

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE SCIENCE – TECHNOLOGIE – SANTÉ

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année : 2006

Thèse N°

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie – Sciences – Santé

présentée et soutenue par

Anne-Aurélie Mazet

le 18 septembre 2006

**ÉTUDE DES SOUCHES DU VIRUS DE L'HÉPATITE B DANS LES
COMPARTIMENTS SÉRIQUE ET LEUCOCYTAIRE CHEZ DES PATIENTS
PRÉSENTANT UNE INFECTION B OCCULTE ET CHEZ DES TÉMOINS**

Thèse dirigée par Mme Sophie Alain

JURY

M François DENIS	Professeur, Université de Limoges	Président du jury
Mme Françoise LUNEL	Professeur, Université d'Angers	Rapporteur
M Jacques IZOPET	Professeur, Université de Toulouse 3	Rapporteur
Mme Sophie ALAIN	Docteur, Université de Limoges	Examinatrice
M Denis SAUTEREAU	Professeur, Université de Limoges	Examinateur
Mme Isabelle CHEMIN	Docteur, Unité INSERM 271 de Lyon	Membre invité

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur François Denis, mon « papa professionnel », qui a accepté voilà 7 ans d'être mon tuteur durant mon internat et qui n'a cessé depuis de m'apporter conseils et soutien. Merci, Monsieur, de m'avoir fait confiance et de m'avoir fait bénéficier de formidables opportunités professionnelles.

Je souhaite remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, Madame le Docteur Sophie Alain, pour avoir dirigé mon travail avec tant d'enthousiasme et de gentillesse. Je te remercie Sophie pour m'avoir communiqué ton énergie et m'avoir encouragé lors des moments difficiles. Avec toute mon amitié.

Je tiens également à remercier Madame le Professeur Françoise Lunel et Monsieur le Professeur Jacques Izopet pour avoir accepté de juger ma thèse et d'en être les rapporteurs ; je les remercie pour le temps consacré à la lecture de mon manuscrit. Je remercie aussi Monsieur Denis Sautereau pour avoir eu l'amabilité d'accepter de participer à mon jury de thèse.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide tout au long de mon travail de recherche : Madame Isabelle Chemin, pour tous ses conseils avisés et ses chaleureuses réponses à mes mails ; Madame le Docteur Véronique Loustaud-Ratti et Madame Monique Walocha, pour la sélection des patients étudiés et le prélèvement d'échantillons cliniques ; Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy, pour avoir pris le temps de s'intéresser régulièrement à mon travail et pour m'avoir prodigué de judicieux conseils ; Mademoiselle Marie-Claire Baclet, pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances en Biologie Moléculaire et pour son aide lors des mises au point de techniques ; Madame Jeanne Cook-Moreau pour avoir gentiment relu et corrigé mes articles.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des techniciens du laboratoire de Virologie pour m'avoir si gentiment accueilli et m'avoir sympathiquement apporté leur collaboration.

Je n'oublie pas mes compagnons de fac, quelque soit la discipline : Armelle, Aurélie, Delphine, Martine, Olivier, Sébastien, Thomas... avec une pensée particulière pour Gaël, mon plus ancien collègue de galère. Merci à vous pour tous ces moments passés ensemble y compris le week-end, pour votre aide, votre soutien amical et nos joyeuses conversations ravigotantes !

Enfin, je remercie mes parents et mes sœurs pour avoir toujours été présents et m'avoir aidé à réaliser mes projets. Merci aussi à ma belle famille pour sa sollicitude et son soutien. Quant à toi, Stéphane, j'ai tant de choses à te dire que je n'en dirai qu'une : merci d'être là ! Enfin, merci Camille, qui a sagement attendu que sa maman ait bien avancé sa rédaction pour naître !

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	3
CHAPITRE I : LE VIRUS DE L'HÉPATITE B	4
A. Taxonomie du virus de l'hépatite B.....	4
B. Structure.....	5
1. Morphologie	5
2. Organisation génomique	7
3. Les protéines du VHB	9
3.1. Les protéines d'enveloppe	9
3.2. Les protéines de core et précore	12
3.3. La polymérase virale	14
3.4. La protéine X.....	15
3.5. La protéine HBSP.....	15
C. Cycle de réplication	15
1. Interaction du VHB avec les hépatocytes et entrée du virus.....	16
2. Formation de l'ADN circulaire superenroulé.....	17
3. Synthèse des ARN viraux	18
4. Encapsidation et synthèse des brins (-) et (+) de l'ADN viral	19
5. Recyclage de la nucléocapside et sécrétion des particules virales	22
D. Variabilité du virus de l'hépatite B.....	22
1. Mécanismes de la variabilité génétique	23
2. Les géotypes du VHB	24
2.1. Définition et classification	24
2.2. Répartition géographique	24
2.3. Coinfections et recombinaisons	25
2.4. Pathogénie des géotypes.....	25
3. Les variants phénotypiques	26
3.1. Les mutants préC/C	26
3.2. Les mutants S	27
3.3. Les mutants P	28
CHAPITRE II : L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HÉPATITE B	29
A. Epidémiologie et prévention des hépatites B	29
1. Epidémiologie	29
1.1. Répartition géographique mondiale	29
1.2. Principaux modes de transmission	29
1.3. Epidémiologie en France.....	30
2. Traitements préventifs.....	31
2.1. La vaccination	31
2.2. L'immunothérapie passive	32

B. Physiopathologie de l'infection B	32
1. Immunopathologie et mécanismes d'élimination virale	32
2. Mécanismes de persistance virale	34
2.1. Facteurs propres à l'hôte	34
2.2. Facteurs viraux	34
3. Histoire naturelle de l'infection B	35
3.1. Hépatite aiguë.....	35
3.2. Hépatite chronique	36
3.3. Carcinome hépatocellulaire (CHC).....	38
C. Traitements des hépatites B chroniques.....	39
1. Bases du traitement	39
2. Efficacité des médicaments antiviraux.....	39
2.1. Les interférons.....	39
2.2. Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques	41
3.1. Hépatite chronique sans cirrhose ou avec cirrhose compensée.....	42
3.2. Cirrhose décompensée.....	43
3.3. Mutations à la lamivudine	43
3.4. Coinfections VIH/VHB.....	43
D. Diagnostic virologique : marqueurs sériques de l'infection par le VHB	43
1. Détection du génome viral	43
1.1. Quantification de l'ADN total.....	43
1.3. Recherche des formes persistantes de l'ADN du VHB.....	48
2. Diagnostic sérologique	49
2.1. Le système HBs.....	50
2.2. Le système HBc	50
2.3. Le système HBe	51
3. Cinétique d'apparition des marqueurs.....	51
3.2. Hépatite fulminante	52
3.4. Carcinome hépatocellulaire.....	53
4. Profils sérologiques atypiques.....	54
4.1. Profils liés à la présence de variants du VHB	54
4.2. Anticorps anti-HBc isolés	54
CHAPITRE III : LES INFECTIONS B OCCULTES	55
A. Diagnostic moléculaire des infections B occultes.....	55
1. Détection de l'ADN	55
2. cccDNA et ARN viraux	56
B. Prévalence des infections B occultes	57
Prévalence des infections B occultes lors des coinfections par le VHC ou le VIH	59
Prévalence du profil d'anticorps anti-HBc isolés.....	59
C. Impact clinique des infections B occultes.....	60
1. Transmission du VHB lors de transfusions, de greffes ou d'hémodialyses.....	60
2. Evolution, aggravation des atteintes hépatiques	60
3. Coinfection par le VHC.....	61
4. Coinfection par le VIH.....	62

D. Mécanismes des infections B occultes.....	62
1. Complexes immuns circulants (CIC)	62
2. Etat des défenses immunitaires	63
3. Mutations dans le génome du VHB	63
3.1. Mutations altérant l'antigénicité et/ou la production de l'AgHBs	64
3.2. Mutations altérant la réplication virale.....	65
4. Interférences virales	65
5. Infection des PBMC	66
6. Intégration du génome du VHB	67
7. Autres mécanismes évoqués.....	68
 TRAVAIL EXPÉRIMENTAL	 69
 CHAPITRE I : ANALYSE DU GÈNE DE SURFACE DES VHB INFECTANT DES PATIENTS PRÉSENTANT DES ANTICORPS ANTI-HBc ISOLÉS.....	 70
A. Recherche de mutations dans l'AgHBs des VHB à l'origine d'infections occultes chez des patients présentant des anticorps anti-HBc isolés.....	71
1. Article 1	71
2. Conclusion.....	77
B. Caractérisation moléculaire d'un variant S infectant un patient triinfecté VHB/VHC/VIH et présentant un profil d'anticorps anti-HBc isolés	79
1. Article 2.....	79
2. Conclusion.....	85
 CHAPITRE II : RECHERCHE D'UNE RÉPLICATION VIRALE DANS LES PBMC DE PATIENTS AGHBs-NEGATIFS.....	 87
A. Mise au point d'un outil de détection du cccDNA, intermédiaire de réplication du VHB, dans le sérum et les PBMC des patients.....	88
1. Article 3.....	88
2. Conclusion.....	111
B. Etude de patients présentant différents profils sérologiques d'infection B, et coinfectés ou non par le VHC et/ou le VIH.....	112
1. Patients et échantillons cliniques.....	112
2. Méthodes	113
2.1. Détermination du statut sérologique des patients.....	113
2.2. Extraction et quantification de l'ADN du VHB	113
2.3. Détermination du génotype des VHB	113
2.4. Amplification et séquençage du génome entier du VHB	114
3. Résultats	115
3.1. Détection et quantification de l'ADN total dans le sérum et dans les PBMC	115
3.2. Détection et quantification du cccDNA dans le sérum et dans les PBMC	122
3.3. Analyse de la séquence et des génotypes des souches sériques et des souches isolées des PBMC.....	123
4. Discussion	124
4.1. Détection de l'ADN du VHB dans les PBMC des patients mono-infectés.....	125
4.2. Influence des coinfections sur la détection de l'ADN du VHB	127
4.3. Rôle des PBMC dans la sélection de souches virales	128

4.4. Conclusion.....	130
C. Recherche et évolution de l'ADN total et du cccDNA dans les PBMC de porteurs chroniques de l'AgHBs	131
1. Patients et méthodes	131
2. Résultats	133
3.1. Patients AgHBe+.....	133
3.2. Patients Ac anti-HBe+.....	135
4. Discussion – Conclusion	136
CHAPITRE III : RECHERCHE DE L'ADN INTÉGRÉ DANS LES PBMC DE PATIENTS PRÉSENTANT DIFFÉRENTS PROFILS SÉROLOGIQUES	137
A. Echantillons et méthodes	137
1.1. Echantillons cliniques	137
1.2. Témoins positifs	138
1.3. Détection de l'ADN intégré	139
2. Résultats	141
2.1. Spécificité de la technique.....	141
2.2. Sensibilité de la technique.....	141
2.3. Détection de l'ADN intégré dans les échantillons des patients AgHBs+.....	142
2.4. Détection de l'ADN intégré dans les PBMC des patients AgHBs-.....	143
3. Discussion – Conclusion	145
CONCLUSION GÉNÉRALE	147
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	150
ANNEXES.....	166

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Analyse phylogénétique des souches humaines et simiennes de virus de l'hépatite B.	5
Figure 2 : Morphologie du VHB..	6
Figure 3 : Représentation schématique des différents constituants du virus de l'hépatite B. ...	6
Figure 4 : Organisation du génome du virus de l'hépatite B.....	7
Figure 5 : Représentation schématique des 4 phases de lecture du virus de l'hépatite B.	8
Figure 6 : Topologie transmembranaire de la protéine S..	10
Figure 7 : Topologie transmembranaire de la protéine moyenne.....	11
Figure 8 : Topologie transmembranaire de la grande protéine..	12
Figure 9 : Modélisation informatique des protéines de capsid du VHB.	13
Figure 10 : Représentation schématique de la synthèse de l'AgHBe à partir de l'ORF C.	13
Figure 11 : Structure de la polymérase du VHB.	14
Figure 12 : Cycle répliatif du virus de l'hépatite B	16
Figure 13 : Représentation du génome du VHB sous forme relachée (rcDNA) et sous forme superenroulée (cccDNA).	17
Figure 14 : Représentation schématique des principales séquences régulatrices du génome du VHB impliquées dans la transcription virale (<i>enhancers</i> et promoteurs).	19
Figure 15 : Initiation de la transcription inverse	20
Figure 16 : Réplication de l'ADN viral à l'intérieur de la capsid.	21
Figure 17 : Répartition géographique des différents géotypes du virus de l'hépatite B.	25
Figure 18 : Principales mutations dans la MHL sélectionnées par les immunoglobulines spécifiques, les anticorps monoclonaux, ou la vaccination.	27
Figure 19 : Réponse cellulaire T cytotoxique..	33
Figure 20 : Mutations de résistance actuellement connues pour la lamivudine et l'adéfovir.	48
Figure 21 : Principe des PCR permettant l'amplification sélective du cccDNA.	49
Figure 22 : Evolution des marqueurs sériques lors d'une hépatite B aiguë	52
Figure 23 : Evolution des marqueurs sériques lors d'une hépatite B chronique.....	53
Figure 24 : Principe de la réaction d'amplification du génome entier du VHB.....	114
Figure 25 : Localisation des couples d'amorces utilisés pour le séquençage du génome entier du VHB.....	115
Figure 26 : Répartition des charges virales mesurées dans le sérum et dans les PBMC des patients VIH- et VIH+, selon leurs profils sérologiques.	121

Figure 27 : Evolution des concentrations d'ADN total et de cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients AgHBs+ AgHBe+ au cours de leur suivi.....	134
Figure 28 : Evolution des concentrations d'ADN total et de cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients AgHBs+ Ac anti-HBe+ au cours de leur suivi.	135
Figure 29 : Principe de la détection des jonctions ADN viral – ADN humain, par PCR Alu et hybridation en Southern Blot.....	140
Figure 30 : Résultat des essais de spécificité et de sensibilité de la PCR Alu et du Southern Blot.	142

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des principaux tests commerciaux actuellement disponibles pour la quantification de l'ADN du VHB.....	45
Tableau 2 : Répartition des patients dans chaque groupe, selon leur profil sérologique VHB et la présence ou non de coinfections par le VHC et/ou le VIH.....	112
Tableau 3 : Détection et quantification de l'ADN total et du cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients AgHBs+.	116
Tableau 4 : Détection et quantification de l'ADN total et du cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients présentant des Ac anti-HBc isolés.	119
Tableau 5 : Détection et quantification de l'ADN total et du cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients présentant des Ac anti-HBs et anti-HBc.	120
Tableau 6 : Génotypes des souches de VHB isolées à partir des PBMC et des sérums des patients étudiés.	124
Tableau 7 : Comparaison des résultats de la recherche de l'ADN du VHB dans les compartiments sérique et leucocytaire de patients AgHBs- de notre étude à ceux d'études antérieures.	126
Tableau 8 : Marqueurs sérologiques viraux, biochimiques et traitement des patients AgHBs+ étudiés.....	132
Tableau 9 : Amorces utilisées dans la PCR Alu, permettant l'amplification des jonctions ADN du VHB – ADN cellulaire, et amorces utilisées pour préparer les amplifiats de VHB servant de témoins positifs d'hybridation.	139
Tableau 10 : Détection de l'ADN intégré dans les PBMC des patients présentant des Ac anti-HBc isolés.....	143
Tableau 11 : Détection de l'ADN intégré dans les PBMC des patients présentant des Ac anti-HBs et anti-HBc	144

ABRÉVIATIONS

aa	acides aminés
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	antigène
AMM	autorisation de mise sur le marché
ARN	acide ribonucléique
ARNpg	ARN pré-génomique
BCP	<i>basal core promoter</i> promoteur basal du core
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i> : ADN double-brin circulaire
CHC	carcinome hépatocellulaire
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i> : lymphocytes T cytotoxiques
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> : test immunoenzymatique
En	<i>enhancer</i> : enhanceur
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i> : traitement antiretroviral hautement actif
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> : complexe majeur d'histocompatibilité humain
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
kDa	kiloDalton
MHL	<i>major hydrophilic loop</i> : boucle hydrophile majeure
NK	<i>natural killer</i> : cellules cytotoxiques naturelles
nt	nucléotides
OMS	organisation mondiale de la santé
ORF	<i>open reading frame</i> : phase ouverte de lecture
pb	paires de bases
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> : cellules mononuclées du sang périphérique
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> : réaction d'amplification génique
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i> : ADN circulaire relâché
RE	reticulum endoplasmique
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> : polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RIA	<i>radioimmunoassay</i> : test radioimmunologique
RNaseH	ribonucléase H
RT	<i>reverse transcriptase</i> : transcriptase inverse

Th	<i>T helper</i> : T auxiliaires
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> : facteur de nécrose tumorale
UI	unité internationale
VHB	virus de l'hépatite B
VHC	virus de l'hépatite C
VHD	virus de l'hépatite delta
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
WHO	<i>world health organization</i> : organisation mondiale de la santé

INTRODUCTION

Malgré l'existence d'un vaccin efficace, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique mondiale, avec plus de 350 millions d'individus atteints d'hépatite chronique et environ 1 million de morts par an [1, 2]. L'hépatite B est une maladie le plus souvent bénigne, mais qui évolue chez 5 à 10 % des adultes immunocompétents vers une hépatite chronique [3], qui peut conduire au développement d'une cirrhose voire d'un hépatocarcinome.

Les tests sérologiques de routine (détection des antigènes de surface associés à la capsid et des anticorps correspondants) permettent généralement de poser le diagnostic d'hépatite chronique et de surveiller l'évolution de la maladie. Cependant, certains patients atteints d'hépatite B chronique présentent des profils sérologiques atypiques, mettant en défaut les tests diagnostiques classiques. Ainsi, la recherche du génome viral dans le sérum par amplification génique (*polymerase chain reaction* : PCR) a permis de mettre en évidence une réplication du VHB chez des patients ne possédant aucun marqueur sérologique d'une infection B ou seulement des anticorps anti-capsid (anticorps anti-HBc), témoins d'un contact antérieur avec le virus. La proportion de patients présentant ces infections sérologiquement silencieuses ou « infections B occultes » varie selon les populations étudiées et les techniques de dépistage utilisées.

Le risque majeur lié à ces infections occultes est l'aggravation de l'atteinte hépatique alors que les transaminases restent souvent normales [4]. Par ailleurs, devant le risque de transmission du virus, la question du dépistage des hépatites sérologiquement silencieuses lors des dons de sang ou d'organes fait l'objet de débats.

Bien que de nombreuses études soient consacrées à ce sujet, les souches virales à l'origine des hépatites occultes sont loin d'être bien caractérisées, que ce soit au niveau moléculaire, biologique ou clinique. Nous avons donc cherché à comprendre quelles particularités distinguent les VHB responsables des infections sérologiquement silencieuses, des virus dits « sauvages ».

Nos travaux ont eu pour but de déterminer les mécanismes de la persistance de réplication virale malgré l'absence d'antigène de surface (AgHBs) détectable. Une première approche a porté sur la recherche de mutations dans le génome viral, permettant au virus d'échapper aux tests classiques de diagnostic. En effet, des mutations dans le gène de surface peuvent mener à l'émergence de variants qui ne sont plus reconnus par les tests sérologiques

et qui échappent à la réponse immunitaire de l'hôte. Une autre approche a visé à explorer d'autres facteurs pouvant expliquer l'étiologie des hépatites occultes, telles une défaillance de la réponse immune, des coinfections par d'autres virus ou une régulation négative de l'expression de l'AgHBs. Nous avons donc ciblé notre étude sur des populations de patients coinfectés par le virus de l'hépatite C (VHC) et par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Nous avons enfin exploré la présence du VHB dans des réservoirs non plasmatiques qui protègeraient le virus de la réponse immune et dans lesquels le VHB se répliquerait à trop faible niveau pour induire un titre d'AgHBs détectable.

Après une revue bibliographique présentant le virus de l'hépatite B ainsi que les infections B « classiques » et occultes, nous détaillerons les différentes phases de notre travail de recherche, dont certaines ont fait l'objet d'articles publiés ou soumis.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : LE VIRUS DE L'HÉPATITE B

A. Taxonomie du virus de l'hépatite B [5]

Le VHB appartient à la famille des *Hepadnaviridae* (contraction de "Hepatotropic DNA Viruses"), virus à ADN hépatotropes. Cette famille regroupe deux genres : *Orthohepadnavirus* et *Avihepadnavirus*, qui partagent des caractéristiques communes comme la morphologie, l'organisation génétique, le mode de réplication, et la spécificité d'hôte.

Le genre *Avihepadnavirus* (virus infectant les aviaires) regroupe les virus du canard de Pekin (Duck Hepatitis B virus: DHBV), du héron (Heron Hepatitis B virus: HHVB), de la cigogne (Stork Hepatitis B Virus : STHBV) et de l'oie des neiges (Ross's Goose Hepatitis B virus). Ils diffèrent des virus des mammifères par l'absence du gène X [5, 6].

Le genre *Orthohepadnavirus* comprend le virus de l'hépatite B humain ainsi que les virus des rongeurs : le virus de la marmotte (Woodchuck Hepatitis B virus : WHB), les virus des écureuils (Ground Squirrel Hepatitis B virus : GSHBV et Tree Squirrel Hepatitis B virus : TSHBV) et les virus des singes (ChHBV chez les chimpanzés, GoHBV chez le gorille, OuHBV chez l'orang-outang, GiHBV chez le gibbon et WMHBV chez le singe laineux). Certaines souches simiennes étant très proches du virus de l'hépatite B humain, les virus des singes ne sont pas classés dans des espèces séparées (Figure 1).

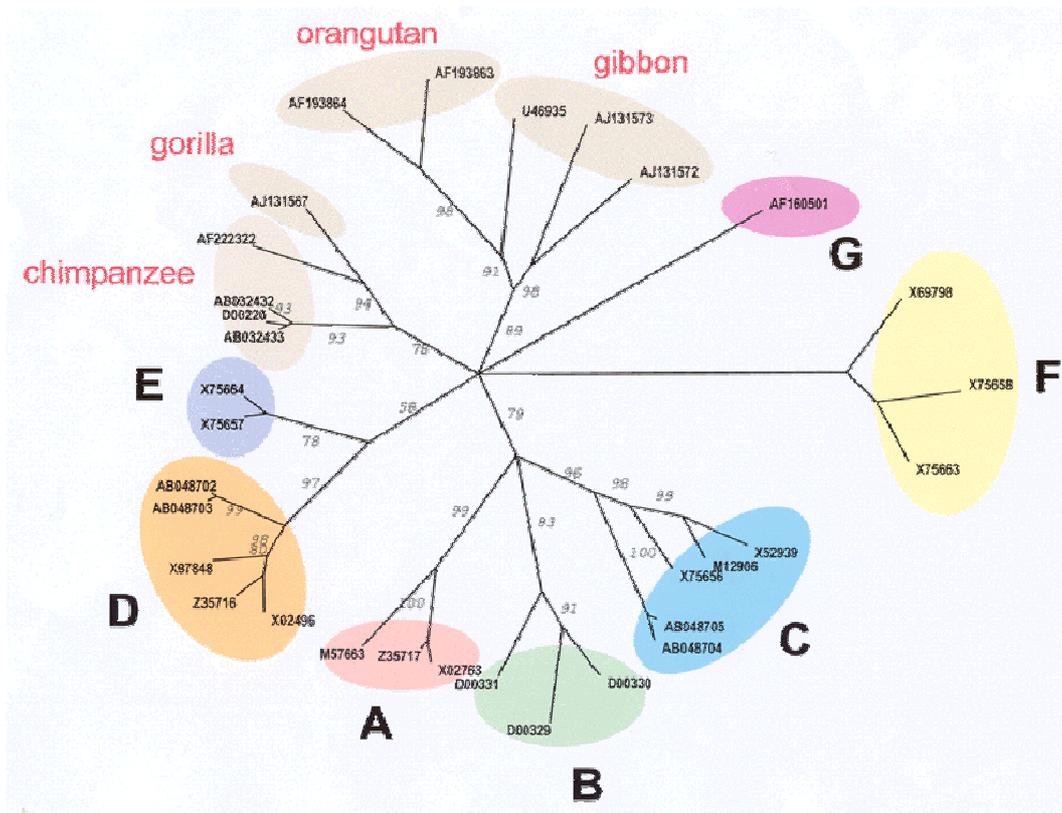


Figure 1 : Analyse phylogénétique des souches humaines et simiennes de virus de l’hépatite B. Les souches sont identifiés par leur numéro d’accèsion à la GenBank (d’après Kidd-Ljunggren et al. [7]).

B. Structure

1. Morphologie

Trois formes différentes du virus de l’hépatite B ont été identifiées par microscopie électronique dans le sérum des patients infectés : des particules infectieuses appelées particules de Dane, et des particules non-infectieuses, sphériques ou allongées, correspondant à une production excessive de protéines d’enveloppe (Figure 2).

Les sphères, de 22 nm de diamètre, et les bâtonnets de même diamètre mais longs de plusieurs centaines de nanomètres, sont composés de protéines d’enveloppe virales et de lipides cellulaires. Ces particules ne sont pas infectieuses puisque dépourvues d’ADN. Elles sont 10 000 à 1 000 000 fois plus nombreuses que les particules de Dane dans le sérum des sujets infectés.

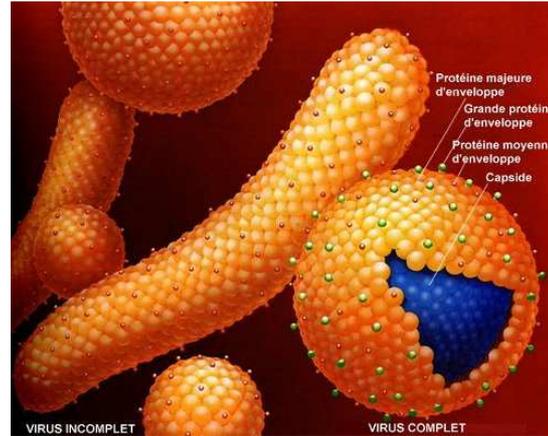
A**B**

Figure 2 : Morphologie du VHB. **A-** Photographie en microscopie électronique des trois formes de particules virales présentes dans le sérum. **B-** Modélisation informatique des particules de Dane et des formes non infectieuses.

Les particules de Dane représentent le virus complet, infectieux. Elles mesurent 42 nm de diamètre et sont constituées d'une enveloppe lipoprotéique et d'une nucléocapside.

L'enveloppe virale est une bicouche de lipides, provenant de la membrane des cellules de l'hôte, dans laquelle sont enchâssées des protéines de surface virales. Elle contient une nucléocapside icosaédrique de 27 nm de diamètre. La capside protéique protège le génome viral, composé d'un brin (-) et d'un brin (+) d'ADN, et la polymérase virale ARN/ADN dépendante liée de façon covalente au brin (-) d'ADN (Figure 3). Sont également retrouvées dans la capside des protéines kinases et protéines chaperonnes d'origine cellulaire ainsi que des oligoribonucléotides liés à l'extrémité 3' du brin (+) d'ADN.

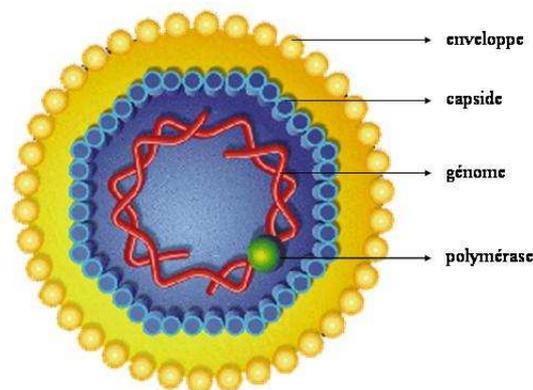


Figure 3 : Représentation schématique des différents constituants du virus de l'hépatite B.

2. Organisation génomique [8, 9]

Le génome du VHB est l'un des plus petits génomes connus parmi les virus à ADN, avec seulement près de 3200 nucléotides (nt).

L'ADN du virion est sous forme circulaire relâchée, partiellement bicaténaire, composé d'un brin complet long, ou brin (-), et d'un brin court, ou brin (+) (Figure 4). Le brin long est le brin codant, de longueur constante. Il possède en 5' une courte redondance terminale de 9 bases qui chevauche l'extrémité 3', et présente donc à cet endroit une courte interruption de séquence appelée « gap ». La polymérase virale est liée de façon covalente via un pont phosphodiester à l'extrémité 5' du brin (-). Le brin court, non codant, a une extrémité 5' bien définie, qui porte un oligonucléotide de 18 bases, mais une extrémité 3' variable. Sa longueur n'est donc pas constante et représente 30 à 85 % de la taille du brin (-). Le maintien de la forme circulaire est assuré par l'appariement des extrémités 5' de chaque brin sur une longueur de 200 nt, appelée région cohésive. En outre, le génome contient de part et d'autre du gap, deux séquences répétées de 10 à 12 bases, appelées DR1 et DR2, qui sont essentielles pour la réplication du virus.

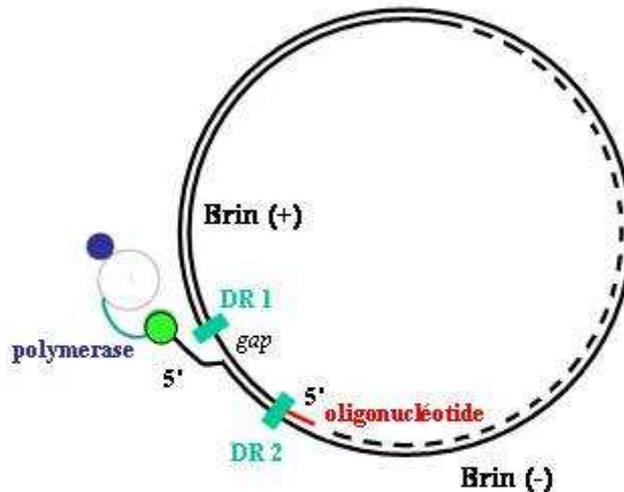


Figure 4 : Organisation du génome du virus de l'hépatite B.

Malgré sa petite taille, l'ADN du VHB est porteur d'une très grande quantité d'informations, le brin long possédant des séquences codantes dans les trois cadres de lecture transcriptionnelle.

On distingue quatre phases ouvertes de lecture (*Open Reading Frame* : ORF) (Figure 5).

✓ l'ORF S contient 3 codons d'initiation de transcription et code donc trois protéines de surface : le gène S code l'AgHBs ou protéine majeure S (small protein : S), le gène préS2/S code la protéine moyenne préS2 (medium protein : M) et le gène préS1/préS2/S code la grande protéine préS1 (large protein : L).

✓ l'ORF C code les protéines de core ou protéines de capsid. Un premier codon d'initiation permet la synthèse d'une séquence signal (à partir du gène préC) nécessaire à la translocation de la protéine HBe dans le reticulum endoblastique (RE) et à sa sécrétion dans le plasma. En l'absence de cette séquence signal (la transcription débute au second codon d'initiation), la protéine HBc est synthétisée. Elle n'est pas excrétée dans le plasma et s'assemble pour former la capsid virale.

✓ la plus longue phase ouverte de lecture, l'ORF P, code la polymérase virale. Elle couvre 80 % du génome et chevauche donc partiellement ou totalement toutes les autres phases ouverte de lecture.

✓ la plus petite ORF code une protéine transactivatrice X.

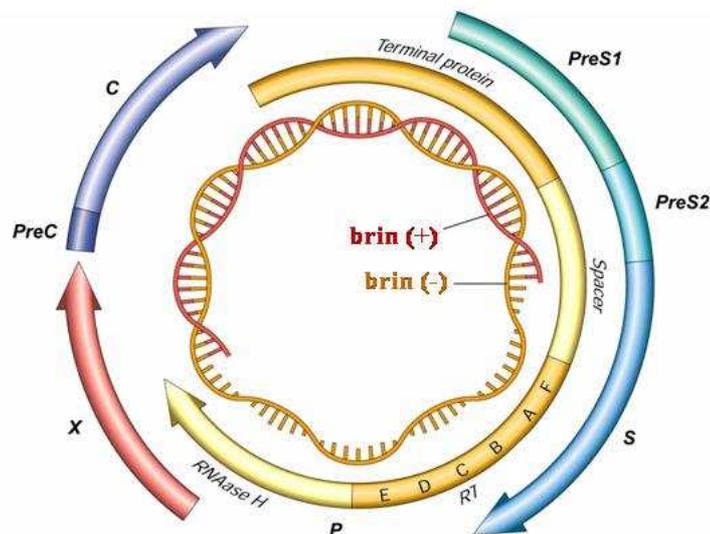


Figure 5 : Représentation schématique des 4 phases de lecture du virus de l'hépatite B.

3. Les protéines du VHB

3.1. Les protéines d'enveloppe

Les trois protéines d'enveloppe sont issues de la même phase ouverte de lecture, à partir de trois codons d'initiation différents, mais ont un codon stop commun. Ces protéines ne diffèrent donc que par leur extrémité N-terminale, plus ou moins longue. La protéine S a un poids moléculaire de 25 kDaltons (kDa), la protéine M, de 31 kDa et la grande protéine, de 39 kDa.

Les protéines d'enveloppe sont synthétisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Lors de leur traduction, elles sont directement insérées dans la membrane du RE et subissent plusieurs modifications post-traductionnelles de type glycosylation et myristilation. Elles possèdent notamment un site de N-glycosylation en position 146 (résidu asparagine) du domaine S commun aux trois protéines, qui n'est cependant pas systématiquement utilisé.

3.1.1. La protéine S ou antigène HBs

Cette protéine est la principale composante de l'enveloppe du VHB (65 % des protéines d'enveloppe dans les virions). Elle est composée de 226 acides aminés (aa) et existe sous deux formes : non glycosylée (p24) et N-glycosylée au niveau de l'asparagine 146 (gp27).

La modélisation informatique de la structure secondaire de la protéine S [10] suggère la présence de quatre hélices hydrophobes transmembranaires (Figure 6). La partie N-terminale de l'hélice α I (aa 8 à 22) est transloquée dans la lumière du RE et se trouve ainsi exposée à l'extérieur du virus. De même, l'hélice α II (aa 80 à 98) s'ancre dans la membrane du RE et entraîne la translocation de la région située en aval dans la lumière du RE. Les hélices α III et α IV se constituent dès que la traduction est terminée. La région située entre les hélices II et III forme une boucle dans la lumière du RE, stabilisée par des ponts disulfures intra-chaîne établis entre les résidus cystéines. L'asparagine 146 est ainsi exposée à l'action des enzymes luminales catalysant la glycosylation. Cette boucle hydrophile, appelée « boucle hydrophile majeure » (ou *Major Hydrophilic Loop* : MHL) porte les épitopes antigéniques de la protéine S et est donc impliquée dans la réponse immune anti-VHB. Le principal déterminant antigénique, cible majeure des anticorps neutralisants induits par la vaccination ou l'infection, est appelé déterminant « a » et est situé entre les acides aminés 121 et 149.

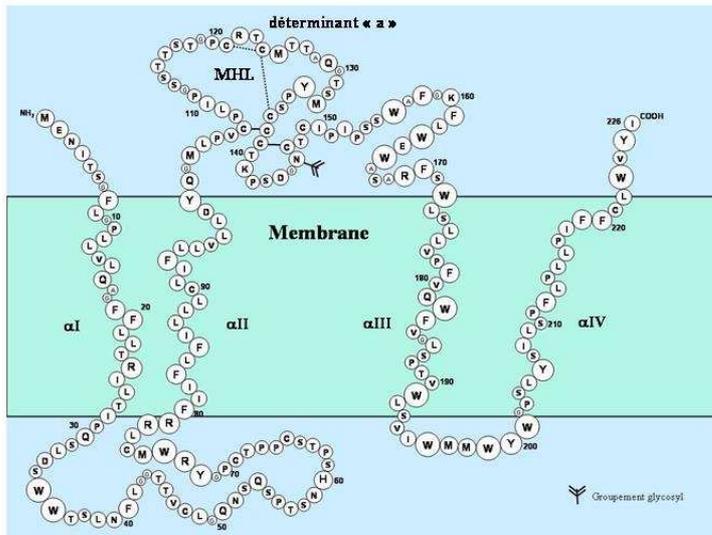
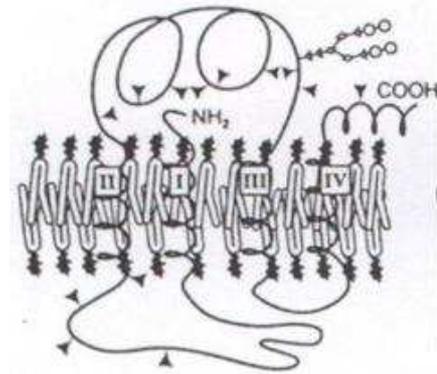
A**B**

Figure 6 : Topologie transmembranaire de la protéine S. **A-** Modélisation informatique des quatre hélices α et de la MHL contenant le déterminant « a » (d'après Kay et al. [11]). **B-** Représentation schématique de l'AgHBs d'après Duclos-Vallee et al. [12].

L'AgHBs, directement exposé à la surface des particules virales, participe également à la reconnaissance et la fixation du VHB aux récepteurs des cellules cibles. En effet, des études *in vitro* ont montré que la protéine S interagissait avec de nombreuses molécules associées à la membrane cellulaire, telles l'annexine V et l'apolipoprotéine H [12].

3.1.2. La protéine M

Elle possède une topologie comparable à la protéine S. Elle comprend le domaine S, additionné de 55 acides aminés à son extrémité N-terminale. Cette protéine possède en position 4 un site de glycosylation systématiquement utilisé.

Après translocation dans la lumière du RE, le domaine préS2 recouvre partiellement la petite protéine (Figure 7). Il semblerait donc logique qu'il soit impliqué dans les mécanismes d'attachement aux cellules hôtes. Toutefois, les résultats des études ne démontrent pas formellement son implication dans les étapes précoces de l'infection par le VHB [12, 13].

La partie N-terminale de la région préS2 contient des épitopes antigéniques induisant des anticorps protecteurs [9].

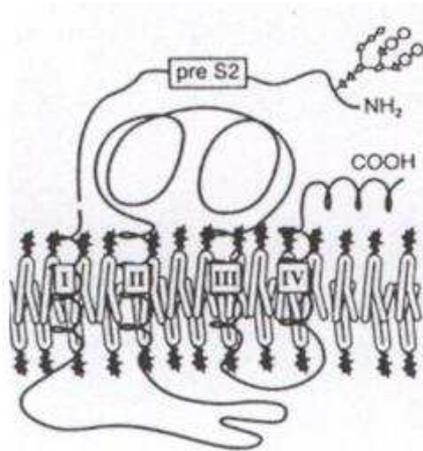


Figure 7 : Topologie transmembranaire de la protéine moyenne [12].

3.1.3. La protéine L

Elle contient 100 à 120 acides aminés supplémentaires par rapport à la protéine M.

Cette protéine possède deux topologies différentes : lors de sa synthèse et de sa maturation, le domaine préS (constitué des séquences préS1 et préS2) se trouve dans le cytosol des cellules infectées. L'extrémité N-terminale est alors myristilée, permettant sa fixation à la membrane du RE. En revanche, le résidu 4 du domaine préS2 n'est pas glycosylé puisque non exposé aux enzymes luminales pendant la maturation protéique. Puis, lors de la phase d'excrétion de la particule virale, environ 50 % des molécules L synthétisées sont transloquées à travers la membrane du RE. La boucle formée par le domaine préS1 dans la lumière du RE masque le domaine S et une partie du domaine préS2. La grande protéine est donc exprimée soit au niveau de la face interne de l'enveloppe virale, soit à la surface des virions excrétés (Figure 8).

Le domaine préS1 situé du côté cytosolique de la membrane du RE est susceptible d'interagir avec les protéines de capsid et jouerait donc un rôle important lors de l'étape d'enveloppement du virus [14].

Exprimé à la surface des virions, le domaine préS1 joue un rôle prédominant dans l'interaction virus/cellule cible, en particulier via la séquence d'acides aminés 21-47 [15, 16]. Plusieurs protéines cellulaires capables de fixer la région préS1 ont été identifiées et proposées comme récepteurs potentiels du VHB, notamment la glyceraldéhyde-3-dehydrogénase [12]. Par ailleurs, le domaine préS1 contient des épitopes antigéniques, capables d'induire des anticorps protecteurs.

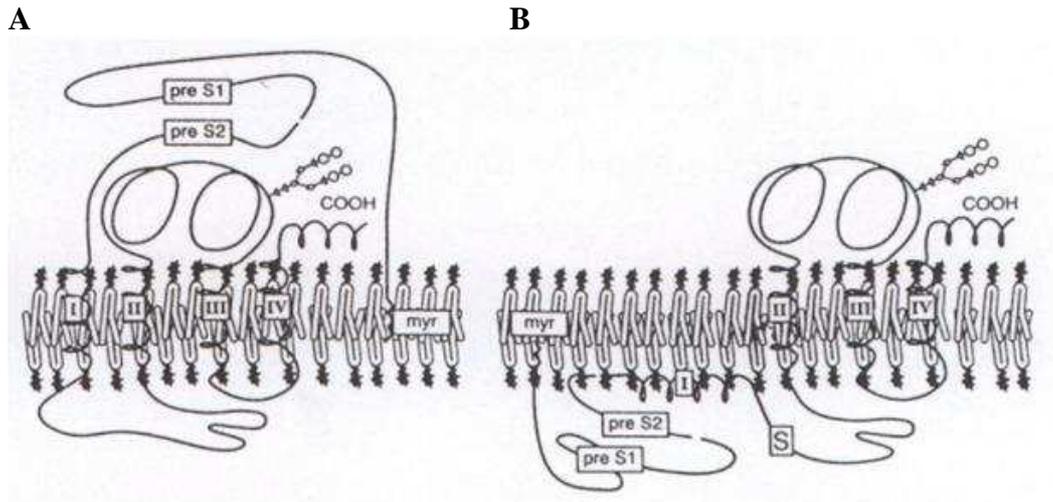


Figure 8 : Topologie transmembranaire de la grande protéine. **A-** Structure après translocation dans la lumière du RE : la protéine L sera exprimée à la surface des particules virales. **B-** Structure après sa biosynthèse et sans translocation vers la lumière du RE : la protéine L restera à l'intérieur des virions [12].

3.2. Les protéines de core et précocore

La protéine de core, ou antigène HBc, est constituée de 183-185 acides aminés, avec un poids de 22 kDa. Elle est synthétisée dans le cytosol des cellules infectées. La région N-terminale de la protéine contient des acides aminés hydrophobes, impliqués dans la formation de la capsidie icosaédrique. La première étape est la dimérisation des unités protéiques [17]. Il semble qu'une certaine concentration de dimères d'AgHBc soit nécessaire pour constituer la capsidie icosaédrique, de 180 ou 240 sous-unités [18] (Figure 9). Le maintien de la structure est assuré par des ponts disulfures. La région C-terminale basique contient quatre domaines riches en arginine, qui seraient essentiels à l'étape d'encapsidation de l'ARN pré-génomique et de la polymérase virale [19, 20]. En effet, des sites de phosphorylation sont localisés dans les trois derniers domaines riches en arginine et l'état de phosphorylation de la protéine HBc régulerait les interactions entre la capsidie et l'ADN viral encapsidé. Ces phosphorylations seraient assurées par une kinase cellulaire, encapsidée en même temps que l'ARN pré-génomique. De plus, un signal de localisation nucléaire a été identifié dans cette structure C-terminale.

L'AgHBc est très immunogène mais n'induit pas la synthèse d'anticorps protecteurs.

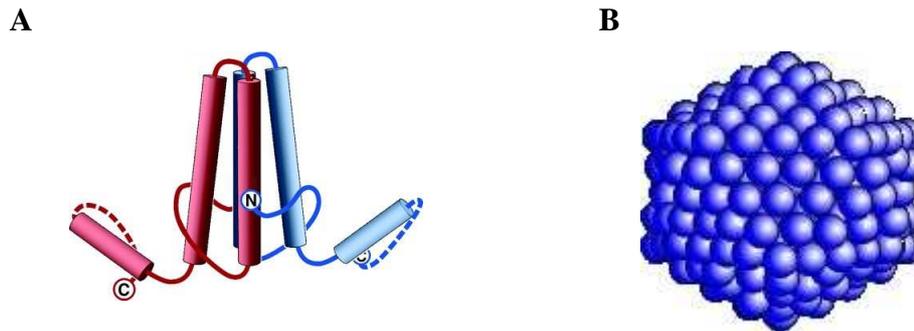


Figure 9 : Modélisation informatique des protéines de capside du VHB, sous forme de dimères (A) et assemblées en structure icosaédrique (B).

La protéine précore, ou antigène HBe, possède 29 acides aminés supplémentaires côté N-terminal. Cette séquence très hydrophobe constitue un peptide signal d'adressage au RE, permettant la translocation de la protéine HBe dans la lumière du RE. Initialement synthétisée sous la forme d'un peptide de 25 kDa (comportant les 125 aa de la protéine C et les 29 aa supplémentaires à l'extrémité N-terminale), la protéine HBe est maturée dans le RE. Elle perd successivement le peptide signal N-terminal et une partie de la région C-terminale. Finalement, l'AgHBe est excrété dans le sérum des patients sous forme d'une protéine de 17 kDa, forme soluble de la protéine HBc (Figure 10). Il arrive que le processus s'interrompt après le clivage du peptide signal et que la protéine résultante soit relarguée dans le cytosol voire dans le noyau de la cellule [21, 22]. La fonction exacte de l'AgHBe n'a pas encore été déterminée mais elle n'apparaît pas indispensable à la réplication du VHB. Des études suggèrent que l'AgHBe entraîne une déplétion des lymphocytes T helpers, et serait donc à l'origine d'une réponse T cytotoxique peu vigoureuse [23, 24].

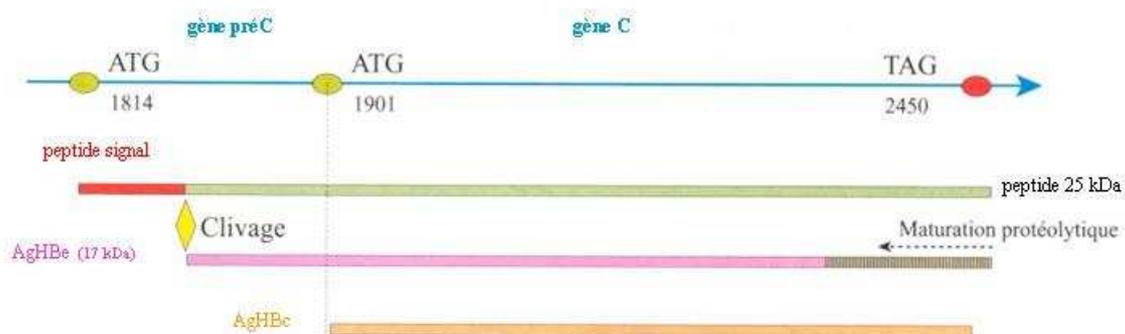


Figure 10 : Représentation schématique de la synthèse de l'AgHBe à partir de l'ORF C (d'après Denis et al. [25]).

3.3. La polymérase virale

La polymérase virale est une protéine d'environ 850 acides aminés (90 kDa). Elle possède des activités de transcriptase inverse (polymérase ARN-dépendante), d'ADN polymérase (ADN-dépendante) et de RNaseH. Elle sert aussi d'amorce lors de la réplication du brin (-).

Quatre domaines fonctionnels ont été définis au sein de la polymérase (Figure 11) :

✓ le domaine N-terminal (aa 1 à 177, environ) est lié de façon covalente à l'extrémité 5' du brin (-) de l'ADN viral et est impliqué dans l'initiation de la transcription. En effet, alors que les rétrovirus utilisent un ARN de transfert pour amorcer la transcription inverse, la polymérase des hépadnavirus sert elle-même d'amorce. Ce domaine est appelé *Primase* ou *Terminal Protéine* (TP)

✓ une région hypervariable (aa 178 à 346, environ), appelée *Spacer*. Le seul rôle identifié de cette région est d'assurer la flexibilité de la polymérase. Des mutations ou délétions dans cette région n'affectent pas l'activité de l'enzyme.

✓ le domaine transcriptase inverse ou *Reverse Transcriptase* (RT; aa 347 à 690, environ) porte les activités ARN-dépendante et ADN-dépendante. Il est composé de 6 régions (A à F) très conservées, dont les modifications de séquences altèrent l'activité de la polymérase.

✓ la région C-terminale (aa 691 à 843, environ) possède une activité RNaseH, permettant la dégradation de l'ARN pré-génomique qui sert de matrice lors de la synthèse du brin (-) de l'ADN viral.

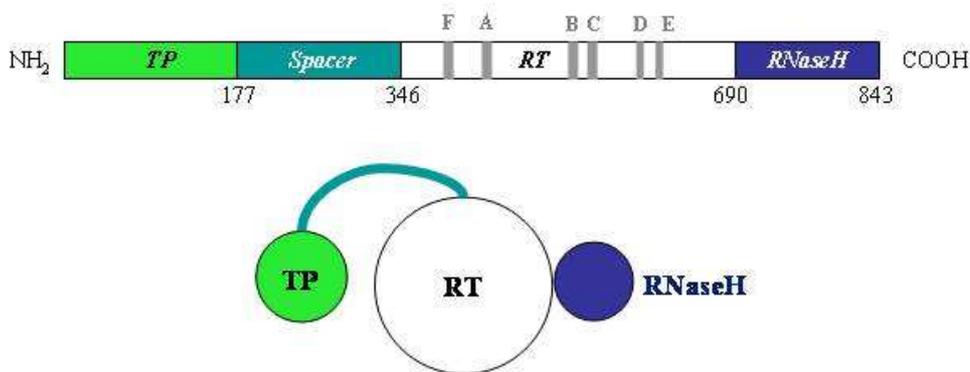


Figure 11 : Structure de la polymérase du VHB.

3.4. La protéine X

Cette petite protéine de 17 kDa et 154 acides aminés reste la moins bien documentée. Le fait que cette protéine n'est pas retrouvée chez les hépadnavirus aviaires suggère qu'elle n'est pas impliquée dans les mécanismes de réplication ou d'assemblage des particules virales. Selon certains auteurs, elle serait principalement présente dans le cytoplasme des cellules infectées et seule une petite fraction serait retrouvée dans le noyau cellulaire [26].

Si son rôle *in vivo* n'est pas clairement défini, des études *in vitro* ont montré que la protéine X était un activateur de la transcription de nombreux gènes cellulaires. Cette protéine ne semble pas interagir directement avec l'ADN, mais plutôt agir via l'activation d'autres facteurs de transcription [8, 9, 27]. Son rôle dans les processus de cancérisation a été évoqué mais reste à ce jour non prouvé [27].

3.5. La protéine HBSP (*Hepatitis B Splice Protein*)

Cette protéine d'environ 10 kDa résulte de l'épissage de l'ARN pré-génomique, qui sert à la traduction de la polymérase de la protéine de capsid. La protéine HBSP est constituée d'une région N-terminale identique à celle de la polymérase et d'une région C-terminale spécifique, différente des autres protéines du fait de l'épissage.

Cette protéine possède des propriétés antigéniques et, *in vitro*, induit l'apoptose des cellules infectées. Elle ne semble pas avoir d'effet sur la réplication virale [28].

C. Cycle de réplication

Du fait de l'absence de système cellulaire permettant l'infection *in vitro*, le cycle de réplication des *Hepadnaviridae* n'a pu être compris que grâce à des modèles animaux, notamment celui du virus du canard de Pékin (DHBV). La caractéristique majeure de ce cycle est la réplication de l'ADN viral par transcription inverse de l'ARN pré-génomique (Figure 12). Contrairement aux rétrovirus, dont la réplication passe également par une phase de transcription inverse, l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire n'est pas nécessaire à la réplication du VHB.

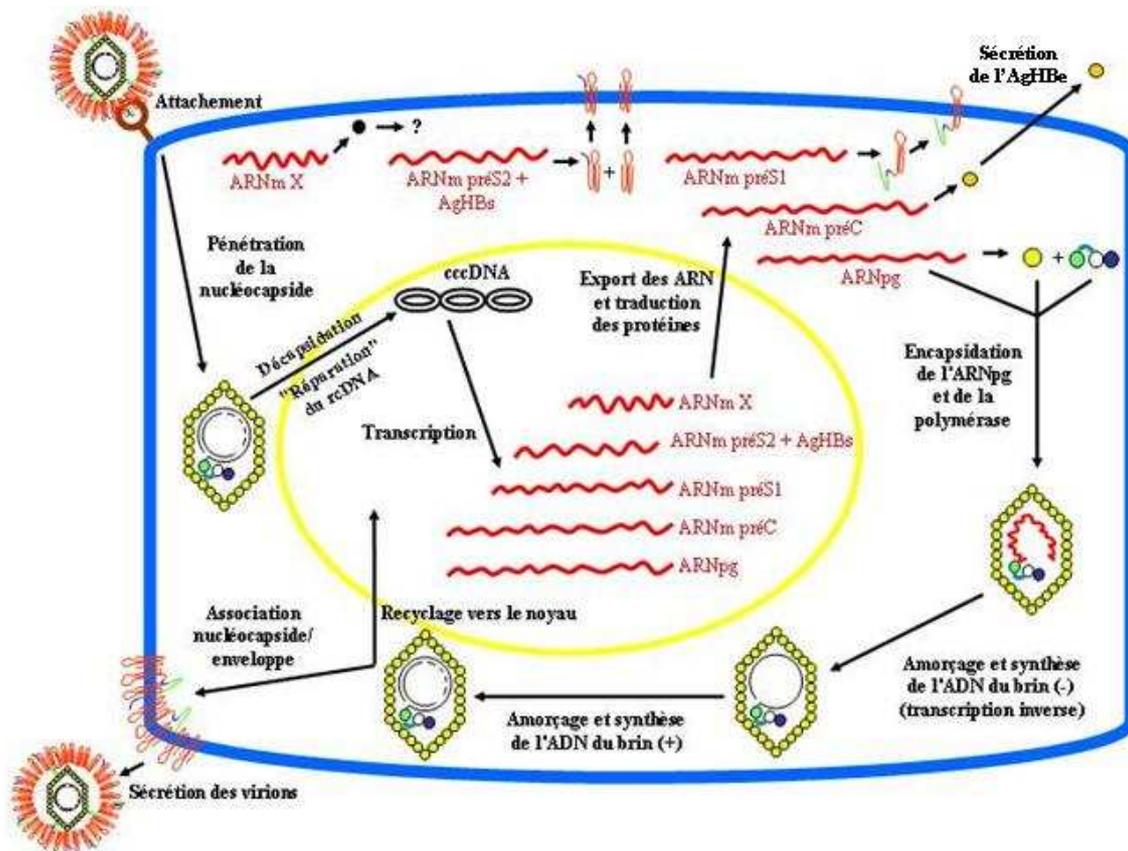


Figure 12 : Cycle réplcatif du virus de l'hépatite B (d'après Kay et al. [11])

1. Interaction du VHB avec les hépatocytes et entrée du virus

Bien que de nombreux travaux aient été consacrés à ce sujet, l'absence de modèle d'infection *in vitro* adapté au VHB a freiné considérablement la compréhension des étapes précoces de l'infection. Ainsi, le processus d'entrée du virus dans l'hépatocyte est encore peu connu. Des études réalisées chez le canard ont montré que le domaine préS de la protéine de surface du DHBV interagissait avec une glycoprotéine cellulaire de 180 kDa (gp 180), associée à la famille des carboxypeptidases [29] et que le complexe gp180-DHBV entrait par endocytose dans la cellule [30]. Ce modèle pourrait s'appliquer au VHB, même si les récepteurs sont différents. La nucléocapside serait ensuite libérée dans le cytoplasme par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome. Un site probable de fusion a été identifié à l'extrémité N-terminale de la protéine S [31]. Mais très récemment, Stoeckl et al. [32] ont montré l'implication d'un peptide appartenant aux protéines de surface du VHB (*translocation motif*: TLM) dans le processus de libération des particules virales de l'endosome dans le cytosol.

Les étapes suivantes sont encore méconnues. Il est supposé que les protéines de core, une fois phosphorylées, jouent un rôle essentiel dans l'acheminement de l'ADN viral vers le noyau cellulaire [33]. Le lieu de la décapsidation n'est pas défini : soit la nucléocapside complète traverse la membrane nucléaire, soit l'ADN seul est acheminé dans le noyau.

2. Formation de l'ADN circulaire superenroulé

La première étape de la réplication virale consiste en la transformation de la forme relâchée de l'ADN viral (*relaxed circular DNA* : rcDNA) en une forme superenroulée, complètement circulaire et fermée de manière covalente, appelée cccDNA (*covalently closed circular DNA*) (Figure 13). Cette transformation survient dans les 24 heures suivant le début de l'infection par le VHB [34, 35]. Elle nécessite la terminaison de la synthèse du brin (+), l'élimination de l'oligonucléotide fixé à son extrémité 5', le détachement de la polymérase virale, l'élimination de la partie redondante du brin (-), la liaison covalente des deux brins puis le superenroulement de l'ADN. Il semblerait que la polymérase virale ne soit pas impliquée dans cette étape qui serait effectuée par des enzymes cellulaires [36].

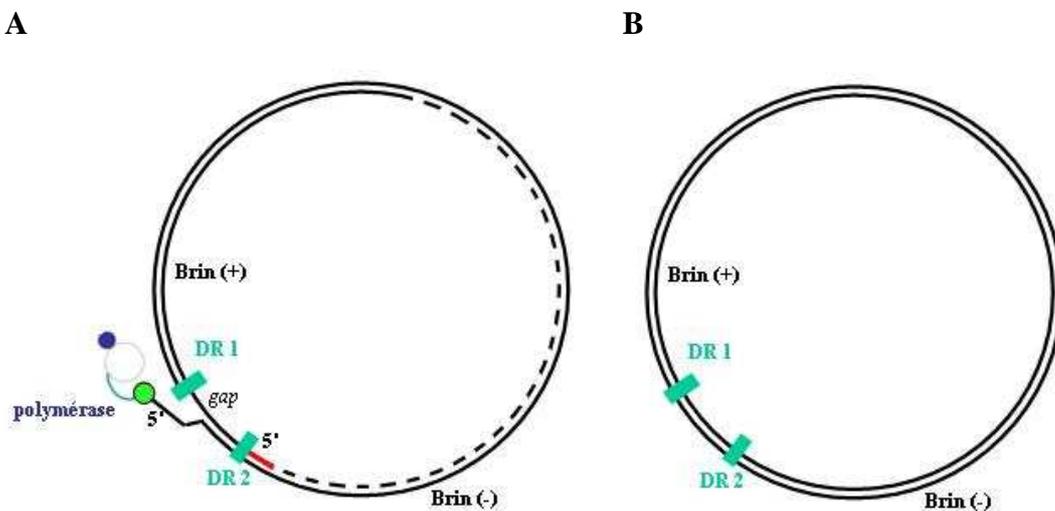


Figure 13 : Représentation du génome du VHB sous forme relâchée (rcDNA) (A) et sous forme superenroulée (cccDNA) (B).

3. Synthèse des ARN viraux

Seul le brin (-) du cccDNA sert de matrice pour la transcription des ARN viraux par la polymérase. Deux sortes de transcrits sont synthétisés : les ARN subgénomiques et les ARN génomiques. Les ARN subgénomiques fonctionnent comme des ARN messagers pour la traduction des trois protéines d'enveloppe (préS1, préS2 et S) et de la protéine X. Les ARN génomiques incluent l'ARN génomique préC qui sera traduit en protéine HBe, et l'ARN prégénomique (ARNpg), qui a une double fonction : il sert de matrice pour la transcription inverse et pour la traduction de la polymérase et de la protéine C. Dans la majorité des cas, ces ARN viraux ne sont pas épissés. Ils sont exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines.

La régulation de la transcription résulte d'interactions complexes entre différents facteurs et les séquences régulatrices du génome du VHB que nous ne détaillerons pas dans cet ouvrage. L'expression de chaque gène est régulée via un ou plusieurs promoteurs, eux-mêmes sous le contrôle de deux *enhancers* (EnI et EnII) [37]. Les *enhancers* sont capables d'activer à distance les promoteurs et peuvent moduler l'expression de plusieurs gènes. Les promoteurs, situés en amont de chaque gène, fixent la majorité des facteurs de transcription (exerçant une régulation positive ou négative de la transcription) et permettent le positionnement de la polymérase au site initial de transcription (Figure 14).

✓ le promoteur core est constitué du promoteur basal du core (*basal core promoter* : BCP) qui régule la transcription de l'ARN génomique préC et de l'ARNpg. Son activité est modulée par des séquences de régulation situées en amont qui représentent l'EnII et par l'EnI, situé en amont du gène X.

✓ le promoteur préS1 est un promoteur faible, régulant la transcription de l'ARN subgénomique préS1. Son activité est principalement modulée par l'EnI.

✓ le promoteur S contrôle la transcription des ARN subgénomiques préS2 et S, principalement sous l'influence de l'EnII.

✓ le promoteur X régule la transcription de l'ARN subgénomique X. Son activité peut être fortement stimulée par l'EnI.

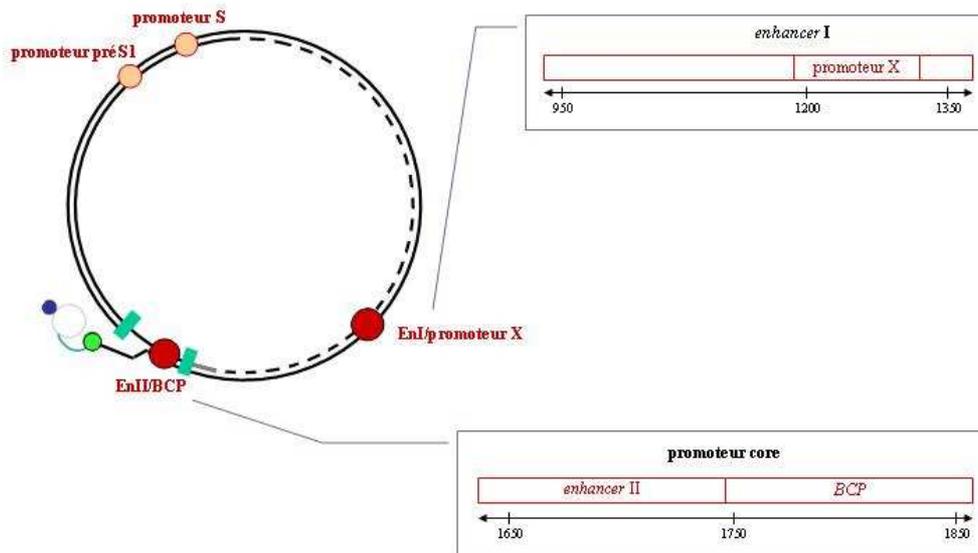


Figure 14 : Représentation schématique des principales séquences régulatrices du génome du VHB impliquées dans la transcription virale (*enhancers* et promoteurs).

4. Encapsidation et synthèse des brins (-) et (+) de l'ADN viral

L'encapsidation débute lorsque suffisamment de protéines HBc et au moins une molécule de polymérase sont synthétisées. La polymérase vient se fixer au niveau d'une structure particulière située à l'extrémité 5' de l'ARNpg, appelée région epsilon (ϵ). Cette étape initie à la fois l'encapsidation du complexe ARNpg-polymérase et la transcription inverse de l'ARNpg [38, 39].

La polymérase débute la synthèse du brin (-) de l'ADN en servant elle-même d'amorce [40, 41]. Après la synthèse d'une séquence de 3-4 nucléotides, le complexe polymérase - oligonucléotide est transloqué au niveau de la région complémentaire DR1 en 3' de l'ARNpg et l'élongation de l'ADN peut continuer (Figure 15).

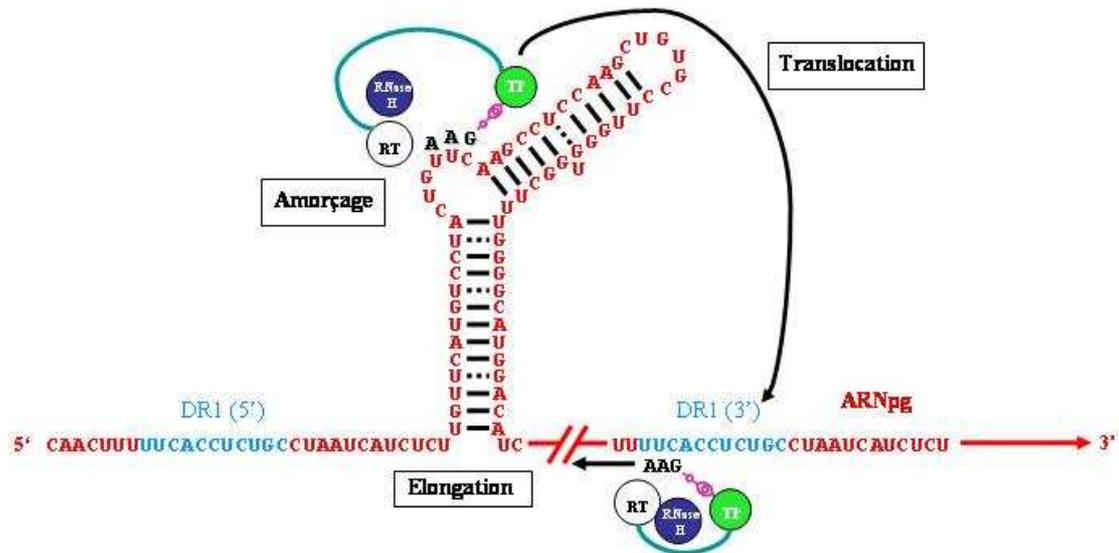


Figure 15 : Initiation de la transcription inverse. Le domaine *Terminal Protéine* (TP) ou *Primase* de la polymérase sert d'amorce (d'après Kay et al. [11])

Au fur et à mesure de l'avancée de la polymérase, l'activité RNaseH dégrade l'ARNpg, excepté une séquence d'une vingtaine de nucléotides à l'extrémité 5' qui reste liée au domaine RT de la polymérase et est donc protégée de la dégradation (Figure 16). Une nouvelle translocation de la polymérase permet l'hybridation de cet oligonucléotide avec la séquence DR2 en 5' du brin (-) de l'ADN néosynthétisé. Il sert d'amorce pour la synthèse du brin (+) [42-44].

Dans 10 % des cas, la synthèse du brin (+) de l'ADN ne se déroule pas correctement : la translocation du complexe polymérase - oligonucléotide en DR2 du brin (-) échoue, aboutissant à la formation d'un ADN double-brin linéaire au lieu du rcDNA [45, 46].

Rapidement, la polymérase arrive à l'extrémité 5' du brin (-). La poursuite de la synthèse du brin (+) n'est possible qu'après circularisation du génome, résultant de l'appariement des extrémités 3' complémentaires du brin (-) et du brin (+) néosynthétisé. Cependant, pour une raison encore inconnue, l'élongation du brin (+) n'est pas complète et il en résulte un ADN semi-circulaire, relâché (rcDNA).

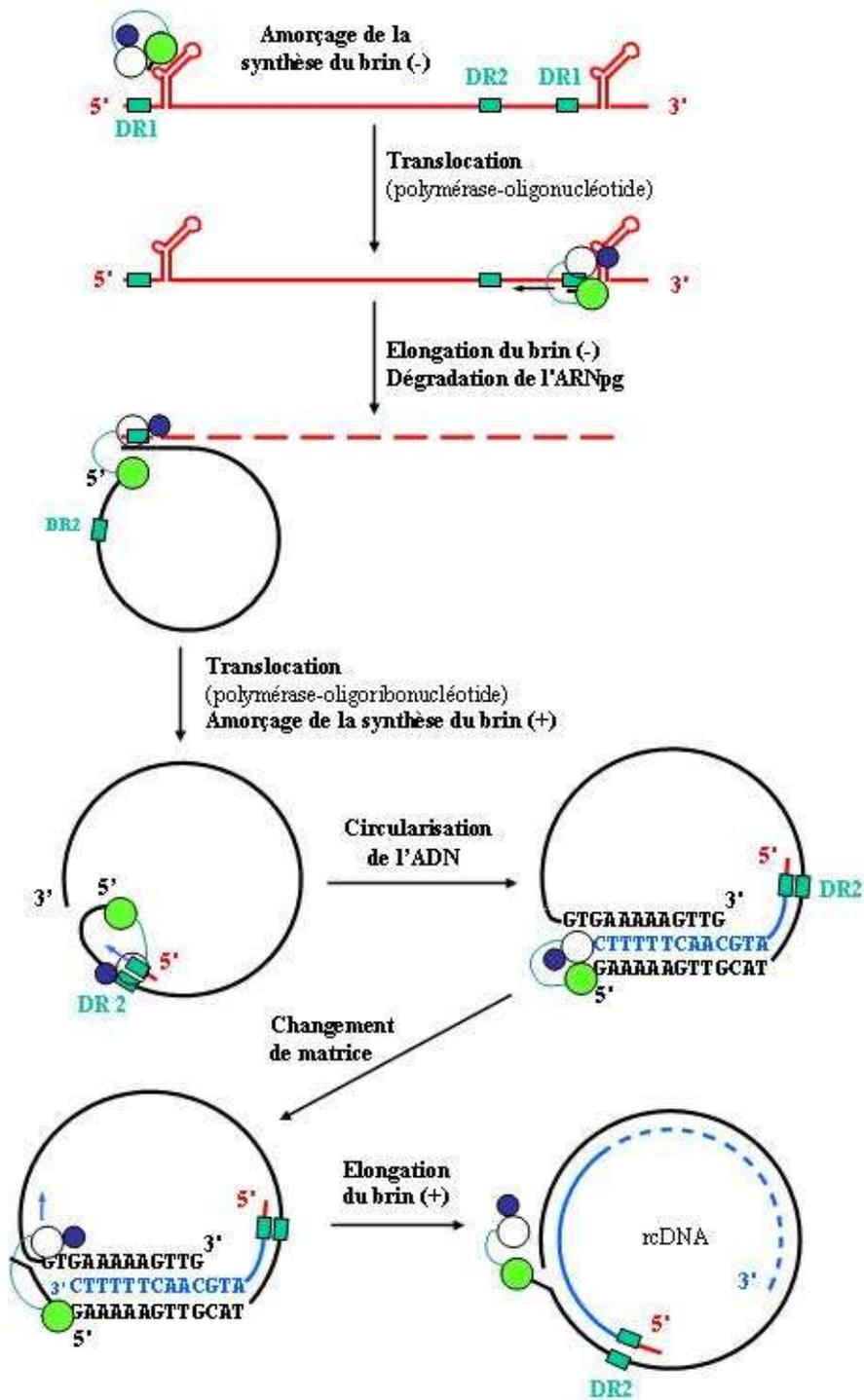


Figure 16 : Réplication de l'ADN viral à l'intérieur de la capsid, d'après Kay et al. [11].

5. Recyclage de la nucléocapside et sécrétion des particules virales

Le devenir des nucléocapsides dépendrait essentiellement de la production des protéines d'enveloppe. En effet, il semble qu'en début d'infection, lorsque les protéines de surface sont en faibles quantités, les nucléocapsides immatures sont préférentiellement recyclées dans le noyau pour amplifier le stock de cccDNA [47, 48]. Certaines expériences ont montré que le cccDNA était stable dans les hépatocytes en phase non répliquative ; sa demi-vie serait supérieure à 30 jours, il pourrait même persister autant que vit la cellule infectée [49-51]. Une demi-vie plus courte, de 3 à 5 jours, a été observée dans d'autres études menées sur des cultures cellulaires [52]. Quoiqu'il en soit, le recyclage du cccDNA permet de maintenir un stock constant d'ADN intranucléaire, entre 10 et 50 copies/cellule [53]. Le cccDNA pourrait être transmis aux hépatocytes issus des mitoses [51].

Puis, au delà d'une certaine concentration en protéines de surface, la voie de la sécrétion serait favorisée. Après maturation, les nucléocapsides seraient capables d'interagir avec les protéines préS1 associées à la membrane du RE. Les particules virales enveloppées sont ensuite excrétées par exocytose, permettant l'infection des cellules voisines [54].

D. Variabilité du virus de l'hépatite B

Comme tous les virus dont la réplication passe par une étape de transcription inverse, le VHB est caractérisé par une grande variabilité génomique, qui est pourtant restée longtemps insoupçonnée, en raison de la complexité et de l'organisation très compacte du génome viral.

Au cours de nos travaux de recherche, nous avons souhaité faire le point sur cette variabilité, ses conséquences et ses méthodes d'étude. Cette synthèse a fait l'objet d'une revue publiée (Wagner et al.[55], voir annexe I).

1. Mécanismes de la variabilité génétique

Plusieurs facteurs associés peuvent expliquer la variabilité du génome du VHB : les erreurs de la polymérase virale qui ne possède pas d'activité 3'5'-exonucléasique et ne corrige donc pas ses erreurs de transcription, la capacité des hépatocytes à accumuler l'ADN superenroulé (cccDNA) et la capacité répllicative (*fitness*) des souches virales [56, 57].

Le taux de mutations spontanées dues à la polymérase virale est estimé à environ 5×10^{-5} substitutions par site et par an [58]. La survenue d'erreurs de réplication est favorisée par l'important niveau de production du VHB (environ 10^{11} virions/jour) : jusqu'à 10^{10} mutations peuvent être générées quotidiennement sur l'ensemble du génome viral [59].

Cependant, l'émergence de nouvelles souches de VHB est limitée par le nombre d'hépatocytes pouvant être infectés (dépendant du *turn-over* hépatocytaire) et par le nombre de molécules de cccDNA qu'ils peuvent contenir. Ainsi, un variant émergent ne peut prédominer sur une souche préexistante que par un mécanisme de compétition pour l'infection des hépatocytes.

De plus, du fait du chevauchement des ORF, beaucoup de mutations influent sur la biologie du virus et sa survie, et de ce fait la majorité des variants sont défectifs. Les autres ont souvent une séquence qui diffère peu de celle de la population dominante et forment des populations minoritaires, appelées « quasi-espèces », coexistant chez un même patient. Elles sont en équilibre instable, leur composition évoluant avec les changements de leur environnement. Les variants les mieux adaptés aux conditions environnementales sont sélectionnés sous l'effet de pressions sélectives qui défavorisent la souche dominante (telles que la réponse immune et les traitements) [60]. Les virus sélectionnés, qui possèdent donc des propriétés différentes de la souche d'origine, émergent alors à un niveau significatif voire majoritaire. Cependant, l'évolution des mutants est modulée par le *fitness* de ces virus : une mutation donnée peut diminuer la capacité répllicative d'une souche qui ne deviendra donc pas la population majoritaire.

2. Les géotypes du VHB

2.1. Définition et classification

L'accumulation des mutations, la sélection des variants les mieux adaptés à l'environnement et leur transmission au sein de zones géographiques ou ethniques délimitées a conduit à la divergence progressive au cours du temps de différents types « sauvages » de VHB. Ces variants sont stables et reflètent l'évolution du VHB. La comparaison des génomes de plusieurs souches a permis de les regrouper en 8 géotypes (de A à H) Cette classification repose sur une divergence entre les séquences nucléotidiques d'au moins 8 % dans tout le génome, ou d'au moins 4 % dans le gène de surface [61, 62].

Okamoto et al. [62] ont décrit les quatre premiers géotypes (de A à D), puis le développement des techniques de biologie moléculaire a permis l'identification des géotypes F, E [63], G [64] et H [65].

2.2. Répartition géographique

La distribution géographique des géotypes du VHB n'est pas homogène et reflète les mouvements de population. Dans la majorité des pays, les patients sont infectés par un nombre limité de géotypes, mais dans certains pays comme les USA, où la mixité ethnique est importante, tous les géotypes sont représentés. La tendance actuelle étant à l'accroissement des mouvements migratoires, les mélanges de géotypes sont favorisés, de même que les phénomènes de surinfections et recombinaisons.

Le géotype A est dominant en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord. Les géotypes B et C sont surtout présents en Asie et le géotype E, en Afrique. Le géotype D est retrouvé sur tous les continents, avec une plus forte prévalence dans le Sud de l'Europe et le Moyen-Orient. La localisation du géotype F est limitée à l'Amérique Centrale et Amérique du Sud. Des cas isolés d'infections dues au géotype G ont été décrits en France, en Allemagne et aux USA. Le géotype H, qui pourrait dériver du géotype F, a été identifié en Amérique Centrale [66, 67] (Figure 17).

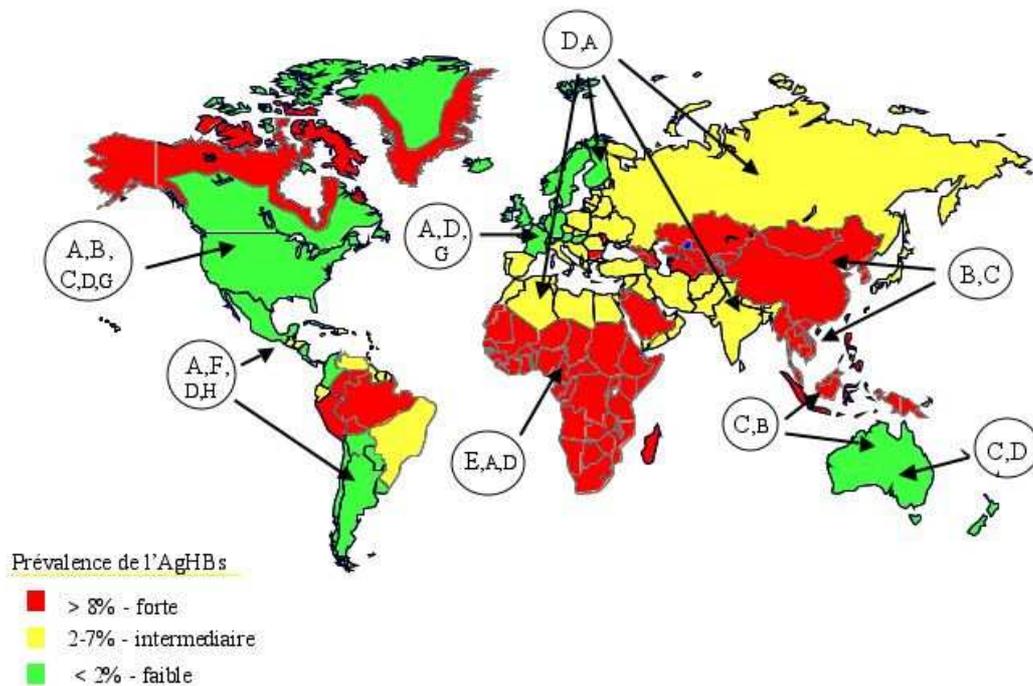


Figure 17 : Répartition géographique des différents génotypes du virus de l'hépatite B.

2.3. Coinfections et recombinaisons

Des coinfections ou surinfections par différents génotypes ne sont pas rares, surtout dans les populations à risque de multiinfections [68, 69]. Le génotype G semble toujours coexister avec le génotype A [64, 70].

Du fait de ces coinfections, des recombinaisons entre génotypes peuvent se produire, notamment entre les génotypes A et D, B et C, A et C, et récemment D et C. La plupart des recombinaisons concernent les séquences précore et core [66, 67, 69].

2.4. Pathogénie des génotypes

Le rôle des génotypes dans la progression de la maladie hépatique est controversé. La plupart des études proviennent d'Asie, peu de données sont disponibles en Europe, Afrique et Amérique. Il semble que les patients infectés par un génotype B progressent plus lentement vers la cirrhose et l'hépatocarcinome que ceux infectés par un génotype C. Cependant, à long terme, aucune différence dans la gravité de la maladie n'est observée. Concernant les génotypes A et D, une seule étude suggère l'association du génotype D avec une forme plus

sévère de la pathologie chez des jeunes patients. Il a également été évoqué que les génotypes pouvaient influencer sur l'évolution de l'infection vers la chronicité. En particulier, le génotype A induirait plus fréquemment une hépatite chronique que les génotypes B et C [66, 71, 72].

De même, les données concernant la réponse au traitement par l'interféron ou la lamivudine sont discordantes pour la majorité des génotypes. Seules les études sur le génotype B montrent des résultats similaires, i.e. une tendance à une meilleure réponse à l'interféron par comparaison au génotype C. Par ailleurs, les génotypes ne paraissent pas impliqués dans l'émergence de résistances à la lamivudine [66, 72, 73].

3. Les variants phénotypiques

Ces variants correspondent à l'apparition de mutations ponctuelles, des délétions, voire des insertions de nucléotides dans le génome viral au cours des cycles de réplication et qui tendent à s'accumuler au cours du temps. Les contraintes de l'organisation génomique (chevauchement des ORF) favorisent la sélection des souches dont les mutations portent sur des régions peu ou non indispensables à la survie du virus, « *hot spots* » ou « points chauds de mutations ».

Les variants émergent lors de situations particulières, sous différents types de pressions de sélection : la réponse immunitaire naturelle de l'hôte, la vaccination, les traitements (immunoglobulines, antiviraux).

3.1. Les mutants préC/C

Ces mutants émergent sous la pression de la réponse immune anti-HBe. Ils portent des mutations soit dans la région préC, entraînant un arrêt de l'expression de l'AgHBe, soit dans le promoteur du core, à l'origine d'une diminution de l'expression de l'AgHBe [57, 74]. Les patients infectés par un mutant précore ont donc un profil sérologique particulier, caractérisé par l'absence de détection de l'AgHBe (« patients AgHBe- »). Ces mutations n'affectent pas la synthèse de la protéine HBe et ne semblent pas avoir d'impact sur la réplication du VHB.

Dans 95 % des cas, les variants défectifs en AgHBe présentent une substitution de nucléotide en position 1896 (G1896A) transformant le codon 28 de la région préC en codon-stop. La traduction se termine prématurément, libérant un peptide tronqué qui est bloqué dans le cytoplasme et dans le noyau des hépatocytes infectés. Cette mutation est génotype-dépendante. En effet, chez les virus de génotypes A, F et H, la substitution G1896A entraîne

La substitution G145R est la mutation la plus fréquemment retrouvée. Toutefois, de nombreuses autres mutations ont été décrites en amont du déterminant « a » (entre les aa 110 et 120), à l'origine d'une altération de la conformation des épitopes [79].

Il en sera reparlé dans le chapitre III.

3.3. Les mutants P

La polymérase virale permet l'encapsidation de l'ARNpg et la réplication du génome viral. Les mutations dans le gène P sont donc supposées être létales la plupart du temps.

Blum et al. [80] ont décrit une mutation non-sens à l'extrémité 5' du gène P, qui est associée à un défaut d'encapsidation de l'ARNpg.

La grande majorité des mutations P a été détectée chez des patients sous traitement antiviral. En effet, les molécules inhibitrices de la polymérase de type analogues nucléosidiques sont à l'origine de la sélection de variants résistants. Les mutations sont localisées dans ou à proximité du site catalytique de l'enzyme, i.e. dans la région C très conservée du domaine RT de la polymérase [57]. Le changement conformationnel de la polymérase résultant de ces mutations est responsable de la résistance du virus aux molécules antivirales. Par ailleurs, ces mutations affectent un site essentiel de l'enzyme et sont donc à l'origine d'une plus faible capacité répliquative du virus.

CHAPITRE II : L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HÉPATITE B

A. Epidémiologie et prévention des hépatites B

1. Epidémiologie

1.1. Répartition géographique mondiale

Le virus de l'hépatite B reste encore aujourd'hui un problème de santé publique mondial. En effet plus de 350 millions d'individus sont porteurs d'une hépatite B chronique [1] et le VHB serait à l'origine de 500 000 à 1,2 millions de morts par an [2].

L'OMS a défini trois zones géographiques, selon le taux d'infection de la population adulte [1, 81] (Figure 17) :

✓ les zones de forte endémie (> 8 % de la population générale est infectée de manière chronique) : Afrique subsaharienne, Asie du Sud-Est, Extrême-Orient et certains pays d'Europe de l'Est. Dans cette zone, le risque d'acquérir l'infection au cours d'une vie entière est supérieur à 60 % et la majorité des sujets sont contaminés à la naissance ou au cours des premières années de leur vie [82].

✓ les zones d'endémie intermédiaire (2 à 7 % de la population est infectée de manière chronique) : Europe de l'Est, les pays du bassin méditerranéen, Asie du Sud-Ouest, Japon et Amérique Latine. Le risque d'infection par le VHB est de 20 à 60 % [83].

✓ les zones de faible endémie (< 2 % de la population présente une infection chronique) : Amérique du Nord, Europe de l'Ouest et du Nord, Australie. Le risque d'infection est inférieur à 20 % et la contamination survient surtout à l'âge adulte [83, 84].

1.2. Principaux modes de transmission

Le virus de l'hépatite B est présent dans la plupart des liquides biologiques. Il est retrouvé dans le sang des sujets infectés à des titres très élevés, pouvant atteindre 10^9 virions/mL. Il est également présent dans les sécrétions vaginales et le sperme (10^6 à 10^7 virions/mL), dans la salive (10^5 à 10^7 virions/mL), mais aussi dans le lait maternel, les urines et les larmes. Du fait de l'hétérogénéité de localisation du VHB, différents modes de transmission sont possibles.

La transmission par voie sexuelle représente actuellement le principal mode de contamination des pays de faible et moyenne endémie [85, 86]. La principale population à risque reste les personnes ayant des partenaires multiples.

Depuis la mise en place systématique de tests de dépistage du VHB pour chaque don de sang et/ou d'organes, la transmission par voie parentérale concerne essentiellement les personnes utilisant du matériel contaminé non stérilisé (toxicomanes par voie intraveineuse, adeptes de l'acupuncture, du piercing et du tatouage) [87].

De même, les infections nosocomiales (par transmission du soigné au soignant mais aussi dans le sens soignant – soigné) ont surtout régressé dans les pays appliquant des règles rigoureuses de stérilisation du matériel et depuis la généralisation de la vaccination du personnel de santé. Le risque de transmission est lié au niveau de répllication virale. Il faut noter que la contagiosité sanguine du VHB est estimée 10 fois supérieure à celle du VHC et 100 fois plus élevée que celle du VIH [88].

La transmission « verticale » mère-enfant est fortement observée dans les zones de forte endémie (principalement en Asie du Sud-Est) [85, 86, 89] mais n'est pas négligeable, souvent sous-estimée, dans les zones de moyenne ou faible endémie. La contamination de l'enfant se fait essentiellement lors de l'accouchement, par l'intermédiaire du sang maternel. Le risque de transmission est d'autant plus élevé que la mère présente une charge virale élevée au moment de l'accouchement. Ainsi le taux de transmission est de 90 % si la mère réplique intensément le virus, et seulement de 10 % si les marqueurs répliatifs sont absents [89].

Etant donnée la résistance du virus dans le milieu extérieur, les infections intra-familiales sont possibles, par l'intermédiaire d'effets personnels (brosse à dents, rasoirs...) ou par contact avec des excoriations cutanées. Ce mode de transmission « horizontale » est particulièrement fréquent en Afrique subsaharienne.

1.3. Epidémiologie en France

La France est considérée comme une zone de faible endémie. Une enquête effectuée en centres de santé en 2003-2004 auprès d'environ 15 000 sujets de 18 à 80 ans [90, 91] a estimé que 0,65 % de la population est porteuse chronique du VHB, ce qui représente environ 280 000 personnes. Les hommes sont cinq fois plus touchés que les femmes (1,10 % vs 0,21 %). Quel que soit le sexe, le pic optimal de prévalence des hépatites B se situe dans la tranche d'âges 50-59 ans, alors que chez les hommes seuls, ce pic se situe autour de 18-39 ans. Les facteurs de risque sont la précarité, l'usage de drogues par voie intraveineuse, le pays de

naissance (les immigrés d’Afrique sub-saharienne et du Moyen-Orient sont particulièrement touchés).

Le mode de transmission sexuel est le plus fréquent (41 %) ; sont également observées des contaminations lors de voyages en pays d’endémie (14 %), d’actes invasifs (10 %) ou par exposition familiale (9 %) [90, 91]. Il est à noter que les hépatites B professionnelles ont quasiment disparu, du fait de la vaccination du personnel de santé. Les transmissions par voie sanguine et périnatale devraient encore régresser avec le dépistage systématique du VHB chez tous les donneurs de sang et la recherche d’une répllication virale chez la femme enceinte, permettant l’instauration d’une sérovaccination des nouveaux-nés. Toutefois, la couverture vaccinale estimée par l’enquête n’est que de 41,3 %.

2. Traitements préventifs

2.1. La vaccination

Les vaccins contre l’hépatite B contiennent l’AgHBs, produit par génie génétique. Cet antigène est très immunogène, même chez le nouveau-né. Il induit de manière durable un taux d’anticorps dits « protecteurs », supérieur à 10 UI/L. Des vaccins combinés sont désormais disponibles, associant hépatite B, diphtérie, tétanos, coqueluche, poliomyélite, *Haemophilus influenzae b*.

Pour un individu sain, la vaccination confère une protection dans environ 95 à 98 % des cas et la durée de protection dépasse 10 ans [92, 93]. Les facteurs de moindre réponse sont l’âge (supérieur à 30 ans), le sexe masculin, l’obésité, le tabagisme, l’alcoolisme, des facteurs génétiques (certains groupes HLA) et des situations d’immunodépression [92]. La protection dure probablement toute la vie chez les répondeurs, la vaccination entraînant une protection même chez les patients ayant des titres d’anticorps indétectables, du fait d’une mémoire immunitaire. La vaccination est recommandée dès l’âge de 2 mois, sauf pour les nouveau-nés de mère porteuse de l’AgHBs, chez lesquels elle doit être pratiquée à la naissance.

La vaccination permet non seulement de prévenir les hépatites aiguës et chroniques, mais aussi les hépatocarcinomes dus au VHB. L’OMS a donc recommandé dès 1995 la mise en place d’un large programme d’immunisation des nouveau-nés et des adolescents dans les pays de forte puis de faible endémie, pour atteindre un taux de couverture de plus de 90 %

[94]. Mais cet objectif est loin d'être atteint : le taux de couverture global en France était évalué à 21,7 % en 2002 [95] et à 41,3 % en 2004 [91].

2.2. L'immunothérapie passive

Les immunoglobulines spécifiques anti-HBs, issues de donneurs immunisés contre le VHB, sont administrées seulement dans des situations à haut risque de transmission du VHB : chez les nouveaux-nés de mère porteuse de l'AgHBs ; après transplantation hépatique chez les sujets porteurs chroniques du VHB ; en cas d'exposition accidentelle au sang ou au VHB chez des personnes non vaccinées ou quand le sujet source est détecté positif pour l'AgHBs (d'après les recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France). L'immunoprophylaxie confère au receveur une protection durant un à deux mois seulement et doit impérativement être associée à une vaccination [96].

B. Physiopathologie de l'infection B

1. Immunopathologie et mécanismes d'élimination virale

Le VHB n'est pas directement cytopathogène. Les lésions hépatiques sont dues à la réponse immune de l'hôte qui induit une inflammation hépatique et une lyse des cellules infectées. La gravité de ces lésions et l'évolution de la pathologie sont déterminées par l'intensité du conflit entre le virus et les défenses immunitaires de l'hôte. De plus, la rapidité de l'activation de la réponse immune, son intensité et son efficacité vont conditionner l'évolution de l'infection. Une réponse immune précoce et efficace permettra le contrôle de la réplication virale et sera associée à la guérison. En revanche, une réponse immune déficiente conduira à la persistance virale.

La réponse immune non spécifique, assurée par les macrophages, les neutrophiles, les cellules NK et NKT, est la plus précoce [97]. Elle entraîne la formation de lésions nécro-inflammatoires. L'AgHBc, très immunogène, est alors localisé dans le noyau des hépatocytes et n'est donc pas visible par le système immunitaire [98].

Puis, les défenses immunitaires spécifiques entrent en action. Les cytokines sécrétées par les cellules NK et les macrophages recrutent les lymphocytes T helper 1 (Th1), principaux effecteurs de la réponse cellulaire. La réponse Th1 induit l'apparition des lymphocytes T cytotoxiques (*cytotoxic T lymphocytes* : CTL), responsables de la lyse des hépatocytes

infectés, et coordonne l'activité des cellules B, qui produisent les anticorps neutralisants (anticorps anti-HBs : Ac anti-HBs). Ces anticorps permettent l'élimination des particules virales libres et empêchent la propagation du virus à d'autres cellules. Le pic de cette réponse est associé chez la plupart des patients à la clairance de l'AgHBs sérique. La réponse CTL est dirigée contre des épitopes des protéines de core, polymérase et antigène de surface [99-101].

Des études réalisées chez des souris transgéniques et des chimpanzés suggèrent que deux mécanismes sont impliqués dans l'élimination virale : la lyse hépatocytaire via les systèmes perforine/Fas et un effet antiviral direct des cytokines sécrétées par les cellules T [102-104] (Figure 19). En effet, l'interféron gamma ($IFN\gamma$) et le *tumor necrosis factor* alpha ($TNF\alpha$) inhibent l'expression des gènes viraux par un mécanisme post-transcriptionnel [105] et empêchent l'assemblage ou accélèrent la dégradation des nucléocapsides, inhibant ainsi la réplication virale [106].

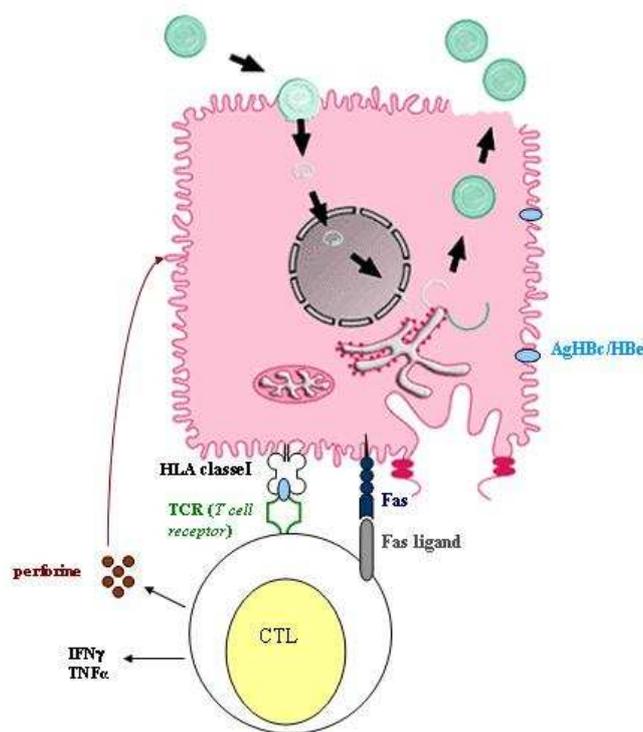


Figure 19 : Réponse cellulaire T cytotoxique. La lyse des hépatocytes infectés est due aux granules cytotoxiques (notamment les perforines) et au système Fas qui active l'apoptose cellulaire.

Lors de l'infection aiguë, la réponse immune intense et efficace entraîne l'arrêt de la réplication virale, et par conséquent, de la synthèse des antigènes viraux. Les cellules infectées ne sont plus reconnues par les CTL, ce qui permet la régression des lésions hépatiques.

Parfois, la réponse immune cellulaire est incomplète ou inadaptée. Elle ne parvient pas à éliminer complètement la propagation du virus dans les hépatocytes, soit du fait de facteurs viraux, soit du fait de facteurs propres à l'hôte [98, 107, 108] et conduit alors à une infection chronique ou persistante.

2. Mécanismes de persistance virale

2.1. Facteurs propres à l'hôte

L'âge de l'hôte au moment de l'infection est déterminant puisqu'il est corrélé à la maturité du système immunitaire. La proportion de cas symptomatiques de l'hépatite B aiguë augmente avec l'âge, alors que le risque de passage à une infection chronique diminue. Ainsi, l'infection acquise à la naissance est fréquemment asymptomatique mais évolue dans 90 % des cas vers la chronicité. L'évolution vers la chronicité concerne 25 à 50 % des infections acquises entre 1 et 5 ans et seulement 5 à 10 % des infections acquises à l'âge adulte [3, 109-111]. De plus, chez les patients infectés en période néonatale, la phase initiale de l'infection peut s'étendre sur des années (entre 10 et 30 ans) alors que chez les sujets infectés à l'âge adulte, elle dure seulement de quelques semaines à quelques mois [2, 98, 112].

Le risque de passage à la chronicité est également augmenté chez les immunodéprimés, les diabétiques et les hémodialysés.

2.2. Facteurs viraux

2.2.1. Induction d'une immunotolérance

L'AgHBe semble jouer un rôle dans la persistance virale, notamment en induisant une déplétion des cellules Th1 [23, 113]. Il a été montré que des enfants nés de mères AgHBe-progressaient le plus souvent vers une infection chronique, alors que des enfants nés de mères AgHBe+ développaient une hépatite aiguë, voire fulminante, mais n'évoluaient que très rarement vers une forme chronique [24, 98, 114, 115].

2.2.2. Inhibition de la réponse cellulaire aux cytokines

Des expériences in vitro ont montré que des protéines du VHB sont impliquées dans la moindre réponse des hépatocytes infectés aux cytokines. La partie N-terminale de la polymérase virale inhibe la réponse cellulaire aux IFN γ et α [116] et la protéine de capsid semble inhiber la transcription du gène de l'IFN β [117].

2.2.3. Mutations d'échappement à la réponse immunitaire

Des mutants dans les épitopes antigéniques des protéines de surface peuvent être sélectionnés sous la pression de la réponse immune, après vaccination ou après immunothérapie passive. Ils sont moins immunogènes que les virus sauvages et tendent à échapper aux défenses immunitaires [108, 118].

Des mutations au niveau des épitopes CTL permettraient au VHB d'échapper à la réponse cytotoxique [119], mais la sélection de tels mutants survient rarement lors l'infection chronique [120].

2.2.4. Réplication dans des réservoirs extra-hépatiques

Le virus de l'hépatite B a un tropisme hépatocellulaire, mais il a également été retrouvé dans d'autres tissus, comme la moelle osseuse, le pancréas, les reins, la rate, le cœur et la peau [121]. Ceci suggère l'existence de sites de multiplication extra-hépatiques du VHB, inaccessibles à l'action directe des CTL ou exprimant faiblement les molécules HLA nécessaires à la présentation des antigènes viraux aux cellules du système immunitaire. D'une part, ces réservoirs contribueraient à la pérennisation de l'infection, mais d'autre part, permettraient une stimulation continue de la réponse immune, protégeant ainsi les patients des réinfections.

Ce sujet sera re-abordé dans le chapitre III.

3. Histoire naturelle de l'infection B

3.1. Hépatite aiguë

Dans environ 70 % des cas, l'infection aiguë est asymptomatique. L'apparition des signes cliniques est liée à l'âge : l'infection est le plus souvent asymptomatique chez le jeune enfant [110]. Le tableau clinique habituel comporte schématiquement trois phases :

- ✓ la phase d'incubation, de 4 à 30 semaines;
- ✓ la phase pré-ictérique, peu spécifique, inconstamment marquée par une asthénie, un syndrome pseudo grippal, des troubles digestifs modérés, une éruption cutanée inconstante;
- ✓ la phase ictérique, associant ictère, hépatomégalie dans 50 % des cas et splénomégalie dans 25 % des cas. L'ictère survient 1 à 2 semaines après le contagion et persiste 2 à 6 semaines.

Dans tous les cas, la phase aiguë est marquée par une élévation nette du taux de transaminases. Dans 90 % des cas, la réponse immunitaire de l'hôte, vigoureuse et efficace, permet la résolution de l'infection, avec disparition des signes cliniques (l'asthénie peut cependant persister plusieurs semaines) et normalisation des transaminases. La séroconversion HBe (négativation de l'AgHBe et apparition des anticorps anti-HBe) annonce une évolution favorable de l'infection. Puis, une immunité durable s'instaure grâce à l'apparition des anticorps dirigés contre l'AgHBs.

Cependant, une fois sur mille [122], la réponse immunitaire de l'hôte devient excessive et entraîne la destruction massive des hépatocytes. Cette forme grave, appelée hépatite fulminante, conduit au décès dans 80 % des cas en l'absence de greffe hépatique.

3.2. Hépatite chronique

Le passage à la chronicité est défini par la persistance de l'AgHBs au-delà de 6 mois. Elle est liée à l'incapacité du système immunitaire de l'hôte à éliminer totalement le virus. Il a été montré que la réponse cellulaire, intense dans l'hépatite B aiguë, est déficiente ou quasi-indétectable au cours des hépatites B chroniques [123].

L'infection chronique est en général asymptomatique (70 à 90 % des cas) et n'est souvent découverte que tardivement, au stade de cirrhose voire de carcinome hépatocellulaire. Elle évolue classiquement en quatre phases [124].

3.2. 1. La phase d'immunotolérance

Elle se caractérise par un état de tolérance immunitaire vis à vis des cellules infectées. La multiplication active du virus se traduit par la présence des marqueurs de réplication virale (AgHBs, AgHBe et ADN du VHB) à taux élevés dans le sérum. A cette phase, l'individu est très contagieux. Du fait de la tolérance immunitaire, les lésions hépatiques de nécrose et d'inflammation sont absentes et les transaminases restent normales. Cette phase dure entre 1 et 15 ans, en fonction de l'âge de contamination et du statut immunitaire.

3.2.2. La phase de clairance immune

Puis les défenses immunitaires de l'hôte sont activées. Le conflit entre la réplication du virus et la réponse immune aboutit à la formation de lésions nécro-inflammatoires. Ce conflit se traduit par une diminution des concentrations sériques de l'ADN du VHB et une élévation des transaminases. L'examen de la biopsie hépatique révèle des lésions d'hépatite chronique active. A ce stade, l'initiation d'un traitement antiviral permet de bloquer la réplication virale et de réduire les lésions tissulaires.

3.2.3. La phase de rémission ou phase d'équilibre

Lorsque la réponse immune n'est pas assez vigoureuse pour éliminer tous les hépatocytes infectés, un équilibre s'installe entre réplication virale et défenses immunitaires. Spontanément, ou sous l'effet de traitements antiviraux, le système immunitaire parvient à contrôler l'infection : le virus se réplique à bas bruit dans les hépatocytes et la faible expression des antigènes viraux (notamment l'AgHBc) réduit l'attaque des cellules infectées par les CTL. Cette phase se caractérise par la séroconversion HBe (taux de séroconversion annuel : 10 - 20 % [125], la diminution de la charge virale sérique en dessous de 10^4 copies/mL et la normalisation des transaminases correspondant à une diminution des lésions hépatiques [126-128]. C'est à ce stade que la réplication des mutants précoces, jusqu'alors quasi-espèce minoritaire, est favorisée par la pression immunitaire [98].

Le plus souvent, la réplication virale devient indétectable après quelques mois et le patient entre dans une phase de portage prolongé asymptomatique de l'AgHBs ou hépatite chronique persistante. Deux types de populations cellulaires sont retrouvées dans le tissu infecté : des cellules contenant du cccDNA, qui peut être à l'origine d'une réactivation virale [127, 129, 130], et des cellules contenant le génome intégré du VHB, pouvant être responsable des phénomènes de carcinogenèse. Spontanément, ou suite à un traitement immunosuppresseur, des épisodes de réactivation peuvent survenir, avec réapparition d'une virémie détectable (supérieure à 10^5 copies/mL) et augmentation des transaminases. L'AgHBe se repositivise (5 à 10 % des cas), excepté dans le cas d'une réactivation due à un mutant précoce (20 à 30 % des cas) [127].

Dans 10 à 20 % des cas, les hépatites chroniques restent actives, avec une destruction massive des hépatocytes. Les transaminases sont élevées et sont associées à la persistance de l'AgHBe. Progressivement, les cellules détruites sont remplacées par du tissu cicatriciel et l'hépatite évolue vers la cirrhose [112] (incidence annuelle de survenue : 2 à 5,4 % [131,

132]). Il en résulte une insuffisance hépatocellulaire qui s'aggrave avec le temps et aboutit à la mort du malade [133].

3.2.4. La phase d'élimination de l'antigène HBs

Après plusieurs années, on peut observer la disparition de l'AgHBs (incidence d'environ 1 % par an), et éventuellement, l'apparition d'Ac anti-HBs. Le plus souvent, seuls les Ac anti-HBc restent positifs, témoignant d'un contact ancien avec le VHB, mais il arrive que tous les marqueurs sérologiques soient absents. Parfois, l'ADN viral subsiste à l'état de traces dans le sérum : il n'est détectable que par des techniques de PCR sensibles.

3.3. Carcinome hépatocellulaire (CHC)

Il s'agit d'une tumeur diffuse du foie. En France, elle apparaît sur une cirrhose préexistante dans plus de 90 % des cas (incidence annuelle de survenue en Europe chez les cirrhotiques : 2,2 % [134]. L'évolution vers un CHC est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes, suggérant un rôle possible des androgènes dans la carcinogenèse [135, 136]. Elle est favorisée par une consommation excessive d'alcool, l'immunodépression et les coinfections par d'autres virus hépatotropes (VHC et virus de l'hépatite delta : VHD) [137-139].

Les mécanismes de l'hépatocarcinogenèse induite par le VHB sont inconnus. L'hypothèse la plus probable implique la protéine X, qui est capable de transactiver des gènes cellulaires associés à la prolifération et/ou la différenciation cellulaire [140-142]. Les protéines d'enveloppe semblent aussi jouer un rôle dans le développement de CHC. En effet, il semble que l'accumulation intracellulaire de protéine L, voire de protéine M, soit associée au développement de cancer [143, 144]. L'hépatocarcinogenèse pourrait également être induite par l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. Cette intégration survenant de façon aléatoire, elle peut interférer avec l'expression d'oncogènes ou de gènes impliqués dans la division cellulaire. Toutefois, cet événement est rare et constituerait donc une étiologie mineure des CHC viro-induits. Par ailleurs, la régénération continue et forcée des hépatocytes détruits par le système immunitaire pourrait favoriser l'émergence de mutations cellulaires, et par conséquent, de CHC [27].

C. Traitements des hépatites B chroniques

1. Bases du traitement

Le but théorique du traitement de l'infection B chronique est l'éradication complète du virus. Cependant, un obstacle majeur à la guérison tient à la persistance du génome viral dans les cellules infectées, sous forme intégrée ou sous forme superenroulée, qui est responsable des réactivations observées à l'arrêt du traitement. La priorité thérapeutique est donc plutôt de supprimer durablement la réplication virale et de limiter l'atteinte hépatique, afin de ralentir la progression vers la cirrhose et l'hépatocarcinome. Les traitements sont donc indiqués dans les hépatites B chroniques histologiquement prouvées, avec une réplication virale détectable, quelque soit le niveau des transaminases.

L'efficacité thérapeutique est évaluée par la négativation de l'ADN du VHB et la séroconversion HBe (réponse combinée) mais aussi par la séroconversion HBs et la normalisation des transaminases accompagnée d'une amélioration histologique [145, 146]. Il est désormais établi que les patients porteurs d'un virus « sauvage » (patients AgHBe+) répondent mieux aux traitements que les patients infectés par un mutant précore (patients AgHBe-). La thérapie est donc adaptée en fonction du profil sérologique des patients.

Deux types de traitements antiviraux sont actuellement utilisés : les interférons et les analogues nucléosidiques/nucléotidiques. Du fait de la physiopathogénie de l'hépatite B, des essais de traitements immunostimulants sont en cours.

2. Efficacité des médicaments antiviraux

2.1. Les interférons

Physiologiquement impliqué dans la lutte contre les infections virales, l'interféron α est tout indiqué dans le traitement des hépatites B chroniques. Il associe une action antivirale directe, par inhibition de la synthèse des ARN viraux, à des propriétés immunomodulatrices, par augmentation de l'expression des molécules HLA de classe I et stimulation de la réponse T [145, 147]. Ses principaux inconvénients sont ses nombreux effets secondaires (notamment une cytolyse hépatique, limitant son utilisation chez les cirrhotiques) et sa courte demi-vie. La pegylation (couplage avec un groupement éthylène glycol) permet d'augmenter la durée de vie de l'interféron et améliore sa tolérance.

Un certain nombre de facteurs sont prédictifs d'une faible réponse à l'IFN α standard [98, 148] : une faible charge virale, des transaminases élevées, les infections acquises à la naissance ou lors de la petite enfance (le plus souvent en région hyperendémique comme le Sud-Est asiatique), le statut AgHBe-.

2.1.1. Réponse chez les patients AgHBe+

Administré à la dose de 9-10 MUI 3 fois par semaine, pendant 4 à 6 mois, l'IFN α standard entraîne une réponse combinée durable (évaluée 6 à 12 mois après l'arrêt du traitement) chez environ 10 à 30 % des patients et une clairance de l'AgHBs, 2 à 4 ans après la séroconversion HBe, chez 11,4 % des patients [149]. De plus, l'IFN α aurait tendance à freiner l'évolution vers la décompensation hépatique et le développement d'hépatocarcinome [86, 149, 150].

La pégylation de l'interféron semble améliorer son efficacité : après 6 mois de traitement par interféron α pegylé (pegIFN α -2a), une diminution de la charge virale en dessous de 5×10^5 copies/mL et une séroconversion HBe sont obtenues chez 28 % des patients vs 12 % avec l'IFN α standard. L'effet bénéfique de l'interféron pegylé est encore plus net chez les patients présentant initialement une forte charge virale [151].

2.1.2. Réponse chez les patients AgHBe-

Du fait de la moindre réponse de cette population, la posologie de l'IFN α standard est modifiée : 5 à 6 MUI pendant 12 à 24 mois.

Après 12 mois de traitement, une négativation de l'ADN du VHB, accompagnée d'une normalisation des transaminases, est obtenue chez environ 50 à 70 % des patients [150, 152]. Toutefois, le taux de réponse durable est faible à long terme et il n'est pas rare de voir des rechutes après 5 ans [153]. Il semble cependant que l'interféron standard réduit la progression de la maladie, principalement chez les répondeurs.

Le bénéfice de la pégylation de l'interféron n'est pas encore bien documenté chez ces patients. Marcellin et al. [154] suggèrent qu'une séroconversion HBs est observée plus rapidement avec le pegIFN-2a qu'avec l'IFN α standard.

2.2. Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques

Ils inhibent la réplication du VHB en s'incorporant à la place des nucléosides naturels lors de la synthèse de l'ADN viral par la polymérase.

2.2.1 La lamivudine

Déjà connue pour son activité inhibitrice sur la transcriptase inverse du VIH, la lamivudine est le premier analogue nucléosidique à avoir obtenu l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) en France pour le traitement de l'hépatite B chronique.

Elle possède une très bonne tolérance et a une puissante activité antivirale à la posologie de 100 mg/j. Cependant, son action est virostatique et elle n'agit pas sur le pool d'ADN superenroulé présent dans les hépatocytes infectés : l'arrêt du traitement avant l'élimination de tous les hépatocytes infectés entraîne un rebond de la réplication virale. Ceci justifie la mise en place de traitements prolongés (au-delà de 12 mois). La demi-vie d'un hépatocyte étant de l'ordre de 100 jours, il faudrait un traitement de plus de 5 ans pour être sûr d'avoir complètement éliminé le cccDNA. Cependant, la lamivudine sélectionne des mutants résistants en un laps de temps plus court, parfois dès la 8^e semaine de traitement. Le risque d'émergence des mutants augmente avec la durée du traitement : environ 20 % à 1 an, 60 % à 3 ans et jusqu'à 70 % à 4 ans, quelque soit le statut HBe des patients [155-157]. On observe une réaugmentation des transaminases et/ou de la charge virale sérique.

2.2.1.1. Réponse chez les patients AgHBe+

La négativation de l'ADN survient très rapidement, en 1 à 2 mois, chez près de 100 % des patients. Après 12 mois de traitement, la diminution de la progression vers la fibrose est significative, mais seulement 17 à 21 % des patients ont éliminé l'AgHBe [157-159]. La poursuite du traitement à 3 ans permet d'augmenter le taux de séroconversion HBe [155].

2.2.1.2. Réponse chez les patients AgHBe-

Le taux de réponse, en termes de négativation de l'ADN et normalisation des transaminases, est de 63 à 96 % après 6 à 12 mois de traitement. Cependant, la persistance de la réponse 6 à 24 mois après l'arrêt du traitement n'est observée que chez 11 à 20 % des patients [160-163].

2.2.2. L'adéfovir

L'adéfovir et sa prodrogue, l'adefovir dipivoxil, sont des analogues nucléotidiques qui semblent agir sur l'activité des cellules NK et sur la réponse immune via la production d'IFN α [164]. L'adéfovir est efficace à des posologies de 10 mg/j, à la fois sur les souches « sauvages » et mutantes précore, mais aussi sur des mutants de résistance à la lamivudine [165, 166].

Il permet de diminuer efficacement la charge virale et de revenir à des taux normaux de transaminases en 12 mois, aussi bien chez les patients AgHBe+ que chez les patients AgHBe- [167, 168]. Toutefois, comme pour la lamivudine, la séroconversion HBe est tardive chez les patients AgHBe+ : le pourcentage de séroconversion est de 12 % à 48 semaines et de 24 % à 18 mois [167]. Il est à noter que le risque de rechute à l'arrêt du traitement explique qu'il soit prolongé au-delà des 48 semaines initialement conseillées. Peu de mutations de résistance ont été décrites, après la 96^e semaine de traitement [169, 170].

2.2.3. Les analogues nucléosidiques en développement

Le ténofovir, inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH, apparaît comme un traitement de choix des coinfections VIH/VHB. Il a la même activité sur le contrôle de la multiplication virale que l'adéfovir : il est actif sur toutes souches de VHB, y compris les mutants d'échappement à la lamivudine [171].

Le développement de l'entécavir, qui présente notamment une puissante activité inhibitrice sur l'ADN superenroulé intra-hépatique, est abandonné en France du fait de l'apparition de tumeurs dans les modèles animaux

Toutefois, de nombreuses autres molécules sont en cours de développement, telles l'emtricitabine, la clévodine, les β L-nucléosides (telbivudine et val-LdC) [172].

3. Modalités thérapeutiques [173]

3.1. Hépatite chronique sans cirrhose ou avec cirrhose compensée

Le traitement de première intention dans les infections par un virus « sauvage » est l'IFN α (9-10 MUI), pendant 6 mois, lorsque l'efficacité est prouvée à 3 mois. Pour les patients AgHBe-, l'IFN α reste le traitement de première intention, à dose réduite (5-6 MUI), mais pendant 12 à 24 mois.

En cas d'échec, d'intolérance ou de contre-indication à l'interféron, un traitement par la lamivudine ou l'adéfovir est proposé en deuxième intention, pour au moins 12 mois. En l'absence de réponse virologique (persistance de l'AgHBe et d'une charge virale détectable), la poursuite du traitement sera discutée en fonction du risque d'émergence de mutants résistants.

3.2. Cirrhose décompensée

En attendant une transplantation hépatique, le patient est traité par la lamivudine, ou l'adéfovir en cas d'échappement à la lamivudine.

3.3. Mutations à la lamivudine

L'émergence de mutants résistants à la lamivudine est repérée par une surveillance trimestrielle des patients. Il est possible de continuer le traitement si une diminution des transaminases et de la charge virale a été constatée au cours de la thérapie. En l'absence de fibrose ou d'immunodépression, l'administration de lamivudine peut être interrompue. Enfin, l'adéfovir peut remplacer ou être adjoint à la lamivudine.

3.4. Coinfections VIH/VHB

La lamivudine ou le ténofovir (en cas de résistance à la lamivudine) sont ajoutés au traitement anti-VIH chez les patients sous HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*). L'adéfovir est indiqué en première intention chez les patients non traités par la HAART.

D. Diagnostic virologique : marqueurs sériques de l'infection par le VHB

1. Détection du génome viral

1.1. Quantification de l'ADN total

La présence d'ADN sérique traduit la production de virions complets infectieux qui passent dans la circulation sanguine, et reflète donc l'intensité de la réplication virale intra-hépatocytaire.

Lors des hépatites aiguës, le diagnostic repose sur la sérologie, la mesure de la charge virale n'est pas nécessaire.

Lors des hépatites chroniques, la mesure de la charge virale est un outil indispensable pour évaluer la progression de l'infection et décider d'un traitement. La quantification de l'ADN circulant permet d'identifier un patient en phase de portage inactif de l'AgHBs (charge virale $< 10^4$ copies/mL) d'un patient infecté par un mutant précore (réplication virale autour de 10^5 – 10^7 copies/mL). Elle permet également d'estimer le risque évolutif de la maladie : la persistance d'une réplication virale est associée à un risque accru de progresser vers une cirrhose puis un CHC. De plus, une charge virale $> 10^5$ copies/mL, associée à la présence de lésions hépatique, est une indication au traitement, mais une charge virale $> 10^8$ copies/mL est un facteur prédictif de moins bonne réponse au traitement. La diminution de la virémie au cours d'un traitement prouve son efficacité. Le suivi à long terme d'un patient permet de détecter un éventuel échappement viral ou de confirmer la rémission. Rappelons cependant que l'ADN du VHB peut se maintenir sous forme intégrée ou superenroulée dans le génome des hépatocytes et n'est alors plus détectable dans le sérum.

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de développer de nombreux tests « maison » et commerciaux avec des seuils de détection et quantification de plus en plus bas. Les techniques d'hybridation avec des sondes spécifiques (par exemple, Hybrid Capture II Ultrasensitive Test, Digene Corporation) manquent de sensibilité par rapport aux techniques reposant sur l'amplification de la cible (seuil de quantification entre 1000 et 5000 copies de génome/mL). La société Bayer a développé un test basé sur l'amplification du signal (Versant HBV DNA 3.0 assay), présentant une bonne spécificité mais une sensibilité limitée. Les techniques d'amplification par PCR sont actuellement les plus sensibles. Récemment commercialisées, les trousse utilisant la technologie de PCR en temps réel ont des seuils de quantification inférieurs à ceux des PCR quantitatives « classiques » et des gammes de quantification plus étendues. Les tests les plus récents et leurs spécificités sont listés dans le Tableau 1 [174].

Par ailleurs, depuis 2001, l'OMS (via le *World Health Organization (WHO) Expert Committee on Biological Standardization*) a réalisé un effort de standardisation des résultats : un titre de 10^6 UI/mL a été attribué à un sérum étalon de génotype A (appelé *WHO HBV International Standard*), issu de patients fortement virémiques [175]. Pour chaque trousse commercialisée, une calibration a été effectuée avec ce standard et un facteur de conversion copies/mL - UI/mL a été calculé.

Test	Technologie	Seuil de détection	Seuil de quantification	Intervalle linéaire de quantification
Artus RealArt HBV PCR kit [176]	PCR en temps réel (amplification de la cible)	2.5×10^2 UI/mL	2.5×10^2 UI/mL	6 log ₁₀
Roche COBAS TaqMan 48 HBV test (données du fabricant)	PCR en temps réel (amplification de la cible)	6 UI/mL (automatisé)	30 UI/mL (automatisé)	7 log ₁₀
Roche COBAS Amplicor HBV Monitor test (données du fabricant)	PCR (amplification de la cible)	38 UI/mL	38 UI/mL	3 log ₁₀
Bayer Versant HBV DNA 3.0 (données du fabricant)	Hybridation (amplification du signal)	2×10^3 copies/mL	2×10^3 copies/mL	5 log ₁₀
Digene Hybrid Capture II Ultrasensitive test (données du fabricant)	Hybridation (amplification du signal)	4.7×10^3 copies/mL	4.7×10^3 copies/mL	4 log ₁₀

Tableau 1 : Comparaison des principaux tests commerciaux actuellement disponibles pour la quantification de l'ADN du VHB.

1.2. Détection des variants du VHB ([55], voir annexe I)

1.2.1. Génotypes

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour identifier les génotypes du VHB, le choix de la technique dépendant de l'objectif des études menées.

1.2.1.1. Séquençage et analyse phylogénétique

Actuellement, le séquençage du génome entier du VHB et l'analyse phylogénétique constituent la méthode de référence pour le génotypage des souches de VHB.

Bien qu'il ne soit pas nécessaire de séquencer l'ensemble du génome viral pour déterminer le génotype du VHB, il faut se montrer prudent dans le choix de la région analysée, les résultats du génotypage variant selon les gènes séquencés : Norder et al. [63] ont montré que les arbres phylogénétiques obtenus à partir des séquences des différents gènes de plusieurs souches de VHB diffèrent considérablement. La comparaison des séquences du génome entier et du gène S a montré que les séquences S permettaient également d'identifier précisément les génotypes de A à F. Cependant, si la région S est la plus fiable pour le

génotypage, elle ne permet pas de détecter les éventuelles recombinaisons entre les souches de VHB [71].

La trousse commercialisée par Bayer Diagnostics (Trugene HBV genotyping kit) cible la région du gène P chevauchant le gène S (aa 456 à 624), dont l'amplification puis le séquençage permettent l'identification du génotype (dans l'ORF S) et la détection simultanée des mutations de résistance au traitement (dans l'ORF P).

Il faut noter qu'aucune souche de référence n'est à ce jour disponible pour la standardisation ou les contrôles de qualité des tests de génotypage.

1.2.1.2. Méthodes alternatives

Seul le séquençage de la totalité du génome permet d'identifier de nouveaux génotypes ou des recombinaisons inter-génotypes. Cependant, cette méthode manque de sensibilité pour la détection des mélanges de populations. D'autres techniques exploitant la variabilité génétique du VHB ont donc été développées. Si elles sont plus sensibles que la technique de séquençage pour la détection des mélanges de génotypes, elles reposent sur l'analyse d'une séquence nucléotidique ou protéique très courte et donnent donc des résultats moins fiables. De plus, ces méthodes nécessitent d'être adaptées chaque fois qu'un nouveau génotype ou une nouvelle mutation sont identifiés. Parmi ces techniques, on distingue :

✓ l'hybridation sur support solide à l'aide de sondes spécifiques dans la région préS1 (*line probe assay* : LiPA ; trousse INNOLIPA HBV genotyping assay, Innogenetics et *genotype specific probe assay* : GSPA).

✓ L'analyse par polymorphisme de restriction (*restriction fragment length polymorphism* : RFLP). Toute mutation portant sur la région analysée peut entraîner la suppression ou, au contraire, la création d'un site de restriction et fausser les résultats du génotypage.

✓ L'amplification de la région conservée des gènes préS1/S par PCR nichée ou PCR multiplex avec des amorces spécifiques de type.

1.2.2. Variants S

La majorité des variants S portent des mutations dans la MHL de l'AgHBs.

La méthode de référence pour l'étude des variants repose sur le séquençage de la région d'intérêt du fait du nombre et de la variété des mutations rencontrées. Il n'existe pas actuellement de technique consensus pour l'analyse de ces mutants. Les amorces utilisées

pour l'amplification et le séquençage doivent être choisies dans des régions conservées entre les génotypes. Chemin et al. [177] ont développé une méthode d'amplification par PCR nichée et de séquençage du gène S qui permet la recherche de mutations dans la région antigénique majeure de l'AgHBs, quel que soit le génotype du VHB. La trousse commercialisée par Bayer Diagnostics (Trugene HBV Kit) permet détection des mutations dans le cadre de lecture du gène S (aa 100 à 227) simultanément à l'identification du génotype du VHB.

1.2.3. Variants précore

La recherche de mutants dans la région préC ou dans le promoteur du core au cours des hépatites chroniques permet de distinguer les patients en rémission des patients infectés par un mutant précore.

Les mutations sont mises en évidence soit par séquençage, à l'aide de techniques « maison », soit par des méthodes rapides, standardisées, mais permettant seulement la détection de mutations bien définies (trousses INNO-LiPA HBV PreCore, Innogenetics ; Smitest: HBV core promoter and precore mutation detection kits, Genome Science Laboratories).

1.2.4. Variants dans la polymérase

En pratique courante, les variants recherchés sont les mutants d'échappement aux traitements antiviraux. Les mutations de résistance connues sont regroupées dans le domaine RT de la polymérase.

La méthode de référence pour rechercher ces mutations repose sur le séquençage du domaine transcriptase inverse, qui permet de détecter l'ensemble des mutations de résistance, quel que soit le traitement antiviral utilisé. Les principales mutations de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir sont indiquées dans la Figure 20.

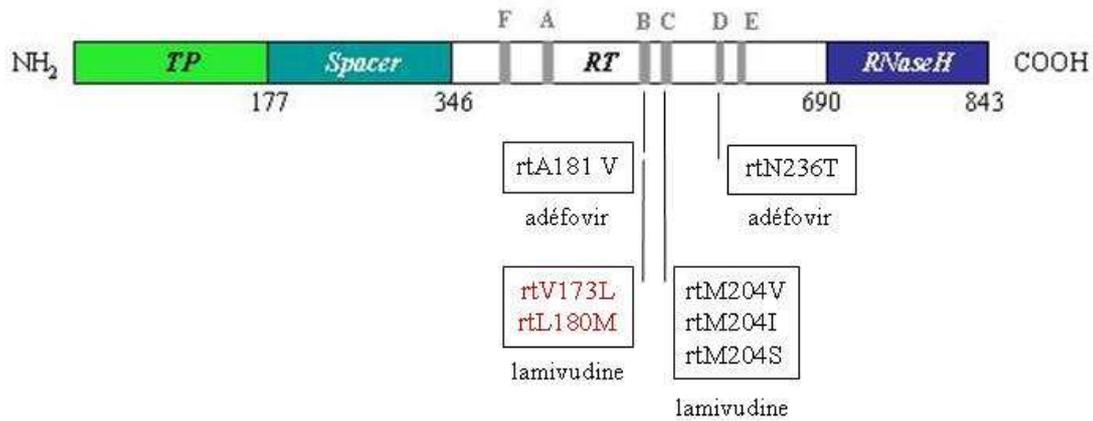


Figure 20 : Mutations de résistance actuellement connues pour la lamivudine et l’adéfovir. Les mutations rtV173L et rtL180M compensent in vitro la diminution de répllication virale observée chez les mutants [57].

Deux troussees sont disponibles sur le marché : les mutations sont détectées soit par hybridation du produit d’amplification du gène P avec des sondes spécifiques (test INNO-LiPA HBV DR, Innogenetics), soit par séquençage direct du produit de PCR (trousse Trugene HBV, Bayer Diagnostics). Le test d’hybridation ne détecte dans la version actuelle que les mutations de résistance connues à la lamivudine. En revanche, la trousse de séquençage-génotypage permet de rechercher de nouvelles mutations à la lamivudine ou à l’adéfovir.

1.3. Recherche des formes persistantes de l’ADN du VHB

Lors de la phase de rémission d’une hépatite chronique, l’ADN viral peut persister dans le noyau des cellules infectées, intégré dans le génome cellulaire ou sous forme de cccDNA.

1.3.1. Détection et/ou quantification du cccDNA

Responsable des réactivations lors de l’arrêt d’un traitement ou du fait d’une immunodépression, le cccDNA représente un marqueur important pour le suivi des patients et l’évaluation de l’efficacité d’un traitement.

D’abord recherché par Southern Blot, le cccDNA est actuellement détecté par des techniques de PCR basées sur l’utilisation d’amorces spécifiques, méthodes plus simples d’utilisation et plus sensibles. Les amorces sont choisies de part et d’autre du *gap* du génome viral, de sorte que seul l’ADN double brin fermé de manière covalente est amplifié (Figure

21). Le développement de PCR en temps réel sur ce principe permet la quantification du cccDNA.

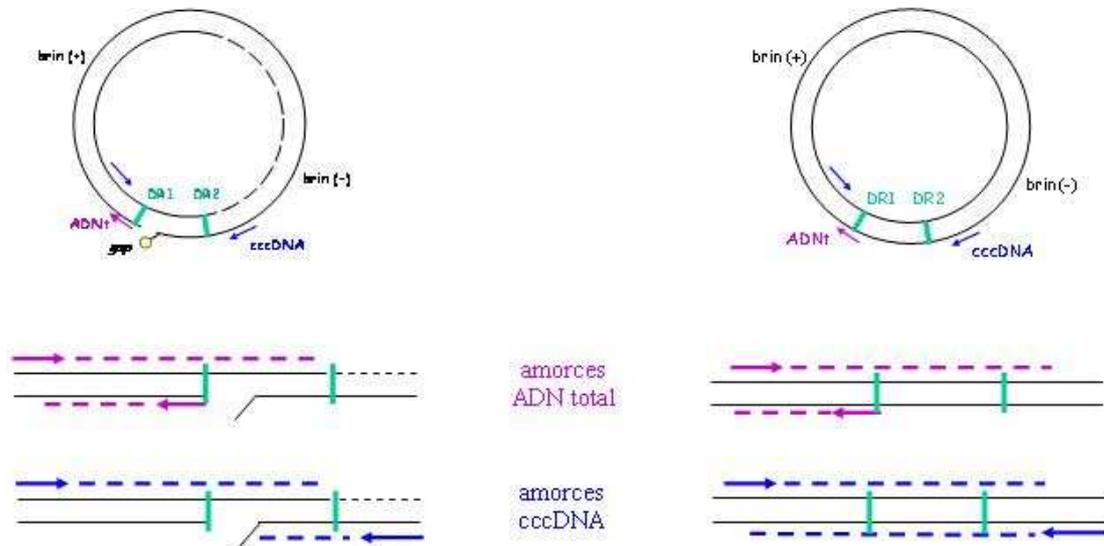


Figure 21 : Principe des PCR permettant l'amplification sélective du cccDNA.

Une méthode alternative reposant sur l'amplification du signal a été développée [178]. Ce test appelé *invasive signal amplification reaction* (Invader assay) utilise deux sondes partiellement chevauchantes qui s'hybrident sur une séquence cible du génome viral. Une endonucléase hydrolyse la structure ainsi formée et la courte séquence d'ADN libérée est amplifiée par PCR en temps réel.

1.3.2. Détection de l'ADN intégré

Elle s'effectue essentiellement à partir de biopsies hépatiques, dans le cadre de protocoles de recherche. La plupart des techniques décrites reposent sur l'amplification des jonctions VHB - génome humain par PCR puis l'analyse par séquençage ou hybridation par Southern Blot.

2. Diagnostic sérologique

Il existe trois principaux systèmes antigène/anticorps : AgHBs/Ac anti-HBs, AgHBc/Ac anti-HBc, AgHBe/Ac anti-HBe.

2.1. Le système HBs

L'antigène HBs correspond à une production en excès d'enveloppe virale. Il traduit la présence du VHB, alors que les antigènes préS1 ou préS2 traduisent la réplication virale mais ne sont pas recherchés en diagnostic de routine.

L'AgHBs est le premier marqueur retrouvé dans le sang, environ 1 à 3 mois après la contamination. Il est détecté dans le sérum à l'aide de tests sérologiques immunoenzymatiques, de type ELISA, utilisant des anticorps monoclonaux. Pour tout échantillon trouvé AgHBs+ pour la première fois, des tests de neutralisation (avec des anticorps anti-HBs) permettent de renforcer la spécificité de la réaction et de confirmer le résultat.

Du fait de la circulation de l'AgHBs sous forme de complexes immuns, certains résultats peuvent s'avérer faussement négatifs. De plus, les modifications conformationnelles induites par les mutations dans le gène S peuvent altérer la reconnaissance de l'AgHBs par les tests de dépistage de routine : Coleman et al. [179] ont testé différentes trouses commerciales de détection de l'AgHBs et ont confirmé que, même parmi celles de dernière génération, quelques-unes sont incapables de détecter certains mutants dans le déterminant « a » et rendent donc occasionnellement un résultat AgHBs- faussement négatif.

Les anticorps anti-HBs apparaissent progressivement au cours de l'élimination virale. L'apparition de ces anticorps signe soit l'arrêt de la réplication virale avec guérison, soit une protection post-vaccinale. Ils sont recherchés dans le sérum par des techniques ELISA, avec un seuil de détection de 2 à 5 UI/L. Un titre d'anticorps supérieur à 10 UI/L est considéré comme protecteur, mais en pratique, la séroprotection n'est affirmée que pour des taux d'anticorps supérieurs à 100 UI/L.

2.2. Le système HBc

L'antigène HBc n'étant pas excrété dans le sérum, sa détection n'est pas réalisée en pratique courante.

Les anticorps anti-HBc apparaissent précocement dans le sérum, quelle que soit l'évolution de la maladie. Ce ne sont pas des anticorps protecteurs mais seulement les témoins d'une infection par le VHB. La fraction IgM anti-HBc peut être recherchée et dosée

parallèlement aux Ac anti-HBc totaux, par technique ELISA. Elle est détectée dans les primo-infections mais est inconstamment retrouvée lors des réactivations.

2.3. Le système HBe

L'antigène HBe est détectable dans le sérum par ELISA mais aussi par RIA, immunodiffusion, électrosynérèse. Il témoigne d'une réplication virale.

La disparition de l'AgHBe, mais surtout l'apparition des Ac anti-HBe sériques sont en faveur d'une évolution favorable. Cependant, la présence d'Ac anti-HBe ne suffit pas pour affirmer la négativation de la réplication virale : dans certains cas, malgré la présence d'Ac anti-HBe, l'ADN viral reste détectable et l'infection poursuit son évolution.

3. Cinétique d'apparition des marqueurs

3.1. Hépatite aiguë (Figure 22)

Lors de la phase aiguë des hépatites B, la réplication virale est intense et la charge virale peut atteindre 10^{10} copies de génome/mL de sérum. Puis, elle décroît progressivement et devient indétectable lorsque l'hépatite est spontanément résolutive.

L'antigène HBs apparaît en moyenne 1 à 3 mois après le contagement et précède parfois l'élévation des transaminases et les signes cliniques. Il disparaît généralement en 1 à 2 mois, après la normalisation des transaminases. L'antigène HBe apparaît peu après l'AgHBs et disparaît rapidement (sa persistance au-delà de trois semaines après le début des manifestations cliniques suggère une évolution vers la chronicité). Ce marqueur, témoin de la réplication du VHB, n'a pas d'intérêt diagnostique au stade aigu. En revanche, la séroconversion HBe annonce un arrêt de la réplication virale. Les anticorps anti-HBc deviennent détectables dans le sérum 2 à 4 semaines après l'AgHBs, et persistent toute la vie.

Ainsi, une évolution favorable est annoncée par la normalisation des transaminases et successivement, les séroconversions HBe et HBs.

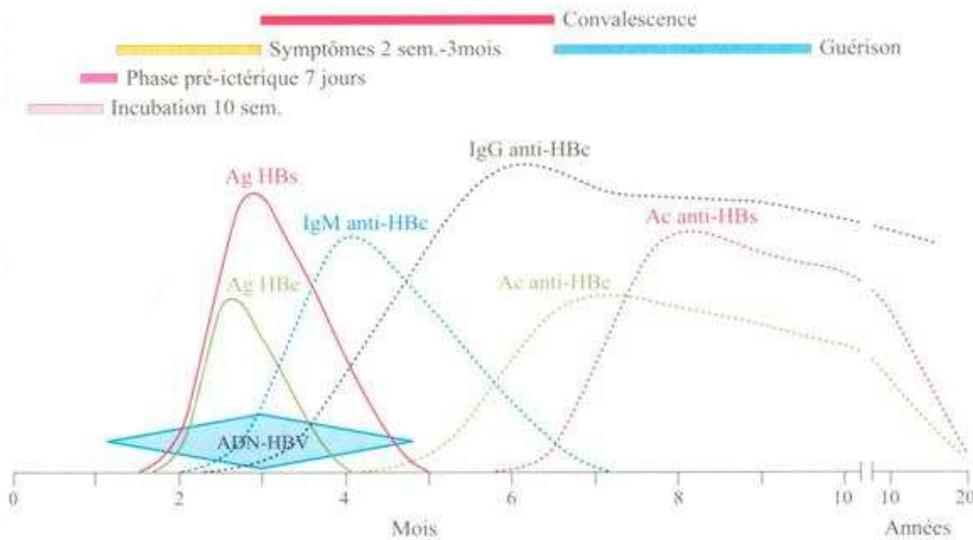


Figure 22 : Evolution des marqueurs sériques lors d'une hépatite B aiguë (d'après Denis et al. [25])

3.2. Hépatite fulminante

La survenue d'une hépatite fulminante au cours d'une hépatite B aiguë est marquée par la présence d'IgM anti-HBc à des titres élevés. Les autres marqueurs (AgHBs, AgHBe, Ac anti-HBs et ADN du VHB) sont inconstamment retrouvés dans le sérum.

En revanche, lors des hépatites fulminantes survenant chez des porteurs chroniques (dues à des réactivations spontanées ou chimio-induites, ou à une surinfection par le virus de l'hépatite delta) la détection des IgM anti-HBc est rare.

3.3. Hépatite chronique (Figure 23)

Au cours des hépatites chroniques, la charge virale varie selon les phases de l'infection : elle est relativement élevée pendant la phase d'immunotolérance, puis chute lors de la phase d'équilibre jusqu'à devenir parfois indétectable (selon la sensibilité de la technique utilisée). Les réactivations virales s'accompagnent d'une réascension de l'ADN sérique, à des niveaux élevés.

Les antigènes HBs et HBe restent détectables pendant plus de 6 mois, parfois même durant quelques décades, et les transaminases sont trouvées à des taux élevés. Après plusieurs années, on peut observer une séroconversion HBe (disparition de l'AgHBe, apparition des Ac anti-HBe). Elle n'est pas toujours associée à une négativation de l'ADN viral sérique. Il arrive

qu'à long terme l'AgHBs disparaisse à son tour et que, parfois, des Ac anti-HBs émergent à des taux très faibles : cette séroconversion HBs ne survient que chez 5 à 10 % des patients. Dans ce cas, seuls les Ac anti-HBc restent détectables, quasi indéfiniment.

Il faut noter que chez les patients immunodéprimés et/ou coinfectés par le VIH, les épisodes de réapparition de l'AgHBs après la « guérison » de l'infection ne sont pas rares. Ils soulignent soit une réactivation de la souche initiale soit une réinfection par une autre souche de VHB.

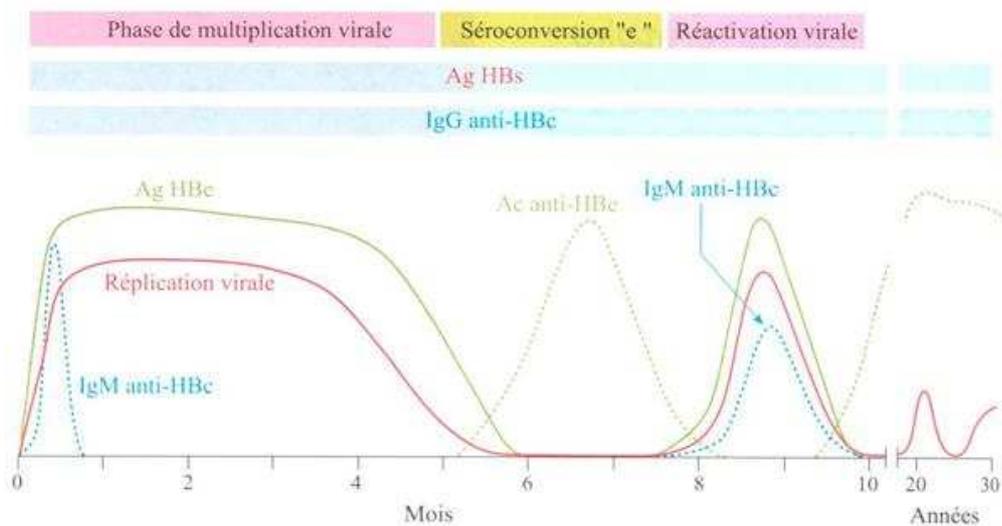


Figure 23 : Evolution des marqueurs sériques lors d'une hépatite B chronique (d'après Denis et al. [25])

3.4. Carcinome hépatocellulaire

La prévalence des marqueurs du VHB varie selon la géographie. L'AgHBs est inconstamment retrouvé chez les patients en France (20 à 30 %), alors qu'en Asie et en Afrique, l'AgHBs est détectable chez 80 % des malades. La détection du génome viral dans les biopsies hépatiques tumorales pose un problème de sensibilité : il semble que les cellules cancéreuses des patients AgHBs- contiennent moins d'ADN du VHB que celles des patients AgHBs+. Bien que le rôle oncogène de l'intégration de l'ADN du VHB dans l'ADN hépatocytaire ne soit que suspecté, il est intéressant de rechercher l'ADN viral intégré chez les patients présentant un CHC.

4. Profils sérologiques atypiques

4.1. Profils liés à la présence de variants du VHB

Certains variants dans le gène S ne sont pas détectés par les tests sérologiques et sont à l'origine d'une sérologie AgHBs négative, alors que l'ADN viral est détectable dans le sérum (voir chapitre suivant).

L'absence d'AgHBe, associée à un niveau de réplication virale constant ou fluctuant, est caractéristique des mutants précore.

4.2. Anticorps anti-HBc isolés

L'interprétation de ce profil sérologique est délicate. La détection d'Ac anti-HBc en dehors de tout marqueur HBs est possible lors des situations suivantes :

✓ une infection récente au stade dit de la « fenêtre sérologique », entre la disparition de l'AgHBs et l'apparition des Ac anti-HBs, qui peut durer plusieurs semaines. Dans ce cas, la fraction M des Ig anti-HBc est positive.

✓ une infection « guérie », datant souvent de plusieurs dizaines d'années. En l'absence de stimulation antigénique, le taux sérique des Ac anti-HBs diminue jusqu'à devenir indétectable, alors que les Ac anti-HBc persistent. Les IgM anti-HBc sont négatives.

✓ une authentique infection B occulte, caractérisée par la persistance d'une réplication virale et l'absence de détection des autres marqueurs sérologiques (voir chapitre suivant). Cette situation souligne l'importance de la détection du génome viral, qui permet de ne pas éliminer le diagnostic d'hépatite B chronique devant un tel profil.

✓ un résultat faussement positif dû à un manque de spécificité des tests diagnostiques.

CHAPITRE III : LES INFECTIONS B OCCULTES

Pendant longtemps, la séroconversion HBs a été considérée comme l'indicateur essentiel de la « guérison » d'une hépatite B aiguë ou chronique, notamment après traitement. Cependant, Hoofnagle et al. [180] ont décrit en 1978 la transmission d'une infection B via la transfusion du sang d'un donneur négatif pour l'AgHBs et les Ac anti-HBs mais positif pour les Ac anti-HBc. L'amélioration des méthodes de diagnostic moléculaire, et en particulier le développement de techniques de PCR de plus en plus sensibles, ont permis de détecter des traces d'ADN du VHB dans le sérum et le foie de patients ayant éliminé l'AgHBs.

Ainsi est apparu le concept d'« infection B occulte », défini par la persistance de la réplication virale en l'absence d'AgHBs détectable.

Bien que les hépatites B occultes soient caractérisées depuis une vingtaine d'années, les mécanismes moléculaires et/ou immunologiques sous-jacents ne sont pas complètement élucidés. Plusieurs hypothèses ont été évoquées, incluant des mutations dans les gènes S, C, X, l'intégration de l'ADN du VHB dans le génome cellulaire, une réplication virale extra-hépatique, la formation de complexes immuns circulants renfermant le VHB, une altération de la réponse immune ou des coinfections par d'autres virus.

L'intérêt majeur de l'identification de ces infections réside dans le risque de transmission du VHB lors d'hémodialyses, de dons d'organes ou de sang. L'impact clinique et l'existence même des hépatites B occultes ont fait l'objet de nombreuses études mais restent controversés.

A. Diagnostic moléculaire des infections B occultes

1. Détection de l'ADN

Le génome viral peut être détecté dans le sérum, mais aussi dans le foie et les cellules mononuclées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* : PBMC) des patients AgHBs- [181]. Le plus souvent, la charge virale sérique est inférieure à 10^4 copies/mL [182, 183] et est donc significativement plus faible que celle observée chez les patients AgHBs+ (en moyenne, 10^8 copies/mL chez les patients AgHBe+ et 10^5 copies/mL chez les patients AgHBe-). Il semble que cette charge virale ne soit pas stable et fluctue dans le temps [184].

La quantité d'ADN intrahépatique est habituellement plus élevée dans le foie que dans le sérum (elle serait d'environ 10^{-2} à 10^{-1} copies de génome/cellule [185]). Cependant, dans certains cas, l'ADN du VHB est détecté seulement dans le sérum [186]. Il pourrait s'agir d'une phase transitoire des infections B occultes, ou de la conséquence d'une localisation extrahépatique de la réplication virale.

La difficulté de diagnostiquer une infection B occulte tient au manque de standardisation des tests utilisés pour la détection du génome viral. La méthode utilisée pour réaliser la détection doit être performante. Le passage des techniques de Southern Blot aux techniques de PCR a permis un gain considérable de sensibilité (d'environ 10^5 - 10^6 copies/mL à 10^{-10^2} copies/mL). Cependant, le choix des amorces de PCR est essentiel et influe sur la sensibilité et la spécificité de la réaction. Par conséquent, certains résultats peuvent apparaître discordants d'une étude à l'autre, soit du fait de faux négatifs, lorsque les méthodes n'ont pas la même sensibilité, soit du fait de faux positifs, dans le cas d'un défaut de spécificité d'une méthode.

En outre, le choix des patients et des échantillons étudiés est crucial pour l'interprétation des résultats. Par exemple, les donneurs de sang avec des Ac anti-HBc isolés ont rarement une charge virale détectable par rapport aux patients présentant une hépatite chronique [187].

2. cccDNA et ARN viraux

Lors de la réplication virale, le rcDNA est transformé en cccDNA, qui sert de matrice pour la transcription des ARN génomiques et pré-génomiques. Le cccDNA et les ARN viraux sont donc des marqueurs incontestables de l'existence d'une réplication virale.

Le stock de cccDNA dans le noyau cellulaire est renouvelé par recyclage des nucléocapsides immatures, pour atteindre jusqu'à 50 copies de cccDNA par cellule, assurant ainsi la persistance de l'infection. La diminution de la charge virale lors de la thérapie anti-virale suit une cinétique en deux phases : la chute brutale de la réplication virale d'abord observée (due à l'inhibition de la production des virions) est suivie d'une décroissance lente de la charge virale, correspondant probablement à l'élimination des cellules infectées [188]. Le cccDNA serait responsable de cette seconde phase, du fait de la difficulté à l'éliminer.

Quelques études ont montré la présence du cccDNA et des ARN viraux à la fois dans le foie et dans les PBMC des patients ayant une infection B occulte [189, 190]. Les différences de résultats entre les études peuvent être expliquées par des limitations techniques. L'inconstance de détection du cccDNA et/ou des ARN viraux dans des hépatocytes contenant le génome viral peut résulter d'un défaut de sensibilité de la technique (i.e. faux négatifs). Par ailleurs, la détection de cccDNA en l'absence de détection de rcDNA rend discutable la spécificité de la technique (i.e. faux positifs). Néanmoins, la plupart des travaux concluent à la persistance de la réplication virale, bien qu'à faible niveau, chez les patients avec une infection B occulte.

B. Prévalence des infections B occultes

Malgré le grand nombre d'études consacrées aux infections B occultes ces dernières années, leur prévalence dans différentes populations de patients reste imprécise. Plusieurs raisons peuvent être évoquées :

- ✓ l'hétérogénéité des situations cliniques dans lesquelles sont observées les infections occultes ;
- ✓ le choix des patients étudiés : un trop faible échantillonnage, des populations hétérogènes, la zone géographique d'origine (de faible ou de forte endémicité), le manque de contrôles... sont des facteurs influençant la prévalence ;
 - ✓ la performance des méthodes de détection de l'ADN du VHB ;
 - ✓ la nature du prélèvement : l'ADN du VHB est plus fréquemment détecté dans les biopsies hépatiques que dans le sérum.;
- ✓ l'intervalle de temps écoulé entre la clairance de l'AgHBs et la recherche de l'ADN viral : plus la période d'observation est longue, plus l'incidence des infections B occultes est faible.

Les hépatites B occultes sont rencontrées dans différentes situations cliniques. Elles sont souvent consécutives à la clairance spontanée ou chimioinduite de l'AgHBs au cours des hépatites chroniques, mais elles peuvent aussi résulter de la « guérison » d'une hépatite B aiguë et persister pendant 20 à 30 ans. Une forte prévalence d'infections B occultes est observée parmi les patients présentant un hépatocarcinome et chez les sujets coinfectés par le VHC. Ces infections ont également été décrites lors des réactivations virales suite à une

immunosuppression ; chez des patients hémodialysés ; après vaccination des enfants ; dans la population générale [191].

Bréchet et al. [187] ont recensé et synthétisé les résultats de plusieurs études menées dans différents pays, sur des groupes variés de patients. Il faut tout d'abord noter que le diagnostic d'infection B occulte n'est pas restreint aux zones de forte endémie. Bien qu'elles soient très fortement représentées dans ces régions, ces infections ont aussi été décrites dans les pays occidentaux de faible endémie comme la France [191].

Globalement, l'ADN viral est détecté dans le sérum de 5 à 55 % (en moyenne 30 %) des patients AgHBs- ayant une hépatite chronique (avec ou sans CHC associé). Ces taux sont augmentés lorsque le génome viral est recherché dans le foie : l'ADN du VHB est positif dans 13 à 71 % des cas (en moyenne, 45 %).

Le suivi à long terme des patients ayant éliminé l'AgHBs spontanément ou sous traitement a montré la persistance de l'ADN du VHB dans le sérum de 28 % des patients et dans le foie de 94 % des patients, avec une chute de la charge virale sérique après la séroconversion.

En Europe, l'incidence des infections chroniques occultes est de 20 à 30 % [191].

La prévalence fluctue selon le profil sérologique des patients étudiés ; elle est plus forte chez les patients possédant des Ac anti-HBc isolés (l'ADN du VHB est positif dans 7 à 60 % des populations fortement exposées au virus) par comparaison aux patients séronégatifs.

La persistance de l'ADN du VHB semble moins fréquente lors des hépatites aiguës, et particulièrement lors des hépatites fulminantes ; la positivité de l'ADN est d'environ 7 % dans le foie et 10 % dans le sérum.

Le génome viral peut aussi être détecté chez les sujets sans atteinte hépatique, i.e. dans la population générale. Par exemple, la prévalence moyenne observée chez les donneurs de sang ou d'organes est inférieure à 20 %, avec là encore une plus forte prévalence chez les sujets ayant des Ac anti-HBc isolés.

Une étude récente menée dans la communauté inuit canadienne [192] révèle qu'une charge virale B est détectable chez 8 % des individus sans aucun marqueur sérologique du VHB et 18 % des sujets possédant à la fois des anticorps anti-HBs et anti-HBc.

Prévalence des infections B occultes lors des coinfections par le VHC ou le VIH

Le génome du VHB est retrouvé chez 22 à 87 % des patients AgHBs- coinfectés par le VHC [181, 187]. Il faut noter que la persistance du génome viral est plus fréquemment associée à une sérologie Ac anti-HBc positifs (70 %) qu'à un profil Ac anti-HBc négatifs (30 %) [193]. En France, l'incidence des infections B occultes dans un contexte de coinfection par le VHC est d'environ 20 %. Elle atteint 80 % au Japon [191, 194].

L'analyse de l'évolution de la charge virale chez les patients coinfectés montre que la virémie fluctue au cours du temps, expliquant les différences de prévalence observées entre les études.

La prévalence des infections B occultes parmi les patients VIH+ reste controversée du fait du manque de méthodes de diagnostic standardisées. L'ADN du VHB a été détecté chez 35 à 89,5 % de patients VIH+ présentant des Ac anti-HBc isolés, par des techniques de PCR permettant l'amplification des régions C et S du VHB [195, 196]. En revanche, des auteurs utilisant la méthode COBAS Amplicor HBV Monitor (Roche Diagnostics), amplifiant le génome du VHB dans la région C, n'ont détecté le génome du VHB que chez moins de 1 % des patients [197-199].

Prévalence du profil d'anticorps anti-HBc isolés

Quelque soit le contexte clinique, les infections B occultes sont plus fréquemment identifiées chez les sujets présentant une sérologie d'Ac anti-HBc isolés.

Il a été estimé qu'en Europe, zone de faible endémie, 1 à 1,4 % de la population générale possède des Ac anti-HBc isolés [200]. Ce profil est particulièrement fréquent dans certaines populations comme les toxicomanes par voie intraveineuse (54 %), les hémodialysés (31 %), les transplantés, les femmes enceintes, les immigrés, les personnes coinfectées par le VIH et/ou le VHC. En effet, 17 à 42 % des sujets coinfectés par le VIH et 20 à 49,2 % des sujets coinfectés par le VHC, ont des Ac anti-HBc comme seuls marqueurs de leur infection B [182, 195, 201-203]. Par ailleurs, plus de 75 % des individus triinfectés (VHB/VIH/VHC) sont porteurs d'Ac anti-HBc isolés [201].

C. Impact clinique des infections B occultes

1. Transmission du VHB lors de transfusions, de greffes ou d'hémodialyses

Le premier constat de la transmission du VHB dans un contexte d'hépatite occulte date de 1978, à l'occasion d'une transfusion sanguine [180]. Depuis, d'autres observations ont rapporté des cas d'hépatites B post-transfusionnelles et des expériences menées sur le chimpanzé ont confirmé le risque infectieux lié aux hépatites B occultes [187]. Actuellement, le risque de transmission du VHB via les transfusions est très limité du fait de la performance des tests de dépistage des marqueurs du VHB.

Des hépatites B ont également été décrites après des greffes d'organes issus de patients AgHBs-, notamment lors de transplantations hépatiques. Le risque de contracter une infection B après une greffe de foie est évalué à 25-94 % [181].

De même, le risque de transmission du VHB lors de greffes de moelle osseuse est très faible mais n'est pas exclu. Des cas de réactivation virale conduisant à des hépatites fulminantes ont été signalés après des greffes de moelles de donneurs ayant une infection B occulte [204].

Cabrerizo et al. [205] ont détecté une virémie VHB en l'absence d'AgHBs chez 58 % de patients hémodialysés. Par ailleurs, une étude récente menée aux USA a rapporté une prévalence d'infections B occultes de 3,8 % parmi les patients hémodialysés [206].

2. Evolution, aggravation des atteintes hépatiques

L'impact des infections B occultes sur l'atteinte hépatique n'est pas clairement établi. Certains auteurs rapportent un effet bénéfique de la clairance de l'AgHBs [181, 207] tandis que d'autres suggèrent une exacerbation de la pathologie hépatique et une augmentation de l'incidence de survenue de CHC [208, 209].

Chemin et al. [177] ont montré que, parmi les patients ayant une hépatite occulte, 66 % présentent une élévation des enzymes hépatiques et 53 %, des sévères lésions de fibrose. Le suivi de ces patients a révélé que 18,2 % progressent vers la cirrhose.

La prévalence des infections B occultes parmi les patients atteints d'hépatocarcinome varie de 22 à 87 % selon les études [208, 210]. Selon Bréchet et al. [187], plusieurs observations sont en faveur d'une corrélation entre hépatite B occulte et évolution vers un hépatocarcinome : tout d'abord, des CHC se développent chez 10 à 20 % des marmottes infectées par le WHV mais ne possédant ni antigène de surface ni antigène de capsid ; ensuite, l'ADN du VHB est détecté dans certains cas de carcinomes hépatocellulaires survenus sans cirrhose préexistante chez des adultes ou des enfants AgHBs- ; enfin, il existe un accroissement du taux de CHC observés chez des patients AgHBs-.

Il est probable que la persistance virale joue un rôle indirect dans l'exacerbation de la maladie hépatique, en stimulant continuellement la réponse immune. L'inflammation hépatique en résultant favoriserait l'évolution vers un carcinome hépatocellulaire. Il a également été suggéré un rôle important des cofacteurs de morbidité, tels que la coinfection par le VHC et l'abus d'alcool [187].

3. Coinfection par le VHC

Plusieurs études montrent que les patients coinfectés par le VHC et présentant des Ac anti-HBc isolés semblent progresser plus rapidement vers la cirrhose [193, 195, 211]. L'infection B occulte semble associée à des transaminases plus élevées et une activité nécroinflammatoire plus importante chez les patients VHC+ [212, 213]. Cependant, pour certains auteurs [202, 214], ces résultats ne sont pas différents de ceux observés chez les patients mono-infectés par le VHC.

De même, l'impact des infections B occultes sur l'incidence des CHC chez les patients coinfectés par le VHC est controversé. Contrairement à certains auteurs, Piroth et al. ne mettent pas en évidence de corrélation entre le profil d'Ac anti-HBc isolés et l'incidence des hépatocarcinomes chez ces patients [195].

En revanche, plusieurs études s'accordent sur le fait que les infections B occultes sont associées à une diminution de la réponse à l'interféron chez les patients VHC+ [193, 212, 215]. Le mécanisme de cette moindre réponse à l'IFN n'est pas encore élucidé.

4. Coinfection par le VIH

Lors des hépatites chroniques, la coinfection par le VIH est associée à une progression plus rapide de la fibrose et un taux d'évolution vers une cirrhose décompensée plus élevé [216].

Peu de données concernant l'impact du VIH sur l'atteinte hépatique sont disponibles pour les sujets présentant une hépatite B occulte. Certains auteurs ont suggéré que l'immunodépression provoquée par le VIH pouvait entraîner une réactivation du VHB [182, 217], avec la description séquentielle de profils sérologiques de guérison de l'infection B (AgHBs-, Ac anti-HBs+, Ac anti-HBc+), puis de profils AgHBs-, Ac anti-HBs-, Ac anti-HBc+ et enfin AgHBs+, Ac anti-HBs+, Ac anti-HBc+. Il peut s'agir de sujets guéris porteurs occultes réactivant leur infection à VHB ou d'une surinfection par une autre souche de VHB. Quelques cas de réactivations virales ont été décrits chez des patients AgHBs-, Ac anti-HBc+ et coinfectés par le VIH, lorsque le taux de TCD₄⁺ s'effondre ou après traitement par la lamivudine [218-220]. Hofer et al. [196] ont mis en évidence une hypertransaminasémie chez les patients ayant une infection B occulte et coinfectés par le VIH.

D. Mécanismes des infections B occultes

Les mécanismes intervenant dans le maintien d'un faible niveau de réplication virale en l'absence d'AgHBs détectable restent à définir.

Plusieurs hypothèses ont été proposées et ont fait l'objet de nombreuses études.

1. Complexes immuns circulants (CIC)

Lors des infections à VHB, les virus sont présents dans le sérum sous forme libre ou liés à des immunoglobulines, i.e. sous forme de complexes immuns. Les particules virales liées aux anticorps deviennent la forme sérique prédominante après la séroconversion HBs [221]. L'ADN du VHB, enfermé au sein des CIC, resterait alors détectable. Cependant, ces complexes immuns ne sont pas retrouvés dans le sérum des patients ayant éliminé l'AgHBs au cours d'une hépatite chronique [190]. Il est donc peu probable que cette hypothèse suffise à expliquer la persistance de l'ADN du VHB chez les sujets AgHBs-.

2. Etat des défenses immunitaires

Les cytokines sécrétées par les CTL, l'IFN γ et le TNF α , jouent un rôle majeur dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du génome du VHB. Une prolifération importante de ces CTL est détectée lors de la résolution des hépatites B aiguës et lors de la clairance de l'AgHBs dans les hépatites B chroniques [222, 223]. En théorie, une immunodépression pourrait donc être à l'origine d'une infection B occulte. D'autant plus qu'un état d'immunosuppression contribue souvent à des réactivations virales après une greffe du foie ou chez les patients coinfectés par le VIH [182, 193, 217]

Toutefois, il a été montré que des patients guéris d'une hépatite B aiguë pouvaient conserver une virémie B faible mais détectable, pendant une période variable, et malgré la présence de CTL et d'anticorps spécifiques [222]. Ainsi, sans être diminuée, la réponse immunitaire serait limitée dans sa capacité à éliminer le VHB : il est concevable que, dans certains cas, l'infection par le VHB et la réponse de l'hôte aboutissent à un équilibre, dans lequel le VHB stimule constamment la réponse immunitaire qui, en retour, maintient la réplication virale à un faible niveau.

3. Mutations dans le génome du VHB

Plusieurs auteurs ont suggéré que la variabilité génétique du VHB pouvait être à l'origine du profil AgHBs- [60, 190, 212, 213, 224]. Des mutations localisées dans les épitopes antigéniques de la protéine de surface peuvent entraîner un échappement aux immunoglobulines anti-HBs ; les virus mutés ne seraient plus reconnus par les anticorps utilisés dans les tests diagnostiques ni par la réponse immune humorale de l'hôte, permettant ainsi le maintien de l'infection B. A côté de ces mutations dites d'échappement au diagnostic, sont observés des mutations dans le gène S et/ou dans d'autres gènes, susceptibles d'inhiber la synthèse de l'AgHBs [190]. Dans ce cas, l'AgHBs est produit en quantité trop faible pour être détecté par les tests diagnostiques. Paterlini et al. [225] ont montré que la charge virale était plus élevée chez les patients ayant des anticorps anti-HBc et/ou anti-HBs que chez les patients séronégatifs. Cette observation suggère une influence du niveau de réplication virale sur la négativité des marqueurs sérologiques.

3.1. Mutations altérant l'antigénicité et/ou la production de l'AgHBs

Toute mutation affectant les propriétés physiques et/ou la conformation des épitopes de l'AgHBs peut entraîner une diminution de l'antigénicité de la protéine et de la production des anticorps anti-HBs [179, 224, 226]. Les mutants peuvent alors échapper à la réponse immune humorale et, peu ou non reconnus par les tests diagnostiques, sont à l'origine d'une hépatite AgHBs négative, avec réplication virale.

Weinberger et al. [60] ont montré que les mutations identifiées chez les VHB de patients présentant des Ac anti-HBc isolés sont fréquemment localisées dans la MHL (2,26 % mutations d'acides aminés dans la MHL vs 0,94 % dans le reste de l'AgHBs), alors que les virus issus de patients AgHBs+ présentent davantage de mutations en dehors de la MHL (0,75 % substitutions dans la MHL vs 1,20 % hors de la MHL).

De nombreuses études ont documenté la variabilité du gène S du VHB [74, 76, 78, 179, 227, 228]. Les mutations les plus souvent décrites concernent la région entre les aa 124 et 147 (déterminant « a ») (Figure 18). Elles modifient l'organisation structurale des épitopes d'enveloppe (modification de la conformation secondaire et tertiaire des boucles) et diminuent donc l'affinité de fixation aux Ac anti-HBs. Les mutations G145R et D144A de l'AgHBs sont les plus fréquentes ; elles sont responsables de l'échappement viral aux Ac anti-HBs et à la vaccination. De nombreuses autres substitutions ont été décrites, que ce soit dans le déterminant « a » de la MHL, dans les autres régions de l'AgHBs et dans les domaines préS [79, 179]. Par exemple, dans leur étude portant sur 55 souches cliniques, Roque-Afonso et al. [229] ont observé que les VHB infectant les patients AgHBs- ont majoritairement des mutations dans le déterminant « a », aux positions 120, 126, 132, 133, 134, 143, 144 et 145. Étonnamment, un variant porte des mutations après la région transmembranaire III, en position 204 et 205.

Par ailleurs, des substitutions ou des délétions dans le promoteur S peuvent influencer sur la transcription du gène S et ainsi diminuer l'expression de l'AgHBs [230, 231] : Cabrerizo et al. [190] ont identifié des virus délétés dans la région préS1 (et donc dans le promoteur S) chez tous leurs patients AgHBs-. Cependant, ce type de mutants peut coexister avec des virus « sauvages » et être également retrouvé chez des patients AgHBs+ [190, 232].

3.2. Mutations altérant la réplication virale

Certaines mutations présentes dans le gène S ont des répercussions sur la région P chevauchante ; par exemple, la substitution G145R correspond à la substitution W153Q dans le gène P, qui est à l'origine d'une diminution de l'activité de la polymérase [233]. Ces substitutions peuvent concerner des régions clés de la polymérase (telles que les domaines B et C de la RT) et pourraient affecter l'activité de l'enzyme ; elles pourraient donc être responsables d'un défaut d'expression de la protéine de surface, expliquant l'absence de détection de l'AgHBs [224]. Blum et al. [80] ont décrit une mutation non sens dans le gène de la polymérase, qui inhibe la multiplication du VHB *in vitro* et est donc susceptible de très fortement diminuer la réplication virale *in vivo*.

De même, les mutations dans l'ORF C interagissent avec la réplication virale. Les mutations dans la région N-terminale peuvent inhiber la formation de la capside icosaédrique à partir des dimères de protéine HBc et les changements dans la région C-terminale peuvent altérer la région epsilon et donc l'encapsidation [224, 234].

Des mutations dans le gène X ont été associées à une diminution de la multiplication virale, par altération de la protéine transactivatrice X ou du BCP [212, 224, 235]. Une délétion de 8 nucléotides (nt 1768 à 1775) dans le promoteur du core a été décrite chez des patients présentant des infections B occultes [212, 213, 236].

Ces données tendent à démontrer que le profil de mutations observé lors des infections B occultes est complexe. Ces mutations sont à l'origine soit d'un niveau de réplication virale comparable à celui des virus « sauvages », mais avec un défaut de reconnaissance de l'AgHBs par les tests sérologiques, soit d'une multiplication virale trop faible pour être détectée par les méthodes de diagnostic actuelles, sans que le gène S soit modifié.

4. Interférences virales

Des coinfections par d'autres virus hépatotropes sont à l'origine d'une diminution de la réplication du VHB : le VHD exerce une régulation négative sur la réplication virale B [237, 238] et des essais de cotransfection ont révélé une interférence mutuelle entre le VHB et le VHC [202, 239, 240].

Plusieurs études ont montré que la réplication et l'expression des gènes du VHB sont réprimées par le VHC, via sa protéine de capsidation [241]. Schuttler et al. [242] ont montré que

la protéine de core du VHC agit sur la transcription du VHB par inhibition de l'expression des *enhancers*, en particulier de l'EnI. Par la suite, Chen et al. [243] ont démontré que la protéine de capsid du VHC exerce une plus forte activité inhibitrice sur la réplication du VHB que sur l'expression des gènes viraux. Il apparaît que la protéine de core du VHC inhibe l'encapsidation du VHB en se liant à la polymérase du VHB ; elle empêche ainsi la fixation de l'enzyme à la région epsilon et stoppe l'initiation de la réplication virale. Par ailleurs, leurs résultats indiquent que l'inhibition de la transcription du VHB est due à l'interaction directe de la protéine de capsid du VHC avec la protéine transactivatrice X du VHB.

Or, la délétion de 8 nucléotides dans le promoteur du core/gène X a souvent été décrite chez les patients coinfectés (VHB/VHC) et présentant une hépatite occulte alors qu'elle ne semble pas être présente chez les patients ayant une hépatite B active [212, 213, 236]. Des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les virus mutés seraient moins réplicatifs et stimuleraient indirectement la réplication du VHC. Toutefois, il faut noter que des VHB « sauvages » coexistent avec les mutants chez environ 30 % des patients et que d'autres mutations ont été identifiées chez certains virus délétés [212].

5. Infection des PBMC

Bien que le virus de l'hépatite B soit hépatotrope, de faibles quantités d'ADN viral ont été retrouvées dans d'autres tissus, tels que la moelle osseuse, les PBMC, le pancréas, les reins, la peau.... Les PBMC, facilement accessibles, ont particulièrement été étudiés. Plusieurs études ont révélé la présence de l'ADN du VHB dans ces cellules chez des patients ayant une hépatite chronique [244-246], ou ayant guéri d'une hépatite aiguë [190, 222, 246, 247], ou sous immunoprophylaxie post-transplantation hépatique [248].

Le rôle de réservoir joué par les PBMC dans les réactivations des infections B et dans la sélection de souches virales a été mis en évidence chez les transplantés hépatiques : après une greffe de foie, l'administration de fortes doses d'immunoglobulines spécifiques permet de maintenir la négativation de l'AgHBs sérique et de la charge virale intra-hépatique ; cependant, l'ADN viral peut rester détectable dans les PBMC de certains patients greffés [249], et être à l'origine d'infections récurrentes. De plus, un cas de réactivation virale post-transplantation hépatique a été décrit, impliquant la population virale mutante qui était minoritaire avant la greffe et seulement détectée dans les PBMC [250]. Par ailleurs, le

caractère infectieux des PBMC contenant le VHB a été montré grâce au modèle de la marmotte [251].

Certains auteurs ont détecté dans ces cellules des intermédiaires de réplication du VHB (ARN et/ou cccDNA), notamment chez des patients fortement virémiques [246, 252]. L'ADN du VHB a également été détecté dans les PBMC de patients AgHBs- jusqu'à 4 ans après la clairance de l'AgHBs [253]. Ces données suggèrent que les PBMC pourraient jouer un rôle de réservoir pour maintenir une infection persistante.

Toutefois, d'autres études ont montré que les PBMC ne pouvaient pas être infectés par le VHB [254].

6. Intégration du génome du VHB

L'intégration de l'ADN du VHB dans le génome hépatocytaire a été mise en évidence au cours des infections B chroniques, plus rarement lors des hépatites aiguës ou fulminantes, et également au cours des infections B occultes [244, 255-258]. Des études ont montré que l'ADN intégré provenait principalement de l'ADN double-brin linéaire, formé « par erreur » lors de la synthèse du brin (+) [43].

Les phénomènes d'intégration sont souvent associés au développement de CHC : l'ADN viral intégré a été décelé dans 10 à 30 % des hépatocarcinomes survenant lors d'infections B occultes par la technique de Southern Blot [259-261] ; par PCR, l'intégration de la région X du VHB dans le génome des hépatocytes tumoraux a été détectée chez 29 % de patients AgHBs- coinfectés par le VHC [255, 256].

Il est probable que l'intégration de l'ADN du VHB dans le génome cellulaire entraîne des réarrangements de la séquence virale à l'origine d'un défaut d'expression du gène de surface [257]. Marusawa et al. [234] n'ont pas réussi à amplifier simultanément les différentes régions de l'ADN viral intégré chez un même patient ayant des Ac anti-HBc isolés et suggèrent donc que l'ADN viral intégré est partiellement délété ou fragmenté. Cette hypothèse a été confirmée par Murakami et al. [244] qui ont rapporté la présence d'ADN intégré à la fois dans le foie et dans les PBMC de patients AgHBs-, et qui ont décrit un cas de réarrangement de la séquence virale.

7. Autres mécanismes évoqués

Le lien entre certains géotypes du VHB et les infections occultes n'est pas bien documenté. Il est possible que la variabilité génomique influe sur le développement d'infections occultes. Weinberger et al. [60] ont montré qu'une majorité des patients ayant des Ac anti-HBc isolés (61 %) sont infectés par des VHB de géotype D, alors que des virus de géotype A sont identifiés chez 53 % des contrôles (patients AgHBs+).

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

CHAPITRE I : ANALYSE DU GÈNE DE SURFACE DES VHB INFECTANT DES PATIENTS PRÉSENTANT DES ANTICORPS ANTI-HBc ISOLÉS

La principale hypothèse évoquée pour expliquer la persistance d'une répllication virale B à un niveau faible mais stable en l'absence d'AgHBs détectable, est la présence de mutations dans la boucle hydrophile majeure (MHL) de la protéine de surface. Le virus muté dans l'AgHBs, peu ou non reconnu par les anticorps anti-HBs, échapperait au diagnostic sérologique et à la réponse immunitaire.

Le premier objectif de notre travail a consisté à rechercher une corrélation entre ces mutations et le profil sérologique d'AgHBs négatif. Dans ce but, nous avons sélectionné des patients chez lesquels la prévalence d'infections B occultes est particulièrement élevée, à savoir des sujets coinfectés par le VIH et/ou le VHC, et possédant des anticorps anti-HBc isolés, selon deux techniques sérologiques. Nous avons analysé les gènes S des souches isolées chez ces patients et les avons comparé avec les séquences S des virus infectant des patients témoins AgHBs+.

Nous avons plus particulièrement étudié un variant S, isolé chez un patient triinfecté VHB/VHC/VIH et ayant des Ac anti-HBc isolés. Nous avons analysé l'évolution de ses mutations au cours du temps afin d'évaluer leur rôle dans le développement des hépatites B occultes. Nous avons également souhaité comprendre l'impact des coinfections VHC/VIH sur l'évolution de l'infection B chez ce patient.

Ces travaux ont abouti à la publication de deux articles.

A. Recherche de mutations dans l'AgHBs des VHB à l'origine d'infections occultes chez des patients présentant des anticorps anti-HBc isolés

1. Article 1

Serological pattern 'anti-hepatitis B core alone' in HIV or hepatitis C virus-infected patients is not fully explained by hepatitis B surface antigen mutants.

Wagner AA, Denis F, Weinbreck P, Loustaud V, Autofage F, Rogez S, Alain S.

AIDS, 2004, 18: 569-571.

Résumé

Nous avons déterminé la prévalence des infections B occultes et étudié les mutations du gène S chez des patients coinfectés par le VIH ou le VHC, et présentant un profil sérologique d'anticorps anti-HBc isolés. Nous avons observé que l'ADN du VHB est fréquemment détecté dans le sérum des patients coinfectés par le VIH. Le séquençage du gène S a révélé que seulement deux VHB issus de patients VIH+ portaient des mutations dans la boucle hydrophile majeure. Ainsi, la présence de mutations d'échappement au diagnostic ne suffit pas à expliquer l'absence de détection de l'AgHBs chez les patients ayant des anticorps anti-HBc isolés.

2. Conclusion

Plusieurs auteurs ont suggéré que les mutations dans les déterminants antigéniques S étaient responsables de la séronégativité de l'AgHBs [60, 179, 224, 226]. Historiquement, les premières mutations évoquées ont été décrites dans le déterminant « a », cible majeure des anticorps dirigés contre le VHB. Plus récemment, Chen et al. [262] ont identifié des mutations dans la MHL, mais en dehors du déterminant « a », qui entraînent une modification conformationnelle des épitopes antigéniques et diminuent drastiquement l'antigénicité de la protéine de surface. Dans notre étude, seulement deux isolats portent des mutations dans la MHL : l'un porte la mutation K141R et l'autre présente une association de 5 mutations aux positions 105, 110, 112, 118 et 119. Bien que les trousse commercialisées par DiaSorin et Abbott que nous avons utilisées pour la recherche de l'AgHBs détectent les mutations connues dans le déterminant « a », dont les substitutions en position 110, 112, 118 et 119 [229] et données du fabricant), il est possible que les deux variants échappent à ces tests diagnostiques. Cependant, vu la faible proportion de mutants S dans la population étudiée, la présence de mutations dans la MHL ne semble pas être une raison suffisante pour expliquer l'absence de détection de l'AgHBs chez les patients ayant une infection B occulte. Sur ce point, nos conclusions concordent avec celles d'autres études [207, 234, 264-266], qui montrent que, parmi les nombreuses mutations précédemment décrites, notamment par Weinberger et al. [60], aucune n'est systématiquement retrouvée chez les patients AgHBs- étudiés et peu semblent vraiment impliquées dans la pathogenèse des infections occultes.

Pour expliquer le profil d'AgHBs- chez les patients étudiés, il faut donc évoquer d'autres causes, telles qu'une diminution de la synthèse de la protéine de surface, associée ou non à une diminution de la réplication du VHB. Cette hypothèse est également retenue par certains auteurs [207, 264, 267], qui associent l'absence de détection de l'AgHBs à un niveau de production très faible, en dessous du seuil de détection des tests diagnostiques, du fait d'une inhibition de la réplication virale. Weinberger et al. [60] ont observé chez leurs patients ayant des Ac anti-HBc isolés (mais pas chez les témoins AgHBs+) la présence de mutations qui touchent à la fois la MHL et la région RT de la polymérase. Ils décrivent en particulier des substitutions aux positions 105, 112, 125 et 141, qui sont également modifiées chez les deux isolats de notre étude. Ces mutations pourraient altérer l'activité de la polymérase, entraînant une diminution de la réplication du VHB et de la production de l'AgHBs. Dans notre étude, quelques isolats présentent des mutations en dehors de la MHL, entre les acides aminés 45 et

54 de la protéine S. Ces positions ont précédemment été décrites par Weinberger et al. [60] comme des sites de polymorphisme, aussi bien chez les patients AgHBs+ que chez les individus ayant des Ac anti-HBc isolés ; de plus, elles ne correspondent pas à des mutations dans la polymérase qui pourraient diminuer l'expression de l'AgHBs. Il paraît donc nécessaire de rechercher des mutations dans d'autres régions, en particulier l'ORF P et le promoteur S, chez ces patients.

Par ailleurs, même si notre échantillonnage est modeste, il apparaît que l'ADN du VHB est plus rarement détecté chez les patients coinfectés par le VHC que chez les patients non coinfectés par le VHC (16,12 % vs 52,9 %). Nos observations confirment donc les données précédemment publiées, concernant la régulation négative exercée par le VHC sur la réplication du VHB [241-243]. En utilisant une technique de PCR en temps réel, Khattab et al. [268] ont observé de faibles charges virales B chez des patients coinfectés par le VHC, qui pourraient expliquer l'absence de détection de l'AgHBs.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier plus précisément et rétrospectivement le patient infecté par le VHB portant 5 mutations dans la MHL, afin de comprendre l'influence de ces mutations sur l'évolution de l'infection. Par séquençage de la totalité du génome viral, nous avons recherché des mutations dans d'autres gènes qui pourraient altérer la capacité de réplication du VHB, ou interférer avec la synthèse ou l'externalisation de la protéine S. Notre objectif était également d'étudier le rôle potentiel des coinfections dans le développement des infections B occultes à travers ce patient triinfecté par le VHB, le VHC et le VIH.

B. Caractérisation moléculaire d'un variant S infectant un patient triinfecté VHB/VHC/VIH et présentant un profil d'anticorps anti-HBc isolés

1. Article 2

Double hepatitis B virus infection in a patient with HIV/hepatitis C virus coinfection and 'anti-HBc alone' as serological pattern.

Wagner AA, Loustaud-Ratti V, Chemin I, Weinbreck P, Denis F, Alain S.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005, 24 : 623-627.

Résumé

Nous rapportons le cas d'une double infection B chez un patient coinfecté par le VIH et le VHC et présentant des anticorps anti-HBc comme seuls marqueurs sérologiques (profil d'« anticorps anti-HBc isolés »). Nous avons identifié chez ce patient deux VHB de génotypes différents. Une revue de la littérature nous indique qu'il s'agit de la première description d'une infection B multiple et sérologiquement silencieuse chez un patient coinfecté par le VIH et le VHC. L'incidence élevée du profil d'anticorps anti-HBc isolés et le nombre croissant d'infections B sérologiquement silencieuses détectées chez les patients VIH+ montrent la nécessité de rechercher la présence d'infections B occultes chez ces patients. De plus, une étude plus approfondie de ces patients semble nécessaire pour évaluer l'impact des infections par plusieurs génotypes du VHB et des coinfections VHB/VHC/VIH sur la morbidité.

2. Conclusion

Bien que la prévalence du profil sérologique d'Ac anti-HBc isolés soit particulièrement élevée dans les populations coinfectées par le VHC et/ou le VIH, l'étiologie de ce profil reste incertaine. Il est possible que l'inhibition de la réplication du VHB par le VHC entraîne une diminution de l'expression de l'AgHBs à un titre inférieur aux seuils de détection des tests de diagnostic. Cependant, des titres élevés d'ADN du VHB sont détectés dès le début du suivi, malgré la présence d'une coinfection par le VHC. De plus, la réactivation du VHB en fin de suivi ne semble pas être liée à une diminution de la régulation négative exercée par le VHC, puisque la charge virale C est supérieure à 800000 UI/mL. La coinfection par le VHC ne peut donc pas à elle seule expliquer le profil d'AgHBs-.

Les mutations dans la MHL pourraient expliquer l'absence de détection de l'AgHBs chez ce patient. Cependant, nous avons retrouvé les cinq mutations chez tous les isolats, y compris ceux correspondant au statut d'AgHBs+. Jeantet et al. [264] ont suggéré l'hypothèse selon laquelle le profil d'AgHBs- ne serait pas lié à l'émergence de mutants S, mais plutôt à une réplication virale déficiente, à l'origine d'une production insuffisante d'AgHBs. D'autres auteurs ont évoqué l'implication de mutations dans la polymérase [80, 224, 233], dans les promoteurs S ou C [190, 212, 213, 230, 231, 235] ou dans le gène C, inhibant l'encapsidation [224, 234]. Nous n'avons observé aucune mutation dans le promoteur S ni dans le promoteur C. Les trois mutations dans le domaine RT de la polymérase (N453S, R455K, qui correspondent aux mutations P105L et I110V dans le gène S, et Q654R) ne sont pas situées dans les régions conservées de l'enzyme et sont retrouvées chez tous les isolats. La mutation Q135E localisée dans le domaine TP de la polymérase est présente chez les isolats du début du suivi mais disparaît lorsque l'AgHBs se positive. Cette substitution empêcherait-elle la fixation de la polymérase au niveau de la région epsilon, inhibant ainsi la réplication virale ? Bien que nous ne puissions pas exclure le rôle de cette mutation dans l'absence de détection de l'AgHBs, il est plus vraisemblable qu'un dysfonctionnement immunitaire, dû à la coinfection par le VIH, soit à l'origine de l'absence de séroconversion HBs puis de la réactivation virale observée dès la chute du taux de TCD₄⁺ du patient.

Par ailleurs, une double infection par des VHB de génotypes différents (A et D) est observée chez le patient étudié. Lorsque le patient est AgHBs-, les deux génotypes représentent alternativement la population majoritaire dans les échantillons cliniques. Dans un poster présenté au 12^e Symposium International sur les Hépatites Virales et les Maladies

Hépatiques, Shire et al. [269] suggèrent qu'une coinfection par le VIH non contrôlée pourrait altérer la capacité du système immunitaire à éliminer les souches de moindre *fitness*, entraînant ainsi la codominance de deux génotypes du VHB. Rappelons que l'influence des génotypes du VHB sur l'évolution de l'infection est encore méconnue. Il pourrait être envisagé qu'une interférence mutuelle entre les deux génotypes soit à l'origine du profil sérologique d'AgHBs- alors que l'ADN viral est détectable. Weinberger et al. [60] ont mis en évidence une forte proportion de VHB de génotype D chez les patients présentant des Ac anti-HBc isolés et de génotype A chez les patients AgHBs+ ayant une hépatite chronique ; et des auteurs japonais ont montré une corrélation entre génotype A et évolution de l'infection vers la chronicité [270, 271]. Il faudrait donc envisager un rôle potentiel des génotypes du VHB dans l'évolution des infections B.

Un point particulièrement intéressant de cette étude est la détection du variant à l'origine de la réactivation virale dans les PBMC du patient. La réplication du VHB dans ces cellules pourrait permettre au virus d'échapper à la réponse immune et de persister plusieurs années. Il nous a donc paru intéressant d'étudier le rôle des PBMC en tant que réservoir des infections B occultes.

CHAPITRE II : RECHERCHE D'UNE RÉPLICATION VIRALE DANS LES PBMC DE PATIENTS AGHBS-NEGATIFS

Bien que plusieurs auteurs aient identifié des intermédiaires de réplication du VHB (cccDNA et/ou ARN viraux) dans les PBMC [190, 246, 252], l'existence d'une multiplication virale dans ces cellules est sujet de controverse [244, 254, 272]. La divergence des observations peut en partie être expliquée par le manque de standardisation des techniques utilisées pour la détection du cccDNA (défaut de spécificité, présence de bruit de fond dû aux virions adsorbés sur les PBMC...) et l'hétérogénéité des populations étudiées (contextes cliniques différents).

Dans le but de clarifier la situation, nous avons développé dans un premier temps une méthode performante de PCR en temps réel pour la détection et la quantification du cccDNA, à partir de techniques précédemment décrites et évaluées. Cet outil nous a permis de vérifier la présence de cccDNA dans les PBMC de patients AgHBs+, et d'émettre des hypothèses sur l'origine du cccDNA détecté dans le sérum de patients par certains auteurs [273, 274].

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le rôle de réservoir des PBMC, potentiellement impliqués dans le développement des infections B occultes et dans la sélection de souches de VHB ; pour cela, nous avons recherché la présence de cccDNA dans les PBMC de patients AgHBs- par la technique précédemment mise au point et analysé la variabilité génomique des virus. Un groupe de patients AgHBs+ nous a servi de témoin.

A. Mise au point d'un outil de détection du cccDNA, intermédiaire de réplication du VHB, dans le sérum et les PBMC des patients

1. Article 3

Real-time PCR quantification of hepatitis B virus DNA and covalently closed circular DNA in peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B virus-infected patients.

A. A. Mazet-Wagner, M. C. Baclet, V. Loustaud-Ratti, F. Denis, S. Alain
accepté pour publication dans J Virol Methods

Résumé

La réplication du VHB dans des tissus extra-hépatiques, en particulier dans les PBMC, qui peuvent jouer un rôle dans le maintien de la réplication virale, est controversée. Afin de clarifier la situation, nous avons développé et validé une méthode de PCR en temps réel permettant la quantification de l'ADN total et du cccDNA du VHB, dans le sérum et dans les PBMC. Cette technique possède une bonne sensibilité (seuil de détection : 27 UI/mL), un large intervalle de quantification ($9 \log_{10}$), et d'excellentes reproductibilités intra- et inter-assais, qui ont été démontrés pour la quantification de l'ADN total. Elle détecte tous les génotypes de A à E et donne des résultats significativement non différents de la trousse COBAS Amplicor HBV Monitor. La spécificité de cette méthode a été améliorée grâce à l'utilisation d'enzyme digérant le rcDNA, et à l'élimination du bruit de fond engendré par l'adsorption des virus sur les PBMC. L'analyse des sérums et PBMC de 12 patients AgHBs+ a révélé la présence du génome viral dans tous les échantillons et a montré que le cccDNA, lorsqu'il était détecté, était une forme minoritaire (< 1 % de l'ADN total). En conclusion, la quantification de l'ADN total et du cccDNA du VHB dans les PBMC représente un marqueur non-invasif intéressant pour la compréhension des différentes étapes de l'infection par le VHB.

Real-time PCR quantification of hepatitis B virus DNA and covalently closed circular DNA in peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B virus-infected patients.

A. A. Mazet-Wagner¹, M. C. Baclet¹, V. Loustaud-Ratti², F. Denis¹, S. Alain¹

¹ *Laboratoire de Bactériologie-Virologie EA3175, Faculté de Médecine, Université de Limoges, 2 rue du Dr Marcland, 87000 Limoges, France*

² *Service de Médecine Interne, CHU Dupuytren, 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France.*

Abstract

It remains unclear whether hepatitis B virus (HBV) replicates in extrahepatic tissues, and particularly in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which may serve as a reservoir for the maintenance of infection. A real-time PCR assay for the quantitation of total and covalently closed circular (ccc) HBV DNA in serum and in PBMCs was developed. This assay was highly sensitive (detection limit: 27 IU/mL), linear over a wide range (9 log₁₀), and was displayed high inter- and intra-assay reproducibility for the quantitation of total DNA. Genotypes A to E were detected and the results were consistent with those obtained with the COBAS Amplicor HBV Monitor Test. The specificity of the methodology was increased by prior treatment with an enzyme that digests relaxed circular DNA, and the elimination of background signals from virus adsorbed to the surface of PBMCs. HBV DNA was detected in the serum and PBMCs of 12 HBsAg-positive patients, with less than 1% in the cccDNA form. In conclusion, the quantitation of total and ccc HBV DNA in PBMCs is potentially useful as a non-invasive marker, and may help to increase our knowledge of the natural history of hepatitis B.

Keywords

Hepatitis B virus, real-time PCR, covalently closed circular DNA, peripheral blood mononuclear cells.

2. Conclusion

La méthode de PCR en temps réel que nous avons développée possède un seuil de détection, une gamme linéaire de quantification et une reproductibilité comparables aux techniques les plus performantes récemment publiées pour quantifier l'ADN total (ADNt) du VHB. Notre technique a l'avantage d'être la première décrite permettant la quantification du cccDNA dans les PBMC, avec une sensibilité bien inférieure à celle des méthodes décrites dans la littérature visant à quantifier le cccDNA.

L'étude du panel de patients AgHBs+ nous a permis de confirmer la présence de l'ADN du VHB dans les PBMC de patients virémiques. Après élimination du bruit de fond (quantité de virions adsorbés à la surface des PBMC), le génome viral est détecté dans les PBMC des patients dont la charge virale sérique est supérieure à 10^4 UI/mL, mais sa concentration dans les PBMC n'est pas proportionnelle à la concentration sérique.

Par ailleurs, nous avons constaté l'importance de la digestion des formes relachées de l'ADN du VHB préalablement à la détection du cccDNA, permettant l'élimination des artefacts de quantification. Nous avons trouvé du cccDNA en faible quantité (≤ 1 % de l'ADNt) dans le sérum de deux patients. Comme nous avons également détecté une faible concentration d'ADN cellulaire dans le sérum de ces patients, nous pouvons supposer que le cccDNA détecté provient de la lyse des hépatocytes ou des PBMC. Cependant, nous n'avons décelé du cccDNA que dans les PBMC d'un seul patient.

Les mécanismes régissant la persistance du génome viral et son éventuelle répllication dans les PBMC sont probablement différents en fonction du contexte clinique. Certains auteurs ont rapporté la présence de cccDNA dans les PBMC de patients AgHBs- [190, 246]. Il est possible que les PBMC sélectionnent certaines souches minoritaires peu réplificatives lors de la séroconversion HBs, qui pourraient être à l'origine des infections occultes, ou certains génotypes, qui pourraient influencer sur l'évolution de l'infection.

Nous avons donc choisi d'étudier différents groupes de patients AgHBs- et un plus grand échantillonnage de patients AgHBs+. Afin d'évaluer l'influence des coinfections sur la localisation extra-hépatique du VHB dans les infections B occultes vs chroniques, nous avons constitué des sous-groupes de patients VHC+ et/ou VIH+.

B. Etude de patients présentant différents profils sérologiques d'infection B, et coinfectés ou non par le VHC et/ou le VIH

Dans ce travail, encore non soumis pour publication, nous avons recherché la présence d'une réplication virale dans le sérum et les PBMC de chaque patient. Nous avons également tenté d'analyser le rôle des PBMC dans la sélection de souches virales en déterminant le génotype et en séquençant le génome entier des VHB.

1. Patients et échantillons cliniques

Nous avons analysé les prélèvements de patients hospitalisés au CHU de Limoges entre 2002 et 2005, recrutés en fonction de leurs profils sérologiques VHB, VHC et VIH. Ces patients ont été scindés en 2 groupes principaux selon leur sérologie HBs : 130 patients AgHBs-, qui possèdent soit des anticorps anti-HBc isolés (76 patients, population A), soit des anticorps anti-HBs et anti-HBc (54 patients, population B) constituent le premier groupe, et 54 patients AgHBs+ (population C), classés selon la séroconversion HBe, forment le second groupe. Leur répartition est synthétisée dans le Tableau 2.

Les coinfections sont prouvées par les séropositivités et/ou la détection des ARN du VHC et/ou du VIH (COBAS Amplicor Monitor tests ; Roche Diagnostics, NJ, USA).

Coinfections	Patients AgHBs-			Patients AgHBs+		
	Ac anti-HBc isolés	Ac anti-HBs+ et anti-HBc+	Total	AgHBe+	Ac anti-HBe+	Total
VIH- VHC-	17	8	25	15	22	37
VIH- VHC+	25	10	35	1	6	7
VIH+ VHC-	22	30	52	4	6	10
VIH+ VHC+	12	6	18	0	0	0
Total	76	54	130	20	34	54

Tableau 2 : Répartition des patients dans chaque groupe, selon leur profil sérologique VHB et la présence ou non de coinfections par le VHC et/ou le VIH.

Nous avons recueilli pour chaque patient un échantillon de sérum et un échantillon de sang total sur EDTA pour l'isolement des PBMC.

2. Méthodes

2.1. Détermination du statut sérologique des patients

Les marqueurs sérologiques des infections par le VHB (AgHBs, AgHBe, Ac anti-HBs, anti-HBc, anti-HBe), VHC et VIH ont été recherché par les tests utilisés en routine, les trousse AxSYM (Abbott Diagnostic, IL, USA). Les séropositivités VHC et VIH ont été confirmées par les tests MONOLISA Anti-HCV PLUS v2 (BioRad, France) d'une part, et GENSCREEN HIV 1/2 v2 (BioRad) et HIV Blot v2.2 (Genelabs Diagnostics, Singapour), d'autre part.

2.2. Extraction et quantification de l'ADN du VHB

L'ADN du VHB a été extrait sur 200 µL de sérum, à l'aide de la trousse QIAamp DNA Blood MiniKit (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne). Les PBMC, isolés par gradient de densité à partir du sang total, ont été aliquotés en culots secs d'environ 2×10^6 PBMC, puis l'ADN a été extrait au moyen de la trousse QIAamp DNA MiniKit (Qiagen). Les extraits ont été conservés à +4°C jusqu'à leur utilisation (pendant 5 jours au maximum) puis à -20°C.

L'ADN total et le cccDNA du VHB ont été recherchés et quantifiés par la méthode de PCR en temps réel précédemment décrite (voir article 3).

2.3. Détermination du génotype des VHB

Nous avons mis au point une méthode « maison » de génotypage, qui a fait l'objet d'une présentation (poster) au congrès de la RICAI, en décembre 2004 à Paris (voir annexe II). Cette méthode permet l'identification des génotypes des VHB issus du sérum et des PBMC des patients par analyse de la séquence S couvrant les nucléotides 217 à 682. Cette région est amplifiée par PCR nichée à l'aide des amorces utilisées par Chemin et al. [177] (POL1 : 5' CCT GCT GGT GGC TCC AGT TC 3' ; POR4 : 5' TAC CCA AAG ACA AAA GAA AAT TGG 3' ; ALS5' : 5' GTT GAC AAR AAT CCT CAC AAT AC 3' ; ALS3' : 5' TAG TAA ACT GAG CCA RGA GAA AC 3'). Nous avons remplacé la polymérase TaKaRa Ex Taq (Takara Bio Europe S.A.S., St Germain en Laye, France) utilisée lors de la mise au point par l'Expand High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Allemagne), afin d'améliorer le rendement et la fidélité de l'amplification. Les produits de PCR purifiés ont été séquencés à l'aide du kit Big Dye terminator (Applied Biosystems,

Courtaboeuf, France) (annexe III) et analysés sur séquenceur ABI 3100 (Applied Biosystems). L'identification du génotype a été obtenue par alignement et comparaison des séquences aux séquences de références enregistrées dans la banque de données GenBank, à l'aide des logiciels disponibles sur les sites d'Infobiogen et du NCBI (<http://www.infobiogen.fr> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.4. Amplification et séquençage du génome entier du VHB

L'amplification et le séquençage du génome entier du VHB ont été réalisés selon la méthode décrite par Gunther et al. [275] (voir paragraphe 2.2.1. de l'article 3 ; Figures 24 et 25) mais avec l'enzyme Expand High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics).

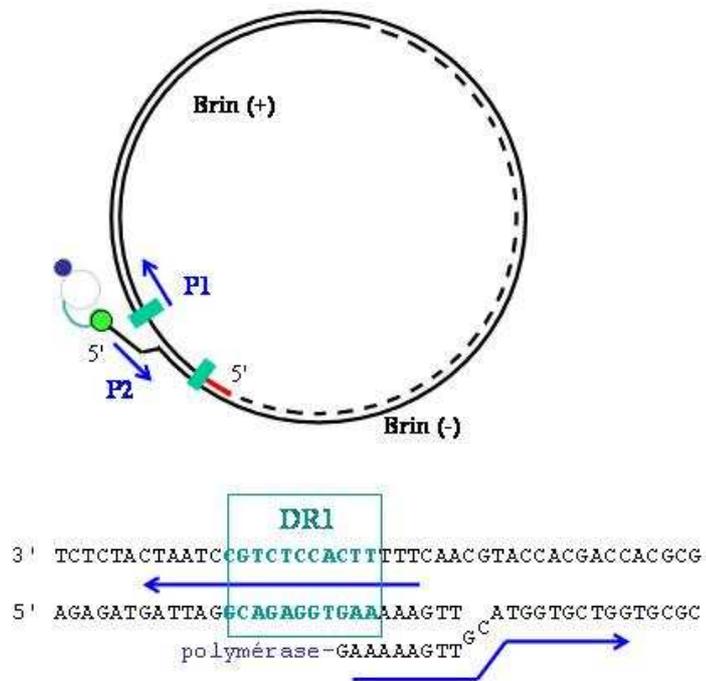


Figure 24 : Principe de la réaction d'amplification du génome entier du VHB : sites de liaison des amorces au niveau du *gap*.

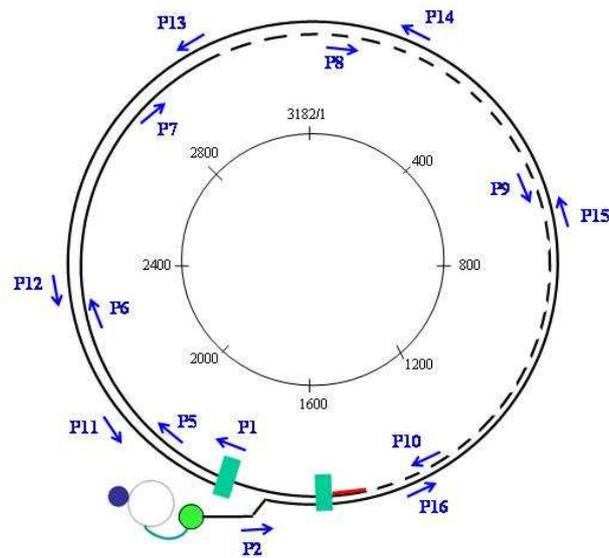


Figure 25 : Localisation des couples d’amorces utilisés pour le séquençage du génome entier du VHB : P1-P11, P5-P12, P6-P13, P7-P14, P8-P15, P9-P16, P10-P2 (les séquences des amorces sont détaillées dans la publication de Gunther et al. [275]).

3. Résultats

3.1. Détection et quantification de l’ADN total dans le sérum et dans les PBMC

3.1.1. Des patients AgHBs+

En toute logique, nous avons observé chez tous les patients AgHBs+, coinfectés ou non par le VIH, une association nette entre le statut HBe et la détection du génome viral. Un seul patient coinfecté par le VHC est AgHBe+, ce qui ne nous permet pas d’établir une telle corrélation chez les patients VHC+ (Tableau 3).

Patients		Sérologies VHB					PBMC		Sérum	
		AgHBs	anti-HBs	anti-HBc	AgHBe	anti-HBe	ADNt (UI/10 ⁶ cellules)	cccDNA (%)	ADNt (UI/mL)	cccDNA (%)
VHC- VIH-	Ca1	+	-	+	+	-	5,14×10 ⁵	-	1,90×10 ⁷	-
	Ca2	+	-	+	+	-	2,58×10 ⁵	-	9,16×10 ⁷	0,07
	Ca3	+	-	+	+	-	4,09×10 ⁴	-	2,34×10 ⁸	0,72
	Ca4	+	-	+	+	-	3,25×10 ⁴	-	9,94×10 ⁷	0,75
	Ca5	+	-	+	+	-	1,30×10 ⁴	-	2,13×10 ⁷	0,21
	Ca6	+	-	+	+	-	1,21×10 ⁴	-	1,05×10 ⁸	1,15
	Ca7	+	-	+	+	-	8,54×10 ³	-	3,37×10 ⁵	-
	Ca8	+	-	+	+	-	6,44×10 ³	-	3,20×10 ⁸	0,27
	Ca9	+	-	+	+	-	1,37×10 ³	-	1,05×10 ⁵	-
	Ca10	+	-	+	+	-	1,36×10 ³	-	5,82×10 ⁴	-
	Ca11	+	-	+	+	-	1,01×10 ³	-	4,37×10 ⁵	-
	Ca12	+	-	+	+	-	460,51	-	1,97×10 ⁵	-
	Ca13	+	-	+	+	-	459,44	-	1,34×10 ⁶	-
	Ca14	+	-	+	+	-	bruit de fond	-	2,47×10 ⁵	-
	Ca15	+	-	+	+	-	-	-	9,74×10 ³	-
	Ca16	+	-	+	-	+	4,33×10 ⁵	0,28	2,28×10 ⁶	1,09
	Ca17	+	-	+	-	+	3,13×10 ⁴	-	1,34×10 ⁸	-
	Ca18	+	-	+	-	+	6,83×10 ³	-	2,00×10 ⁷	0,25
	Ca19	+	-	+	-	+	1,25×10 ³	-	4,41×10 ⁵	-
	Ca20	+	-	+	-	+	672,62	-	9,61×10 ⁶	-
	Ca21	+	-	+	-	+	46,40	-	236,88	-
	Ca22	+	-	+	-	+	bruit de fond	-	3,24×10 ⁶	-
	Ca23	+	-	+	-	+	< SQ	-	352,80	-
	Ca24	+	-	+	-	+	< SQ	-	395,92	-
	Ca25	+	-	+	-	+	< SQ	-	45,08	-
	Ca26	+	-	+	-	+	-	-	570,64	-
	Ca27	+	-	+	-	+	-	-	567,84	-
	Ca28	+	-	+	-	+	-	-	303,07	-
	Ca29	+	-	+	-	+	-	-	468,16	-
	Ca30	+	-	+	-	+	-	-	282,58	-
	Ca31	+	-	+	-	+	-	-	245,84	-
	Ca32	+	-	+	-	+	-	-	70,00	-
	Ca33-Ca34	+	-	+	-	+	-	-	< SQ	-
	Ca35-Ca37	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	VHC+ VIH-	Cb1	+	-	+	+	-	-	-	-
Cb2		+	-	+	-	+	1,33×10 ³	-	8,93×10 ⁴	-
Cb3		+	-	+	-	+	1,42×10 ⁵	-	3,18×10 ⁴	-
Cb4		+	-	+	-	+	-	-	51,74	-
Cb5-Cb7		+	-	+	-	+	-	-	-	-
VHC- VIH+	Cc1	+	-	+	+	-	7,02×10 ⁴	-	8,01×10 ⁷	0,73
	Cc2	+	-	+	+	-	2,06×10 ³	-	4,02×10 ⁷	0,36
	Cc3	+	-	+	+	-	1,01×10 ³	-	4,84×10 ⁷	-
	Cc4	+	-	+	+	-	< SQ	-	2,64×10 ³	-
	Cc5	+	-	+	-	+	162,96	-	-	-
	Cc6	+	-	+	-	+	bruit de fond	-	3,47×10 ⁴	-
	Cc7	+	-	+	-	+	< SQ	-	-	-
	Cc8	+	-	+	-	+	< SQ	-	70,45	-
	Cc9	+	-	+	-	+	-	-	298,48	-
	Cc10	+	-	+	-	+	-	-	136,64	-

Tableau 3 : Détection et quantification de l'ADN total et du cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients AgHBs+. < SQ : < seuil de quantification (i.e. valeur > seuil de détection : 1 copie/réaction soit 0,135 UI/réaction, mais < seuil de quantification : 10 copies/réaction soit 1,35 UI/réaction).

3.1.1.1. Patients AgHBe+ non coinfectés par le VHC

Tous les patients AgHBe+ ont une charge virale sérique quantifiable, comprise entre $2,64 \times 10^3$ et $3,20 \times 10^8$ UI/mL.

L'ADN du VHB a été détecté dans les PBMC de 13/15 (86,7 %) patients VIH-. Ces patients ont une charge virale sérique supérieure à 5×10^4 UI/mL. Une incertitude subsiste quant à la présence de l'ADN du VHB dans les PBMC du patient Ca14 ayant une charge virale sérique supérieure à 10^5 UI/mL : la quantité d'ADN détectée s'apparente au bruit de fond.

L'ADN du VHB a été détecté dans les PBMC de tous les patients VIH+ mais n'est quantifiable par notre PCR en temps réel que chez les 3 patients ayant environ 10^7 UI d'ADN/mL de sérum.

Il faut noter que la concentration d'ADN dans les PBMC n'est pas strictement proportionnelle à la virémie.

3.1.1.2. Patients Ac anti-HBe+ non coinfectés par le VHC

Après la séroconversion HBe, le génome du VHB est moins souvent détecté dans le sérum comme dans les PBMC, et à des concentrations plus faibles.

L'ADN du VHB est détecté dans le sérum de 19/22 patients VIH- et de 4/6 patients VIH+.

La charge virale sérique est inférieure à 10^3 UI/mL chez 13/19 (68,4 %) patients VIH- et chez 3/4 (75 %) patients VIH+.

L'ADN du VHB est quantifiable dans les PBMC de seulement 6/22 (27,3 %) patients VIH- et 1/6 (16,7 %) patients VIH+.

Pour 7 patients (4 patients VIH- : Ca22 à Ca25 et 3 patients VIH+ : Cc6 à Cc8), la concentration de l'ADN dans les PBMC est inférieure au seuil de quantification ou est identifiable au bruit de fond, ce qui ne nous permet pas d'éliminer leur positivité.

Notons que la quantité d'ADN ne semble pas être directement corrélée à la charge virale sérique.

3.1.1.3. Patients coinfectés par le VHC

Le génome viral a été détecté dans le sérum de 3/7 patients et dans les PBMC des 2 patients dont la charge virale sérique est supérieure à 10^4 UI/mL (Tableau 3).

3.1.2. Des patients AgHBs-

Globalement, les résultats obtenus pour les patients présentant des Ac anti-HBc isolés et pour les patients présentant des Ac anti-HBs et anti-HBc sont similaires.

Deux catégories de patients peuvent être distinguées : les patients non coinfectés par le VIH, pour lesquels le génome viral est peu détecté dans le sérum mais fréquemment détecté dans les PBMC, et les patients VIH+, pour lesquels l'ADN du VHB est fréquemment détecté dans le sérum mais peu dans les PBMC (Tableau 4 et 5 ; Figure 26).

3.1.2.1. Patients non coinfectés par le VIH

✓ Patients présentant des Ac anti-HBc isolés (Tableau 4 et Figure 26) :

L'ADN du VHB est positif dans le sérum de seulement 1/17 (5,9 %) patients VHC- et 3/25 (12 %) patients VHC+, à des valeurs inférieures à 600 UI/mL.

En revanche, l'ADN du VHB est quantifiable dans les PBMC de 11/17 (64,7 %) patients VHC- et de 12/25 (48 %) patients VHC+.

✓ Patients possédant à la fois des Ac anti-HBs et des Ac anti-HBc (Tableau 5 et Figure 26) :

Le génome viral est détecté chez 2/8 patients VHC- et 6/10 patients VHC+. La charge virale sérique est inférieure à 200 UI/mL et est même en dessous du seuil de quantification chez la majorité des patients, i.e. chez: 6/8 (75 %) patients.

L'ADN du VHB est quantifiable dans les PBMC d'environ la moitié des patients : 3/8 patients VHC- et 3/10 patients VHC+.

Patients		Sérologies VHB			PBMC		Sérum	
		AgHBs	anti-HBs	anti-HBc	ADNt (UI/10 ⁶ cellules)	cccDNA (%)	ADNt (UI/mL)	cccDNA (%)
VIH- VHC-	Aa1	-	-	+	8,96×10 ³	-	-	-
	Aa2	-	-	+	2,57×10 ³	-	-	-
	Aa3	-	-	+	726,68	-	-	-
	Aa4	-	-	+	644,28	-	-	-
	Aa5	-	-	+	607,92	-	539,17	-
	Aa6	-	-	+	397,32	-	-	-
	Aa7	-	-	+	293,40	-	-	-
	Aa8	-	-	+	164,61	-	-	-
	Aa9	-	-	+	162,86	-	-	-
	Aa10	-	-	+	86,80	-	-	-
	Aa11	-	-	+	3,37	-	-	-
	Aa12	-	-	+	< SQ	-	-	-
	Aa13-Aa17	-	-	+	-	-	-	-
VIH- VHC+	Ab1	-	-	+	1,68×10 ³	-	424,37	-
	Ab2	-	-	+	614,28	-	-	-
	Ab3	-	-	+	361,16	-	-	-
	Ab4	-	-	+	305,97	-	-	-
	Ab5	-	-	+	272,84	-	-	-
	Ab6	-	-	+	239,76	-	-	-
	Ab7	-	-	+	103,94	-	59,36	-
	Ab8	-	-	+	53,77	-	-	-
	Ab9	-	-	+	49,27	-	-	-
	Ab10	-	-	+	26,73	-	-	-
	Ab11	-	-	+	16,45	-	-	-
	Ab12	-	-	+	7,24	-	< SQ	-
	Ab13-Ab14	-	-	+	< SQ	-	-	-
Ab15-Ab25	-	-	+	-	-	-	-	
VIH+ VHC-	Ac1	-	-	+	15,32	-	-	-
	Ac2	-	-	+	< SQ	-	4,36×10 ³	79,27
	Ac3	-	-	+	< SQ	-	216,72	-
	Ac4	-	-	+	< SQ	-	1,01×10 ³	-
	Ac5-Ac6	-	-	+	< SQ	-	< SQ	-
	Ac7-Ac11	-	-	+	< SQ	-	-	-
	Ac12	-	-	+	-	-	1,78×10 ³	100
	Ac13	-	-	+	-	-	1,50×10 ³	100
	Ac14	-	-	+	-	-	786,80	100
	Ac15-Ac16	-	-	+	-	-	< SQ	-
Ac17-Ac22	-	-	+	-	-	-	-	
VIH+ VHC+	Ad1	-	-	+	< SQ	-	2,35×10 ³	-
	Ad2	-	-	+	-	-	1,78×10 ⁴	100
	Ad3	-	-	+	-	-	1,66×10 ³	100
	Ad4	-	-	+	-	-	152,60	-
	Ad5	-	-	+	-	-	< SQ	-
	Ad6-Ad12	-	-	+	-	-	-	-

Tableau 4 : Détection et quantification de l'ADN total et du cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients présentant des Ac anti-HBc isolés. < SQ : < seuil de quantification.

Patients		Sérologies VHB			PBMC		Sérum	
		AgHBs	anti-HBs	anti-HBc	ADNt (UI/10 ⁶ cellules)	cccDNA (%)	ADNt (UI/mL)	cccDNA (%)
VIH- VHC-	Ba1	-	+	+	833,73	-	-	-
	Ba2	-	+	+	205,10	-	-	-
	Ba3	-	+	+	24,32	-	-	-
	Ba4	-	+	+	-	-	64,82	-
	Ba5	-	+	+	-	-	< SQ	-
	Ba6-Ba8	-	+	+	-	-	-	-
VIH- VHC+	Bb1	-	+	+	4,60×10 ⁴	-	< SQ	-
	Bb2	-	+	+	36,37	-	138,32	-
	Bb3	-	+	+	14,95	-	< SQ	-
	Bb4	-	+	+	< SQ	-	< SQ	-
	Bb5	-	+	+	< SQ	-	-	-
	Bb6-Bb7	-	+	+	-	-	< SQ	-
	Bb8-Bb10	-	+	+	-	-	-	-
VIH+ VHC-	Bc1	-	+	+	201,38	-	-	-
	Bc2	-	+	+	55,45	-	-	-
	Bc3	-	+	+	13,15	-	-	-
	Bc4	-	+	+	< SQ	-	389,20	-
	Bc5-Bc11	-	+	+	< SQ	-	< SQ	-
	Bc12-Bc15	-	+	+	< SQ	-	-	-
	Bc16	-	+	+	-	-	6,54×10 ³	-
	Bc17	-	+	+	-	-	688,80	-
	Bc18	-	+	+	-	-	133,28	-
	Bc19	-	+	+	-	-	473,20	-
	Bc20	-	+	+	-	-	79,52	-
	Bc21	-	+	+	-	-	< SQ	-
	Bc22-Bc30	-	+	+	-	-	-	-
VIH+ VHC+	Bd1	-	+	+	18,13	-	-	-
	Bd2	-	+	+	< SQ	-	< SQ	-
	Bd3	-	+	+	-	-	76,72	-
	Bd4	-	+	+	-	-	< SQ	-
	Bd5-Bd6	-	+	+	-	-	-	-

Tableau 5 : Détection et quantification de l'ADN total et du cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients présentant des Ac anti-HBs et anti-HBc. < SQ : < seuil de quantification.

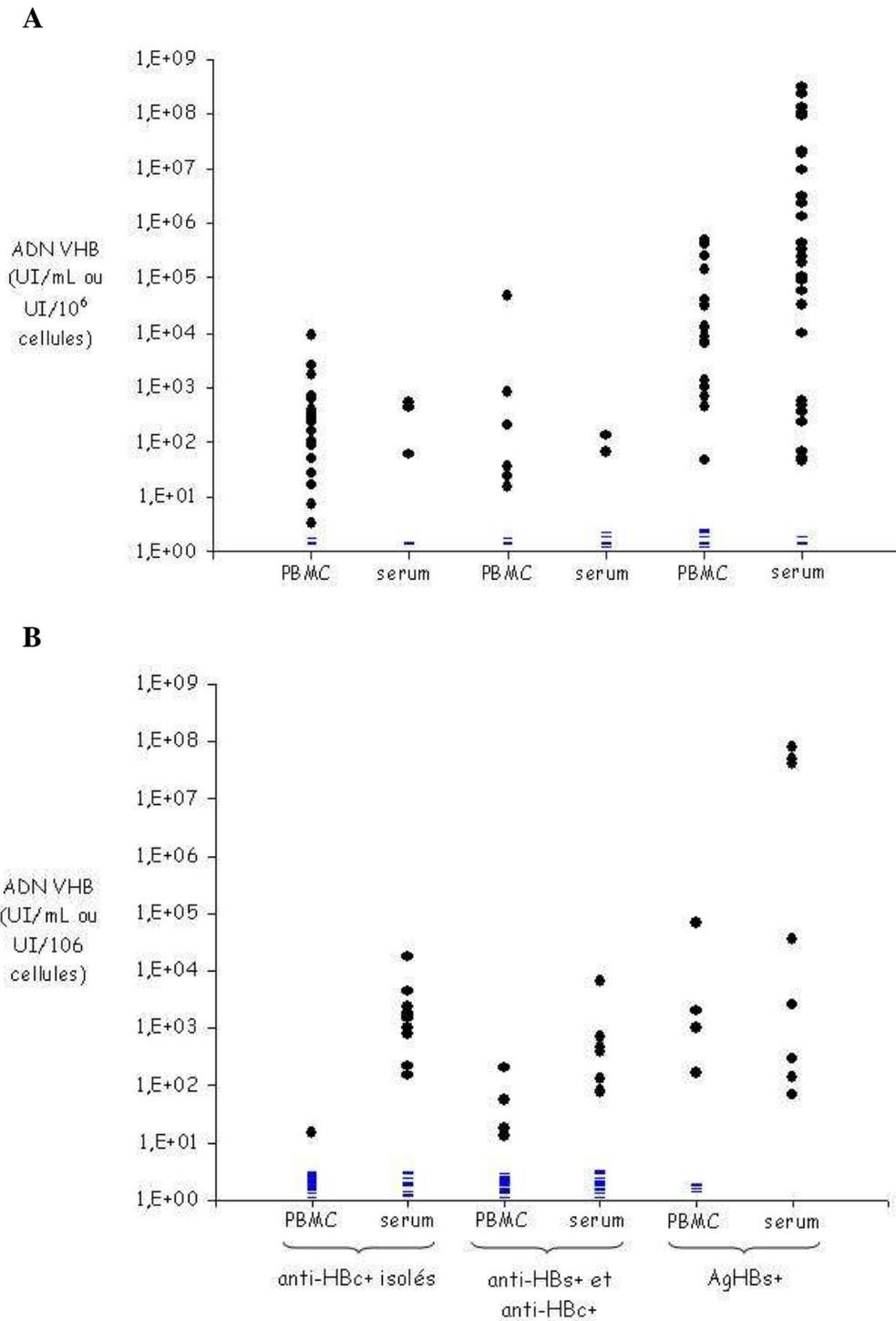


Figure 26 : Répartition des charges virales mesurées dans le sérum et dans les PBMC des patients VIH- (A) et VIH+ (B), selon leurs profils sérologiques. Les concentrations d'ADN en dessous du seuil de quantification apparaissent en bleu.

3.1.2.2. Patients coinfectés par le VIH

✓ Patients présentant des Ac anti-HBc isolés (Tableau 4 et Figure 26) :

L'ADN du VHB est détecté dans le sérum de 10/22 (45,5 %) patients VHC- et 5/12 (41,7 %) patients VHC+. La virémie est cependant faible ($\leq 10^4$ UI/mL).

Un seul patient (patient Ac1) présente une charge virale supérieure au seuil de quantification dans ses PBMC.

✓ Patients possédant à la fois des Ac anti-HBs et des Ac anti-HBc (Tableau 5 et Figure 26) :

De même, le génome viral est détecté dans le sérum de 14/30 (46,7 %) patients VHC- et 3/6 (50 %) patients VHC+, à des concentrations inférieures à 10^4 UI/mL.

L'ADN du VHB est quantifiable dans les PBMC de seulement 4/36 patients (Bc1 à Bc3).

3.2. Détection et quantification du cccDNA dans le sérum et dans les PBMC

3.2.1. Des patients AgHBs+

Nous avons détecté du cccDNA dans le sérum de certains patients AgHBs+ non coinfectés par le VHC. La présence de cccDNA semble liée au statut sérologique HBe (Tableau 3).

3.2.1.1. Patients AgHBe+ non coinfectés par le VHC

Du cccDNA est détecté dans le sérum de 6/15 patients VIH- et 2/4 patients VIH+ virémiques. Cette forme répliquative est minoritaire : elle représente moins de 1,2 % de l'ADN total.

Aucun échantillon de PBMC n'est trouvé positif en cccDNA.

3.2.1.2. Patients Ac anti-HBe+ non coinfectés par le VHC

Une faible quantité de cccDNA est détecté dans le sérum de 2 des 19 patients VIH- positifs en ADN total.

Seul un patient (patient Ca16) présente du cccDNA dans ses PBMC, correspondant à 0,28 % de l'ADN total détecté.

3.2.1.3. Patients coinfectés par le VHC

Aucun patient n'a de cccDNA dans son sérum ni dans ses PBMC.

3.2.2. Des patients AgHBs-

3.2.2.1. Patients non coinfectés par le VIH

Nous n'avons détecté de cccDNA ni dans le sérum ni dans les PBMC des patients ayant des Ac anti-HBc isolés ou ayant des Ac anti-HBs et anti-HBc (Tableaux 4 et 5).

3.2.2.2. Patients coinfectés par le VIH

Aucun patient possédant des Ac anti-HBs et anti-HBc n'a de cccDNA dans son sérum ni dans ses PBMC.

Du cccDNA est retrouvé dans le sérum de 4/10 patients VHC- et 2/5 patients VHC+ présentant des Ac anti-HBc isolés et positifs pour la détection de l'ADN total.

La présence de cccDNA ne semble pas être directement corrélée à la concentration d'ADNt sérique. Quand il est présent, le cccDNA représente la forme majoritaire de l'ADN total détecté (Tableau 4).

3.3. Analyse de la séquence et des génotypes des souches sériques et des souches isolées des PBMC

Malgré de nombreux essais d'optimisation, et notamment d'amélioration de la sensibilité de la PCR, nous n'avons pas réussi à obtenir la séquence entière des isolats issus des PBMC des patients.

De même, en raison du seuil de sensibilité de la PCR spécifique de la région S (environ 50 UI/mL), certaines souches virales, et en particulier les souches isolées des PBMC, n'ont pu être génotypées. De fait, nous avons identifié le génotype de 40 isolats sériques et de 24 isolats issus des PBMC de patients AgHBs+ ; et de 12 isolats sériques et 8 isolats issus des PBMC de patients AgHBs-. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Nous avons pu comparer les génotypes dans les deux compartiments chez seulement 25 patients (1 seul patient AgHBs- et 24 patients AgHBs+). Dans tous les cas, nous avons

observé que les souches issues du sérum et celles issues des PBMC correspondants chez un même patient appartenaient au même génotype.

	Patients AgHBs+		Patients AgHBs-	
	PBMC	sérum	PBMC	sérum
ADN total +	25	43	34	22
Génotypes				
A (%)	7 (28)	14 (32,5)	3 (8,8)	8 (36,4)
B (%)	2 (8)	2 (4,7)	1 (2,9)	3 (13,6)
C (%)	3 (12)	3 (7)	0 (0)	1 (4,5)
D (%)	6 (24)	12 (27,9)	2 (5,9)	0 (0)
E (%)	6 (24)	9 (20,9)	2 (5,9)	2 (9,1)
nd (%)	1 (4)	3 (7)	26 (76,5)	8 (36,4)

Tableau 6 : Génotypes des souches de VHB isolées à partir des PBMC et des sérums des patients étudiés. *nd* : non déterminé.

4. Discussion

Si la présence du génome du VHB dans les PBMC de patients AgHBs+ ou AgHBs- est à ce jour démontrée dans de nombreuses études, l'existence de formes répliquatives virales, et en particulier du cccDNA, dans les PBMC des patients AgHBs- est encore très controversée. Les récents travaux de Michalak et al. [276] sur les infections B occultes induites chez la marmotte soulignent le rôle particulier des PBMC : au cours de la primo-infection occulte, induite par l'administration intraveineuse de 10^3 virions au plus, la sérologie est négative, les PBMC et les organes lymphoïdes sont infectés mais pas le foie ; lors de l'infection occulte secondaire à une hépatite aiguë, induite par une dose supérieure à 10^3 virions, sont observées une production d'anticorps et une réplication virale dans les organes lymphoïdes, les PBMC et le foie.

Dans notre étude, nous avons analysé les PBMC et le sérum de patients AgHBs- vs AgHBs+, afin de comprendre si les PBMC pouvaient effectivement constituer un réservoir de multiplication virale, et donc être à l'origine du cccDNA relargué dans le sérum de certains patients. Comme les interactions avec d'autres virus peuvent influencer sur l'évolution de l'infection B, nous avons également analysé l'impact des coinfections par le VHC et/ou le

VIH sur la présence de l'ADN du VHB dans les PBMC et son éventuelle réplication dans ces cellules.

4.1. Détection de l'ADN du VHB dans les PBMC des patients monoïnfectés

4.1.1. Patients AgHBs+

Nous avons observé la présence de l'ADN du VHB dans les PBMC de 86,7 % des patients AgHBs+ avec un profil d'AgHBe positif. Dans la majorité des cas, le génome viral n'est détecté dans les PBMC que lorsque la charge virale sérique dépasse un certain seuil, environ 10^4 UI/mL, mais la quantité d'ADN dans les PBMC n'est pas strictement proportionnelle à la virémie.

Après la séroconversion HBe, la fréquence de détection de l'ADN dans les PBMC diminue. Le génome viral est surtout détecté dans les PBMC de patients ayant une forte charge virale sérique, mais pas toujours ; ainsi, il a également été quantifié chez un patient peu virémique. Ceci pourrait refléter la fluctuation de la détection de l'ADN du VHB dans les deux compartiments au cours de l'évolution des infections chroniques.

Plusieurs patients AgHBs+ présentent des traces de cccDNA dans leur sérum. Ce résultat confirme ceux de notre étude préliminaire menée sur 12 patients AgHBs+ (voir article 3) et démontre l'existence d'un réservoir de multiplication virale quelque part dans l'organisme, qui relargue des formes répliquatives dans le sérum. Un seul échantillon de PBMC, isolés d'un patient ayant des Ac anti-HBe, contient du cccDNA, en très faible quantité (0,28 % de l'ADN total). L'absence de détection du cccDNA dans les PBMC des patients AgHBs+ tend à prouver que, chez ces patients, les PBMC ne constituent pas un site de réplication virale et que les traces de cccDNA détectées dans le sérum de certains patients AgHBs+ ne proviennent pas de leur lyse.

4.1.2. Patients AgHBs-

Ces patients ont peu ou pas d'ADN du VHB dans leur sérum, mais 56 % d'entre eux ont de l'ADN total dans leurs PBMC. L'absence de détection ou les très faibles concentrations de l'ADN du VHB dans le sérum permettent d'éliminer une contamination des PBMC par l'ADN circulant : le génome viral détecté dans les PBMC ne provient pas de virus adsorbés à la surface des cellules.

D'autres auteurs [190, 246, 272] décrivent la présence d'ADN dans les PBMC de patients AgHBs- (Tableau 7).

Etudes	Nombre de patients positifs		
	ADN total dans le sérum	ADN total dans les PBMC	cccDNA dans les PBMC
Umeda et al. [272]	0/21	3/21	0/21
Torii et al. [246]	0/10	5/10	2/10
Cabrerizo et al. [190]	19/19 CV moyenne = $1,26 \times 10^6$ copies/mL	19/19 CV moyenne = $1,42 \times 10^4$ copies/ μ g d'ADN cellulaire	9/19
notre étude (patients monoïnfectés)	3/25 CV < 600 UI/mL	15/25 CV moyenne = 842 UI/ 10^6 cellules	0/25

Tableau 7 : Comparaison des résultats de la recherche de l'ADN du VHB dans les compartiments sérique et leucocytaire de patients AgHBs- de notre étude à ceux d'études antérieures. CV : charge virale.

Parmi eux, Umeda et al. [272] ont récemment étudié 21 donneurs vivants de tissu hépatique AgHBs- sans virémie détectable par PCR nichée. Seulement 14,3 % (3/21) des patients ont de l'ADN du VHB dans leurs PBMC, ce qui est nettement inférieur au pourcentage observé dans notre étude. Cependant, seuls les échantillons amplifiés dans plus de 2 régions différentes ont été considérés comme positifs et la sensibilité de leur PCR n'est pas indiquée.

Dans l'étude de Torii et al. [246], les échantillons de PBMC de la moitié des patients AgHBs- (guéris d'une hépatite aiguë) contiennent de l'ADN viral. Les charges virales sériques des patients sont indétectables par la méthode de *transcription-mediated amplification* (TMA). Or le seuil de détection de cette technique, $3,7 \log_{10}$ geq/mL ou 5×10^3 copies/mL, est supérieur à la concentration d'ADN habituellement détectée dans le sérum des patients AgHBs- : les concentrations sériques dans notre étude sont inférieures à 600 UI/mL, soit environ 4×10^3 copies/mL, et des études antérieures [221, 265, 277, 278] montrent que la concentration d'ADN viral détecté dans le sérum n'excède pas 10^3 copies de génome/mL. Il est fort probable qu'au moins 9/10 patients de Torii et al., pour lesquels le génotype du VHB a été déterminé par PCR-RFLP, soient en fait faiblement virémiques.

Les 19 patients AgHBs- (11 patients hémodialysés et 8 membres du personnel de l'unité de dialyse) étudiés par Cabrerizo et al. [190] ont tous de l'ADN viral dans leurs PBMC, mais sont également tous virémiques, avec des charges virales comprises entre

$4,3 \times 10^2$ et $2,2 \times 10^7$ copies/mL, par le test COBAS Amplicor HBV Monitor. On peut s'interroger sur ces fortes concentrations sériques, au vu de nos résultats et ceux d'autres études sus-citées. Il n'est pas exclu que l'ADN détecté dans les PBMC des patients provienne de l'adsorption de virions à la surface des cellules.

Dans notre étude, aucun échantillon de PBMC ne contient de cccDNA détectable. Nos résultats diffèrent notamment de ceux de Cabrerizo et al. qui observent du cccDNA dans le PBMC de la moitié de leurs patients. Une première explication est la différence de méthodologie entre nos études, en particulier l'utilisation d'enzymes permettant la digestion des formes relachées de l'ADN viral : il est possible que Cabrerizo et al. du cccDNA par manque de spécificité de leur technique.

Une deuxième explication est la différence de sensibilité des méthodes utilisées pour la détection du cccDNA. En effet, dans le modèle de la marmotte développé par Michalak et al. [276] le cccDNA présent dans les PBMC et les organes lymphoïdes n'a été détectée que grâce à une méthode de PCR-hybridation très sensible, et cependant dix fois moins sensible que leur technique de détection de l'ADN total. Lors de la mise au point de notre technique de quantification, nous avons établi la sensibilité de la PCR ADN total. Or le produit de PCR ADN total est plus court que le fragment amplifié par les amorces cccDNA, il est donc possible que la PCR cccDNA soit moins sensible que la PCR ADN total, et moins sensible que les méthodes utilisées par Torii et al. et Cabrerizo et al.

4.2. Influence des coinfections sur la détection de l'ADN du VHB

4.2.1. Coinfection par le VIH

L'analyse du rôle des coinfections par le VIH est limitée du fait de notre faible échantillonnage. Il apparaît cependant que nos conclusions concernant les patients AgHBs+ mono-infectés restent valables pour les patients VIH+.

L'influence de la coinfection par le VIH sur la détection de l'ADN du VHB est en revanche très nette chez les patients AgHBs-, en particulier chez les patients ayant des Ac anti-HBc isolés : alors que le génome du VHB est détecté dans le sérum de seulement 16 % des patients VIH-, à des valeurs inférieures à 550 UI/mL, 44 % des patients VIH+ sont virémiques, avec des charges virales souvent supérieures à 10^3 UI/mL. Chez ces patients, le cccDNA représente plus de 75 % de l'ADN total détecté. Les concentrations de cccDNA laissent supposer une lyse cellulaire non négligeable des réservoirs de multiplication ou une

réplication virale importante dans ces réservoirs ; la concentration de l'ADN cellulaire dans le sérum (évaluée par la quantification de l'albumine : environ 10 à 100 copies/mL) ne tend pas à confirmer l'hypothèse d'une importante lyse cellulaire. Il est clair que la physiopathologie des infections B occultes chez les patients VIH+ est très différente de celle des patients VIH-. Bien que nous n'ayons pas connaissance des taux de TCD₄⁺ de nos patients VIH+, nous pouvons supposer que, comme pour le patient triinfecté précédemment étudié (voir article 2 [279]), le maintien de la réplication du VHB soit lié à une réponse immune plus inadaptée qu'altérée, qui ne parvient pas à contrôler totalement l'infection B.

4.2.2. Coinfection par le VHC

Trop peu de patients AgHBs+, en particulier de patients AgHBe+, coinfectés par le VHC ont été inclus dans notre étude pour nous permettre d'évaluer l'influence de la coinfection par le VHC sur la détection de l'ADN du VHB.

Chez les patients AgHBs-, la persistance du génome viral dans le sérum est plus fréquemment observée lorsque ces patients sont coinfectés par le VHC ; cette observation va bien dans le sens de l'inhibition de la réplication et l'expression des gènes du VHB par la protéine de core du VHC montrée par certains auteurs [241-243]. La différence de détection de l'ADN du VHB (VHC+ vs VHC-) est plus marquée chez les patients ayant des Ac anti-HBs et anti-HBc (60 % vs 25 %) que chez les patients ayant des Ac anti-HBc isolés (12 % vs 5,9 %). Nos résultats divergent donc de ceux de Drosten et al. [280] et Noborg et al. [278] qui n'ont pas retrouvé d'association entre la présence d'Ac anti-HBs et la détection de l'ADN viral chez les patients AgHBs-. Cependant, notre échantillonnage est trop faible pour pouvoir conclure à une différence significative entre nos groupes de patients VHC+ et VHC-.

A noter que la présence de l'ADN viral dans les PBMC des patients AgHBs- ne semble pas être influencée par la coinfection par le VHC : la quantification de l'ADN du VHB dans les PBMC a été possible pour 56 % de patients VHC- vs 43 % de patients VHC+.

4.3. Rôle des PBMC dans la sélection de souches virales

4.3.1. Sélection de souches mutées ?

L'absence de détection du cccDNA dans les PBMC pourrait être expliquée par un défaut de sensibilité de la PCR, dans le cas où les PBMC sélectionneraient des souches de VHB à très faible pouvoir répliatif. Les données actuelles sur le rôle des mutations dans les infections B occultes étant controversées, nous avons tenté d'analyser la totalité du génome

des souches issues des PBMC des patients AgHBs-. L'intérêt était de déceler toute mutation susceptible d'interagir avec le cycle viral, telles les mutations dans la protéine de surface, les régions promotrices S ou C, la polymérase, qui peuvent inhiber l'entrée du virus dans la cellule, son externalisation, ou sa réplication. Cependant, nous n'avons pas réussi à amplifier l'intégralité du génome des VHB. Notons qu'il est difficile d'obtenir la séquence complète de l'ADN du VHB, probablement du fait d'un défaut de fixation des amorces P1-P2, lié ou non à un superenroulement du génome viral, et que les trop faibles quantités d'ADN présentes dans les PBMC des patients AgHBs- constituent un obstacle à l'amplification du génome entier.

Deux études ont montré que les délétions dans la région préS1 ne semblent pas associées au profil d'AgHBs- [266, 281]. Mais récemment Sengupta et al.[282] ont suggéré que les mutations dans les promoteurs préS1 et S entraînaient un accroissement du ratio protéine L/protéine S, un défaut de sécrétion et une agrégation de l'AgHBs, supposés être à l'origine des infections occultes. Pour Lin et al. [281], les mutations dans la région préC/C ne sont pas fréquemment retrouvées lors des infections B occultes et ne contribuent donc pas à la persistance du VHB. En revanche, Kao et al. [266] ont observé une double mutation dans une région essentielle pour la régulation de la transcription (nt 1770 à 1808, dans l'ORF C) chez 8/10 patients AgHBs- et seulement 2/20 contrôles AgHBs+. L'impact de ces mutations reste à définir.

4.3.2. Sélection de certains génotypes du VHB ?

En parallèle, et toujours afin de comprendre le rôle joué par les PBMC dans la persistance virale, nous avons analysé la variabilité génotypique des virus présent dans les PBMC des patients AgHBs-.

Il est en effet possible que les PBMC sélectionnent certains génotypes du VHB, dont l'influence sur l'évolution des infections B est encore méconnue. Nous avons précédemment suggéré l'implication des génotypes A et D dans la réactivation virale observée chez un patient présentant initialement des Ac anti-HBc isolés et triinfecté par le VHB, le VHC et le VIH. Lo et al. [283] ont montré que la fréquence de détection de l'ADN du VHB chez les patients AgHBs- variait selon les zones géographiques, suggérant un lien entre la variabilité génomique et la prévalence d'infections B occultes. Par ailleurs, Weinberger et al. [60] ont montré une corrélation entre génotype D et profil d'Ac anti-HBc isolés et Sanchez-Tapias et al. [284] ont rapporté une négativation de l'ADN du VHB et une clairance de l'AgHBs plus fréquentes dans les infections par un génotype A que par un génotype D ou F.

L'étude de l'influence des génotypes n'est pas évidente puisque souvent biaisée par la prédominance de certains génotypes dans les régions étudiées. Toutefois, les observations de Torii et al. [246] sont en faveur d'une possible implication du génotype A, pourtant très minoritaire au Japon, dans les hépatites B occultes : alors que des VHB de génotype C sont identifiés chez 78,6 % des patients AgHBs+, 50 % des patients AgHBs- sont infectés par des VHB de génotype A. Parmi eux se trouvent les 2 patients pour lesquels du cccDNA a été détecté dans les PBMC.

Dans notre étude, les virus isolés chez nos patients AgHBs- non coinfectés par le VIH appartiennent à des génotypes très divers, de même que ceux isolés chez nos patients AgHBs+. Cependant, nous n'avons pu comparer les génotypes dans les PBMC et dans le sérum que chez 25 patients. Il y avait toujours identité entre les deux sites. En outre, la plupart des génotypes ont été identifiés chez des patients issus de l'immigration et infectés par des virus de génotype B, C ou E. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une telle association entre génotype A et présence d'ADN dans les PBMC des patients AgHBs-.

4.4. Conclusion

La forme répliquative du VHB (cccDNA) n'a été détectée que dans les PBMC d'un seul patient AgHBs+ et Ac anti-HBe+, suggérant que le virus peut être présent dans les PBMC sans s'y répliquer. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'absence de cccDNA dans les PBMC des patients étudiés soit due à un défaut de sensibilité de notre PCR. Il est également possible que la charge virale et la quantité de cccDNA dans les PBMC fluctuent au cours de l'infection, décroissant épisodiquement à des titres non détectables par notre technique.

Par ailleurs, la présence de l'ADN du VHB dans les PBMC diffère selon le statut sérologique HBs et HBe. Nous pouvons supposer que la physiopathologie de l'infection des PBMC par le VHB dépend de l'évolution de l'infection B.

Nous avons souhaité étudier séquentiellement des porteurs chroniques du VHB traités, susceptibles d'éliminer l'AgHBs, afin de déterminer si les PBMC constituent un réservoir de virus passif ou dynamique, en d'autres termes, si l'évolution de la charge virale dans les PBMC dépend ou non de celle dans le sérum. A ce jour, ces travaux ne sont pas soumis pour publication.

C. Recherche et évolution de l'ADN total et du cccDNA dans les PBMC de porteurs chroniques de l'AgHBs

1. Patients et méthodes

Huit patients porteurs chroniques de l'AgHBs suivis sur une période d'environ 2 ans et pour lesquels des prélèvements séquentiels de sérum et PBMC étaient disponibles ont été inclus dans cette étude.

Excepté le patient Cb2 qui est VHC+, ces patients ne sont pas coïnfectés par le VIH ni par le VHC. Cinq d'entre eux sont AgHBe+ : patients Ca5, Ca7, Ca8, Ca14, Ca15 et trois possèdent des Ac anti-HBe : patients Ca18, Ca29, Cb2.

Tous ces patients ont été traités en fonction de la charge virale initiale, de la gravité des lésions hépatiques, de la tolérance et de la réponse au traitement.

Le Tableau 8 regroupe les sérologies, le niveau des transaminases et le traitement administré à chaque patient.

Après extraction (QIAamp DNA Blood MiniKit et QIAamp DNA MiniKit ; Qiagen), l'ADN total et le cccDNA ont été recherché et quantifié dans chaque échantillon de sérum et de PBMC comme décrit précédemment (voir article 3).

Patients	Sérologies					ALT	Traitement	
	Ag HBe	Ac anti-HBe	VHD	VHC	VIH			
Ca14	+	-	-	-	-	1,2N	IFN	début du suivi
	+	-	-	-	-	1,4N	lamivudine	
	+	-	-	-	-	1,1N	lamivudine + adéfovir	
	+	-	-	-	-	0,9N	adéfovir	
	+	-	-	-	-	0,5N	lamivudine + adéfovir	
Ca15	+	-	-	-	-	N	IFN	diagnostic de CHC début du suivi
	+	-	-	-	-	1,8N	lamivudine	
	+	-	-	-	-	N	adéfovir	
	+	-	-	-	-	0,6N	lamivudine + adéfovir	
Ca8	+	-	-	-	-	1,5N	lamivudine	début du suivi
	+	-	-	-	-	2,5N	arrêt du traitement	
Ca5	+	-	-	-	-	N	lamivudine	début du suivi
	+	-	-	-	-	0,9N	lamivudine + pegIFN	
	+	-	-	-	-	N	lamivudine	
	+	-	-	-	-	1,5N	lamivudine + adéfovir	
Ca7	+	-	-	-	-	N	adéfovir	début du suivi
Ca29	-	+	+	-	-	0,5N	IFN	début du suivi
	-	+	+	-	-	0,3N	lamivudine	
	-	+	+	-	-	0,3N	lamivudine + adéfovir	
	-	+	+	-	-	0,3N	adéfovir	
Ca18	-	+	-	-	-	N	IFN	début du suivi problème d'observance
	-	+	-	-	-	2N	lamivudine	
	-	+	-	-	-	N	lamivudine + adéfovir	
	-	+	-	-	-	2N	lamivudine + adéfovir	
Cb2	-	+	-	+	-		IFN + ribavirine	début du suivi
	-	+	-	+	-	6N	lamivudine	
	-	+	-	+	-	4N	lamivudine + adéfovir	
	-	+	-	+	-	4N	pegIFN + ribavirine	

Tableau 8 : Marqueurs sérologiques viraux, biochimiques et traitement des patients AgHBs+ étudiés. *ALT* : alanine aminotransférase ; *N* = 50 UI/L.

2. Résultats

Nous tenons d'abord à préciser que l'objectif de notre étude était simplement de comprendre comment fluctue la concentration de l'ADN du VHB dans les PBMC des patients AgHBs+, en fonction de la charge virale sérique. Nous n'avons pas cherché à analyser l'influence du traitement sur l'évolution de la concentration d'ADN du VHB dans les PBMC. Ce point fait l'objet d'une étude actuellement en cours au laboratoire de virologie du CHU de Limoges sur une population homogène de patients AgHBs+ sous traitement séquentiel par adéfovir et interféron.

Pour tous les patients, les mutations d'échappement au traitement à la lamivudine et/ou à l'adéfovir ont été recherchées à chaque pic de la charge virale sérique. Aucune mutation n'a été observée.

Les résultats pour chaque patient sont présentés sous forme de graphiques, dans les Figures 27 et 28.

3.1. Patients AgHBe+

Chez ces 5 patients, les concentrations d'ADN dans les PBMC et dans le sérum semblent évoluer parallèlement (Figure 27) :

✓ pour les patients Ca5, Ca8 et Ca15, l'ADN du VHB est détecté dans les PBMC quand la charge virale sérique est supérieure à environ 10^4 UI/mL.

✓ pour le patient Ca14, qui n'a pas correctement suivi son traitement, le génome viral est détecté dans les PBMC lorsque l'ADN sérique re-augmente à des titres de l'ordre de 10^5 à 10^6 UI/mL. Cependant, il existe un délai entre les accroissements des charges virales dans le sérum et dans les PBMC.

✓ le patient Ca7 présente de faibles quantités d'ADN du VHB dans ses PBMC (2 sont même en dessous du seuil de quantification), lorsque les concentrations sériques évoluent entre 10^3 et 10^4 UI/mL.

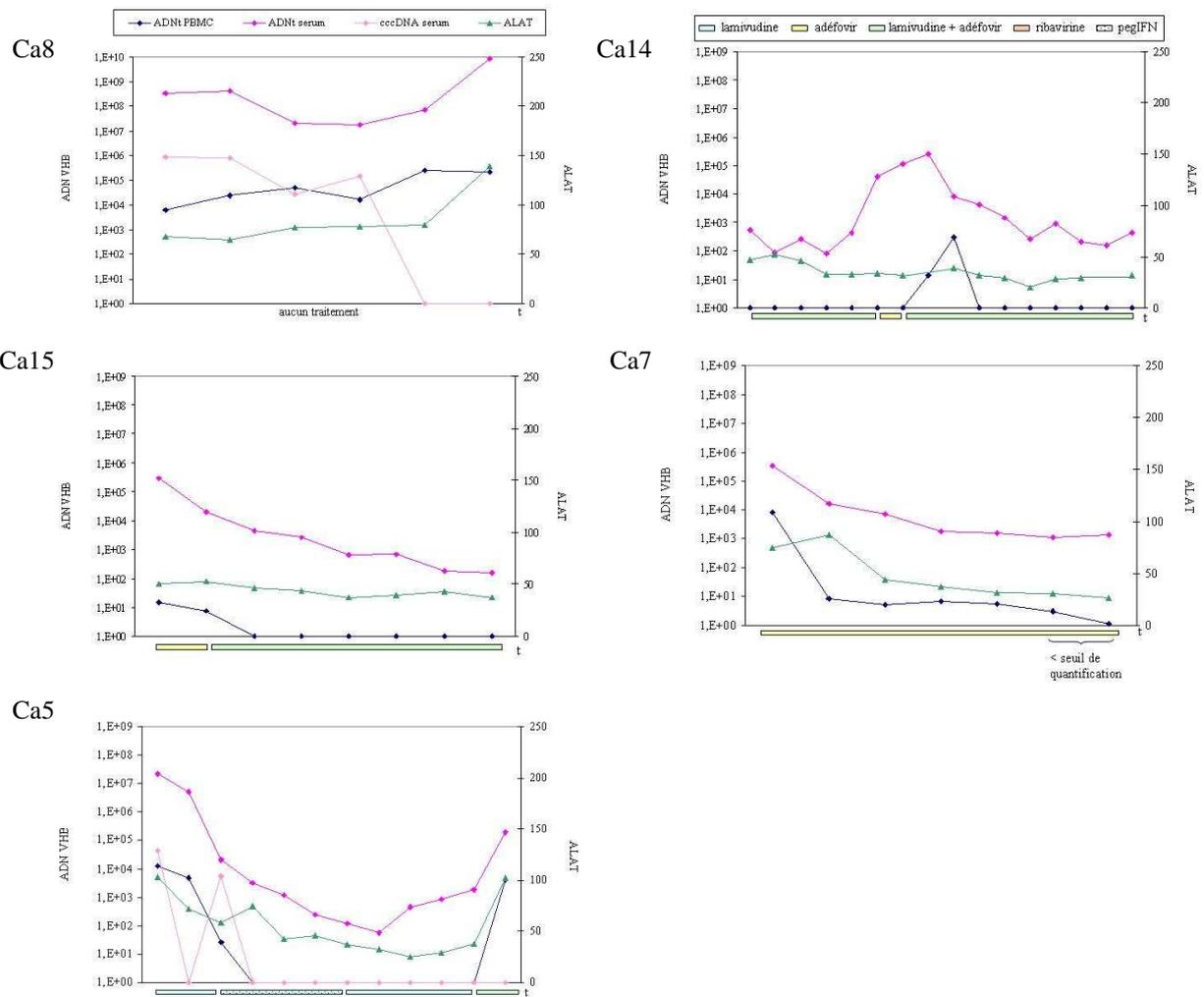


Figure 27 : Evolution des concentrations d'ADN total et de cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients AgHBs+ AgHBe+ au cours de leur suivi.

Notons que les charges virales dans les PBMC et dans le sérum ne sont pas strictement proportionnelles, en particulier chez le patient Ca8, non traité sur toute la durée du suivi.

Par ailleurs, la nature et la durée des traitements ne semblent pas influencer l'évolution de l'ADN dans les PBMC.

Nous avons détecté du cccDNA dans le sérum des patients lorsque la concentration d'ADN sérique est élevée : c'est le cas du patient Ca8 et du patient Ca5 au début du suivi.

Tous les échantillons de PBMC testés sont négatifs en cccDNA.

3.2. Patients Ac anti-HBe+

Comme pour les patients AgHBe+, la charge virale dans les PBMC des patients Ac anti-HBe+ paraît dépendante de celle dans le sérum (Figure 28) :

- ✓ nous constatons que l'ADN du VHB est présent dans les PBMC du patient Ca18 quand la charge virale sérique dépasse le seuil de 10^4 UI/mL
- ✓ aucune trace d'ADN n'est retrouvée par notre technique de PCR en temps réel dans les PBMC du patient Ca29, dont les titres sériques sont inférieurs à 10^3 UI/mL.
- ✓ les PBMC du patient Cb2, coinfecté par le VHC, sont positifs dès que la concentration sérique atteint 10^3 UI/mL.

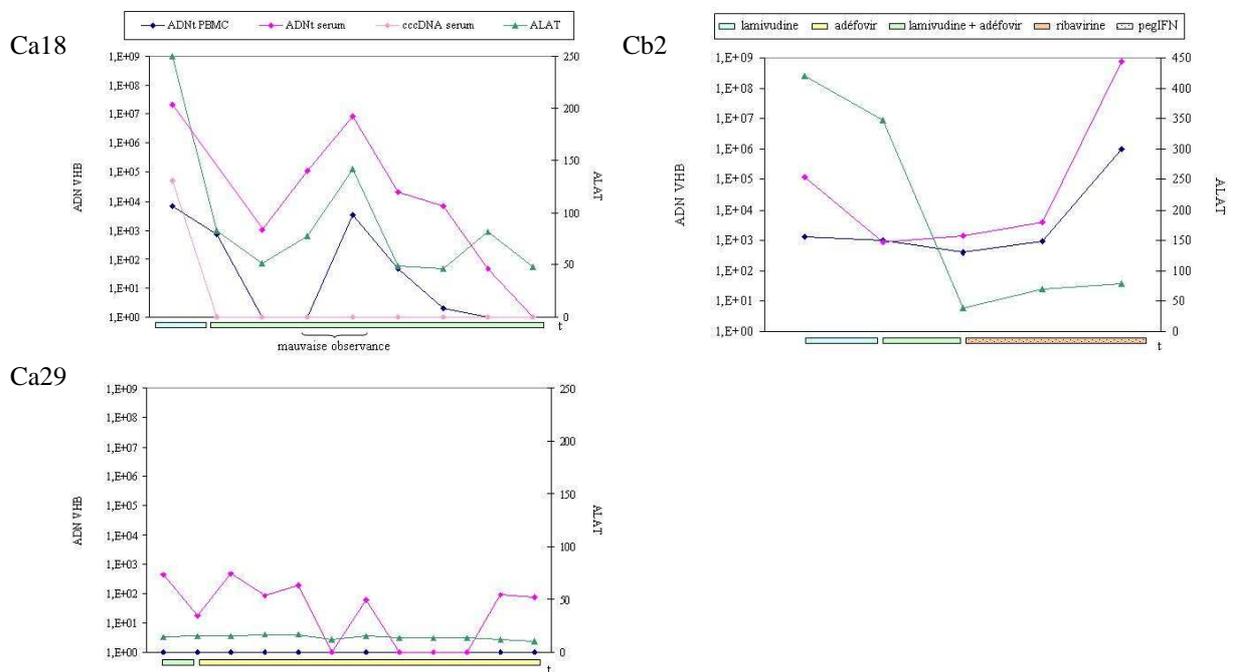


Figure 28 : Evolution des concentrations d'ADN total et de cccDNA dans les PBMC et le sérum des patients AgHBs+ Ac anti-HBe+ au cours de leur suivi.

Du cccDNA est trouvé dans le sérum du patient Ca18 en début de suivi.
Aucun échantillon de PBMC ne contient de cccDNA.

4. Discussion – Conclusion

La diversité des traitements proposés et l'hétérogénéité même de la population étudiée (profils HBe, coinfections, réponse au traitement...) font que ces données sont préliminaires et nous empêchent d'élaborer des conclusions significatives ; les résultats partiels nous permettent quelques commentaires.

Nous observons la présence de cccDNA dans le sérum de certains patients, dont la virémie est élevée. Deux arguments ne sont pas en faveur d'une lyse hépatocellulaire mais plutôt d'une production de virus :

1- globalement, les patients ont des transaminases normales (sauf le patient Ca8, non traité au moment des prélèvements, et le patient Cb2 coinfecté par le VHC) même lorsque le cccDNA est détecté dans le sérum. Inversement, des transaminases élevées ne sont pas associées à la détection de cccDNA (patient Ca18).

2- des pics d'ADN total sont observés indépendamment de la quantité de cccDNA.

Chez les patients AgHBs+ étudiés, l'ADN total du VHB est détecté dans les PBMC, indépendamment du profil HBe. Il semble que la charge virale dans les PBMC reflète les fluctuations de la charge virale sérique, dans une certaine limite : nos résultats vont dans le sens de ceux de notre étude précédente, montrant que le génome viral n'est détecté dans les PBMC que lorsque la charge virale sérique est supérieure à $10^3 - 10^4$ UI/mL. Cependant, même si nous avons tenu compte de la quantité de virus possiblement adsorbés à la surface des PBMC, nous ne pouvons affirmer la présence d'ADN dans les PBMC que chez les patients n'ayant pas d'ADN détectable dans le sérum.

L'absence de détection de cccDNA dans les PBMC des patients AgHBs+ nous conduit à émettre deux hypothèses : soit les concentrations de cccDNA sont très faibles et indétectables par notre technique (la stimulation in vitro des PBMC pourrait alors révéler la réplication du VHB), soit les PBMC ne contiennent pas de cccDNA, et ne constituent pas un réservoir de multiplication virale extra-hépatique.

Les PBMC seraient donc un réservoir passif de virus.

Il nous a paru intéressant d'analyser de manière plus approfondie la forme moléculaire de l'ADN du VHB détecté dans les PBMC des patients, en recherchant une éventuelle intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire.

CHAPITRE III : RECHERCHE DE L'ADN INTÉGRÉ DANS LES PBMC DE PATIENTS PRÉSENTANT DIFFÉRENTS PROFILS SÉROLOGIQUES

Plusieurs études ont rapporté l'intégration de l'ADN du VHB dans le génome des cellules hépatiques lors d'infections occultes [234, 255-261]. Certains auteurs ont suggéré que, lors de l'intégration de l'ADN du VHB, des réarrangements de la séquence virale de type délétion ou fragmentation pourraient se produire et entraîner un défaut d'expression de l'AgHBs [234, 244, 257].

Plus rares sont les études décrivant l'intégration de la séquence virale dans l'ADN des PBMC [244, 272, 285]. Précédemment, nous avons détecté l'ADN du VHB dans les PBMC de 56 % des patients AgHBs- non virémiques, sans mettre en évidence la forme répliquative du virus. Notre but a donc été de rechercher si l'ADN du VHB persistait dans les PBMC de ces patients sous forme intégrée, en utilisant une technique de détection des jonctions séquence virale – séquence humaine. Ce travail n'a pas encore été soumis pour publication.

A. Echantillons et méthodes

1.1. Echantillons cliniques

Nous avons analysé les extraits issus des PBMC de la plupart des patients AgHBs- sélectionnés pour l'étude du cccDNA dans les PBMC (voir paragraphe B.1. du chapitre II), soit 48 patients possédant des anticorps anti-HBc isolés (groupe A), dont 24 patients coinfectés par le VHC et 7 patients coinfectés par le VIH et 15 patients ayant des anticorps anti-HBs et anti-HBc (groupe B), dont 6 patients coinfectés par le VHC et 3 patients coinfectés par le VIH.

Parmi les patients AgHBs+, nous avons étudié les PBMC d'un seul patient (groupe C, patient Ca3).

En parallèle, nous avons étudié une biopsie de foie provenant d'un patient AgHBs+ atteint d'hépatite chronique, suivi à la Fédération Hépatites du CHU.

L'ADN du tissu hépatique a été extrait à l'aide de la trousse QIAamp DNA MiniKit (Qiagen).

1.2. Témoins positifs

Nous avons utilisé comme ADN de référence l'ADN total extrait à partir des cellules Hep3B (Hep3B2.1-7 ; référence ATCC : HB-8064). L'ADN viral est intégré dans le génome de ces cellules au niveau des régions DR ; la séquence S est intacte mais des réarrangements ont eu lieu dans les gènes préS1 et C, et la région X est tronquée. Twist et al. [286] ont montré que chacune des cellules Hep3B contenait 2 copies d'ADN viral. L'ADN total de ces cellules a été extrait par lyse à la protéinase K, suivie d'une extraction des protéines au phénol - chloroforme - alcool isoamylique et d'une précipitation de l'ADN à l'éthanol glacial (voir annexe IV).

Le témoin positif d'hybridation a été préparé en mélangeant plusieurs produits de PCR de VHB de génotype A (VQC HBV DNA genotype A panel 1999 ; Pelicheck) et de génotype D (isolé d'un patient AgHBs+) :

- ✓ de 222 pb dans le gène préC/C (amplifié à l'aide des amorces P1 et P11 [275])
- ✓ de 565 pb dans le gène X (amorces MM60 et P2 [244, 275])
- ✓ de 720 pb dans les gènes X et préC/C (amorces MM60 et MM25 [244])
- ✓ de 1030 pb dans les gènes X et préC/C (amorces MM60 et MM31 [244]) (Tableau 9).

Les témoins de spécificité ont été préparés en utilisant des amplifiats du gène de l'albumine (selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.2 de l'article 3 ; 140 pb) et un plasmide contenant le gène pUL56 du cytomégalovirus ou CMV (environ 5300 pb ; fourni par G. Champier, EA 3175, Faculté de Médecine, Limoges).

Le témoin d'hybridation a été reconstitué en mélangeant le témoin positif d'hybridation et les témoins de spécificité albumine et CMV.

Nom	Sequence (5' - 3')	Région amplifiée
A5	CAG UGC CAA GUG UUU GCU GAC GCC AAA GUG CUG GGA UUA CAG	séquence Alu humaine
A3	AGU GCC AAG UGU UUG CUG ACG ACU GCA CUC CAG CCU GGG CGA C	
Tag5 Tag3	CAA GTG TTT GCT GAC GCC AAA G CAA GTG TTT GCT GAC GAC TGC A	
pUTP	ACA UGA ACC UUU ACC CCG UUG C (nt 1131-1152)	gène X
uPre31	GAG UUC UUC UUC UAG GGG ACC UG (nt 2350-2328)	gène C
MM37	TGC CAA GTG TTT GCT GAC GC (nt 1174–1193)	gène X
MM31	AGT GCG AAT CCA CAC TC (nt 2288–2269)	gène C
MM60	CCA TAC TGC GGA ACT CCT AG (nt 1258-1279)	gène X
MM25	GGA AGG AAA GAA GTC AGA AGG (nt 1978-1960)	gène C
P1	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA (nt 1821-1841)	gène C
P2	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G (nt 1806-1823)	gène X
P11	CAA TGC TCA GGA GAC TCT AAG GC (nt 2043-2021)	gène C

Tableau 9 : Amorces utilisées dans la PCR Alu, permettant l'amplification des jonctions ADN du VHB – ADN cellulaire, et amorces utilisées pour préparer les amplifiats de VHB servant de témoins positifs d'hybridation.

1.3. Détection de l'ADN intégré

L'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire a été recherchée par une technique de PCR couplée à une hybridation en Southern Blot spécifique, permettant l'amplification des jonctions génome viral – génome humain (PCR Alu). Le principe de cette méthode est représenté dans la Figure 29 et les amorces utilisées sont listées dans le Tableau 9.

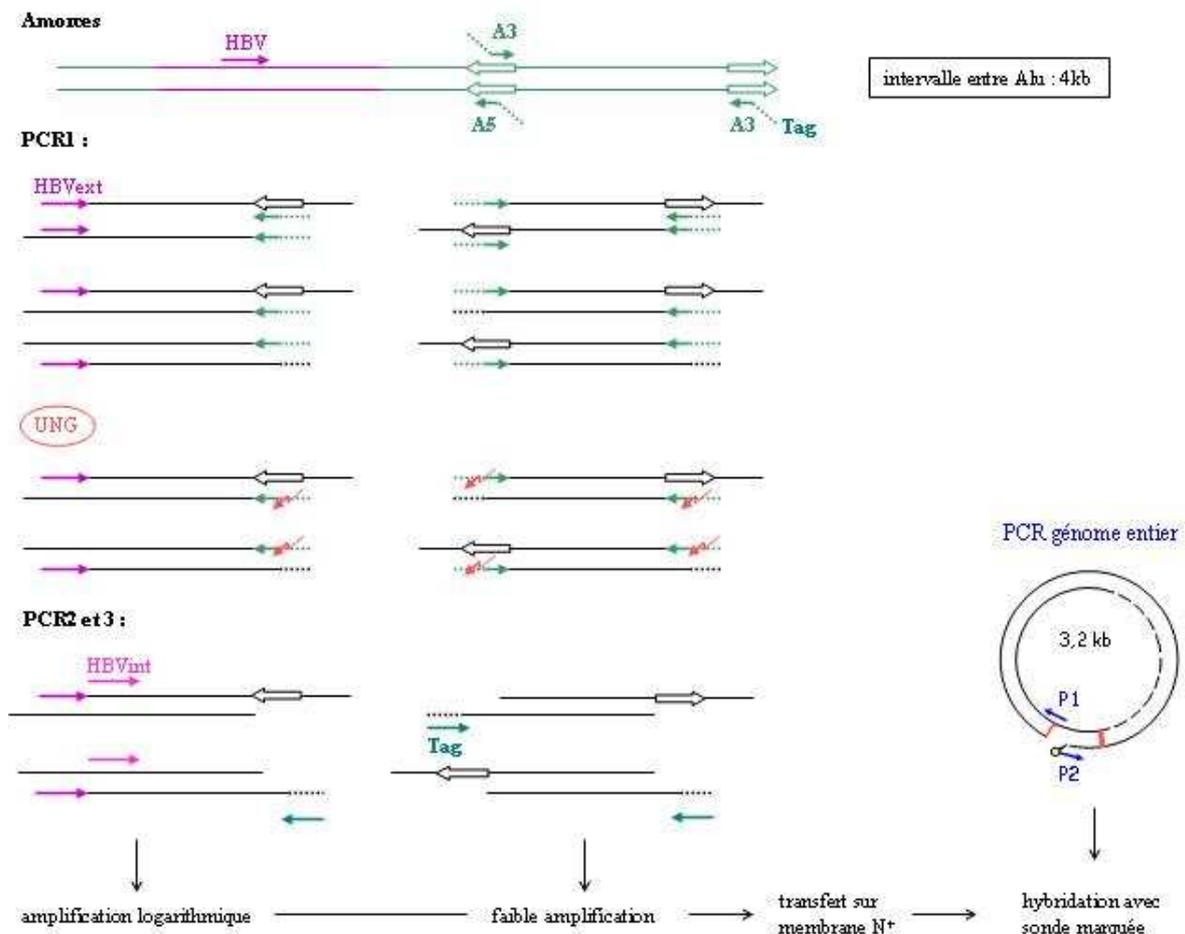


Figure 29 : Principe de la détection des jonctions ADN viral – ADN humain, par PCR Alu et hybridation en Southern Blot.

Nous avons adapté le protocole initialement mis au point par Minami et al. [287] et modifié par Murakami et al. [244] : 5 μ L d'extrait sont amplifiés en 10 cycles (94°C, 30 s ; 59°C, 30 s ; 70°C, 3 min) en présence de 200 μ M de dNTP, 200 nM d'amorces Alu (A5 et A3), 600 nM d'amorces VHB (pUTP et uPre31), 5 % de DMSO, 1,5 mM de MgCl₂ et 3,1 U d'Expand High Fidelity Enzyme mix (Roche Diagnostics). Après ajout d'1 U d'uracile N-glycosylase dans chaque tube de PCR, le mélange réactionnel est incubé 30 min à 37°C puis 10 min à 94°C. Les amorces de seconde amplification (Tag5, Tag3, MM37 et MM31) sont alors ajoutées à la concentration finale de 400 nM, et l'ADN est amplifié par une technique de « *touchdown PCR* » : les 15 premiers cycles se décomposent en une dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation à 62°C-0,5°C/cycle pendant 30 s et une élongation à 70°C pendant 3 min ; les 20 cycles suivant comportent une dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation à 55°C pendant 30 s et une élongation à 70°C pendant 30 s + 5 s/cycle ; le dernier cycle s'achève sur une élongation finale à 72°C pendant 7 min. Pour augmenter la sensibilité

de la PCR, 1 à 5 μL de produit de PCR sont re-amplifiés par PCR semi-nichée, avec les amorces Tag5, Tag3, MM60 et MM25, selon le même protocole d'amplification.

Les produits de PCR finaux sont analysés par une technique de Southern Blot. Ils sont séparés sur gel d'agarose à 1 %, puis transférés par capillarité, en milieu alcalin, sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond- N^+ membrane ; Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA), selon le protocole recommandé par Roche Diagnostics (*Procedures for Nonradioactive Labeling and Detection*). La révélation par chimiluminescence est effectuée après hybridation avec une sonde marquée à la digoxine, à l'aide de la trousse DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics). Cette sonde spécifique du VHB est préparée par amplification du génome entier [275] d'un VHB de génotype E (isolé d'un patient fortement virémique) à l'aide de la trousse DIG DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics). La détection du marquage est réalisée à l'aide du substrat CSPD, selon le protocole recommandé par Roche Diagnostics, mais en utilisant les films radiographiques Hyperfilm ECL (Amersham – GE Healthcare Europe GmbH, Saclay, France). Le temps d'exposition varie entre 30 s et 1 min, selon l'intensité du signal obtenu.

2. Résultats

2.1. Spécificité de la technique

Les essais d'hybridation effectués sur 5 μL du témoin positif d'hybridation ont montré une bonne spécificité de la fixation de la sonde VHB : seules les bandes correspondant aux produits de PCR de VHB sont révélés par chimiluminescence (Figure 30). La sonde, préparée à partir d'un VHB de génotype E, semble donc s'hybrider correctement aux amplifiats issus de VHB de génotypes différents (A et D).

2.2. Sensibilité de la technique

L'ADN total du VHB extrait des cellules Hep3B a été quantifié par la technique quantitative de PCR en temps réel précédemment décrite : 3×10^8 copies d'ADN du VHB/mL d'extrait. Des dilutions en série de l'extrait, de 10^{-1} à 10^{-4} , ont été préparées. L'ADN intégré a été détecté par la technique de PCR Alu-Southern Blot jusqu'à la dilution 10^{-3} à l'aide des amorces A5/pUTP - Tag5/MM37 - Tag5/MM60 (Figure 30). Par conséquent, la sensibilité de la méthode a été établie à $1,5 \times 10^3$ copies d'ADN du VHB par réaction. La quantification du gène de l'albumine dans les cellules Hep3B, par PCR en temps réel, nous a permis d'évaluer

le nombre de cellules : $1,85 \times 10^7$ cellules/mL d'extrait. Le seuil de détection de la technique est donc estimé à 8×10^3 copies/ 10^6 cellules.

2.3. Détection de l'ADN intégré dans les échantillons des patients AgHBs+

La PCR Alu a permis l'amplification de l'ADN extrait des PBMC du patient AgHBs+ Ca3 (Figure 30, lignes 8 et 9) et de la biopsie hépatique d'un autre patient AgHBs+ (Figure 30, lignes 14 et 16).

Comme pour les cellules Hep3B, plusieurs bandes sont visibles après l'hybridation des produits de PCR en Southern Blot : l'ADN du VHB semble s'être intégré de manière fragmentée dans le génome humain. Seul le séquençage des fragments amplifiés permettrait d'identifier les extrémités des séquences virales intégrées.



Figure 30 : Résultat des essais de spécificité et de sensibilité de la PCR Alu et du Southern Blot. Lignes 1 et 10 : témoin d'hybridation ; **amorces A5/pUTP puis Tag5/MM37 puis Tag5/MM60** ; ligne 2 : 5 μ L Hep3B 10^{-1} , ligne 3 : 5 μ L Hep3B 10^{-3} , ligne 4 : 5 μ L Hep3B 10^{-4} , ligne 5 : 1 μ L Hep3B 10^{-1} , ligne 6 : 1 μ L Hep3B 10^{-1} , ligne 7 : 1 μ L Hep3B 10^{-1} , ligne 8 : PBMC d'un patient AgHBs+, ligne 9 : PBMC d'un patient AgHBs+, ligne 11 : 1 μ L Hep3B 10^{-1} , ligne 12 : 1 μ L Hep3B 10^{-3} , ligne 13 : 1 μ L Hep3B 10^{-4} , ligne 15 : eau, ligne 16 : biopsie de foie d'un patient AgHBs+.

2.4. Détection de l'ADN intégré dans les PBMC des patients AgHBs-

Les résultats sont présentés dans les Tableaux 10 et 11.

Patients		Sérologies VHB			PBMC			Sérum	
		AgHBs	anti-HBs	anti-HBc	ADNt (UI/10 ⁶ cellules)	cccDNA (%)	ADN intégré	ADNt (UI/mL)	cccDNA (%)
VHC- VIH-	Aa1	-	-	+	8,96×10 ³	-	-	-	-
	Aa2	-	-	+	2,57×10 ³	-	-	-	-
	Aa3	-	-	+	726,68	-	-	-	-
	Aa4	-	-	+	644,28	-	-	-	-
	Aa5	-	-	+	607,92	-	-	539,17	-
	Aa6	-	-	+	397,32	-	-	-	-
	Aa7	-	-	+	293,40	-	-	-	-
	Aa8	-	-	+	164,61	-	-	-	-
	Aa9	-	-	+	162,86	-	-	-	-
	Aa10	-	-	+	86,80	-	-	-	-
	Aa11	-	-	+	3,37	-	-	-	-
	Aa12	-	-	+	< SQ	-	-	-	-
	Aa13-Aa17	-	-	+	-	-	-	-	-
VHC+ VIH-	Ab1	-	-	+	1,68×10 ³	-	-	424,37	-
	Ab2	-	-	+	614,28	-	-	-	-
	Ab3	-	-	+	361,16	-	-	-	-
	Ab4	-	-	+	305,97	-	-	-	-
	Ab5	-	-	+	272,84	-	-	-	-
	Ab6	-	-	+	239,76	-	-	-	-
	Ab7	-	-	+	103,94	-	-	59,36	-
	Ab8	-	-	+	53,77	-	QI	-	-
	Ab9	-	-	+	49,27	-	-	-	-
	Ab10	-	-	+	26,73	-	-	-	-
	Ab11	-	-	+	16,45	-	-	-	-
	Ab12	-	-	+	7,24	-	-	< SQ	-
	Ab13-Ab14	-	-	+	< SQ	-	-	-	-
Ab15-Ab25	-	-	+	-	-	-	-	-	
VHC- VIH+	Ac1	-	-	+	15,32	-	-	-	-
	Ac2	-	-	+	< SQ	-	-	4,36×10 ³	79,27
	Ac3	-	-	+	< SQ	-	nd	216,72	-
	Ac4	-	-	+	< SQ	-	-	1,01×10 ³	-
	Ac5-Ac6	-	-	+	< SQ	-	nd	< SQ	-
	Ac7	-	-	+	< SQ	-	-	-	-
	Ac8-Ac11	-	-	+	< SQ	-	nd	-	-
	Ac12	-	-	+	-	-	nd	1,78×10 ³	100
	Ac13	-	-	+	-	-	nd	1,50×10 ³	100
	Ac14	-	-	+	-	-	nd	786,80	100
	Ac15-Ac16	-	-	+	-	-	nd	< SQ	-
Ac17-Ac22	-	-	+	-	-	-	-	-	
VHC+ VIH+	Ad1	-	-	+	< SQ	-	nd	2,35×10 ³	-
	Ad2	-	-	+	-	-	nd	1,78×10 ⁴	100
	Ad3	-	-	+	-	-	nd	1,66×10 ³	100
	Ad4	-	-	+	-	-	nd	152,60	-
	Ad5	-	-	+	-	-	nd	< SQ	-
	Ad6-Ad12	-	-	+	-	-	nd	-	-

Tableau 10 : Détection de l'ADN intégré dans les PBMC des patients présentant des Ac anti-HBc isolés. < SQ : < seuil de quantification ; QI : quantité insuffisante ; nd : non déterminé.

Patients		Sérologies VHB			PBMC			Sérum	
		AgHBs	anti-HBs	anti-HBc	ADNt (UI/10 ⁶ cellules)	cccDNA (%)	ADN intégré	ADNt (UI/mL)	cccDNA (%)
VHC- VIH-	Ba1	-	+	+	833,73	-	-	-	-
	Ba2	-	+	+	205,10	-	-	-	-
	Ba3	-	+	+	24,32	-	QI	-	-
	Ba4	-	+	+	-	-	-	64,82	-
	Ba5	-	+	+	-	-	QI	< SQ	-
	Ba6-Ba8	-	+	+	-	-	-	-	-
VHC+ VIH-	Bb1	-	+	+	4,60×10 ⁴	-	-	< SQ	-
	Bb2	-	+	+	36,37	-	-	138,32	-
	Bb3	-	+	+	14,95	-	-	< SQ	-
	Bb4	-	+	+	< SQ	-	QI	< SQ	-
	Bb5	-	+	+	< SQ	-	-	-	-
	Bb6-Bb7	-	+	+	-	-	QI	< SQ	-
	Bb8-Bb10	-	+	+	-	-	-	-	-
VHC- VIH+	Bc1	-	+	+	201,38	-	-	-	-
	Bc2	-	+	+	55,45	-	-	-	-
	Bc3	-	+	+	13,15	-	-	-	-
	Bc4	-	+	+	< SQ	-	nd	389,20	-
	Bc5-Bc11	-	+	+	< SQ	-	nd	< SQ	-
	Bc12-Bc15	-	+	+	< SQ	-	nd	-	-
	Bc16	-	+	+	-	-	nd	6,54×10 ³	-
	Bc17	-	+	+	-	-	nd	688,80	-
	Bc18	-	+	+	-	-	nd	133,28	-
	Bc19	-	+	+	-	-	nd	473,20	-
	Bc20	-	+	+	-	-	nd	79,52	-
	Bc21	-	+	+	-	-	nd	< SQ	-
Bc22-Bc30	-	+	+	-	-	nd	-	-	
VHC+ VIH+	Bd1	-	+	+	18,13	-	-	-	-
	Bd2	-	+	+	< SQ	-	nd	< SQ	-
	Bd3	-	+	+	-	-	nd	76,72	-
	Bd4	-	+	+	-	-	nd	< SQ	-
	Bd5-Bd6	-	+	+	-	-	nd	-	-

Tableau 11 : Détection de l'ADN intégré dans les PBMC des patients présentant des Ac anti-HBs et anti-HBc. *SQ* : seuil de quantification ; *QI* : quantité insuffisante ; *nd* : non déterminé.

3. Discussion – Conclusion

La présence de l'ADN du VHB dans les PBMC des patients AgHBs-, parfois même à des titres élevés, en l'absence de cccDNA détectable, soulève la question du rôle joué par les PBMC dans les infections par le VHB. L'intégration de l'ADN viral dans le génome leucocytaire pourrait expliquer la persistance du VHB dans ces cellules à l'origine d'infections occultes.

La méthode de détection des jonctions ADN du VHB – ADN cellulaire que nous avons adaptée du protocole de Minami et al. al. [287] a permis la détection de l'ADN intégré dans la lignée cellulaire Hep3B (cellules provenant d'un foie tumoral), la biopsie hépatique et les PBMC de deux patients AgHBs+. Alors que l'intégration de l'ADN du VHB dans le génome hépatocytaire a été démontrée à plusieurs reprises chez les patients AgHBs+, peu d'études rapportent l'intégration du génome viral dans les PBMC de ces patients [244, 285].

Dans notre étude, l'ADN intégré dans les cellules Hep3B est mieux détecté avec les amorces amplifiant la région X qu'avec les amorces amplifiant la région préC/C. Le génome du VHB paraît être fragmenté compte tenu du nombre de bandes observées après hybridation. Il semble que ce soit aussi le cas dans la biopsie de foie d'un des deux patients AgHBs+ et dans les PBMC de l'autre patient, avec les amorces amplifiant la région préC/C. Nos observations vont dans le sens de celles de Takada et al. [288], qui décrivent des réarrangements de la séquence virale intégrée dans les hépatocytes de patients ayant une hépatite B chronique, et de celles de Murakami et al. [244], qui rapportent la fragmentation de la séquence X de l'ADN intégré dans les PBMC d'un patient AgHBs- coinfecté par le VHC. Même si nous ne pouvons pas exclure que l'hybridation révèle non seulement les produits de PCR interne mais aussi les produits de PCR externe, nous observons plus de deux bandes sur le film radiographique, qui pourraient donc correspondre à plusieurs fragments d'ADN viral.

Nous n'avons pas trouvé d'ADN intégré dans les PBMC des patients AgHBs- que nous avons étudiés.

Murakami et al. détectent de l'ADN intégré dans les PBMC de 22 % (2/9) des patients AgHBs- ayant une hépatite C chronique qu'ils ont inclus dans leur étude. Nous observons donc une discordance entre leurs résultats et ceux obtenus chez notre groupe de patients AgHBs- coinfectés par le VHC (suivis en Gastro-Entérologie ou à la Fédération Hépatites du

CHU). Bien que nos observations rejoignent celles de Torii et al. [246] (patients guéris d'une hépatite aiguë, sans ADN détectable dans le sérum, et possédant des Ac anti-HBc isolés ou des Ac anti-HBc et anti-HBs), la comparaison de nos groupe de patients AgHBs- est délicate

Murakami et al. suggèrent que le nombre de copies d'ADN viral intégré par cellule dans les PBMC est très faible chez les patients AgHBs-, comparativement au foie. Nous avons évalué le seuil de détection de notre technique à $1,5 \times 10^3$ copies d'ADN du VHB/réaction, soit 8×10^3 copies/ 10^6 cellules. Ce seuil est comparable à celui établi par Torii et al. (10^3 copies/réaction) et supérieur à celui déterminé par Murakami et al. (10^2 copies/réaction). Les concentrations de l'ADN du VHB dans les PBMC de nos patients AgHBs-, exprimées en UI/mL, ont été mesurées par PCR en temps réel. En utilisant le facteur de conversion (de copies en UI) que nous avons calculé lors de la mise au point de cette PCR, la sensibilité de notre méthode utilisant la PCR Alu serait de 1120 UI d'ADN/ 10^6 cellules. Or la quantité d'ADN total détecté dans les PBMC au cours des infections occultes est inférieure à ce titre dans 96 % (46/48) des cas. L'absence de détection de l'ADN intégré dans les PBMC des patients AgHBs- de notre étude et de celle de Torii et al. pourrait donc en partie être expliquée par un manque de sensibilité de nos techniques.

Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure la présence d'ADN intégré sous forme fragmentée ou délétée, qui ne serait pas détectée avec les amorces dans le gène C ou X.

Les travaux de Umeda et al. [272] ont révélé la présence du génome viral dans les ganglions lymphatiques et dans les PBMC de donneurs vivants de tissu hépatique AgHBs-, et ont mis en évidence l'intégration de l'ADN du VHB dans les ganglions. Malheureusement, ces auteurs n'ont pas recherché l'ADN intégré dans les PBMC. L'infection des organes lymphoïdes par le VHB est également observée dans le modèle de la marmotte développé par Michalak et al. [276], que ce soit dans les primo-infections occultes (en l'absence de virus dans le foie), ou dans les infections occultes secondaires à une hépatite aiguë. Chez les patients de Murakami et al., l'ADN intégré n'est pas systématiquement détecté dans le foie lorsque les PBMC sont positifs. Ceci suggère la possibilité d'une infection purement lymphoïde, déjà décrite chez la marmotte [276], à l'origine d'infections occultes. Le rôle physiopathologique des fragments d'ADN intégré reste à définir.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les infections occultes par le VHB restent encore mal connues, tant pour leurs conséquences cliniques que pour leurs mécanismes physiopathologiques. Les profils sérologiques vont de l'absence de marqueur B à la présence d'anticorps anti-HBs et anti-HBc, avec un fait commun, l'absence constante de l'AgHBs associée à la détection de l'ADN d'un ou plusieurs gènes du VHB dans le sang. Ces infections occultes ont été le fil conducteur de nos travaux, et nous avons tenté d'explorer plusieurs mécanismes susceptibles d'expliquer le caractère occulte de certaines infections dues au VHB.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux mutations potentiellement responsables d'un défaut de détection ou de production de l'AgHBs. Puis nous avons cherché à identifier les formes de persistance du VHB dans le compartiment sanguin au cours de ces infections, et en particulier, nous avons cherché à préciser le rôle possible de réservoir des leucocytes périphériques (PBMC).

Nous avons pour cela développé ou adapté les outils moléculaires nécessaires. Nous avons initialement utilisé l'amplification par PCR nichée d'un fragment du gène S [177] pour identifier les porteurs d'infections occultes dans différents groupes de patients. La sensibilité de cette PCR nous a permis de détecter le virus B alors que les tests commerciaux restaient négatifs. Dans l'étape suivante, nous avons mis au point une méthode de quantification de la forme répliquative (cccDNA) de l'ADN du VHB, applicable aux différents compartiments du sang (voir article 3). En effet, les différentes techniques proposées dans la littérature, du fait de leur manque de spécificité, ne permettaient pas d'identifier avec certitude la présence du cccDNA. La méthode développée permet, à partir d'une même région du gène X chevauchant le *gap*, de quantifier l'ADN total du virus avec une grande sensibilité, ce qui permet d'identifier les infections occultes, et de quantifier spécifiquement le cccDNA au sein de cet ADN total. Cependant, du fait de sa grande spécificité liée à l'utilisation optimisée de la DNase, la quantification du cccDNA est moins sensible que la détection de l'ADN total. Cette PCR en temps réel est applicable à tous les compartiments, PBMC, sérum, foie, et sera prochainement utilisée sur sang total. Enfin, nous avons adapté une méthode de détection des séquences d'ADN du VHB intégrées, basée sur une amplification des séquences Alu humaines et des séquences spécifiques du VHB, couplée à un Southern Blot, et qui permet d'analyser le caractère fragmenté ou non des séquences intégrées [244, 287]. Malgré son

optimisation et sa spécificité, cette technique reste peu sensible et devra être améliorée dans la suite de ce travail.

Les mutations dans l'AgHBs pouvant être à l'origine d'une non-reconnaissance par les tests diagnostiques, soit du fait de mutations portant sur des épitopes antigéniques, soit du fait d'une altération à distance de la conformation de la boucle antigénique, n'ont été retrouvées que chez deux des quarante-huit patients de notre première étude (voir article 1). Ce mécanisme paraît donc anecdotique. Plus que des mutations portant sur l'AgHBs, on peut invoquer une diminution du niveau de production virale, du fait de mutations dans les promoteurs S ou C, ou dans le gène de la polymérase [207, 224, 264, 289]. L'altération de l'externalisation de l'AgHBs liée à des mutations de la région préS, est un autre mécanisme qui a été récemment mis en évidence *in vitro* [282]. Il est très vraisemblable que les profils de mutation à l'origine des infections occultes soient très complexes et différents selon les patients.

Ainsi, chez le patient infecté par le VHB, le VHC et le VIH, que nous avons étudié, une mutation dans la région TP, qui porte la fonction primase de l'ADN polymérase, pourrait être à l'origine d'une diminution de la synthèse de l'ADN viral (voir article 2). Cependant, chez les patients infectés par le VIH, l'altération de l'immunité cellulaire est probablement le facteur prédominant. Les études longitudinales sur ces populations montrent une alternance de phases de réactivations virales et d'infections silencieuses, avec ou non séroconversion HBs réversible, et fluctuant en fonction du taux de TCD₄⁺ [218-220].

La physiopathologie des infections « occultes » chez les patients coinfectés par le VIH semble être différente de celle des infections occultes observées chez les patients mono-infectés ou coinfectés par le VHC. Cette hypothèse est illustrée dans notre étude par la différence de répartition du virus dans les compartiments plasmatique et leucocytaire : chez les patients VIH⁺ AgHBs⁻, l'ADN du VHB est plus fréquemment détecté dans le sérum, à des titres plus élevés, et n'est pas ou peu retrouvé dans les PBMC. Au contraire, chez les patients mono-infectés, le taux d'ADN sérique est le plus souvent indétectable ou très faible, inférieur à 600 UI/ml, et 56 % des patients hébergent du virus dans leurs PBMC. On peut donc s'interroger sur le rôle de réservoir de ces cellules au cours des infections occultes.

Nous avons montré que l'ADN du VHB présent dans les PBMC des patients AgHBs⁻ de notre étude est essentiellement sous forme d'ADN relâché ; la présence de forme répliquative cccDNA ou de forme intégrée paraît anecdotique ou très minoritaire. Il faut toutefois rester prudent dans l'interprétation de ces résultats du fait de la faible sensibilité de

la méthode de détection de l'ADN intégré. Dans tous les cas, ces résultats sont en faveur d'un rôle de réservoir passif des PBMC au cours des infections B occultes.

Ce caractère passif des PBMC est retrouvé dans notre population AgHBs+ : la concentration d'ADN intracellulaire évolue avec la charge virale sérique, et les PBMC, en dehors de toute activation, ne semblent pas héberger la forme répliquative du virus à un seuil détectable par notre PCR.

Il est possible que les PBMC jouent un rôle dans la persistance virale, du fait de ce rôle de réservoir passif, cependant la principale raison du caractère occulte des infections est plus vraisemblablement une diminution du niveau de la production virale, associée à une perte ou une absence d'anticorps liée à la faible stimulation antigénique et variant selon les individus.

Par ailleurs, il n'est pas exclu que certains génotypes, ou certaines souches plus ou moins mutées dont la répllication serait déficiente, voire plusieurs souches déficientes complémentaires, soient sélectionnés par les PBMC. Toutefois, le rôle de ce phénomène sur l'évolution de l'infection B reste à démontrer.

Nos hypothèses sous-entendent une coexistence de répllication dans au moins deux sites, hépatique et leucocytaire. Cependant, à l'instar de Michalak et al. [276] qui identifient dans le modèle de la marmotte deux formes physiopathologiques d'infection occulte (une forme purement lymphoïde, conséquence d'un inoculum faible, et une forme lymphoïde et hépatique, secondaire à une hépatite aiguë), nous pourrions évoquer l'existence d'infections purement lymphoïdes chez l'homme. Certaines études s'intéressant aux compartiments lymphoïdes (PBMC et ganglions) et hépatique des patients AgHBs- vont dans le sens de cette hypothèse [244, 272].

Bien que nous n'ayions pas mis en évidence l'intégration de l'ADN du VHB dans les PBMC des patients AgHBs-, des auteurs utilisant des méthodes plus sensibles ont détecté chez ces patients de faibles quantités d'ADN intégré dans les ganglions lymphatiques et les PBMC [244, 272]. La fragmentation de cet ADN observée chez certains patients amène à s'interroger sur son origine. L'intégration de l'ADN dans les cellules lymphoïdes et la capacité du VHB à se répliquer dans les cellules de la moëlle osseuse [290, 291] signifient-elles que l'intégration a lieu dans les cellules souches hématopoïétiques ou bien dans les PBMC activés ? En d'autres termes, ces infections sont-elles une voie physiopathologique conduisant à une infection occulte ? Ces questions restent actuellement sans réponse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Chin J: **Control of communicable diseases manuel.** *Washington DC : APHA* 2000:243-251.
2. Lee WM: **Hepatitis B virus infection.** *N Engl J Med* 1997, **337**:1733-1745.
3. Hyams KC: **Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review.** *Clin Infect Dis* 1995, **20**:992-1000.
4. Chemin I, Jeantet D, Kay A, Trepo C: **Role of silent hepatitis B virus in chronic hepatitis B surface antigen(-) liver disease.** *Antiviral Res* 2001, **52**:117-123.
5. Maiga I, Venard V, Muller C, Le Faou A: **Evolution du virus de l'hépatite B.** *Bull Soc Fr Microbiol* 2003, **18**:281-286.
6. Robertson BH, Margolis HS: **Primate hepatitis B viruses-genetic diversity, geography and evolution.** *Rev Med Virol* 2004, **12**:133-141.
7. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH: **Genetic variability in hepatitis B viruses.** *J Gen Virol* 2002, **83**:1267-1280.
8. Ganem D: **Hepadnaviridae and their replication.** In *Field's virology*. 3rd Ed edition. Edited by Fields BN, Knipe DM, Howley P. Philadelphia: Lippencott-Raven; 1996: 2738-2807
9. Kann M, Gerlich W: **Structure and molecular virology.** In *Viral Hepatitis. Volume Section III: Hepadnaviridae*. 2nd Ed edition. Edited by Zuckerman AR, Thomas HC. London: Churchill Livingstone; 1998: 77-99
10. Berting A, Hahnen J, Kroger M, Gerlich WH: **Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein.** *Intervirology* 1995, **38**:8-15.
11. Kay A, Zoulim F, Trepo C: **Structure, cycle viral et variation du virus de l'hépatite B.** In *Virus des hépatites B et Delta*. Edited by Denis F, Trepo C. Paris: Elsevier Médi/Bio; 2004: 15-40
12. Duclos-Vallee JC, Mabit H, Ducloux S, Capel F, Dubanchet S, Petit MA: **Les différents candidats récepteurs du virus de l'hépatite B.** *Virologie* 2000, **4**:473-483.
13. Fernholz D, Galle PR, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, Will H: **Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier.** *Virology* 1993, **194**:137-148.
14. Bruss V, Ganem D: **The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:1059-1063.
15. Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K: **Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus.** *Cell* 1986, **46**:429-436.
16. Paran N, Geiger B, Shaul Y: **HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment.** *Embo J* 2001, **20**:4443-4453.
17. Chang C, Zhou S, Ganem D, Standring DN: **Phenotypic mixing between different hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cis preferential.** *J Virol* 1994, **68**:5225-5231.
18. Seifer M, Zhou S, Standring DN: **A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in Xenopus oocytes.** *J Virol* 1993, **67**:249-257.
19. Gallina A, Bonelli F, Zentilin L, Rindi G, Muttini M, Milanese G: **A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids.** *J Virol* 1989, **63**:4645-4652.
20. Nassal M: **The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly.** *J Virol* 1992, **66**:4107-4116.
21. Garcia PD, Ou JH, Rutter WJ, Walter P: **Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm.** *J Cell Biol* 1988, **106**:1093-1104.
22. Ou JH, Yeh CT, Yen TS: **Transport of hepatitis B virus precore protein into the nucleus after cleavage of its signal peptide.** *J Virol* 1989, **63**:5238-5243.

23. Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE: **The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence.** *J Immunol* 1998, **160**:2013-2021.
24. Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A: **Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero?** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**:6599-6603.
25. Denis F, Thibault V, Alain S: **Hepadnaviridae. Virus de l'hépatite B (HBV).** In *Virologie humaine*. Edited by Huraux JM, Nicolas JC, Agut H, Peigue-Lafeuille H. Paris: ESTEM; 2003: 293-306
26. Sirma H, Weil R, Rosmorduc O, Urban S, Israel A, Kremsdorf D, Brechot C: **Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome.** *Oncogene* 1998, **16**:2051-2063.
27. Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R: **Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma.** *Oncogene* 2003, **22**:5093-5107.
28. Soussan P, Garreau F, Brechot C, Kremsdorf D: **Une nouvelle protéine du virus de l'hépatite B.** *Médecine/Sciences* 2000, **16**:855-857.
29. Kuroki K, Eng F, Ishikawa T, Turck C, Harada F, Ganem D: **gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family.** *J Biol Chem* 1995, **270**:15022-15028.
30. Urban S, Kruse C, Multhaup G: **A soluble form of the avian hepatitis B virus receptor. Biochemical characterization and functional analysis of the receptor ligand complex.** *J Biol Chem* 1999, **274**:5707-5715.
31. Rodriguez-Crespo I, Gomez-Gutierrez J, Nieto M, Peterson DL, Gavilanes F: **Prediction of a putative fusion peptide in the S protein of hepatitis B virus.** *J Gen Virol* 1994, **75 (Pt 3)**:637-639.
32. Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B, Oess S, Will H, Sirma H, Hildt E: **Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006.
33. Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A: **Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex.** *J Cell Biol* 1999, **145**:45-55.
34. Mason WS, Halpern MS, England JM, Seal G, Egan J, Coates L, Aldrich C, Summers J: **Experimental transmission of duck hepatitis B virus.** *Virology* 1983, **131**:375-384.
35. Tagawa M, Omata M, Okuda K: **Appearance of viral RNA transcripts in the early stage of duck hepatitis B virus infection.** *Virology* 1986, **152**:477-482.
36. Kock J, Schlicht HJ: **Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity.** *J Virol* 1993, **67**:4867-4874.
37. Moolla N, Kew M, Arbuthnot P: **Regulatory elements of hepatitis B virus transcription.** *J Viral Hepat* 2002, **9**:323-331.
38. Pollack JR, Ganem D: **An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation.** *J Virol* 1993, **67**:3254-3263.
39. Wang GH, Zoulim F, Leber EH, Kitson J, Seeger C: **Role of RNA in enzymatic activity of the reverse transcriptase of hepatitis B viruses.** *J Virol* 1994, **68**:8437-8442.
40. Tavis JE, Ganem D: **Expression of functional hepatitis B virus polymerase in yeast reveals it to be the sole viral protein required for correct initiation of reverse transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:4107-4111.
41. Wang GH, Seeger C: **The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis.** *Cell* 1992, **71**:663-670.
42. Lien JM, Aldrich CE, Mason WS: **Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis.** *J Virol* 1986, **57**:229-236.
43. Seeger C, Ganem D, Varmus HE: **Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy.** *Science* 1986, **232**:477-484.

44. Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H: **Replication strategy of human hepatitis B virus.** *J Virol* 1987, **61**:904-911.
45. Gong SS, Jensen AD, Rogler CE: **Loss and acquisition of duck hepatitis B virus integrations in lineages of LMH-D2 chicken hepatoma cells.** *J Virol* 1996, **70**:2000-2007.
46. Yang W, Summers J: **Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination.** *J Virol* 1995, **69**:4029-4036.
47. Lenhoff RJ, Luscombe CA, Summers J: **Competition in vivo between a cytopathic variant and a wild-type duck hepatitis B virus.** *Virology* 1998, **251**:85-95.
48. Summers J, Smith PM, Horwich AL: **Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification.** *J Virol* 1990, **64**:2819-2824.
49. Luscombe C, Pedersen J, Uren E, Locarnini S: **Long-term ganciclovir chemotherapy for congenital duck hepatitis B virus infection in vivo: effect on intrahepatic-viral DNA, RNA, and protein expression.** *Hepatology* 1996, **24**:766-773.
50. Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay L, Mason WS: **Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus.** *J Virol* 1997, **71**:9392-9399.
51. Zhu Y, Yamamoto T, Cullen J, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Litwin S, Furman PA, Jilbert AR, Mason WS: **Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis.** *J Virol* 2001, **75**:311-322.
52. Civitico GM, Locarnini SA: **The half-life of duck hepatitis B virus supercoiled DNA in congenitally infected primary hepatocyte cultures.** *Virology* 1994, **203**:81-89.
53. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J: **Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells.** *Cell* 1986, **47**:451-460.
54. Ganem D, Prince AM: **Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences.** *N Engl J Med* 2004, **350**:1118-1129.
55. Wagner A, Denis F, Ranger-Rogez S, Loustaud-Ratti V, Alain S: **Génotypes du virus de l'hépatite B.** *Imm Bio* 2004, **19**:330-342.
56. Halfon P, Pol S, Bourliere M, Cacoub P: **Les génotypes du virus de l'hépatite B : implications cliniques, épidémiologiques et thérapeutiques.** *Gastroenterol Clin Biol* 2002, **26**:1005-1012.
57. Pawlowsky JM: **The concept of hepatitis B virus mutant escape.** *J Clin Virol* 2005, **34 Suppl 1**:S125-129.
58. Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, Gojobori T: **Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:7059-7062.
59. Zoulim F: **Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection.** *Antiviral Res* 2004, **64**:1-15.
60. Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W: **High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum.** *J Gen Virol* 2000, **81**:1165-1174.
61. Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnius LO: **Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains.** *J Gen Virol* 1992, **73 (Pt 5)**:1201-1208.
62. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M: **Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes.** *J Gen Virol* 1988, **69 (Pt 10)**:2575-2583.
63. Norder H, Courouce AM, Magnius LO: **Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes.** *Virology* 1994, **198**:489-503.

64. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R: **A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness.** *J Gen Virol* 2000, **81**:67-74.
65. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO: **Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America.** *J Gen Virol* 2002, **83**:2059-2073.
66. Schaefer S: **Hepatitis B virus: significance of genotypes.** *J Viral Hepat* 2005, **12**:111-124.
67. Zeng G, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J, Tan D, Xiao F, Ma S, Li W, et al: **Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China.** *J Viral Hepat* 2005, **12**:609-617.
68. Jeantet D, Chemin I, Mandrand B, Zoulim F, Trepo C, Kay A: **Characterization of two hepatitis B virus populations isolated from a hepatitis B surface antigen-negative patient.** *Hepatology* 2002, **35**:1215-1224.
69. Chen BF, Chen PJ, Jow GM, Sablon E, Liu CJ, Chen DS, Kao JH: **High prevalence of mixed genotype infections in hepatitis B virus infected intravenous drug users.** *J Med Virol* 2004, **74**:536-542.
70. Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M: **Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F).** *J Virol* 2002, **76**:6131-6137.
71. Niesters HG, Pas S, de Man RA: **Detection of hepatitis B virus genotypes and mutants: current status.** *J Clin Virol* 2005, **34 Suppl 1**:S4-8.
72. Liu CJ, Kao JH, Chen DS: **Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes.** *Liver Int* 2005, **25**:1097-1107.
73. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS: **Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:1207-1209.
74. Francois G, Kew M, Van Damme P, Mphahlele MJ, Meheus A: **Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications?** *Vaccine* 2001, **19**:3799-3815.
75. Tong SP, Li JS, Vitvitski L, Kay A, Trepo C: **Evidence for a base-paired region of hepatitis B virus pregenome encapsidation signal which influences the patterns of precore mutations abolishing HBe protein expression.** *J Virol* 1993, **67**:5651-5655.
76. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC: **Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus.** *Lancet* 1990, **336**:325-329.
77. Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, Berg T, Hopf U, Meyer zum Buschenfelde KH, Neuhaus P, Gerken G: **Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation.** *Hepatology* 1998, **27**:254-263.
78. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K, Dornan E, McIntyre G, Waters J, Kliem V, Muller R, Thomas HC, Manns MP: **Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis.** *Hepatology* 1996, **24**:489-493.
79. Weber B: **Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact.** *J Clin Virol* 2005, **32**:102-112.
80. Blum HE, Galun E, Liang TJ, von Weizsacker F, Wands JR: **Naturally occurring missense mutation in the polymerase gene terminating hepatitis B virus replication.** *J Virol* 1991, **65**:1836-1842.
81. **Hepatitis B vaccines** [Who Web site]
82. **Childhood diseases in Africa** [Who Web site]
83. Mahoney FJ, Kane M: *Hepatitis B vaccine.* Philadelphia: Saunders; 1999.
84. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH: **Management of hepatitis B: 2000--summary of a workshop.** *Gastroenterology* 2001, **120**:1828-1853.
85. Gust ID: **Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia.** *Gut* 1996, **38 Suppl 2**:S18-23.

86. Lok AS: **Chronic hepatitis B.** *N Engl J Med* 2002, **346**:1682-1683.
87. Schmunis GA, Zicker F, Cruz JR, Cuchi P: **Safety of blood supply for infectious diseases in Latin American countries, 1994-1997.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **65**:924-930.
88. Bouvet E: **Transmission nosocomiale de l'hépatite B.** *Med Mal Infect* 2003, **33** (suppl. A):42-45.
89. Schapiro CN: **Epidemiology of hepatitis B.** *Pediatr Infect Dis J* 1993, **1**:433-437.
90. Antona D, Delarocque-Astagneau E, Lévy-Bruhl D: **Déclaration obligatoire des hépatites B aiguës : résultats de la première année de surveillance, France, 1^{er} mars 2003 - 1^{er} mars 2004.** *Bull Epidemiol Hebd* 2005, **31**:157-160.
91. **Estimation des taux de prévalence des anticorps anti-VHC et des marqueurs du virus de l'hépatite B chez les assurés sociaux du régime général de France métropolitaine** [www.invs.gouv.fr]
92. Denis F, Mounier M: **Le point sur la vaccination contre l'hépatite B.** *Hygiene's* 2000, **8**:113-119.
93. Goudeau A: **La vaccination contre l'hépatite B : vingt ans d'expérience clinique.** *Virologie* 1998, **2**:16-29.
94. **Hepatitis B** [WHO Web site]
95. Denis F: **[Hepatitis B vaccination in France: vaccination coverage in 2002].** *Bull Acad Natl Med* 2004, **188**:115-123.
96. Zuckerman JN, Harrison TJ, Zuckerman AJ: **Prevention.** In *Viral Hepatitis. Volume Section III: Hepadnaviridae.* 2nd Ed edition. Edited by Zuckerman AR, Thomas HC. London: Churchill Livingstone; 1998: 245-251
97. Dienes HP, Hutteroth T, Hess G, Meuer SC: **Immunoelectron microscopic observations on the inflammatory infiltrates and HLA antigens in hepatitis B and non-A, non-B.** *Hepatology* 1987, **7**:1317-1325.
98. Hadziyannis SJ: **Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: from clinical recognition to pathogenesis and treatment.** *Viral Hepat Rev* 1995, **1**:7-36.
99. Bertoni R, Sidney J, Fowler P, Chesnut RW, Chisari FV, Sette A: **Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis.** *J Clin Invest* 1997, **100**:503-513.
100. Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, et al: **Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection.** *Gastroenterology* 1999, **117**:1386-1396.
101. Reherrmann B, Fowler P, Sidney J, Person J, Redeker A, Brown M, Moss B, Sette A, Chisari FV: **The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis.** *J Exp Med* 1995, **181**:1047-1058.
102. Wu TT, Coates L, Aldrich CE, Summers J, Mason WS: **In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway.** *Virology* 1990, **175**:255-261.
103. Guo JT, Zhou H, Liu C, Aldrich C, Saputelli J, Whitaker T, Barrasa MI, Mason WS, Seeger C: **Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections.** *J Virol* 2000, **74**:1495-1505.
104. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV: **Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes.** *Immunity* 1996, **4**:25-36.
105. Tsui LV, Guidotti LG, Ishikawa T, Chisari FV: **Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:12398-12402.
106. Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV: **Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice.** *J Virol* 2000, **74**:4165-4173.
107. Lok AS: **Hepatitis B infection: pathogenesis and management.** *J Hepatol* 2000, **32**:89-97.
108. Chisari FV, Ferrari C: **Hepatitis B virus immunopathogenesis.** *Annu Rev Immunol* 1995, **13**:29-60.

109. Ranger-Rogez S, Alain S, Denis F: **[Hepatitis viruses: mother to child transmission]**. *Pathol Biol (Paris)* 2002, **50**:568-575.
110. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, Maynard JE: **Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state**. *J Infect Dis* 1985, **151**:599-603.
111. Chang MH: **Natural history of hepatitis B virus infection in children**. *J Gastroenterol Hepatol* 2000, **15 Suppl**:E16-19.
112. Lok AS: *Clinical manifestations and natural history of hepatitis B virus infection*. Wellesley, UA: UpToDate; 2000.
113. Milich DR, Schodel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL: **The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype**. *J Virol* 1997, **71**:2192-2201.
114. Beath SV, Boxall EH, Watson RM, Tarlow MJ, Kelly DA: **Fulminant hepatitis B in infants born to anti-HBe hepatitis B carrier mothers**. *Bmj* 1992, **304**:1169-1170.
115. Kosaka Y, Takase K, Kojima M, Shimizu M, Inoue K, Yoshida M, Tanaka S, Akahane Y, Okamoto H, Tsuda F, et al.: **Fulminant hepatitis B: induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e antigen**. *Gastroenterology* 1991, **100**:1087-1094.
116. Foster GR, Ackrill AM, Goldin RD, Kerr IM, Thomas HC, Stark GR: **Expression of the terminal protein region of hepatitis B virus inhibits cellular responses to interferons alpha and gamma and double-stranded RNA**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:2888-2892.
117. Whitten TM, Quets AT, Schloemer RH: **Identification of the hepatitis B virus factor that inhibits expression of the beta interferon gene**. *J Virol* 1991, **65**:4699-4704.
118. Waters JA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, Thomas HC: **Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant**. *J Clin Invest* 1992, **90**:2543-2547.
119. Bertolotti A, Costanzo A, Chisari FV, Levrero M, Artini M, Sette A, Penna A, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C: **Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope**. *J Exp Med* 1994, **180**:933-943.
120. Reherrmann B, Pasquinelli C, Mosier SM, Chisari FV: **Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection**. *J Clin Invest* 1995, **96**:1527-1534.
121. Yoffe B, Burns DK, Bhatt HS, Combes B: **Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection**. *Hepatology* 1990, **12**:187-192.
122. Bernuau J, Benhamou JP: **Fulminant and subfulminant liver failure**. In *Oxford textbook of clinical hepatology. Volume 2*. Edited by McIntyre N. Oxford: Oxford University Press; 1991: 923-942
123. Sobao Y, Tomiyama H, Sugi K, Tokunaga M, Ueno T, Saito S, Fujiyama S, Morimoto M, Tanaka K, Takiguchi M: **The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication**. *J Hepatol* 2002, **36**:105-115.
124. Lok AS, McMahon BJ: **Chronic hepatitis B**. *Hepatology* 2001, **34**:1225-1241.
125. Lok AS, Lai CL, Wu PC, Leung EK, Lam TS: **Spontaneous hepatitis B e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection**. *Gastroenterology* 1987, **92**:1839-1843.
126. Fattovich G, Rugge M, Brollo L, Pontisso P, Noventa F, Guido M, Alberti A, Realdi G: **Clinical, virologic and histologic outcome following seroconversion from HBeAg to anti-HBe in chronic hepatitis type B**. *Hepatology* 1986, **6**:167-172.
127. Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, Liaw YF: **Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B**. *Hepatology* 2002, **35**:1522-1527.

128. Sanchez-Tapias JM, Vilar JH, Costa J, Bruguera M, Ballesta AM, Rodes J: **Natural history of chronic persistent hepatitis B. Relationship between hepatitis B virus replication and the course of the disease.** *J Hepatol* 1984, **1**:15-27.
129. Davis GL, Hoofnagle JH, Waggoner JG: **Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection.** *Gastroenterology* 1984, **86**:230-235.
130. Fattovich G, Brollo L, Alberti A, Realdi G, Pontisso P, Giustina G, Ruol A: **Spontaneous reactivation of hepatitis B virus infection in patients with chronic type B hepatitis.** *Liver* 1990, **10**:141-146.
131. Fattovich G, Brollo L, Giustina G, Noventa F, Pontisso P, Alberti A, Realdi G, Ruol A: **Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B.** *Gut* 1991, **32**:294-298.
132. Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, Arase Y, Fukuda M, Chayama K, Murashima N, Kumada H: **Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients.** *J Hepatol* 1998, **28**:930-938.
133. Sheen IS, Liaw YF, Tai DI, Chu CM: **Hepatic decompensation associated with hepatitis B e antigen clearance in chronic type B hepatitis.** *Gastroenterology* 1985, **89**:732-735.
134. Fattovich G, Giustina G, Schalm SW, Hadziyannis S, Sanchez-Tapias J, Almasio P: **Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. The EUROHEP Study Group on Hepatitis B Virus and Cirrhosis.** *Hepatology* 1995, **21**:77-82.
135. Beasley RP: **Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 1988, **61**:1942-1956.
136. McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, Bulkow L, Lanier AP: **Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers.** *Arch Intern Med* 1990, **150**:1051-1054.
137. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW: **Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep).** *Gut* 2000, **46**:420-426.
138. Benvegna L, Fattovich G, Noventa F, Tremolada F, Chemello L, Cecchetto A, Alberti A: **Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study.** *Cancer* 1994, **74**:2442-2448.
139. Tsai JF, Jeng JE, Ho MS, Chang WY, Hsieh MY, Lin ZY, Tsai JH: **Effect of hepatitis C and B virus infection on risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study.** *Br J Cancer* 1997, **76**:968-974.
140. Feitelson MA: **Hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis.** *J Cell Physiol* 1999, **181**:188-202.
141. Wu CG, Forgues M, Siddique S, Farnsworth J, Valerie K, Wang XW: **SAGE transcript profiles of normal primary human hepatocytes expressing oncogenic hepatitis B virus X protein.** *Faseb J* 2002, **16**:1665-1667.
142. Yeh CT: **Hepatitis B virus X protein: searching for a role in hepatocarcinogenesis.** *J Gastroenterol Hepatol* 2000, **15**:339-341.
143. Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C: **Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants.** *Virology* 2002, **292**:44-58.
144. Xu Z, Jensen G, Yen TS: **Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum.** *J Virol* 1997, **71**:7387-7392.
145. Tine F, Liberati A, Craxi A, Almasio P, Pagliaro L: **Interferon treatment in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis of the published literature.** *J Hepatol* 1993, **18**:154-162.
146. Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L, Haussinger D: **Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B.** *N Engl J Med* 1996, **334**:1422-1427.
147. Thomas H, Foster G, Platis D: **Mechanisms of action of interferon and nucleoside analogues.** *J Hepatol* 2003, **39 Suppl 1**:S93-98.
148. Thomas HC, Karayiannis P, Brook G: **Treatment of hepatitis B virus infection with interferon. Factors predicting response to interferon.** *J Hepatol* 1991, **13 Suppl 1**:S4-7.

149. Craxi A, Di Bona D, Camma C: **Interferon alpha for HBeAg positive chronic hepatitis B : systematic review.** In *EASL International Consensus Conference on Hepatitis B, 13-14 september 2002.* Geneva, Switzerland; 2002.
150. Brunetto MR, Oliveri F, Coco B, Leandro G, Colombatto P, Gorin JM, Bonino F: **Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study.** *J Hepatol* 2002, **36**:263-270.
151. Cooksley WGE, Piratvisuth T, Wang YJ, Mahachai V, Chao YC, Tanwandee T, Chutaputti A, Chang WY, Zahm FE, Pluck N: **Evidence for the efficacy of peginterferon alfa-2a (PEGASYS) in the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B and impact of baseline factors (abstract).** *J Hepatol* 2002, **36 (suppl 1)**:8.
152. Manesis EK, Hadziyannis SJ: **Interferon alpha treatment and retreatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B.** *Gastroenterology* 2001, **121**:101-109.
153. Papatheodoridis GV, Manesis E, Hadziyannis SJ: **The long-term outcome of interferon-alpha treated and untreated patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B.** *J Hepatol* 2001, **34**:306-313.
154. Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, et al: **Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B.** *N Engl J Med* 2004, **351**:1206-1217.
155. Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, et al: **Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy.** *Hepatology* 2001, **33**:1527-1532.
156. Lok AS, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi A, Grazi GL, Jovine E, Benardi M, Andreone P: **Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy.** *Hepatology* 2000, **32**:1145-1153.
157. Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papadimitropoulos V, Hadziyannis SJ: **Course of virologic breakthroughs under long-term lamivudine in HBeAg-negative precore mutant HBV liver disease.** *Hepatology* 2002, **36**:219-226.
158. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA: **Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States.** *N Engl J Med* 1999, **341**:1256-1263.
159. Schalm SW, Heathcote J, Cianciara J, Farrell G, Sherman M, Willems B, Dhillon A, Moorat A, Barber J, Gray DF: **Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial.** *Gut* 2000, **46**:562-568.
160. Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, Hawley S, Barber J, Condreay L, Gray DF: **Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B.** Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology* 1999, **29**:889-896.
161. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaioannou C: **Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B.** *Hepatology* 2000, **32**:847-851.
162. Rizzeto M: **Efficacy of lamivudine in HBeAg-negative chronic hepatitis B.** *J Med Virol* 2002, **66**:435-451.
163. Dienstag JL, Schiff ER, Mitchell M, Casey DE, Jr., Gitlin N, Lissoos T, Gelb LD, Condreay L, Crowther L, Rubin M, Brown N: **Extended lamivudine retreatment for chronic hepatitis B: maintenance of viral suppression after discontinuation of therapy.** *Hepatology* 1999, **30**:1082-1087.
164. Calio R, Villani N, Balestra E, Sesa F, Holy A, Balzarini J, De Clercq E, Perno CF, Del Gobbo V: **Enhancement of natural killer activity and interferon induction by different acyclic nucleoside phosphonates.** *Antiviral Res* 1994, **23**:77-89.
165. Perrillo R, Schiff E, Yoshida E, Statler A, Hirsch K, Wright T, Gutfreund K, Lamy P, Murray A: **Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants.** *Hepatology* 2000, **32**:129-134.

166. Willems B, Lau GK, Leung N, Schiff E, Trepo C, Wright T: **Safety and efficacy of adding adefovir dipivoxil to lamivudine therapy in compensated chronic hepatitis B with YMDD variant HBV and a reduced response to lamivudine : 52-week results (abstract).** *Hepatology* 2002, **36**:1891.
167. Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, et al: **Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B.** *N Engl J Med* 2003, **348**:808-816.
168. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Wulfsohn MS, et al: **Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B.** *N Engl J Med* 2003, **348**:800-807.
169. Xiong S, Yang H, Westland E, Delaney WE, Colledge D, Bartholomeusz A: **Resistance surveillance of HBeAg-negative chronic hepatitis B patients treated for two years with adefovir dipivoxil.** In *38th EASL, 3-6 July 2003.* Geneva, Switzerland; 2003.
170. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, et al: **Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B.** *N Engl J Med* 2005, **352**:2673-2681.
171. Zoulim F: **Assessing hepatitis B virus resistance in vitro and molecular mechanisms of nucleoside resistance.** *Semin Liver Dis* 2002, **22 Suppl 1**:23-31.
172. Asselah T, Ripault MP, Castelnau C, Giuily N, Boyer N, Marcellin P: **The current status of antiviral therapy of chronic hepatitis B.** *J Clin Virol* 2005, **34 Suppl 1**:S115-124.
173. de Franchis R, Hadengue A, Lau G, Lavanchy D, Lok A, McIntyre N, Mele A, Paumgartner G, Pietrangelo A, Rodes J, et al: **EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version).** *J Hepatol* 2003, **38**:533-540.
174. Kessler HH: **Comparison of currently available assays for detection of hepatitis B virus DNA in the routine diagnostic laboratory.** *Expert Rev Mol Diagn* 2005, **5**:531-536.
175. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A: **An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques.** *Vox Sang* 2001, **80**:63-71.
176. Stelzl E, Muller Z, Marth E, Kessler HH: **Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by automated sample preparation and real-time PCR.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:2445-2449.
177. Chemin I, Zoulim F, Merle P, Arkhis A, Chevallier M, Kay A, Cova L, Chevallier P, Mandrand B, Trepo C: **High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology.** *J Hepatol* 2001, **34**:447-454.
178. Kwiatkowski RW, Lyamichev V, de Arruda M, Neri B: **Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay.** *Mol Diagn* 1999, **4**:353-364.
179. Coleman PF: **Detecting hepatitis B surface antigen mutants.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:198-203.
180. Hoofnagle JH, Seeff LB, Bales ZB, Zimmerman HJ: **Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen.** *N Engl J Med* 1978, **298**:1379-1383.
181. Hu KQ: **Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications.** *J Viral Hepat* 2002, **9**:243-257.
182. Jilg W, Sieger E, Zachoval R, Schatzl H: **Individuals with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker for hepatitis B infection: high percentage of carriers of hepatitis B and C virus.** *J Hepatol* 1995, **23**:14-20.
183. Gomes SA, Yoshida CF, Niel C: **Detection of hepatitis B virus DNA in hepatitis B surface antigen-negative serum by polymerase chain reaction: evaluation of different primer pairs and conditions.** *Acta Virol* 1996, **40**:133-138.
184. Zhang YY, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, Nordenfelt E: **Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg.** *Hepatology* 1993, **17**:538-544.

185. Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C: **Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 1995, **21**:313-321.
186. Lorient MA, Marcellin P, Bismuth E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Degott C, Erlinger S, Benhamou JP: **Demonstration of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in the serum and the liver after spontaneous or therapeutically induced HBeAg to anti-HBe or HBsAg to anti-HBs seroconversion in patients with chronic hepatitis B.** *Hepatology* 1992, **15**:32-36.
187. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P: **Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"?** *Hepatology* 2001, **34**:194-203.
188. Tsiang M, Rooney JF, Toole JJ, Gibbs CS: **Biphasic clearance kinetics of hepatitis B virus from patients during adefovir dipivoxil therapy.** *Hepatology* 1999, **29**:1863-1869.
189. Mason AL, Xu L, Guo L, Kuhns M, Perrillo RP: **Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen.** *Hepatology* 1998, **27**:1736-1742.
190. Cabrerizo M, Bartolome J, Caramelo C, Barril G, Carreno V: **Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases.** *Hepatology* 2000, **32**:116-123.
191. Chemin I, Trepo C: **Clinical impact of occult HBV infections.** *J Clin Virol* 2005, **34 Suppl 1**:S15-21.
192. Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, Zhang M, Caouette S, Nicolle LE, Gutkin A, Doucette K, Martin B, Giulivi A: **Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population.** *J Hepatol* 2005, **42**:480-485.
193. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G: **Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease.** *N Engl J Med* 1999, **341**:22-26.
194. Koike K, Kobayashi M, Gondo M, Hayashi I, Osuga T, Takada S: **Hepatitis B virus DNA is frequently found in liver biopsy samples from hepatitis C virus-infected chronic hepatitis patients.** *J Med Virol* 1998, **54**:249-255.
195. Piroth L, Binquet C, Vergne M, Minello A, Livry C, Bour JB, Buisson M, Duong M, Grappin M, Portier H, Chavanet P: **The evolution of hepatitis B virus serological patterns and the clinical relevance of isolated antibodies to hepatitis B core antigen in HIV infected patients.** *J Hepatol* 2002, **36**:681-686.
196. Hofer M, Joller-Jemelka HI, Grob PJ, Luthy R, Opravil M: **Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. Swiss HIV Cohort Study.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998, **17**:6-13.
197. Nunez M, Rios P, Perez-Olmeda M, Soriano V: **Lack of 'occult' hepatitis B virus infection in HIV-infected patients.** *Aids* 2002, **16**:2099-2101.
198. Shire NJ, Rouster SD, Rajcic N, Sherman KE: **Occult hepatitis B in HIV-infected patients.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004, **36**:869-875.
199. Rodriguez-Torres M, Gonzales-Garcia J, Mendes-Correa M, et al: **Prevalence of occult HBV in HIV/HCV co-infected patients in a large, multinational trial (APRICOT).** *J Hepatol* 2003, **38**:S165-S166.
200. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gunther S, Hess G, Hudig H, Kitchen A, Margolis H, et al: **Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop.** *J Med Virol* 2000, **62**:450-455.
201. Gandhi RT, Wurcel A, Lee H, McGovern B, Boczanowski M, Gerwin R, Corcoran CP, Szczepiorkowski Z, Toner S, Cohen DE, et al: **Isolated antibody to hepatitis B core antigen in human immunodeficiency virus type-1-infected individuals.** *Clin Infect Dis* 2003, **36**:1602-1605.
202. Kazemi-Shirazi L, Petermann D, Muller C: **Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronic hepatitis C.** *J Hepatol* 2000, **33**:785-790.

203. Denis F, Adjide CC, Rogez S, Delpyroux C, Rogez JP, Weinbreck P: **[Seroprevalence of HBV, HCV and HDV hepatitis markers in 500 patients infected with the human immunodeficiency virus]**. *Pathol Biol (Paris)* 1997, **45**:701-708.
204. Iwai K, Tashima M, Itoh M, Okazaki T, Yamamoto K, Ohno H, Marusawa H, Ueda Y, Nakamura T, Chiba T, Uchiyama T: **Fulminant hepatitis B following bone marrow transplantation in an HBsAg-negative, HBsAb-positive recipient; reactivation of dormant virus during the immunosuppressive period**. *Bone Marrow Transplant* 2000, **25**:105-108.
205. Cabrerizo M, Bartolome J, De Sequera P, Caramelo C, Carreno V: **Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff**. *J Am Soc Nephrol* 1997, **8**:1443-1447.
206. Minuk GY, Sun DF, Greenberg R, Zhang M, Hawkins K, Uhanova J, Gutkin A, Bernstein K, Giulivi A, Osiowy C: **Occult hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patient population**. *Hepatology* 2004, **40**:1072-1077.
207. Ahn SH, Park YN, Park JY, Chang HY, Lee JM, Shin JE, Han KH, Park C, Moon YM, Chon CY: **Long-term clinical and histological outcomes in patients with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance**. *J Hepatol* 2005, **42**:188-194.
208. Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Crax A, Farinati F, Missale G, Smedile A, Tiribelli C, et al: **Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection**. *Gastroenterology* 2004, **126**:102-110.
209. Huo TI, Wu JC, Lee PC, Chau GY, Lui WY, Tsay SH, Ting LT, Chang FY, Lee SD: **Sero-clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis**. *Hepatology* 1998, **28**:231-236.
210. Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, Terre S, D'Errico A, Grigioni W, Nalpas B, Franco D, Wands J, Kew M, et al.: **Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen**. *N Engl J Med* 1990, **323**:80-85.
211. De Maria N, Colantoni A, Friedlander L, Leandro G, Idilman R, Harig J, Van Thiel DH: **The impact of previous HBV infection on the course of chronic hepatitis C**. *Am J Gastroenterol* 2000, **95**:3529-3536.
212. Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M, Hamamoto S, Satoh S, Tanaka S, Kushiyama Y, Uchida Y, Iihara S, Akagi S, et al: **Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance**. *J Med Virol* 1999, **58**:201-207.
213. Uchida T, Kaneita Y, Gotoh K, Kanagawa H, Kouyama H, Kawanishi T, Mima S: **Hepatitis C virus is frequently coinfecting with serum marker-negative hepatitis B virus: probable replication promotion of the former by the latter as demonstrated by in vitro cotransfection**. *J Med Virol* 1997, **52**:399-405.
214. Khan MH, Farrell GC, Byth K, Lin R, Weltman M, George J, Samarasinghe D, Kench J, Kaba S, Crewe E, Liddle C: **Which patients with hepatitis C develop liver complications?** *Hepatology* 2000, **31**:513-520.
215. Zignego AL, Fontana R, Puliti S, Barbagli S, Monti M, Careccia G, Giannelli F, Giannini C, Buzzelli G, Brunetto MR, et al: **Impaired response to alpha interferon in patients with an inapparent hepatitis B and hepatitis C virus coinfection**. *Arch Virol* 1997, **142**:535-544.
216. Puoti M, Torti C, Bruno R, Filice G, Carosi G: **Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients**. *J Hepatol* 2006, **44**:S65-70.
217. Raimondo G, Balsano C, Craxi A, Farinati F, Levrero M, Mondelli M, Pollicino T, Squadrito G, Tiribelli C: **Occult hepatitis B virus infection**. *Dig Liver Dis* 2000, **32**:822-826.
218. Chamorro AJ, Casado JL, Bellido D, Moreno S: **Reactivation of hepatitis B in an HIV-infected patient with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005, **24**:492-494.
219. Altfeld M, Rockstroh JK, Addo M, Kupfer B, Pult I, Will H, Spengler U: **Reactivation of hepatitis B in a long-term anti-HBs-positive patient with AIDS following lamivudine withdrawal**. *J Hepatol* 1998, **29**:306-309.

220. Manegold C, Hannoun C, Wywiol A, Dietrich M, Polywka S, Chiwakata CB, Gunther S: **Reactivation of hepatitis B virus replication accompanied by acute hepatitis in patients receiving highly active antiretroviral therapy.** *Clin Infect Dis* 2001, **32**:144-148.
221. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K: **Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B.** *Hepatology* 1998, **27**:1377-1382.
222. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV: **The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response.** *Nat Med* 1996, **2**:1104-1108.
223. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, Bertoletti A, Pilli M, Chisari FV, Rehermann B, Del Prete G, Fiaccadori F, Ferrari C: **Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B.** *J Clin Invest* 1996, **98**:1185-1194.
224. Schories M, Peters T, Rasenack J: **Isolation, characterization and biological significance of hepatitis B virus mutants from serum of a patient with immunologically negative HBV infection.** *J Hepatol* 2000, **33**:799-811.
225. Paterlini P, Poussin K, De Mitri S, Kew M, Grigioni W, Franco D, Brechot C: **Rate of persistence, structure, and expression of HBV genome in HCC developing in HBsAg-negative patients.** In *Viral hepatitis and Liver disease, Second Edition*. Edited by Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T. Tokyo: Springer-Verlag; 1994: 757-762
226. Khan N, Guarnieri M, Ahn SH, Li J, Zhou Y, Bang G, Kim KH, Wands JR, Tong S: **Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene.** *J Virol* 2004, **78**:3262-3270.
227. Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F: **Hepatitis B virus mutants.** *Intervirology* 1999, **42**:69-80.
228. Zuckerman AJ, Zuckerman JN: **Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutants.** *J Med Virol* 1999, **58**:193-195.
229. Roque-Afonso AM, Ferey MP, Belkhir D, Dussaix E: **[HBs antigen mutants: prevalence, clinical and diagnostic implications].** *Pathol Biol (Paris)* 2005, **53**:563-568.
230. Xu Z, Yen TS: **Intracellular retention of surface protein by a hepatitis B virus mutant that releases virion particles.** *J Virol* 1996, **70**:133-140.
231. Bock CT, Tillmann HL, Maschek HJ, Manns MP, Trautwein C: **A preS mutation isolated from a patient with chronic hepatitis B infection leads to virus retention and misassembly.** *Gastroenterology* 1997, **113**:1976-1982.
232. Melegari M, Bruno S, Wands JR: **Properties of hepatitis B virus pre-S1 deletion mutants.** *Virology* 1994, **199**:292-300.
233. Locarnini S: **Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis.** *J Hepatol* 2003, **39 Suppl 1**:S124-132.
234. Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, Ueda Y, Tanaka K, Shimotohno K, Chiba T: **Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen.** *Hepatology* 2000, **31**:488-495.
235. Poussin K, Dienes H, Sirma H, Urban S, Beaugrand M, Franco D, Schirmacher P, Brechot C, Paterlini Brechot P: **Expression of mutated hepatitis B virus X genes in human hepatocellular carcinomas.** *Int J Cancer* 1999, **80**:497-505.
236. Fukuda R, Ishimura N, Kushiyama Y, Moriyama N, Ishihara S, Chowdhury A, Tokuda A, Sakai S, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S: **Hepatitis B virus with X gene mutation is associated with the majority of serologically "silent" non-b, non-c chronic hepatitis.** *Microbiol Immunol* 1996, **40**:481-488.
237. Francisci D, Baldelli F, Papili R, Stagni G, Pauluzzi S: **Prevalence of HBV, HDV and HCV hepatitis markers in HIV-positive patients.** *Eur J Epidemiol* 1995, **11**:123-126.
238. Liaw YF, Chien RN, Chen TJ, Sheen IS, Chu CM: **Concurrent hepatitis C virus and hepatitis delta virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection.** *J Med Virol* 1992, **37**:294-297.

239. Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Filippini P, Santantonio T, Stroffolini T, Piccinino F: **Virologic and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C, and delta viruses in patients with chronic hepatitis.** *Hepatology* 2000, **32**:1106-1110.
240. Chu CM, Yeh CT, Sheen IS, Liaw YF: **Acute hepatitis C virus (HCV) infection in chronic carriers of hepatitis B virus (HBV): the impact of underlying active HBV replication on persistence of HCV infection and antibody responses to HCV.** *Gut* 2002, **51**:95-99.
241. Shih CM, Chen CM, Chen SY, Lee YH: **Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation.** *J Virol* 1995, **69**:1160-1171.
242. Schuttler CG, Fiedler N, Schmidt K, Repp R, Gerlich WH, Schaefer S: **Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein.** *J Hepatol* 2002, **37**:855-862.
243. Chen SY, Kao CF, Chen CM, Shih CM, Hsu MJ, Chao CH, Wang SH, You LR, Lee YH: **Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein.** *J Biol Chem* 2003, **278**:591-607.
244. Murakami Y, Minami M, Daimon Y, Okanoue T: **Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen.** *J Med Virol* 2004, **72**:203-214.
245. Rodriguez-Inigo E, Mariscal L, Bartolome J, Castillo I, Navacerrada C, Ortiz-Movilla N, Pardo M, Carreno V: **Distribution of hepatitis B virus in the liver of chronic hepatitis C patients with occult hepatitis B virus infection.** *J Med Virol* 2003, **70**:571-580.
246. Torii N, Hasegawa K, Joh R, Hayashi N: **Configuration and replication competence of hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis B patients and patients who have recovered from acute self-limited hepatitis.** *Hepatol Res* 2003, **25**:234-243.
247. Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari FV: **Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis.** *J Clin Invest* 1994, **93**:230-239.
248. Roche B, Feray C, Gigou M, Roque-Afonso AM, Arulnaden JL, Delvart V, Dussaix E, Guettier C, Bismuth H, Samuel D: **HBV DNA persistence 10 years after liver transplantation despite successful anti-HBs passive immunoprophylaxis.** *Hepatology* 2003, **38**:86-95.
249. Feray C, Zignego AL, Samuel D, Bismuth A, Reynes M, Tiollais P, Bismuth H, Brechot C: **Persistent hepatitis B virus infection of mononuclear blood cells without concomitant liver infection. The liver transplantation model.** *Transplantation* 1990, **49**:1155-1158.
250. Brind A, Jiang J, Samuel D, Gigou M, Feray C, Brechot C, Kremsdorf D: **Evidence for selection of hepatitis B mutants after liver transplantation through peripheral blood mononuclear cell infection.** *J Hepatol* 1997, **26**:228-235.
251. Michalak TI, Pardoe IU, Coffin CS, Churchill ND, Freake DS, Smith P, Trelegan CL: **Occult lifelong persistence of infectious hepadnavirus and residual liver inflammation in woodchucks convalescent from acute viral hepatitis.** *Hepatology* 1999, **29**:928-938.
252. Stoll-Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Kreuder J, Kann M, Lampert F, Gerlich WH: **Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients.** *J Virol* 1997, **71**:5399-5407.
253. Mason A, Yoffe B, Noonan C, Mearns M, Campbell C, Kelley A, Perrillo RP: **Hepatitis B virus DNA in peripheral-blood mononuclear cells in chronic hepatitis B after HBsAg clearance.** *Hepatology* 1992, **16**:36-41.
254. Kock J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ: **Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus.** *Hepatology* 1996, **23**:405-413.
255. Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Enomoto M, Koh N, Takeda T, Shiomi S, Hirohashi K, Kinoshita H, Otani S: **Sequencing of human-viral DNA junctions in hepatocellular carcinoma from patients with HCV and occult HBV infection.** *J Med Virol* 2003, **69**:475-481.
256. Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Narimatsu T, Habu D, Takeda T, Hirohashi K, Shiomi S: **HBV DNA integration and HBV-transcript expression in non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan.** *J Med Virol* 2003, **71**:492-498.

257. Lai MY, Chen PJ, Yang PM, Sheu JC, Sung JL, Chen DS: **Identification and characterization of intrahepatic hepatitis B virus DNA in HBsAg-seronegative patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Taiwan.** *Hepatology* 1990, **12**:575-581.
258. Kawai S, Yokosuka O, Imazeki F, Maru Y, Saisho H: **State of HBV DNA in HBsAg-negative, anti-HCV-positive hepatocellular carcinoma: existence of HBV DNA possibly as nonintegrated form with analysis by Alu-HBV DNA PCR and conventional HBV PCR.** *J Med Virol* 2001, **64**:410-418.
259. Brechot C, Degos F, Lugassy C, Thiers V, Zafrani S, Franco D, Bismuth H, Trepo C, Benhamou JP, Wands J, et al.: **Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen.** *N Engl J Med* 1985, **312**:270-276.
260. Hada H, Arima T, Togawa K, Okada Y, Morichika S, Nagashima H: **State of hepatitis B viral DNA in the liver of patients with hepatocellular carcinoma and chronic liver disease.** *Liver* 1986, **6**:189-198.
261. Imazeki F, Omata M, Yokosuka O, Okuda K: **Integration of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 1986, **58**:1055-1060.
262. Chen WN, Oon CJ, Toh I: **Altered antigenicities of hepatitis B virus surface antigen carrying mutations outside the common "a" determinant.** *Am J Gastroenterol* 2000, **95**:1098-1099.
263. et données du fabricant
264. Jeantet D, Chemin I, Mandrand B, Tran A, Zoulim F, Merle P, Trepo C, Kay A: **Cloning and expression of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays.** *J Med Virol* 2004, **73**:508-515.
265. Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Chowdhury A, Chakravarty R: **Genotype, phylogenetic analysis, and transmission pattern of occult hepatitis B virus (HBV) infection in families of asymptomatic HBsAg carriers.** *J Med Virol* 2006, **78**:53-59.
266. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS: **Sequence analysis of pre-S/surface and pre-core/core promoter genes of hepatitis B virus in chronic hepatitis C patients with occult HBV infection.** *J Med Virol* 2002, **68**:216-220.
267. Owiredu WK, Kramvis A, Kew MC: **Hepatitis B virus DNA in serum of healthy black African adults positive for hepatitis B surface antibody alone: possible association with recombination between genotypes A and D.** *J Med Virol* 2001, **64**:441-454.
268. Khattab E, Chemin I, Vuillermoz I, Vieux C, Mrani S, Guillaud O, Trepo C, Zoulim F: **Analysis of HCV co-infection with occult hepatitis B virus in patients undergoing IFN therapy.** *J Clin Virol* 2005, **33**:150-157.
269. Shire NJ, Rouster SD, Stanford S, Sherman KE: **High prevalence of mixed HBV genotypes in patients with HIV.** *J Clin Virol* 2006, **36**, suppl2:S189.
270. Ogawa M, Hasegawa K, Naritomi T, Torii N, Hayashi N: **Clinical features and viral sequences of various genotypes of hepatitis B virus compared among patients with acute hepatitis B.** *Hepatol Res* 2002, **23**:167-177.
271. Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, et al: **Clinical features of hepatitis B virus genotype A in Japanese patients.** *J Gastroenterol* 2003, **38**:656-662.
272. Umeda M, Marusawa H, Seno H, Katsurada A, Nabeshima M, Egawa H, Uemoto S, Inomata Y, Tanaka K, Chiba T: **Hepatitis B virus infection in lymphatic tissues in inactive hepatitis B carriers.** *J Hepatol* 2005, **42**:806-812.
273. Wong DK, Yuen MF, Yuan H, Sum SS, Hui CK, Hall J, Lai CL: **Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients.** *Hepatology* 2004, **40**:727-737.
274. Chen Y, Sze J, He ML: **HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage.** *World J Gastroenterol* 2004, **10**:82-85.
275. Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H: **A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients.** *J Virol* 1995, **69**:5437-5444.

276. Michalak TI, Mulrooney-Cousins PM, Coffin CS, Pham TNQ, Gujar SA: **Primary and secondary occult hepadnaviral infections: identification and differential characteristics.** . *J Clin Virol* 2006, **36**, suppl 2:S5.
277. Chen RW, Piiparinen H, Seppanen M, Koskela P, Sarna S, Lappalainen M: **Real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus DNA.** *J Med Virol* 2001, **65**:250-256.
278. Noborg U, Gusdal A, Horal P, Lindh M: **Levels of viraemia in subjects with serological markers of past or chronic hepatitis B virus infection.** *Scand J Infect Dis* 2000, **32**:249-252.
279. Wagner AA, Loustaud-Ratti V, Chemin I, Weinbreck P, Denis F, Alain S: **Double hepatitis B virus infection in a patient with HIV/hepatitis C virus coinfection and 'anti-HBc alone' as serological pattern.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005, **24**:623-627.
280. Drosten C, Nippraschk T, Manegold C, Meisel H, Brixner V, Roth WK, Apedjinou A, Gunther S: **Prevalence of hepatitis B virus DNA in anti-HBc-positive/HBsAg-negative sera correlates with HCV but not HIV serostatus.** *J Clin Virol* 2004, **29**:59-68.
281. Lin ZM, Yatsuhashi H, Daikoku M, Hamada R, Nakao R, Fukuda M, Koga M, Yano M: **Hepatitis B virus of genotype C persistence after recovery from acute hepatitis B virus infection in Japan.** *Hepatol Res* 2003, **25**:244-253.
282. Sengupta S, Durgapal H, Panda SK: **Analysis of surface promoter mutants of HBV: its relation to hepatitis B surface antigen production and secretion.** *J Clin Virol* 2006, **36**, suppl 2:S68.
283. Lo YM, Lo ES, Mehal WZ, Sampietro M, Fiorelli G, Ronchi G, Tse CH, Fleming KA: **Geographical variation in prevalence of hepatitis B virus DNA in HBsAg negative patients.** *J Clin Pathol* 1993, **46**:304-308.
284. Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J: **Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients.** *Gastroenterology* 2002, **123**:1848-1856.
285. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Nowicki M, Rakela J: **Detection and sequence analysis of hepatitis B virus integration in peripheral blood mononuclear cells.** *J Virol* 1999, **73**:1235-1238.
286. Twist EM, Clark HF, Aden DP, Knowles BB, Plotkin SA: **Integration pattern of hepatitis B virus DNA sequences in human hepatoma cell lines.** *J Virol* 1981, **37**:239-243.
287. Minami M, Poussin K, Brechot C, Paterlini P: **A novel PCR technique using Alu-specific primers to identify unknown flanking sequences from the human genome.** *Genomics* 1995, **29**:403-408.
288. Takada S, Gotoh Y, Hayashi S, Yoshida M, Koike K: **Structural rearrangement of integrated hepatitis B virus DNA as well as cellular flanking DNA is present in chronically infected hepatic tissues.** *J Virol* 1990, **64**:822-828.
289. Zoulim F: **Place des variants du virus de l'hépatite B dans le diagnostic et le contrôle de l'hépatite B.** *Médecine et Maladies Infectieuses* 2003, **33**, suppl A:46-51.
290. Romet-Lemonne JL, McLane MF, Elfassi E, Haseltine WA, Azocar J, Essex M: **Hepatitis B virus infection in cultured human lymphoblastoid cells.** *Science* 1983, **221**:667-669.
291. Zeldis JB, Mugishima H, Steinberg HN, Nir E, Gale RP: **In vitro hepatitis B virus infection of human bone marrow cells.** *J Clin Invest* 1986, **78**:411-417.

ANNEXES

ANNEXE I

Article

Génotypes du virus de l'hépatite B.

A Wagner, F Denis, S Ranger-Rogez, V Loustaud-Ratti, S Alain.

Immuno-analyse & Biologie Spécialisée 2004; 19: 330-342.

Revue générale - Analyse prospective

Génotypes du virus de l'hépatite B

Hepatitis B virus genotypes

A. Wagner ^a, F. Denis ^a, S. Ranger-Rogez ^a, V. Loustaud-Ratti ^b, S. Alain ^a

^a Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Dupuytren
2, avenue Martin Luther-King, 87042 Limoges Cedex, France

^b Service de Médecine Interne A, CHU Dupuytren
2, avenue Martin Luther-King, 87042 Limoges Cedex, France

Résumé : Les hépadnavirus peuvent infecter un certain nombre de primates tels que chimpanzés, orangs-outans, gibbons avec des souches phylogénétiquement très proches du virus de l'hépatite B (VHB) humain. Huit génotypes différents, désignés par des lettres de A à H, sont identifiés sur des variations (supérieures à 8%) portant sur la séquence nucléotidique de l'ensemble du génome. Répartis selon des zones géographiques précises, les génotypes influent sur l'évolution de la maladie et sur l'efficacité du traitement. Au delà des génotypes, la variabilité phénotypique du génome du VHB influence les paramètres virologiques et leur interprétation de même que les décisions thérapeutiques.

Abstract : Hepadnaviruses strains infecting primates like to chimpanzee, orangutan and gibbon are phylogenetically closely related to human hepatitis B virus (HBV). Eight genotypes of human HBV, designated A to H, are identified, based on a sequence divergence in the entire genome exceeding 8%. The genotypes show a distinct geographical distribution and influence the course of disease and the prognosis of treatment. The variability of HBV genotypes can influence the interpretation of diagnostic data and the therapeutic decisions.

Mots clés : Virus de l'hépatite B, génotypes, épidémiologie, variabilité, diagnostic.

Keywords : Hepatitis B virus, genotypes, epidemiology, variability, diagnosis

* auteur correspondant

Adresse e-mail : fdenis@unilim.fr

ANNEXE II

Poster

Evaluation of performance of an "in-house" sequencing assay for hepatitis B virus genotypes determination.

A Wagner, G Champier, A Monnet, V Thibault, F Denis, S Alain.

24^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse & 6th European Congress on Chemotherapy and Infection 2004, Paris.

EVALUATION OF PERFORMANCE OF AN "IN-HOUSE" SEQUENCING ASSAY FOR HEPATITIS B VIRUS GENOTYPES DETERMINATION.

A.A. Wagner¹, G. Champier¹, A. Monnet², V. Thibault³, F. Denis¹, S. Alain¹.

¹ Department of Bacteriology-Virology-Hygiene, Teacher Hospital Dupuytren, Limoges, France. ² Bayer Diagnostics, Cergy-Pontoise, France. ³ Department of Virology, CERVI, Teacher Hospital Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

ABSTRACT

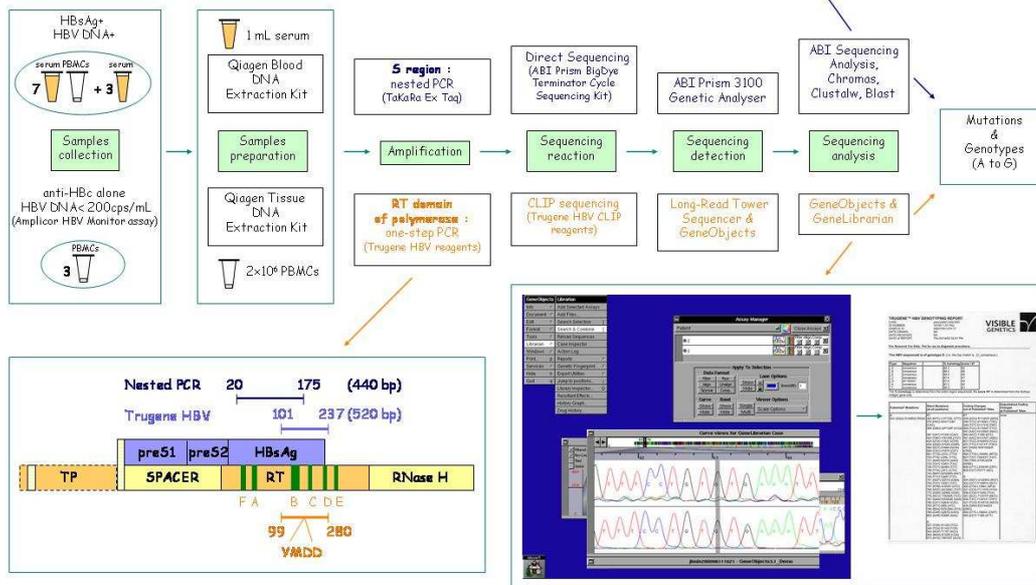
Hepatitis B virus (HBV) genotypes may influence the course of disease and the prognosis of treatment. Therefore, availability of rapid, simple and accurate methods of genotyping may not only be important for HBV epidemiology but may permit more detailed study on the clinical significance of these HBV genotypes.

We aimed to assess the accuracy and reliability of an « in-house » sequencing assay in genotyping peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum HBV isolates.

A total of 20 PBMCs and serum samples found positive for HBV DNA using a nested PCR were selected. Seven coupled PBMCs-serum samples plus 3 sera were collected from Ag-HBs+ patients (viral loads ranging from 414 to over 200000 copies/mL, using the Amplicor HBV Monitor assay), and 3 PBMCs samples from patients with "anti-HBc alone" pattern and undetectable viraemia. All samples were analysed by the « in-house » sequencing assay and by the Trugene HBV Genotyping Kit: the S region (nucleotides 217 to 682) amplified by nested PCR (sensitivity: 350 copies/mL) was directly sequenced using the ABI Prism 3100 Genetic Analyser and genotypes were determined by comparison of the S sequences with all available HBV sequences in the GenBank, using BLAST. Results were compared to those obtained with the Trugene assay, previously validated on serum by Roque-Afonso *et al.*, that sequences the region coding the RT domain of the polymerase and the overlapping S region. The sensibility of the Trugene assay was determined using serial dilutions of a culture supernatant.

The Trugene assay (sensitivity: 100 copies/mL) was not able to detect HBV DNA in the 3 « anti-HBc alone » patients. Using the « in-house » assay, two of the 3 HBV isolates were classified in genotype A and one in genotype D. Full concordance between both methods was observed for the genotyping of the 17 remaining samples: 4 isolates were of genotype A, 2 of genotype B, 2 of genotype C, 1 of genotype D, and 8 of genotype E. Genotypes from PBMC and coupled sera were fully concordant. In conclusion, the « in-house » sequencing assay appears to be a sensitive and reliable tool for determining HBV genotypes as well from serum samples as from PBMCs samples. Both methods may permit better characterisation of PBMCs strains.

METHODS



RESULTS

HBV DNA detection :

- « In-house » assay (sensitivity: 350cps/mL): HBV DNA was detected in all samples
- Trugene HBV assay (sensitivity: 100cps/mL): HBV DNA was detected in all samples from HBsAg+ patients but was undetectable in PBMCs samples from anti-HBc alone patients.

Genotypes (table 1): « In-house » assay results were completely concordant with those of Trugene assay. Full concordance was observed between genotypes from PBMCs and coupled sera.

Mutations in the overlapping S region: No mutations were observed within the S region by direct sequencing neither using the Trugene assay.

	HBsAg +										anti-HBc alone									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13							
Trugene assay	A	A	E	E	C	C	E	E	B	B	E	E	A	A	E	D	E	-	-	-
« in-house » assay	A	A	E	E	C	C	E	E	B	B	E	E	A	A	E	D	E	A	D	A

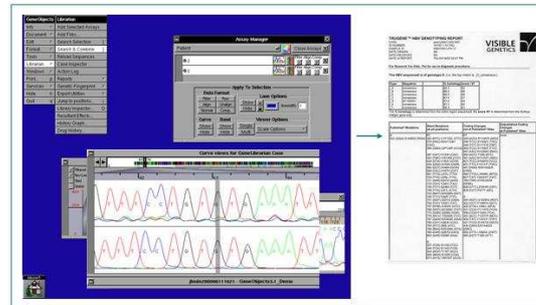
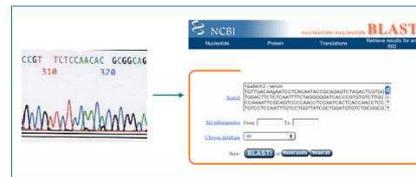
Table 1: HBV genotypes determined by an « in-house » sequencing assay and using the Trugene HBV Genotyping Kit.

INTRODUCTION

Actually B genotypes of HBV, designated A to H, are identified, based on a sequence divergence exceeding 8% in the entire genome or exceeding 4,1% in the S gene. These genotypes influence the course of disease and the prognosis of treatment.

Development of rapid, simple and accurate assays to detect viral genotypes and identify common mutants is important for epidemiological studies and may accelerate research on the clinical significance of these variants.

We aim to assess the accuracy of an « in-house » sequencing assay for determining HBV genotype from serum and PBMCs samples.



CONCLUSION

Nested PCR amplification and direct sequencing of a 440 bp region of the S gene appears to be as sensitive and reliable for determining HBV genotypes as the Trugene HBV genotyping assay.

Both methods can determine HBV genotypes as well from sera as from PBMCs, enabling better characterisation of the PBMCs strains.

REFERENCES

- Roque-Afonso AM, Ferey MP, Mackiewicz V, *et al* Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy in human immunodeficiency virus coinfecting patients: performance of CLIP sequencing and line probe assay. *Antivir Ther* 2003, 8: 627-634.
- Bartholomeusz A and Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004, 14: 3-16.
- Wagner A, Denis F, Ranger-Rogez S, *et al* Genotypes du virus de l'hépatite B. *IBS* 2004. In press.

ANNEXE III

Réaction de séquençage –ABI Prism 3100

Préparation du mélange de réaction

amorces (10 pmol/μL)	2,5 μL
tampon de séquençage 5x (10mM MgCl ₂ - 400mM Tris HCl - pH9)	2,5 μL
mélange Big Dye	2,5 μL
produit PCR purifié	2,5 μL
	<hr/>
	9,5 à 12,5 μL

Amplification

96°C - 10 s	} 25 cycles
50°C - 5 s	
60°C - 4 min	
4°C - ∞	

Purification des produits de séquence : précipitation à l'éthanol en plaques de 96 puits

	pour 1 puits
acétate de sodium 3M	1 μL
EDTA 125 mM	1 μL
éthanol glacial	50 μL
	<hr/>
	52 μL

Mélanger par retournement pendant 15 s et laisser précipiter l'ADN pendant 15 min à température ambiante.

Centrifuger pendant 30 min, à 3300 rpm, à 15°C.

Jeter le surnageant et centrifuger brièvement la plaque retournée pendant 1 min, à 1000 rpm.

Laver le culot avec 50 μL d'éthanol à 70%.

Centrifuger pendant 15 min, à 3300 rpm, à 15°C.

Jeter le surnageant et centrifuger brièvement la plaque retournée pendant 1 min, à 1000 rpm.

Laisser sécher le culot 5 min à température ambiante.

Prendre le culot avec 15 μL de formamide.

Incuber le mélange 3 min, à 95°C.

Placer immédiatement la plaque dans la glace, pendant au moins 3 min.

ANNEXE IV

Extraction phénol – chloroforme – alcool isoamylique

Lyse des protéines à la protéinase K

Ajouter aux cellules 2 volumes de tampon de lyse (10mM, NaCl 10mM, EDTA 10mM, SDS 0,5%, PH8) et 1/10 volume de protéinase K à 10 mg/mL.

Incuber 2 h à 56°C.

Extraction des protéines

Ajouter un volume de mélange phénol – chloroforme – alcool isoamylique (24 :24 :1) et agiter par retournement doux pendant 5 à 10 min.

Centrifuger 10 min à 4000 rpm.

Recueillir la phase aqueuse (phase supérieure) sans perturber l'interface.

Répéter les extractions jusqu'à ce que l'interface soit claire.

Pour éliminer les traces de phénol, ajouter un volume de mélange chloroforme-alcool isoamylique (24 :1) et agiter par retournement doux pendant 5 à 10 min.

Centrifuger 10 min à 4000 rpm.

Recueillir la phase aqueuse (phase supérieure).

Précipitation de l'ADN à l'éthanol glacial

Ajouter 2 volumes d'éthanol glacial et 1 volume d'acétate de sodium 0,3M et agiter par retournement.

Incuber 2 h à -80°C.

Centrifuger 30 min à 10000 rpm, à 4°C. Un culot d'ADN doit être visible.

Pipeter le surnageant sans décoller le culot.

Rincer le culot avec 700 µL d'éthanol à 70 % glacial.

Centrifuger 10 min à 10000 rpm, à 4°C.

Pipeter soigneusement le surnageant.

Laisser sécher le culot à température ambiante puis le remettre en suspension dans 50 à 100 µL de tampon TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, PH8).