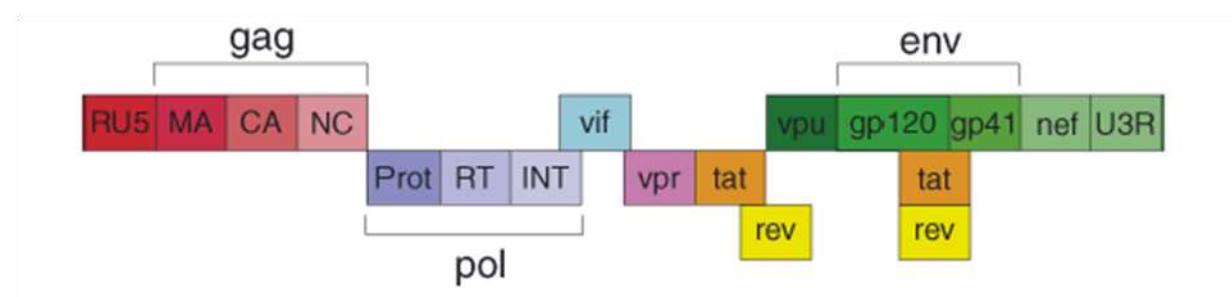


Figure 31 : Organisation du génome du VIH-1 (Amiel and Schneider, 2011)

3 Cycle de réPLICATION du VIH

Le cycle de réPLICATION du VIH, (figure 32), a lieu essentiellement dans les cellules qui expriment à leur surface la molécule CD4 : à savoir les lymphocytes T helper et les cellules présentatrices de l'antigène, comme les macrophages ou les monocytes, les cellules de Langerhans ou encore les cellules dendritiques.

3.1 Entrée du virus dans la cellule

L'interaction entre la gp120 et la molécule CD4 va permettre l'attachement du virus à la cellule cible. La liaison CD4-gp120 a une très forte affinité. Cette fixation engendre une modification de conformation de la gp120 par clivage protéolytique de la boucle V3. Ainsi, la gp120 peut se lier à des protéines en surface : les corécepteurs CCR5 ou CXCR4. La gp41, par un changement de

conformation, libère son peptide de fusion, ce qui permet la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. La capsidé est alors libérée à l'intérieur de la cellule.

Le choix du corécepteur va définir le tropisme viral : les virus qui utilisent le corécepteur CCR5 sont nommés virus R5 et ceux qui utilisent le corécepteur CXCR4, les virus X4. Au début de l'infection, le tropisme R5 est prédominant et les virus infectent de manière préférentielle les monocytes et macrophages. Au fur et à mesure de l'évolution de l'infection, le tropisme R5 diminue au profit du tropisme X4 où les lymphocytes T sont contaminés.

3.2 Transcriptase inverse

Une fois entrée dans la cellule, les deux brins d'ARN sont rétrotranscrits en ADN dans le cytoplasme par la transcriptase inverse. L'activité RNase de la RT va dégrader le modèle ARN viral, et par sa fonction d'ADN polymérase ADN dépendante, la RT permet la formation d'un ADN double brin linéaire : l'ADN proviral.

3.3 Intégration

Cet ADN passe dans le noyau et va être intégré dans le génome de la cellule hôte par un clivage de l'ADN chromosomique grâce à l'activité de l'intégrase.

3.4 Transcription et traduction

Après intégration de l'ADN proviral et suite à l'activation de la cellule, l'ARN polymérase II cellulaire permet la transcription du génome viral en ARN messager (ARNm). L'ARNm viral migre du noyau vers le cytoplasme où une maturation (ou épissage) a lieu. Les ARNm, qui codent pour les différentes protéines virales, sont produits par épissage et les ARNm non épissés constituent l'ARN génomique. En premier lieu, les protéines régulatrices (*tat*, *nef*, *rev*) sont produites, puis les protéines de structures sont synthétisées.

3.5 Assemblage et maturation

Les polyprotéines vont être clivées par la protéase virale et vont ainsi former la nucléocapside. Un assemblage de tous les éléments créés permet la formation de particules virales non infectieuses ou immatures. Ces particules sortent de la cellule par bourgeonnement et achèvent leur maturation grâce à l'action de la protéase virale. Ainsi, les particules virales deviennent infectieuses et sont capables de

contaminer d'autres cellules. La vitesse de réPLICATION du virus en l'absence de traitement est de 10^{10} particules virales produites par jour (Wei *et al.*, 1995).

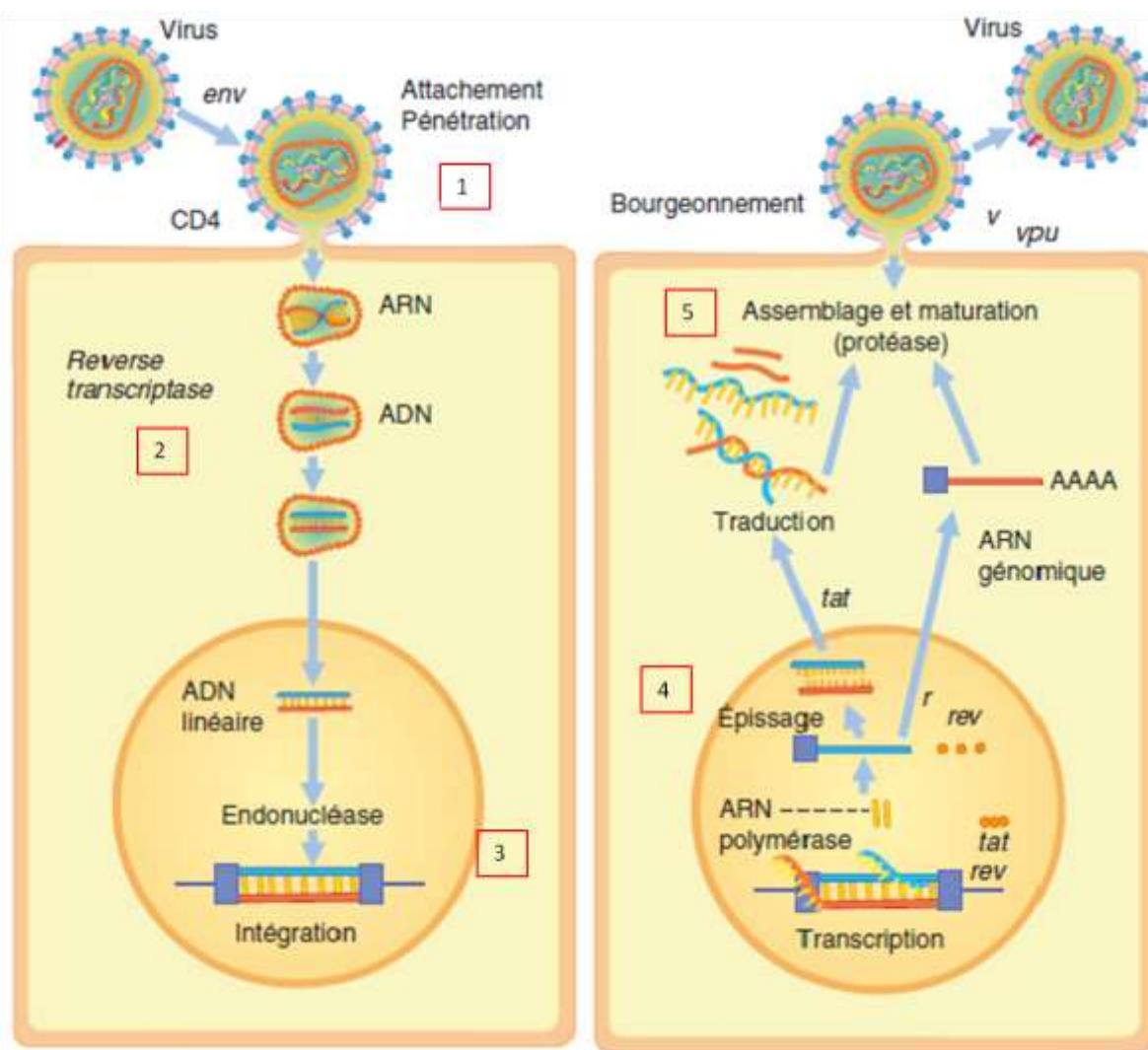


Figure 32 : Cycle de réPLICATION du VIH (Charpentier *et al.*, 2011)

Légende : 1 = entrée dans la cellule, 2 = étape de transcription inverse, 3 = intégration de l'ADN proviral, 4 = transcription puis traduction de l'ARNm, 5 = Assemblage, maturation des particules et bourgeonnement.

4 Variabilité du VIH

Par l'interaction de plusieurs facteurs, le VIH bénéficie d'une grande variabilité génétique. Parmi ces facteurs, on peut citer : un taux de réPLICATION élevé, un fort taux de recombinaison génétique par échange de matériel entre deux molécules d'ARN au moment de la rétrotranscription (Ramirez *et al.*, 2008) et un taux élevé d'erreur de la RT qui n'a pas d'activité correctrice. Le taux d'erreur de la RT est

de 10^{-4} (Pathak and Temin, 1990), ce qui est à l'origine environ une erreur par cycle de réPLICATION. L'association de tous ces éléments a favorisé l'hétérogénéité du virus au cours de son évolution.

4.1 Origine du VIH

Le VIH est proche des virus simiens (SIV) retrouvés chez les primates non humains (figure 33). De multiples transmissions zoonotiques de SIV du singe à l'Homme ont été décrites et semblent être à l'origine de l'épidémie de VIH (Sharp and Hahn, 2011). Il existe deux types de VIH, le VIH-1 et le VIH-2, dont l'origine est différente. Par des études phylogénétiques, il a été démontré que le SIV des chimpanzés et des gorilles sont les ancêtres du VIH-1 (Gao *et al.*, 1999) (Van Heuverswyn *et al.*, 2006), alors que le VIH-2 est proche du SIV retrouvé chez les macaques (Hirsch *et al.*, 1989).

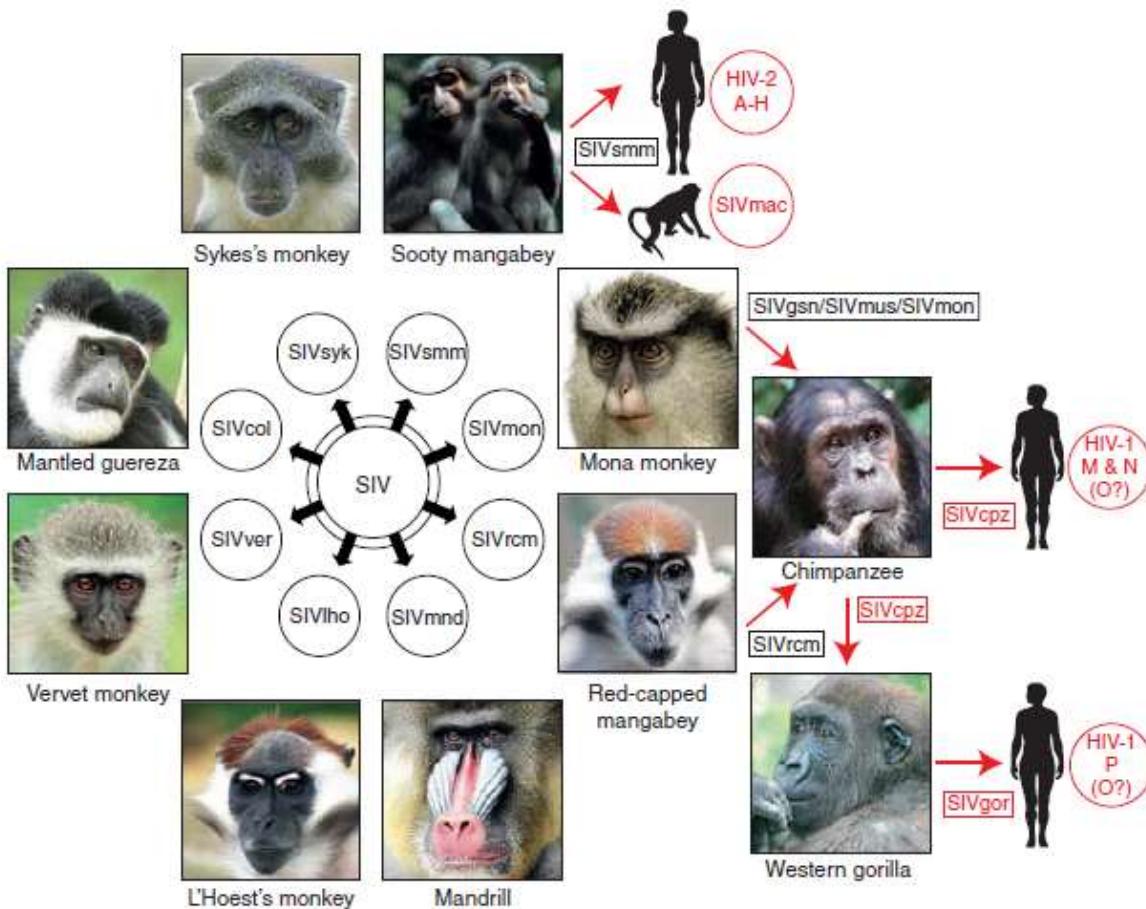


Figure 33 : Origines du VIH (Sharp and Hahn, 2011)

4.2 Classification du VIH

Le classification du VIH, basé sur l'étude des séquences génétiques, est complexe. On parle de types (VIH-1 et VIH-2), de groupes, de sous-types, de sous-sous-types et de formes recombinantes

circulantes et uniques. Le VIH-1 est à l'origine de l'épidémie actuelle car il représente 95% des infections dans le monde. Il est divisé en quatre groupes : M (Major), O (Outlier), N (non M et non O) et le groupe P. Le VIH-1 groupe M est le plus répandu et le plus diversifié. Il est divisé en neuf sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) eux-mêmes parfois divisés en sous-sous-types (par exemple de A1 à A4 pour le sous-type A). Entre les souches d'un même sous-type, la variation génétique est inférieure à 17%. Elle est de 17 à 35% entre les différents sous-types. La présence de nombreux virus recombinants a été observée et a rendu le classement plus complexe. On parle de formes circulantes recombinantes (CRF) lorsque le virus est identifié chez au moins trois individus sans lien épidémiologique entre eux sans quoi on parle de formes recombinantes uniques (URF). Plus de cinquante CRF sont décrites à l'heure actuelle. Un numéro est présent sur les CRF, donné selon l'ordre de la découverte. De plus, une extension indique les sous-types concernés par la CRF (exemple: CFR02-AG est la deuxième forme circulante recombinante découverte et implique les sous-types A et G). Si trois ou plusieurs sous-types ou même CRF sont présents au sein du génome, le terme "cpx" pour complexe est utilisé. Enfin, il ne faut pas oublier qu'au sein d'un même organisme, le virus est présent sous forme de quasi-espèces. Ces espèces sont proches génétiquement mais leur diversité est due à l'activité non correctrice de la RT.

Le VIH-2 comporte huit sous-types (A-H). Il reste moins diversifié que le VIH-1 ce qui peut être expliqué par une capacité réplicative plus faible. De plus, le VIH-2 est moins transmissible et est associé à une plus lente évolution de la maladie (Martine Peeters and Chaix, 2013).

4.3 Distribution géographique du VIH

Les différents sous-types sont répartis inégalement à travers le monde (figure 34). Les variants du VIH-1 groupe M sont les plus répandus. Le sous-type C est le plus fréquemment retrouvé, il représente à lui seul 48% des souches isolées chez les patients infectés. Il est surtout présent en Afrique Australe, en Océanie et en Asie. Le sous-type B, qui correspond à la première souche de VIH isolée, est le sous-type majoritaire en Europe occidentale, en Australie ainsi que dans le continent américain et représente 12% des souches isolées. La mise en place de tests sérologiques ou de charge virale et l'efficacité des antirétroviraux ainsi que la majorité des connaissances acquises sur le VIH ont été obtenues par l'étude de ce sous-type. Le sous-type A est présent surtout en Afrique de l'Est et représente 12% des infections. Les formes recombinantes concernent 20% des souches isolées et la forme la plus fréquente est le CRF02-AG avec une prévalence de 8% surtout retrouvée en Afrique de l'Ouest.

La plus grande diversité génétique du VIH se trouve en Afrique centrale, épicentre de l'épidémie.

L'épidémie liée au VIH-2 est restreinte à l'Afrique de l'Ouest et concerne 5% de la population mondiale infectée (Martine Peeters and Chaix, 2013).

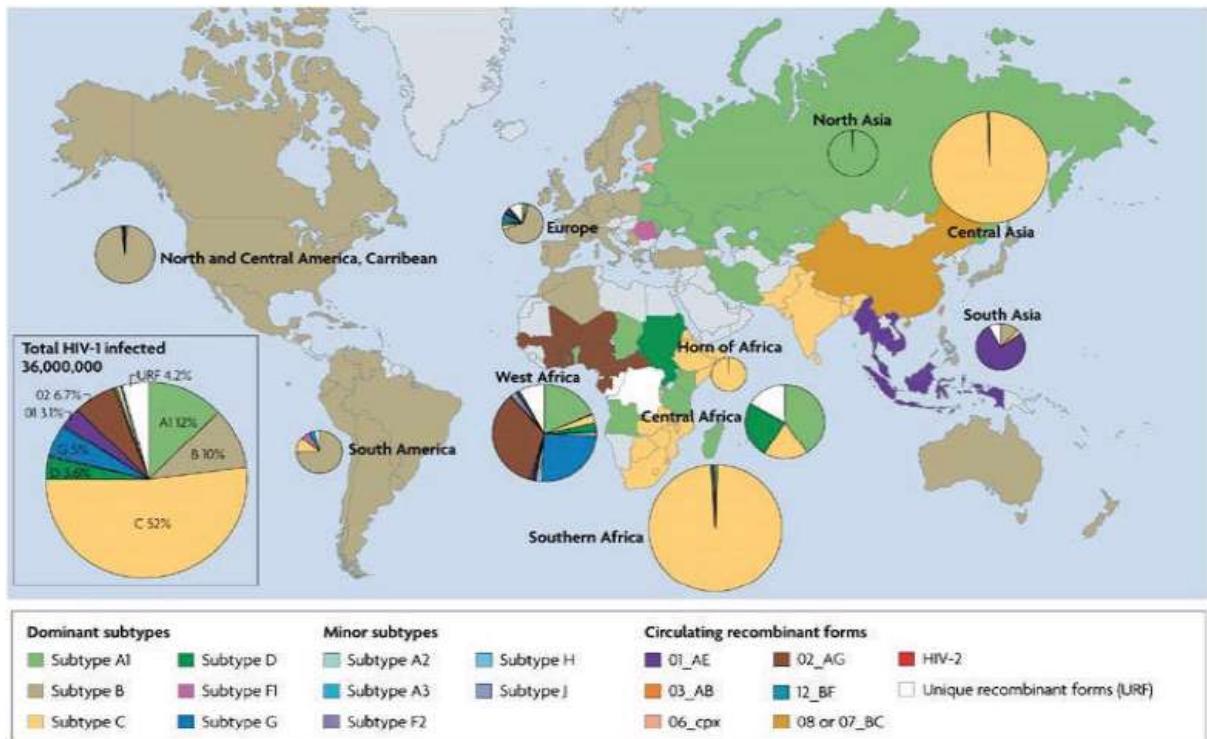


Figure 34 : Distribution géographique mondiale des différents sous types de VIH (Ariën *et al.*, 2007)

5 Epidémiologie

5.1 Modes de transmission du VIH

Le VIH est un virus fragile qui ne peut se transmettre que par contact étroit. Il est retrouvé dans différents liquides biologiques comme le sang, le sperme, les sécrétions vaginales, le lait et les liquides amniotique, broncho-alvéolaire ou céphalorachidien. Trois principaux modes de transmission du virus existent : les rapports sexuels, la transmission par le sang et la transmission de la mère à l'enfant soit pendant la grossesse, au cours de l'accouchement ou durant l'allaitement. La transmission sexuelle par rapports hétérosexuels est le principal mode de transmission au niveau mondial (Desenclos *et al.*, 2013).

5.2 Epidémiologie mondiale

Les données épidémiologiques publiées dans le rapport 2013 d'ONUSIDA estiment que le nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde est de 35 millions (figure 35). Plus de 60% de la population infectée est originaire d'Afrique subsaharienne, considérée comme le noyau de l'épidémie

du VIH. La plus forte prévalence de patients contaminés se situe en Afrique du Sud avec plus de 15% de la population concernée (figure 36). Cependant, l'épidémie touche toutes les régions du monde à un niveau différent. Ainsi, le taux de prévalence est proche de 1% dans l'Europe de l'Est, l'Asie centrale et aux Caraïbes. Le nombre de nouveaux cas de contamination par le VIH est estimé à 2,1 millions de personnes et on considère que le virus serait responsable de 1,5 millions de décès en 2013. Depuis la généralisation des antirétroviraux, la mortalité due au VIH a considérablement chuté. La maladie est devenue chronique, toujours mortelle mais contrôlable.



Figure 35 : Estimation du nombre d'adultes et d'enfants infectés par le VIH en 2013 (ONUSIDA, 2013)

5.3 Epidémiologie en France

Environ 150 000 personnes sont infectées par le VIH en France ce qui représente une prévalence de 0,23%. On estime que 10 à 20% des personnes séropositives ignorent leur statut sérologique vis-à-vis du virus. Depuis 2003, l'infection par le VIH est une maladie à déclaration obligatoire. Près de 6 100 nouveaux cas sont dénombrés chaque année, soit environ 15 par jour et ce chiffre reste stable depuis plusieurs années. Chez les hétérosexuels, l'incidence tend à la diminution alors que l'épidémie chez les homosexuels n'est pas maîtrisée et le nombre de cas augmente depuis dix ans (Cazein F *et al.*, 2015).

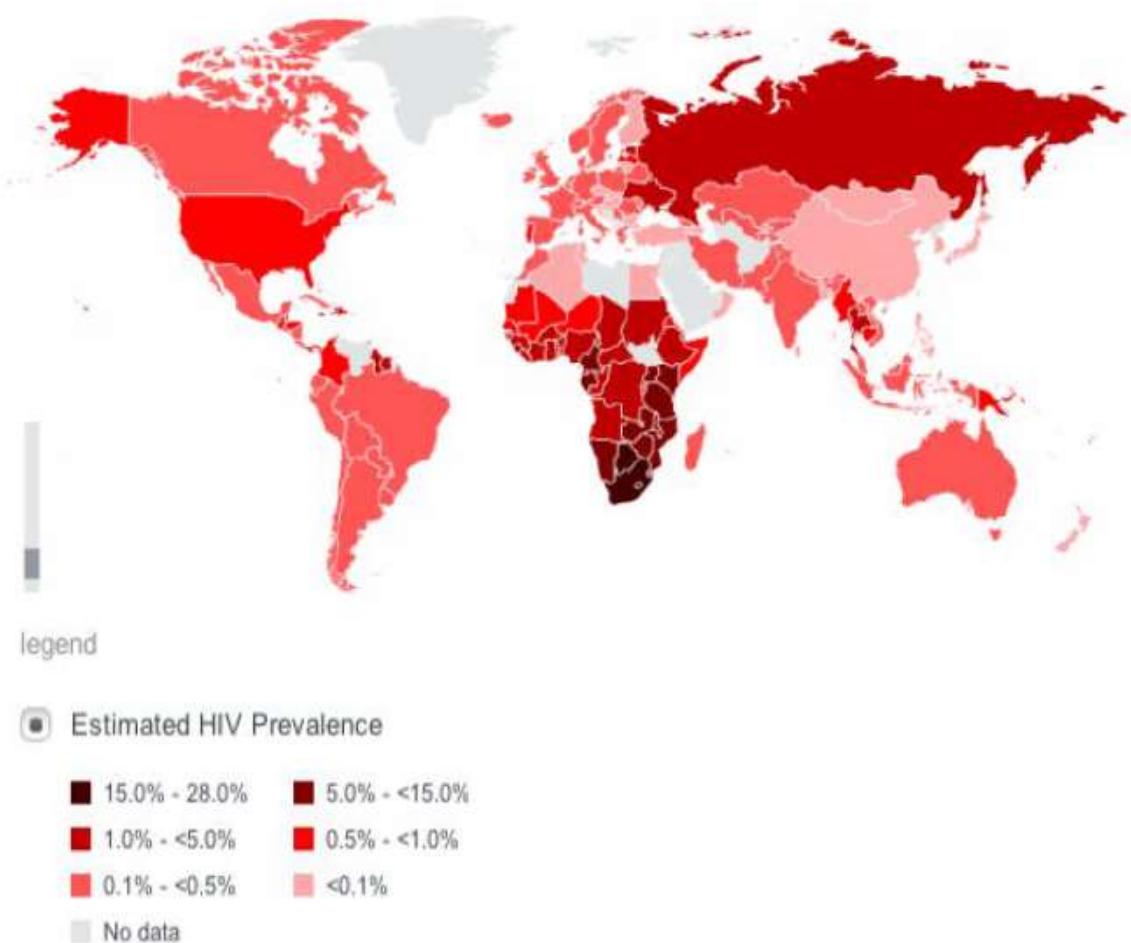


Figure 36 : Prévalence de l'infection par le VIH (ONUSIDA, 2013)

6 Physiopathologie

6.1 Les cellules cibles

Les cellules cibles du VIH expriment à la fois le marqueur CD4 et l'un des deux corécepteurs CCR5 et/ou CXCR4. Dans le cas de l'expression conjointe des deux corécepteurs, on parle de virus à double tropisme.

Lors de la primo-infection, les cellules de Langerhans au niveau des muqueuses génitales jouent un rôle important dans l'entrée du virus dans l'organisme. Elles expriment le corécepteur CCR5 et, une fois contaminées par des souches R5, sont à l'origine d'une réponse immunitaire de grande ampleur avec sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Ces cytokines permettent le recrutement d'autres cellules immunitaires pour combattre le virus, comme les cellules dendritiques ou les macrophages. Paradoxalement, cet événement va favoriser la dissémination du virus à travers ces cellules. Les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans, qui sont des cellules présentatrices d'antigènes, vont migrer vers les ganglions et transmettre le virus aux lymphocytes T CD4. Le virus va

coloniser rapidement le tissu lymphoïde associé aux muqueuses qui contient la plus grande partie des LT CD4 de l'organisme. Ainsi, peu de temps après la contamination, le virus s'est dispersé dans les différents réservoirs anatomiques.

Dans les cellules présentatrices d'antigènes, le virus peut se répliquer sans produire d'effets cytopathogènes. Ces cellules ont un rôle de réservoir du virus dans l'organisme. A l'inverse, les LT CD4 infectés de manière active ont une durée de vie brève de 48 heures. Les LT CD4 mémoires peuvent survivre à l'infection. Dans ce cas, l'ADN proviral est intégré et le virus ne se réplique pas. Ces cellules mémoires ont une durée de vie prolongée et constituent le réservoir principal du virus (ASSIM, 2013).

6.2 Immunopathologie

Trois stades cliniques sont décrits au cours de l'infection par le VIH : la primo-infection, la phase asymptomatique et la phase SIDA (figure 37).

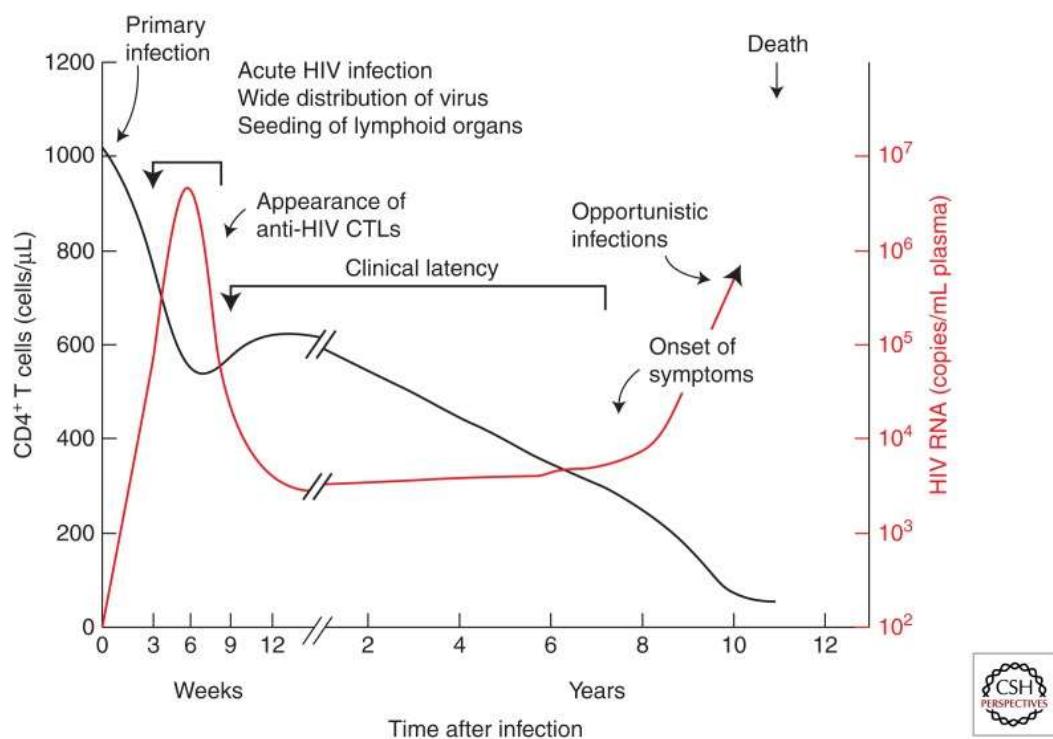


Figure 37 : Évolution du taux de LT CD4 et de la charge virale au cours de l'infection par le VIH (Coffin and Swanstrom, 2013)

Le VIH est responsable de la destruction des LT CD4, qui sont les chefs d'orchestre du système immunitaire.

Durant la primo-infection, le VIH va provoquer une perte profonde et irréversible de LT CD4 au niveau de la muqueuse intestinale rendant la translocation bactérienne possible par la perte d'intégrité de la barrière intestinale. Une réponse immunitaire très forte se met en place avec une activation des LT CD4 et LT CD8 spécifiques du VIH qui persiste tout le long de l'infection. La présence de protéines virales, comme la gp120, renforce l'activation lymphocytaire systémique.

Durant la phase asymptomatique, le taux de LT CD4 va décroître progressivement jusqu'au stade SIDA caractérisé par des infections opportunistes et/ou l'apparition de tumeurs conduisant au décès du patient.

La déplétion des LT CD4 peut être expliquée par l'interaction entre plusieurs mécanismes :

- l'effet cytolytique direct du VIH sur les LT CD4,
- la destruction des LT CD4 infectés par les LT CD8 cytotoxiques spécifiques,
- l'apoptose de LT CD4 non infectés liée à l'activation chronique du système immunitaire,
- le défaut de régénération des LT CD4 par épuisement du stock dans le thymus.

Le déficit en LT CD4 va provoquer une diminution des réponses immunitaires adaptatives T et B contre les pathogènes. Ainsi, un déficit immunitaire létal va naître, créant un état d'inflammation chronique délétère pour l'ensemble de l'organisme (figure 38).

Des anomalies fonctionnelles des LT CD4 apparaissent en plus des anomalies quantitatives. En effet, ces cellules perdent leur capacité de prolifération et de production d'IL2. De plus, elles ont une sensibilité augmentée à l'apoptose.

Des taux de cytokines pro-inflammatoires élevés sont retrouvés suite à l'hyperactivation du système immunitaire. Ces cytokines auto-entretiennent l'inflammation et sont responsables d'un vieillissement accéléré et du vieillissement prématûre du système immunitaire (ASSIM, 2013).

6.3 Réponses immunitaires mises en place contre le VIH

6.3.1 Réponse humorale

Une réponse humorale est activée suite à l'infection par le VIH. Les premiers anticorps apparaissent trois à douze semaines après la contamination. Ces anticorps, produits par les lymphocytes B, sont dirigés contre toutes les protéines d'enveloppe et de capsid du VIH. Ils ne sont pas protecteurs car ils ont une faible activité de neutralisation du fait de la variabilité importante des glycoprotéines d'enveloppe. Ainsi, le virus peut échapper à la pression immunitaire en modifiant les épitopes

reconnus par les anticorps. La détection de ces anticorps permet de poser le diagnostic par des tests appropriés.

6.3.2 Réponse cellulaire

Les LT CD8 jouent un rôle essentiel dans le contrôle initial de l'infection par le VIH. Ils permettent une réduction considérable de la réPLICATION virale en détruisant les cellules infectées. La variation des épitopes ciblés par les LT CD8 impose une constante adaptation des réponses immunitaires. Ainsi, lors de modifications épitopiques, les LT CD8 initialement présents décroissent et de nouveaux LT CD8 apparaissent, induisant une nouvelle pression de sélection. Une course-poursuite est engagée entre la réponse CD8 spécifique et le virus tout au long de l'infection, ce qui va "épuiser" le système immunitaire (figure 38).

L'adaptation des réponses B et T spécifiques aux nouveaux variants viraux est progressivement limitée par le déclin des LT CD4 et finit par ne plus être présente dans le stade final de la maladie (Rouzioux *et al.*, 2013).

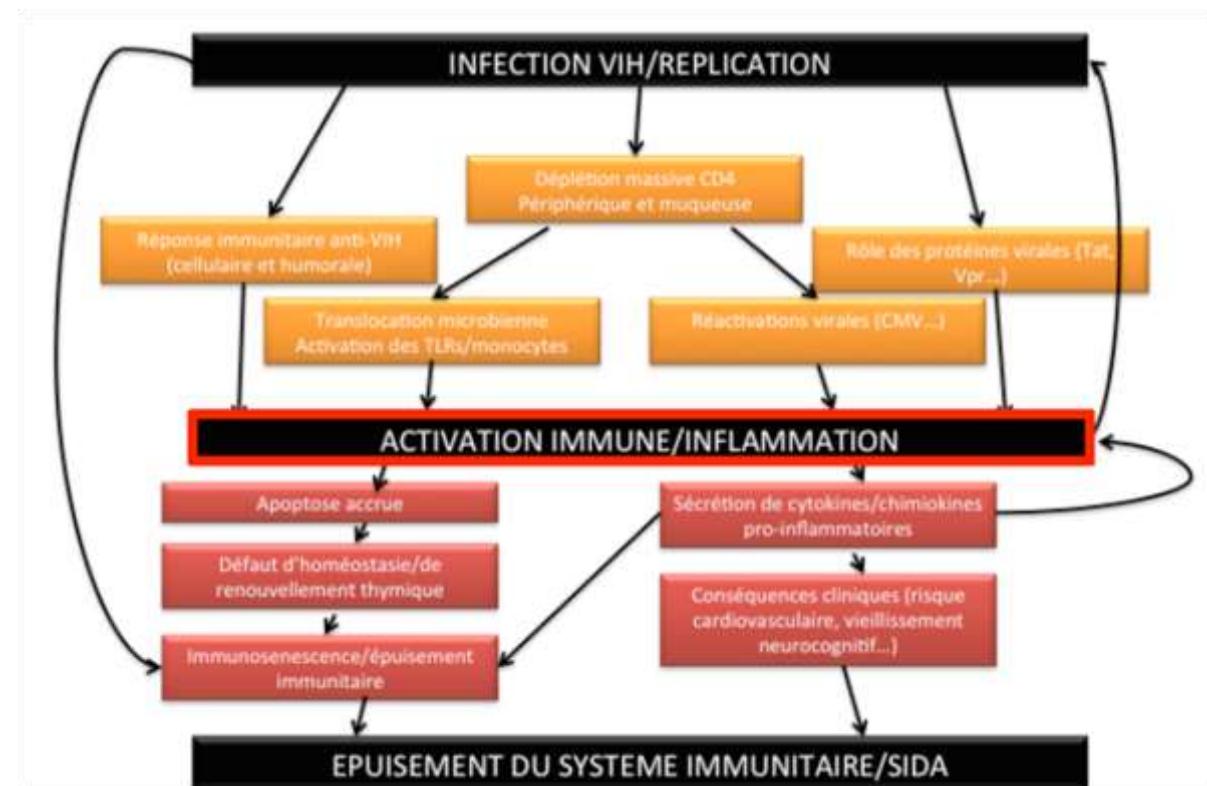


Figure 38 : Causes et conséquences de l'activation immunitaire au cours du VIH (Appay and Sauce, 2008)

6.4 Catégories cliniques du CDC

Les patients sont classés en trois catégories (A, B, C) en fonction des événements cliniques qui sont survenus au cours de l'évolution de la maladie (tableau 3).

Tableau 3 : Classification de l'infection par le VIH pour les adultes et les adolescents (CDC, 1992)

Nombre de lymphocytes CD4+	Catégories cliniques		
	A Asymptomatique, primo-infection ou PGL*	B Symptomatique sans critères (A) ou (C)	C SIDA
= 500 / μ L	A1	B1	C1
200 – 499 / μ L	A2	B2	C2
< 200 / μ L	A3	B3	C3

*PGL Lymphadénopathie persistante généralisée

Dans la catégorie A, sont retrouvés : les patients en primo-infection symptomatique ou non, les patients ayant une infection VIH asymptomatique et les patients présentant une lymphadénopathie persistante généralisée.

La catégorie B concerne les patients présentant des manifestations cliniques mineures liées au VIH, comme une candidose oropharyngée ou vaginale, un zona, un carcinome in situ.

Enfin la catégorie C, qui correspond au stade SIDA, concerne les patients atteints par des maladies opportunistes comme la pneumocystose, la toxoplasmose, la tuberculose et des cancers comme la maladie de Kaposi et des lymphomes.

7 Traitement

7.1 Les molécules actives contre le VIH

Depuis la découverte des antirétroviraux en 1987 et l'arrivée des inhibiteurs de protéase en 1996, la mortalité liée au VIH a fortement diminué. Actuellement, l'arsenal thérapeutique est composé de six classes d'antirétroviraux regroupant une vingtaine de molécules ciblant les différentes étapes du cycle de réplication virale (figures 39 et 40).

- **Les inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse (INTI)** : ce sont des analogues nucléos(t)idiques qui entrent en compétition avec les nucléotides cellulaires pour l'incorporation dans la chaîne d'ADN en elongation et bloquent l'activité de la RT.

- **Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)** : ce sont des molécules qui inhibent de façon non compétitive l'action de la RT par fixation à l'enzyme et modification de la conformation du site catalytique.
- **Les inhibiteurs de protéase** : ce sont des molécules qui inhibent la maturation fonctionnelle des protéines virales entraînant la formation de virions immatures et non infectieux.
- **Les inhibiteurs d'intégrase** : ce sont des molécules qui empêchent l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte.
- **Les inhibiteurs de fusion** : cette classe est composée d'une seule molécule, l'enfuvirtide, qui bloque la fusion entre les protéines d'enveloppe du VIH et le CD4 par fixation à la gp41.
- **Les inhibiteurs du corécepteur CCR5** : ces molécules agissent par compétition en se liant sur le corécepteur CCR5 et bloquant l'entrée du virus.

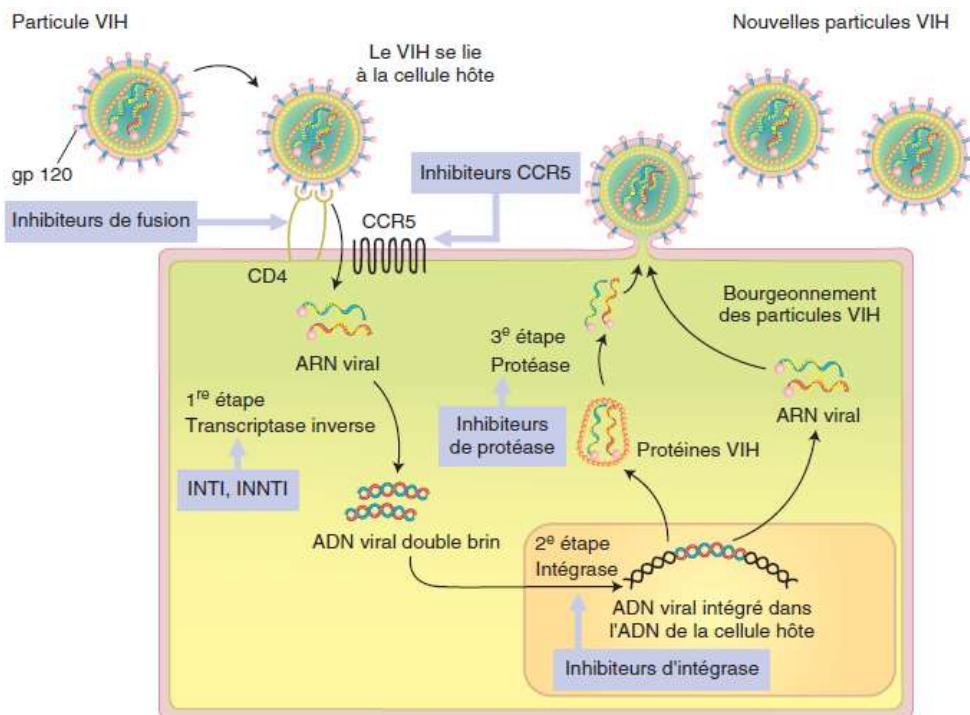


Figure 39 : Cycle de réplication du VIH avec les sites d'actions des antirétroviraux (Ghosn and Katlama, 2012)

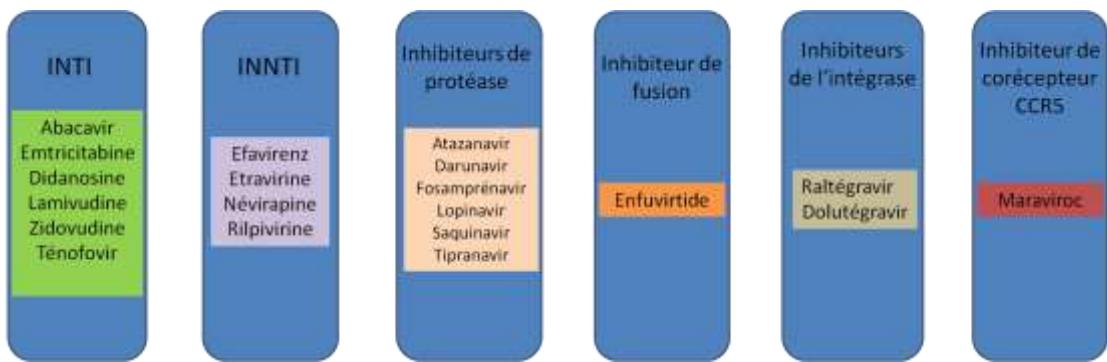


Figure 40 : Liste des antirétroviraux disponibles (Morlat, 2013)

7.2 Objectifs et indications du traitement

D'après le rapport Morlat 2013, il est recommandé de proposer un traitement antirétroviral efficace à toutes les personnes vivant avec le VIH quel que soit le taux de CD4.

Le traitement instauré doit faire appel à une trithérapie, dont le but est de potentialiser l'effet des antirétroviraux et d'éviter l'apparition de résistance. Les schémas thérapeutiques classiques sont les suivants :

- 2 INTI + 1 INNTI
- 2 INTI + 1 Inhibiteur de protéase boosté par le ritonavir
- 2 INTI + 1 Inhibiteur d'intégrase

Le choix du schéma thérapeutique est établi selon les résultats du génotypage VIH. Les éléments de surveillance biologique et d'efficacité de traitement se font par le suivi de la CV VIH et du taux de LT CD4. Les objectifs thérapeutiques sont de bloquer la réPLICATION virale à long terme (CV < 20 copie/mL) et d'obtenir une restauration immunitaire (taux de LT CD4 > 500 mm³). L'atteinte de ces objectifs permet de stopper l'évolution de la maladie, d'augmenter la survie, d'améliorer la qualité de vie et de limiter la propagation du virus (Morlat, 2013).

Malgré l'efficacité des antirétroviraux sur la réPLICATION virale, ceux-ci n'ont aucun impact direct sur les cellules infectées latentes. L'infection par le VIH ne se guérit pas et est considérée comme une maladie chronique. Dans le but d'éradier le virus, de nouvelles approches thérapeutiques ciblant le réservoir viral sont en développement. L'apparition de vaccins préventifs anti-VIH, basés sur l'induction d'une réponse humorale à base d'Ac neutralisants à large spectre et d'une réponse cellulaire à base de LTc de forte affinité et de haute avidité, est l'objectif attendu dans les prochaines années (Girard *et al.*, 2013).

La co-infection VIH/VHB

L'infection par le VHB, responsable de lésions hépatiques sévères, est considérée comme une cause majeure de mortalité et de morbidité pour les patients séropositifs pour le VIH. De multiples données existent sur la co-infection VIH/VHB et sur l'impact de l'infection chronique par le VHB sur l'évolution de l'infection à VIH. L'interaction entre les deux virus est complexe et n'est pas encore totalement maîtrisée.

1 Epidémiologie

En raison des modes de transmission communs au VHB et au VIH, la co-infection est couramment observée dans le monde. Chez les patients séropositifs pour le VIH, 68% présentent une cicatrice sérologique de contage par le VHB avec un Ac anti-HBc positif (Lo Re *et al.*, 2007). Le taux de prévalence de co-infection VIH/VHB dans la population VIH varie entre 5 à 80% selon les études et les zones étudiées. Dans les pays développés, où la prévalence de l'Ag HBs est faible, la co-infection est proche de 6%. Des taux proches de 26% et de 73% sont retrouvés respectivement dans de petites cohortes au Nigéria et en Ouganda (Peters, 2007) (Thio *et al.*, 2013). D'après une étude multicentrique sur les patients VIH + et la co-infection VIH/VHB, une prédominance du génotype A (60%) est retrouvée chez les co-infectés. Cette étude démontre également qu'un taux de 50,4% de souches sauvages du VHB (Ag HBe +) est retrouvé dans la population co-infectée (Thio *et al.*, 2013).

Les dernières données épidémiologiques en France sur les co-infectés VIH/VHB remontent à 2004. Un marqueur de contact avec le VHB (Ac anti-HBc) était retrouvé chez 37,6% des personnes infectées par le VIH et la prévalence d'une infection active par le VHB (présence d'un Ag HBs et/ou d'une CV VHB positive) était de 7% (Larsen *et al.*, 2008). L'incidence des infections par le VHB chez les personnes infectées par le VIH est difficile à estimer. La découverte d'un Ag HBs positif peut correspondre soit à une contamination récente, même chez les patients vaccinés en cas de perte de leur immunité protectrice (Ac anti-HBs < 10 mUI/mL), soit à une réactivation du VHB en cas d'immunodépression ou d'interruption thérapeutique par un antirétroviral actif sur le VHB. Les patients co-infectés en France, de même qu'au niveau mondial, sont plus fréquemment porteurs d'une souche de VHB sauvage que les patients mono-infectés par le VHB (46,4% vs 32,8%) (Piroth *et al.*, 2010).

2 Physiopathologie et interaction entre les deux virus

De nombreuses études ont observé que la co-infection VIH/VHB augmentait la morbidité et la mortalité en comparaison à la mono-infection par le VIH ou le VHB. Les interactions entre le VIH, le VHB et le système immunitaire de l'hôte sont complexes. Les effets de chaque virus sur l'histoire de la maladie seront détaillés dans les chapitres suivants.

2.1 Impacts du VIH sur l'hépatite B

La co-infection VIH/VHB modifie l'histoire naturelle du VHB et aggrave le pronostic de l'hépatite B chronique (figure 41) (Joshi *et al.*, 2011). La mortalité hépatique est dix-neuf fois supérieure chez les patients co-infectés par rapport aux patients mono-infectés par le VHB (Peters, 2007). Un taux de LT CD4 faible va favoriser le passage à la chronicité du VHB et accélère la progression de la maladie hépatique vers la fibrose, le développement de la cirrhose et le risque de CHC (Li *et al.*, 2012). Une corrélation existe entre le taux faible de LT CD4 et la CV VHB élevée (Taffon *et al.*, 2014). Le risque de passage du stade aigu au stade chronique est multiplié par cinq par rapport aux patients mono-infectés par le VHB (Morlat, 2013). Les LT CD4 jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire spécifique du VHB et dans la clairance virale. Ainsi, le VIH peut supprimer l'immunité spécifique anti-VHB. La co-infection s'accompagne d'une diminution des séroconversions spontanées des Ag HBe et Ag HBs (Taffon *et al.*, 2014). Le niveau d'Ag HBs est plus élevé chez les patients ayant un taux de CD4 bas. La clairance de l'Ag HBs est dépendante de la réponse immunitaire en LT CD4 (Jaroszewicz *et al.*, 2012).

Au cours de l'infection par le VIH, le système immunitaire est activé de façon constante et de nombreuses cytokines et facteurs de transcription pro-inflammatoires sont libérés. Il est décrit qu'au cours de la co-infection, les hépatocytes sont plus sensibles à l'apoptose. Les cellules stellaires hépatiques sont activées et vont sécréter du collagène impliqué dans la fibrose hépatique (Li *et al.*, 2012).

Chez les co-infectés, l'association entre le taux faible de LT CD4 et l'hépatite B occulte a été observée (Li *et al.*, 2012). Ces hépatites occultes résultent le plus souvent de mutations sur la région hydrophile majeure de l'Ag HBs à l'origine d'un défaut de détection de l'Ag HBs par les tests diagnostics. Enfin, la co-infection est associée à une augmentation de la fréquence des réactivations du VHB chez les porteurs inactifs du VHB liée à la persistance du génome viral sous forme d'ADNccc dans les hépatocytes infectés (Gilson *et al.*, 1997).

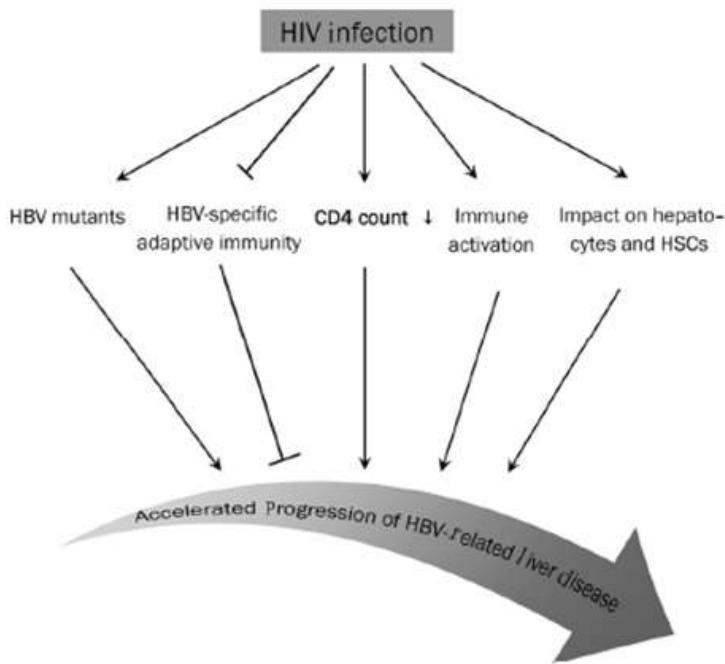


Figure 41 : Effets de l'infection par le VIH sur l'hépatite B (Li *et al.*, 2012)

légende : HSCs = cellules stellaires hépatiques

2.2 Impacts du VHB sur la progression de l'infection par le VIH

Les résultats des différentes études publiées, concernant les effets du VHB sur l'évolution du VIH (figure 42), sont assez contradictoires. La plupart d'entre elles s'accordent pour dire qu'il ne semble globalement pas y avoir de retentissement du VHB sur l'évolution immuno-virologique de l'infection par le VIH. Cependant, une étude a montré que la diminution des LT CD4 et l'augmentation de la CV VIH étaient plus importantes chez les co-infectés que chez les mono-infectés par le VIH lors des phases d'interruption thérapeutique (Dore *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été démontré *in vitro*, que le VHB peut accroître la réplication du VIH par l'activation de la transcription des Long Terminal Repeat (LTR) via la protéine HBx (Li *et al.*, 2012). De plus, au cours de l'infection par le VHB et le VIH, les deux virus agissent en synergie pour activer le système immunitaire en continu. Ce phénomène peut expliquer la déplétion plus sévère des LT CD4 retrouvée chez les co-infectés (Li *et al.*, 2012).

Paradoxalement, le VHB peut inhiber la dissémination du VIH via les cellules dendritiques. En effet, il a été démontré, d'une part, que les particules virales du VHB, composées de l'Ag HBs, inhibent la maturation des cellules dendritiques (Op den Brouw *et al.*, 2009). Or, ce sont les cellules dendritiques matures qui favorisent la transmission du VIH aux autres cellules. D'autre part, la présence de l'Ag HBs de façon chronique est associée à une diminution de l'expression des Toll-like receptor 2 (TLR-2) par les cellules mononucléées sanguines périphériques (Riordan *et al.*, 2006). Cela permet

entre autre d'inhiber l'entrée du VIH dans les cellules dendritiques immatures et d'affaiblir la transmission de novo aux LT CD4 (Thibault *et al.*, 2009).

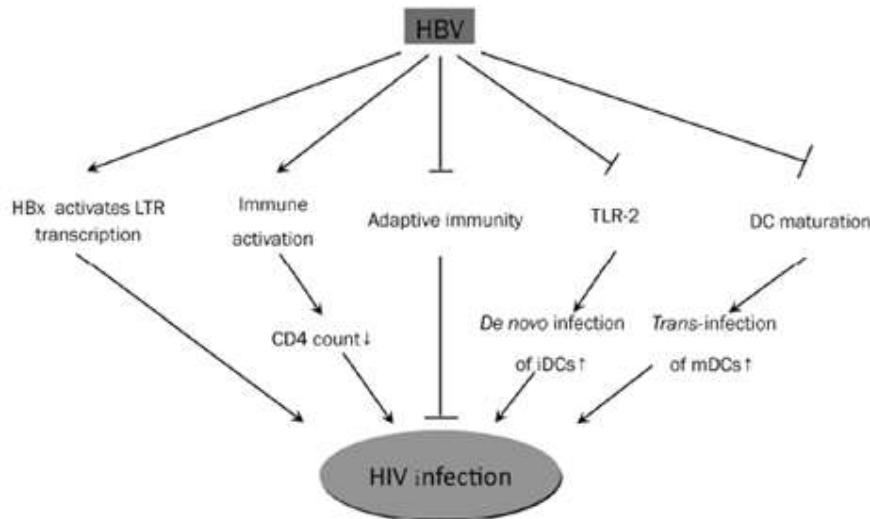


Figure 42 : Effets de l'infection par le VHB sur la progression de l'infection par le VIH (Li *et al.*, 2012)

légende : DC = cellule dendritique, iDCs = DCs immatures, mDCs = DCs matures.

Pour finir, il est intéressant de préciser que depuis la généralisation des antirétroviraux et la prise en charge multidisciplinaire de ces patients co-infectés, la morbi-mortalité a diminué par rapport aux patients non traités (Joshi *et al.*, 2011).

3 Prise en charge thérapeutique

3.1 Objectifs et indications thérapeutiques

Chez tout patient détecté séropositif pour le VIH, la recherche de marqueurs d'infection par le VHB doit être systématique (Morlat, 2013). De même, chez tout patient porteur de l'Ag HBs et avant instauration d'une thérapie anti-VHB, une sérologie VIH doit être réalisée (EASL, 2012).

L'objectif thérapeutique est identique à celui d'une mono-infection par le VHB, c'est-à-dire obtenir une CV VHB indétectable à long terme et idéalement une négativation de l'Ag HBs, ce qui est d'autant plus rare en cas d'infection par le VIH.

Le traitement antirétroviral doit être instauré le plus rapidement possible chez tous les patients vivants avec le VIH co-infectés par le VHB quel que soit le taux de LT CD4. Des molécules ayant une double activité anti-VIH et anti-VHB doivent être incluses dans le traitement. En cas de co-infection,

l'indication du traitement ne tient pas forcément compte des facteurs habituellement utilisés chez les patients ayant une mono-infection au VHB (ALAT, CV VHB, importance des lésions nécrotico-inflammatoires) (Morlat, 2013). Les molécules efficaces sur les deux virus sont : TDF, 3TC, FTC, ETV. Les résistances du VIH et du VHB sont indépendantes vis-à-vis de ces molécules.

3.2 Stratégies thérapeutiques

L'utilisation du TDF doit être privilégiée. Il doit être prescrit si possible en association avec le 3TC ou le FTC. Du fait de la barrière génétique de résistance très élevée de cette molécule, le TDF peut être utilisé comme seul agent anti-VHB. Il doit cependant toujours être combiné à d'autres molécules antirétrovirales efficaces sur le VIH.

ETV peut être utilisé chez les patients intolérants au TDF. Mais il doit toujours être combiné à d'autres molécules anti-VIH, du fait de sa faible activité vis-à-vis de ce virus. L'efficacité est limitée chez les patients présentant une exposition à long terme au 3TC en monothérapie anti-VHB (risque de mutations sur le gène de la polymérase au niveau du motif YMDD). Dans ce cas, le traitement associé par 3TC ou FTC devra être arrêté du fait des résistances croisées. La posologie de l'ETV est de 0,5 mg une fois par jour. En cas de mutation, elle est de 1 mg une fois par jour et son utilisation reste associée à un risque élevé d'échec virologique.

L'utilisation du 3TC et du FTC est à proscrire en monothérapie anti-VHB.

Dans les très rares cas où un traitement anti-VIH n'est pas instauré, les molécules anti-VHB sans activité sur le VIH (Peg-IFN, ADF, LdT) pourront être utilisées après avis spécialisé.

Les molécules anti-VIH et anti-VHB, prescrites dans le cadre des combinaisons antirétrovirales, ne doivent pas être arrêtées chez les patients co-infectés VIH/VHB. Toute interruption de ces molécules comporte un risque majeur de réactivation du VHB, parfois sous la forme d'hépatite aiguë sévère voire fulminante. Exceptionnellement, un arrêt des agents anti-VHB peut être envisagé après avis spécialisé, mais seulement en cas de très bon contrôle virologique du VHB (six mois après une séroconversion HBs) et s'il existe un inconvénient à poursuivre le traitement. En effet, une réactivation virale est possible à l'arrêt des agents anti-VHB, malgré la séroconversion, par l'intermédiaire de l'ADNccc persistant dans le génome cellulaire (Morlat, 2013).

La surveillance de l'efficacité des traitements se fait par le suivi de la CV VHB et des taux quantifiés des Ag HBe (si souche sauvage) et des Ag HBs. La diminution de ces taux peut être prédictive de la séroconversion des Ag HBe et Ag HBs trois à six ans après le début du traitement (Zoutendijk *et al.*, 2012).

La prise en charge des patients co-infectés par des antirétroviraux actifs sur les deux virus ont modifié les effets négatifs du VIH sur l'hépatite B chronique. En effet, il a été démontré que la sévérité de la maladie hépatique était moins importante chez les co-infectés que chez les mono-infectés par le VHB. Ce qui est probablement une conséquence de l'utilisation à long terme des antirétroviraux actifs sur le VHB, notamment le TDF (Piroth *et al.*, 2015).

Cependant, aucun traitement à ce jour n'est capable d'éradiquer aussi bien le VIH que le VHB. Des molécules strictement anti-VHB, constitueront une avancée thérapeutique très attendue, tout comme le vaccin contre le VIH.

Partie 2 : Travail personnel

Objectifs du travail

En raison notamment de la persistance de l'ADNccc dans les hépatocytes, les traitements actuels ne permettent pas d'éliminer le VHB. Les glycoprotéines d'enveloppe virales, jouant un rôle important dans la réaction immunitaire de l'hôte, ainsi que dans l'entrée du virus dans les cellules, sont des cibles thérapeutiques potentielles contre le VHB. Des épitopes spécifiques des lymphocytes B et T sont présents sur les protéines codées par les gènes préS1, préS2, S. Des mutations retrouvées sur ces épitopes ont déjà été décrites comme étant responsables d'un échappement immunitaire pouvant favoriser la persistance de l'infection.

Notre objectif est d'étudier l'influence de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du VHB sur la clairance de l'Ag HBs chez des patients co-infectés VIH/VHB traités par analogues nucléos(t)idiques efficaces sur le VHB.

Nos travaux visent notamment à mettre en évidence des signatures moléculaires au sein des protéines d'enveloppe du VHB ayant un lien avec la clairance ou la persistance de l'Ag HBs chez des patients co-infectés VIH/VHB. Ces signatures moléculaires pourraient permettre de définir des sites essentiels des glycoprotéines d'enveloppe du VHB à cibler par des inhibiteurs d'entrée.

Pour chaque patient sélectionné, le séquençage des gènes préS1, préS2 et S codant pour les glycoprotéines S, M et L d'enveloppe a été réalisé.

Les résultats du séquençage préS/S du VHB des patients présentant une clairance de l'Ag HBs, ont été comparés aux résultats de patients contrôles présentant une persistance de l'Ag HBs, ainsi qu'aux données de la littérature.

L'analyse des données a notamment porté sur l'impact de ces mutations sur l'antigénicité.

Matériel et méthode

1 Sélection des patients

Notre étude a porté sur des patients co-infectés de façon chronique par le VIH et le VHB, sélectionnés uniquement sur le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nancy au sein du service de Maladies Infectieuses et Tropicales (Pr May, Pr Rabaud). Nous avons étudié un groupe de patients d'intérêt ayant présenté une clairance de l'Ag HBs, on parle alors d'hépatite B résolue (Ag HBs négatif, charge virale VHB négative). Il s'agit de patients rares, c'est pourquoi notre effectif est assez limité.

Le logiciel GLIMS (logiciel informatique pour la gestion des résultats des analyses de biologie médicale) nous a permis de sélectionner les patients en réalisant une extraction des données sur des patients hospitalisés dans le service des Maladies Infectieuses et Tropicales.

Pour l'extraction, les critères retenus étaient les suivants : présence de l'Ac anti-HBc (indicateur de contact avec le VHB) et présence d'un marqueur d'infection par le VIH, une charge virale (CV) positive pour le VIH ou une sérologie positive. Une fois les patients triés selon la présence ou l'absence de l'Ag HBs, nous avons recherché pour chacun d'entre eux s'il y avait une CV VHB positive dans les antériorités des patients. Cela a permis de trouver une trentaine de patients et de distinguer les patients d'intérêt ayant présenté une clairance de l'Ag HBs, des patients contrôles chez lesquels l'Ag HBs persiste. Nous avons par la suite recherché dans la sérothèque du laboratoire de virologie, les sérums de ces patients avec une CV VHB positive nécessaire pour le séquençage. Nous avons par ailleurs vérifié que ces patients n'avaient pas de sérologie positive concernant le virus de l'hépatite C et le virus de l'hépatite Delta.

Une fois les patients inclus dans la cohorte, nous avons recherché leurs antécédents biologiques pour le suivi du VIH et du VHB. Nous avons utilisé le logiciel Nadis, dédié aux patients VIH, qui permet de suivre ces patients d'un point de vue thérapeutique et biologique. Nous avons pu récupérer des données concernant les traitements anti-VIH et anti-VHB utilisés chez ces patients. Finalement, quatorze patients ont été retenus dans cette étude, les autres ayant été éliminés par défaut d'appariement, de sérums suffisants ou d'informations nécessaires à l'inclusion.

Notre population d'intérêt est donc constituée de quatre patients avec une CV VHB indétectable et une clairance de l'Ag HBs et chez qui on retrouve une CV VIH indétectable. Nous les avons comparés à des patients contrôles co-infectés VIH/VHB mais avec une persistance de leur Ag HBs et appariés selon l'âge, le sexe et le génotype du VHB. Il faut préciser que le génotype du VHB n'est obtenu qu'après séquençage, or un certain nombre de patients n'ont pu être apparié à leur patient d'intérêt du

fait de la différence des génotypes. Nous avons donc retrouvé une petite population de génotype E dont nous avons étudié les caractéristiques.

2 Réalisation des sérologies et charges virales VHB

Pour certains patients, nous avons récupéré des sérums anciens sans connaissance de leur statut sérologique pour le VHB à cette époque. Nous avons donc vérifié leur statut sérologique pour les marqueurs du VHB sur l'automate **Architect i2000sr (Abbott)** avec la recherche des trois marqueurs Ac anti-HBc, Ac anti-HBs et Ag HBs. Cet automate travaille avec des techniques de chimioluminescence où des billes sont recouvertes d'antigènes ou d'anticorps selon le paramètre et où le signal mesuré est proportionnel à l'analyte recherché. Si le statut sérologique correspondait au profil recherché, nous réalisions une CV sur l'automate **Cobas 2000 (Roche)**. La CV était réalisée avec une dilution au demi pour préserver le maximum de sérum. L'automate réalise une extraction automatisée et une PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel selon le principe des sondes Taqman (Figure 43). Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité l'un de l'autre. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'elongation. Nous en déduisons par la suite une charge virale en UI/mL grâce à une extrapolation par rapport à un calibrant. Nous avions besoin d'un volume de sérum de 300 µL pour la CV et 300 µl pour la sérologie.

Lorsque la CV était positive et en quantité suffisante pour la suite ($> 2 \log \text{d'UI/mL}$), nous avons réalisé chez tous les patients de l'étude le séquençage des gènes préS1, préS2 et S qui codent pour les glycoprotéines d'enveloppes.

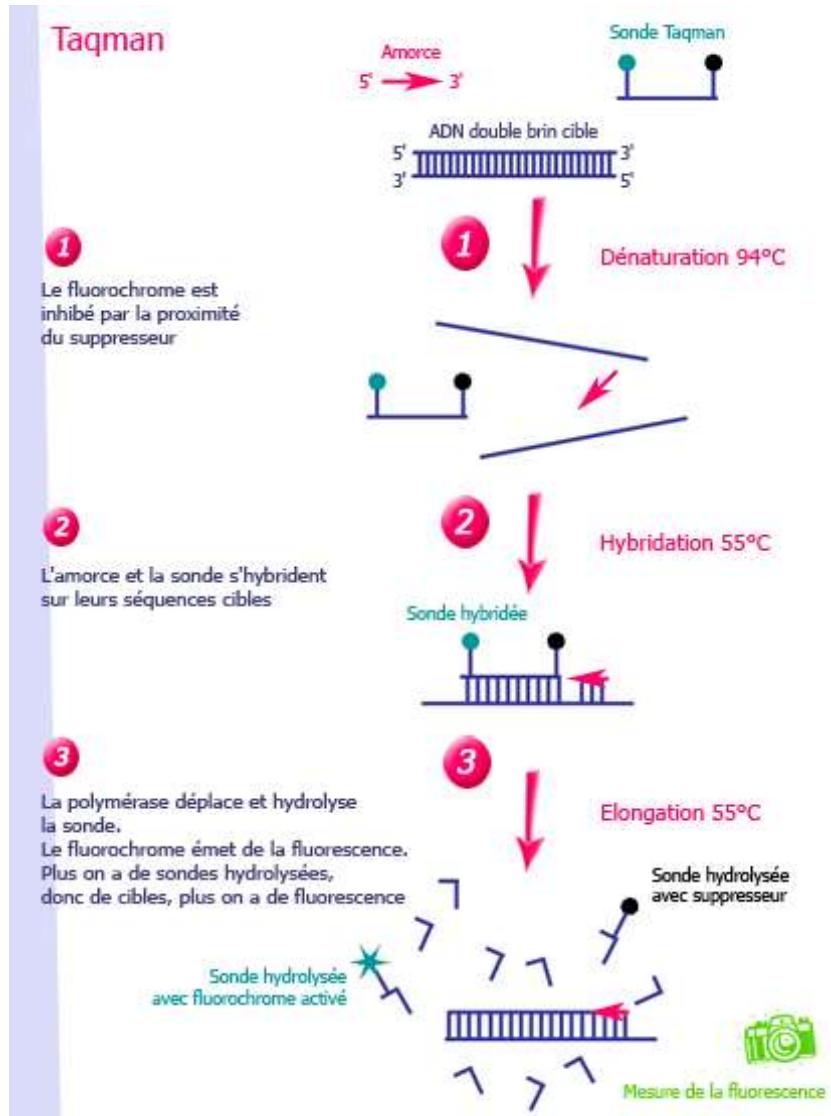


Figure 43 : Principe des sondes Taqman (d'après <http://www.ilm.pf/>)

3 Extraction des acides nucléiques : automate Easymag

La première étape est l'extraction de l'ADN du virus à partir des échantillons 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...).

3.1 Principe

L'échantillon est dans un premier temps mélangé à un tampon de lyse contenant du thiocyanate de guanidine, un puissant agent dénaturant où toute matière cellulaire, particule virale, bactérie ou champignon présent se rompra à son contact libérant ainsi les AN. Le tampon de lyse neutralise

également les nucléases présentes dans l'échantillon. Le processus d'extraction est déclenché en ajoutant de la silice magnétique à l'échantillon lysé. Les conditions salines élevées provoqueront la fixation des AN à la silice magnétique. La silice magnétique est ensuite lavée à plusieurs reprises au moyen de deux tampons de lavage. Puis, les acides nucléiques sont libérés de la silice magnétique 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. Les billes sont ensuite séparées du tampon d'élution grâce au système d'aimantation. La solution obtenue concentrée en ADN viral peut être conservée à -20°C pour une utilisation ultérieure (Figure 44).

3.2 Technique

Nous avons généralement réalisé l'extraction à partir de 500 µl de sérum patient et élué les AN dans un volume final de 50 µl.

Pour certains patients dont la CV était faible (< 3,5 log d'UI/mL), nous avons procédé à une étape préalable de centrifugation à 24 000 g pendant 30 minutes puis élué dans un volume final plus faible, variable selon la quantité de sérum disponible, afin de concentrer au maximum l'ADN.

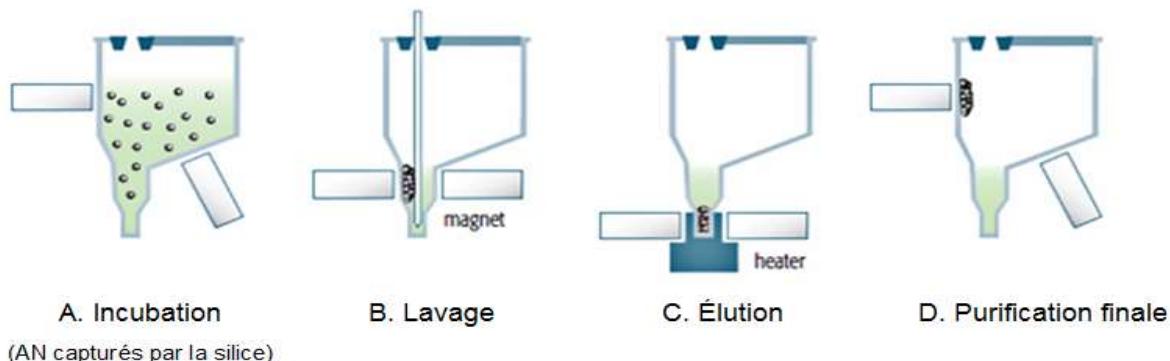


Figure 44 : Principe de l'extraction de l'ADN du VHB par easyMAG (d'après <http://www.biomerieux-diagnostics.com/nuclisensr-easymag>)

4 Amplification des gènes S et préS

4.1 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 préS1 et préS2) par PCR en point final. La réaction d'amplification se fait 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 min) permettant notamment la dénaturation initiale de l'ADN double brin, chaque cycle comportera trois phases successives (Figure 45).

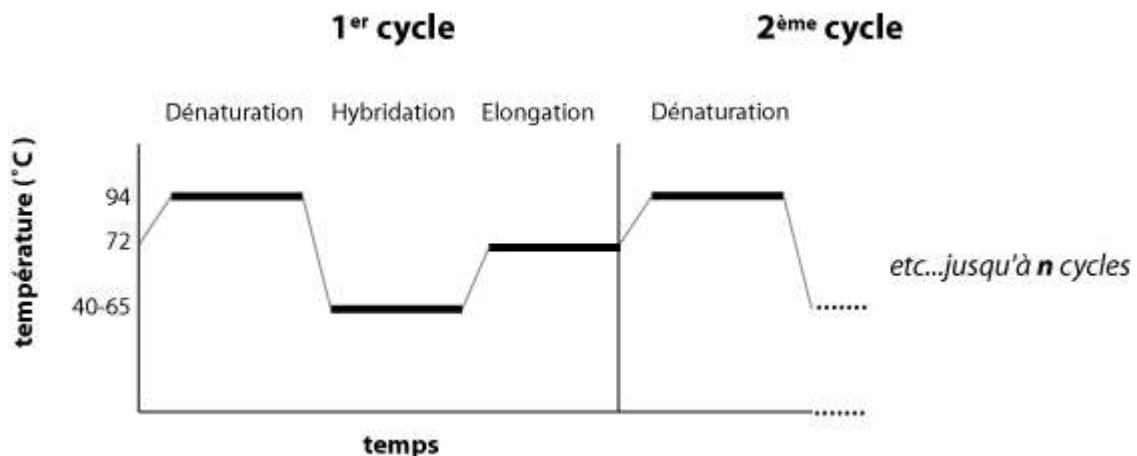


Figure 45 : Etapes successives d'un cycle de PCR
(d'après http://bioutils.unige.ch/experiences/expe_PCR_PV92.php)

La première phase (94-98°C pendant 20 à 30 s) est la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin. La deuxième phase (40-70°C pendant 20 à 40 s) correspond à l'hybridation des amorces aux brins d'ADN matrice à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Les amorces 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'elongation au cours de laquelle la polymérase va synthétiser à partir des amorces le brin d'ADN complémentaire. Après le dernier cycle, une phase d'elongation finale (5 à 15 min) va permettre de s'assurer qu'il ne reste plus d'ADN simple brin dans le milieu.

Dans l'objectif d'optimiser l'amplification en terme de sensibilité et pour obtenir des segments amplifiés d'une longueur compatible avec le séquençage nucléotidique, nous avons opté pour une première PCR, dite PCR1, couvrant l'intégralité de la zone d'intérêt suivie de une ou deux PCR « semi-nichées » utilisant des amorces internes à la PCR1.

Cette technique permet de réduire le risque de contamination en limitant l'amplification de régions aspécifiques (le produit final interagit avec deux couples d'amorces 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.

4.2 Choix des amores

Les techniques suivantes ont été mises en place par le Docteur Aurélie Velay (données non publiées).

- 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'est avéré que ces amores pouvaient aussi s'aligner sur du VHB de génotype E car nous avons trouvé parmi les quatorze patients étudiés cinq patients de génotype E. Les amores sont donc situées dans une zone du génome du VHB qui est proche pour les trois génotypes A, D, E (Figure 46). Il s'agit des amores *P2f* (sens) et *979* (antisens) (Olinger *et al.*, 2006). Un premier amplicon d'environ 900 pb est alors obtenu, couvrant entièrement la région S (Figure 47). La deuxième étape comprend 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 337 et 659 pb. 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 800 pb sur 1032) (Figure 48).

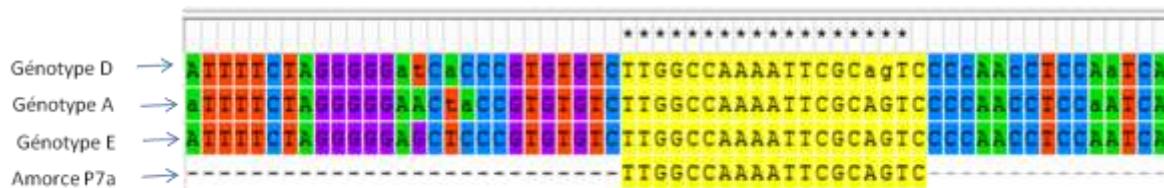


Figure 46 : Amorce P7a (jaune) alignée grâce au logiciel Mega avec les génotypes A, D, E

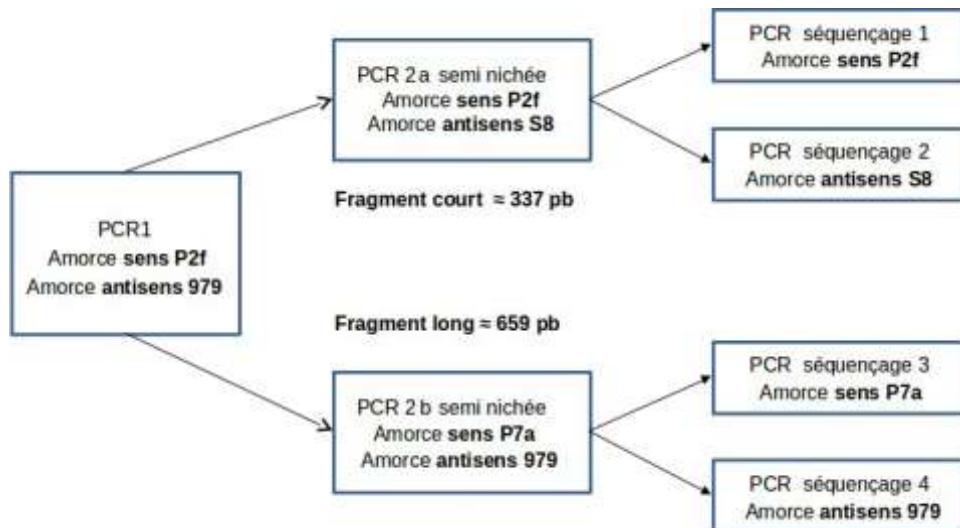


Figure 47 : Schéma des PCR permettant le séquençage de la région S

La figure 46 montre qu'il y a peu de différences entre les génotypes A, D, E dans la zone où s'hybride l'amorce P7a. Cela prouve que celle-ci peut être validée pour la recherche de génotype E.

Nous retrouvons des résultats équivalents avec les autres amorces aussi bien pour l'étude du domaine S que préS.

- Gènes préS

La région préS (= gènes préS1 + préS2) (489 à 522 pb) peut être séquencée en une seule étape. La PCR1 permet l'amplification d'un fragment couvrant intégralement la région préS en utilisant les amorces *P4* (sens) et *P7arev* (antisens) (Figure 49) (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 557 pb (Figure 49).

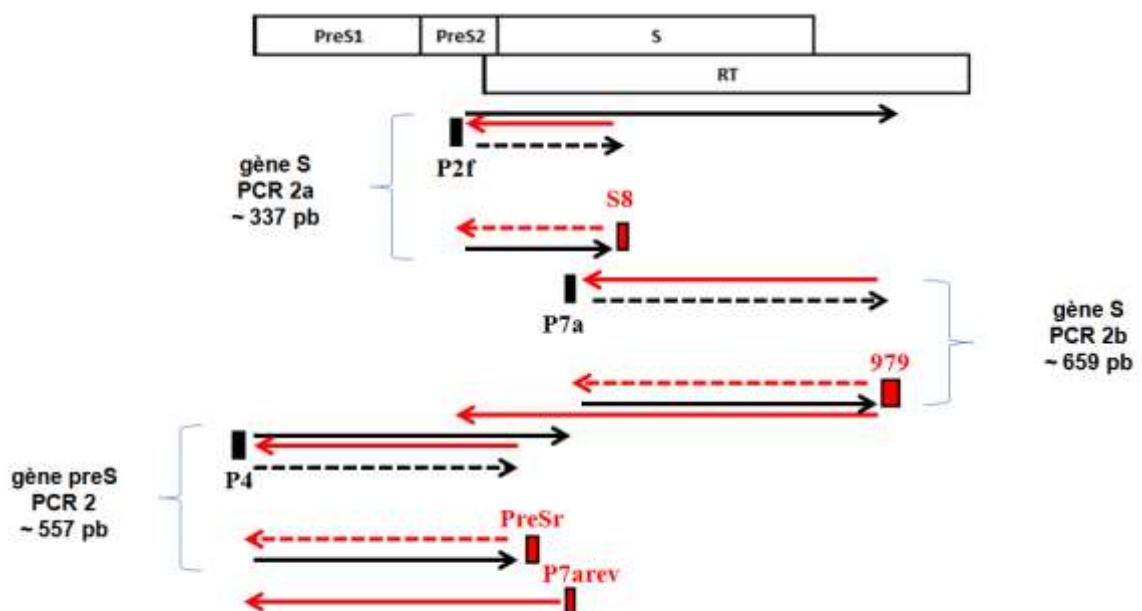


Figure 48 : Séquençage des gènes préS et S (RT). Emplacement des amorces utilisées par rapport aux cadres de lecture préS/S et Pol (Malve, 2014)

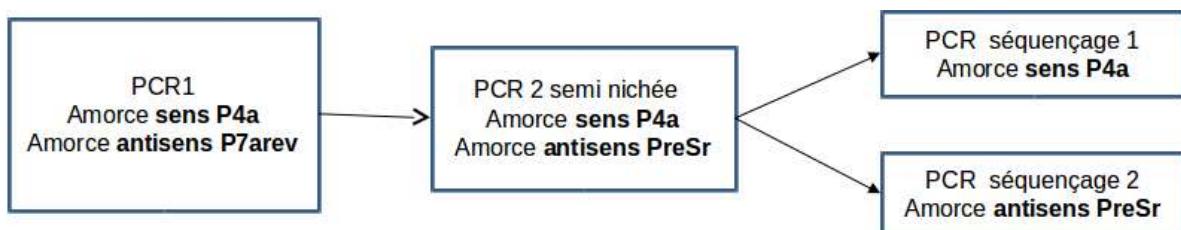


Figure 49 : Schéma des PCR permettant le séquençage de la région préS

4.3 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) 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 est donc bien adaptée aux réactions de séquençage pour lesquelles la séquence en ADN doit être la plus exacte 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.

Composition d'un mix pour un échantillon d'ADN :

Amorce Sens (10 µM)	Amorce Antisens (10 µM)	Master Mix	DMSO	Eau	Extrait ADN pour la PCR1 Produit de PCR1 pour la PCR2
0,75 µL	0,75 µL	12,5 µL	0,6 µL	5,4 µL	5 µL

Remarque pour la PCR 1 : pour les échantillons dont la CV était faible (inférieure à 3 log UI/mL), nous avons augmenté la quantité d'ADN en ajoutant 8 µL d'extrait et jusqu'à 10 µL pour les CV très faibles (inférieure à 2 log UI/mL). Il faut dans ce cas retirer la quantité d'eau correspondante.

Remarque pour la PCR 2 : pour les échantillons dont la CV était forte avec présence de larges bandes et bandes aspécifiques en gel d'électrophorèse (voir ci-après), nous avons ajouté 5 µL 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
61°C 30 secondes (hybridation) pour la PCR 1	
62°C 20 secondes (hybridation) pour la PCR 2	
72°C 30 secondes (élongation)	
72°C 7 minutes (élongation finale)	1 cycle

5 Vérification de la taille des fragments amplifiés : 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 (figure 50).

Nous avons utilisé pour cela des gels d'agarose 1,5% enrichis en GelRed™ qui est un agent intercalant de l'ADN permettant la détection de la molécule en émettant une fluorescence proportionnelle à la quantité.

Dans un premier temps, il faut déposer 7 µL de produit par puits (5 µL de produit amplifié et 2 µL d'agent alourdisseur). La migration dure ensuite 35 minutes sous 100 V. 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'automate Gel doc XR + system (Biorad) et identifiées grâce à la migration en parallèle d'un marqueur de taille (« 100bP DNA Ladder », Invitrogen™). On utilise le logiciel Quantity One 1-D Analysis Software pour récupérer la photo du gel.

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)

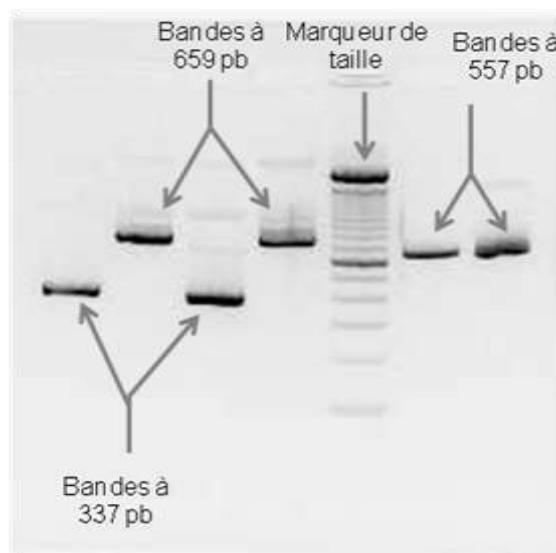


Figure 50 : Exemple de migration sur gel (d'après des résultats personnels)

6 Purifications et séquençage

6.1 Première purification

Une première purification des produits de PCR2 est nécessaire avant la PCR de séquençage. On utilise le Kit de purification d'ADN sur colonne, basé sur la fixation/élution sur membrane de silice « QIA quick PCR purification kit », laboratoire QIAGEN selon le protocole du fabricant (Annexe 1), pouvant purifier très simplement des ADN de 70 pb à 10 kb.

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 amores. L'ADN est ensuite élué avec un tampon spécifique et récupéré après centrifugation.

6.2 PCR de séquençage

Cette PCR est basée sur la méthode de séquençage de Sanger et consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Dans chaque mix, une seule amorce sera utilisée. La polymérase incorpore les nucléotides (dNTPs) libres présents dans le milieu mais aussi des 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 (Figure 51).

Les brins sens et anti-sens sont ainsi séquencés et comparés afin de bâtir une séquence consensus, somme des deux brins.

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.

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

- 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 amores sens et antisens à 10 µM.

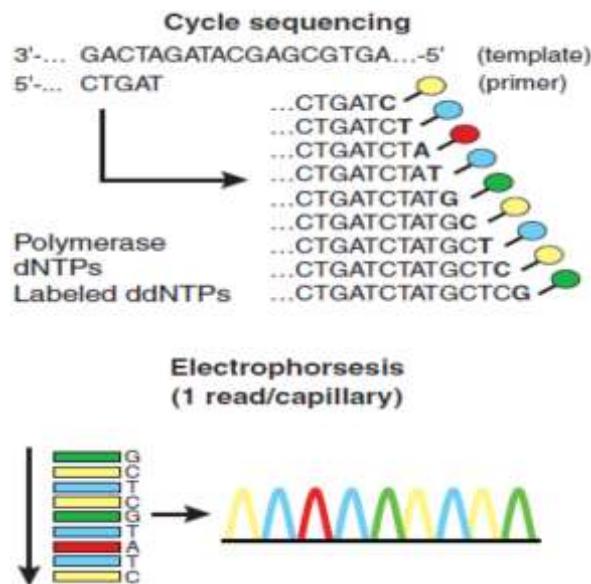


Figure 51 : Principe de la PCR de séquençage (d'après <http://www.mdpi.com/>)

Composition du mix pour un patient et une amorce

Amorces (10 µM)	BigDye Terminator	Tampon	Eau	Produit de PCR2 amplifié
3,2 µL	2 µL	1 µL	5,8 µL	3 µL

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)	

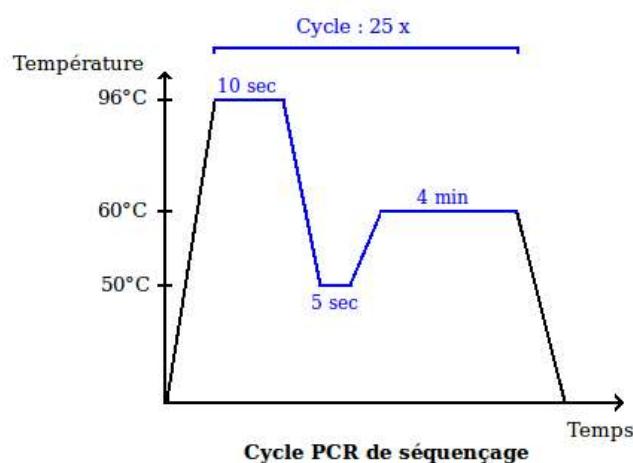


Figure 52 : Représentation schématique d'un cycle de PCR de séquençage.

6.3 Deuxième purification

Immédiatement après la PCR, le produit de séquençage doit subir une purification sur colonne de filtration sur gel utilisant le kit Dye EX® 2.0 Spin kit, laboratoire QIAGEN, selon le protocole recommandé par le fabricant. Elle permet d'éliminer les différents réactifs de la PCR de séquençage et notamment les ddNTPs marqués non incorporés.

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. Un volume de 15 µL est isolé et conservé à 4°C en attendant la PCR de séquençage (Annexe 2).

7 Séquençage

Le produit de purification de la PCR de séquençage est analysé sur le séquenceur automatique ABI 3100 basé sur le principe de l'électrophorèse capillaire. Ainsi, les séquences des brins sens et antisens sont obtenues pour chaque fragment.

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 quatre 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 longueur d'onde spécifique du ddNTP.

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

8 Interprétation des résultats du séquençage par analyse bio informatique

8.1 Logiciel MEGA 6.0

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) est un logiciel intuitif que nous avons utilisé pour ses fonctions d'alignement de séquences à partir des données brutes précédemment obtenues pour chaque patient. La première étape consiste à nettoyer les séquences pour cibler la zone d'intérêt. Il est indispensable de retourner les séquences antisens et de remplacer chaque base par sa base complémentaire. Les brins antisens sont donc « reverse-complémentés ». Un alignement des séquences nettoyées est réalisé par rapport à une séquence de référence du gène correspondant. Une comparaison est faite entre le brin sens et antisens. Cela permet de lever certaines ambiguïtés de lecture. Il est possible 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 53, 54). 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 53 : Exemple de séquences nucléotidiques sur Mega du brin sens P2F et anti sens S8 et présence de base dégénérée pour un même patient (C ou T = Y)

Les séquences d'AN sont ensuite traduites en acides aminés grâce à une fonction du logiciel. On obtient donc finalement pour chaque patient une séquence consensus en AN et en acides aminés (AA) pour les gènes S, RT (~ 830 pb/ 1032) et préS. Nous enregistrons ces fichiers sous le format Fasta (base internationale pour l'étude des séquences). Les données brutes sont analysées par deux opérateurs différents afin de limiter le risque d'erreur pouvant être lié à une lecture subjective.

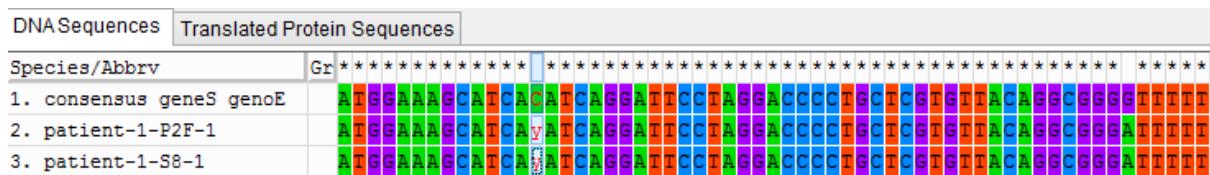


Figure 54 : Exemple d'alignement de séquences dans Mega 6

8.2 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 résistance aux traitements) et certaines mutations d'intérêt de l'Ag HBs.

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

8.3 Site Internet Pubmed avec la fonction BLAST (d'après <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Ce site est une base de données où des milliers de séquences de références concernant de multiples domaines ont été répertoriées. Il permet d'intégrer les séquences au format fasta et de réaliser un BLAST, c'est-à-dire une comparaison par rapport à des séquences répertoriées. L'intérêt était d'identifier le génotype du VHB quand la séquence était impossible à analyser sur GREG+. Nous l'avons par ailleurs utilisé pour l'étude des sous-types VIH.

8.4 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'intérêt (en acides nucléiques ou acides aminés). Il calcule ainsi la fréquence de chaque acide aminé (ou nucléotide) dans chacune des

deux cohortes et met en évidence les différences de séquence entre celles-ci (Korber and Myers, 1992).

Pour chaque patient, la séquence obtenue (S, préS et RT) a été comparée à une séquence consensus de référence (S, préS et RT) du génotype correspondant (A, D et E). On a ainsi pu recenser l'ensemble des mutations des protéines S et préS.

8.5 Crédit d'une séquence consensus pour les gènes préS/S du VHB de génotype E

Suite à l'analyse des résultats de certains patients dans GREG+, nous avons réalisé qu'une proportion importante des patients étudiés était de génotype E. Nous avons donc créé une séquence consensus à laquelle nous référer. Ce consensus a été créé à partir de la banque de données HBVdb dans laquelle est référencé un nombre important de séquences types pour chaque génotype et pour chaque cadre de lecture. Il y avait 267 séquences concernant notre zone d'intérêt pour le génotype E. Nous avons copié ces séquences et analysé l'alignement grâce à Vespa pour savoir quelle était la base dominante à chaque position. Enfin, à partir d'un fichier Excel, nous avons trié les données et aligné la séquence préS/S pour le génotype E. Nous avons voulu vérifier l'efficacité de ce consensus pour savoir s'il était utilisable en routine. Nous avons de nouveau utilisé Vespa pour comparer notre consensus à une séquence de l'HBVdb, et nous avons obtenu le même nombre d'AN. En comparant aux données de la littérature, nous avons aussi confirmé que la protéine L de la séquence du consensus, association du domaine préS1/préS2/S, était composée de 399 acides aminés tel que décrit pour le génotype E.

8.6 Logiciel ANTHEPROT

ANTHEPROT (Deléage *et al.*, 2001) est un logiciel gratuit et autonome destiné à l'analyse des séquences protéiques. De nombreux outils et procédés y sont disponibles : analyse physico-chimique de la protéine (pH, courbe de titration, charge, hydrophobie/hydrophilie,...), prédiction de structures secondaires et des domaines transmembranaires, accessibilité, différents modes de représentation tridimensionnelle,...

Ce logiciel permet en effet de mettre en évidence les sites de surface d'une protéine et d'évaluer leur niveau d'antigénicité en intégrant les trois échelles les plus pertinentes : l'hydrophilie HPLC (Parker), l'accessibilité (Janin) et les valeurs B de flexibilité (Karplus & Schultz) (Parker *et al.*, 1986). Après soumission de la séquence protéique primaire au logiciel, celui-ci élabore un graphique sur lequel on retrouve en abscisse, la position des acides aminés et en ordonnée, l'évaluation de l'antigénicité en unité arbitraire (figure 55).

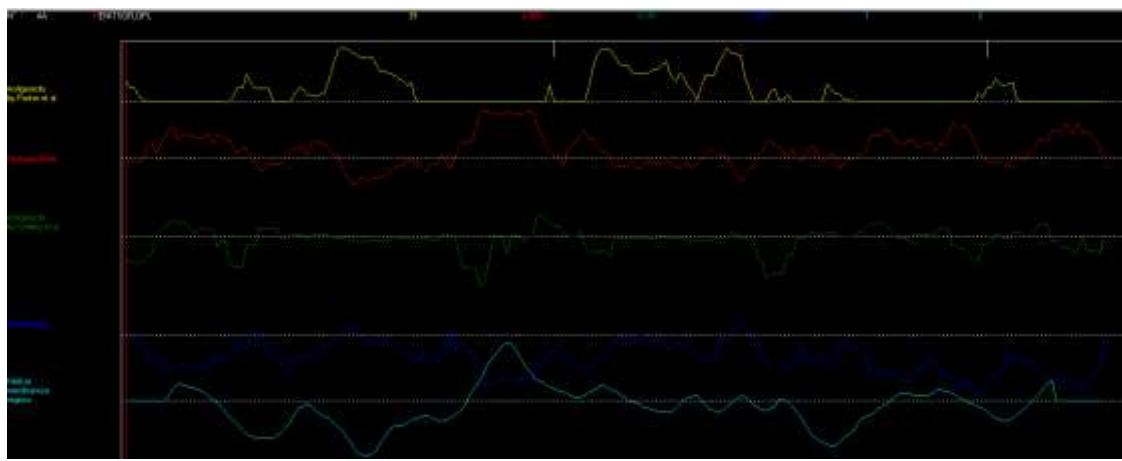


Figure 55 : Représentation graphique de quelques paramètres sur Antheprot : antigénicité Parker (jaune), hydrophobie (rouge), antigénicité Welling (vert), hydrophilie (bleu foncé), domaines transmembranaires en hélice α (bleu clair). Séquence protéique en abscisse.

Résultats et Discussion

1 Présentation de la cohorte

Parmi les patients suivis dans le service de Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Nancy, quatorze patients co-infectés VIH/VHB ont été sélectionnés (Tableau 4). Un sérum avec une charge virale VHB positive a été retrouvé pour chaque patient, ce qui a permis la réalisation du séquençage des gènes S, préS1 et préS2. Quatre de ces patients présentaient une clairance de l'Ag HBs. Deux patients ont pu être appariés avec un ou plusieurs contrôles selon l'âge, le sexe, et le génotype. Pour un des patients (FJC), les souches virales ont été étudiées à deux temps différents, en 2005 et en 2014.

Tableau 4 : Listing des patients étudiés (NR: non renseigné)

Patient / Année de naissance	Clairance de l'Ag HBs	Sexe	Génotype VHB	Sous-type VIH	Pays de naissance	Mode de transmission	Stade Clinique VIH
FJC102005 1954	Oui	M	D	B	France	Homosexuel	C3
FJC062014 1954	Oui	M	D	B	France	Homosexuel	C3
GM082013 1952	Oui	M	A	B	France	Homosexuel	C3
DC092013 1955	Non	M	A	B	France	Homosexuel	C3
MJ052003 1958	Non	M	A	B	NR	Homosexuel	A3
GD072006 1956	Non	M	A	NR	France	Homosexuel	C3
LJM092003 1959	Non	M	A	CRF02AG	France	Hétérosexuel	A3
KH052008 1976	Oui	M	A	B	France	Homosexuel	C3
KK102008 1978	Non	M	A	B	NR	Homosexuel	A2
HG012003 1974	Non	M	A	B	France	Homosexuel	A3
MW062008 1983	Oui	F	E	CRF06cpX	Burkina Faso	Hétérosexuel	A2
GA072013 1971	Non	F	E	CRF02AG	Côte d'Ivoire	Hétérosexuel	C3
HM1996 1953	Non	M	E	CRF02AG	France	Hétérosexuel	A3
FG102001 1950	Non	M	E	NR	Congo Brazzaville	Hétérosexuel	C3
OL022008 1977	Non	M	E	CRF06cpX	Burkina Faso	Inconnu	A3

2 Analyse phylogénique des souches VIH et VHB des patients inclus dans l'étude

Les séquences des gènes de la protéase et de la reverse transcriptase du VIH ainsi que les séquences des gènes préS/S du VHB des patients inclus ont été analysées grâce au logiciel MEGA. Deux arbres phylogénétiques ont pu être réalisés (figures 56 et 57).

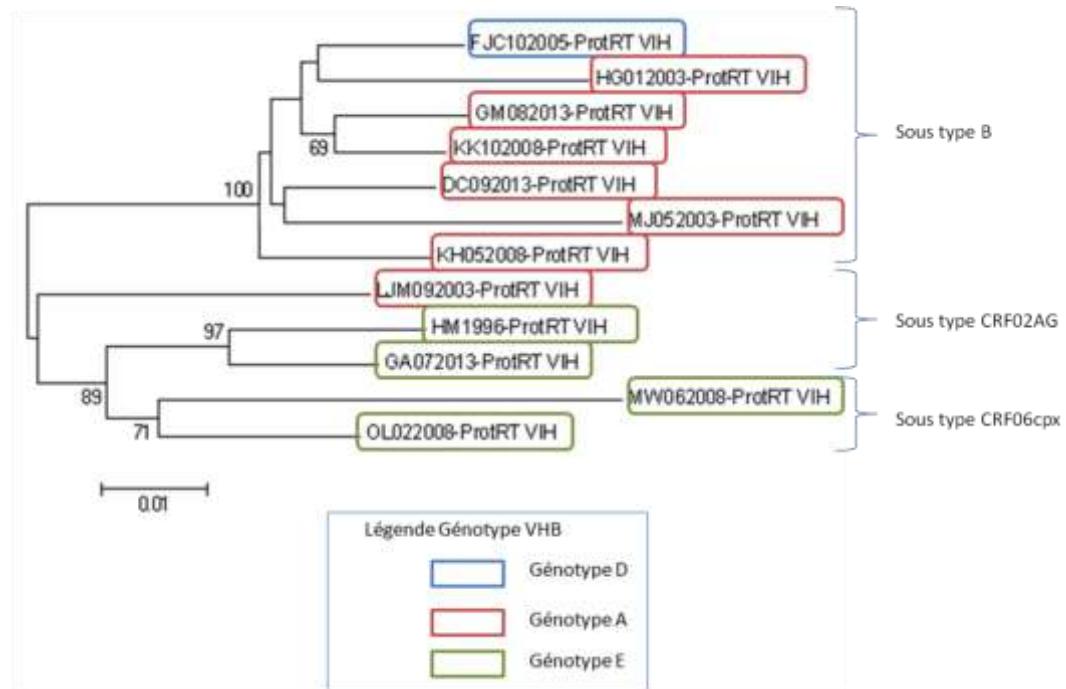


Figure 56 : Arbre phylogénétique des séquences de la protéase et de la reverse transcriptase du VIH

Douze des quatorze patients étudiés sont représentés sur l'arbre phylogénétique (pour rappel, FJC062014 et FJC102005 sont le même patient donc nous l'avons intégré une seule fois à l'arbre).

Les séquences VIH de GD072006 et FG102001 n'étaient pas disponibles.

Sept patients sont contaminés par un VIH de sous-type B. Cinq patients se détachent sur une deuxième branche, contaminés par des formes recombinantes circulantes, dont trois CRF02-AG et deux CRF06-cpx. Ces deux souches sont proches d'un point de vue génétique. En effet, ce sont des formes recombinantes circulantes (CRF) impliquant différents sous-types :

- CRF02-AG est un recombinant des sous-types A et G au niveau du gène pol,
- CRF06-cpx est un recombinant constitué de quatre sous-types A, G, K et J. Au niveau du gène pol, les sous-types A et G prédominent et le sous-type K est également présent.

La présence concomitante des sous-types A et G dans le gène de la pol explique le lien entre les souches CRF02-AG et CRF06-cpx.

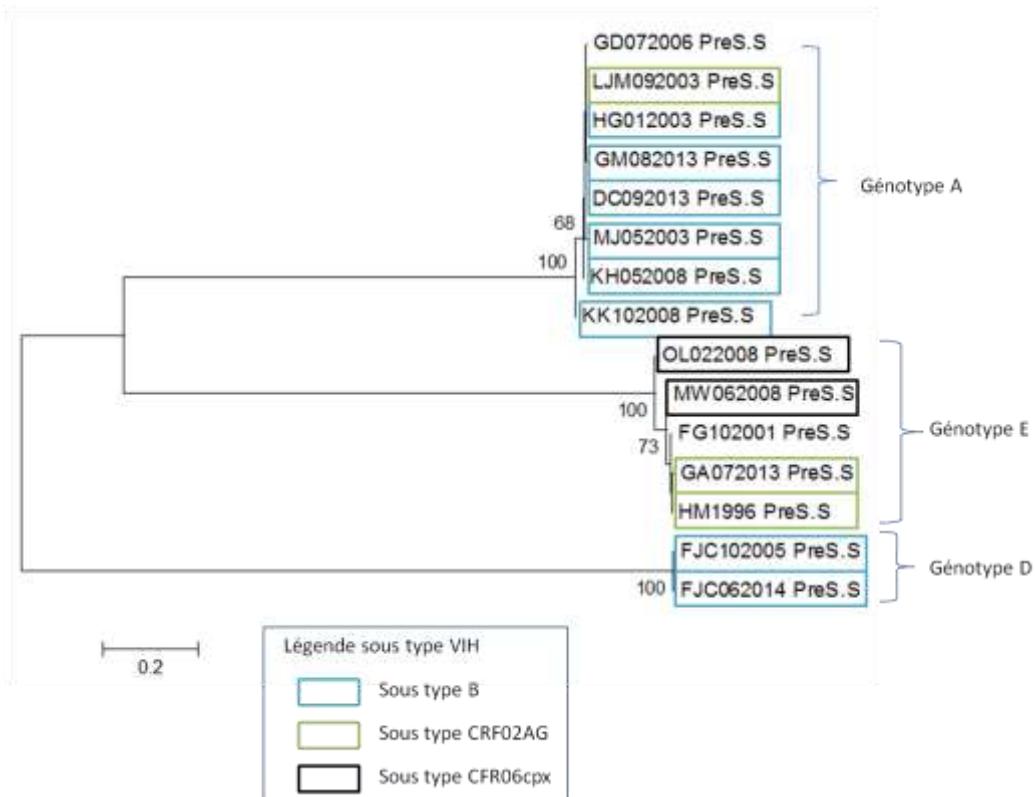


Figure 57 : Arbre phylogénétique des séquences des gènes préS /S du VHB

Sur cet arbre sont représentées les séquences obtenues par analyse phylogénétique des quatorze patients de l'étude.

A travers ces deux arbres phylogénétiques, ressort un lien épidémiologique évident entre les sous-types VIH et génotypes VHB des patients de la cohorte.

Le génotype E est retrouvé majoritairement dans le continent africain : sur les cinq patients de génotypes E, quatre sont originaires d'un pays africain. Deux patients sont originaires du Burkina Fasso, où le CRF06-cpx joue un rôle important car il représente 20 à 50% des virus circulants dans ce pays (Martine Peeters and Chaix, 2013).

D'autre part, le CRF02-AG prédomine en Afrique occidentale avec des prévalences variant entre 50 et 80% (Martine Peeters and Chaix, 2013).

En France, c'est le sous-type B qui prédomine suivi par le CRF02-AG.

Les caractéristiques de notre cohorte sont concordantes avec l'épidémiologie mondiale du VIH et du VHB.

D'après the EPIB 2012 study (Piroth *et al.*, 2015), la répartition des génotypes du VHB retrouvés chez les patients co-infectés VIH/VHB en France est la suivante :

Tableau 5 : Comparaison de la distribution des génotypes VHB retrouvés chez les co-infectés dans l'EPIB 2012 et notre cohorte.

EPIB 2012 n = 21	Cohorte n = 14
Génotype A = 45,8%	Génotype A = 57%
Génotype D = 0%	Génotype D = 7%
Génotype E = 37,5%	Génotype E = 35,7%

La cohorte de l'EPIB 2012 a été établie à partir de résultats sélectionnés dans 19 centres hospitaliers français. D'un point de vue épidémiologique, nous pouvons observer que la distribution des génotypes est proche entre l'EPIB 2012 et notre cohorte, ce qui signifie que les patients co-infectés étudiés au CHU de Nancy sont comparables à la distribution nationale française.

3 Modalités de l'analyse bioinformatique des données

La longueur et la séquence du génome du VHB varient en fonction du génotype. Ainsi, pour le génotype A, 119 AA couvrent la région préS1 alors que le génotype D n'est fait que de 108 AA en raison de la délétion des 11 premiers AA au début de préS1. Les régions préS2 et S ne varient pas selon les génotypes et sont composées de 55 AA et 226 AA respectivement. Une numérotation unique a été utilisée pour le domaine préS basée sur la numérotation du génotype D (1 : 163). Ainsi les AA situés en amont du premier AA du génotype D seront numérotés en négatif, de -11 à -1 pour le génotype A et de -10 à -1 pour le génotype E (Figure 58). Dans la région S sont définis la région hydrophile majeure (MHR) et le déterminant "a".

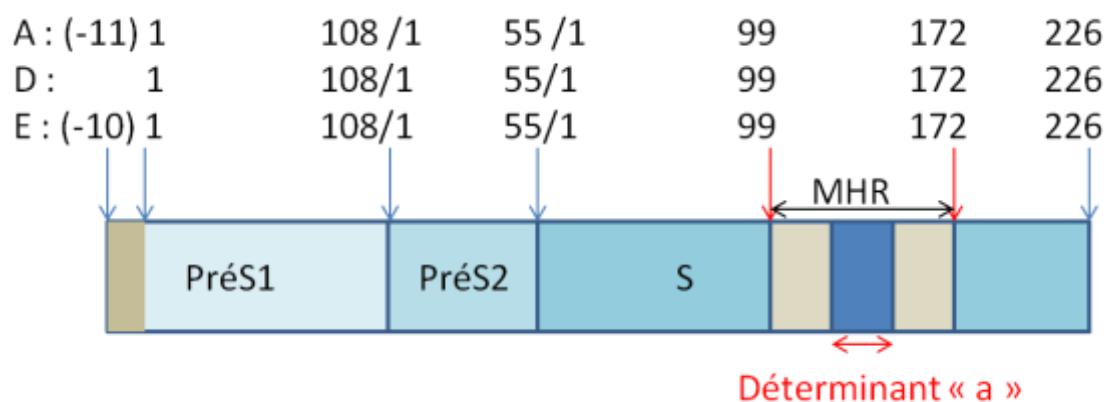
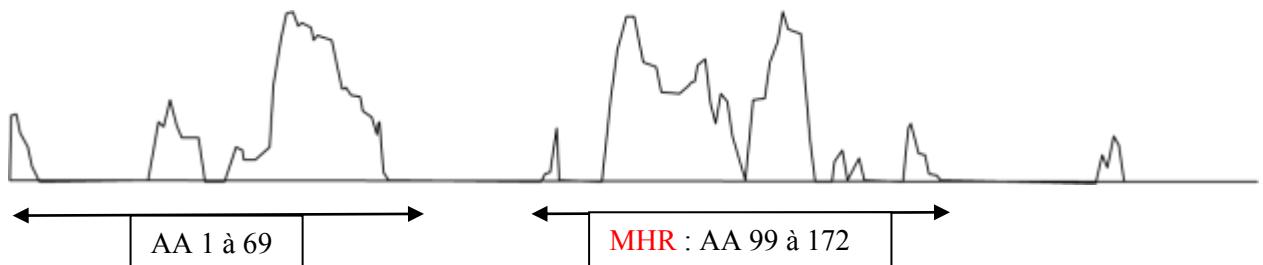


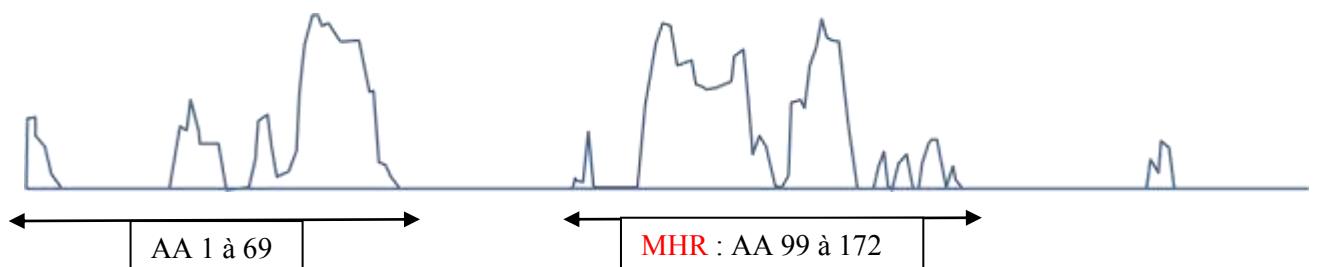
Figure 58 : Représentation graphique des gènes préS et S du VHB

Concernant le profil antigénique prédict par bio-informatique, nous vous présentons ci-dessous les profils obtenus avec la séquence consensus de chaque génotype viral (D, A, et E), pour les domaines S et préS de l'Ag HBs.

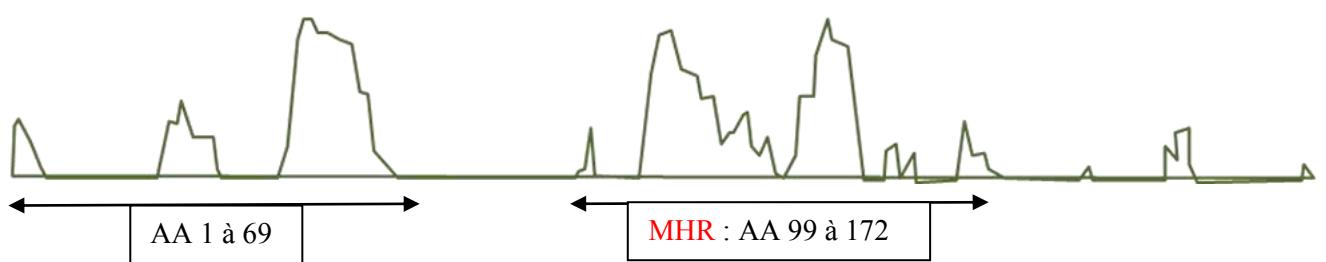
- Domaine S



Profil antigénique du domaine S de l'Ag HBs du VHB de génotype D



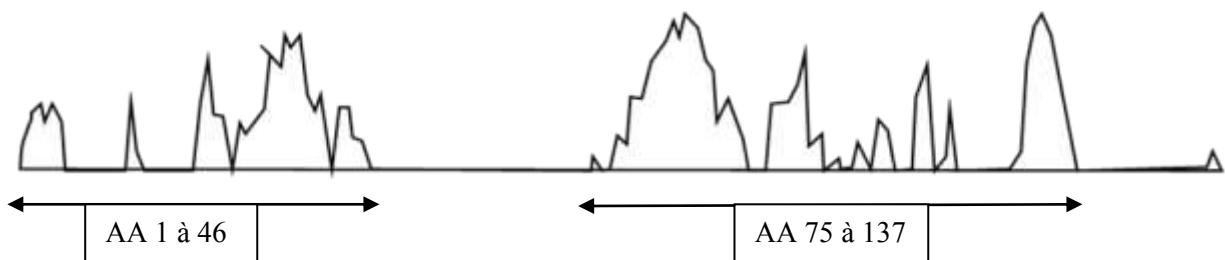
Profil antigénique du domaine S de l'Ag HBs du VHB de génotype A



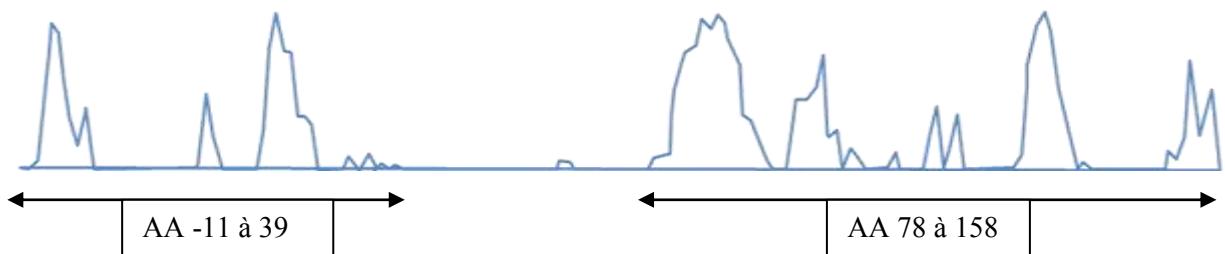
Profil antigénique du domaine S de l'Ag HBs du VHB de génotype E

Nous pouvons observer que les profils antigéniques des souches de génotypes A et D sont relativement proches alors que de grandes différences sont visibles pour le génotype E, notamment au niveau de la MHR où l'antigénicité prédict est diminuée par rapport aux autres génotypes.

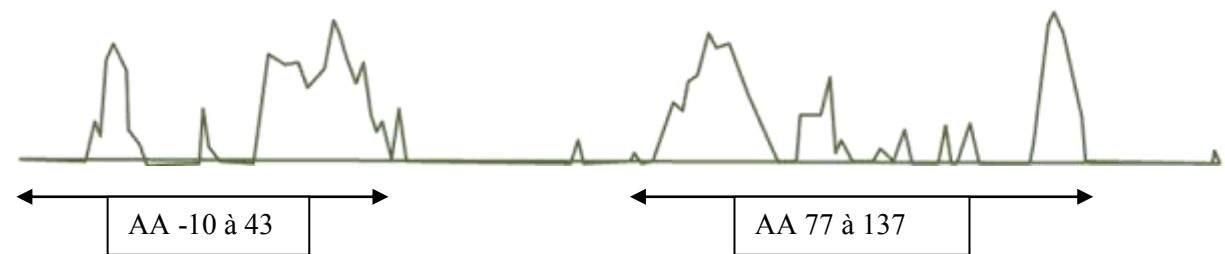
- Domaine préS



Profil antigénique du domaine préS de l'Ag HBs du VHB de génotype D



Profil antigénique du domaine préS de l'Ag HBs du VHB de génotype A



Profil antigénique du domaine préS de l'Ag HBs du VHB de génotype E

Le profil antigénique du domaine préS prédit par Anthéprot distingue deux zones antigéniques pour chaque génotype : une, en début de préS1, l'autre située sur la 2^{ème} moitié de préS1 et le début de préS2. Il est intéressant de préciser que la zone de fixation de préS1 pour le récepteur hNTCP (AA 2-48) se superpose avec la 1^{ère} zone antigénique prédictive. Le génotype A présente un profil antigénique diminué sur la 1^{ère} partie par rapport aux génotypes D et E, alors que sur la 2^{ème} zone les profils sont proches, légèrement augmenté pour le génotype D.

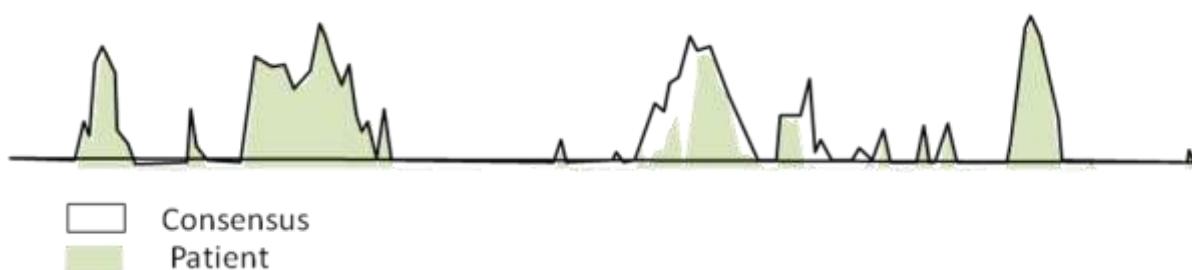
Pour expliquer au mieux les résultats, nous avons choisis de faire 3 parties correspondant chacune à l'étude d'un génotype particulier. Nous commencerons par le génotype D, puis le génotype A et enfin le génotype E.

Nous présenterons d'une part les mutations en AA dans les différents domaines fonctionnels de l'Ag HBs et d'autre part leur impact sur le profil antigénique prédict.

L'ensemble des mutations observées pour chacun des patients a été recensé par comparaison avec une séquence de référence. Les séquences de référence utilisées se situent en *Annexe 3*. Le code international des AA a été utilisé pour nommer une mutation (ex : K122R) ; la présence d'une double population est également signalée (ex : F8F/L).

Une mutation au niveau de la protéine S peut induire une mutation au niveau de la RT en raison du chevauchement des cadres de lecture. Nous avons décidé de ne pas représenter la région RT étant donné que très peu de patients ont des mutations dans cette zone, nous citerons ces mutations lorsqu'elles ont un lien avec la résistance aux antiviraux.

Pour la comparaison de chaque profil antigénique des gènes préS/S retrouvé chez les patients avec le consensus correspondant, nous avons superposé les deux profils avec en trait plein noir le consensus et en fond coloré, le patient.



4 Patient de génotype D

4.1 Présentation du cas

Le premier patient d'intérêt est un homme né en 1954 suivi au CHU de Nancy depuis 1996 pour son infection au VIH. Au moment du diagnostic, un traitement à base de 3TC a été instauré et du TDF a été ajouté en 2003. Voici selon le tableau et le graphique, l'évolution biologique et thérapeutique au cours du temps depuis la première sérologie concernant le VHB réalisée au CHU de Nancy (Tableau 6, Figure 59).

Tableau 6 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de FJC

Date	Taux CD4 cell/mm ³	CV VIH log copies/mL	CV VHB log UI/mL	Ag HBs	Ac anti-HBs	Traitemen
07/10/2005	251	5	3,6	Positif	Négatif	3TC + TDF
18/11/2005	388	/	2,3	Positif	Négatif	3TC + TDF
26/04/2006	230	0,2	/	Positif	Négatif	FTC + TDF
15/01/2009	737	1,61	ND	Douteux	Négatif	FTC + TDF
15/10/2009	852	ND	ND	Négatif	Négatif	FTC + TDF
10/02/2011	745	ND	ND	Négatif	Négatif	FTC + TDF
31/05/2012	903	ND	ND	Négatif	Négatif	FTC + TDF
31/01/2014	739	ND	/	Négatif	Négatif	FTC + TDF
18/06/2014	/	ND	6	Positif	Négatif	/
26/09/2014	585	ND	ND	Positif	Négatif	FTC + TDF
10/03/2015	/	ND	ND	Négatif	Négatif	FTC + TDF

Légende : ND = Non Déetectable , 3TC = Lamivudine, TDF = Ténofovir, FTC = Emtricitabine, Séquençage

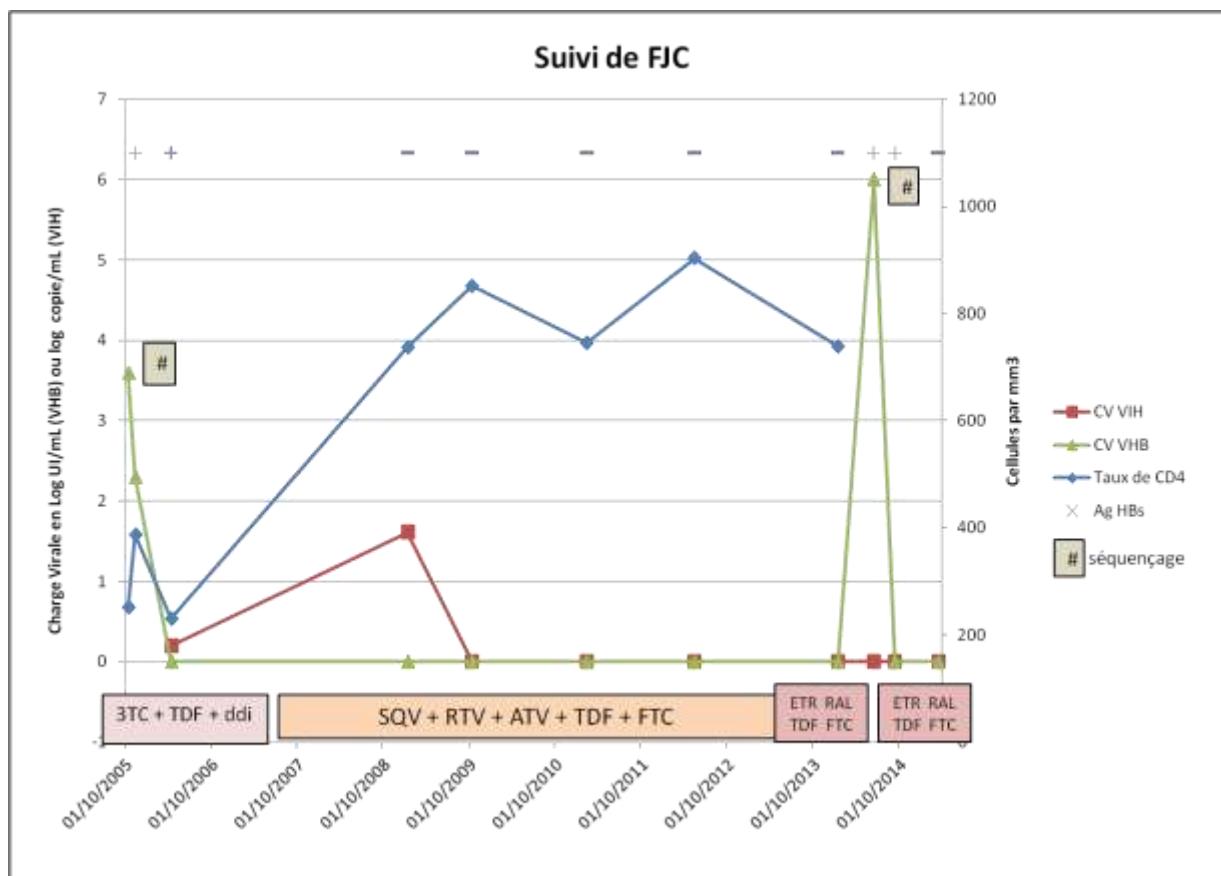


Figure 59 : Suivi biologique et thérapeutique anti VHB et VIH au cours du temps de FJC

Légende : DDI = Didanosine, SQV = Saquinavir, RTV = Ritonavir, ATV = Atazanavir, ETR = Etravirine, RAL = Raltegravir

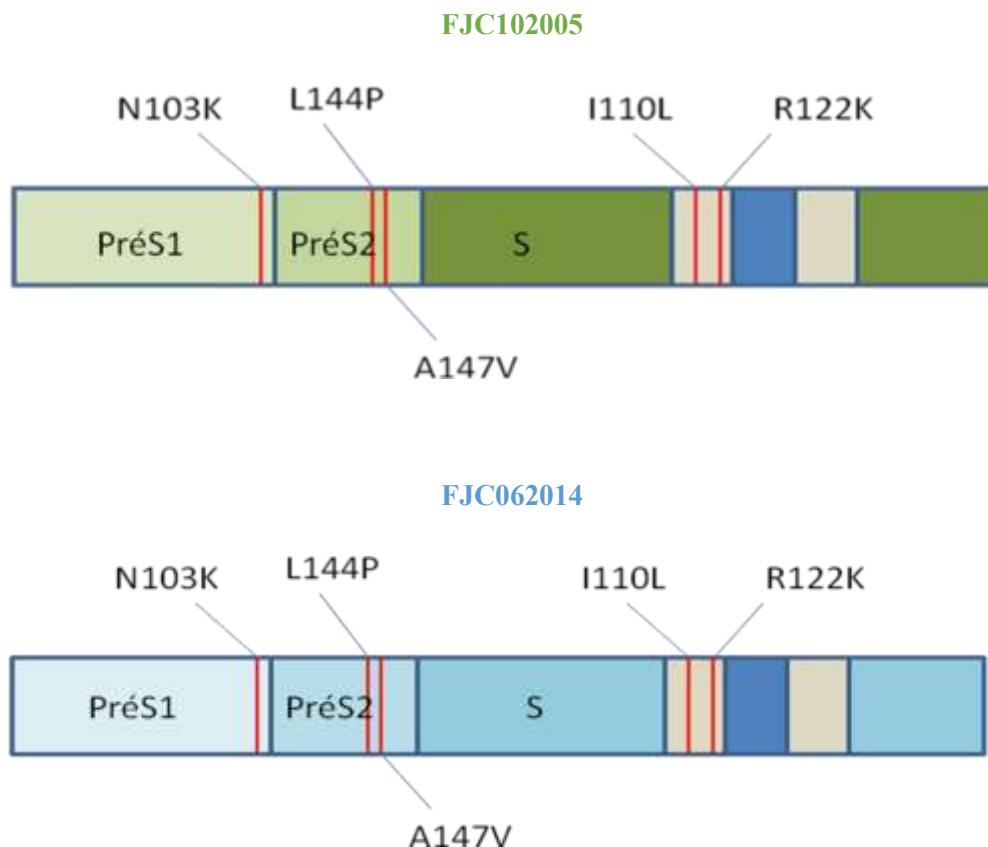
La date de la primo-infection VHB n'est pas connue pour ce patient. La première sérologie pour le VHB réalisée en fin 2005, (Ag HBe négatif), est associée à une charge virale VHB positive à 3,6 log d'UI/mL. En 2006, le 3TC a été arrêté et remplacé par du FTC. Ce patient a obtenu une première clairance de l'Ag HBs en 2009 sous TDF + FTC. Après huit ans de traitement, un switch thérapeutique anti-VIH a été discuté afin de diminuer les effets secondaires du TDF + FTC (néphropathie avec une clairance à la créatinine à 78 mL/min). En dépit d'une CV VHB indétectable et d'un Ag HBs négatif depuis 5 ans, l'arrêt des molécules ciblant le VHB a été à l'origine d'une réactivation du VHB. Une charge virale a été retrouvée fortement positive à 6 log d'UI/mL et l'Ag HBs s'est positivé à nouveau. Le traitement initial a été remis et trois mois plus tard la charge virale s'était négativée et l'Ag HBs avait fortement diminué (de 342 UI/mL le 18/06/14 à 1,85 UI/mL le 26/09/14). En mars 2015, l'Ag HBs est devenu négatif. Une deuxième clairance de l'Ag HBs a donc été obtenue.

Durant la période étudiée entre 2005 et 2015, les transaminases ont toujours été dans les normes physiologiques.

Nous avons séquencé la souche virale de ce patient avant la clairance de l'Ag HBs (octobre 2005) et après la réactivation du VHB suite à l'arrêt du traitement (Juin 2014) afin de comparer les deux souches virales.

4.2 Mutations détectées

Ci-dessous sont représentées les mutations retrouvées sur les gènes préS1/S2 et S du patient FJC.



Il est intéressant de relever que les mutations retrouvées sur les régions S et préS des souches virales de 2005 (FJC102005) et de 2014 (FJC062014) sont identiques.

Comparaison des résultats entre les 2 séquençages de FJC :

Très peu de mutations sur le gène S (I110L et R122K) ou préS (N103K, L144P, A147V) sont retrouvées grâce au séquençage.

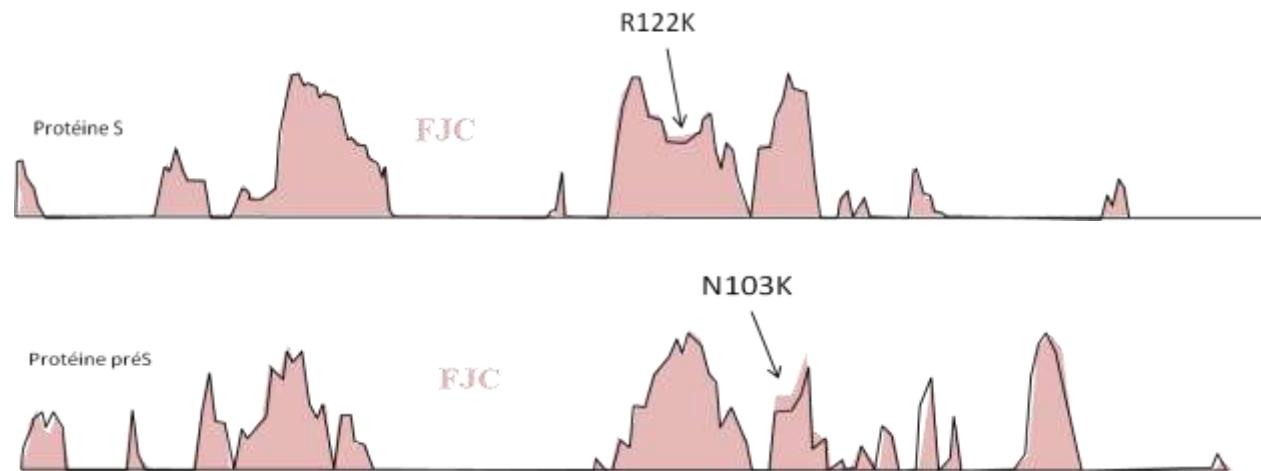
Au cours du premier séquençage, le 07/10/2005, le patient était sous 3TC et TDF depuis 2003 et la charge virale VHB restait positive (3,6 log d'UI/mL). Ce qui peut être expliqué par une mauvaise observance, d'autant qu'à la même époque, la charge virale VIH était de 5 log de copies/mL. Le

résultat du séquençage nous indique qu'il n'y a pourtant pas de mutation associée à une résistance au 3TC ou au TDF sur le gène de la RT du VHB.

Au moment des résultats du 2ème séquençage, le patient n'était plus sous traitement depuis 1 mois (arrêt du TDF + FTC en mai 2014). Nous n'avons pas retrouvé de mutations supplémentaires que ce soit pour les gènes préS/S et RT. Nous savons que le virus réactive à partir de l'ADNccc du foie, c'est donc probablement la souche initiale détectée en 2005 qui a été réactivée et a été retrouvée grâce au séquençage.

4.3 Profils antigéniques sur Antheprot

Pour simplifier les illustrations nous avons choisi de ne traiter qu'un seul profil de FJC étant donné que les deux séquences étaient identiques et par conséquent que le profil antigénique l'était également. Nous l'avons comparé au profil du consensus de génotype D. Ci-dessous est représentée la prédiction de l'antigénicité des domaines S et préS de FJC.



Une différence est observée entre le profil antigénique du patient et le consensus pour le domaine S. La mutation R122K augmente très légèrement le profil antigénique prédit alors que la mutation I110L n'a pas de conséquence sur l'antigénicité prédite selon le mode de calcul du logiciel.

Ces deux mutations sont situées dans la région hydrophile majeure. Grâce à VESPA et l'HBVdb, la fréquence de ces mutations a été identifiée sur 2000 séquences de gènes S de génotype D, à différents stades cliniques.

La mutation I110L n'est retrouvée que dans 1,1% des séquences et la R122K n'est retrouvée que dans 0,75% des cas, ce qui en font des mutations très rares. Dans la littérature, il est fait notion que la

mutation I110L provoquerait la perte d'un épitope pouvant être responsable d'échappement immunitaire (Ijaz et al., 2012) . Ce qui veut dire que le patient est porteur d'une mutation qui diminue l'antigénicité de la protéine S mais a tout de même réalisé la clairance de l'Ag HBs sous analogues nucléos(t)idiques. L'absence de perte d'antigénicité prédictive par Anthéprot au niveau de cette mutation s'explique par le fait que la leucine (L) et l'isoleucine (I) sont des AA proches présentant les mêmes caractéristiques physico-chimiques. Cependant, la taille de L est plus petite que I d'où la probable perte de l'épitope à l'origine de l'échappement immunitaire.

R122K n'est pas retrouvée dans la littérature comme associée à une diminution d'antigénicité. L'arginine (R) et la lysine (K) sont deux AA proches, chargés positivement et basiques. La substitution d'AA provoque tout de même une modification de l'hydrophobicité et de la charge électrique de la protéine qui peut expliquer la modification du profil antigénique prédict.

Trois mutations ont été retrouvées sur la partie préS : une concerne préS1 (N103K), les deux autres concernent préS2 (L144P , A147V).

La fréquence de ces mutations a été identifiée sur 1063 séquences de gènes préS de génotype D (HBVdb). La mutation N103K n'est retrouvée que dans 0,1% des cas et la L144P dans 1,4% des cas. Pour la mutation A147V, la fréquence est de 35%. En effet, il s'agit de la mutation la plus fréquente à cette position.

Ces mutations se situent au niveau d'épitopes B/T (Chen *et al.*, 2006), mais seule la mutation N103K a un impact sur le profil antigénique prédict de la protéine en augmentant légèrement son antigénicité. La substitution d'un AA non chargé (N) par un AA chargé positivement (K) explique la modification prédictive de l'antigénicité.

Des mutations sur les gènes préS/S avec des impacts variables sur l'antigénicité ont donc été retrouvées. Les deux souches étudiées à des temps différents sont identiques, c'est probablement la souche de 2005 qui s'est répliquée lors de la réactivation. La diminution du taux de l'Ag HBs obtenue après la reprise du TDF + FTC a été prédictive de la nouvelle clairance de l'Ag HBs obtenue en mars 2015.

4.4 Comparaison avec des patients mono-infectés

Malheureusement, pour ce patient de génotype D nous n'avons pas retrouvé de patients contrôles co-infectés. Il a donc été comparé à des patients mono-infectés sélectionnés dans une autre étude qui ont soit perdu leur Ag HBs soit présentent une CV VHB négative mais un Ag HBs persistant (données non publiées, Dr A.Velay).

Ci-dessous sont recensées les mutations retrouvées chez le patient d'intérêt co-infecté VHB/VIH et des patients mono-infectés par le VHB, traités par analogues nucléos(t)idiques et ayant présenté une clairance de l'Ag HBs ou non (Tableau 7 et 8).

Comparaison des résultats avec les patients mono infectés ayant obtenus une clairance de l'Ag HBs :

Tableau 7 : Liste des mutations retrouvées chez le patient d'intérêt FJC et des patients mono infectés par le VHB qui ont obtenu une clairance de l'Ag HbS.

Patients	Co-infection VIH+VHB	Clairance de l'Ag HbS	Mutations sur le gène S	Mutations sur le gène préS
FJC102005	Oui	Oui	I110L R122K	N103K L144P A147V
FJC062014	Oui	Oui	I110L R122K	N103K L144P A147V
BF012002 1974 F	Non	Oui	/	D43E S90T A147V
KI022000 1967 M	Non	Oui	Q30K T118A P127T Y134F L175S S207N	/
FR052009 1937 M	Non	Oui	N40S S204R Y206C	L150I
TV102005 1945 M	Non	Oui	G10R T118A P127T P142R L176P P178Q F220C	L74I S135F
MD032007 1963 M	Non	Oui	Q30K I110L L173F	N112T T114S R124K F154L
KF101999 1951 F	Non	Oui	G44E I92T W172C L175S Y206C S207R C221Y	A147V P149H

Une mutation commune sur le gène S, à savoir la I110L, est retrouvée chez 1/6 patient mono-infecté. Une mutation sur le gène préS, la A147V, est retrouvée chez deux patients mono infectés, ce qui est cohérent avec la fréquence de cette mutation dans la base de données.

Comparaison des résultats avec les patients mono infectés présentant une persistance de l'Ag HBs :

Tableau 8 : Liste des mutations retrouvées chez les patients mono infectés avec persistance de l'Ag HBs.

Patients	Clairance de l'Ag HBs	Mutations sur le gène S	Mutations sur le gène préS
WM052002 1950 F	Non	T125M P127T G159A S175L F220L	/
SA112002 1960 M	Non	T45N G112L S113N T118A T125M P127T S136Y S193L S204N S210R	L74I L150I
EJ122004 1944 M	Non	F8L Q30K N40S W196L	L150I
DR042007 1937 M	Non	T125M P127T G159V L173F S193V Y206F L213I	Q3T T7V S8P F56L N103D
CM032007 1968 M	Non	T125M P127T E164D I195M	F56L
BA122008 1975 F	Non	/	L54P Q93K A147V P149H L150I

Aucune mutation commune n'est retrouvée à part la A147V sur la partie préS chez 1 seul patient sur 6.

Il est intéressant de préciser que chez les non répondeurs mono-infectés, les mutations 125 + 127 sont retrouvées chez 4/6 patients et sont associées à une diminution de l'antigénicité prédictive.

4.5 Conclusion

La mutation A147V en préS est fréquente dans la database. Elle est retrouvée chez les non répondeurs et les répondeurs. La mutation I110L, de fréquence rare dans la database, est retrouvée chez le patient d'intérêt co-infecté et chez un patient répondeur mono-infecté mais pas chez les non répondeurs. Le patient mono-infecté présentant la mutation I110L est un homme né en 1961, originaire de France. Son historique thérapeutique est composé d'IFN pendant 24 semaines, puis d'un traitement par analogues nucléos(t)idiques : 3TC pendant 4 ans et TDF + FTC pendant 6 ans. Son historique est donc proche de notre patient d'intérêt mono-infecté.

La diminution de l'antigénicité de l'Ag HBs due à la mutation I110L a été démontrée à partir d'une étude sur l'impact du polymorphisme du gène S. Cette étude a permis la mise en évidence des épitopes de l'Ag HBs grâce à l'utilisation de quatre anticorps monoclonaux qui reconnaissent différents domaines du déterminant "a". 38 sérum contenant des Ag HBs présentant des modifications en AA ont été testés avec les quatre anticorps. Un seul des quatre anticorps testés met en évidence une perte

de réactivité due à la mutation I110L (Ijaz *et al.*, 2012). Cette mutation est donc associée à une diminution partielle de l'antigénicité.

Il faudrait toutefois disposer d'une cohorte plus importante de patients de génotype D pour confirmer ces observations et mettre en évidence d'éventuelles mutations caractéristiques des patients co-infectés, associées ou non à la clairance de l'Ag HBs.

5 Patients de Génotype A

Huit patients de génotype A ont été sélectionnés dans cette étude, dont deux patients d'intérêt, cinq contrôles et un patient porteur chronique.

Les patients ont été appariés par rapport à leur âge, on distingue deux groupes : le 1^{er} groupe (sous cohorte A/1) est composé du patient d'intérêt KH052008 et de deux contrôles KK102008 et HG012003 (moyenne d'âge 38 ans). Le 2^{ème} groupe (sous cohorte A/2) est composé du patient d'intérêt GM082013 associé à trois contrôles MJ052003, GD072006, LJM092003 et un patient porteur chronique DC092013 (moyenne d'âge 58 ans).

5.1 Sous cohorte A/1

5.1.1 Présentation des cas

Patient d'intérêt : KH052008 : Il s'agit d'un patient né en 1976 et suivi au CHU de Nancy depuis 2006. La première sérologie date de la même époque (Ag HBe négatif). Un traitement à base de TDF + FTC a été introduit en novembre 2006, on note par ailleurs une interruption thérapeutique entre mai 2007 et mai 2008 et une autre entre juin 2008 et février 2009, ce qui explique les charges virales VIH et VHB retrouvées positives à ces mêmes époques. Une clairance de l'Ag HBs est observée après 2008, au moment de l'interruption thérapeutique, en dépit d'une CV faiblement positive. L'Ag HBs négatif associé à une CV faiblement positive correspond à la définition d'une hépatite occulte. Le séquençage a été réalisé sur un prélèvement de 2008 (Tableau 9, séquençage).

Tableau 9 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de KH052008

Date	Ag HBs	Ac Anti-HBs	CV VHB en log UI/mL	CV VIH en log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitements
20/04/2006	Négatif	Négatif	ND	/	/	/
03/11/2006	Positif	Négatif	/	/	162	TDF +FTC
Interruption Thérapeutique						
29/05/2008	Positif	Négatif	3,16	1,5	/	TDF +FTC
Interruption Thérapeutique						
10/02/2009	Négatif	Négatif	2,38	6,26	22	TDF +FTC
23/11/2011	Négatif	Négatif	ND	1,2	465	TDF +FTC
21/08/2014	Négatif	Négatif	/	1,43	/	TDF +FTC

Patient contrôle : KK102008 : Il s'agit d'un patient né en 1978 et suivi au CHU de Nancy depuis 2008. La première sérologie date de la même époque (Ag HBe positif). Un traitement à base de TDF + FTC a été instauré. Le patient a été perdu de vue en 2009, l'Ag HBs était encore positif et la charge virale VHB négative (tableau 10).

Tableau 10 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de KK102008

Date	Ag HBs	CV VHB en log UI/mL	CV VIH en log copie/mL	Traitements
23/10/2008	Positif	9,49	4,64	/
01/09/2009 (CHU Dijon)	Positif	ND	ND	TDF +FTC

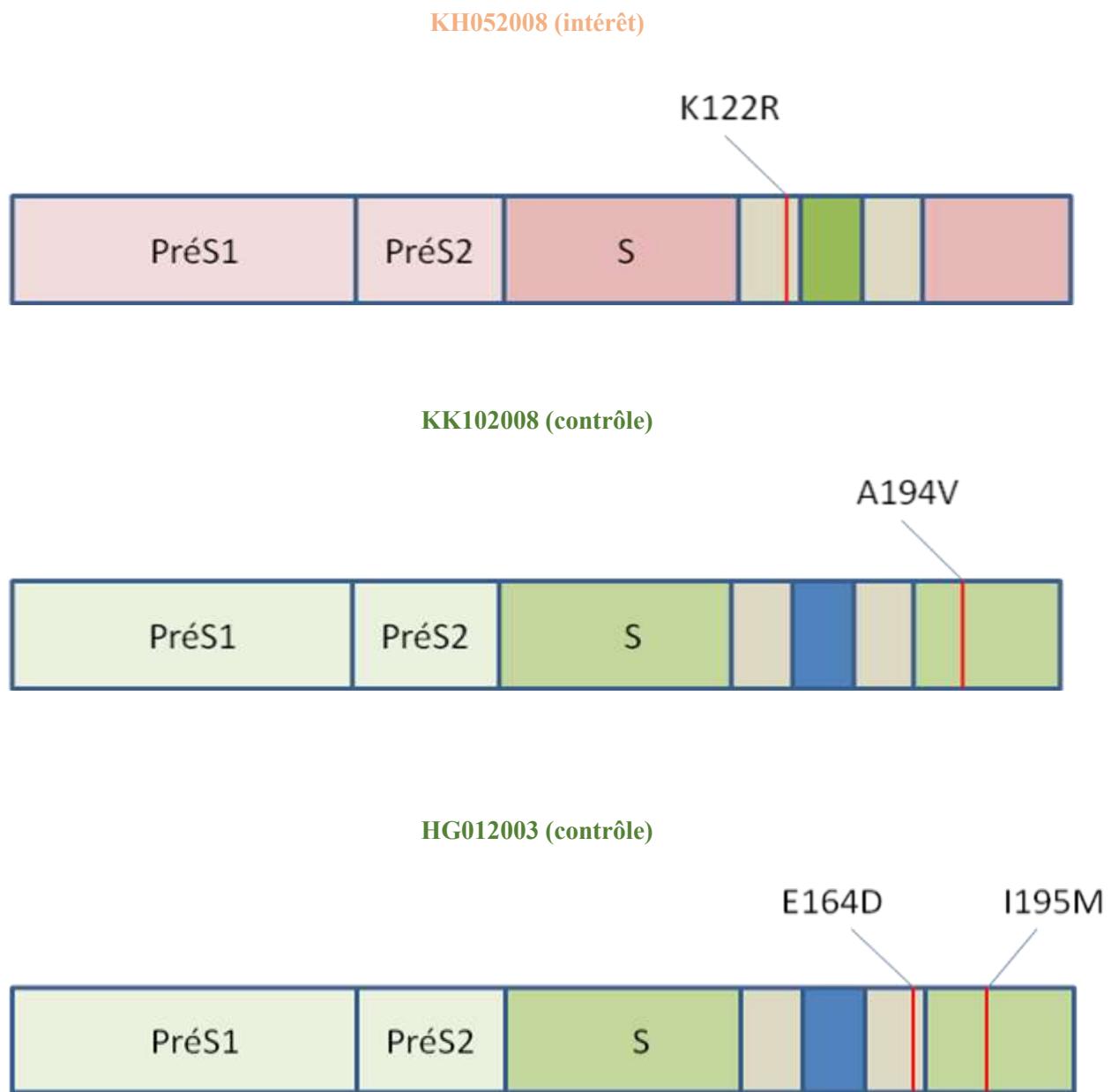
Patient contrôle : HG012003 : Il s'agit d'un patient né en 1974 et suivi au CHU de Nancy depuis 1999, la première sérologie date de la même époque (Ag HBe positif). Le séquençage a été réalisé sur un prélèvement de 2003 (tableau 11). A noter, sur la dernière sérologie en 2011, la présence d'une séroconversion HBe.

Tableau 11 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de HG012003

Date	Ag HBs	CV VHB en log UI/mL	CV VIH en log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitement
13/12/1999	Positif	/	5,2	182	/
12/07/2000	Positif	/	1,7	268	3TC
30/08/2001	Positif	>5,3	/	288	3TC
03/01/2003	Positif	>5,3	2,75	482	3TC
20/02/2004	Positif	>5,3	/	358	/
20/04/2004	Positif	>5,3	/	316	TDF
21/09/2004	Positif	4,7	4,5	/	TDF
10/05/2007	Positif	/	2,06	650	TDF + 3TC
23/09/2009	Positif	ND	ND	560	TDF + FTC
17/01/2011	Positif	ND	/	956	TDF +FTC

5.1.2 Mutations détectées

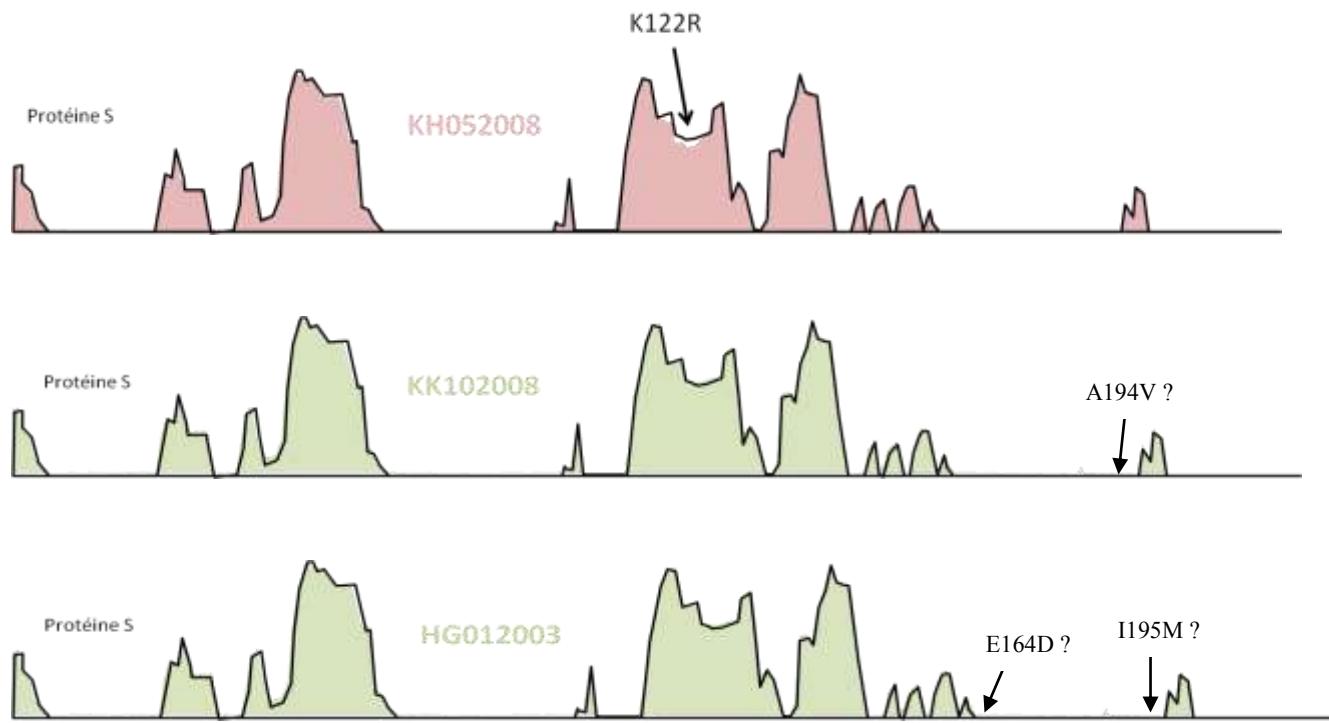
Ci-dessous sont représentées les mutations retrouvées sur les gènes préS1/S2 et S des patients de la sous cohorte A/1.



Très peu de mutations sont retrouvées. A noter que HG012003 est également porteur de mutations sur le gène de la RT, à savoir la V173L, L180M et la M204V qui lui confèrent une résistance au 3TC. Aucune mutation n'est observée dans la région préS pour ces trois patients.

5.1.3 Profils antigéniques sur Anthéprot

Ci-dessous est représentée la prédiction de l'antigénicité des domaines S des patients de la sous cohorte A/1.



La mutation K122R observée chez le patient d'intérêt est associée à une très légère diminution de l'antigénicité prédictive. Etant donné l'absence de mutation au niveau du domaine préS, il est inutile de représenter les profils Anthéprot qui seront identiques au consensus.

5.1.4 Discussion

Nous n'observons pas de différence notable entre ces trois patients appariés. Leurs protéines d'enveloppe sont très proches de celles d'une souche de virus sauvage.

Le patient d'intérêt, KH052008, présente une mutation située dans la MHR, la K122R (fréquence de 11% à partir de l'HBVdb sur 2000 séquences). Cette mutation diminue très légèrement l'antigénicité prédictive *in silico* et est décrite dans la littérature comme jouant un rôle dans l'altération de la neutralisation et la clairance de l'Ag HBs. En effet, la substitution d'AA provoque une modification de l'hydrophobicité et de la charge électrique de la protéine pouvant être responsable d'un changement de conformation du "déterminant a" (Pei *et al.*, 2014). Cette mutation a pu entraîner l'absence de détection de l'Ag HBs par l'automate Architect. On ne peut exclure que la clairance de l'Ag HBs chez ce patient soit le fruit d'un artefact technique.

Les deux patients contrôles, KK102008 et HG012003, ne présentent pas de mutations qui influencent l'antigénicité prédictive. En effet, il s'agit de substitutions d'AA proches d'un point de vue physico-chimique. Nous avons peu de recul pour le patient KK102008 et la mutation A194V n'est pas décrite dans la littérature. On retrouve chez l'un des patients contrôles les mutations E164D et I195M qui, lorsqu'elles sont associées, diminuent l'affinité des anticorps anti-HBs pour l'Ag HBs d'un facteur 50 et provoquent des mutations sur le gène de la RT à savoir la V173L, la L180M et la M204V permettant ainsi au virus l'acquisition de la résistance au 3TC (Locarnini and Yuen, 2010). Or le patient contrôle était traité par du 3TC depuis 3 ans et la charge virale restait positive.

Le patient d'intérêt, qui présente une réponse optimale au traitement anti-VHB ou un défaut de détection de l'Ag HBs par l'Architect, est porteur d'une mutation défavorable à la réponse immunitaire. Cela démontre qu'une mutation ponctuelle de la protéine S ne peut pas toujours expliquer à elle seule la clairance ou la persistance de l'Ag HBs. La clairance de l'Ag HBs est un mécanisme multifactoriel impliquant l'hôte, son système immunitaire, la pression thérapeutique et les virus.

5.2 Sous cohorte A/2

5.2.1 Présentation des cas

Patient d'intérêt : GM082013 : Il s'agit d'un patient né en 1952 et suivi au CHU de Nancy depuis 1991. La première sérologie pour le VHB date de la même époque (Ag HBe négatif). Un traitement à base de 3TC a été instauré en 1999, puis le patient a été perdu de vue jusqu'en 2009. Entre 2009 et 2010, le patient a reçu 3 mois de traitement avec TDF + FTC, remplacé par la suite par du 3TC seul. Après 2009, la CV VHB est fluctuante et varie entre la non détectabilité et une positivité faible, témoin d'une réPLICATION légère. L'Ag HBs est par ailleurs retrouvé négatif, ce qui signe une hépatite occulte. Le séquençage a été réalisé sur un prélèvement de 2013 (tableau 12).

Tableau 12 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de GM082013

Date	Ag HBs	Ac Anti-HBs	CV VHB en log UI/mL	CV VIH en log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitemen
1991	Positif	Positif	/	/	397	/
1992	Positif	Positif	/	/	370	/
1993	Positif	Positif	/	/	454	/
1994	Positif	Positif	/	/	420	/
1995	Positif	/	1,8	/	309	/
1996	Positif	Négatif	ND	4,3	352	/
1999	Positif	Négatif	/	/	663	3TC
Perdu de vue						
23/02/2009	Négatif	Négatif	2,83	4,8	46	/
06/04/2010	Négatif	Négatif	ND	ND	221	/
29/08/2011	Négatif	Négatif	ND	ND	353	3TC
08/08/2013	Négatif	Négatif	2,27	5	188	3TC
14/11/2013	Négatif	Négatif	D	4	110	3TC
05/02/2014	Négatif	Négatif	1,36	4	105	3TC
12/03/2014	Négatif	Négatif	/	3,5	/	3TC
15/10/2014	Négatif	Négatif	ND	4,8	/	3TC

Légende : D = détectable

Patient contrôle : MJ052003 : Il s'agit d'un patient né en 1958 et suivi au CHU de Nancy depuis 1999. La première sérologie concernant le VHB date de la même époque (Ag HBe positif). Un traitement à base de 3TC a été instauré la même année. On note la présence d'une interruption thérapeutique entre 2002 et 2004, puis du TDF a été introduit en 2004 avec l'ajout du FTC en 2008. Depuis 2004, la charge virale VHB est négative. Le séquençage a été réalisé sur un prélèvement de 2003 (tableau 13).

Tableau 13 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de MJ052003

Date	Ag HBs	CV VHB en log UI/mL	CV VIH en log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitement
28/10/1999	Positif	/	5,8	9	3TC
22/05/2003	Positif	4,3	ND	359	/
19/02/2004	Positif	/	/	386	TDF
08/11/2007	Positif	ND	3,75	289	TDF
14/05/2009	Positif	ND	ND	362	TDF + FTC

Patient contrôle : GD072006 : Il s'agit d'un patient né en 1956 et suivi au CHU de Nancy depuis 1993. La première sérologie concernant le VHB date de 2006 (Ag HBe négatif). Un traitement à base de TDF + FTC a été instauré à cette époque puis le FTC a été remplacé par du 3TC en 2009. Le traitement est efficace puisque la charge virale est négative depuis l'introduction du TDF. Le séquençage a été réalisé sur un prélèvement de 2006 (tableau 14).

Tableau 14 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de GD072006

Date	Ag HBs	CV VHB en log UI/mL	CV VIH en log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitement
13/07/2006	Positif	5,3	4,1	170	/
02/10/2008	Positif	ND	ND	150	TDF + FTC
01/03/2012	Positif	ND	ND	490	TDF + 3TC

Patient contrôle : LJM092003 : Il s'agit d'un patient né en 1959 et suivi au CHU de Nancy depuis 2003. La première sérologie date de la même époque (Ag HBe positif), un traitement à base de 3TC + TDF avait été instauré. Le séquençage a été réalisé sur un prélèvement de 2003 (tableau 15).

Patient chronique : DC092013 : Il s'agit d'un patient né en 1955 et suivi au CHU de Nancy depuis 1996. Une hépatite aiguë à VHB est mentionnée dans son dossier en 1998. La première sérologie concernant le VHB réalisée au CHU de Nancy date de 2013 (Ag HBe positif). Nous n'avons pas retrouvé d'autres antériorités concernant l'infection du VHB. Un traitement à base de TDF a été instauré en 2003, avec un ajout du FTC en 2010 sans négativation de la CV. Le séquençage a été réalisé à partir d'un prélèvement de 2013 (tableau 16).

Tableau 15 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de LJM092003

Date	Ag HBs	CV VHB en log UI/mL	CV VIH en log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitement
13/02/2003	Positif	>5,3	/	48	3TC + TDF
04/09/2003	Positif	4,6	/	144	3TC + TDF
03/06/2004	Positif	3,6	/	344	3TC + TDF
24/06/2005	Positif	ND	/	376	3TC + TDF
01/08/2006	Positif	5,5	/	415	TDF + FTC
17/04/2007	Positif	2,05	ND	710	TDF + FTC
04/12/2007	Positif	D	2.20	730	TDF + FTC
11/03/2008	Positif	ND	ND	/	TDF + FTC
16/01/2009	Positif	ND	/	904	TDF + FTC
11/12/2009	Positif	ND	ND	705	TDF + FTC
08/06/2010	Positif	ND	D	637	TDF + FTC
09/05/2011	Positif	ND	/	/	TDF + FTC
20/09/2012	Positif	D	ND	762	TDF + FTC
26/03/2013	Positif	ND	D	854	TDF + FTC
19/05/2014	Positif	ND	ND	804	TDF + FTC

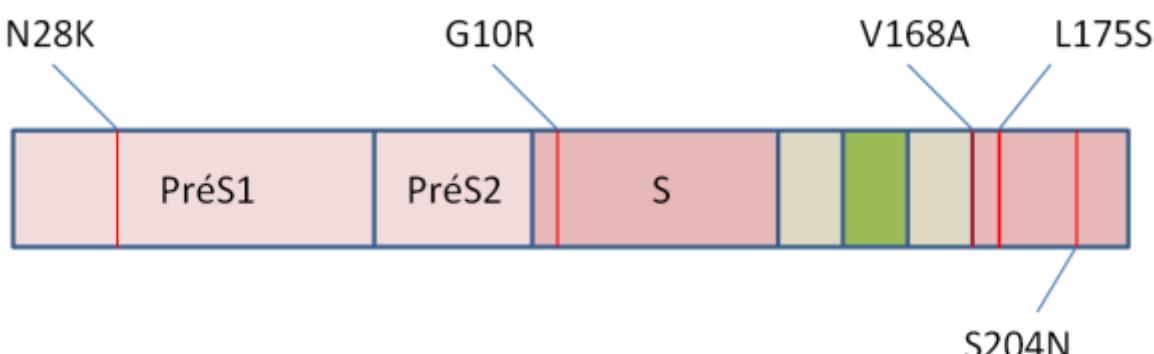
Tableau 16 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de DC092013

Date	Ag HBs	CV VHB en log UI/mL	CV VIH en log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitement
1998	Positif	/	/	/	/
13/09/2013	Positif	4,7	3,15	108	FTC + TDF
03/06/2014	Positif	3	3,27	/	FTC + TDF

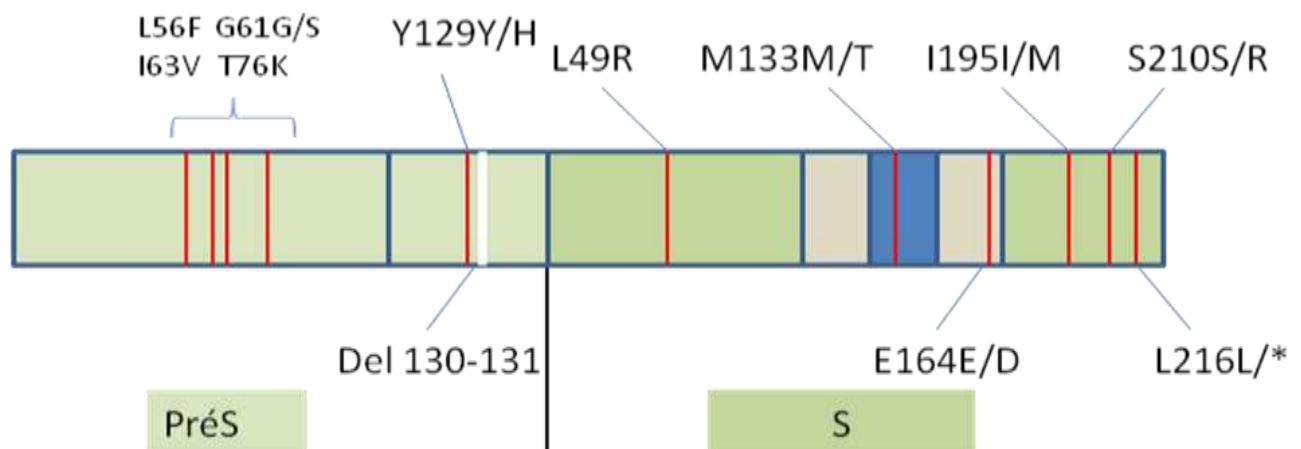
5.2.2 Mutations détectées

Ci-dessous sont représentées les mutations retrouvées sur les gènes préS1/S2 et S des patients de la sous cohorte A/2. Etant donné l'absence de mutations détectées pour le patient DC092013, la cartographie des protéines n'a pas été représentée.

GM082013 (intérêt)

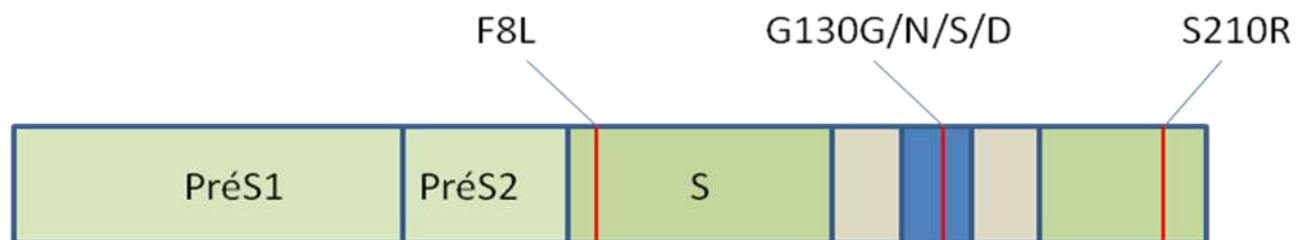


MJ052003 (contrôle)



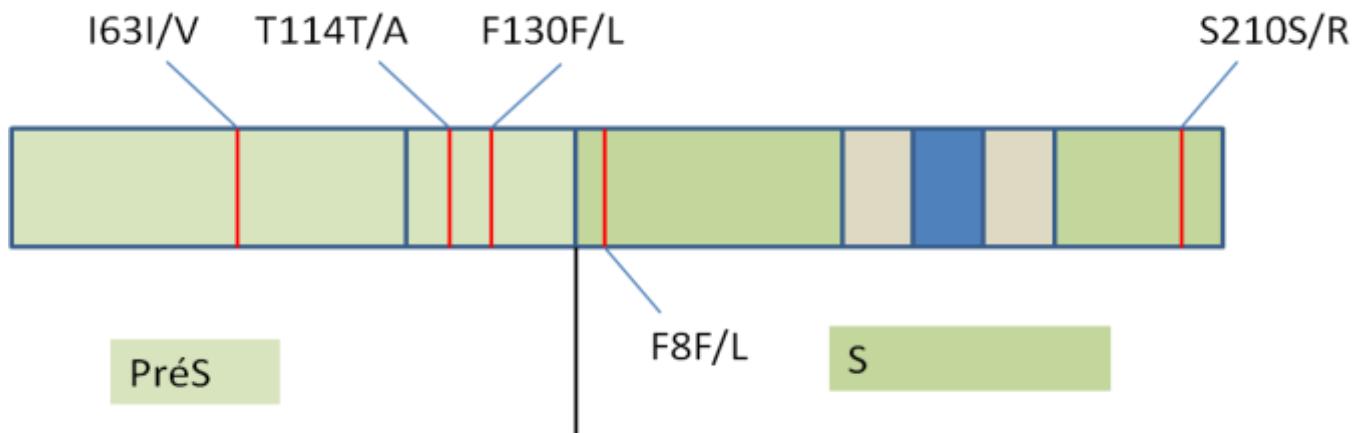
Nous pouvons observer un grand nombre de bases dégénérées pour ce patient, ce qui se traduit par la présence de plusieurs acides aminés pour une même position. A noter que MJ052003 est également porteur de mutations sur le gène de la RT, à savoir la V173L, L180M et la M204V qui confèrent au virus une résistance au 3TC. Nous pouvons également signaler la présence d'une délétion de deux acides aminés sur la région préS2 et d'un codon stop qui signe l'arrêt de la protéine en position 216 de la région S.

GD072006 (contrôle)



Pour ce patient, il est intéressant de noter la présence d'une quadruple population concernant la position 130 du gène S. En effet, deux bases dégénérées au sein d'un même codon ont été retrouvées, ce qui se traduit par la possibilité d'avoir quatre AA différents à cette position. Nous verrons l'importance de cette mutation dans la partie discussion.

LJM092003 (contrôle)

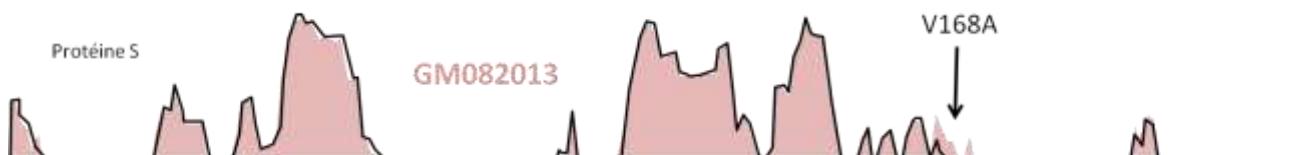


Cinq bases dégénérées ont été retrouvées pour ce patient, ce qui se traduit par la présence de deux AA possibles sur chacun des cinq sites de mutations.

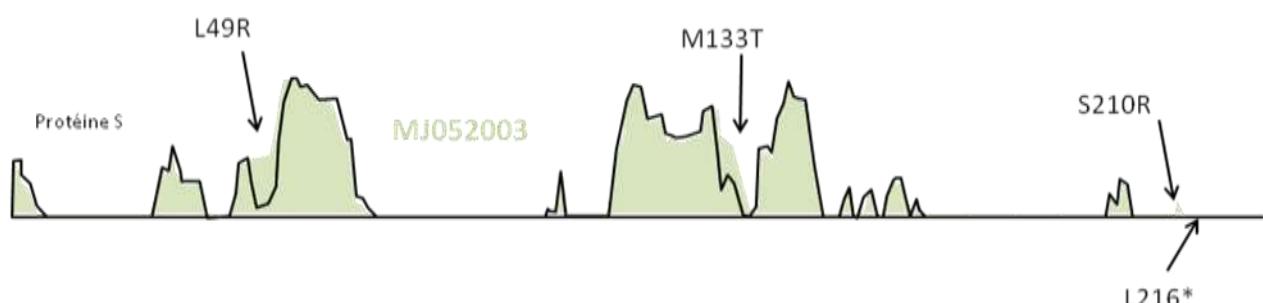
5.2.3 Profils antigéniques sur Antheprot

Ci-dessous est représentée la prédiction de l'antigénicité des domaines S et préS des patients de la sous cohorte A/2. Les profils antigéniques prédis pour le domaine S et préS du patient DC092013 n'ont pas été représentés du fait de l'absence de mutations, de même que pour le profil du domaine préS du patient GD072006.

Domaine S :

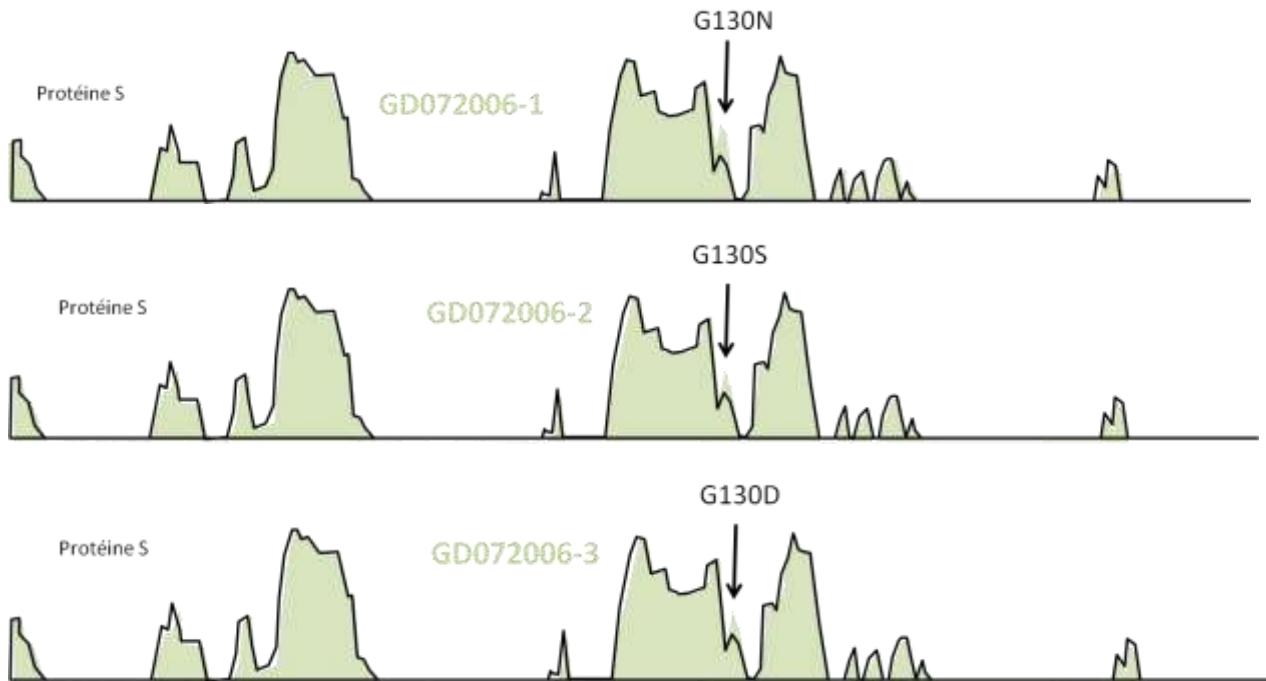


On note que la mutation V168A augmente légèrement le profil antigénique prédit *in silico*.



Pour ce patient, nous avons présenté toutes les mutations différentes du consensus sur un même profil. Certaines mutations augmentent l'antigénicité comme la L49R et la M133T. Il est par ailleurs

intéressant de relever la présence d'une mutation non sens la L216*. Nous discuterons de ces résultats dans la partie dédiée.



Pour le patient GD072006, les trois profils antigéniques mutés ont été réalisés pour mettre en évidence la modification du profil selon les AA présents à la position 130. Les trois mutations entraînent une légère augmentation de l'antigénicité prédictive.

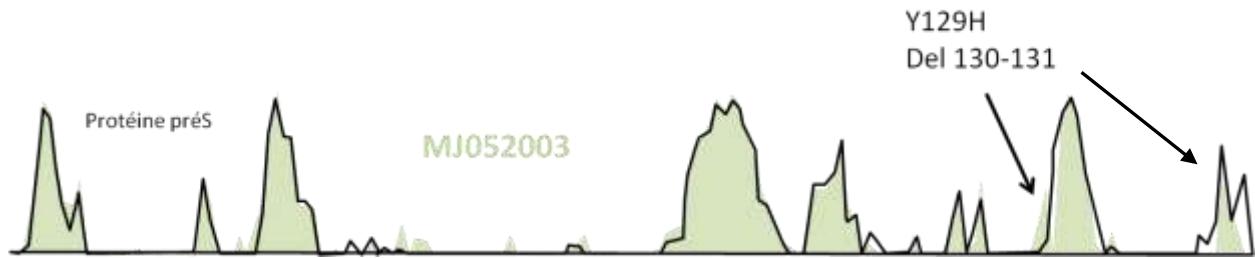
Pour le patient LJM092003, porteur de double populations, nous avons réalisé les profils en conséquence et les avons comparés entre eux mais il est apparu qu'aucune différence n'était mise en évidence par rapport au consensus.

Domaine préS :



La modification du profil antigénique par rapport au consensus ne peut être interprétée.

Pour le patient LJM092003, porteur de double populations, nous avons réalisé les profils en conséquence et les avons comparés entre eux mais il est apparu qu'aucune différence n'était mise en évidence par rapport au consensus.



Pour le patient MJ052003, la mutation Y129H, ainsi que la délétion 130-131 dans la région préS2, influencent légèrement le profil antigénique prédit.

5.2.4 Discussion

Le patient d'intérêt GM082013 présente les mutations G10R, V168A, L175S et S204N dans le domaine S ainsi que la mutation N28K dans le domaine préS. La mutation L175S (fréquence de 0,5% sur 2000 séquences) a été retrouvée chez des patients présentant un profil sérologique particulier avec coexistence de l'Ag HBs et d'Ac anti-HBs (Zhang *et al.*, 2007). Or, nous avons retrouvé des résultats antérieurs qui correspondent à ce profil entre 1991 et 1994 (tableau 12). Cette mutation est également localisée au niveau d'un épitope T et aurait un impact sur l'échappement immunitaire (Salpini *et al.*, 2015). La mutation V168A semble augmenter légèrement l'antigénicité prédictive *in silico* mais n'est pas décrite dans la littérature (fréquence 2,6%). Les mutations G10R et S204N sont situées dans des domaines transmembranaires (TM1 et TM4) et ne sont pas décrites dans la littérature. La mutation N28K se situe dans une zone où de nombreux épitopes B et T sont retrouvés (Chen *et al.*, 2006). Enfin, nous pouvons rappeler que le patient a été traité par du 3TC pendant de longues années. Or, nous ne retrouvons pas de mutations conférant une résistance vis-à-vis de cette molécule. Ceci peut s'expliquer par l'absence de pression de sélection thérapeutique pendant l'échappement au système de santé.

Le patient MJ052003 présente la mutation M133T qui peut être responsable d'une insuffisance de détection de l'Ag HBs (Baclig *et al.*, 2014) et d'un échappement immunitaire (Kay and Zoulim, 2007). Malgré tout, l'Ag HBs est retrouvé positif avec la technique de chimioluminescence de l'Architect. La L49R n'est pas décrite dans la littérature mais nous observons qu'elle augmente le profil antigénique. Cette mutation est située dans une zone intracytosolique de l'Ag HBs. L'impact sur le système immunitaire peut donc être discuté. Le patient présente une résistance vis-à-vis du 3TC due aux

mutations E164D et I195M. Or ce patient a déjà été traité par du 3TC. Nous pouvons également signaler la mutation L216* à l'origine d'une protéine S tronquée au niveau de l'épitope P4 des lymphocytes T. Cette mutation aurait un impact négatif sur la neutralisation par les anticorps (Pourkarim *et al.*, 2014) et pourrait jouer également un rôle dans l'initiation de la carcinogénèse (Huang *et al.*, 2014).

Concernant le domaine préS, ce patient est porteur de cinq mutations et de deux délétions. Les mutations G61S, I63V et Y129H se situent au niveau d'épitopes B (Chen *et al.*, 2006). La délétion 130-131 sur le domaine préS2 est également située sur des épitopes B et T et est responsable d'un échappement immunitaire et d'une évolution plus rapide de la maladie hépatique (Tai *et al.*, 2002). En conséquence, ces mutations peuvent contribuer à la persistance de l'Ag HBs.

Le patient GD072006 présente les mutations G130N/S/D (fréquence rare dans la database, de 0,4%, 0,25% et 0,05% respectivement) responsable d'un échappement immunitaire. La modification antigénique au niveau du déterminant "a", par la substitution d'une Glycine (G), AA non chargé hydrophobe, par des AA aux propriétés différentes, va diminuer l'affinité des anticorps pour l'Ag HBs (Kay and Zoulim, 2007), (Simon *et al.*, 2013). Les mutations F8L et S210R ne sont pas décrites dans la littérature comme impactant la réponse immunitaire. De plus, elles sont situées dans un domaine transmembranaire (TM1 et TM4 respectivement). On peut donc supposer qu'elles interagissent de façon très limitée avec le système immunitaire.

Le patient LJM092003 présente également sur le domaine S deux mutations (F8L et S210R) situées dans des zones transmembranaires. Concernant le domaine préS, ce patient est porteur de trois mutations situées chacune sur des épitopes B et/ou T (Chen *et al.*, 2006).

La S210R ne semble pas avoir d'impact sur le système immunitaire, mais on remarque qu'elle est présente chez trois des patients contrôles (fréquence de 14,5% dans la database HBVdb). De même, la F8L est aussi présente chez deux des patients contrôles (fréquence de 4,4%).

Le patient DC092013 ne présente aucune mutation alors que celui ci est traité depuis dix ans par du TDF. Ce patient est considéré comme un patient chronique avec une probable inobservance thérapeutique au vue de la réPLICATION virale qui persiste et du taux faible de CD4. Une faible pression immunitaire chez ce patient peut expliquer l'absence d'impact sur la modification des glycoprotéines d'enveloppe du VHB.

5.3 Conclusion

Nous avons sélectionné deux patients ayant présenté une clairance de l'Ag HBs mais chez qui une faible réPLICATION virale persiste (hépatite B occulte), cinq patients contrôles et un patient chronique sous traitement de génotype A. Ci-dessous est représenté le tableau récapitulatif des mutations retrouvées en prenant en compte les résultats des patients d'intérêt (2) et des patients contrôles (5) (tableau 17). Le patient chronique n'a pas été inclus dans le tableau car il ne présente aucune mutation. Nous avons distingué le nombre total de mutations par patients puis nous les avons réparties en deux catégories : d'une part, les mutations décrites dans la littérature pouvant être responsable d'un échappement immunitaire ou situées dans une zone épitopique pour les lymphocytes B/T et d'autre part les mutations diminuant, même très légèrement, l'antigénicité prédictive par bioinformatique. Les domaines S et préS ont été détaillés pour mettre en évidence d'éventuelles différences entre les patients pour chaque domaine.

Tableau 17 : Mutations retrouvées chez les patients de génotypes A

		Nombre total de mutations par patient	mutations décrites dans la littérature par patient	mutations diminuant l'antigénicité prédictive par patient
patients d'intérêt (2)	domaine S	2,5	1	0,5
	domaine préS	0,5	/	/
	domaine préS/S	3	1	0,5
patients contrôles (5)	domaine S	2,8	1,4	/
	domaine préS	2	1,6	/
	domaine préS/S	4,8	3	/

On observe plus de mutations chez les patients ne réalisant pas la clairance de l'Ag HBs que chez les patients d'intérêt. De plus, ces mutations sont plus souvent décrites dans la littérature comme jouant un rôle dans l'échappement immunitaire ou étant situées dans des zones épitopiques B/T. On peut citer parmi ces mutations, la G130N/S/D, la M133T, L216* dans le domaine S et la I63V, retrouvée chez deux patients contrôles, ainsi que la délétion 130-131 dans le domaine préS.

Nous avons mis en évidence une signature moléculaire, la S210R, retrouvée chez trois patients contrôles. Une étude a décrit le rôle probable des mutations concernant la protéine S, retrouvées chez les porteurs d'hépatites occultes, sur la production et l'excrétion *in vitro* de l'Ag HBs. Il a été démontré que les mutations situées sur le TM4 peuvent affecter les interactions moléculaires et altérer la morphologie de la protéine (Biswas *et al.*, 2013). La S210R peut donc avoir un impact sur la sécrétion

de l'Ag HBs. Dans notre étude, elle est retrouvée uniquement chez des patients porteurs de l'Ag HBs. La S204N est quant à elle présente chez un patient porteur d'une hépatite occulte.

Les patients d'intérêt présentent tout de même des mutations impliquées dans l'échappement immunitaire et donc pouvant favoriser la persistance de l'Ag HBs.

Le premier patient d'intérêt, KH052008, ainsi que ses deux contrôles, sont plus jeunes (38 ans) que les autres patients de génotype A (58 ans). Or pour ces patients nous ne retrouvons que très peu de mutations. Cela peut être dû à une plus courte évolution de l'infection par le VHB si on émet l'hypothèse selon laquelle la contamination par le virus serait plus récente dans la sous cohorte A/1. En effet, la pression immunitaire exercée sur le virus de façon chronique va être responsable de l'émergence de mutations au niveau des glycoprotéines d'enveloppe, dont le nombre peut augmenter avec le temps.

Il est par ailleurs important de préciser que le séquençage est réalisé à des moments différents dans l'évolution de l'infection pour le VHB pour chaque patient, par exemple lors d'une découverte de l'infection ou lors d'une interruption de traitement. Ce qui peut compliquer l'interprétation des données et être à l'origine d'un biais.

Nous pouvons en conclure que certaines mutations propres au VHB de génotype A peuvent contribuer à la clairance ou la persistance de l'Ag HBs chez les patients co-infecté VIH/VHB. Cependant, il faudrait disposer d'une cohorte plus importante pour confirmer les observations et mettre en évidence d'autres facteurs associés à un plus fort taux de persistance de l'Ag HBs.

6 Patients de génotype E

Cinq patients de génotype E ont été sélectionnés dans cette étude, dont un patient d'intérêt (MW062008), un patient porteur chronique apparié, ayant une CV VHB toujours positive, (GA072013) et trois patients contrôles non répondeurs et non appariés (HM1996, FG102001, OL022008). Dans un premier temps, le patient d'intérêt et le patient apparié chronique seront présentés suivis des patients contrôles.

6.1 Patient d'intérêt et patient apparié porteur chronique

6.1.1 Présentation des patients

Patient d'intérêt MW060008 : Il s'agit d'une femme née en 1983 suivie au CHU de Nancy depuis septembre 2004. A l'époque, un traitement à base de 3TC a été instauré et suivi jusqu'en 2007 puis modifié par TDF + FTC. On note la présence d'une interruption thérapeutique anti-VHB entre décembre 2007 et juin 2008 pour adaptation thérapeutique de la prise en charge du VIH. La CV VHB était négative ainsi que l'Ag HBs, depuis une durée indéterminée. Suite à cette modification thérapeutique, une réactivation du VHB est apparue ; le séquençage a été réalisé à ce moment. La première sérologie date de juillet 2007, à l'époque l'Ag HBs était négatif (tableau 18).

Tableau 18 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de MW062008

Date	Ag HBs	Ac anti-HBs	CV VHB log UI/mL	CV VIH log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitement
25/07/2007	Négatif	Négatif	ND	4,68	220	3TC
20/03/2008	/	/	2,86	ND	318	/
19/06/2008	Positif (>250 UI/ml)	Positif (156 mUI/ml)	/	ND	282	/
27/06/2008	Positif (>250 UI/ml)	Positif (120 mUI/ml)	8,59	/	/	TDF+FTC
07/07/2008	Négatif (0,01 UI/ml)	Positif (12 mUI/ml)	6,12	ND	/	TDF+FTC
04/09/2008	/	/	1,58	ND	399	TDF+FTC
18/12/2008	/	/	1,54	ND	394	TDF+FTC
26/03/2009	Négatif	Positif (35 mUI/ml)	D	D	320	TDF+FTC
08/07/2010	Négatif	Positif (155 mUI/ml)	/	ND	536	TDF+FTC

Lors de la réactivation du VHB suite à l'arrêt de traitement vis-à-vis de celui-ci (fin 2007), une hépatite grave est survenue (signes de cytolysé hépatique). L'Ag HBe, l'Ag HBs ainsi que des Ac anti-HBs se sont positivés, la charge virale VHB était à 8,59 log d'UI/mL. Peu de temps après l'introduction du TDF + FTC, nous observons à nouveau une clairance de l'Ag HBs. Deux ans après l'épisode de réactivation, la persistance d'Ac anti-HBs signe une hépatite résolue.

Aucun patient contrôle n'a pu être apparié à ce patient.

Patient chronique : GA072013 : Il s'agit d'une femme née en 1971 suivie au CHU depuis 2001 pour son infection au VIH et sous TDF + FTC depuis janvier 2008, date de la première sérologie VHB (Ag HBe positif). Malgré un traitement efficace, la charge virale VHB reste toujours positive. Le génotypage a été réalisé sur un prélèvement de juillet 2013 (tableau 19).

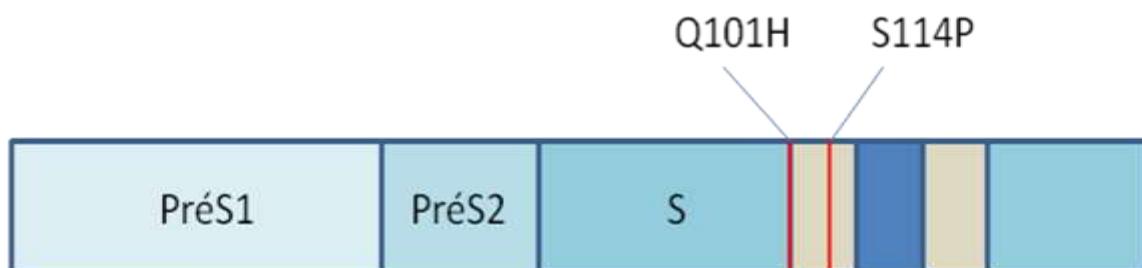
Tableau 19 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de GA072013

Date	Ag HBs	CV VHB log UI/mL	CV VIH log copie/mL	Traitement
28/01/2008	Positif	8,84	6	TDF + FTC
08/01/2009	Positif	4,2	ND	TDF + FTC
24/02/2009	Positif	5,73	/	TDF + FTC
09/04/2009	Positif	4,38	ND	TDF + FTC
12/10/2010	Positif	3,37	2,4	TDF + FTC
19/03/2013	Positif	8,19	5	TDF + FTC
16/07/2013	Positif	3,06	2,62	TDF + FTC

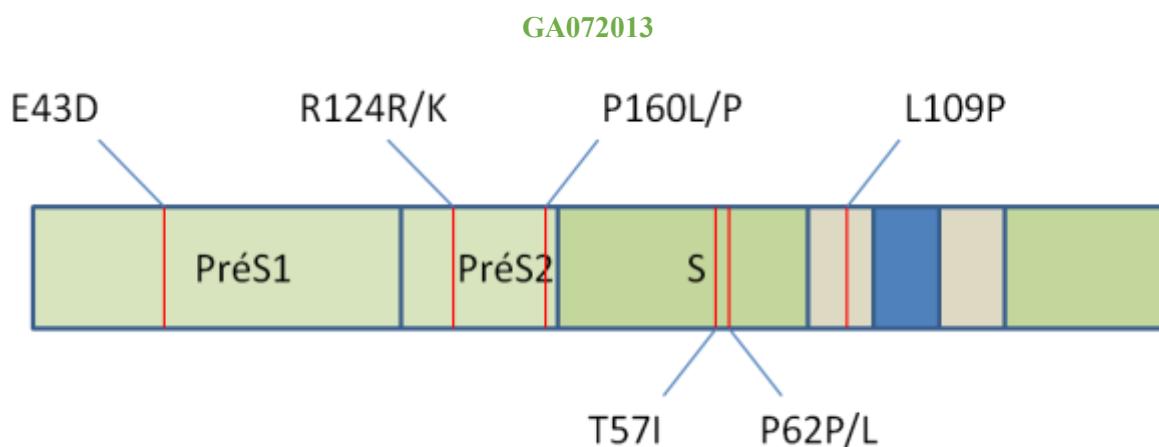
6.1.2 Mutations détectées

Ci-dessous sont représentées les mutations retrouvées sur les gènes préS1/S2 et S des patients appariés, MW062008 et GA072013.

MW062008 (intérêt)



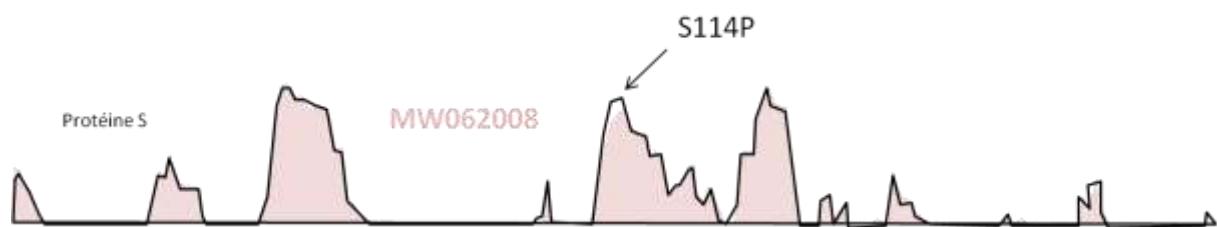
Ce patient est le plus jeune de la cohorte pour le génotype E.



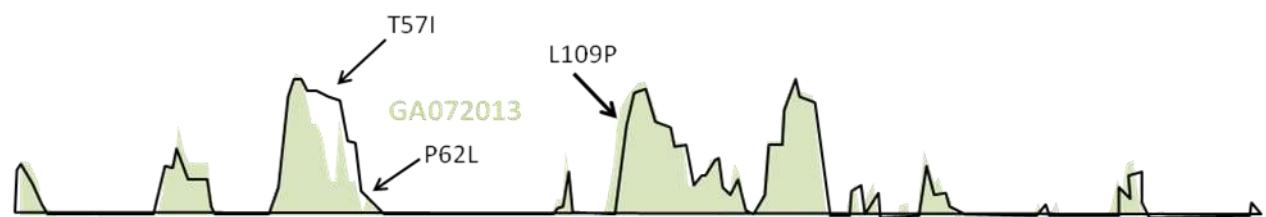
Les mutations retrouvées sont différentes entre le patient d'intérêt et le patient chronique qui est doté par ailleurs de plus de mutations (6 vs 2).

6.1.3 Profils antigéniques sur Antheprot

Ci-dessous est représentée la prédition de l'antigénicité des domaines S et préS des patients appariés. Les profils antigéniques prédits pour le domaine préS des patients MW062008 et GA072013 n'ont pas été représentés du fait de l'absence de mutations ou de modifications retrouvées sur le profil antigénique.



Nous pouvons voir sur ce profil que la mutation S114P diminue très légèrement l'antigénicité *in silico*.



Pour GA072013, nous avons présenté toutes les mutations différentes du consensus sur un même profil. Les mutations T57I et P62L sont responsables d'une diminution d'antigénicité prédictive *in silico*, alors que la L109P semble responsable d'une très légère augmentation.

Des doubles populations au niveau du domaine préS concernant les mutations R124R/K et P160P/L sont présentes chez le patient GA072013. Nous avons donc réalisé les profils en tenant compte de ces éléments et il est apparu que les mutations ne modifiaient pas le profil Anthéprot.

6.1.4 Discussion

Les protéines d'enveloppe du patient d'intérêt sont proches de celles d'une souche de virus sauvage. Les mutations Q101H et S114P situées sur la MHR du gène S sont des mutations retrouvées que très rarement pour le génotype E (respectivement 1,3% et 0,6% par rapport à 665 séquences référencées dans l'HBVdb). Il apparaît que la S114P diminue très légèrement le profil antigénique de la protéine S selon Anthéprot. La substitution d'une Sérine (S) par une Proline (P), AA plus petit et moins polaire, explique cette diminution. La Q101H a été décrite dans la littérature comme jouant un rôle dans l'échappement immunitaire en affectant la reconnaissance des anticorps (Scheiblauer *et al.*, 2010). La substitution d'une Histidine (H), AA basique et chargé positivement, à la place d'une glutamine (Q), AA polaire et non chargé, peut expliquer le défaut de reconnaissance des anticorps. La souche virale de ce patient ne présente pas de mutation dans la région préS.

Le patient GA072013 présente une CV VHB toujours positive sous traitement alors qu'aucune mutation n'est retrouvée sur le gène de la polymérase associée à une résistance aux traitements. Ceci peut être expliqué par la probable non observance au traitement, confirmée par la présence de CV VIH positives. En revanche, il y a 3 mutations sur le gène S dont une association entre la T57I et la P62L qui diminuent le profil d'antigénicité prédit *in silico*. Ces mutations étant situées dans une zone intracytosolique de l'Ag HBs, leur impact *in vivo* sur la réponse immunitaire peut être discuté. La L109P est décrite comme ayant un impact sur le profil d'hydrophobicité (Baclig *et al.*, 2014), de plus c'est une mutation touchant l'épitope des cellules LB (Ramezani *et al.*, 2013). Concernant la partie préS, la E43D se situe dans une zone sans rôle connu sur le pouvoir infectieux. On note également la présence de deux mutations situées sur la région préS2 considérées dans la littérature comme épitopes LT/LB mais qui n'influencent pas le profil Anthéprot (Chen *et al.*, 2006).

Nous n'avons pas trouvé de patient contrôle (CV indétectable, Ag HBs positif) pouvant être apparié à ce patient d'intérêt. Seule une patiente présentant une hépatite B chronique pouvait être appariée par le sexe et l'âge. Au delà de la probable inobservance du patient expliquant la chronicité de l'infection VHB, il est toutefois intéressant de noter que le patient chronique présente plus de mutations impactant de façon plus importante le profil antigénique.

6.2 Patients contrôles non appariés

6.2.1 Présentation des patients

Patient contrôle : HM1996 : Il s'agit d'un patient né en 1953 et suivi au CHU de Nancy depuis 1996 pour son infection au VIH. Il a reçu un traitement à base de 3TC depuis 1997, arrêté en 2007 et remplacé par TDF + FTC en 2009. Le génotypage a été réalisé sur un prélèvement de 1996 (Ag HBe négatif). Depuis l'introduction du TDF + FTC, la CV VHB est indétectable (tableau 20).

Tableau 20 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de HM1996

Date	Ag HBs	CV VHB log UI/mL	CV VIH log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitements
1996	Positif	7,9	/	252	/
18/01/2008	Positif	3,17	ND	480	/
16/12/2009	Positif	ND	2,55	350	TDF + FTC
19/12/2011	/	ND	ND	377	TDF + FTC

Patient contrôle : FG102001 : Il s'agit d'un patient né en 1950 et suivi au CHU de Nancy depuis 1999 pour son infection au VIH. La première sérologie VHB date de la même année (Ag HBe positif). Il a reçu un traitement à base de 3TC depuis 1999 avec un ajout du TDF en 2002, puis remplacé par TDF + FTC en 2009. Le génotypage a été réalisé sur un prélèvement d'octobre 2001. La charge virale VHB est indétectable depuis 2002 (tableau 21).

Tableau 21 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de FG102001

Date	Ag HBs	CV VHB log UI/mL	CV VIH log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitements
13/08/1999	Positif	/	6,5	24	/
02/10/2001	Positif	5	ND	170	3TC
03/06/2008	Positif	ND	ND	325	TDF + 3TC
17/05/2011	Positif	ND	ND	558	TDF + FTC

Patient contrôle : OL022008 : Il s'agit d'un patient né en 1977 et suivi au CHU de Nancy depuis 2008 pour son infection au VIH. La première sérologie VHB date de la même époque (Ag HBe négatif), et

un traitement à base de TDF + FTC a été instauré. Le génotypage a été réalisé sur un prélèvement de 2008. La charge virale VHB est indétectable depuis la mise en route du traitement (tableau 22).

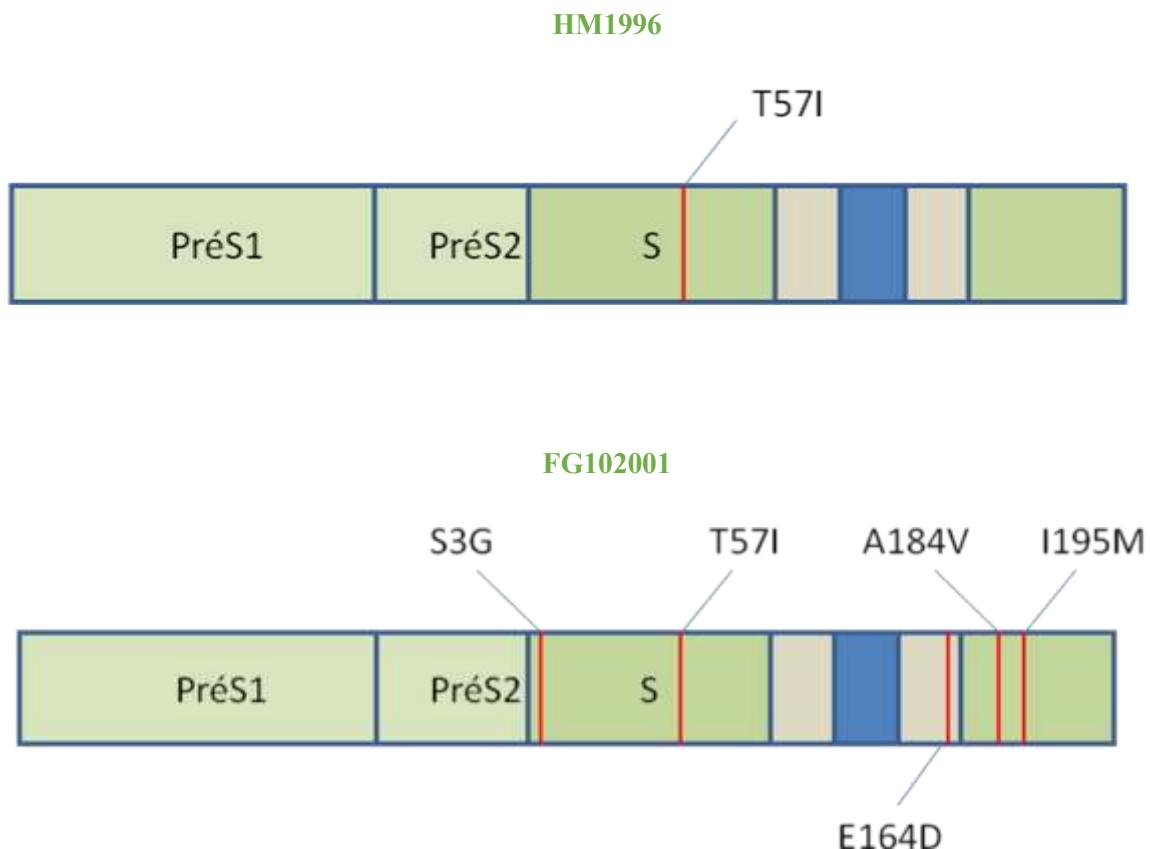
Tableau 22 : Evolution biologique et thérapeutique anti VHB de OL022008

Date	Ag HBs	CV VHB log UI/mL	CV VIH log copie/mL	Taux CD4 cell/mm ³	Traitement
12/02/2008	Positif	4,44	5,36	159	/
18/11/2008	Positif	ND	2,9	329	TDF + FTC
12/07/2011	Positif	ND	1,86	300	TDF + FTC

Ces trois patients présentent donc une réponse virologique mais une persistance de l'Ag HBs.

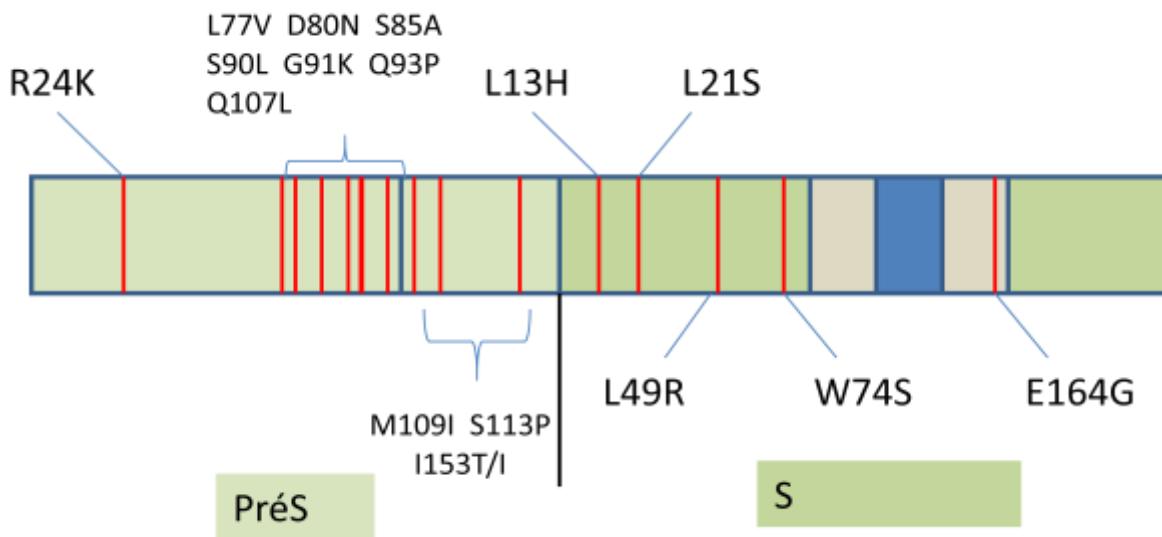
6.2.2 Mutations détectées

Ci-dessous sont représentées les mutations retrouvées sur les gènes préS1/S2 et S des patients contrôles : HM1996, FG102001 et OL022008.



A noter que FG102001 est également porteur de mutations sur le gène de la RT : à savoir la V173L, L180M et la M204V qui confèrent une résistance au 3TC.

OL022008

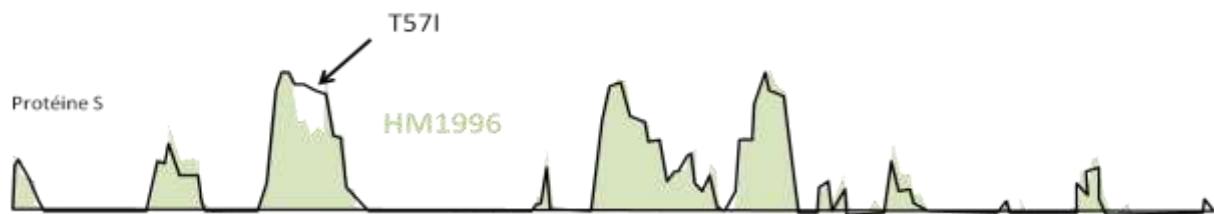


Ce patient présente seize mutations : cinq concernent la partie S et onze la partie préS1 et préS2 des gènes codant les glycoprotéines d'enveloppe.

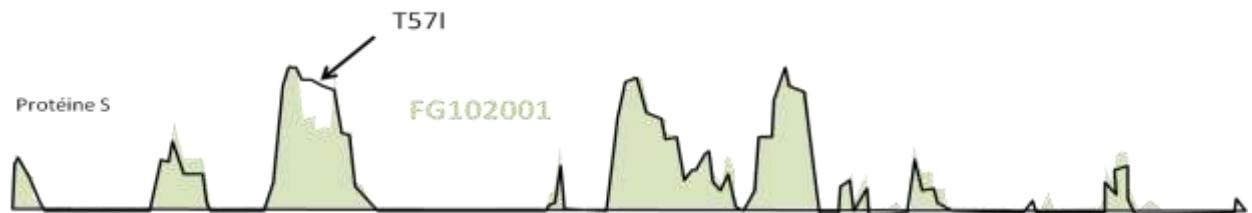
Il possède le plus de mutations alors que le séquençage a été réalisé avant l'introduction de traitement. Nous ne savons pas depuis quand le patient est contaminé par le VHB, mais il semble que cette souche virale présente une très grande variabilité.

6.2.3 Profils antigéniques sur Anthéprot

Ci-dessous est représentée la prédiction de l'antigénicité des domaines S et préS des patients contrôles. Etant donné l'absence de mutation sur le domaine préS pour les patients HM1996 et FG102001, il est inutile de représenter les profils Anthéprot qui seront identiques au consensus.

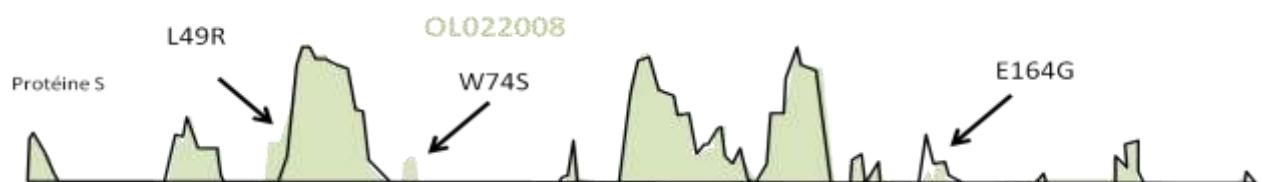


Il est intéressant de rappeler que le séquençage a été réalisé alors que le patient n'était pas encore sous traitement antirétroviral efficace sur le VHB. Il est donc logique de se retrouver devant une séquence avec très peu de mutations.

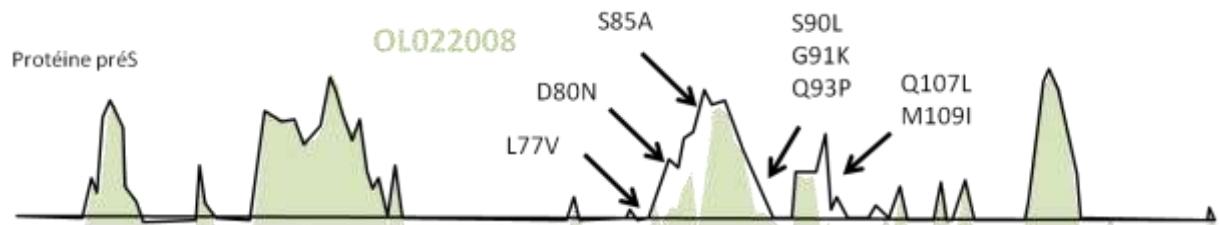


Seule la mutation T57I joue un rôle sur l'antigénicité prédictive *in silico*.

L'association de la E164D et de la I195M est responsable de résistance aux traitements. En effet, on retrouve sur le gène de la RT les mutations V173L, L180M et la M204V qui confèrent une résistance au 3TC expliquée par le chevauchement du cadre de lecture des gènes (Torresi *et al.*, 2002).



Seule la mutation E164G sur le gène S diminue *in silico* l'antigénicité prédictive très légèrement. La L49R ainsi que la W74S augmentent le profil antigénique. Ces mutations ne sont pas décrites dans la littérature.



OL022008 est porteur de beaucoup de mutations sur la partie préS, or nous pouvons observer de nombreuses variations par rapport au profil de référence. Huit mutations sur le domaine préS (fréquence rare proche de 1%) diminuent l'antigénicité prédictive *in silico* et sont considérées dans la littérature comme des épitopes LT/LB (Chen *et al.*, 2006).

6.2.4 Discussion

Deux patients contrôles présentent la mutation T57I. Du fait de la substitution de la Thréonine (T), AA non chargé polaire, par de l'Isoleucine (I), AA non chargé hydrophobe et de plus grande taille, le profil antigénique prédict est modifié selon les modes de calcul du logiciel Antheprot. OL022008 est plus

jeune que les deux autres patients contrôles, il présente par ailleurs le plus grand nombre de mutations. L'impact de la réponse immunitaire, propre à chaque individu, peut expliquer de telles différences sur la variabilité des glycoprotéines d'enveloppes entre ces patients. Il est envisageable que OL022008 ait été contaminé à la naissance ce qui pourrait expliquer le nombre de mutations retrouvées.

6.3 Conclusion

La mutation T57I est retrouvée chez trois patients : deux contrôles et le patient chronique. Cette mutation a un impact direct par rapport au profil du consensus ou du patient d'intérêt. La position T57I se situe dans une zone antigénique non exposée aux systèmes immunitaires. Elle peut intervenir indirectement en modifiant la conformation de la boucle antigénique. Cette mutation a une fréquence de 15% par rapport aux séquences retrouvées dans l'HBVdb (sur 665 séquences répertoriées) et aurait une importance épidémiologique (Lago *et al.*, 2014). Elle est retrouvée surtout en Namibie, en Angola et au Congo Brazzaville. Seul FG102001 est originaire d'un de ces pays.

Ci-dessous est représenté un tableau récapitulatif des mutations retrouvées chez quatre patients de génotype E (le patient d'intérêt + 3 contrôles) (tableau 23). Les mutations du patient chronique n'ont pas été intégrées dans le tableau.

Tableau 23 : Mutations retrouvées chez les patients de génotype E

		Nombre total de mutations par patient	mutations décrites dans la littérature par patient	mutations diminuant l'antigénicité prédictive
patient d'intérêt (1)	domaine S	2	1	1
	domaine préS	/	/	/
	domaine préS/S	2	1	1
patients contrôles (3)	domaine S	3,67	0,67	1
	domaine préS	3,67	2,67	2,67
	domaine préS/S	7,34	3,34	3,67

Aux vues de ces résultats, nous observons que le patient d'intérêt présente moins de mutations que les patients contrôles (2 vs 7,34). Sur le **domaine S**, une des deux mutations retrouvée chez le patient d'intérêt est décrite dans la littérature comme ayant un impact sur l'échappement immunitaire.

Sur le domaine préS, les résultats sont très hétérogènes car nous retrouvons des mutations seulement chez un patient ayant une persistance de l'Ag HBs (OL022008).

Nos résultats suggèrent toute de même un lien entre la persistance de l'Ag HBs et une signature moléculaire chez les co-infectés avec la mutation T57I (3 sur 4 patients).

7 Synthèse et discussion

La clairance de l'Ag HBs chez les patients co-infectés est un phénomène multifactoriel impliquant des critères virologiques, immunologiques et thérapeutiques. Notre hypothèse de travail est que la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe est un des critères virologiques en lien avec la clairance ou la persistance de l'Ag HBs. En préambule, nous analyserons les résultats propres aux critères virologiques afin de les intégrer par la suite à l'ensemble des critères.

Ci-dessous est représenté un tableau récapitulatif des mutations retrouvées chez les quatre patients d'intérêt (tableau 24).

Tableau 24 : Mutations retrouvées chez les patients d'intérêt

		Nombre total de mutations par patients	Mutations décrites dans la littérature par patients	Mutations diminuant l'antigénicité prédictée
Génotype D (1)	domaine S	2	1	/
	domaine préS	3	3	/
	domaine préS/S	5	4	/
Génotype A (2)	domaine S	2,5	1	0,5
	domaine préS	0,5	/	/
	domaine préS/S	3	1	0,5
Génotype E (1)	domaine S	2	1	1
	domaine préS	/	/	/
	domaine préS/S	2	1	1

Le patient d'intérêt de génotype D présente plus de mutations que les patients de génotypes A et E. De plus, ces mutations ont plus souvent un impact sur l'antigénicité (4 vs 1). Le VHB de génotype D présente donc une plus grande variabilité chez les patients d'intérêt que le VHB de génotype A ou E. Ce qui est cohérent avec les données de la littérature qui décrivent une plus grande variabilité du génotype D en particulier sur le déterminant "a" comparé aux autres génotypes (De Maddalena *et al.*, 2007). Des données similaires ont été observées dans une cohorte non publiée de patients mono-infectés par le VHB.

Une mutation en position 122 du gène S, dans la MHR, est retrouvée chez le patient de génotype D (R122K) et un patient de génotype A (K122R), mais seule la K122R est décrite dans la littérature comme pouvant être responsable d'un échappement immunitaire. Cette mutation a été retrouvée chez un patient co-infecté VIH/VHB, présentant un profil sérologique d'une hépatite occulte (présence d'un Ac anti-HBc isolé), au cours d'une réactivation du VHB de génotype A (Pei *et al.*, 2014). Or notre patient porteur de la mutation a un profil similaire. Malgré l'absence de description dans la littérature

de la mutation R122K, une étude a démontré que toute modification d'AA sur la position 122 du gène S peut jouer un rôle vis-à-vis de la réponse immunitaire (Wu *et al.*, 2012).

Tous les patients d'intérêt présentent des mutations ayant un impact sur le système immunitaire, comme la sI110L, sL175S, préS N103K. Une étude sur la variabilité du génome du VHB chez des patients co-infectés VIH/VHB a décrit un nombre plus important de mutations dans la région préS/S chez les patients ayant un Ag HBs négatif (hépatite occulte probable) que chez les patients présentant un Ag HBs positif. De plus, ces mutations concernent plus souvent la MHR et le déterminant "a" (Taffon *et al.*, 2014). Dans notre étude, les mutations concernant le domaine S des patients Ag HBs négatif, sont souvent situées sur la MHR (6/9 mutations). Malgré ces mutations défavorables, la clairance de l'Ag HBs est tout de même observée. La notion de clairance de l'Ag HBs reste ambiguë pour les deux patients de génotypes A, porteurs d'une hépatite B occulte. Toutefois, il est important de préciser que, sur les dernières analyses, la CV VHB est indétectable pour ces deux patients.

Cela démontre que seule la présence de mutations défavorables ne suffit pas à expliquer la persistance de l'Ag HBs. La clairance de l'Ag HBs est un phénomène complexe faisant intervenir de multiples facteurs qui peuvent donc se réaliser malgré la présence de mutations dans la MHR.

Le fait de ne disposer que de quatre patients d'intérêt ne nous permet pas de conclure. Il faudrait disposer d'une cohorte plus importante pour confirmer ces observations.

Ci dessous est représenté un tableau récapitulatif des mutations retrouvées chez les dix patients non répondeurs (huit patients contrôles + 2 patients chroniques).

Tableau 25 : Mutations retrouvées chez les patients non répondeurs

		Nombre total de mutations par patients	Mutations décrites dans la littérature par patients	Mutations diminuant l'antigénicité prédictive
Génotype A (6)	domaine S	2,3	1,17	/
	domaine préS	1,66	1,33	/
	domaine préS/S	4	2,5	/
Génotype E (4)	domaine S	3,5	0,75	1,25
	domaine préS	3,5	2,5	2
	domaine préS/S	7	3,25	3,25

Pour rappel, nous avons mis en évidence un nombre plus important de mutations chez les non répondeurs de génotype A et E que chez les patients d'intérêt de même génotype.

La variabilité de l'Ag HBs est plus importante chez les patients de génotype E que chez ceux de génotype A. Le taux de mutations est de $1,5 \cdot 10^{-2}$ pour le génotype E vs $9,38 \cdot 10^{-3}$ pour le génotype A. Cependant, il ne faut pas oublier la présence des mutations du patient OL022008, qui à lui seul possède neuf mutations ayant un impact sur le système immunitaire.

Nos résultats suggèrent un lien entre la persistance de l'Ag HBs et deux signatures moléculaires observées chez les co-infectés non répondeurs porteurs d'une souche de génotype A (S210R) ou de génotype E (T57I). De nombreuses mutations associées à une diminution de l'antigénicité de l'enveloppe du VHB pourraient influencer le pronostic de l'hépatite B chez ces patients co-infectés.

Précisons par ailleurs que parmi les patients d'intérêts ayant réalisé la clairance de l'Ag HBs, un patient est Ag HBe + et trois sont Ag HBe -, alors que chez les dix patients contrôles, sept sont Ag HBe + et trois sont Ag HBe -. Il y a donc plus de souches Ag HBe + chez les patients contrôles que chez les patients d'intérêt alors que les patients porteurs d'une souche Ag HBe - sont connus pour être de moins bons répondeurs aux traitements et à la clairance de l'Ag HBs ; ceci est en faveur de l'hypothèse que les patients d'intérêt de notre cohorte présentaient des facteurs viraux ou d'hôte favorisant la clairance.

De nombreuses études font référence aux taux faibles de LT CD4 et à la classification CDC dans l'influence de la clairance de l'Ag HBs et l'évolution de l'hépatite B. Dans notre cohorte, trois des quatre patients d'intérêt sont au stade C3 dans la classification CDC, MW062008 est au stade A2. Parmi les patients contrôles, quatre sont au stade C3, cinq sont au stade A3 et le dernier est au stade A2. Selon les données de la littérature, plus les patients sont avancés dans la classification, avec un taux faible de LT CD4, et plus l'évolution de la maladie est défavorable. Dans notre cohorte, les critères immunologiques ne semblent pas corrélés à la clairance obtenue chez les patients d'intérêt par rapport aux patients contrôles.

D'après l'étude épidémiologique de l'infection de l'hépatite B réalisée en 2012 (EPIB2012), il apparaît que les patients co-infectés VIH/VHB évoluent plus rarement vers la fibrose et le carcinome hépatocellulaire que les mono-infectés. De même, dans cette étude, la clairance de l'Ag HBs est plus fréquente chez les co-infectés. La moindre sévérité de l'hépatite B chronique chez les co-infectés serait probablement liée à l'utilisation au long cours des antirétroviraux efficaces sur les deux virus (Piroth *et al.*, 2015).

Les patients sélectionnés dans cette étude sont tous traités par analogues nucléos(t)idiques efficaces sur le VIH et le VHB. De part le chevauchement des cadres de lecture, des mutations retrouvées sur le gène S peuvent avoir un impact sur le gène de la RT et induire des mutations de résistance au traitement. Seulement trois patients (HG012003, MJ052003 et FG102001) présentent de telles mutations. Il s'agit de patients contrôles.

Cependant, et pour des raisons techniques, il faut préciser que les séquençages ont été réalisés à partir de sérums recueillis à différents temps dans l'évolution de la maladie pour chaque patient. L'influence de la pression thérapeutique sur la séquence S doit être interprétée avec précautions.

L'observance thérapeutique est également un élément clé dans l'obtention de la clairance de l'Ag HBs. De nombreuses interruptions thérapeutiques (volontaires ou non) sont observées dans les deux populations. Des CV VIH et VHB persistantes, en faveur d'une inobservance, sont retrouvées dans les deux groupes (intérêt et contrôle). Ce paramètre ne semble pas être corrélé à la persistance ou la clairance de l'Ag HBs.

Les facteurs propres au VHB ne peuvent pas expliquer à eux seuls la clairance ou la persistance de l'Ag HBs chez les patients co-infectés VIH/VHB, mais les mutations des glycoprotéines d'enveloppe du VHB pourraient influencer le pronostic de l'hépatite B.

Conclusion

Grâce à de nombreuses études sur le domaine, les connaissances sur la co-infection VIH/VHB se sont affinées ces dernières années. L'impact du VIH sur l'évolution de l'hépatite B chronique est bien établi. La prise en charge thérapeutique, qui consiste à l'utilisation d'analogues nucléos(t)idiques efficaces sur le VIH et le VHB, a pour objectif idéal la clairance de l'Ag HBs. Cependant, il s'agit d'un événement rare qui survient chez certains patients à condition que plusieurs facteurs soient réunis.

Notre objectif était d'étudier l'influence de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du VHB sur la clairance de l'Ag HBs chez des patients co-infectés VIH/VHB traités par analogues nucléos(t)idiques efficaces sur le VHB.

De fréquentes mutations diminuant l'antigénicité ont été observées dans les domaines S et préS des patients présentant une persistance de l'AgHBs. Nos résultats suggèrent un lien entre la persistance de l'Ag HBs et deux signatures moléculaires observées chez les co-infectés non répondeurs porteurs d'une souche de génotype A ou de génotype E. Ces mutations associées à une diminution de l'antigénicité de l'enveloppe du VHB pourraient influencer le pronostic de l'hépatite B chez ces patients co-infectés.

L'arrivée de l'UDS (Ultra Deep Sequencing) en pratique courante dans les années à venir, permettra l'analyse de l'ensemble des quasi-espèces virales y compris les variants minoritaires qui pourraient jouer un rôle dans la persistance de l'Ag HBs chez les porteurs chroniques.

Bibliographie

- Allain, J.-P.** (2006). Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. *J. Clin. Virol. 36 Suppl 1*, S12–S17.
- Amiel, C.**, and Schneider, V. (2011). Virus de l'immunodéficience humaine. EMC Elsevier Masson SAS Paris Biologie Clinique 1-13.
- Appay, V.**, and Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol. 214*, 231–241.
- Araujo, N.M.**, Branco-Vieira, M., Silva, A.C.M., Pilotto, J.H., Grinsztejn, B., de Almeida, A.J., Trepo, C., and Gomes, S.A. (2008). Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients: Evaluation of biochemical, virological and molecular parameters. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology. 38*, 1194–1203.
- Ariën, K.K.**, Vanham, G., and Arts, E.J. (2007). Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nat. Rev. Microbiol. 5*, 141–151.
- ASSIM**, (Collège des enseignants d'immunologie) (2013). Immunologie fondamentale et immunopathologie. Enseignements thématique et intégré-Tissu lymphoïde et sanguin/Immunopathologie et immuno-intervention. Elsevier Masson, 260 p.
- Bacig, M.O.**, Alvarez, M.R., Gopez-Cervantes, J., and Natividad, F.F. (2014). Unique surface gene variants of hepatitis B virus isolated from patients in the Philippines. *J. Med. Virol. 86*, 209–216.
- Barré-Sinoussi, F.**, Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science 220*, 868–871.
- Baumert, T.F.**, Meredith, L., Ni, Y., Felmlee, D.J., McKeating, J.A., and Urban, S. (2014). Entry of hepatitis B and C viruses — recent progress and future impact. *Current Opinion in Virology 4*, 58–65.
- Beck, J.**, and Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol. WJG 13*, 48–64.
- Biswas, S.**, Candotti, D., and Allain, J.-P. (2013). Specific amino acid substitutions in the S protein prevent its excretion in vitro and may contribute to occult hepatitis B virus infection. *J. Virol. 87*, 7882–7892.
- Blumberg, B.S.**, Alter, H.J., and Visnich, S. (1965). A "new" antigen in leukemia sera. *Jama 191*, 541–546.
- Bruss, V.** (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol. WJG 13*, 65–73.
- Buster, E.H.C.J.**, and Janssen, H.L.A. (2006). Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection--immune modulation or viral suppression? *Neth. J. Med. 64*, 175–185.
- Buti, M.**, Fung, S., Gane, E., Afdhal, N.H., Flisiak, R., Gurel, S., Flaherty, J.F., Martins, E.B., Yee, L.J., Dinh, P., et al. (2015). Long-term clinical outcomes in cirrhotic chronic hepatitis B patients treated with tenofovir disoproxil fumarate for up to 5 years. *Hepatol. Int. 9*, 243–250.

Cazein F, Pillonel J, Le Strat Y, Pinget R, Le Vu S, and Brunet S, (2015). Découvertes de séropositivité VIH et de sida, France, 2003- 2013. INVS BEH n°9-10, 152-161.

Charpentier C, F Damond, F Brun-Vézinet, and D Descamps (2011). Virus de l'immunodéficience humaine. EMC Elsevier Masson SAS Paris Maladies infectieuses 1-13.

CDC (1992). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control 41, 1-19.

Chen, B.-F., Liu, C.-J., Jow, G.-M., Chen, P.-J., Kao, J.-H., and Chen, D.-S. (2006). High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 130, 1153–1168.

Chen, C.-H., Hung, C.-H., Lee, C.-M., Hu, T.-H., Wang, J.-H., Wang, J.-C., Lu, S.-N., and Changchien, C.-S. (2007). Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* 133, 1466–1474.

Chong-Jin, O., Wei Ning, C., Shiuan, K., and Gek Keow, L. (1999). Identification of hepatitis B surface antigen variants with alterations outside the “ α ” determinant in immunized Singapore infants. *J. Infect. Dis.* 179, 259–263.

Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., and Rouzioux, C. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343–346.

Coffin, J., and Swanstrom, R. (2013). HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3, a012526.

Dane, D.S., Cameron, C.H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1, 695–698.

Deléage, G., Combet, C., Blanchet, C., and Geourjon, C. (2001). ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Computers in Biology and Medicine* 31, 259–267.

De Maddalena, C., Giambelli, C., Tanzi, E., Colzani, D., Schiavini, M., Milazzo, L., Bernini, F., Ebranati, E., Cargnel, A., Bruno, R., et al. (2007). High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology* 365, 113–124.

Desenclos, J.-C., Dabis, F., and Semaille, C. (2013). Épidémiologie du VIH dans le monde : particularités de l'épidémie au Nord et au Sud. *Virologie* 17, 132–144.

Desmond, C.P., Bartholomeusz, A., Gaudieri, S., Revill, P.A., and Lewin, S.R. (2008). A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. *Antivir. Ther.* 13, 161–175.

Dore, G.J., Soriano, V., Rockstroh, J., Kupfer, B., Tedaldi, E., Peters, L., Neuhaus, J., Puoti, M., Klein, M.B., Mocroft, A., et al. (2010). Frequent hepatitis B virus rebound among HIV-hepatitis B virus-coinfected patients following antiretroviral therapy interruption. *AIDS Lond. Engl.* 24, 857–865.

Ducancelle, A., Servant-Delmas, A., Beuvelet, T., Balan, V., Pivert, A., Maniez, M., Laperche, S., and Lunel-Fabiani, F. (2011). Results of a novel real-time PCR, sequence analysis, Inno-LiPA line probe assays in the detection of hepatitis B virus G1896A precore mutation in French blood donors. *Pathol. Biol. (Paris)* 59, 21–27.

EASL : European Association for the Study of the Liver (2012). Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* *57*, 167–185.

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

Fu, J., Xu, D., Liu, Z., Shi, M., Zhao, P., Fu, B., Zhang, Z., Yang, H., Zhang, H., Zhou, C., et al. (2007). Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* *132*, 2328–2339.

Ganem, D., and Prince, A.M. (2004). Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.* *350*, 1118–1129.

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* *397*, 436–441.

Ghosn, J., and Katlama, C. (2012). prise en charge de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *EMC Elsevier Masson SAS Paris Maladies infectieuses* *9*, 1–12.

Gilson, R.J., Hawkins, A.E., Beecham, M.R., Ross, E., Waite, J., Briggs, M., McNally, T., Kelly, G.E., Tedder, R.S., and Weller, I.V. (1997). Interactions between HIV and hepatitis B virus in homosexual men: effects on the natural history of infection. *AIDS Lond. Engl.* *11*, 597–606.

Girard, M.P., Paul, S., and Verrier, B. (2013). Vaccins préventifs anti-VIH : un but à notre portée ? *Virologie* *17*, 193–205.

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

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* *305*, 1425–1431.

Hannoun, C., Krogsgaard, K., Horal, P., Lindh, M., and Interpred trial group (2002). Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J. Infect. Dis.* *186*, 752–759.

HAS (2011) : Stratégie de dépistage biologique des hépatites virales B et C disponible sur : http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1050355/fr/strategies-de-depistage-biologique-des-hepatites-virales-b-et-c. Page consultée le 11/03/2015.

Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* *339*, 389–392.

Hosaka, T., Suzuki, F., Kobayashi, M., Seko, Y., Kawamura, Y., Sezaki, H., Akuta, N., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y., et al. (2013). 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.* *48*, 930–941.

Huang, S.-F., Chen, Y.-T., Lee, W.-C., Chang, I.-C., Chiu, Y.-T., Chang, Y., Tu, H.-C., Yuh, C.-H., Matsuura, I., Shih, L.-Y., et al. (2014). Identification of transforming hepatitis B virus S gene nonsense mutations derived from freely replicative viruses in hepatocellular carcinoma. *PloS One* *9*, e89753.

Huy, T.T.T., Ngoc, T.T., and Abe, K. (2008). New Complex Recombinant Genotype of Hepatitis B Virus Identified in Vietnam. *J. Virol.* *82*, 5657–5663.

Ijaz, S., Szypulska, R., Andrews, N., and Tedder, R.S. (2012). Investigating the impact of hepatitis B virus surface gene polymorphism on antigenicity using ex vivo phenotyping. *J. Gen. Virol.* *93*, 2473–2479.

INPES (2012). INPES Guide des vaccinations 2012. Disponible sur : <http://www.inpes.sante.fr/10000/themes/vaccination/guide-vaccination-2012/telechargements.asp>. Page consultée le 24/04/2015.

Jaroszewicz, J., Reiberger, T., Meyer-Olson, D., Mauss, S., Vogel, M., Ingiliz, P., Payer, B.A., Stoll, M., Manns, M.P., Schmidt, R.E., et al. (2012). Hepatitis B surface antigen concentrations in patients with HIV/HBV co-infection. *PloS One* *7*, e43143.

Jeulin, H., Velay, A., Murray, J., and Schvoerer, E. (2013). Clinical impact of hepatitis B and C virus envelope glycoproteins. *World J. Gastroenterol. WJG* *19*, 654–664.

J.M Huraux, J.C Nicolas, H Agust, and H Peigue-Lafeuille (2003). Traité de virologie médicale. Editions Esten 699p.

Joshi, D., O'Grady, J., Dieterich, D., Gazzard, B., and Agarwal, K. (2011). Increasing burden of liver disease in patients with HIV infection. *Lancet* *377*, 1198–1209.

Kay, A., and Zoulim, F. (2007). Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* *127*, 164–176.

Kim, J.H., Park, J.H., Lee, Y.J., Cho, E.W., Bae, Y.S., and Kim, K.L. (2000). 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* *50*, 379–384.

Kim, B.K., Revill, P.A., and Ahn, S.H. (2011). HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antivir. Ther.* *16*, 1169–1186.

Korber, B., and Myers, G. (1992). Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *8*, 1549–1560.

Lago, B.V., Mello, F.C., Ribas, F.S., Valente, F., Soares, C.C., Niel, C., and Gomes, S.A. (2014). Analysis of complete nucleotide sequences of Angolan hepatitis B virus isolates reveals the existence of a separate lineage within genotype E. *PloS One* *9*, e92223.

Laperche S, Servant Delmas A, Gallian P, Pillonel J, and DMI (2012). La surveillance de la diversité des virus VIH, VHB et VHC chez les donneurs de sang français entre 2000 et 2010. Numéro thématique. Don de sang : surveillance du risque infectieux et sécurité transfusionnelle. INVS BEH n°39-40, 447-52.

Larsen, C., Pialoux, G., Salmon, D., Antona, D., Le Strat, Y., Piroth, L., Pol, S., Rosenthal, E., Neau, D., Semaille, C., et al. (2008). Prevalence of hepatitis C and hepatitis B infection in the HIV-infected population of France, 2004. Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin *13*, n°22, 1-4.

Le Duff, Y., Blanchet, M., and Sureau, C. (2009). The Pre-S1 and Antigenic Loop Infectivity Determinants of the Hepatitis B Virus Envelope Proteins Are Functionally Independent. *J. Virol.* *83*, 12443–12451.

Li, Y.-J., Wang, H.-L., and Li, T.-S. (2012). Hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection: interaction among human immunodeficiency virus infection, chronic hepatitis B virus infection, and host immunity. *Chin. Med. J. (Engl.)* *125*, 2371–2377.

Lin, C.-L., and Kao, J.-H. (2011). The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *26 Suppl 1*, 123–130.

Locarnini, S. (2008). Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatol. Int.* *2*, 147–151.

Locarnini, S.A., and Yuen, L. (2010). Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antivir. Ther.* *15*, 451–461.

Lo Re, V., Frank, I., Gross, R., Dockter, J., Linnen, J.M., Giachetti, C., Tebas, P., Stern, J., Synnestvedt, M., Localio, A.R., et al. (2007). Prevalence, risk factors, and outcomes for occult hepatitis B virus infection among HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *44*, 315–320.

Maasoumy, B., Wiegand, S.B., Jaroszewicz, J., Bremer, B., Lehmann, P., Deterding, K., Taranta, A., Manns, M.P., Wedemeyer, H., Glebe, D., et al. (2015). Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) levels in the natural history of hepatitis B virus infection in a large European cohort predominantly infected with genotypes A and D. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 1-10.

Malve, B. (2014). 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. Université de Lorraine, Soutenue le 24/10/14, 132p.

Martine Peeters, and Chaix, M.-L. (2013). origine et diversité génétique du virus de l'immunodéficience humaine : d'où vient-il, où va-t-il? *Virologie* *17*, 119–131.

Meffre C, and DMI (2006). Prévalence des hépatites B et C en France en 2004. Saint Maurice : INVS, 176p.

Meier, A., Mehrle, S., Weiss, T.S., Mier, W., and Urban, S. (2013). Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatol. Baltim. Md* *58*, 31–42.

Michel, M.-L. (2014). Immunopathogenèse et approches vaccinales thérapeutiques de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B. *Virology* *18*, 25–33.

Morlat, P. (2013). Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Recommandations du groupe d'experts. RAPPORT 2013 sous la direction du Pr Philippe Morlat et sous l'égide du CNS et de l'ANRS 478p.

Nowak, M.A., Bonhoeffer, S., Hill, A.M., Boehme, R., Thomas, H.C., and McDade, H. (1996). Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4398–4402.

Okamoto, H., Imai, M., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1987). Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype ady or adwr. *J. Virol.* *61*, 3030–3034.

Olinger, C.M., Venard, V., Njayou, M., Oyefolu, A.O.B., Maïga, I., Kemp, A.J., Omilabu, S.A., Faou, A. le, and Muller, C.P. (2006). Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J. Gen. Virol.* *87*, 1163–1173.

Olinger, C.M., Jutavijittum, P., Hübschen, J.M., Yousukh, A., Samountry, B., Thammavong, T., Toriyama, K., and Muller, C.P. (2008). Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg. Infect. Dis.* *14*, 1777–1780.

ONUSIDA (2013). Rapport sur l'épidémie mondiale de sida 2013. Disponible sur : http://www.unaids.org/fr/resources/documents/2013/20130923_UNAIDS_Global_Report_2013, 274p. Page consultée le 11/05/2015.

Op den Brouw, M.L., Binda, R.S., van Roosmalen, M.H., Protzer, U., Janssen, H.L.A., van der Molen, R.G., and Woltman, A.M. (2009). Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology* *126*, 280–289.

Parker, J.M., Guo, D., and Hodges, R.S. (1986). 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 (Mosc.)* *25*, 5425–5432.

Pathak, V.K., and Temin, H.M. (1990). Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts, and hypermutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 6019–6023.

Pei, R., Grund, S., Verheyen, J., Esser, S., Chen, X., and Lu, M. (2014). Spontaneous reactivation of hepatitis B virus replication in an HIV coinfecté patient with isolated anti-Hepatitis B core antibodies. *Virol. J.* *11*, 9.

Peters, M.G. (2007). Diagnosis and management of hepatitis B virus and HIV coinfection. Topics in HIV medicine: a publication of the International AIDS Society, USA *15*, 163–166.

Petit, M.-A., Trepo, C., (2014). Virologie de l'hépatite B. *EMC Hépatologie* *9*, n°2, 1-18.

Piroth, L., Pol, S., Lacombe, K., Mialhes, P., Rami, A., Rey, D., Loustau-Ratti, V., Morlat, P., Goderel, I., Sene, D., et al. (2010). Management and treatment of chronic hepatitis B virus infection in HIV positive and negative patients: the EPIB 2008 study. *J. Hepatol.* *53*, 1006–1012.

Piroth, L., Pol, S., Mialhes, P., Lacombe, K., Lopes, A., Fillion, A., Loustaud-Ratti, V., Borsig-Lebas, F., Salmon, D., Rosenthal, E., et al. (2015). Therapeutic management and evolution of chronic hepatitis B: does HIV still have an impact? The EPIB 2012 study. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 1-9.

Pollicino, T., Cacciola, I., Saffiotti, F., and Raimondo, G. (2014). Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. *J. Hepatol.* *61*, 408–417.

Pontisso, P., Vidalino, L., Quarta, S., and Gatta, A. (2008). Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells. *Autoimmun. Rev.* *8*, 13–17.

Pourkarim, M.R., Sharifi, Z., Soleimani, A., Amini-Bavil-Olyaei, S., Elsadek Fakhr, A., Sijmons, S., Vercauteren, J., Karimi, G., Lemey, P., Maes, P., et al. (2014). Evolutionary analysis of HBV “S” antigen genetic diversity in Iranian blood donors: a nationwide study. *J. Med. Virol.* *86*, 144–155.

Quetier, I., and Kremsdorf, D. (2014). La protéine X du virus de l'hépatite B et son rôle dans le développement du carcinome hépatocellulaire. *Virologie* *18*, 229–238.

Ramezani, F., Norouzi, M., Sarizade, G.R., Poortahmasebi, V., Kalantar, E., Magnius, L., Norder, H., Domingo, E., and Jazayeri, S.M. (2013). Mutation Hot Spots in Hepatitis B Surface Antigen in Chronic Carriers from Khoozestan Province, Southern of Iran. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* *12*, 269–275.

Ramirez, B.C., Simon-Loriere, E., Galetto, R., and Negroni, M. (2008). Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res.* *134*, 64–73.

Riordan, S.M., Skinner, N., Kurtovic, J., Locarnini, S., and Visvanathan, K. (2006). Reduced expression of toll-like receptor 2 on peripheral monocytes in patients with chronic hepatitis B. *Clin. Vaccine Immunol.* *13*, 972–974.

Rouzioux, C., Avettand-Fenoel, V., and Autran, B. (2013). Réservoirs et réponses immunitaires au cours de l'histoire naturelle de l'infection à VIH-1. *Virologie* *17*, 157–168.

Salpini, R., Colagrossi, L., Bellocchi, M.C., Surdo, M., Becker, C., Alteri, C., Aragri, M., Ricciardi, A., Armenia, D., Pollicita, M., et al. (2015). Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression. *Hepatol. Baltim. Md* *61*, 823–833.

Scheiblauer, H., El-Nageh, M., Diaz, S., Nick, S., Zeichhardt, H., Grunert, H.-P., and Prince, A. (2010). Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. *Vox Sang.* *98*, 403–414.

Schmitt, S., Glebe, D., Tolle, T.K., Lochnit, G., Linder, D., Geyer, R., and Gerlich, W.H. (2004). Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* *85*, 2045–2053.

Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *1*, a006841.

Simon, B., Kundi, M., and Puchhammer, E. (2013). Analysis of Mutations in the S Gene of Hepatitis B Virus Strains in Patients with Chronic Infection by Online Bioinformatics Tools. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 163–168.

Sohn, J.A., Litwin, S., and Seeger, C. (2009). Mechanism for CCC DNA Synthesis in Hepadnaviruses. *PLoS ONE* *4*, 1-6.

Stoeckl, L., Funk, A., Kopitzki, A., Brandenburg, B., Oess, S., Will, H., Sirma, H., and Hildt, E. (2006). Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 6730–6734.

Sung, J.J.Y., Tsui, S.K.W., Tse, C.-H., Ng, E.Y.T., Leung, K.-S., Lee, K.-H., Mok, T.S.K., Bartholomeusz, A., Au, T.C.C., Tsoi, K.K.F., et al. (2008). Genotype-specific genomic markers associated with primary hepatomas, based on complete genomic sequencing of hepatitis B virus. *J. Virol.* *82*, 3604–3611.

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

Taffon, S., Genovese, D., Blasi, M., Pierotti, P., Degli Esposti, A., Catone, S., Chionne, P., Pulimanti, B., Candido, A., Dettori, S., et al. (2014). HBV whole-genome mutation profile in HIV-1/HBV coinfecting patients in a long-term follow-up study. *Infection* *42*, 675–687.

Tai, P.-C., Suk, F.-M., Gerlich, W.H., Neurath, A.R., and Shih, C. (2002). Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. *Virology* *292*, 44–58.

Takkenberg, R.B., Weegink, C.J., Zaaijer, H.L., and Reesink, H.W. (2010). New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Vox Sang.* *98*, 481–494.

Tatematsu, K., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Sugauchi, F., Mano, S., Maeshiro, T., Nakayoshi, T., Wakuta, M., Miyakawa, Y., and Mizokami, M. (2009). 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. 83, 10538–10547.

Thibault, S., Fromentin, R., Tardif, M.R., and Tremblay, M.J. (2009). TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells. Retrovirology 6, 42.

Thio, C.L., Smeaton, L., Saulynas, M., Hwang, H., Saravan, S., Kulkarni, S., Hakim, J., Nyirenda, M., Iqbal, H.S., Laloo, U.G., et al. (2013). Characterization of HIV-HBV co-infection in a multi-national HIV-infected cohort. AIDS Lond. Engl. 27, 191–201.

Torresi, J., Earnest-Silveira, L., Deliyannis, G., Edgton, K., Zhuang, H., Locarnini, S.A., Fyfe, J., Sozzi, T., and Jackson, D.C. (2002). Reduced Antigenicity of the Hepatitis B Virus HBsAg Protein Arising as a Consequence of Sequence Changes in the Overlapping Polymerase Gene That Are Selected by Lamivudine Therapy. Virology 293, 305–313.

Urban, S., Schulze, A., Dandri, M., and Petersen, J. (2010). The replication cycle of hepatitis B virus. J. Hepatol. 52, 282–284.

Van Hemert, F.J., Berkhout, B., and Zaaijer, H.L. (2014). Differential Binding of Tenofovir and Adefovir to Reverse Transcriptase of Hepatitis B Virus. PLoS ONE 9, 1–9.

Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B.F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., et al. (2006). Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. Nature 444, 164.

Velu, V., Saravanan, S., Nandakumar, S., Dhevahi, E., Shankar, E.M., Murugavel, K.G., Kumarasamy, T., and Thyagarajan, S.P. (2008). Transmission of —à determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. Jpn. J. Infect. Dis. 61, 73–76.

Volz, T., Allweiss, L., Barek, M.B., Warlich, M., Lohse, A.W., Pollok, J.M., Alexandrov, A., Urban, S., Petersen, J., Lütgehetmann, M., et al. (2013). The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. J. Hepatol. 58, 861–867.

Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., and Hahn, B.H. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature 373, 117–122.

Wei, Y., Neuveut, C., Tiollais, P., and Buendia, M.-A. (2010). Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. Pathol. Biol. (Paris) 58, 267–272.

Wu, C., Deng, W., Deng, L., Cao, L., Qin, B., Li, S., Wang, Y., Pei, R., Yang, D., Lu, M., et al. (2012). Amino Acid Substitutions at Positions 122 and 145 of Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Determine the Antigenicity and Immunogenicity of HBsAg and Influence In Vivo HBsAg Clearance. J. Virol. 86, 4658–4669.

Xiao, F., McKeating, J.A., and Baumert, T.F. (2013). A bile acid transporter as a candidate receptor for hepatitis B and D virus entry. J. Hepatol. 58, 1246–1248.

Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., et al. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. eLife 1, e00049.

Zhang, J.-M., Xu, Y., Wang, X.-Y., Yin, Y.-K., Wu, X.-H., Weng, X.-H., and Lu, M. (2007). Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *44*, 1161–1169.

Zoutendijk, R., Hansen, B.E., van Vuuren, A.J., Boucher, C.A.B., and Janssen, H.L.A. (2011). Serum HBsAg decline during long-term potent nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B and prediction of HBsAg loss. *J. Infect. Dis.* *204*, 415–418.

Zoutendijk, R., Zaaijer, H.L., de Vries-Sluijs, T.E.M.S., Reijnders, J.G.P., Mulder, J.W., Kroon, F.P., Richter, C., van der Eijk, A.A., Sonneveld, M.J., Hansen, B.E., et al. (2012). Hepatitis B surface antigen declines and clearance during long-term tenofovir therapy in patients coinfected with HBV and HIV. *J. Infect. Dis.* *206*, 974–980.

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 ajoutant 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	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLSWWTSLNFLGGSPVCL GQNSQSPTSNHSPTCPCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDY QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC CIPIPSSWAFAKYLWEWASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSA IWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLPIFFCLWVY
	préS	MGGWSSKPRKGGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDF NPIKDHWPAANQVGVGAFGPGLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPP PASTNRQSGRQPTPISPPLRDHPQAMQWNSTAFHQALQDPRVRGL YFPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISARTGDPVTN
Génotype D	S	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLSWWTSLNFLGGTTVCLG QNSQSPTSNHSPTCPCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDY QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC TCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLS VIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLPIFFCLWVYI
	préS	MGQNLSTSPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANK VGAGAFGLGFTPPHGGLLGWPQAAQGILQTL PANPPPASTNRQSGR QPTPLSPPLRNTHPQAMQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSSG TVNPVPTTVSPISSIFSRI GDPALN
Génotype E	S	MESITSGFLGPLLVLQAGFFLLTKILTIPQSLSWWTSLNFLGGAPVCL GQNSQSPTSNHSPTCPCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDY QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTT LAQGTSMFPSCCCSKPSDGNC TCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFAGLSPTVWLS VIWMMWYWGPSLYNILSPFIPLPIFFCLWVYI
	préS	MGLSWTVPLEWGKNHSTTNPLGFFPDHQLDPAFRANTRNPWDHN PNKDHWTEANKVGVGAFGPGFTPPHGGLLGWPQAAQGMLKTL PAD PPPASTNRQSGRQPTPITPPLRDTHPQAMQWNSTTFHQALQDPRVR GLYFPAGGSSSGTVNPVPTTASLISSIFSRI GDPAPN

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 10 juillet 2015

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par : Alain DUDA

Vu,

Nancy, le 05/06/2015

Sujet : Influence de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur la clairance de l'AgHBs chez des patients co-infectés par le VIH suivis au CHU de Nancy

Jury:

Président : Mme Chantal FINANCE, PUPH
Directeur : Mme Hélène JEULIN, MCU-PH
Juges : Mme Evelyne SCHVOERER, PUPH
M. Thierry MAY, PUPH
M. François GOEHRINGER, Médecin

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

Mme Chantal FINANCE

Mme Hélène JEULIN

Vu et approuvé,

Vu.

Nancy, le 11.06.2015

Nancy Je

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



Le Président de l'Université de Lorraine



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 7011

N° d'identification :

TITRE

Influence de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B sur la clairance de l'Ag HBs chez des patients co-infectés par le VIH suivis au CHU de Nancy

Thèse soutenue le 10 juillet 2015

Par Alain DUDA

RESUME :

En raison de modes de contamination similaires, environ 7% des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) présentent des marqueurs d'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB). Les interactions entre le VIH et le VHB, le système immunitaire et les traitements antirétroviraux sont complexes et aucun traitement à ce jour n'est capable d'éradiquer ces deux virus. L'objectif thérapeutique dans la prise en charge de l'hépatite B chronique chez des patients co-infectés VIH/VHB est identique à celui des mono-infectés VHB, c'est-à-dire obtenir la négativation de l'AgHBs. Notre objectif est d'étudier l'impact de la variabilité des glycoprotéines d'enveloppe du VHB sur la clairance de l'AgHBs chez des patients co-infectés VIH/VHB traités par analogues nucléos(t)idiques efficaces sur le VHB.

Quatorze patients co-infectés VIH/VHB (de génotype A, D ou E) ont été inclus dont quatre ayant présenté une clairance de l'AgHBs et dix ayant un AgHBs persistant (patients non répondeurs). La séquence nucléotidique des gènes S et préS du VHB a été obtenue par séquençage direct.

Les données ont été comparées à une cohorte de patients mono-infectés par le VHB. L'antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du VHB a été étudiée par prédiction bio-informatique (logiciel Antheprot). L'analyse phylogénique montre une association entre les souches B du VIH et les souches A ou D du VHB, et entre les souches CRF02-AG du VIH et E du VHB.

De fréquentes mutations diminuant l'antigénicité ont été observées dans les domaines S et préS des patients présentant une persistance de l'AgHBs. Par exemple, la mutation T57I de la protéine S, associée à une diminution de l'antigénicité prédictive, a été observée exclusivement chez 3 des 4 patients de génotype E présentant un AgHBs persistant. Le taux de mutations tend à être plus important chez les patients porteurs de VHB de génotype E comparé au génotype A ($1,5 \cdot 10^{-2}$ vs. $9,38 \cdot 10^{-3}$).

Nos résultats suggèrent un lien entre la persistance de l'AgHBs et deux signatures moléculaires (mutations S210R et T57I) observées chez les co-infectés non répondeurs porteurs d'une souche de génotype A ou de génotype E. De nombreuses mutations associées à une diminution de l'antigénicité de l'enveloppe du VHB pourraient influencer le pronostic de l'hépatite B chez ces patients co-infectés.

MOTS CLES : Virus de l'hépatite B, Virus de l'immunodéficience humaine, co-infection, variabilité virale, protéines d'enveloppe, 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 <input type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle