

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE



Année : 2008

Thèse N° 3146 4

THESE

pour obtenir le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement le 15 octobre 2008 par

Paul CARRIER,

né le 2 mai 1981 à Limoges.

SCD UNIV.LIMOGES



**CINETIQUE DU CCC DNA ET DE L'ADN DU VIRUS DE
L'HEPATITE B DANS LES LYMPHOCYTES, LE SERUM ET
LE SANG TOTAL AU COURS DU TRAITEMENT DE
L'HEPATITE B CHRONIQUE PAR ADEFOVIR DIPIVOXIL
ET PEGINTERFERON ALPHA2A.**

Thèse dirigée par le Dr Véronique LOUSTAUD-RATTI.

JURY

| | | |
|------------------------------|------------|-------------------|
| Mr Denis SAUTEREAU | Professeur | Président du jury |
| Mme Sophie ALAIN | Professeur | Juge |
| Mme Elisabeth VIDAL-CATHALA | Professeur | Juge |
| Mme Marie Cécile PLOY | Professeur | Juge |
| Mme Véronique LOUSTAUD-RATTI | Docteur | Membre invité |

UNIVERSITE DE LIMOGES FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur LASKAR Marc

Monsieur le Professeur VALLEIX Denis

Monsieur le Professeur PREUX Pierre-Marie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

* C.S = Chef de Service

| | |
|---------------------------------------|---|
| ACHARD Jean-Michel | PHYSIOLOGIE |
| ADENIS Jean-Paul * (C.S) | OPHTALMOLOGIE |
| ALAIN Sophie | BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE |
| ALDIGIER Jean-Claude (C.S) | NEPHROLOGIE |
| ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S) | MEDECINE INTERNE |
| ARNAUD Jean-Paul (C.S) | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| AUBARD Yves (C.S) | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| BEDANE Christophe (C.S) | DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE |
| BERTIN Philippe FF (C.S) | THERAPEUTIQUE |
| BESSEDE Jean-Pierre (C.S) | OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE |
| BONNAUD François (C.S) | PNEUMOLOGIE |
| BONNETBLANC Jean-Marie | DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE |
| BORDESSOULE Dominique (C.S) | HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION |
| CHARISSOUX Jean-Louis | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| CLAVERE Pierre (C.S) | RADIOTHERAPIE |
| CLEMENT Jean-Pierre (C.S) | PSYCHIATRIE ADULTES |
| COGNE Michel (C.S) | IMMUNOLOGIE |
| COLOMBEAU Pierre | UROLOGIE |
| CORNU Elisabeth | CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE |
| COURATIER Philippe | NEUROLOGIE |
| DANTOINE Thierry | GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT |
| DARDE Marie-Laure (C.S) | PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE |
| DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S) | PEDIATRIE |
| DENIS François (C.S) | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE |
| DESCOTTES Bernard (C.S) | CHIRURGIE DIGESTIVE |
| DESPORT Jean-Claude | NUTRITION |
| DUDOIGNON Pierre (Sur 31/08/2009) | MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION |
| DUMAS Jean-Philippe (C.S) | UROLOGIE |
| DUMONT Daniel (C.S) | MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL |
| FEISS Pierre (C.S) | ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE |
| FEUILLARD Jean (C.S) | HEMATOLOGIE |
| GAINANT Alain (C.S) | CHIRURGIE DIGESTIVE |
| GAROUX Roger (C.S) | PEDOPSYCHIATRIE |
| GASTINNE Hervé (C.S) | REANIMATION MEDICALE |
| JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odite | IMMUNOLOGIE |
| LABROUSSE François (C.S) | ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE |
| LACROIX Philippe | MEDECINE VASCULAIRE |
| LASKAR Marc (C.S) | CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE |
| LIENHARDT-ROUSSIE Anne | PEDIATRIE |
| MABIT Christian | ANATOMIE |
| MARQUET Pierre | PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE |

MATHONNET Muriel
MAUBON Antoine (C.S)
MELLONI Boris
MERLE Louis (C.S)
MONTEIL Jacques
MOREAU Jean-Jacques (C.S)
MOULIES Dominique (C.S)
NATHAN-DENIZOT Nathalie
PARAF François
PILLEGAND Bernard (Surnombre 31/08/2008)
PIVA Claude (Surnombre 31/08/2008)
PLOY Marie-Cécile
PREUX Pierre-Marie
RIGAUD Michel (Surnombre 31/08/2010)
SALLE Jean-Yves
SAUTEREAU Denis (C.S)
SAUVAGE Jean-Pierre
STURTZ Franck
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre
TREVES Richard
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel (C.S)
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude (C.S)
VERGNENEGRE Alain (C.S)
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S)
WEINBRECK Pierre (C.S)
YARDIN Catherine (C.S)

CHIRURGIE DIGESTIVE
 RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
 PNEUMOLOGIE
 PHARMACOLOGIE
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
 NEUROCHIRURGIE
 CHIRURGIE INFANTILE
 ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
 ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
 GASTRO ENTEROLOGIE, HEPATHOLOGIE
 MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE
 BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
 EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
 GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE
 OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
 RHUMATOLOGIE
 CANCEROLOGIE
 NEUROLOGIE
 ANATOMIE – CHIRURGIE GENERALE
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
 EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE-PREVENTION
 MEDECINE INTERNE
 REANIMATION MEDICALE
 CARDIOLOGIE
 MALADIES INFECTIEUSES
 CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel
ANTONINI Marie-Thérèse (CS)
BOUTEILLE Bernard
CHABLE Hélène
DAVIET Jean-Christophe
DRUET-CABANAC Michel
DURAND-FONTANIER Sylvaine
ESCLAIRE Françoise
JULIA Annie
LE GUYADER Alexandre
MOUNIER Marcelle
PETIT Barbara
PICARD Nicolas
QUELVEN-BERTIN Isabelle
RONDELAUD Daniel
TERRO Faraj
VERGNE-SALLE Pascale
VINCENT François

Parasitologie et Mycologie
 Physiologie
 Parasitologie - Mycologie
 Biochimie et Biologie Moléculaire
 Médecine physique et réadaptation
 Médecine et Santé au Travail
 Anatomie – Chirurgie Digestive
 Biologie Cellulaire
 Hématologie
 Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
 Bactériologie – virologie – hygiène hospitalière
 Anatomie et cytologie pathologiques
 Pharmacologie Fondamentale
 Biophysique et Médecine Nucléaire
 Cytologie et Histologie
 Biologie Cellulaire
 Thérapeutique
 Physiologie

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie

Anglais

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

BUCHON Daniel
BUISSON Jean-Gabriel

Médecine générale
 Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

DUMOITIER Nathalie
PREVOST Martine

Médecine Générale
 Médecine Générale

Au Professeur Denis SAUTEREAU.
Hépatogastroentérologie.
Praticien hospitalier.

C'est un honneur que d'avoir travaillé dans votre service durant ces quatre années et d'avoir bénéficié de votre enseignement. Malgré vos fonctions et responsabilités, vous nous êtes restés accessibles et nous avez transmis votre passion. Je vous remercie d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Au professeur ALAIN.

Professeur des universités.

Biologiste des hôpitaux.

Bactériologie-Virologie.-Hygiène.

Il n'est permis d'avoir qu'un directeur de thèse. Compte tenu de l'importance de votre implication, vous auriez très bien pu en être le second. Je vous suis reconnaissant de m'avoir permis de faire ce travail et de pénétrer dans votre laboratoire. Avec beaucoup de rigueur et de justesse, vous avez participé à la rédaction et à la relecture de ce présent manuscrit.

Au professeur VIDAL.
Médecine Interne.
Chef de service.

Je vous sais gré d'accepter de juger ce travail. Vous m'expliquiez, il y a cinq ans, votre manque d'intérêt pour ces dédicaces. Néanmoins, croyez en la sincérité de ma reconnaissance pour l'enseignement que vous nous avez prodigué, de cette si belle spécialité qu'est la médecine interne. Nous avons également pu profiter de vos talents de médecin et de management de deux services.

Au professeur PLOY.

Professeur des universités.

Biologiste des hôpitaux.

Bactériologie-Virologie.-Hygiène.

Nous vous remercions de votre présence dans le jury de cette thèse. C'est un honneur que vous puissiez juger ce travail, et espérons qu'il complètera avec qualité les précédentes études sur le cccDNA que vous aviez relues.

Au docteur LOUSTAUD-RATTI.

Praticien hospitalier.

Médecine interne.

Hépatologie.

Ce fut un immense plaisir de travailler cette thèse sous votre direction. Vous nous avez, par la qualité et l'ampleur, difficilement mesurables, de votre investissement, votre pugnacité et votre expertise, durant le peu de temps dont nous disposions, permis de surmonter beaucoup d'écueils. Vous avez su injecter dans ce travail la rigueur et l'expertise qui lui étaient nécessaires. Ce travail, je l'espère, ne sera pas lendemain, de même que notre collaboration.

Nous avons également pu, que ce soit en médecine interne ou en hépatologie, pu apprécier la passion, l'expertise, et le souci constant de soins de qualité dont vous faites preuve et que vous avez su nous transmettre. Par votre parcours, votre professionnalisme, votre disponibilité, vous êtes pour nous un exemple à suivre.

Au professeur PILLEGAND.
Hépatologie-Gastroentérologie.
Médecin des hôpitaux.

Nous aurions tellement apprécié que vous puissiez être parmi nous aujourd'hui. Vous avez été présent sur notre parcours depuis l'enseignement à nos pères jusqu'à nos dernières visites communes, en passant par nos cours à la faculté et nos premiers stages. Vous avez su, par votre respect du patient comme du personnel non médical, par votre sens clinique, votre expérience, transmettre le message d'une médecine plus humaine, telle qu'elle devrait plus souvent pratiquée. Nous espérons être dignes de cet héritage.

Aux médecins du service d'hépatogastro-entérologie.

Au professeur DESPORT,

Nous vous remercions pour la qualité de votre enseignement et de vos conseils.

Au docteur CESSOT,

Nous avons bénéficié de votre expertise en endoscopie et de votre disponibilité à l'intérieur comme à l'extérieur du service. Votre rôle est majeur dans l'intérêt que portent les internes à la spécialité.

Au docteur LE SIDANER.

Votre qualité d'écoute, votre patience et le souci de vos patients ont permis de soulager des positions difficiles, voire conflictuelles. Ainsi, pour nous, sont-ils exemplaires et une source d'inspiration.

Au docteur DEBETTE-GRATIEN.

Tout au long de notre parcours, jusqu'à Paris, vous avez été présente à nos côtés et nous avez transmis la passion de l'hépatologie et de la transplantation. Nous vous félicitons pour ce double bonheur et espérons vous retrouver bientôt à nos côtés.

Au docteur VINCENSINI.

Vous avez su enseigner toutes les facettes de cette spécialité, et bien au-delà à toute une génération d'internes. Soyez assurés de notre reconnaissance, de notre amitié et de notre confiance en votre avenir.

Au docteur SEILLAN.

Aujourd'hui encore, vous nous surprenez par votre sagacité. Ce fut un plaisir d'avoir bénéficié de votre savoir. Recevez ici un témoignage de notre amitié et la preuve de notre assurance pour la suite de votre carrière.

Au docteur NGOMIRAKIZA.

Nous espérons qu'un jour, le présent ouvrage sera dans vos mains. Croyez en nos meilleurs souvenirs.

Au docteur DALOKO LONFO.

Nous avons eu le plaisir de partager votre expérience, et souhaitons que celle-ci se prolonge.

Au service de virologie-CNR CMV.

Nous sommes reconnaissants de l'accueil que vous nous avez réservés. Nous tenons à remercier plus particulièrement pour sa patience (beaucoup de patience), son affabilité et sa rigueur Madame Virginie LACHAISE, sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé dans le temps qui nous était imparti. Nous remercions également Madame Béatrice BOYER et Madame Valérie MARCZUK pour leur précieuse aide, Madame le docteur Marie-Claire BACLET pour son expertise et ses explications techniques. Cette thèse est également la vôtre.

Au professeur Annick ROUSSEAU.

Nous vous sommes gré pour votre précieuse aide dans la réalisation des statistiques.

A madame Annie LEFEBVRE.

Nous avons su apprécier votre gentillesse. Aussi, avez-vous beaucoup consacré de temps et d'énergie pour que ce travail soit fini dans les délais. Recevez ici la preuve de notre reconnaissance.

A la fédération Hépatites du CHU de Limoges.

A mesdames Isabelle BOUTANT, Annick GUILHOT et Monique WALOCHA, pour leur aide à mener ce travail dans les meilleures conditions. Nous avons également pu apprécier la qualité de vos soins et votre professionnalisme de « terrain ».

Aux laboratoires SCHERING-PLOUGH et GILEAD, qui ont aidé au financement de cette étude.

Une pensée pour le docteur WAGNER qui avait intitulé les travaux sur le cccDNA.

Au service de médecine interne A du CHU de Limoges (Professeur VIDAL).

La qualité de vos soins, la politique de service, l'émulation de vos connaissances sont exemplaires. Nous remercions les docteurs LIOZON, LY, FAUCHAIS, BEZANAHARY, NADALON-CHAMBRIER, OUATTARA. Une pensée émue est destinée aux docteurs RHAJEM (avec qui travailler est un plaisir) et GONDRAN (un futur grand interniste, qui a sur rester simple).

Au service de médecine interne de Saint-Junien (Docteur GERARDIN).

Les six mois passés au sein de votre unité furent probablement les plus heureux de notre internat. Votre humanisme nous a profondément marqué. Nous remercions pour la qualité de cet accueil les docteurs GERARDIN, VENOT, MARTIN et BARRIERE.

Au service de réanimation du CHU de Limoges (Professeur GASTINNE).

La recherche de l'excellence à tous les niveaux, le professionnalisme y sont exemplaires. Nous tenons à remercier de nous y avoir accueillis et de nous avoir transmis leur savoir les professeurs GASTINNE, VIGNON et les docteurs FRANCOIS, GOBEAUX, VOULTOURY, CLAVEL, AMIEL, DUGARD et MUCKE. Nous adressons des remerciements particulièrement au docteur PICHON pour l'enseignement de son sens de l'ordre et de la rigueur.

Au service d'hépatologie du centre hépato-biliaire.

Aux professeurs SAMUEL et PELLETIER, aux docteur DUCLOS-VALLEE, ROCHE, nous vous sommes reconnaissants de nous avoir accueillis et de nous avoir fait partager votre expérience et votre expertise internationale. Nous adressons une pensée émue aux docteurs SOBESKY et ANTONINI pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

A mes collègues du service d'hépatogastroentérologie.

A Leila KANAFI, nous regrettons tous les jours ton départ et avons profité pendant ces quatre années de ta gentillesse et de ta motivation.

A Virginie VALGUEBLASSE, avec qui nous avons partagé notre premier stage, il y a neuf ans. Qui eût cru que nous nous retrouvions internes ensemble ? Tu es la collègue dont on rêve. A Eddy et toi, je vous souhaite beaucoup de bonheur, qui devrait peut-être être contemporain de la présentation.

A Marianne PICARD, une autre « enfant » du service. Ton calme et ta gentillesse furent appréciée de tous. C'est une bonheur de poursuivre notre collaboration.

A Alexandre GIRAUD, nous avons débuté notre internat ensemble. Tu as toujours su rester exigeant envers toi, sans te laisser griser. Tu seras un grand médecin.

A Romain LEGROS, le plus doué d'entre nous, que ce soit dans l'exercice manuel ou dans la réflexion intellectuelle.

A Antoine BOUYGUES, j'ai pu apprécier ta camaraderie et ton efficacité.

A Julien MANELFE, qui, depuis, a choisi une autre voie. Nous regrettons ton esprit de groupe.

A Bruno FILLOUX, avec qui nos destins professionnels ont été parallèles depuis le lycée, jusqu'en hépatogastroentérologie. J'ai regretté ton départ. Reçois ici le témoignage de mon amitié.

A mes autres collègues, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, dans les différents services que j'ai précédemment cités, et tout particulièrement Suzana DA COSTA, avec qui, malgré son choix de la voie cardiologique nous avons passé deux étés successifs, durant lesquels elle a dû me supporter.

J'ai une pensée émue également pour l'équipe internationale et multiculturelle de Paul Brousse, avec une dédicace spéciale pour notre Brésilienne, Joyce ROMA.

A l'ensemble des personnels des différents services, qui m'ont accompagné durant les quatre années de mon Internat. Pour avoir dû supporter mes hiéroglyphes durant deux ans, je remercie le service d'hépatogastroentérologie.

Aux externes, qui ont dû subir pendant ces quatre années mon autorité.

A mes parents qui, depuis vingt-huit ans, ont été, dans les bons comme dans les mauvais moments, présents à mes côtés. Vous avez toujours privilégié mon bonheur et mon intérêt avant les vôtres. J'espère que vous serez fiers de ce travail.

Aux docteurs POULAIN, DEGUINGAND, FONTAINE, TRICARD, QUEYROUX, LASFARGEAS, SACHS et bien sûr mon père, merci de m'avoir initié, tôt, à une médecine humaniste.

A mes amis, tant de chemin parcouru ! Je pense très fort à vous tous. Je m'excuse du manque de disponibilité de ces six derniers mois.

ABBREVIATIONS :

| | |
|----------------------|---|
| Aa : | Acides aminés. |
| AASLD : | American Association for the Study of the Liver Diseases ou association américaine pour l'étude des maladies du foie. |
| ADN ou DNA : | Acide DésoxyriboNucléique ou DesoxyruboNucleic Acid. |
| ADNt : | Acide DésoxyriboNucléique total. |
| AgHBc : | Antigène HBc ou protéine de core. |
| AgHBe : | Antigène HBe ou protéine précore. |
| AgHBs : | Antigène HBs ou protéine majeure S (small protein : S). |
| AgHBx : | Antigène HBx ou protéine X. |
| AINS : | Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens. |
| Alb : | Albumine. |
| ALAT ou ALT : | ALanine AminoTransférase. |
| AMM : | Autorisation de Mise sur le Marché. |
| AntiHBe : | Anticorps dirigé contre l'antigène HBe. |
| AntiHBc : | Anticorps dirigé contre l'antigène HBc. |
| AntiHBs : | Anticorps dirigé contre l'antigène HBs. |
| APRI : | ASAT/Platelet Ratio Index ou Ratio ASAT/taux de Plaquettes. |
| ARN ou RNA : | Acide RiboNucléique ou RiboNucleic Acid. |
| ARNm : | Acide RiboNucléique messenger. |
| ARNpg : | ARN pré génomique. |
| ASAT ou AST : | ASparagine AminoTransférase. |
| AZT ou ZDV : | Azidothymidine. |
| BCP : | Basal Core Promoter ou promoteur basal du core. |
| CA : | California. |
| cccDNA : | Covalently closed circular DesoxyruboNucleic Acid ou Acide DésoxyriboNucléique superenroulé. |
| CCPRB : | Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale. |
| CHC ou HCC : | Carcinome Hépatocellulaire ou hépatocarcinome ou hepatocellular carcinoma. |
| CD : | Cluster of differentiation. |
| CMV : | CytoMegaloVirus. |
| CNR : | Centre National de Référence. |
| CPK : | Créatine Pyruvate Kinase. |
| Ct : | Threshold cycle ou cycle de seuil. |
| CTL : | Cytotoxic T Lymphocytes ou lymphocytes T cytotoxiques. |
| Da, KDa : | Daltons, kiloDaltons. |
| DDC : | Zalcitabine. |
| DDI : | Didanosine. |
| DHBV : | Duck Hepatitis B Virus. |
| DMSO : | DiMéthylSulfOxide. |
| DRC : | Direction de la Recherche Clinique. |
| En ou Enh : | Enhancer. |
| GiHBV : | Gibbon Hepatitis B Virus. |
| GoHBV : | Gorilla Hepatitis B Virus. |
| GSHBV : | Ground Squirrel Hepatitis B Virus. |
| GSPA : | Genotype Specific Probe Assay. |
| GUCI : | Göteborg University Cirrhosis Index. |

| | |
|---------------------------|---|
| HAS : | Haute Autorité de Santé. |
| HBcrAg : | Core Protein Antigen ou antigène relié à la protéine de core. |
| HHVB : | Heron Hepatitis B Virus. |
| HLA : | Human Leukocyte (differentiation) Antigens ou antigènes de différenciation des leucocytes humains |
| HSBP : | Hepatitis B Splice Protein ou protéine d'épissage de l'hépatite B. |
| IFN : | Interferon. |
| Ig : | Immunoglobuline. |
| IRIS : | Immune Reconstitution Syndrome ou syndrome de reconstitution immune. |
| IVDU : | Intra-Veinous Drug Use ou Usage de Drogue Intra-Veineux. |
| J : | Jour. |
| LiPA : | Line Probe Assay. |
| M : | Mois. |
| MELD : | Model for End-Liver Disease. |
| MgCl₂ : | Chlorure de Magnésium. |
| MHL : | Major Hydrophilic Loop ou boucle hydrophile majeure. |
| ML : | Millilitre. |
| μL : | Microlitre. |
| MO : | Missouri. |
| NIH : | National Institute of Health. |
| NK : | Natural Killer. |
| NT : | Natural |
| OuHBV : | Orang-outan Hepatitis B Virus. |
| OMS ou WHO : | Organisation mondiale de la Santé ou World Health Organization. |
| ORF : | Open Reading Frame ou cadre de lecture ouverte. |
| PAN : | PériArtérite Noueuse. |
| PBMC : | Peripheral Blood Mononuclear Cells ou cellules mononucléées du sang périphérique. |
| PEG : | Pégylé. |
| PCR : | Plasmid Chain Reaction ou Réaction en Chaîne de la Plasmide. |
| pgRNA : | Pregenomic RNA (RiboNucleic Acid) ou ARN (Acide RiboNucléique) pré-génomique. |
| PMEA : | 9-[2-(phosphonométhoxy)éthyl]adénine. |
| Pr : | Professeur. |
| préC : | PréCore. |
| préC/C : | PréCore/Core. |
| RCA : | Rolling Circle Amplification. |
| rcDNA : | Relaxed Circular DesoxyriboNucleic Acid ou Acide DésoxyriboNucléique sous forme relâchée. |
| RFLP : | Restriction Fragment Length Polymorphism ou analyse par polymorphisme de restriction. |
| ROR : | Rougeole Oreillons Rubéole. |
| RR : | Relative Risk ou Ratio Risk. Risque Relatif. |
| RT : | Reverse Transcriptase ou Transcriptase Inverse. |
| Rx : | Treat ou traitement |
| S : | Semaine. |
| TH : | T helpers. |
| TNFα : | Tumor Necrosis Factor Alpha. |
| TP : | Terminal Protein ou protéine terminale. |

| | |
|---------------------|--|
| TLM : | TransLocation Motif ou motif de translocation. |
| TSHBV : | Tree Squirrel Hepatitis B Virus. |
| UI ou IU : | Unités Internationales ou International Unit. |
| ULN : | Upper Limit of the Normal ou limite supérieure de la normale. |
| USA : | United States of America ou Etats-Unis d'Amérique. |
| VIH ou HIV : | Virus de l'Immunodéficience Humaine ou Human Immunodeficiency Virus. |
| VHB ou HVB : | Virus de l'Hépatite B ou Hepatitis B virus. |
| VHC ou HVC : | Virus de l'Hépatite C ou Hepatitis C virus. |
| VQC : | Viral Quality Control ou contrôle de Qualité Virale. |
| WHBV : | Woodchuck Hepatitis B Virus. |
| WI : | Wisconsin. |
| WMHBV : | Whool Monkey Hepatitis B Virus. |
| YMDD : | Tyrosine Méthionine Aspartate Aspartate. |

TABLEAUX :

- Tableau 1 :** Prévalence de l'AgHBs en France selon la zone géographique d'origine.
Tableau 2 : Les infections prévalentes en France en fonction du mode de contamination.
Tableau 3 : Les infections incidentes en France en fonction du mode de contamination.
Tableau 4 : Stratégies thérapeutiques.
Tableau 5 : Résultats des tests de résistance croisée in vitro.
Tableau 6 : Comparaison des principaux tests commerciaux actuellement disponibles pour la quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B.

FIGURES ET GRAPHIQUES :

- Figure 1 :** Samuel Blumberg.
- Figure 2 :** Programme franco-sénégalais « Prévention Hépatites et Cancer du foie ».
- Figure 3 :** Analyse phylogénétique des souches humaines et simiennes de virus de l'hépatite B.
- Figure 4 :** Morphologie du virus de l'hépatite B.
- Figure 5 :** Représentation schématique des différents constituants du virus de l'hépatite B.
- Figure 6 :** Génome du virus de l'hépatite B et phases de lecture.
- Figure 7 :** Topologie transmembranaire de la protéine S.
- Figure 8 :** Topologie transmembranaire de la protéine moyenne.
- Figure 9 :** Topologie transmembranaire de la grande protéine.
- Figure 10 :** Modélisation informatique des protéines de capsid du virus de l'hépatite B.
- Figure 11 :** Structure de la polymérase du virus de l'hépatite B.
- Figure 12 :** Cycle réplcatif du virus de l'hépatite B.
- Figure 13 :** Représentation du génome du virus de l'hépatite B.
- Figure 14 :** Représentation schématique des principales séquences régulatrices du génome du virus de l'hépatite B impliquées dans la transcription virale.
- Figure 15 :** Réplication de l'ADN viral à l'intérieur de la capsid.
- Figure 16 :** Initiation de la transcription inverse.
- Figure 17 :** Réplication de l'ADN viral à l'intérieur de la capsid.
- Figure 18 :** Répartition géographique des différents génotypes du virus de l'hépatite B.
- Figure 19 :** Principales mutations dans la MHL.
- Figure 20 :** Répartition mondiale du virus de l'hépatite B.
- Figure 21 :** Répartition géographique française de la prévalence de l'AgHBs chez les patientes enceintes.
- Figure 22 :** Réponse cellulaire T cytotoxique.
- Figure 23 :** Evolution de la répartition des AgHBe positifs et négatifs de 1994 à 2003.
- Figure 24 :** Les différents types de réponse en fonction de la famille d'antiviral instaurée.
- Figure 24 :** Les différents types de réponse en fonction de la famille d'antiviral instaurée.
- Figure 25 :** Algorithme pour le sui des patients porteurs du virus de l'hépatite B.
- Figure 26 :** Mutations de résistance actuellement connues pour la lamivudine et l'adéfovir.
- Figure 27 :** Principe des PCR permettant l'amplification sélective du cccDNA.
- Figure 28 :** Evolution des marqueurs virologiques et sérologiques après une hépatite aiguë d'évolution favorable.
- Figure 29 :** Evolution des marqueurs virologiques et sérologiques après une hépatite aiguë évoluant vers la chronicité.
- Figure 30 :** Schéma thérapeutique de l'étude.
- Figure 31 :** Schéma figuratif du fonctionnement des amorces.
- Figure 32 :** Effets de la digestion par la DNase.
- Figure 33 :** Traitement des mélanges d'ADN total et de cccDNA par DNase.

- Graphe 1 :** Corrélations entre PCR temps réel dans le sérum et le Taqman 48 dans le plasma.
- Graphes 2 et 3 :** Corrélations entre PCR temps réel dans le sérum et le Taqman 48 dans le plasma chez les patients Ag HBe+ et les patients Ag HBe-.
- Graphe 4 :** Corrélation Taqman 48 dans le plasma et notre PCR en temps réel dans le sang total.
- Graphes 5 et 6 :** Corrélation Taqman 48 dans le plasma et notre PCR en temps réel dans le sang total chez les patients Ag HBe+ et Ag HBe-.
- Graphe 7 :** Effet « matrice » ADN total : corrélation ADN total sérum / ADN total sang total.
- Graphes 8 et 9 :** Effet « matrice » ADN total : corrélation ADN total sérum / ADN total sang total chez les patients Ag HBe+ et Ag HBe-.
- Graphe 10 :** Distribution log(cccDNA) sérique et log(ADN total dans le sérum).
- Graphe 11 :** Corrélation cccDNA sérum / cccDNA sang total.
- Graphe 12 :** Effet réservoir des PBMC pour l'ADNt.
- Graphes 13 et 14 :** Effet réservoir des PBMC pour l'ADNt pour les patients Ag *HBe + et AgHBe-.
- Graphe 15 :** Distribution des points cccDNA sérum/cccDNA PBMC.
- Graphe 16 :** Distribution des points cccDNA dans les PBMC et ADNt dans le sérum.
- Graphe 17 :** Corrélation cccDNA PBMC et ALAT.
- Graphe 18 :** Corrélation cccDNA sérique et ALAT.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 23 |
| CHAPITRE I : LE VIRUS DE L'HEPATITE B | 25 |
| A. Historique..... | 25 |
| 1. Les premières observations | 25 |
| 2. L'apparition des sciences modernes..... | 25 |
| 3. L'ère du microscope électronique | 26 |
| B. Taxonomie du virus de l'hépatite B | 28 |
| C. Structure..... | 29 |
| 1. Morphologie | 29 |
| 2. Organisation génomique | 31 |
| 3. Les protéines du VHB | 33 |
| 3.1. Les protéines d'enveloppe | 33 |
| 3.2. Les protéines de core et précore | 38 |
| 3.3. La polymérase virale | 40 |
| 3.4. La protéine X..... | 41 |
| 3.5. La protéine HBSP..... | 41 |
| D. Cycle de réplication | 41 |
| 1. Interaction du VHB avec les hépatocytes et entrée du virus..... | 42 |
| 2. Formation de l'ADN circulaire superenroulé..... | 43 |
| 3. Synthèse des ARN viraux | 44 |
| 4. Séquences régulatrices | 45 |
| 4.1. Promoteurs viraux | 45 |
| 4.2. Signaux d'encapsidation | 47 |
| 5. Encapsidation et synthèse des brins (-) et (+) de l'ADN viral | 49 |
| 6. Recyclage de la nucléocapside et sécrétion des particules virales | 50 |
| D. Variabilité du virus de l'hépatite B..... | 51 |
| 1. Mécanismes de la variabilité génétique | 51 |
| 2. Les géotypes du VHB | 52 |
| 2.1. Définition et classification | 52 |
| 2.2. Répartition géographique | 52 |
| 2.3. Coinfections et recombinaisons | 53 |
| 2.4. Pathogénie des géotypes..... | 54 |
| 3. Les variants phénotypiques | 55 |
| 3.1. Les mutants préC/C | 55 |
| 3.2. Les mutants S | 56 |
| 3.3. Les mutants P | 57 |
| 4. Modèles d'étude | 58 |
| 4.1. Cultures cellulaires | 58 |
| 4.2. Modèles animaux | 59 |

| | |
|---|------------|
| CHAPITRE II : L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE B | 61 |
| A. Epidémiologie de l'hépatite virale B | 61 |
| 1. Répartition géographique | 61 |
| 2. Evolution de l'épidémiologie mondiale | 62 |
| 3. Epidémiologie en France..... | 63 |
| B. Physiopathologie de l'infection B | 65 |
| 1. Modes de transmission | 65 |
| 2. Immunopathologie et mécanismes d'élimination virale | 67 |
| 2. Mécanismes de persistance virale | 69 |
| 2.1. Facteurs propres à l'hôte | 69 |
| 2.2. Facteurs viraux | 69 |
| 3. Histoire naturelle de l'infection B | 71 |
| 3.1. Hépatite aiguë..... | 71 |
| 3.2. Hépatite chronique | 72 |
| 3.3. Carcinome hépatocellulaire (CHC)..... | 75 |
| 3.4. Formes particulières d'infection du virus de l'hépatite B | 76 |
| 3.5. Implication clinique..... | 81 |
| C. Traitements du virus de l'hépatite B | 82 |
| 1. Bases du traitement | 82 |
| 1.1. Données histologiques..... | 83 |
| 1.2. Marqueurs non-invasifs..... | 84 |
| 2. Traitements préventifs..... | 85 |
| 2.1. Vaccination..... | 85 |
| 2.2. Immunothérapie passive..... | 86 |
| 3. Traitements curatifs..... | 88 |
| 3.1. Interféron et interféron pégylé..... | 90 |
| 3.2. Les analogues nucléosidiques | 91 |
| 3.3. Les analogues nucléotidiques..... | 95 |
| 3.4. Résistance aux antiviraux..... | 96 |
| 3.5. Autres traitements | 97 |
| 4. Modalités thérapeutiques..... | 97 |
| 4.1. Hépatite aiguë..... | 97 |
| 4.2. Hépatite chronique sans cirrhose ou avec cirrhose compensée..... | 97 |
| 4.3. Cirrhose décompensée..... | 99 |
| 4.4. Carcinome hépatocellulaire | 99 |
| 4.5. Prise en charge en cas de résistance aux antiviraux | 99 |
| 4.6. Coinfection hépatite B-hépatite Δ | 101 |
| 4.7. Coinfection hépatite B-HIV | 101 |
| 4.8. Coinfection hépatite B-hépatite C | 102 |
| 4.9. Femmes enceintes | 102 |
| 4.10. Prise en charge chez les enfants | 103 |
| 4.11. En cas d'immunosuppression..... | 104 |
| 4.12. Chez les insuffisants rénaux | 105 |
| 4.13. Professionnels de santé..... | 105 |
| 4.14. Chez les patients transplantés hépatiques..... | 105 |
| D. Diagnostic virologique..... | 107 |
| 1. Détection du génome viral | 107 |
| 1.1. Quantification de l'ADN total..... | 107 |

| | |
|---|------------|
| 1.2. Détection des variants du virus de l'hépatite B..... | 109 |
| 1.3. Recherche des formes persistantes de l'ADN du VHB..... | 112 |
| 2. Diagnostic sérologique..... | 114 |
| 2.1. Le système HBs..... | 114 |
| 2.2. Le système HBc..... | 114 |
| 2.3. Le système HBe..... | 114 |
| 3. Cinétique d'apparition des marqueurs..... | 115 |
| 3.1. Hépatite aiguë..... | 115 |
| 3.2. Hépatite fulminante..... | 116 |
| 3.2. Hépatite chronique..... | 117 |
| 3.4. Carcinome hépatocellulaire..... | 118 |
| 4. Profils sérologiques atypiques..... | 118 |
| 4.1. Profils liés à la présence de variants du VHB..... | 118 |
| 4.2. Anticorps anti-HBc isolés..... | 118 |
| CHAPITRE III : NOTRE ETUDE..... | 118 |
| A. Rationnel..... | 119 |
| 1. Les difficultés posées par la persistance du virus..... | 119 |
| 1.1. La guérison virologique..... | 119 |
| 1.2. L'intérêt du cccDNA..... | 121 |
| 2. Le choix de l'association de l'adefovir dipivoxil et du peginterféron..... | 124 |
| 2.1. L'adefovir dipivoxil..... | 124 |
| 2.2. Le peginterféron alpha2a..... | 127 |
| 2.3. L'intérêt d'une association thérapeutique..... | 130 |
| B. Objectifs..... | 135 |
| 1. Objectif principal..... | 135 |
| 2. Objectifs secondaires..... | 136 |
| C. Matériels et méthodes..... | 136 |
| 1. Patients..... | 136 |
| 1.1. Nombre et origine..... | 136 |
| 1.2. Critères d'éligibilité..... | 136 |
| 2. Déroulement de l'étude..... | 137 |
| 2.1. Calendrier du suivi virologique..... | 138 |
| 2.2. Calendrier thérapeutique..... | 139 |
| D. Techniques virologiques..... | 140 |
| 1. Synthèse des recherches virologiques..... | 140 |
| 1.1. Quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B dans le sérum..... | 140 |
| 1.2. Quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B dans le sang total..... | 140 |
| 1.3. Quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B dans les lymphocytes..... | 140 |
| 2. Description des techniques..... | 141 |
| 2.1. PCR usuelles par amplification de cible et de signal..... | 141 |
| 2.2. Description de la technique de PCR « maison » temps réel..... | 142 |
| 2.3. Validation des techniques..... | 148 |
| 3. Report des données et méthodes statistiques..... | 153 |
| E. Résultats..... | 154 |
| 1. Caractéristiques cliniques..... | 154 |
| 2. Résultats virologiques..... | 155 |

| | |
|--|------------|
| 2.1. Dans le sérum | 155 |
| 2.2. Dans les lymphocytes | 155 |
| 2.3. Expression du cccDNA en pourcentage d'ADN total..... | 155 |
| 2.4. Génotypes..... | 156 |
| 2.5. Mutations précore..... | 156 |
| 3. Evolution sous bithérapie | 156 |
| 3.1. Evolution globale | 156 |
| 3.2. Etude de corrélation technique | 157 |
| 3.3. cccDNA sérique et sang total, corrélation avec l'ADN total sérum | 164 |
| 3.4. Rôle des PBMC..... | 168 |
| 3.5. Effet cytolyse..... | 173 |
| F. Discussion | 175 |
| 1. Aspects Techniques..... | 176 |
| 1.1. La PCR en temps réel par LightCycler, une méthode éprouvée et efficace.... | 176 |
| 1.2. Des mesures entourées de précaution..... | 177 |
| 1.3. Nouvelles perspectives pour affiner nos techniques | 178 |
| 2. Apport du dosage du cccDNA et de l'ADNt dans les PBMC..... | 180 |
| 2.1. Modèles expérimentaux | 180 |
| 2.2. Modèles cliniques..... | 182 |
| 3. Quelle utilisation clinique des données ? | 189 |
| 3.1. Le cccDNA, un mauvais marqueur de suivi | 189 |
| 3.2. Le cccDNA sérique, facteur prédictif de l'évolution de la maladie virale..... | 190 |
| 3.3. Lien entre Ag HBs sérique et cccDNA sérique ou lymphocytaire | 191 |
| 4. Conclusions et perspectives | 192 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 194 |
| ANNEXES..... | 225 |

INTRODUCTION.

L'hépatite B est un grave problème de santé mondiale, avec 400 millions de porteurs chroniques et 1 million de décès qui lui sont attribuables. En effet, si les chances de guérison spontanée sont importantes après le premier contact chez l'adulte (95 %), le risque en cas de chronicité de développer une cirrhose et un carcinome hépato-cellulaire nécessite l'instauration de traitements adaptés.

Ces dernières années sont marquées par des progrès techniques considérables, d'une part dans la détection du virus et d'autre part grâce l'arrivée sur le marché de molécules de plus en plus efficaces.

Le nouveau challenge auquel vont être confrontés les hépatologues, infectiologues et virologues dans un proche futur est celui de la guérison.

Les marqueurs sérologiques actuels (détection des antigènes de surface associés à la capsidite et des anticorps correspondants) servent principalement au diagnostic de la maladie principale et pour certains d'entre eux, ainsi que pour le taux sérique du virus de l'hépatite B, à son suivi. Toutefois, l'émergence de nouveaux outils de quantification virologique nous amène à rediscuter les définitions de guérison virologique employées jusqu'ici. Parmi ceux-ci, le plus intéressant semble être le cccDNA (covalently closed circular DesoxyrubeNucleic Acid), ou ADN superenroulé. Il s'agit de la forme prolongée de l'ADN du virus de l'hépatite B, qui sert également de matrice pour la transcription des ARN viraux par la polymérase. Cette durabilité lui confère un rôle majeur dans les réactivations, notamment en cas d'immunosuppression ou d'arrêt du traitement. Ceci a été démontré pour la forme intra-hépatique du cccDNA, dont la cinétique a également pu être évalué au cours de thérapies antivirales.

Nous avons préféré nous intéresser à la forme circulante du cccDNA, et plus particulièrement dans sa forme intra-lymphocytaire. Ce travail s'installe en complément d'une étude réalisée dans nos services et qui avait établi le probable rôle du cccDNA intra-lymphocytaire dans les infections occultes. Pour notre part, nous avons voulu montrer l'intérêt que pouvait avoir le dosage cccDNA intra-lymphocytaire dans un suivi thérapeutique, notamment en comparant au gold-standard actuel, représenté par la quantification de l'ADN sérique total.

A cet effet, nous avons choisi une bithérapie séquentielle, associant l'adéfovir dipivoxil et l'interféron pégylé alpha2a, pendant 48 semaines, qui, au moment où cette étude a

été entamée, semblait présenter le plus de chances de succès. Le présent compte-rendu porte sur les 24 premières semaines et intéresse une cohorte de 16 patients.

Par ailleurs, nous avons eu l'opportunité pour nos dosages virologiques de bénéficier de PCR (Plasmid Chain Reaction) réalisées sur LightCycler, dont l'efficacité a déjà été éprouvée.

Après deux premières parties consacrées au virus de l'hépatite B, d'un point de vue biologique et d'un point de vue plus clinique, nous détaillerons les différentes étapes de notre travail et en tirerons les conclusions.

CHAPITRE I : LE VIRUS DE L'HEPATITE B.

A-HISTORIQUE.

.1.Les premières observations.

Les premières descriptions datent du VII^{ème} siècle avant J.C. et sont attribuables aux Sumériens : « La jaunisse : si son corps est jaune, son visage jaune, ses yeux jaunes, si ses chairs deviennent flasques, c'est la jaunisse » [1,2]. Celle-ci serait causée par le démon Ahhâzu. C'est à cette époque que naît l'hépatoscopie, doctrine qui attribue au foie des propriétés nourricières et notamment un rôle de témoin des desseins des dieux (ceci est encore retrouvé de nos jours dans la culture arabe où le foie a la même valeur que le cœur chez les occidentaux.) [3,4].

Le terme d'ictère et la notion d'épidémie apparaissent dans l'œuvre d'Hippocrate [5]. L'origine d'ictère reste floue (*iktis*, fouine, *iktivos*, milan, animaux aux yeux jaunes, ou du loriot, qui pourrait soigner les jaunisses). Hippocrate est également le père de la théorie des quatre humeurs (sang, bile, atrabile et pituite).

.2.L'apparition des sciences modernes.

Malgré quelques travaux intéressants (Galien, Rufus d'Ephèse, ...), peu d'avancées significatives sont apportées avant le XIX^{ème} siècle [1,6,7]. A cette époque se développe la théorie de l'inflammation (Virchow en Allemagne, Broussais et Dieulafoy en France) et naît la microbiologie (Jaenner, Pasteur, ...) [1,8].

Le développement d'épidémies au cours de campagnes de vaccination est décrit pour la première fois en 1883 par Lürman en Allemagne [9]. Le terme d'hépatite sérique est proposé en 1919 par F.Lindstedt, médecin suédois [10]. De nombreux travaux et expériences sont menés durant l'entre-deux guerres, dont W.P. Havens en fera la synthèse en 1945, constatant une hépatite d'incubation courte et de transmission oro-fécale, et une hépatite

d'incubation plus longue et dont la transmission est sanguine [11]. En 1947, MacCallum nomme la première hépatite A, la seconde hépatite B.

.3.L'ère du microscope électronique.

En 1963, Blumberg (Figure 1) et son équipe découvrent, au cours de leurs travaux sur des sérums de patient polytransfusés un antigène qu'ils nomment Antigène Australia (réactif provenant d'un aborigène). Leurs recherches successives leur permettront d'établir un lien entre l'antigène et la survenue d'hépatite [13]. Dane en 1970 identifie au microscope électronique dans le sérum des patients porteurs de cet antigène des particules en cocarde de 42 nanomètres, avec en leur sein une zone plus dense, appelée la capsid [14]. Cette zone correspond à l'antigène Hbc. L'antigène Hbe est découvert en 1972 par Magnius et Epsmarck [15]. L'antigène Australia est finalement reconnu comme étant la protéine d'enveloppe de l'hépatite B, soit l'AgHbs. A titre comparatif, le virus de l'hépatite A est découverte en 1973, celui de l'hépatite D en 1977, celui de l'hépatite C et celui de l'hépatite E en 1989 [1].



Figure 1 : Samuel Blumberg a découvert le virus de l'hépatite B à partir de sérums de patients polytransfusés.

Le vaccin contre le virus de l'hépatite B est réalisé à partir de l'antigène HBs et mis au point par différentes équipes (France, USA, Chine) [1]. Son invention est néanmoins attribuée à Philippe Maupas et son équipe en 1976 [16,17,18] (Figure 2). Ils poursuivent leurs travaux

et établissent le premier vaccin contre le virus de l'hépatite B issu du génie génétique en 1981 [1].

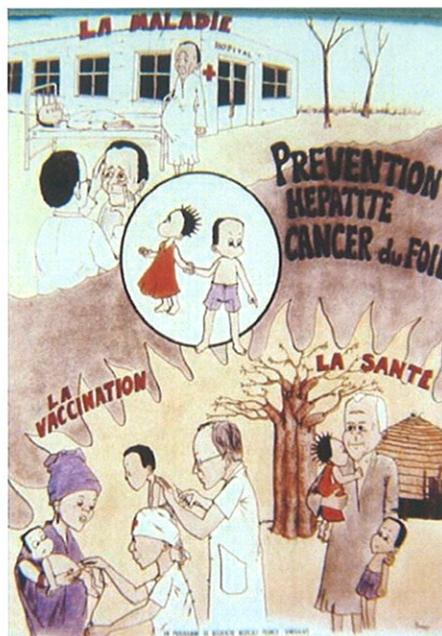


Figure 2 : dès 1976, est instauré un programme « Prévention Hépatites et Cancer du foie » franco-sénégalais Pr. F. Denis, Limoges et Pr. Ph. Maupas, Tours.

Il faut en revanche attendre la deuxième partie des années 1990 pour voir se développer des thérapeutiques à visée curative : l'interféron et sa version pégylée, les dérivés nucléosidiques et nucléotidiques.

B-TAXONOMIE DU VIRUS DE L'HEPATITE B.

Le virus de l'hépatite B (VHB) appartient à la famille des Hepadnaviridae (contraction de « Hepatotropic DNA Viruses », virus à ADN hépatotropes), elle-même constituée de deux genres : Orthohepadnavirus et Avihepadnavirus, qui partagent des caractéristiques communes telles que la morphologie, l'organisation génétique, le mode de répllication, et la spécificité d'hôte [20].

Le genre Avihepadnavirus comprend les virus du héron (Heron Hepatitis B virus : HHVB), de l'oie des neiges (Ross's Goose Hepatitis B virus), de la cigogne (Storck Hepatitis B Virus : STHB), du canard de Pekin (Duck Hepatitis B : DHBV). Ils diffèrent des virus des mammifères par l'absence du gène X.

Le genre Orthohepadnavirus regroupe le virus de l'hépatite B humain ainsi que les virus des rongeurs : le virus de la marmotte américaine (Woodchuck Hepatitis B Virus : WHBV), les virus des écureuils (Tree Squirrel Hepatitis B Virus : TSHBV et Ground Squirrel Hepatitis B Virus : GSHBV) et les virus des singes (GoHBV chez le gorille, OuHBV chez l'orang-outan, GiHBV chez le gibbon, 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 [21] (Figure 3).

Beaucoup de nos connaissances sur les Hepadnaviradae proviennent du WHBV (marmotte) et DBHV (canard).

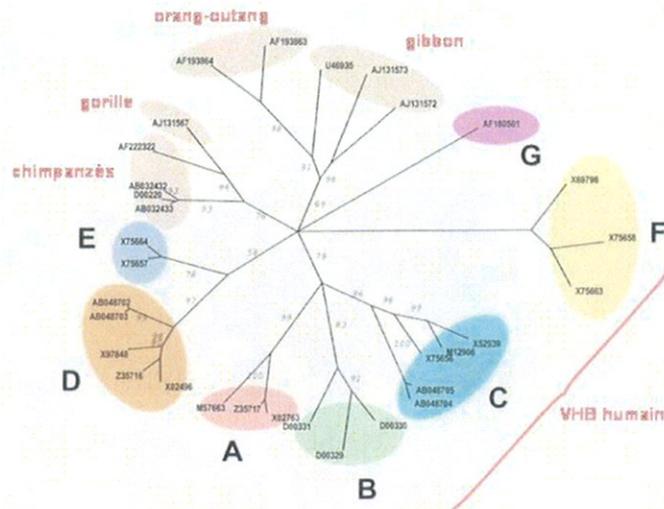


Figure 3 : Analyse phylogénétique des souches humaines et simiennes de virus de l'hépatite B. Les souches sont identifiés par leur numéro d'accèsion à la GenBank (d'après Kidd-Ljunggren et al. [22]).

C-STRUCTURE.

1.Morphologie.

Trois formes du virus de l'hépatite B ont été observées au microscope électronique dans le sérum des patients infectés : des particules infectieuses ou de Dane, et des particules non infectieuses, sphériques ou allongées, correspondant à une production excessive de protéines d'enveloppe (Figure 4).

Les sphères, de 22 nanomètres de diamètre, et les bâtonnets de même diamètre, mais longs de quelques centaines de nanomètres, sont constitués de lipides et de protéines d'enveloppe virales. En revanche, elles ne contiennent pas d'ADN, ce qui leur ôte tout caractère infectieux. Ces particules sont 10 000 à 1 000 000 de fois plus nombreuses que celles de Dane dans le sérum des patients infectés.

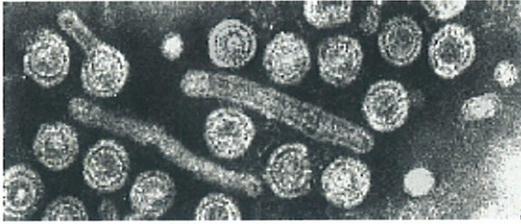
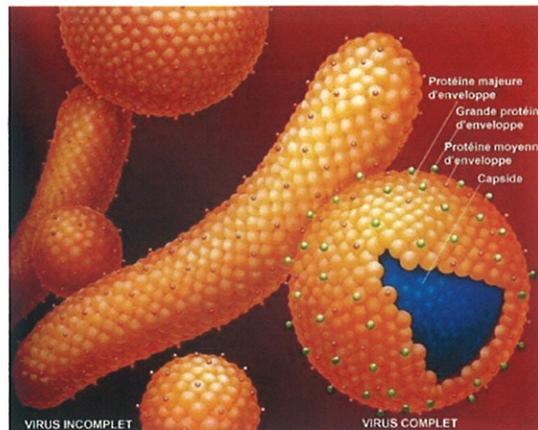
A**B**

Figure 4 : 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.

Le virus complet infectieux est représenté par les particules de Dane. Leur diamètre mesure 44 nanomètres. Elles sont constituées d'une enveloppe lipoprotéique et d'une nucléocapside.

L'enveloppe virale consiste en une bicouche de lipides provenant des cellules hôtes et dans laquelle s'insèrent des protéines de surface virales.

La nucléocapside a une structure icosaédrique et son diamètre est mesuré à 27 nanomètres. Elle protège le génome viral, composé d'un brin (-) et d'un brin (+) d'ADN, et la polymérase virale ARN/ADN dépendante liée par covalence au brin (-) d'ADN (Figure 5). D'autres éléments sont également détectés en son sein, comme des protéines kinases et protéines chaperonnes d'origine cellulaire ainsi que des oligoribonucléotides liés à l'extrémité 3' du brin (+) d'ADN.

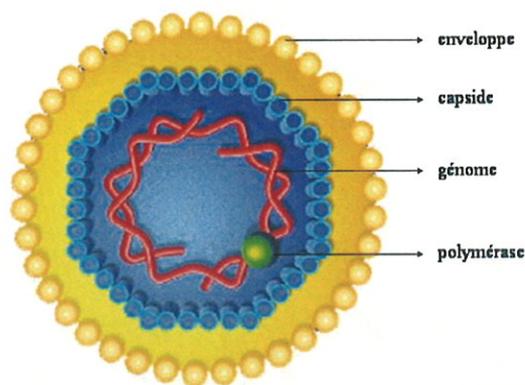


Figure 5 : représentation schématique des différents constituants du virus de l'hépatite B.

.2.Organisation du génome viral [23,24].

Il s'agit d'un génome à ADN, l'un des plus petits connus, d'environ 3,2 kilobases. Dans le virion, le génome est un ADN circulaire, partiellement bicaténaire et non fermé de manière covalente.

Il se compose d'un brin complet long (brin L ou brin moins) et d'un brin court (brin S ou brin plus). Figure 6. L'extrémité 5' du brin plus chevauche les deux extrémités du brin moins dans une zone, nommée région cohésive, assurant la circularité du génome. Le brin moins contient non seulement la totalité du patrimoine génétique mais également une courte redondance terminale en 5' une courte redondance terminale de 9 bases qui chevauche l'extrémité 3'; il présente donc à cet endroit une courte interruption de séquence appelée « gap ». La polymérase est liée de manière covalente à son extrémité 5'. Le brin plus possède à son extrémité 5' un oligoribonucléotide 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 moins.

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 indispensables pour la réplication du virus.

Cette structure, unique chez les animaux, est le résultat d'une stratégie de réplication virale passant par une étape de transcription inverse. En effet, malgré sa petite taille, l'ADN du VHB est porteur d'une grande quantité d'informations, le brin long possédant des séquences codantes dans les trois cadres de lecture transcriptionnelle.

Le génome du VHB possède quatre phases ouvertes de lecture (ORF : Open Reading Frame).

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

-l'ORF C code les protéines de capsidite ou protéines de core. 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 réticulum endoplasmique 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 et s'assemble pour former la capsule virale.

-l'ORF P code la polymérase virale. Il s'agit de la plus longue phase ouverte de lecture. En effet, elle couvre 80 % du génome et chevauche donc partiellement ou totalement toutes les autres phases ouvertes de lecture.

-la plus petite phase ouverte de lecture code une protéine transactivatrice X.

Elles sont toutes situées sur le brin plus et sont chevauchantes. De ce fait, chaque nucléotide participe donc au codage d'au moins une protéine virale et jusqu'à quatre protéines distinctes. De plus, les éléments de régulation (promoteurs et enhanceurs de transcription, signal d'encapsidation, signal de polyadénylation, répétitions exactes) chevauchent eux aussi des phases ouvertes de lecture. Cette extrême complexité est expliquée par la petite taille du génome du VHB, mais impose également des contraintes quant aux variations que le génome peut tolérer.

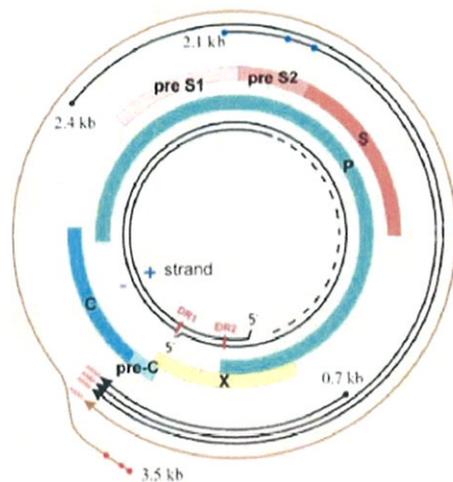


Figure 6 : génome du virus de l'hépatite B et phases de lecture [25].

.3. Les protéines du virus de l'hépatite B [26,27].

.3.1. Les protéines d'enveloppe.

Ces trois protéines sont issues de la phase de lecture ouverte S, à partir de trois codons d'initiation différents, avec toutefois un codon stop commun. Elles forment, avec une bicouche lipidique d'origine cellulaire, l'enveloppe des particules virales. Ces protéines ne diffèrent que par leur extrémité N-terminale, plus ou moins longue. La protéine S a un poids moléculaire de 25 kDaltons (kDa), la protéine L de 39 kDa et la protéine M, de 31 kDa.

La synthèse des protéines d'enveloppe se déroule au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Elles sont directement insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique lors de leur traduction et subissent plusieurs modifications post-traductionnelles de type glycosylation et myristillation. 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.

Elle est la principale composante de l'enveloppe du virus de l'hépatite B (65 % des protéines d'enveloppe dans les virions). Lors de l'infection aiguë, la persistance de l'antigène HBs circulant au-delà de 6 mois est le signe d'un passage de l'infection vers la chronicité.

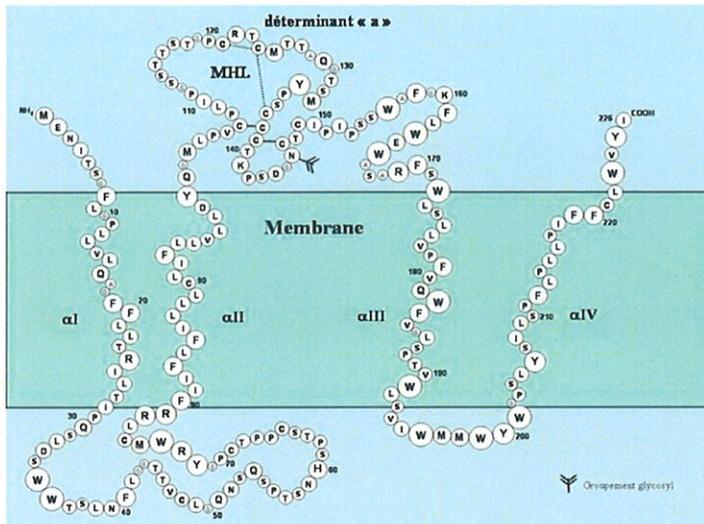
Elle se compose de 226 acides aminés (aa) et existe sous deux formes : non glycosylée (p24) et N-glycosylée au niveau de l'asparagine 146 (gp27). La protéine S migre dans un gel d'acrylamide sous forme d'un doublet de poids moléculaires proches de 24 et de 27 kDa.

La modélisation informatique de sa structure suggère la présence de quatre hélices hydrophobes transmembranaires. La partie N-terminale de l'hélice alpha I (aa 8 à 2) est transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique et est donc exposée à l'extérieur du virus. De même, l'hélice alpha II (aa 80 à 98) s'ancre dans la membrane du réticulum endoplasmique et entraîne une translocation de la région située en aval dans la lumière du réticulum endoplasmique. Les hélices alpha II et alpha IV se constituent une fois la traduction terminée. La région située entre les hélices II et IV forme une boucle dans la lumière du réticulum endoplasmique, stabilisée par des ponts disulfures intra-chaîne établis entre les résidus cystéines. L'asparagine 146 est ainsi exposée à l'action des enzymes lumineuses 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.

L'AgHBs, directement exposé à la surface des particules virales, participe également à la reconnaissance et à la fixation du virus de l'hépatite B aux récepteurs des cellules cibles. En effet, les 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 [29].

Une des propriétés intéressantes de l'AgHBs est sa capacité *in vivo* ou en culture cellulaire à s'assembler pour former des particules qui sont excrétées, expliquant l'excès d'enveloppes vides qu'on trouve chez les patients.

A



B

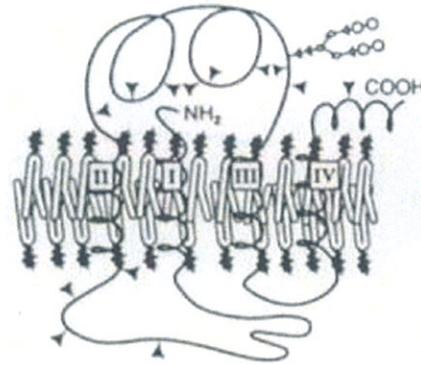


Figure 7 : Topologie transmembranaire de la protéine S. A- Modélisation informatique des quatre hélices α et de la MHL contenant le déterminant « a » (d'après Kay et al. [28]). B- Représentation schématique de l'AgHBs d'après Duclos-Vallee et al.[29].

.3.1.2. La protéine M ou préS2.

La protéine M contient toute la séquence de la protéine S, additionnée de 55 acides aminés à sa partie N-terminale. Elle possède un site de N-glycosylation en position 4 qui est systématiquement utilisé.

Après translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique, le domaine préS2 recouvre partiellement la petite protéine. 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 virus de l'hépatite B [29,30].

La partie N-terminale contient des épitopes antigéniques qui induisent des anticorps protecteurs [29].

Elle migre aussi comme un doublet de 33 et 37 kDa mais sous formes mono- et biglycosylées.

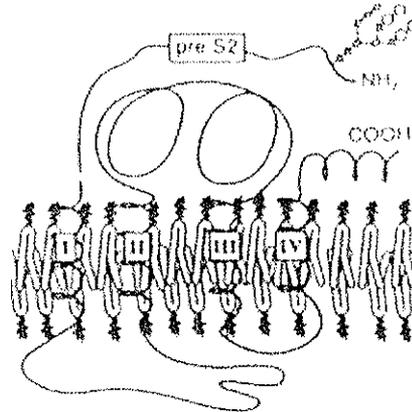


Figure 8 : Topologie transmembranaire de la protéine moyenne (d'après Duclos-Vallée et al. [29]).

.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 situe dans le cytosol des cellules infectées. Au moment de la phase d'excrétion de la particule virale, environ 50 % des protéines L synthétisées sont transloquées à travers la membrane du réticulum endoplasmique. Les protéines transloquées sont exprimées à la surface des virions excrétés ; les protéines non transloquées sont exprimées au niveau de la face interne de l'enveloppe virale (figure 9).

Le domaine préS1, situé sur le versant cytosolique de la membrane du réticulum endoplasmique est susceptible d'interagir avec les protéines de capsid et jouerait un rôle primordial lors de l'étape d'enveloppement des virus [31].

Situé à la surface des virions, le domaine préS1 est un acteur important de l'interaction virus-cellule cible [32,33]. Plusieurs protéines cellulaires capables de fixer la région préS1 ont été identifiées et proposées comme récepteurs potentiels du virus de l'hépatite B [29]. Il est à noter également que le domaine préS1 possède des épitopes antigéniques, susceptibles d'induire des anticorps protecteurs.

Dans les gels d'acrylamide, la protéine L migre aussi comme un doublet. Cependant, le site de glycosylation de la région préS2 n'est pas utilisé. Ce sont des formes non ou monoglycosylées.

La protéine L est quasiment absente des particules d'enveloppe vides et sa détection dans le sérum est un bon indicateur de la quantité de particules virales infectieuses circulantes.

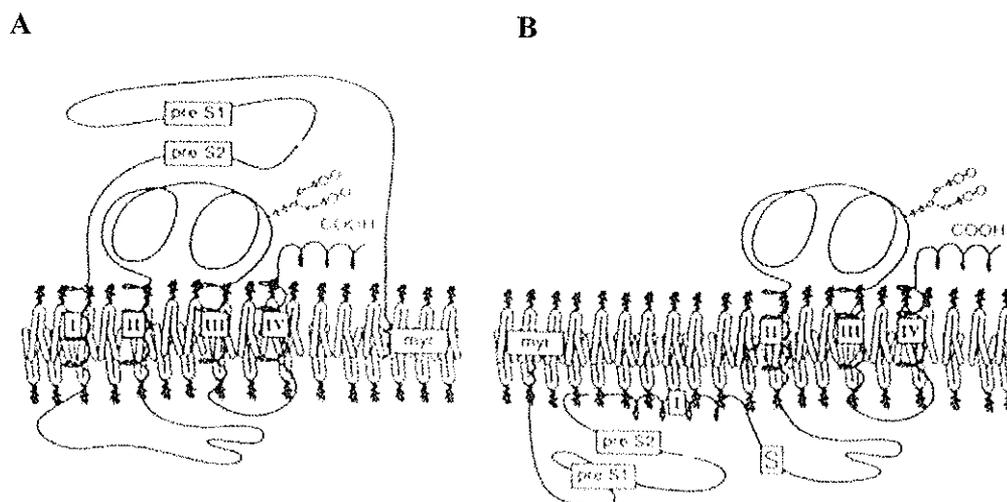


Figure 9 : Topologie transmembranaire de la grande protéine. **A-** Structure après translocation dans la lumière du RE : la protéine L sera exprimée à la surface des particules virales. **B-** Structure après sa biosynthèse et sans translocation vers la lumière du RE : la protéine L restera à l'intérieur des virions.

.3.2. Les protéines de core et précore.

.3.2.1. La protéine de core ou antigène HBc.

Elle est constituée de 183-185 acides aminés et pèse 22 kDa. Sa synthèse se déroule 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 en est la dimérisation des unités protéiques [34]. Il semble qu'une certaine concentration de dimère d'AgHBc soit nécessaire à la constitution de la capsidie icosaédrique, de 180 à 240 sous-unités [35] (Figure 10). Le maintien de la structure icosaédrique est assuré par des ponts disulfures. La région C-terminale basique possède quatre domaines riches en arginine, qui seraient essentiels à l'étape d'encapsidation de l'ARN prégénomique et de la polymérase virale [36,37]. En effet, des sites de phosphorylation sont situés 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 prégénomique. Par ailleurs, un signal de localisation nucléaire a été identifié dans cette structure N-terminale.

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

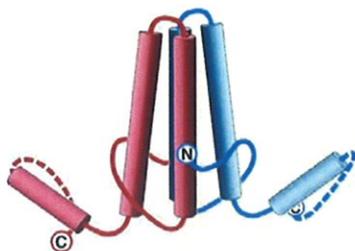
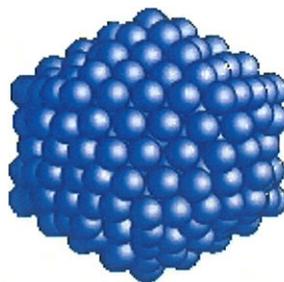
A**B**

Figure 10 : Modélisation informatique des protéines de capsid du VHB, sous forme de dimères (**A**) et assemblées en structure icosaédrique (**B**).

.3.2. La protéine précore ou antigène HBe.

Elle est synthétisée comme une protéine de 25 kDa, possédant 183 à 185 acides aminés de l'AgHBc suivis en N-terminal de 29 acides aminés codés par la région préC. Cette séquence très hydrophobe constitue un peptide signal adressé au réticulum endoplasmique, permettant la translocation de l'AgHBe dans la lumière du réticulum endoplasmique. Après maturation dans le réticulum endoplasmique, la protéine précore est excrétée dans le sérum des patients sous forme d'une protéine de 17 kDa, forme soluble de l'AgHBc. Il arrive que le processus s'interrompe après le clivage du peptide signal et que la protéine résultante soit relarguée dans le cytosol voire dans le noyau de la cellule [38,39].

La fonction exacte de l'AgHBe n'a pas encore été déterminée mais elle n'apparaît pas indispensable à la réplication du virus de l'hépatite B., même si sa présence semble être intimement liée à la phase de réplication. Des études suggèrent que l'AgHBe entraînerait une déplétion des lymphocytes T helpers, et serait donc à l'origine d'une réponse T cytotoxique peu vigoureuse [40,41].

La séroconversion vers un anti-HBe marque, en général, mais pas toujours, la fin de la réplication active et le début de la résolution de l'hépatite.

.3.3. La polymérase virale.

Codée dans la phase de lecture ouverte P, la polymérase virale est une protéine de 850 acides aminés (taille variable selon l'isolat), d'un poids de 90 kDa. C'est à la fois une polymérase ARN-dépendante (transcriptase inverse) et ADN-dépendante (ADN-polymérase). Elle possède une activité RnaseH et sert d'amorce lors de la réplication du brin long [42,43].

Quatre domaines fonctionnels ont été définis (Figure 11) :

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

-une région hypervariable (aa 178 à 346 environ), appelée *Charnière* ou *Espace* ou *Spacer*. Son rôle consiste à 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 ADN-dépendante et ARN-dépendante. Il est composé de 6 zones (A à F) très conservés, dont les modifications de séquences altèrent l'activité de la polymérase. Il montre certaines homologues de séquences avec les autres transcriptases inverses et partage avec ces dernières le même site actif, le motif « YMDD ».

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

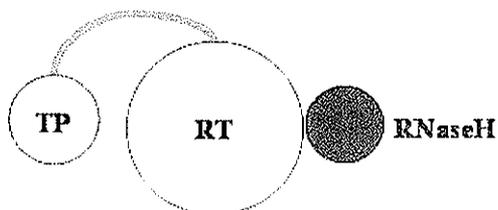


Figure 11 : Structure de la polymérase du VHB.

.3.4. La protéine X.

Cette petite protéine de 154 acides aminés et 17 kDa est la moins bien documentée. Son obtention n'a été soupçonnée qu'après étude des premières séquences du génome du VHB et du VHV où la phase de lecture est très conservée. Son absence chez les hépadnavirus aviaires suggère qu'elle n'est pas impliquée dans les mécanismes de réplication et d'assemblage des protéines virales. Selon certains auteurs, on la retrouverait surtout dans le cytoplasme des cellules infectées et seulement une partie serait présente dans le noyau cellulaire.

Si son rôle *in vivo* n'a pas été clairement défini, des études *in vitro* ont montré que la protéine X était un activateur de la transcription de nombreux gènes cellulaires. Elle ne semble pas interagir via l'ADN, mais plutôt par le biais d'autres facteurs de transcription [44,45,46]. L'AgHBx est également soupçonné, sans preuve établie, d'être impliqué dans le développement des hépatocarcinomes chez les patients chroniquement infectés [46].

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

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

Elle possède des propriétés antigéniques et, *in vitro*, induit l'apoptose des cellules infectées. Cette protéine ne semble pas avoir d'influence sur la réplication virale [47].

.D. Le cycle de réplication.

Grâce notamment au modèle DHBV (canard de Pékin), la réplication virale est assez bien comprise et comporte plusieurs particularités [48,49]. En revanche, l'absence de système *in vitro* adapté explique que les premiers événements de l'infection soient mal connus. La caractéristique majeure de ce cycle est la réplication de l'ADN viral par la transcriptase inverse de l'ARN pré-génomique (Figure 11). A l'inverse des rétrovirus, dont la réplication passe par une phase de transcription inverse, l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire n'est pas nécessaire à la réplication du virus de l'hépatite B.

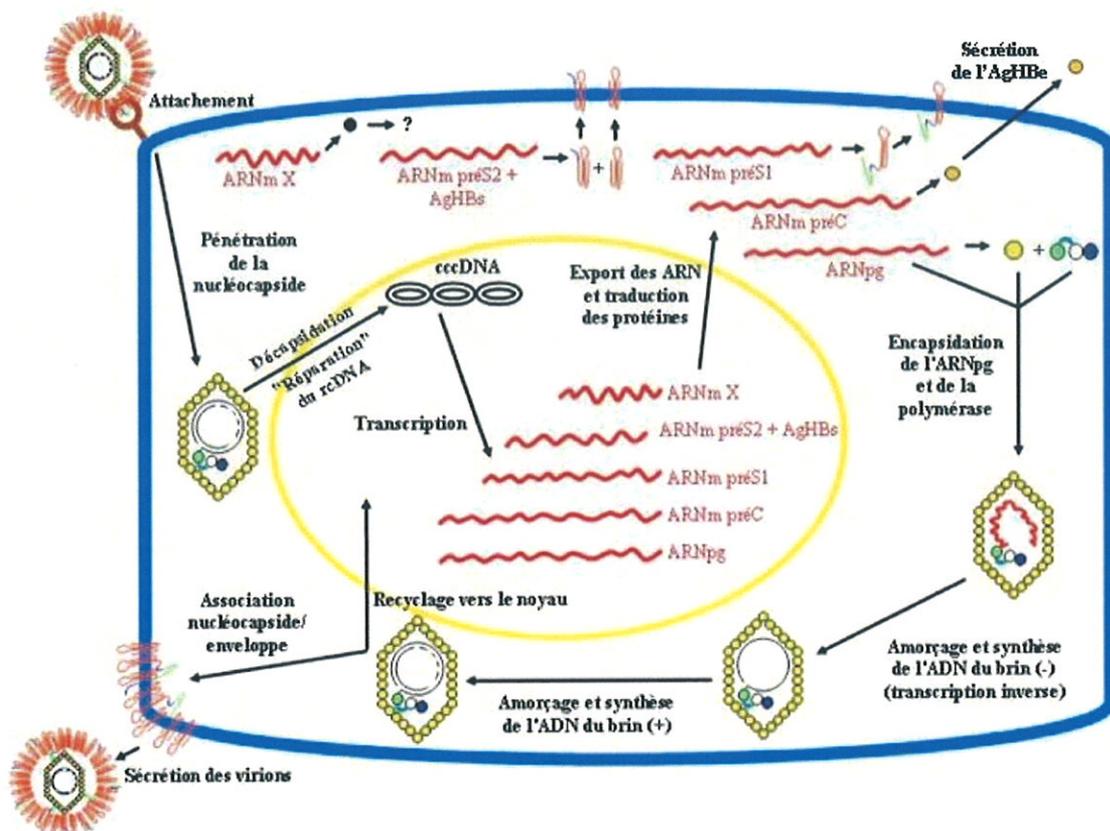


Figure 12 : Cycle répliatif du virus de l'hépatite B (d'après Kay et al. [28]).

.1. Interaction du virus de l'hépatite B avec les hépatocytes et entrée dans la cellule.

Bien que de nombreux travaux aient été consacrés à ce sujet, l'absence de modèle in vitro d'infection hépatocytaire a freiné la compréhension de ses mécanismes, notamment le mode d'entrée du virus. Les études sur le canard de Pékin ont permis d'établir que le domaine préS de la protéine de surface du DBHV interagissait avec une glycoprotéine de 180 kDa (gp180) associée à la famille des carboxypeptidases [50] et que le complexe gp180-DBHV pénétrait par endocytose dans la cellule [51]. Même si les récepteurs diffèrent, ce modèle pourrait être appliqué au virus de l'hépatite B.

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 au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine S [52]. Récemment, il a été mis en évidence l'implication d'un peptide appartenant aux protéines de surface du virus de l'hépatite B

(*translocation motif*: TLM) dans le processus de libération des particules virales de l'endosome dans le cytosol [53].

L'étape suivante est la décapsidation de l'ADN viral et le transport du génome viral vers le noyau. Il semble que les protéines de core, une fois déphosphorylées, jouent un rôle majeur dans le transport du génome viral vers le noyau [54]. Le lieu de la décapsidation n'est pas défini : soit la nucléocapside complète traverse la membrane nucléaire, soit l'ADN seul parvient au noyau.

.2. Formation de l'ADN circulaire superenroulé (cccDNA).

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 12). Cette transformation survient dans les 24 heures qui suivent le début de l'infection par le virus de l'hépatite B [55,56]. Elle nécessite la terminaison de la synthèse du brin plus, l'élimination de l'oligonucléotide fixé à l'extrémité 5', le détachement de la polymérase virale, l'élimination de la partie redondante du brin moins, 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 [57]. L'ordre dans lequel ces événements ont lieu et l'implication de facteurs ou des enzymes cellulaires dans ces processus restent inconnus.

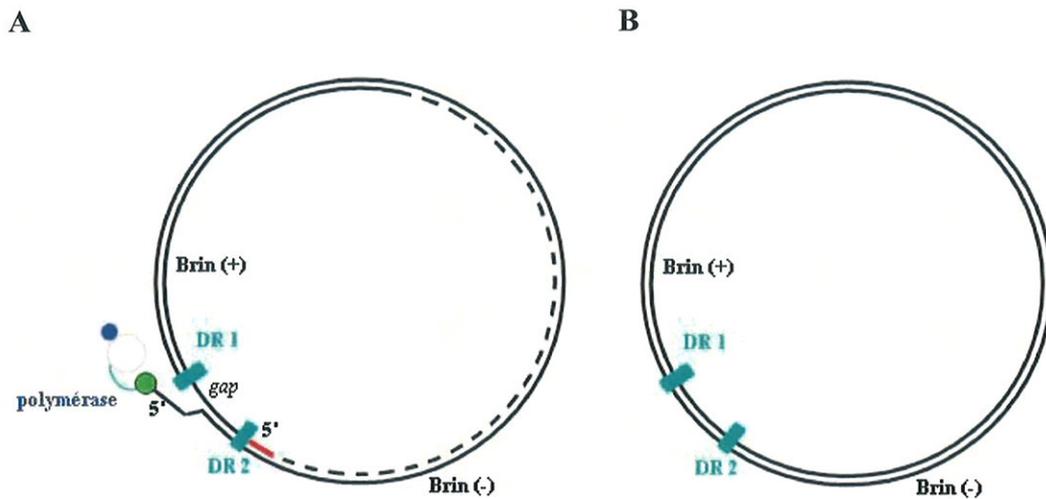


Figure 13 : Représentation du génome du VHB sous forme relâchée (rcDNA) (A) et sous forme superenroulée (cccDNA) (B).

.3.Synthèse des ARN viraux.

Seul le brin moins du cccDNA sert de matrice pour la transcription des ARN viraux par la polymérase. Deux sortes de transcrits sont synthétisés : les ARN génomiques et les ARN subgénomiques. Ces derniers fonctionnent comme ARN messagers pour la traduction des trois protéines d'enveloppe (préS1, préS2, S) et de la protéine X. Les ARN génomiques incluent l'ARN génomique préC qui sera traduit en protéine HBe, et l'ARN prégénomique (ARN_{pg}) 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 plupart des cas, ces ARN viraux ne sont pas épissés. Ils sont exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines.

4. Séquences régulatrices.

4.1. Promoteurs viraux.

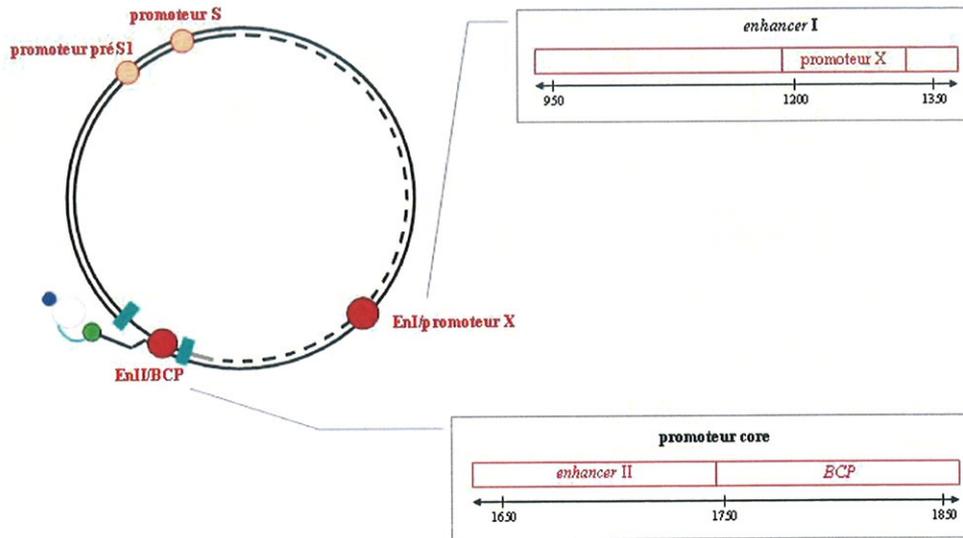


Figure 14 : Représentation schématique des principales séquences régulatrices du génome du VHB impliquées dans la transcription virale (*enhancers* et promoteurs).

La régulation de la transcription est le produit d'interactions complexes entre différents facteurs et les séquences régulatrices du génome du virus de l'hépatite B [58]. Le VHB possède quatre promoteurs et deux « enhancers » (Enh ou En) de la transcription [59] (Figure 13).

-Le promoteur core régule la transcription de deux ARN de 3,5 kb. Ces transcrits ne diffèrent que d'une vingtaine de nucléotides mais ils ont des propriétés très différentes. Le plus long, qui est initié en amont du codon initiateur ATG de la protéine PréC, sert comme ARNm de cette protéine. Le deuxième transcrit, appelé ARN prégénomique (ARN_{pg}) est initié en aval de l'ATG initiateur de la protéine PréC. Il sert comme ARNm pour l'AgHBc et pour la

Pol et aussi comme matrice pour la synthèse de l'ADN du brin moins du génome viral. Les deux transcrits possèdent une redondance terminale. Dans le cas de l'ARNpg, cela est essentiel pour que le virus ne perde pas d'information génétique pendant la réplication de l'ADN. Le promoteur core est constitué d'un noyau appelé promoteur basal du core (*basal core promoter* : BCP). Il contient un site de liaison pour un facteur spécifique du foie, ce qui peut expliquer le tropisme hépatique du virus. Le promoteur basal du core est capable par lui-même d'initier la transcription des ARN PréC et pg, mais son activité est aussi modulée par des séquences de régulation négatives et positives qui se trouvent en amont et qui constituent l'Enh II du virus. L'Enh II est aussi actif essentiellement dans le foie. L'activité du promoteur core est également modulée par l'autre enhancer viral, l'enhancer I (Enh I). L'Enh I se trouve dans le gène P, en amont du gène X.

-Le promoteur PréS1, comme son nom l'indique, contrôle la transcription de l'ARNm de la protéine PréS1, un ARN de 2,4 kb. C'est un promoteur faible qui montre également une spécificité hépatocytaire. L'activité du promoteur est modulée par l'Enh I mais ne l'est apparemment pas par l'Enh II. Le promoteur S initie la transcription des ARNm (2,1 kb) de la protéine PréS2 et de l'AgHBs. Il a une activité promotrice intrinsèque, même dans des cellules non hépatiques. Cependant, il est régulé positivement par l'Enh I et surtout l'Enh II, donc son activité est maximale dans des hépatocytes différenciés.

Le promoteur PréS1 est un promoteur faible, régulé négativement par le promoteur S. Il est en effet important pour le virus de bien contrôler l'expression de PréS1 car un excès de la protéine PréS1 par rapport à l'AgHBs inhibe la sécrétion des particules virales par accumulation dans le réticulum endoplasmique. L'accumulation de particules virales est toxique pour les hépatocytes ainsi infectés, leur donnant un aspect que les histopathologistes appellent « verre dépoli ».

-Le promoteur X contrôle la transcription d'un petit ARNm de 0,7 kb. Cet ARNm est indétectable dans le foie infecté mais peut être mis en évidence dans des lignées d'hépatocytes transfectées in vitro. Le promoteur est mal défini, mais des séquences situées entre l'Enh I et le début du gène X ont une activité promotrice.

D'autres éléments affectent directement ou indirectement la transcription virale. Il y a un élément de réponse aux glucocorticoïdes, situé dans le gène S, et la prise de corticoïdes par des patients influence ainsi cet élément. Un élément de régulation post-transcriptionnelle chevauche le promoteur X et partiellement l'Enh I et le gène X. Cet élément de régulation post-transcriptionnelle probablement en coopération avec des facteurs cellulaires, permet

l'exportation efficace des transcrits non épissés du VHB. Il faut noter que tous les transcrits du VHB sauf l'ARNm de l'AgHBx contiennent toutes les séquences de l'élément de régulation post-transcriptionnelle. Ceci explique peut-être la faible expression de l'ARNm du gène X dans le foie infecté.

.4.2. Signaux d'encapsidation.

Comme les rétrovirus, les hepadnavirus possèdent un signal pour l'encapsidation de l'ARN prégénomique. Ce signal peut adopter une structure en tige-boucle. Il est nécessaire à l'interaction de l'ARN prégénomique avec la polymérase et des protéines cellulaires chaperonnes ; il permettra l'initiation de la transcription inverse et l'encapsidation du génome viral par les protéines de capsid [60-63]. Il existe aussi deux répétitions directes (DR1 et DR2), de 11 bases chez le VHB, qui sont impliquées dans la réplication virale.

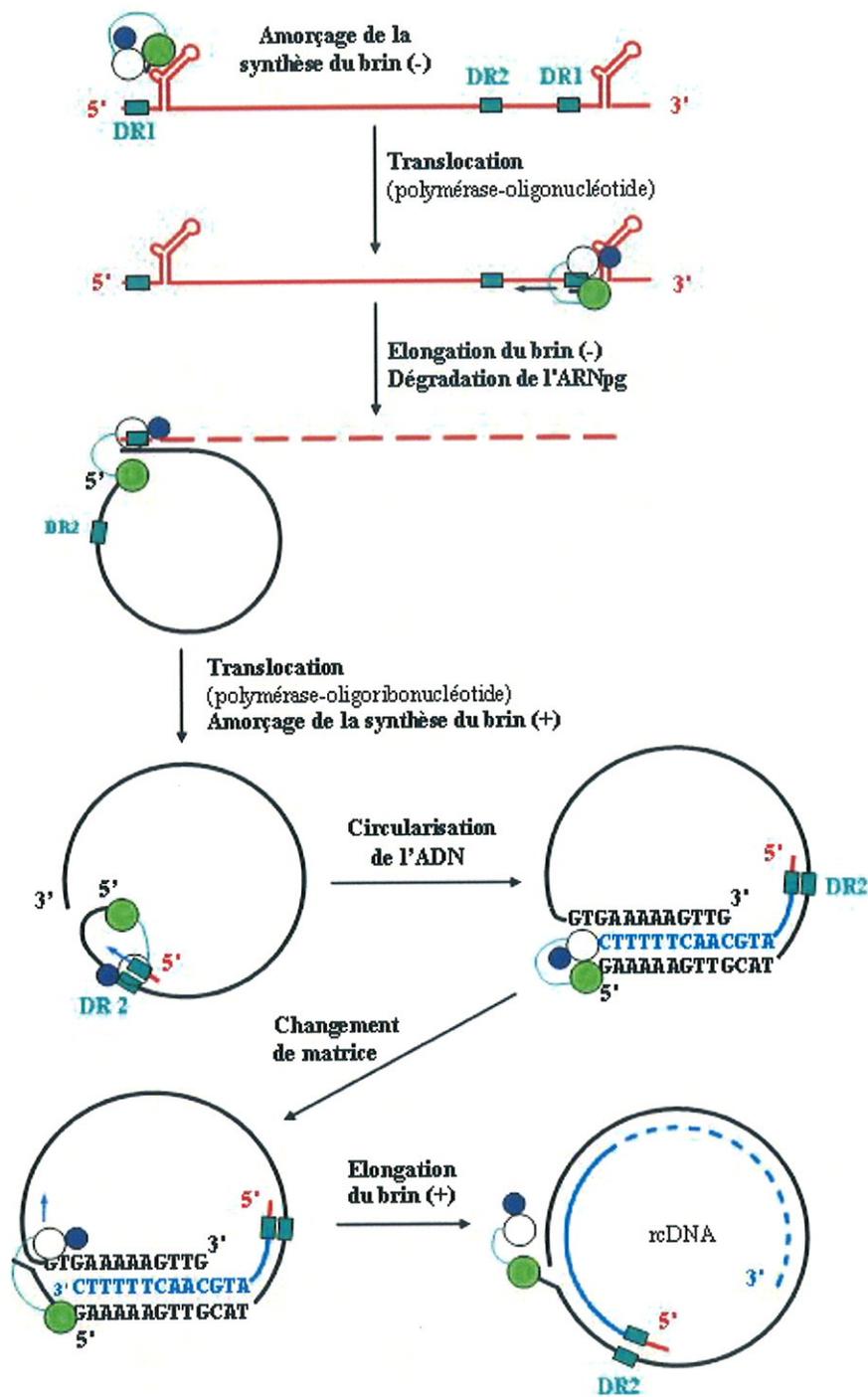


Figure 15 : Réplication de l'ADN viral à l'intérieur de la capside, d'après Kay et al. [28].

5. Encapsulation et synthèse des brins moins et plus de l'ARN viral.

L'encapsulation débute lorsque suffisamment de protéines Hbc et au minimum une molécule de polymérase sont synthétisées. La polymérase se fixe au niveau d'une structure particulière située à l'extrémité 5' de l'ARN pré-génomique (ARNpg), appelée région epsilon (ϵ). Cette étape initie à la fois l'encapsulation du complexe ARN pg-polymérase et la transcription inverse de l'ARNpg [60,64].

La polymérase débute la synthèse du brin moins de l'ADN en servant elle-même d'amorce [65,66]. 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 14).

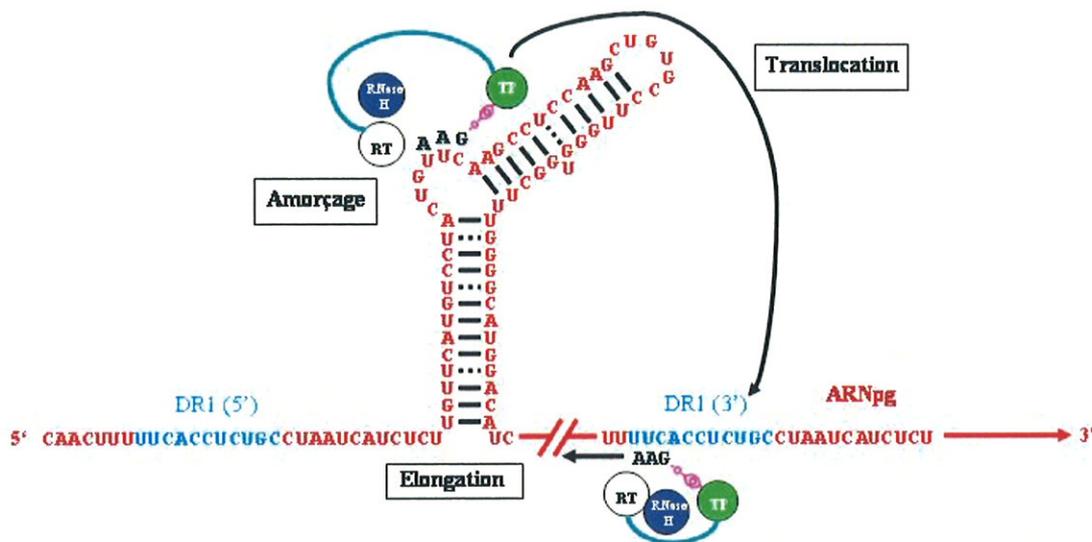


Figure 16 : Initiation de la transcription inverse. Le domaine *Terminal Protéine* (TP) ou *Primase* de la polymérase sert d'amorce (d'après Kay et al. [28]).

Au fur et à mesure de l'avancée de l'élongation, l'activité RNase dégrade l'ARNpg, en-dehors d'une séquence d'une vingtaine de nucléotides à l'extrémité 5' qui reste liée au domaine RT (*reverse transcriptase*) de la polymérase et est donc protégée de la dégradation (Figure 15). Une nouvelle translocation de la polymérase permet l'hybridation de cet oligonucléotide avec la séquence DR2 en 5' du brin moins de l'ADN néosynthétisé. Il sert

d'amorce pour la synthèse du brin plus [67-69].

Cette synthèse ne se déroule pas correctement dans 10 % des cas ; en effet, il peut arriver que la translocation du complexe polymérase-oligonucléotide échoue, aboutissant à la formation d'un ADN double-brin linéaire au lieu du rcDNA [70,71].

Rapidement, la polymérase arrive à l'extrémité 5' du brin moins. La poursuite de la synthèse du brin plus n'est possible qu'après circularisation du génome, résultant de l'appariement des extrémités 3' complémentaires du brin moins et du brin plus néosynthétisé, probablement sous forme de triple hélice. La formation de cette triple hélice serait favorisée par la composition très riche en A/T des séquences impliquées.

Toutefois, pour une raison encore inconnue, l'élongation du brin plus n'est pas complète et il en résulte de l'ADN semi-circulaire, relâché (rcDNA).

.6. Recyclage de la nucléocapside et sécrétion de particules virales.

Le devenir des nucléocapsides dépendrait essentiellement de la production de protéines d'enveloppe. En effet, il semble qu'en début d'infection, lorsque les protéines de surface d'enveloppe sont en faible quantité, les nucléocapsides immatures sont recyclées dans le noyau pour amplifier le stock de cccDNA [72,73]. Certaines expériences ont montré que le cccDNA était stable dans les hépatocytes en phase non réplivative ; sa demi-vie serait supérieure à 30 jours, ce qui lui permettrait de subsister persister autant que vit la cellule infectée [74-77]. Cependant, une demi-vie plus courte, de 3 à 5 jours a été observée dans d'autres études menées sur des cultures cellulaires [78]. Quoiqu'il en soit, le recyclage du cccDNA permet de maintenir un stock d'ADN intranucléaire, entre 10 et 50 copies/cellules [79]. Le cccDNA pourrait être transmis aux hépatocytes issus de mitoses [76].

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 réticulum endoplasmique. Les protéines virales enveloppées sont ensuite excrétées par exocytose, permettant l'infection des cellules voisines [79].

.D. Variabilité du virus de l'hépatite B.

Comme tous les virus dont la réplication passe par une étape de transcription inverse, le virus de l'hépatite B possède une grande variabilité génomique, qui est pourtant restée longtemps insoupçonnée, en raison de la complexité et de l'organisation très compacte du génome [80].

.1. Mécanismes de la variabilité génétique.

Plusieurs facteurs associés peuvent expliquer l'importante variabilité du génome du virus de l'hépatite B : 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 surperenroulé (cccDNA) et la capacité répllicative (*fitness*) des souches virales [81,82].

Le taux de mutations spontanées induites par la polymérase virale est estimé à 2.10^{-4} changements nucléotidiques par site et par an [83]. La survenue d'erreurs de réplication est favorisée par l'important niveau de production de virus de l'hépatite B (environ 10^{11} virions/jour) : jusqu'à 10^{10} mutations peuvent être générées quotidiennement sur l'ensemble du génome viral [84].

Cependant, l'émergence de nouvelles souches de virus de l'hépatite B est limitée par le nombre d'hépatocytes pouvant être infectés (dépendant du roulement hépatocytaire) et par le nombre 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.

Du reste, 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 possèdent souvent une séquence qui diffère peu de celle de la population dominante et forment des populations minoritaires, nommées « 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 positives qui défavorisent la souche dominante (telles que la réponse immune et les traitements) [85]. Les virus sélectionnés, qui possèdent donc des propriétés différentes de la souche d'origine, émergent alors à un taux significatif voire

majoritaire. Toutefois, l'évolution des mutants est modulée par le fitness de ces virus : une mutation donnée peut affaiblir la capacité répliquative d'une souche qui ne deviendra donc pas la souche majoritaire.

.2. Les géotypes du virus de l'hépatite B.

.2.1. Définition et classification.

L'accumulation des mutations, la sélection des variants les mieux adaptés à leur environnement et leur transmission dans des zones géographiques ou ethniques délimitées a conduit à la divergence progressive dans le temps de différents types « sauvages » de virus de l'hépatite B. Ces variants sont stables et représentent l'évolution du virus de l'hépatite B. La comparaison de plusieurs souches a permis de les classer en huit géotypes, de A à H. Cette classification est basée 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 [86,87].

Les quatre premiers (de A à D) ont été décrits par une équipe japonaise [87]. Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis l'identification des quatre suivants [88-90].

.2.2. Répartition géographique.

La distribution géographique des géotypes du virus de l'hépatite B n'est pas homogène et reflète les mouvements migratoires. Dans la majorité des régions et pays, les populations ne sont infectées que par un nombre limité de géotypes. Toutefois, dans un pays comme les Etats-Unis d'Amérique, véritable « creuset ethnique », tous les géotypes sont représentés (A : 35%, B : 25%, C : 31% D : 10%, E-G : 2%). La tendance mondiale actuelle tendant vers un accroissement des flux de population, les mélanges de géotypes sont favorisés de même que les phénomènes de recombinaisons et de surinfections.

Le géotype A est surtout présent en Europe occidentale, en Afrique et en Amérique du Nord. Les géotypes B et C sont dominants en Asie. Le géotype D est retrouvé sur tous les continents, avec toutefois une plus forte prévalence en Europe méridionale et au Moyen-Orient. Le géotype E est détecté principalement en Afrique. La localisation du géotype F est limitée à l'Amérique latine et à la Polynésie. Des cas isolés d'infections dues au géotype

G ont été décrits en France, en Allemagne et aux Etats-Unis d'Amérique. Le génotype H, qui pourrait dériver du génotype F a été identifié en Amérique centrale [91,92].

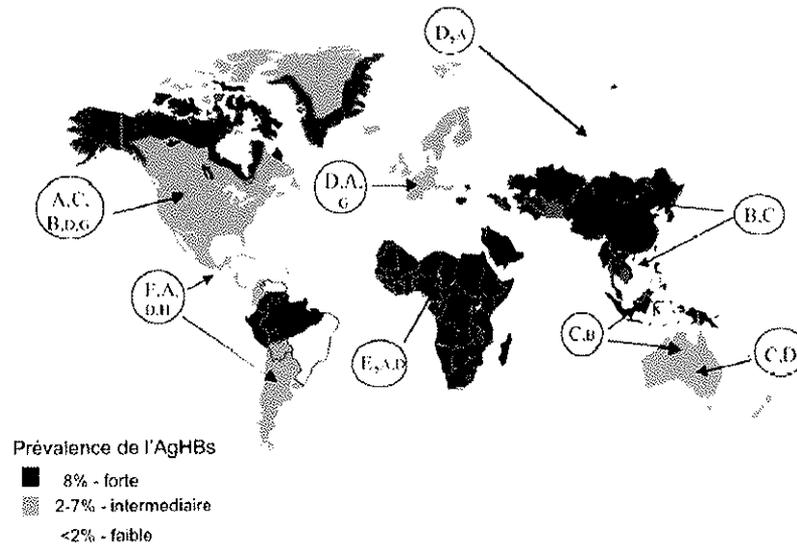


Figure 17 : Répartition géographique des différents génotypes du virus de l'hépatite B. D'après Bartholomeusz [93] et B. Miyikawa et al. [94].

.2.3. Coinfections et recombinaisons.

Des coinfections ou surinfections par différents génotypes ne sont pas rares, surtout chez les populations à risque de multi-infections [95,96]. Ainsi, le génotype G semble-t-il toujours coexister avec le génotype A [87,97].

En raison de ces coinfections, des recombinaisons entre génotypes peuvent apparaître, 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 [94-96].

.2.4. Pathogénie des génotypes.

Le rôle des génotypes dans la progression de la maladie hépatique reste controversé. La plupart des études proviennent d'Asie ; peu de données sont disponibles en Europe, Afrique et Amérique. Il semble que les patients porteurs d'un génotype C progressent plus rapidement vers la cirrhose et l'hépatocarcinome que ceux infectés par un génotype B (chez des populations présentant (a priori) les mêmes caractéristiques en termes de durée d'infection et d'exposition à l'aflatoxine). Cependant, aucune différence n'est constatée sur la gravité de la maladie. Concernant les génotypes A et D, une seule étude suggère l'association du génotype D avec une forme plus sévère de la pathologie chez les 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 [90,97,98]. En Asie, le génotype B est associé une séroconversion HBe à un âge précoce, à plus de rémission après la séroconversion, à une maladie moins nécrotique et inflammatoire, à un taux plus lent de progression vers la cirrhose, à un taux plus lent de progression vers l'hépatocarcinome en comparaison avec le génotype C. La relation entre la progression de la maladie et les autres génotypes est plus obscure.

Plusieurs études avec l'interféron alpha standard et une étude avec l'interféron pégylé, ont montré que les génotypes A et B étaient associés à un taux plus élevé de séroconversion HBe en comparaison avec les génotypes C et D. Une autre étude a montré que le Peg interféron était associée à un taux de séroconversion AgHBe-antiHBe supérieur avec les génotypes A mais pas avec les génotypes B [98].

Les études avec les analogues de nucléos(t)ides n'ont pas montré de relation entre les génotypes et la réponse. Par ailleurs, plusieurs études ont analysé l'impact des génotypes viraux sur la réponse aux nouvelles molécules antivirales comme la lamivudine et l'adéfovir. La plupart des études indiquent que ces molécules sont aussi actives quel que soit le génotype viral. D'autre part, pour la lamivudine, il ne semblerait pas y avoir de corrélation entre les génotypes viraux et la sélection de souches résistantes. Une seule étude a retrouvé une sélection plus rapide de souches résistantes à la lamivudine chez les patients infectés par un génotype D, mais n'a pas été confirmée à large échelle [90,99-103].

D'autres études sont nécessaires avant d'utiliser la technique du génotypage en pratique clinique.

.3. Les variants phénotypiques.

Ces variants correspondent à l'apparition de mutations ponctuelles, de délétions, voire d'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 de souches dont les mutations portent sur des régions peu ou pas 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, 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 [72,104]. Les patients infectés par le 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 protéine HBe et ne semblent pas avoir d'impact sur la réplication du virus de l'hépatite B.

Dans 95 % des cas, les variants défectifs en AgHBe possèdent une substitution de nucléotide en position 1896 (G1896A) transformant le codon 28 de la région préC en codon-stop. La traduction se termine précocement, libérant un peptide tronqué qui est bloqué dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules infectées. Cette mutation est dépendante du génotype. En effet, pour les virus de génotypes A, F et H, la mutation G1896A entraîne une déstabilisation secondaire qui est délétère pour la réplication virale [105]. Comme nous le verrons, cette mutation a une importance capitale dans la prise en charge du virus de l'hépatite B, notamment lors de la démarche thérapeutique.

Des mutations sont également observées dans le promoteur du core, qui affectent principalement le site majeur de fixation de facteurs de transcription situés sur le promoteur basal du core. La double mutation A1762T – G1764A est retrouvée chez environ 80 % des patients AgHBe+ ayant une hépatite B chronique. Elle entraîne une diminution de la transcription de l'ARN préC et par conséquent de la synthèse de l'AgHBe.

3.2. Les mutants S.

Certaines mutations peuvent affecter la conformation spatiale de la MHL, permettant aux souches virales d'échapper à l'action des anticorps anti-HBs. Ces mutants sont sélectionnés par la réponse immune dirigée contre l'AgHBs, qu'elle soit liée à l'administration d'immunoglobulines spécifiques [106,107] ou induite par la vaccination [108], ou plus rarement spontanées.

Les mutations d'échappement initialement décrites sont situées dans le déterminant « a », témoignant de l'importance fonctionnelle de la région.

La substitution G145R est la mutation la plus fréquemment rencontrée. Toutefois, de nombreuses autres mutations ont été décrites en amont du déterminant « a » (entre les acides aminés 110 et 120), à l'origine d'une altération de la conformation des épitopes [109] (Figure 17).

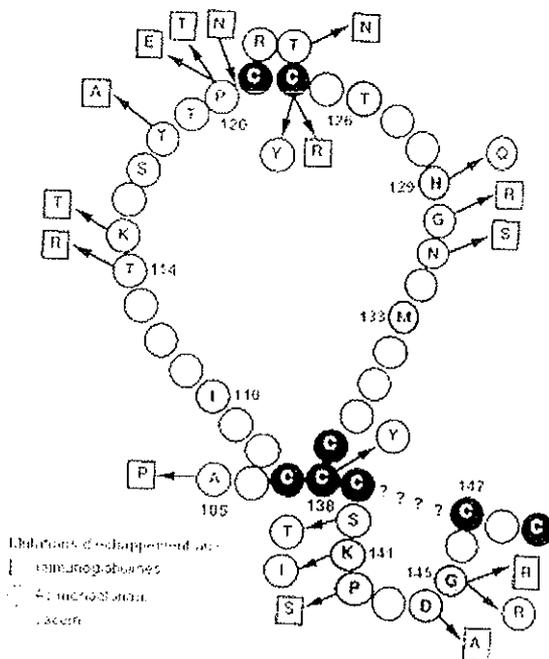


Figure 18 : Principales mutations dans la MHL sélectionnées par les immunoglobulines spécifiques, les anticorps monoclonaux, ou la vaccination.

.3.3. Les mutants P.

La polymérase virale permet l'encapsidation de l'ARN prégénomique et la réplication du génome viral. Les mutations dans le gène P sont donc supposées létales le plus souvent.

Une mutation non sens située à l'extrémité 5' du gène P, qui est associé à un défaut d'encapsidation de l'ARN prégénomique, a été décrite [110].

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 situées dans ou à proximité du site catalytique de l'enzyme, c'est-à-dire dans la région C très conservée du domaine de la transcriptase inverse de la polymérase. Le changement conformationnel de la polymérase résultant de ces mutations est responsable de la résistance des souches virales aux traitements antiviraux. 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 [82].

Les mutations concernant les infections par un virus de l'hépatite B cryptique et celles affectant la résistance aux antiviraux seront abordées ultérieurement.

.4. Modèles d'études.

L'étude du virus de l'hépatite B est difficile, que ce soit *in vivo* ou en culture cellulaire, conduisant les chercheurs à s'appuyer sur des modèles analogues et à dépasser les cadres habituels d'expérience [26].

.4.1. Cultures cellulaires.

Jusqu'à récemment, le virus de l'hépatite B était compliqué à cultiver *in vitro*. En effet, seuls les hépatocytes primaires pouvaient être infectés et supportaient un cycle complet de réplication virale [111-113]. Pendant deux décennies, les différentes tentatives d'infection de lignées cellulaires, comme des lignées d'hépatomes ou de lymphocytes, ont échoué.

Ces dernières années, une lignée d'hépatome humain, HepaRG, correspondant probablement à des cellules souches pouvant se différencier en hépatocytes ou en cellules

biliaires, a été développée [114]. En état de différenciation, ces cellules peuvent être infectées par le virus de l'hépatite B et reproduisent un cycle de réplication virale complet. Ceci devrait permettre, dans un avenir proche, l'élucidation de nombreuses étapes du cycle viral : caractérisation du récepteur cellulaire, déterminant (s) cellulaire (s) responsable (s) de la formation de l'ADN superenroulé, étude de la fonction de la protéine X. Par ailleurs, cette lignée pourrait être extrêmement utile pour les études de nouvelles stratégies antivirales, ainsi que pour les travaux de pharmacologie ou de toxicologie.

À côté des modèles d'infection cellulaire, il existe des modèles de transfection qui permettent de court-circuiter des étapes limitantes du cycle de réplication : interaction avec le récepteur cellulaire et transport du virus vers le noyau. La transfection de lignées d'hépatome humain a permis l'élucidation de nombreuses étapes du cycle de réplication du génome viral, mais aussi la caractérisation des mutants du VHB [115-117].

De nouvelles approches permettent de cloner rapidement l'ensemble du génome viral et de transférer celui-ci dans ces lignées, afin d'étudier le phénotype des isolats cliniques circulants chez les patients [118].

A côté de ces modèles relativement classiques, il est possible d'utiliser des cultures primaires d'hépatocytes de canard ou d'hépatocytes de marmotte, pour étudier l'infection par leur hépadnavirus respectif (DBHV, WHBV). Ces modèles ont été particulièrement utiles pour étudier la formation de l'ADN superenroulé et son amplification intracellulaire, responsable de la persistance virale même lors de traitements antiviraux.

.4.2. Modèles animaux.

Pendant très longtemps, seul le chimpanzé pouvait être utilisé comme modèle animal de l'infection par le virus de l'hépatite B. Ceci a permis, notamment, de réaliser des études de l'infectiosité des particules virales ainsi que des études de protection vaccinale. Il faut noter que la lamivudine avait démontré un effet antiviral puissant dans le modèle du chimpanzé.

Ce modèle étant d'accès difficile, compte tenu de la protection du chimpanzé et des coûts élevés de ces expériences animales, d'autres modèles étaient donc nécessaires. Ainsi, il a pu être montré que le tupaïa, petit primate, pouvait être infecté, au moins de façon transitoire,

par le virus de l'hépatite B. Des améliorations de ce système sont actuellement en cours afin d'obtenir des infections prolongées.

Plus récemment, un modèle de souris *nude* humanisée, dont le foie est repeuplé par des hépatocytes humains, a été développé pour l'infection par le VHB et par le virus de l'hépatite C (VHC) [119]. Ce modèle pourrait être particulièrement intéressant pour des études concernant les spécificités du VHB humain, dans l'infection *in vivo*.

À côté de ces modèles d'infection, il existe des modèles de souris transgéniques. Elles comportent comme transgène, soit une partie du génome viral, soit l'ensemble du génome viral. Ces dernières peuvent répliquer le génome viral de façon active, mais le cycle viral est incomplet, les hépatocytes de souris n'étant pas susceptibles à l'infection virale. Ces modèles de souris transgéniques ont été extrêmement importants pour la caractérisation de la réponse immunitaire TH1, qu'elle soit T-cytotoxique ou non cytolitique [120-123]. De plus, ce modèle de souris transgénique a permis de mettre en évidence le rôle pathogène des protéines d'enveloppe virales et de la protéine X, notamment dans l'induction de l'oncogenèse, ainsi que la possibilité de retarder le développement du carcinome hépatocellulaire par l'administration précoce d'interféron alpha.

Par ailleurs, il existe des modèles d'infection par les virus apparentés de la famille des hepadnavirus. Le modèle de l'hépatite B du canard est particulièrement intéressant puisqu'il s'agit d'un animal facilement accessible et qui reproduit certains aspects de l'infection par le virus de l'hépatite B chez l'homme : en effet, il a été observé que plus l'inoculation virale avait lieu tôt dans la vie, plus le taux de chronicité de l'infection était élevé [124]. Cependant, même en cas d'infection chronique, le développement du carcinome hépatocellulaire est rare dans ce modèle. Le modèle du canard a permis de mettre en évidence le rôle primordial de l'ADN superenroulé dans la persistance virale *in vitro* et *in vivo*, en présence ou non de médicaments antiviraux. Le rôle de la régénération hépatocytaire dans l'élimination virale a aussi été démontré dans ce modèle [125]. Le modèle de l'hépatite B du canard a été aussi particulièrement important dans l'étude des mécanismes de neutralisation virale et l'évaluation de nouvelles stratégies antivirales de type vaccinothérapie par ADN nu [126-128].

Le modèle de l'hépatite B de la marmotte américaine présente certaines caractéristiques communes avec l'infection humaine, notamment un taux d'infection chronique élevé en cas d'inoculation précoce à la naissance [129]. En revanche, en cas d'infection virale chronique, le taux d'apparition du carcinome hépatocellulaire est extrêmement élevé puisque 100 % des animaux infectés développeront un carcinome

hépatocellulaire au cours de leur vie (4 à 6 ans). Ce modèle a permis de mettre en évidence l'importance des phénomènes d'intégration du génome viral dans l'oncogenèse viro-induite, avec l'identification d'une intégration préférentielle du génome du WHBV dans les oncogènes *N- myc* et *c- myc* [130]. Ce modèle a aussi été particulièrement important dans l'évaluation de nouvelles molécules antivirales avec notamment leur efficacité et certains aspects pharmacologiques (toxicité mitochondriale) [131]. Il a pu être clairement établi dans ce modèle que l'élimination des cellules infectées nécessitait la lyse des hépatocytes et la régénération hépatocytaire impliquant des cellules non infectées [132,133].

Les autres modèles animaux (singe laineux, héron,) ont été découverts récemment et peuvent être utiles dans l'étude de la physiopathologie ou dans la découverte du récepteur cellulaire pour l'infection virale.

CHAPITE II : L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE B.

A. EPIDEMIOLOGIE DE L'HEPATITE VIRALE B.

.1. Répartition géographique.

L'infection par le virus de l'hépatite B demeure encore un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale.

Actuellement, on estime que plus de 350 millions de sujets porteurs d'une hépatite virale B chronique dans le monde et que 500 000 à 1,2 million d'entre eux en décèdent chaque année. Deux milliards de personnes auraient en contact avec le virus dans leur vie [134,135].

A titre de comparaison, le VIH (Virus d'Immudéficience Humaine) atteint 40 à 45 millions d'individus, et 170 millions sont porteuses du virus de l'hépatite C .

L'OMS a défini trois zones d'infection, déterminées selon le taux d'infection de la population adulte [134,136] (Figure 18) :

-les zones de forte endémie (plus de 8 % de la population est infectée sur un mode chronique). Sont ainsi concernées l' Afrique subsaharienne, l'Asie du Su-Est et l'Extrême-Orient (sauf Japon), ainsi que certains pays d'Europe de l'Est. Dans ces régions, 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 [137].

-les zones d'endémie intermédiaire (de 2 à 7% de la population infectée de manière chronique) : y sont incluses l'Europe de l'Est, les pays du bassin méditerranéen, l'Asie du Sud-Ouest, le Japon et l'Amérique Latine. Le risque infectieux est alors entre 20 et 60 % [137].

-les zones de faible endémie (moins de 2 % des personnes infectées). Sont concernés la majorité des pays développés : Europe occidentale, Amérique du Nord, Australie. Le risque de contamination est inférieur à 20 % et intéresse essentiellement la population adulte.

Au plan mondial, le taux d'infection est plus important chez les hommes que chez les femmes, chez les enfants que chez les adultes, dans les populations urbaines que dans les populations rurales [138,139].

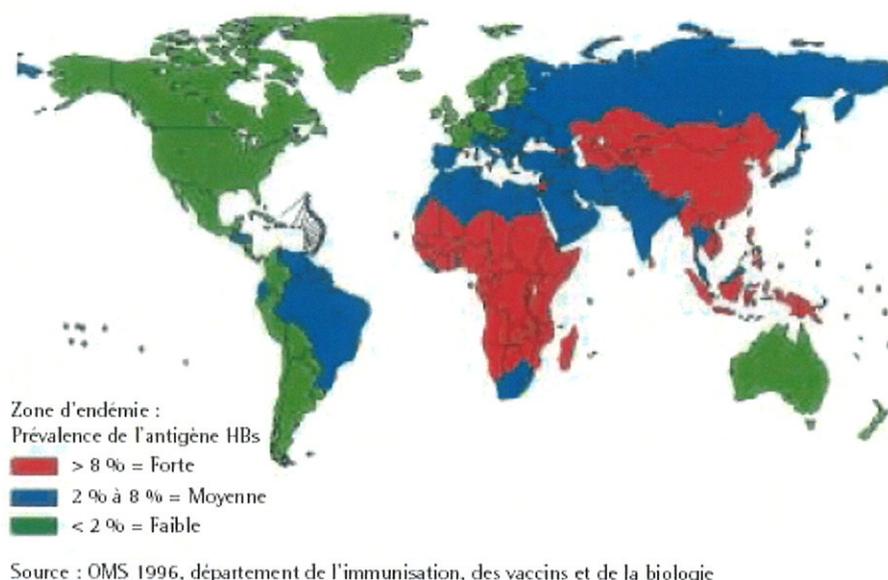


Figure 19 : répartition mondiale du virus de l'hépatite B.

.2. Evolution de l'épidémiologie mondiale.

L'évolution de l'épidémiologie mondiale est fonction de deux principales données : les flux migratoires et la mise en place de larges campagnes de prévention.

Dans les pays développés où des programmes de vaccination sont depuis longtemps instaurés, les flux migratoires venant des zones du Sud, à forte prévalence, augmente les statistiques, comme le suggèrent les données épidémiologiques en France sur les populations issues d'Asie ou d'Afrique du Nord.

A contrario, l'incidence de l'hépatite B chronique est en nette diminution dans les pays où une vaccination de masse est réalisée de manière efficace. Ceci est particulièrement vrai en Italie mais aussi dans les pays d'Asie comme Taïwan, où la vaccination à la naissance a permis de faire baisser le portage chronique de l'AgHBs de 10 à 0.8% en l'espace, autorisant la diminution des complications de la maladie, dont le carcinome hépatocellulaire [140,141]. La mise en place récente à grande échelle, notamment en Afrique, de programmes de vaccination ainsi que de mesures incitatives pour la contraception mécanique devrait permettre d'obtenir d'ici une génération une baisse substantielle du taux d'infection.

.3. Epidémiologie en France.

La France est considérée comme une zone de faible endémie [142,143] (Figure 19).

D'après une étude de prévalence réalisée en 2003-2004, sur un échantillon de 14416 personnes, la prévalence du portage chronique de l'antigène HBs est estimée à 0,65 % (Intervalle de confiance à 95 % ou IC95 : 0.44-1.05). Cela correspond à 280 000 personnes porteuses de l'AgHBs. La prévalence est plus élevée chez les hommes que chez les femmes, soit respectivement 1,10 % et 0,21%, quelle que soit la tranche d'âge. Quant à la prévalence de l'anticorps anti-HBc, elle est estimée à 8.18% (IC95 : 6.96 – 9.59).

La prévalence de l'AgHBs a été également analysée en fonction du continent de naissance, avec des taux de 0,92% pour les personnes originaires d'Asie et de 5,25% pour les personnes originaires d'Afrique sub-saharienne. La prévalence du portage du virus B apparaît également plus élevée chez les patients bénéficiant de la CMU (taux X 3) [144].

En France, le dépistage de l'AgHBs au sixième mois de grossesse a été rendu obligatoire en 1992, afin de prévenir la transmission périnatale du VHB par la sérovaccination des nouveau-nés de mères porteuses de l'AgHBs.

Denis et al. ont étudié la prévalence de l'AgHBs chez les femmes enceintes [145-148]. Celle-ci est estimée à 0,41 %. Elle variait en fonction de l'origine géographique des parturientes (Tableau 1) : 0,15 % chez les femmes d'origine française, 2,56% chez les femmes nées hors de France (1,75% chez les femmes originaires d'Afrique sub-saharienne et 5,45 % chez les femmes originaires d'Asie du sud-est). L'antigène HBe ou l'ADN du VHB était retrouvé chez 16,5% des femmes enceintes porteuses de l'AgHBs. Il est intéressant de noter une variation géographique de cette prévalence (de 0,13% à Limoges à 2,99% à Montpellier).

Concernant les hépatites B aiguës, leur déclaration obligatoire a été réintroduite en 2003, après avoir été suspendue en 1985. L'incidence de l'hépatite B aiguë symptomatique observée en 1996, était estimée à 6 nouveaux cas pour 100000 habitants par an. Nous ne disposons pas de données plus récentes.

La prévalence de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B a été également étudiée chez les patients séropositifs. Définie par la présence de l'antigène HBs (et/ou d'ADN viral), elle a été estimée à 7,0%. D'autre part, 37,6 % des patients étaient porteurs d'anticorps antiHBc sans AgHBs, indiquant un antécédent d'infection par le VHB, sans préjuger du passage à la chronicité ou de la guérison.

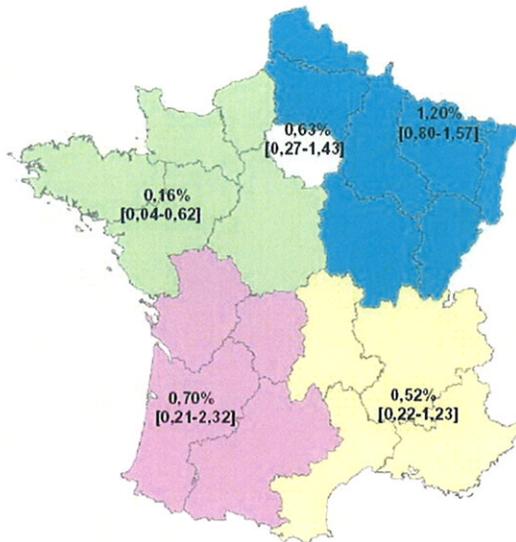


Figure 20 : Répartition géographique française de la prévalence de l'AgHBs chez les patientes enceintes.

| | % | IC à 95% |
|-------------------------------|------|-----------|
| Europe | 0,58 | 0,33-1,02 |
| Afrique du nord | 0,36 | 0,07-1,89 |
| Moyen Orient | 1,61 | 0,47-5,41 |
| Afrique Sub Saharienne | 3,75 | 1,76-7,81 |
| Asie Pacifique | 1,36 | 0,43-4,25 |
| Amérique (nord sud) | 0,22 | 0,03-1,87 |

Tableau 1 : Prévalence de l'AgHBs en France selon la zone géographique d'origine.

.B.PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HEPATITE B.

.1. Modes de transmission.

Le virus de l'hépatite B est présent dans la plupart des liquides biologiques. Il est présent dans le sang des personnes infectées à des taux souvent élevés, pouvant atteindre 10^9 virions/mL. On le détecte dans les sécrétions vaginales et le sperme (10^6 à 10^7 virions/mL), dans la salive (10^5 à 10^7 virions/mL), ainsi que dans les urines, le lait maternel et les larmes. Du fait de l'hétérogénéité de localisation du virus de l'hépatite B, différents modes de transmission sont possibles (Tableaux 2 et 3).

La transmission par voie sexuelle représente actuellement le principal mode de contamination des pays de faible et moyenne endémie [149,150]. La population la plus à risque reste les personnes à partenaires sexuels multiples.

Depuis la mise en place systématique des tests du virus de l'hépatite B pour chaque don de sang ou d'organe, la transmission par voie parentérale concerne essentiellement les personnes utilisant du matériel contaminé non stérilisé (toxicomanes par voie intraveineuse, utilisateurs de l'acupuncture, du piercing et des tatouages) [151]. Cependant, l'hépatite B demeure la maladie transmissible la plus fréquente après transfusion, malgré les tests de dépistage.

Les infections nosocomiales (par transmission du soigné au soignant, mais également du soignant au soigné) ont considérablement diminué dans les pays appliquant des règles rigoureuses de stérilisation du matériel et depuis la généralisation du programme de vaccinations des personnels de santé. Le risque de transmission est fonction du taux de réplication virale. Il est important de noter que la contagiosité du virus de l'hépatite B (30 %) est estimée 10 fois supérieure à celle du virus de l'hépatite C et 100 fois supérieure à celle du VIH [152].

La transmission « verticale » mère-enfant est décrite essentiellement dans des zones de forte endémie (principalement en Asie du Sud-Est) [149,150,153], mais n'est pas négligeable et serait même sous-estimée dans les zones de faible et moyenne endémies. La contamination de l'enfant a lieu principalement lors de l'accouchement, par l'intermédiaire du sang maternel. Ainsi, si la mère réplique intensément le virus, le risque de transmission est de 90 %, mais seulement de 10 % en l'absence de marqueurs de réplication [153]. Ce mode de transmission est à l'origine d'un taux de chronicité de l'infection chez le nouveau-né

extrêmement important. Ceci explique la très forte prévalence dans les zones d'endémie comme l'Afrique ou l'Asie où les programmes de vaccination à la naissance n'ont pas encore pu être mis en place de façon large.

Compte tenu de la résistance du virus en milieu extérieur, les infections intra-familiales sont possibles, par le biais d'effets personnels (brosses à dents, rasoirs, ...) ou par contact avec des excoriations cutanées. Ce mode de transmission « horizontale » est particulièrement fréquent en Afrique subsaharienne [26].

| | |
|---------------------------------|--------|
| Usage de drogues IV | 55,9 % |
| Homosexuels | 42,5 % |
| Bisexuels | 15,6 % |
| Hétérosexuels | 7,7 % |
| Tentative d'autolyse avant 1992 | 12 % |
| Prison | 31 % |
| Institution | 17,6 % |

Tableau 2 : Les infections prévalentes en France en fonction du mode de contamination [154,155].

| | |
|---------------------|--------|
| Sexe | 40,6 % |
| Aucun | 29,6 % |
| Pays d'endémie | 14,5 % |
| Acte Méd. Invasif | 10,3 % |
| Contact familial | 9,7 % |
| IVDU | 6,2 % |
| Tatouage / Piercing | 3,4 % |
| Institution | 7,8 % |
| Plusieurs | 26,3 % |

Tableau 3 : Les infections incidentes en France en fonction du mode de contamination [154,155].

2. Immunopathologie et mécanismes d'infection virale.

Le VHB n'est pas directement cytopathogène. Les lésions hépatocytaires sont principalement dues à l'attaque des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques CD8 positifs reconnaissant principalement les épitopes de capsidite, mais aussi de l'enveloppe virale, présentés par les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité. La gravité de ces lésions et l'évolution de la pathologie sont déterminées par le 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. Ainsi, une réponse immune précoce permettra-t-elle le contrôle de la réplication virale et sera-t-elle associée à la guérison. En revanche, une réponse immune déficiente aboutira à la persistance virale.

La réponse immune non spécifique, assurée par les macrophages, les neutrophiles, les cellules NK et NT est la plus précoce [156]. Elle entraîne la formation de lésions nécrotico-inflammatoires. L'AgHBc, très immunogène, est alors localisé au sein du noyau des hépatocytes et n'est donc pas repérable par le système immunitaire [157].

Dans un second temps, les défenses immunitaires spécifiques rentrent 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 de 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 vers d'autres cellules. Le pic de cette réponse s'associe chez la plupart des patients à la clairance de l'AgHBs sérique. La réponse CTL est dirigée contre les épitopes des protéines de core, polymérase et antigènes de surface [158-160].

Des études menées chez les souris transgéniques et les chimpanzés suggèrent que deux mécanismes sont impliqués dans l'élimination virale : la lyse hépatocytaire par l'intermédiaire des systèmes perforine/Fas et un effet antiviral direct des cytokines sécrétées par les cellules T [161-163]. En effet, l'interféron gamma (IFN γ) et le tumor necrosis factor alpha (TNF α) inhibent l'expression de gènes viraux par un mécanisme post-transcriptionnel [164] et empêchent l'assemblage ou accélèrent la dégradation des nucléocapsides, inhibant la réplication virale [165].

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 lymphocytes T cytotoxiques, ce qui autorise la régression des lésions hépatiques.

Ces deux mécanismes conjoints peuvent être à l'origine du contrôle de l'infection virale par la réponse immune [162, 166].

En revanche, lorsque la réponse immune cellulaire médiée par les lymphocytes T CD4 est insuffisamment vigoureuse, elle aboutit à la génération d'une destruction chronique des hépatocytes insuffisante pour éliminer toutes les cellules répliquant le génome viral et permettant ainsi la perpétuation de la réplication virale et des lésions [157, 167, 168]. Ceci est donc à l'origine des lésions d'hépatite chronique, qui conduiront progressivement à la cirrhose.

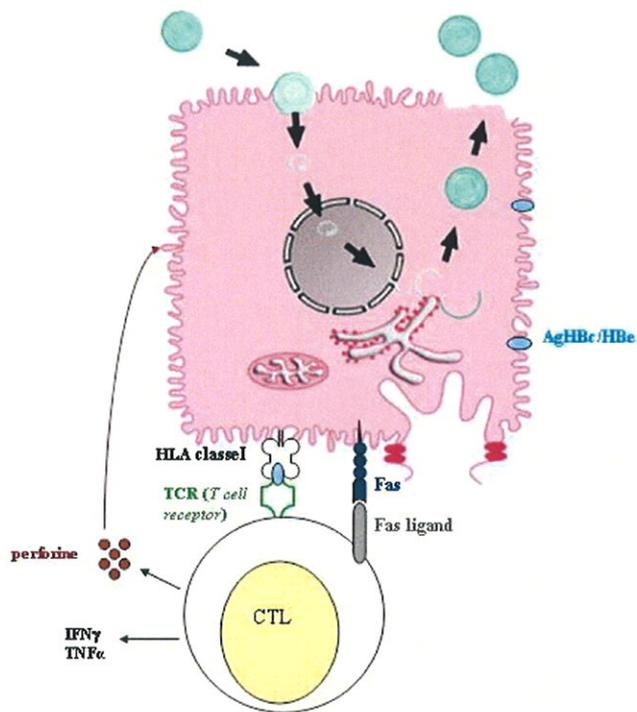


Figure 21 : Réponse cellulaire T cytotoxique. La lyse des hépatocytes infectés est due aux granules cytotoxiques (notamment les perforines) et au système Fas qui active l'apoptose cellulaire.

.3. Mécanismes de persistance virale.

.3.1. Facteurs propres à l'hôte.

L'âge de l'hôte au moment de l'infection est un élément déterminant, puisqu'il est corrélé à la maturité du système immunitaire. La proportion de cas symptomatiques d'hépatite B aiguë augmente avec l'âge, tandis que le risque de passage à la chronicité baisse. Ainsi, si l'infection acquise à la naissance est fréquemment asymptomatique, on estime que le risque de développement d'une infection chronique après une exposition est de 90 % chez les nouveau-nés de mère positive pour l'AgHBe, de 25-30 % chez des enfants de moins de 5 ans et moins de 10 % chez l'adulte [169-172]. En outre, chez les patients infectés lors de la période néonatale, la phase initiale de l'infection peut s'étendre sur plusieurs années (entre 10 et 30 ans) tandis que pour les sujets infectés à l'âge adulte, elle dure seulement de quelques semaines à quelques mois [157, 173, 174].

D'autres populations sont également plus susceptibles de passer à la chronicité : les patients immunodéprimés, les diabétiques, les hémodialysés.

.3.2. Facteurs viraux.

.3.2.1. Induction d'une immunotolérance.

L'antigène Hbe semble jouer un rôle dans la persistance virale, notamment en induisant une déplétion des cellules Th1 [175]. 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 plus facilement une hépatite aiguë, voire fulminante, mais n'évoluaient que très rarement vers une forme chronique [175-177].

.3.2.2. Inhibition de la réponse cellulaire aux cytokines.

Des expériences in vitro ont montré que des protéines du virus de l'hépatite B 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 [178] et la protéine de capsid semble inhiber la transcription du gène de l'IFN β [179].

.3.2.3. Modifications d'échappement de la réponse immunitaire.

Des mutations 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 [168, 180].

Des mutations au niveau des épitopes CTL permettraient au virus de l'hépatite B d'échapper à la réponse cytotoxique [181], mais la sélection de tels mutants survient rarement lors d'infection chronique [182].

.3.2.4. Réplication dans des réservoirs extra-hépatiques.

Le virus de l'hépatite B a un tropisme hépatocellulaire, mais il a également été détecté dans d'autres tissus comme la moelle osseuse, le pancréas, les reins, la rate, le cœur et la peau [183]. Ceci suggère l'existence de sites de multiplications extra-hépatiques du virus de l'hépatite B, inaccessibles à l'action directe des lymphocytes T cytotoxiques 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, favoriseraient une stimulation continue de la réponse immune, protégeant ainsi les patients des réinfections.

Le virus de l'hépatite B est également mis en évidence dans les cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells : PBMC*). Ces cellules, facilement accessibles, ont été particulièrement étudiées. Plusieurs travaux ont révélé la présence de l'ADN du virus de l'hépatite B dans ces cellules chez des patients atteints d'une hépatite chronique, ou ayant guéri d'une hépatite aiguë, ou sous immunoprophylaxie dans les suites d'une transplantation hépatique [184].

Le rôle de réservoir joué par les cellules mononucléées du sang périphérique dans les réactivations des infections B et dans la sélection de souches virales a été établi chez les patients transplantés hépatiques : malgré l'administration de fortes doses d'immunoglobulines

spécifiques qui permettent de maintenir la négativation de l'AgHBs sérique et de la charge virale intra-hépatique, l'ADN viral reste détectable dans les cellules mononucléées du sang périphérique. En outre, 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 cellules mononucléées du sang périphérique [185-189].

Ces données suggèrent que ces cellules pourraient jouer un rôle de réservoir pour maintenir une infection persistante.

.4. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B.

.4.1. Hépatite aiguë.

Dans 70 % des cas, l'infection demeure asymptomatique [26]. L'apparition de signes cliniques dépend de l'âge avec des signes cliniques le plus souvent absents chez le jeune enfant.

Le tableau clinique habituel comprend schématiquement trois phases :

- la phase d'incubation, de 4 à 30 semaines ;
- la phase pré-ictérique, peu spécifique, inconstamment marquée par un syndrome pseudo-grippal, une asthénie, des troubles digestifs modérés, une éruption cutanée peu fréquente ;
- la phase ictérique, qui associe ictère, ainsi qu'une hépatomégalie et splénomégalie respectivement dans 50 % et dans 25 % des cas. L'ictère apparaît généralement 1 à 2 semaines après le contagé et persiste 2 à 6 semaines.

Au niveau biologique, cette phase est marquée par une élévation franche des transaminases (ALAT : alanine aminotransférase et ASAT : asparagine aminotransférase). Chez 90 % des patients, la réponse immunitaire de l'hôte, vigoureuse et efficace, permet la résolution de l'infection, avec disparition des signes cliniques (l'asthénie peut toutefois persister plusieurs semaines.) et normalisation des transaminases.

Au niveau sérologique, lors des infections par virus sauvage, 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.

Chez un patient sur 1000, la réponse immune devient excessive, entraînant la

destruction massive des hépatocytes, se traduisant sur le plan clinico-biologique par une hépatite fulminante ou subfulminante [190]. L'hépatite fulminante se définit par l'apparition d'une encéphalopathie (signes neurologiques correspondant à une insuffisance hépatocellulaire, probablement en rapport avec une absence de catabolisme de l'ammoniac par le foie) dans les deux semaines qui suivent l'apparition de l'ictère. Ce délai est de 2 à 6 semaines dans le cas des hépatites subfulminantes. Ces formes peuvent être extrêmement graves et conduire au décès en absence de greffe hépatique.

.3.2. Hépatite chronique.

On définit une hépatite chronique par la persistance de l'AgHBs au-delà de 6 mois. Elle est liée à l'incapacité du système immunitaire à éradiquer totalement le virus. Il a ainsi été montré que la réponse cellulaire, intense dans l'hépatite B aiguë, est déficiente ou quasi-absente au cours des hépatites B chroniques [191].

Chez 70 à 90 % des patients, l'infection chronique est asymptomatique et n'est découverte que tardivement, au stade de cirrhose, voire de carcinome hépato-cellulaire.

Elle évolue classiquement en quatre phases [192,193].

.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 de marqueurs de réplication virale (AgHBs, AgHBe pour les virus sauvages, ADN viral) à des taux élevés dans le sérum du sujet infecté. A cette phase, le patient est très contagieux. Du fait de la tolérance immunitaire, les lésions hépatiques de nécrose ou d'inflammation sont absentes. Le patient ne décrit pas de symptômes et ses tests fonctionnels biologiques, en particulier les transaminases, demeurent normaux. 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.

Elle correspond à l'activation des défenses immunitaires de l'hôte ou à l'hépatite chronique active. Sa durée est variable, de moins de cinq à plus de vingt-cinq ans. Le conflit entre la réponse immune et la réplication virale aboutit à la formation de lésions nécrotico-inflammatoires. Ceci se traduit par une baisse des concentrations sériques de l'ADN du virus de l'hépatite B (200 000 à 2 milliards d'UI/ml) et une élévation des transaminases. D'un point de vue histologique, la biopsie hépatique révèle des lésions d'hépatite chronique active. Progressivement, les cellules détruites sont remplacées par du tissu cicatriciel et l'hépatite évolue ainsi vers la cirrhose (incidence annuelle de survenue : 2 à 5,4 %).

Il en résulte les complications habituelles de la cirrhose liées à l'insuffisance hépatocellulaire et l'hypertension portale, dont l'aggravation en-dehors de traitements spécifiques, va conduire au décès. A ce stade, l'initiation d'un traitement anti-viral permet de bloquer la réplication virale et de réduire les lésions tissulaires.

La plupart de ces patients vont devenir porteurs d'un mutant précore ou de mutations de la région promoteur du core.

.3.2.3. La phase de rémission ou d'équilibre.

Lorsque la réponse immune n'est pas suffisamment vigoureuse pour éliminer tous les hépatocytes infectés, un équilibre s'installe entre défenses immunitaires et réplication virale. Spontanément, ou sous l'effet de traitements antiviraux, le système immunitaire parvient à contrôler l'infection : le virus se réplique à bas bruit au sein des hépatocytes et la faible expression des antigènes viraux (notamment l'AgHBe) réduit l'attaque des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques.

Cette phase se caractérise par la séroconversion HBe (taux annuel de séroconversion: 10 à 20 %) [194], la diminution de la charge virale sérique en-dessous de 10^4 copies/mL et la normalisation des transaminases en rapport avec une diminution des lésions hépatiques [195-197]. C'est à ce stade que survient la réplication des mutants précore, jusqu'alors minoritaires, favorisée par la pression immunitaire [157].

Après une clairance spontanée de l'AgHBe, 67 à 80 % des porteurs ont un taux bas ou indétectable d' HBVDNA et une ALAT normale avec des lésions minimales ou absentes sur la

biopsie du foie : c'est le portage chronique inactif asymptomatique de l'AgHBs ou hépatite chronique persistante.

Deux types de population sont détectés dans le tissu infecté : des cellules porteuses du cccDNA, qui peut être à l'origine d'une répllication virale [196,198,199], et des cellules contenant le génome intégré du virus de l'hépatite B, pouvant être responsable des phénomènes de carcinogénèse. Parmi ceux qui demeurent anti HBe+, 10 à 30 % gardent une élévation irrégulière de l'ALAT et un taux d'ADN du virus de l'hépatite B élevé. Globalement, la clairance de l'Ag HBe, qu'elle soit spontanée ou après une thérapeutique réduit le risque de décompensation de la maladie et augmente la survie.

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 (10 à 20 % des cas) [196] en-dehors des mutations précore (20 à 30 % des patients), même après plusieurs années de quiescence. Aussi, des tests sériés sont-ils indispensables pour déterminer si ces patients sont de vrais porteurs chroniques inactifs et ceci tout au long de leur vie afin de vérifier que l'état inactif est maintenu.

.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'anticorps anti-HBs. Le plus souvent, les anticorps anti-HBc restent positifs, témoignant d'un contact ancien avec le virus de l'hépatite B, mais il peut arriver que tous les marqueurs sérologiques soient absents. Parfois, l'ADN viral subsiste à l'état de traces dans le sérum : il n'est alors détectable que par des techniques de PCR sensibles. Leur pronostic est amélioré mais un hépatocarcinome a pu être rapporté chez les patients plus âgés ou ceux qui ont progressé vers la fibrose avant la clairance de l'Ag HBs.

.3.3. Carcinome hépatocellulaire (CHC).

Le carcinome hépatocellulaire est une tumeur maligne primitive du foie. En France, elle survient dans plus de 90 % de cas, sur une cirrhose préexistante. L'incidence annuelle de survenue en Europe est de 2,2 % [200]. Dans les zones de forte épidémie, 30 à 50 % des cancers du foie associés à l'hépatite B surviennent en l'absence de cirrhose. Récemment, l'étude de plusieurs cohortes prospectives de porteurs du virus B en Asie a montré que la présence de l'AgHBe et des taux élevés d'ADN du virus de l'hépatite B étaient des facteurs de risque indépendants pour le développement de cirrhose et de cancer. Comme la plupart des patients de ces études avaient acquis leur infection en périnatal, et que leur âge moyen était de 40 ans, on peut déduire que des taux élevés de réplication virale pendant plus de quatre décades sont associés à un risque accru de cancer [201,202].

L'évolution vers un carcinome hépatocellulaire est plus fréquente chez les sujets masculins, suggérant un rôle possible des androgènes dans la carcinogénèse [203,204]. Les facteurs favorisants retrouvés sont une consommation excessive d'alcool, l'immunodépression, la séroconversion AgHBe-antiHBe, l'exposition à l'aflatoxine qui favoriserait des mutations dans le gène suppresseur de tumeur p53, le tabac et les coinfections par d'autres virus hépatotropes (virus de l'hépatite C et de l'hépatite D) [26, 205-207].

Les mécanismes de l'oncogénèse hépatique viro-induite sont complexes, mal connus et comprennent l'expression de protéines virales, comme la protéine X [208-210] ou les protéines d'enveloppe (protéines L, voire protéine M) [211, 212] pouvant transactiver certains gènes cellulaires associés à la prolifération et/ou la différenciation cellulaire ou induire des lésions cellulaires directes, le renouvellement hépatocytaire lié à la lyse de médiation immunitaire et la cirrhose [213]. Un autre mécanisme est l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte, avec instabilité génétique et possibilité de dérégulation d'oncogènes ou de gènes cellulaires contrôlant la division cellulaire. Toutefois, cet événement est rare et constituerait donc une étiologie mineure des carcinomes hépatocellulaires viroinduits.

L'évaluation de nouveaux protocoles de prophylaxie du carcinome hépatocellulaire par l'interféron alpha est en cours, sur la base d'observations expérimentales obtenues dans des modèles de souris transgéniques montrant l'impact bénéfique de cette approche en termes d'expression de certains oncogènes et de retard d'apparition des tumeurs hépatiques.

.3.4. Formes particulières d'infection du virus de l'hépatite B.

.3.4.1. Hépatites fulminantes.

L'hépatite fulminante est une forme rare d'hépatite B aiguë qui correspond à la destruction massive et rapide des hépatocytes infectés par le virus de l'hépatite B par la réponse immune T cytotoxique, évoluant vers l'insuffisance hépatocellulaire en quelques jours. Elle répond à la définition clinique de l'apparition d'une atteinte cérébrale se traduisant par une encéphalopathie dans les deux semaines qui suivent l'installation d'un ictère. Une forme proche, aux conséquences souvent identiques est l'hépatite subfulminante : la définition change au niveau du délai ictère-encéphalopathie qui atteint 2 à 6 semaines [190]. Les anglosaxons définissent quant à eux les défaillances hépatiques aiguës, subaiguës, selon leurs critères [214]. D'un point de vue biologique, les transaminases apparaissent généralement très élevées, le taux de prothrombine est effondré et les marqueurs viraux peuvent être indétectables avec les techniques usuelles, compte tenu de la destruction massive des hépatocytes : l'AgHBs peut lui aussi être en dessous des seuils de détection des tests diagnostiques de même que l'ADN viral qui n'est détectable que par PCR. Les IgM anti-HBc permettent alors de faire le diagnostic [215-218].

L'évolution peut être résolutive, mais est le plus souvent rapidement fatale. Il s'agit alors d'une indication classique de transplantation hépatique, selon des critères bien définis [190].

.3.4.2. Mutations précocore du virus de l'hépatite B.

Cette forme correspond à la sélection d'un mutant de la région précocore du génome viral. Il s'agit, soit de mutations dans le promoteur du core qui diminuent fortement l'expression de l'AgHBe, soit de mutations de type codon stop dans la région précocore et qui arrêtent l'expression de cet antigène. Classiquement, il est admis que ces mutants sont sélectionnés par la réponse immune anti-HBe et émergent lors de la séroconversion HBe. Ces mutants s'accumulent au cours du temps pour dominer le virus sauvage après l'apparition d'anticorps anti-HBe. Le type de mutant dépend du génotype viral, le génotype D étant plus souvent associé aux mutations de type codon stop de la région précocore, alors que les autres mutations, notamment dans le promoteur du core, sont indépendantes des génotypes viraux.

Ces mutations ne sont pas létales pour la réplication virale in vitro et in vivo.

Ces patients, ont souvent un taux d'ADN viral plus bas que les patients AgHBe+ (2000 à 20 millions versus 200 000 à 2 billions d'UI/ml) et ont le plus souvent une évolution fluctuante. Ces patients sont aussi plus âgés et ont une maladie plus évoluée car ce profil correspond à un stade plus avancé de l'infection chronique à virus B.

Sur le plan clinique, l'évolution de cette infection à virus muté est marquée par trois profils clinicovirologiques. Dans tous les cas, le patient est porteur de l'AgHBs, il a des anticorps anti-HBe et l'ADN viral est détectable en utilisant des techniques ultrasensibles car, généralement, les taux d'ADN viraux sont plus faibles que dans le cadre de l'infection par un virus sauvage [219-223].

Le premier profil correspond à la présence d'ADN viral à des taux relativement élevés, détectables par les techniques d'hybridation classiques avec des transaminases toujours au-dessus de la normale. Le second profil correspond à des fluctuations de la réplication virale et des transaminases sans qu'il y ait de phase de normalisation spontanée des transaminases. Le troisième profil correspond à la succession de phases d'exacerbation des transaminases avec normalisation spontanée de celles-ci et reprise ultérieure de la cytolyse. Ce dernier profil est difficile à distinguer du portage inactif du VHB lorsque le patient est en phase de rémission spontanée [224-226].

Généralement, les lésions histologiques fibrosantes sont plus sévères que dans le cadre de l'infection par un virus sauvage car ces formes sont associées à des infections de plus longue durée. On peut retrouver ainsi une cirrhose chez 30 à 40 % des patients.

En France, l'évolution respective des prévalences des patients porteurs d'AgHBe et d'anticorps antiHBe entre 1994 et 2003 a été étudiée par l'équipe du Pr. Zarski (Figure 21). On observe une inversion de cette prévalence respective avec prédominance en 2003 des patients antiHBe+.

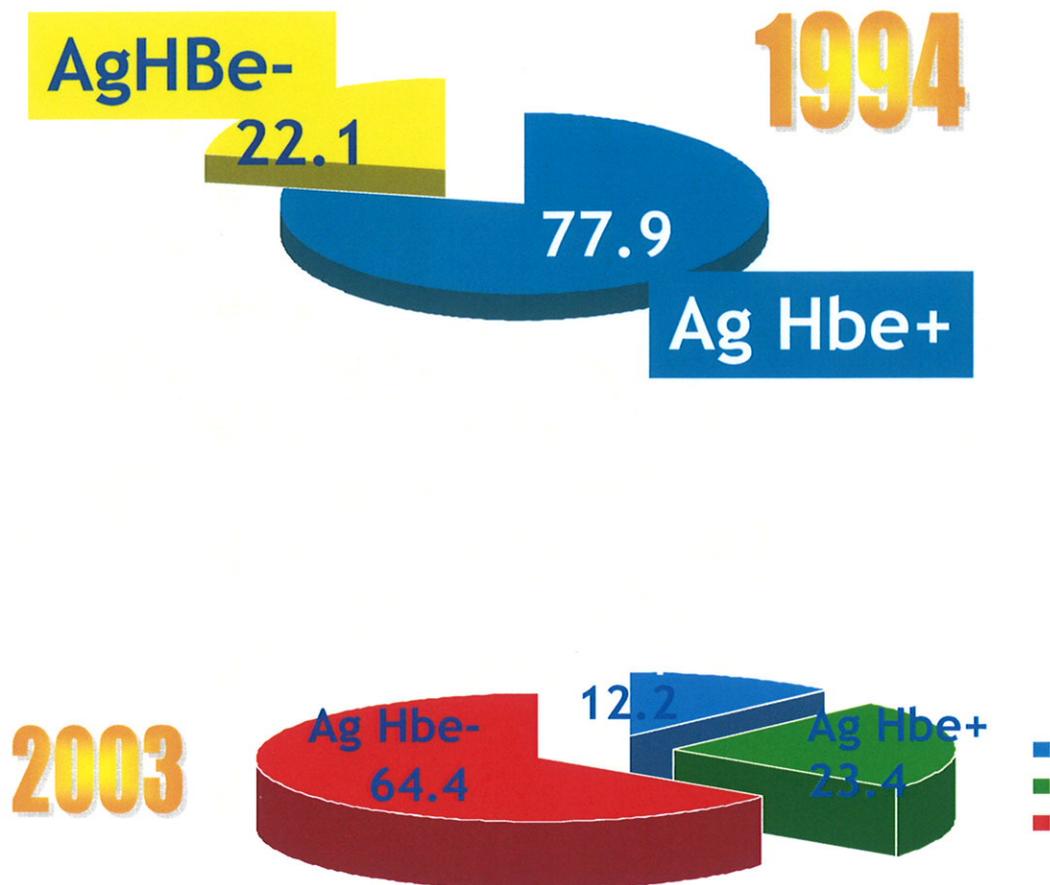


Figure 22 : Evolution de la répartition des AgHBe positifs et négatifs de 1994 à 2003 [227].

.3.4.3 Réactivation virale.

La réactivation virale correspond à la reprise d'une réplication du virus de l'hépatite B et peut s'accompagner d'une exacerbation cytolitique. On distingue généralement deux grands types de réactivation [228, 229].

Le premier type est la réactivation d'un virus sauvage qui peut se voir classiquement dans le cadre d'une réversion en AgHBe. Il s'agit d'une réapparition de l'AgHBe chez une personne ayant antérieurement fait une séroconversion anti-Hbe.

La deuxième situation est celle d'une réactivation d'un mutant pré-core, la personne infectée par le virus de l'hépatite B, ayant des anticorps anti-HBe, l'ADN viral remonte sans modification des marqueurs HBe.

Ces réactivations virales peuvent être associées à des poussées cytolytiques parfois sévères pouvant s'accompagner d'insuffisance hépatocellulaire.

L'exacerbation de la maladie hépatique peut être liée à une réactivation virale, mais aussi à d'autres facteurs comme une surinfection par le virus de l'hépatite C ou le virus de l'hépatite delta, et des facteurs intercurrents, comme l'alcool, la prise de médicaments hépatotoxiques, etc..

.3.4.5. Manifestations extra-hépatiques du virus de l'hépatite B.

Dans certains cas, l'infection virale peut se manifester par des symptômes extrahépatiques. Le plus classique est la périartérite noueuse qui est due à la présence de complexes immuns circulants impliquant des antigènes viraux et des anticorps spécifiques anti-VHB [230,231]. Ces complexes immuns se déposent sur des artères de moyen et petit calibre et sont à l'origine de la vascularite. Certaines observations indiquent que les mutants pré-core peuvent être associés à des périartérites noueuses, suggérant que l'AgHBe n'est pas toujours impliqué dans ces complexes immuns [232].

D'autres types de manifestations résultant également de complexes immuns ont été décrits. Ainsi, a-t-il été rapporté au niveau néphrologique des glomérulonéphrites extramembraneuses, des syndromes néphrotiques, au niveau neurologique des syndromes de Guillain-Barré. Il est également noté par les dermatologues des cas fréquents d'alopecie, de prurit ou plus rarement d'urticaire, d'érythème noueux, d'acrodermatite papuleuse, de syndrome de Raynaud.

Classiquement, le traitement repose sur l'utilisation d'antiviraux afin d'éliminer la cause de la vascularite, associée initialement à une corticothérapie ou autre immunosuppresseur et des échanges plasmatiques pour éliminer les complexes immuns circulants et contrôler leurs conséquences vasculaires [26].

.3.4.6. Cirrhose virale B.

La cirrhose virale B est une forme sévère de l'hépatite B chronique. En effet, celle-ci peut se compliquer d'insuffisance hépatocellulaire, d'hypertension portale, mais surtout de carcinome hépatocellulaire [233-235]. Ainsi, a-t-il été estimé que le risque de développer un carcinome hépatocellulaire chez des patients cirrhotiques est de 3 à 5 % par an. Ce risque est augmenté en cas de persistance de la réplication virale et d'élévation des transaminases.

Ceci implique une surveillance étroite chez ces patients, pour le dépistage du carcinome hépatocellulaire, par examens d'imagerie (au minimum échographie) et dosage de l'alphafoetoprotéine au moins tous les 6 mois, mais aussi de mettre en place des stratégies antivirales pour contrôler la réplication virale et diminuer ainsi le risque de développement du carcinome hépatocellulaire [236,237].

.3.4.7. Coinfection hépatite B- hépatite delta (Δ).

Le virus de l'hépatite delta est dépendant de la présence du virus de l'hépatite B pour la production de protéines d'enveloppe [238]. Sa présence est surtout observée en Amérique du Sud et dans le bassin méditerranéen. La prévalence de ce virus est en baisse, à la faveur des programmes de prévention contre le virus de l'hépatite B [239]. L'infection par le virus de l'hépatite delta survient sous deux formes.

La première est la coinfection par les deux virus, qui s'accompagne d'un tableau d'hépatite aiguë plus sévère, avec un taux de mortalité plus important [238, 240]. En revanche, elle ne s'associe pas plus fréquemment à une hépatite chronique.

La seconde est une surinfection par l'hépatite delta chez un patient porteur de l'antigène HBs. Elle se manifeste sous forme d'hépatite aiguë dans un contexte d'hépatite virale chronique B asymptomatique ou sous l'aspect d'une exacerbation d'une hépatite chronique B active sous-jacente. Contrairement à la coinfection, la surinfection s'accompagne toujours d'une hépatite chronique.

Par rapport à la monoinfection par le virus de l'hépatite B, une plus grande proportion de patients porteurs d'une coinfection hépatite B/hépatite Δ sont susceptibles de développer une cirrhose ou un hépatocarcinome [241, 242].

.3.4.8. Autres formes cliniques.

D'autres formes cliniques sont fréquentes, notamment dans le cadre des co-infections [243-246]. Il a été clairement montré que la co-infection avec le virus de l'hépatite C était associée à des maladies hépatiques plus sévères et probablement à une réponse moindre aux traitements antiviraux. La co-infection avec le VIH expose à un risque de maladie hépatique d'évolution plus rapide. Ceci est par ailleurs rendu plus complexe par les phénomènes d'hépatites liées à la restauration immunitaire, du fait des traitements antirétroviraux efficaces. Il est également décrit des phénomènes d'hépatotoxicité dus aux antirétroviraux et la sélection de mutants du virus de l'hépatite B résistant aux antirétroviraux.

Les hépatites B chroniques chez les patients immunodéprimés, dialysés rénaux, transplantés rénaux, transplantés hépatiques sont généralement sévères et associées à une morbidité plus importante [26, 247]. On note également dans le cadre de la transplantation de moelle osseuse et des chimiothérapies anticancéreuses, que des hépatites avec exacerbations parfois gravissimes sont observées lors de la restauration du système immunitaire, plaçant pour l'utilisation préventive d'analogues nucléosidiques lors de la mise en route de la chimiothérapie ou du traitement immunosuppresseur.

.3.5. Implication clinique.

En se basant sur la positivité ou non de l'antigène HBs qui définit ou non la persistance d'une répllication virale, la présence ou non d'un anticorps anti-HBe, le taux de DNA viral, on définit certaines situations cliniques qui correspondent à une phase de l'évolution naturelle de la maladie, avec des implications spécifiques à chacune dans la prise en charge.

Ces définitions ont fait l'objet de consensus [98, 248, 249], le plus récent actualisé en 2007, par l'AASLD (*American Association for the Study of the Liver Diseases*).

L'hépatite chronique se définit ainsi par un portage de l'antigène HBs avec un taux d'ADN viral supérieur à 20 000 UI/ml chez les patients AgHBe+ ou entre 2000 et 20 000 UI/ml chez les patients AgHBe-, associé à des anomalies persistantes ou intermittentes des transaminases. La biopsie du foie montre une inflammation et une nécrose modérées ou

sévères. En fonction de la positivité ou non de l'antigène HBe, on parlera respectivement d'hépatite chronique active à virus sauvage et à mutant précore.

Dans le cas du portage chronique inactif, l'antigène HBs persiste également après 6 mois, avec un AgHBe- et un anticorps anti-HBe+. En revanche, le taux d'ADN du virus de l'hépatite B est inférieur à 2000 UI/ml, les transaminases persistent à des taux normaux. Il n'existe pas de lésion ou des lésions minimales sur la biopsie.

L'hépatite B est dite guérie si l'antigène HBs est négatif, avec un anticorps anti-HBc positif, un taux d'ADN viral indétectable et un dosage normal des transaminases.

.C. TRAITEMENT DU VIRUS DE L'HEPATITE B.

.1. Bases du traitement.

Comme dans toute infection, le but du traitement est l'éradication complète du virus. Le meilleur moyen de traiter reste la prévention : elle s'appuie sur un vaccin, dont l'efficacité a été prouvée et sur une immunothérapie passive.

Chez les patients porteurs d'une hépatite chronique active, la persistance du génome viral dans les cellules infectées sous forme intégrée ou sous forme superenroulée, responsable des réactivations à l'arrêt du traitement, est un obstacle majeur à la guérison.

Le but du traitement va consister à supprimer le plus longtemps possible la réplication virale et donc à limiter l'atteinte hépatique afin d'éviter les conséquences les plus graves de la maladie que sont la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Un traitement antiviral apparaît donc indiqué en cas d'atteinte histologique, avec réplication virale détectable. De nos jours, l'atteinte histologique, en-dehors de la biopsie, peut être estimée par d'autres méthodes, non invasives, actuellement en cours de validation.

Le choix du traitement sera fonction du statut HBe, des taux d'ADN viral, de transaminases. Son efficacité sera estimée sur la séroconversion AgHBs, la baisse du taux d'ADN viral, la normalisation des transaminases et l'amélioration histologique [250, 251]. Une séroconversion HBe sera également détectée chez les patients porteurs d'un virus sauvage.

Actuellement, plusieurs médicaments sont utilisés : les interférons et les analogues nucléosidiques/nucléotidiques. L'avenir apportera d'autres solutions, notamment sans doute

par l'intermédiaire de traitements immunostimulants, dont les essais sont actuellement en cours.

.1.1. Données histologiques.

Le gold-standard qui permet de qualifier et de quantifier l'atteinte hépatique est la biopsie hépatique. Sa qualité est déterminée par sa taille (au moins 1 cm) le nombre d'espaces portes prélevés (au minimum 6) [252, 253]. L'examen de la pièce de biopsie détermine l'infiltrat inflammatoire, la nécrose hépatocytaire, le degré de fibrose qui en résulte, mais aussi la présence de lésions associées (stéatose,...), et si elle est dirigée une éventuelle dégénérescence.

L'atteinte histologique liée à l'hépatite virale B se caractérise par une obstruction précoce des petites veines portes et hépatiques, avec inflammation portale, péri-portale, lobulaire. Les hépatocytes apparaissent en verre dépoli, avec un cytoplasme granuleux [254, 255].

Afin d'en déterminer l'importance, plusieurs échelles standardisées ont été décrites : les plus connues et utilisées sont celle de Knodell, publiée en 1981 [256], le score de Scheuer (1991) [257], la classification METAVIR (1994) [258], et le score d'Ishak (ou index histologique modifié, 1995) [259].

En France, les deux classifications utilisées en pratique courante sont celles de Knodell et METAVIR. La première décrit un score qui additionne des points attribués aux lésions de nécrose périportale et en pont, de nécrose et dégénérescence focales intra-lobulaires, d'inflammation portale, et de fibrose : le maximum est de 22 points. Cette dernière, référence actuelle combine les lésions de nécrose, d'inflammation portale et/ou septale et de stéatose pour différencier les lésions d'activité en les classant de A0 à A3. On y ajoute celles de fibrose de F0 à F4 (qui représente la cirrhose).

Les anglo-saxons utilisent l'échelle d'Ishak qui se base sur un grade (score des lésions nécrotico-inflammatoires) et un stade (modification architecturale, fibrose et cirrhose).

A l'aide de ces scores, le clinicien peut décider de la mise en place d'un traitement et établir un suivi.

.1.2. Marqueurs non-invasifs.

La ponction-biopsie hépatique n'est pas un examen anodin, dans la mesure où il peut se grever d'une morbi-mortalité non nulle [260]. De plus, cet examen, invasif est mal perçu par les patients, ce d'autant plus qu'une douleur de l'hypochondre droit et de l'épaule droite apparaît souvent au décours.

Deux catégories d'examen, ont donc été étudiés récemment comme substituts à la biopsie, les tests biologiques, qui combinent plusieurs marqueurs sanguins et l'élastométrie impulsionnelle.

Divers tests biologiques ont été employés : APRI, Forns, FibroTest-Actitest, Hepascore, GUCI, Fibromètre... [261-270]. En France, le plus ancien et plus étudié est le FibroTest-Actitest, initialement décrit pour le virus de l'hépatite C, pour laquelle il est le seul validé par l'HAS [271]. Des résultats analogues ont été décrits pour le virus de l'hépatite B. Mais le nombre de patients évalués et le recul est moins important que pour le virus de l'hépatite C.

L'élastométrie impulsionnelle par ultrasons est réalisée grâce à un appareil récemment mis sur le marché, le Fibroscan® [272-274]. Cette technique se base sur le recueil des ondes ultra-sonores de cisaillement qui permettent d'évaluer la dureté du foie, et ainsi la fibrose. Cette technique a été aussi initialement étudiée pour le virus de l'hépatite C. Des données similaires ont été établies pour le virus de l'hépatite B. Toutefois, la présence d'une activité importante, qui se traduit par un taux élevé de transaminases, augmente artificiellement la valeur du Fibroscan® [275, 276]. Les premiers résultats sont en cours de publication mais il apparaît que les seuils établis sont différents de ceux de l'hépatite C [277]. La combinaison de différents tests (sanguin et élastométrie ; deux tests sanguins) permet l'obtention de résultats satisfaisants. A cet effet, des algorithmes ont été proposés [267, 278, 279].

Pour synthèse, les résultats des tests non invasifs sont encore à valider seuls ou en association sur de grandes populations.

.2. Traitements préventifs.

.2.1. Vaccination.

Depuis sa découverte par l'équipe de Philippe Maupas, en 1976 [16], le vaccin contre le virus de l'hépatite B a été largement développé et connaît une distribution conséquente [280, 281]. Contenant l'AgHBs, il a été conçu initialement sous forme plasmique, puis par génie génétique, qui est sa forme actuelle. Cet antigène est très immunogène, même chez le nouveau-né.

Pour un sujet sain, la vaccination induit une protection dans environ 95 à 98 % des cas et la durée de protection est supérieure à 10 ans [282, 283]. Son efficacité repose sur deux mécanismes : la persistance des anticorps postvaccinaux qui protège de l'infection virale initiale et la réactivation de l'immunité mémoire qui permet la production d'anticorps en quelques jours et prévient le passage à la chronicité avec ses complications. 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, en raison d'une mémoire immunitaire. Des facteurs de moindre réponse ont pu être isolés, tels que le sexe masculin, un âge supérieur à 30 ans, l'obésité, le tabagisme, l'alcoolisme, des facteurs génétiques (certains groupes HLA) et des situations d'immunodépression [283].

La vaccination permet non seulement de prévenir les hépatites B aiguës et chroniques, mais également les hépatocarcinomes induits par le virus de l'hépatite B, conduisant l'OMS à recommander dès 1995 l'installation d'un large programme de vaccination des nouveaux-nés et des adolescents dans les pays de forte puis de faible endémie, afin d'atteindre un taux de couverture de plus de 90 % de la population [284].

En France, pays où ce vaccin fut inventé, les premières campagnes d'immunisation datent de 1981 et concernèrent les personnels de santé (elles ne devinrent obligatoires qu'en 1991). Il apparut rapidement qu'à la vaccination de populations à risque (personnels de santé, nouveaux-nés de mère AgHBs positive, hémodialysés) devait s'ajouter celle des adolescents et nourrissons, afin de prévenir tous les modes de transmission, débouchant sur une campagne massive en 1994. Toutefois, l'extension de la couverture à un taux satisfaisant fut limitée du fait d'aspects administratifs (vaccination conseillée mais non-obligatoire, prise en charge du coût,...), mais aussi et surtout de polémiques (n'intéressant pratiquement que le landerneau français) quant à la nature du vaccin dans les années 1980 puis au sujet d'effets indésirables attribués (atteintes démyélinisantes centrales, fasciites à macrophages,...), dont la

répercussion dans les médias à large écoute, aujourd'hui encore entrave la diffusion de la vaccination. En effet, bien qu'aucune preuve scientifique n'ait été apportée [285-287], au nom du principe de précaution et dans la crainte d'un scandale sanitaire de retentissement équivalent à celui dit du « sang contaminé », les programmes de vaccination en milieu scolaire ont été suspendus. Actuellement en France le taux de couverture global était évalué à 21,7 % en 2002 et à 41,3 % en 2004 [288, 289]. On peut toutefois regretter des taux faibles de couverture dans certaines populations à risque (entre 6 et 25 % des populations en milieu carcéral, 13,2 % chez les patients infectés par le VIH) [281] et surtout le faible taux de couverture vaccinale des nourrissons de 30%, très inférieur aux autres pays européens et aux USA (90%).

Les seules contre-indications retenues pour le vaccin contre le virus de l'hépatite B sont des infections fébriles sévères et une hypersensibilité à l'un des constituants.

Le schéma vaccinal est actuellement à 3 doses (vaccin initial avec rappel à 1 et 6 mois). En-dehors des enfants de mères porteuses de l'AgHBs, il est administré au deuxième mois et son injection peut être combinée avec le vaccin pentavalent ou le vaccin dit ROR. Chez les adultes, si la primovaccination a eu lieu avant les 25 ans, aucun rappel n'est nécessaire. Au contraire, chez les sujets de plus de 25 ans, la troisième injection doit être suivie du contrôle du titrage des anticorps antiHBs un à deux mois après. Si le taux des antiHBs est inférieur à 10 UI/mL, se discute une revaccination [290]. Un schéma M0,M1,M2 avec rappel à un an est utilisé dans des cas particuliers lorsque une protection rapide est souhaitée ou lorsqu'il existe des arguments en faveur d'une moindre réponse.

.2.2. Immunothérapie passive.

Elle consiste en l'injection d'immunoglobulines par voie intraveineuse (ou intramusculaire selon les anciens protocoles) [291]. Son indication concerne principalement les patients porteurs du virus de l'hépatite B transplantés, les nouveaux-nés de mère porteuse de l'AgHBs, les patients hémodialysés en attente de l'efficacité de la vaccination, les personnes ayant subi une exposition accidentelle au sang chez en cas de non vaccination antérieure ou quand le sujet source est détecté positif pour l'AgHBs (d'après les recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène publique en France) [292]. Elle doit être impérativement associée à une vaccination [293].

Chez les patients transplantés hépatiques AgHBs positifs, c'est-à-dire les patients ayant bénéficié d'une greffe de foie pour une cirrhose post-hépatitique B ou B+Δ, une hépatite fulminante B, B+Δ, ou avec IgM antiHBc, l'intérêt d'une injection quotidienne d'immunoglobulines antiHBs dans les suites immédiates de la greffe, jusqu'à négativation de l'antigène HBs a été démontré par Samuel et al. [294, 295].

Chez les nouveaux-nés de mères porteuse de l'AgHBs, cette administration débute dès la naissance.

Concernant les patients hémodialysés, l'administration des immunoglobulines antiHBs se déroule jusqu'à l'efficacité de la vaccination.

En cas d'accident d'exposition au sang, dans les cas précédemment définis, l'immunoprophylaxie doit avoir lieu dans les 72 heures suivant l'accident [249].

Il est à noter que récemment, des travaux étaient en faveur d'une majoration de l'efficacité des antiviraux curatifs classiques quand on leur adjoignait des perfusions d'immunoglobulines [296, 297]. Toutefois, le faible gain apporté, ainsi que le coût élevé des injections ne semble pas pérenniser cette indication.

3. Traitements curatifs.

Le traitement de l'hépatite B repose sur deux types de stratégies dont les avantages et inconvénients respectifs sont exposés dans le tableau 4 synthétique sous-jacent.

| • INTERFERON | • ANALOGUES |
|--|---|
| Action antivirale et immunomodulatrice | Action antivirale |
| Durée limitée | Durée indéfinie |
| RÉPONSE PROLONGÉE | RÉPONSE MAINTENUE |
| Perte de l'Ag HBs non négligeable | Perte de l'Ag HBs faible |
| Pas de résistance | Résistance avec perte du bénéfice thérapeutique. |
| | Constitution de réservoirs de virus multirésistants |
| Rôle du génotype | Pas de rôle du génotype |
| Tolérance médiocre | Tolérance bonne |

Tableau 4 : Stratégies thérapeutiques.

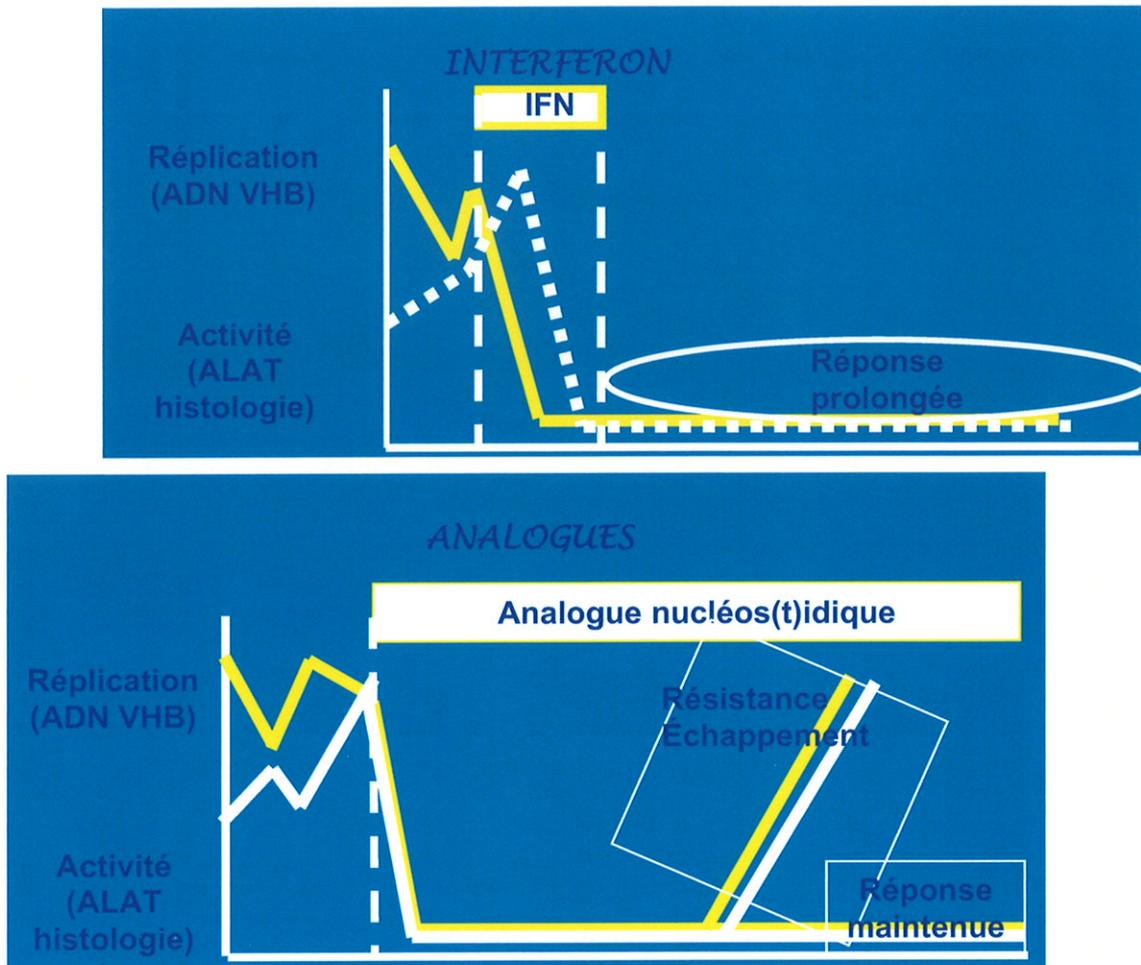


Figure 23 : Les différents types de réponse en fonction de la famille d'antiviral instaurée.

Les objectifs du traitement diffèrent entre le clinicien et le virologue.

Vus par le clinicien, ceux-ci sont représentés par :

- la diminution soutenue de la réplication virale (au mieux négativation) ;
- la séroconversion AgHBe-antiHBe chez le patient Ag HBe+ ;
- une rémission de la maladie histologique ;
- la disparition de l'Ag HBs et séroconversion AgHBs-antiHBs. ;
- le but ultime demeure la prévention de la cirrhose, de la décompensation aiguë, et du cancer.

Vus par le virologue, il s'agit essentiellement de l'éradication du cccDNA.

Ces points de vue se rejoignent et sont symbolisés par la clearance de l'AgHBs. En effet, c'est l'objectif qui se situe le plus près de la guérison virologique en pratique clinique et conclue le contrôle immunologique de l'infection par le virus de l'hépatite B [298]. Il est lié à l'augmentation de la survie globale et sans complications. La clairance est forte pour les interféron et interféron pégylé, faible et plus tardive (10 vs 5 ans) pour les analogues [299].

Le taux d'Ag HBs reflète le cccDNA intra-hépatique. Un taux d'AgHBs pré-thérapeutique inférieur à 10 000 UI/ml est prédictif de la clairance de l'Ag HBs [300]. La diminution de l'AgHBs (<10UI) à la 48^{ème} semaine est prédictive de la clearance à terme de l'Ag HBs (RR 22,8 95%CI 8-64,9, p<0.0001) [301].

.3.1. Interféron et interféron pégylé.

L'interféron α est le premier traitement mis en œuvre dans le cadre d'une hépatite B chronique active. La découverte récente d'une forme pégylée a permis d'espacer les injections et de réduire les effets secondaires. Actuellement, on utilise deux variétés d'interféron pégylé : le PEG-Inteféron α 2a (validé) et le PEG-Interféron α 2b (en cours de validation).

Les principales propriétés de l'interféron sont une activité antivirale, par inhibition de la synthèse des ARN viraux, et une immunomodulation, par augmentation de l'expression des molécules HLA de classe I et stimulation de la réponse T [250, 302]. L'absence de résistance et la courte durée de traitement constituent ses principaux avantages. Cependant, son mode d'administration (injection sous-cutanée) et les nombreux effets secondaires observés (syndrome pseudo-grippal, troubles thymiques, anémie, neutropénie,) compliquent son emploi.

.3.1.1. Interféron standard.

Chez les patients traités par interféron standard, un taux de séroconversion AgHBe-antiHbe est observé dans 25 à 40 % des cas [303-306]. Bien que ces études soient anciennes, on peut estimer que ce taux diminue quand la concentration en ADN viral est supérieur à 2.10^7 UI/mL. On constate également que les chances de succès sont moindres si le taux de transaminases est peu important (inférieur à deux fois la normale supérieure), ce qui conduit à ne pas recommander l'emploi de l'interféron standard chez les patients ayant des

transaminases peu élevées ou un forte charge virale. D'autres éléments sont prédictifs d'une mauvaise réponse : le sexe masculin, un âge supérieur à 40 ans, la présence d'une cirrhose. Si celle-ci est décompensée, l'interféron devient contre-indiquée.

Le rythme d'administration standard est de 10 millions d'unités trois fois par semaine ou 5 millions d'unités quotidiennes, pour une durée de 16 à 24 semaines.

Avec un suivi de 8 ans, on obtient un maintien de la séroconversion chez 70 à 80 % des patients. Bien qu'une séroconversion AgHBs-antiHBs soit plus fréquente que dans la population non traitée, elle n'est observée que pour 6 à 8 % des patients [307-310].

.3.1.2. Interféron pégylé.

L'interféron, sous sa forme pégylée, a été principalement étudié sous sa forme $\alpha 2a$. Il a été ainsi établi une amélioration des résultats notamment de la séroconversion AgHBe-antiHBe, sans majoration des effets secondaires. Cette molécule faisant l'objet de notre étude, ces travaux seront détaillés dans un prochain chapitre.

.3.2. Analogues nucléosidiques.

Le premier traitement en-dehors de l'interferon ayant fait la preuve de son efficacité est la lamivudine à la fin des années 1990. Ces deux dernières années ont vu l'arrivée sur le marché de nouvelles molécules comme l'entécavir et très prochainement la telbivudine.

.3.2.1. La lamivudine.

La lamivudine, commercialisée en France sous le nom de Zeffix® à la dose de 100 milligrammes par jour est un analogue pyrimidique qui empêche la liaison des nucléosides avec la polymérase du virus de l'hépatite B. Compte tenu de son ancienneté et du fait qu'elle est restée longtemps la seule molécule orale disponible sur le marché, la lamivudine a été utilisée pour un grand nombre de patients.

Son action est virostatique et elle n'agit pas sur le pool d'ADN superenroulé présent dans les hépatocytes infectés ; ainsi, l'arrêt du traitement entraîne-t-il un rebond de la

réplication virale en l'absence d'élimination de tous les hépatocytes infectés. Ceci justifie la mise en place de traitements prolongés, au-delà d'un an [310]. Cependant, il apparaît rapidement, parfois dès la 8^{ème} semaine de traitement, des mutants résistants ; leur risque d'émergence augmente avec le temps : environ 20 % à un, 60 % à 3 ans, 70 % à 4 ans, indépendamment du statut HBe du patient [311-313]. Cette résistance s'accompagne d'une réascension des transaminases et/ou de la charge virale sérique et d'une perte du bénéfice histologique [314]. Elle est observée surtout chez les patients présentant un taux d'ADN viral élevé avant traitement. Le développement de ces résistances peut également favoriser l'apparition de résistance pour les autres analogues et compromettre la réponse virologique à ceux-ci.

La mutation la plus fréquente concerne le remplacement de la méthionine par la valine ou l'isoleucine dans la séquence tyrosine-méthionine-aspartate-aspartate (YMDD) de la Polymérase virale. Elle est ainsi nommée rtM204V/I. Cette mutation est souvent accompagnée du remplacement d'une méthionine par une leucine dans une région d'amont : rtL180M [315-316].

Chez les patients AgHBe+, la négativation du taux d'ADN viral est rapidement obtenu, en un à deux mois. 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. Ce taux de séroconversion s'accroît au fil des ans en dépit des phénomènes de résistance [317-320].

Le taux de négativation de l'ADN viral et de normalisation des transaminases chez les patients AgHBe- 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 reste exceptionnelle. La lamivudine n'a pas lieu d'être poursuivie (au moins seule) en l'absence de négativation de l'ADN viral après 6 mois de traitement [321, 322].

Son utilisation actuelle est limitée en raison de l'arrivée sur le marché de nouveaux analogues au profil de résistance moindre. Il est ainsi démontré une efficacité dans la limitation de la progression de la fibrose chez les patients atteints de cirrhose, sans effet sur la survie toutefois [323]. La lamivudine étant la molécule principalement étudiée dans ce contexte, il est probable qu'un effet analogue existe pour les autres antiviraux. Elle est également utilisée actuellement en prévention de récurrence de l'infection par le virus de l'hépatite B chez les patients transplantés [297].

La lamivudine ne devrait plus être utilisée à ce jour en monothérapie.

3.2.2. L'entécavir.

Il s'agit d'un analogue de la guanosine, qui agit sur la phase de réplication à trois niveaux : la synthèse de la polymérase virale, la transcription inverse du brin négatif depuis l'ARN prégénomique et la synthèse du brin court de l'ADN. L'entécavir est distribué sous le nom de Baraclude®. Il existe en deux dosages : 0,5 et 1 mg, en cas de résistance à la lamivudine. Les doses sont ajustées à la créatinine. In vitro, l'entécavir est plus puissant que la lamivudine et l'adéfovir, même en cas de résistance à la lamivudine.

Chez les patients AgHBe+, au bout de 12 mois, on observe des réponses virologique (91% à 4 ans), histologique et biologique plus probantes qu'avec la lamivudine. Toutefois, le taux de séroconversion AgHBe-antiHBe est identique. Ces résultats sont confirmés après deux ans de traitement [324-326].

Des résultats équivalents sont obtenus chez les patients AgHBe- : 100% de négativation de l'ADN viral à 2 ans versus 64% pour la lamivudine [327].

Chez des patients présentant des profils de résistance à la lamivudine, les études suggèrent une meilleure efficacité en cas de remplacement de la lamivudine par l'entécavir qu'en cas de poursuite de la lamivudine. Il semble également que des réponses virologique, histologique et biologique satisfaisantes puissent être obtenues en cas de résistance à l'adéfovir [328].

Le taux de résistance est de 3 % à deux ans. Ces chiffres sont plus importants chez les patients porteurs d'une résistance à la lamivudine : 7 % à un an, 16 % à 2 ans et 51% à 5 ans (évaluation cumulée du risque de résistance sur l'ensemble des patients résistants à la lamivudine et traités dans les essais). La résistance à l'entécavir survient par l'intermédiaire de deux mécanismes, avec une mutation initiale M204V/I suivie de substitutions au niveau des rtI169, rtT184, rtS202 ou rtM250. Le risque de résistance est fortement augmenté en cas de résistance préalable à la lamivudine. Il est possible que des résistances croisées avec l'adéfovir existent également [329, 330].

Il faut noter également que le taux de séroconversion AgHBe-antiHBe est augmenté en fonction du taux préthérapeutique de transaminases (respectivement 12 %, 23 % et 39 % pour un taux d'ALAT de moins de 2, entre 2 et 5, et plus de 5 fois la normale respectivement) [331].

Des résultats complémentaires sont nécessaires, afin de connaître le risque de résistance à long terme, l'efficacité dans d'autres indications, l'apport dans des combinaisons médicamenteuses.

.3.2.3. La telbuvudine.

La telbuvudine ou L-doxythymidine est un analogue pyrimidique, doté d'une puissante efficacité contre le virus de l'hépatite B, supérieure à la lamivudine, 56 versus 39% pour les patients AgHBe+ et 82 versus 57% pour les patients AgHBe-. La dose d'administration est de 600 mg/jour. On observe fréquemment sous ce traitement une élévation du taux de CPK ; des cas de myosites ont également été décrits, notamment en association avec les statines [332-334].

Le taux de résistance est respectivement de 21,6% à 8,6% à deux ans pour les patients AgHBe+ et AgHBe- respectivement. Chez les patients AgHBe+, 30% d'entre eux présentent un taux de séroconversion de AgHBe-antiHBe à un an et le maintiennent dans 83% de des cas. Les taux de négativation de l'ADN viral obtenus sont plus probants que pour la lamivudine, chez les patients AgHBe+ et AgHBe- [335].

Des résistances ont été observées dans la séquence YMDD, par le biais de la mutation M204I. Le taux de résistance à un et deux ans pour les patients AgHBe+ est de 4,4 % et 21,6 % et pour les patients AgHBe- de 2,7 % et 8,6% [333].

.3.2.4. L'emtricitabine.

L'emtricitabine est actif sur la réplication du virus de l'hépatite B. Il est utilisé également chez les patients porteurs du VIH, seul (Emtriva®) ou combinés (Truvada®). De structure proche de la lamivudine, les mutations sont identiques.

Cette molécule a été étudiée et comparée au placebo, montrant des réponses histologique, virologique et biologique satisfaisantes. En revanche, le taux de séroconversion AgHBe-antiHBe est identique et le taux de mutation dans la séquence YMDD est détecté chez 13 % des patients [336].

Elle garde une place importante dans la stratégie du coinfecté par le virus de l'hépatite B et le VIH, essentiellement dans sa forme associée au ténofovir (Truvada®). Cette association est potentiellement intéressante aussi chez le mono-infecté.

.3.2.5. Clévudine.

La clévodine est une analogue pyrimidique qui agit en empêchant la réplication du virus de l'hépatite B, que ce soit in vitro ou dans les modèles animaux. Administré à la dose de 30 milligrammes par jour, il est bien toléré. A 24 semaines de traitement, le taux d'ADN viral devient indétectable chez 59 % des patients AgHBe+ et 92 % des patients AgHBe- [337, 338]. L'absence de bénéfice dans la séroconversion AgHBe-antiHBe suggère la présence de mutations.

.3.3. Les analogues nucléotidiques.

Deux médicaments ont actuellement l'AMM en France : l'adéfovir dipivoxil et le ténofovir.

.3.3.1. L'adéfovir et l'adéfovir dipivoxil.

Deux médicaments ont actuellement l'AMM en France : l'adéfovir dipivoxil et le ténofovir

L'adéfovir dipivoxil étant étudiée dans nos travaux, ces résultats seront détaillés ultérieurement.

.3.3.2. Le ténofovir.

Le ténofovir disoproxil fumarate est un analogue nucléotidique qui est également utilisé dans les infections par le VIH, seul (Viread®) ou combiné avec l'emtricitabine (Truvada®). Sa structure est équivalente à celle de l'adéfovir. Leurs résultats in vitro sont similaires. Toutefois, compte tenu d'une néphrotoxicité moindre, les doses de ténofovir utilisables sont plus importantes (300 milligrammes par jour), ce qui explique sans doute de meilleurs résultats dans les études cliniques. Les résultats obtenus sont probants, avec l'obtention d'une négativation de 93% de l'ADN à 12 mois versus 63% pour l'adéfovir chez

les patients AgHBe- et 76% versus 13% chez les patients Ag HBe+ avec 21% de séroconversion AgHbc-antiHBe [339, 340].

Il a également été décrit des phénomènes de rebond virologique lors du remplacement de ténofovir par adéfovir et de réduction virale significative en cas de remplacement d'adéfovir par ténofovir [341-343]. Compte tenu des profils très proche des molécules, il est cependant préférable d'utiliser en association un analogue nucléosidique en cas de résistance à l'adéfovir. A ce jour (2 ans de recul), aucun cas de résistance n'a été décrit au ténofovir.

Ce traitement est bien toléré. On rapporte de rares cas de syndrome de Fanconi et d'insuffisance rénale chez le patient coinfecté.

.3.4.Résistance aux antiviraux.

La résistance antivirale est une problématique qui concerne les analogues. Des facteurs de risque de développement de la résistance ont été retrouvés : le taux pré-thérapeutique d'ADN du virus de l'hépatite B, la rapidité de la suppression virale durant le traitement, une exposition antérieure aux analogues.

Des termes relatifs à la résistance antivirale aux analogues ont ainsi été définis :

-l'échappement virologique qui correspond à une augmentation du taux d'ADN viral supérieur à 1 log₁₀ au-dessus du nadir après obtention de la réponse virologique en cours de traitement.

-le rebond virologique défini par une augmentation de la charge virale au-dessus de 20 000 UI/ml ou au-dessus du taux préthérapeutique après obtention de la réponse virologique en cours de traitement.

-l'échappement biochimique qui se traduit par une augmentation des transaminases au-dessus de la normale après obtention d'une normalisation en cours de traitement.

-la résistance génotypique au cours de laquelle la détection de mutations est démontrée dans les études *in vitro* comme conférant une résistance aux analogues administrés.

-la résistance phénotypique qui confirme *in vitro* que la mutation détectée diminue la susceptibilité (augmentation des concentrations inhibitrices) aux analogues administrés [57].

.3.5. Autres traitements.

L'arsenal thérapeutique devrait s'enrichir dans les années futures de nouvelles molécules. Actuellement, on peut citer la thymosine, dérivée de peptides thymiques, pouvant stimuler la réponse immune T.

Les perspectives d'avenir consistent essentiellement en la place de l'immunothérapie et de la vaccination, ainsi que dans des stratégies de combinaisons [344, 345].

.4. Modalités thérapeutiques.

.4.1. Hépatite aiguë.

Compte tenu de la forte probabilité (95 %) de guérison spontanée chez les adultes immunocompétents, une thérapie antivirale n'est pas nécessaire. Toutefois, chez les patients présentant un hépatite aiguë sévère, voire fulminante, des travaux ont montré un gain de survie sous traitement par lamivudine. De manière empirique, et par extension, on peut considérer que l'entécavir, la telbivudine peuvent être utilisés dans cette indication. L'interféron, en raison de ses effets secondaires, et l'adéfovir, du fait d'une néphrotoxicité potentielle et d'une moindre puissance antivirale dans les premiers jours du traitement sont à éviter [346-348].

Dans certains cas d'hépatite fulminante, une transplantation devient indispensable, selon des critères bien définis. Ainsi, sont utilisés les critères de Clichy et du King's college [190, 214]. La transplantation peut être orthotopique totale (tout le foie est enlevé et remplacé par un greffon), ou auxiliaire (une partie du foie natif est laissée en place, dans l'éventualité d'une régénération, avec un greffon auxiliaire à ses côtés).

.4.2. Hépatite chronique sans cirrhose ou avec cirrhose compensée.

Selon les différentes conférences de consensus établies (les plus récentes étant celle des consensus américain et pacifique), le traitement sera institué en fonction du taux d'ADN viral, de transaminases et éventuellement l'atteinte histologique.

En pratique, les différentes indications thérapeutiques sont proposées dans les schémas ci-dessous (consensus NIH 2007 [57]).

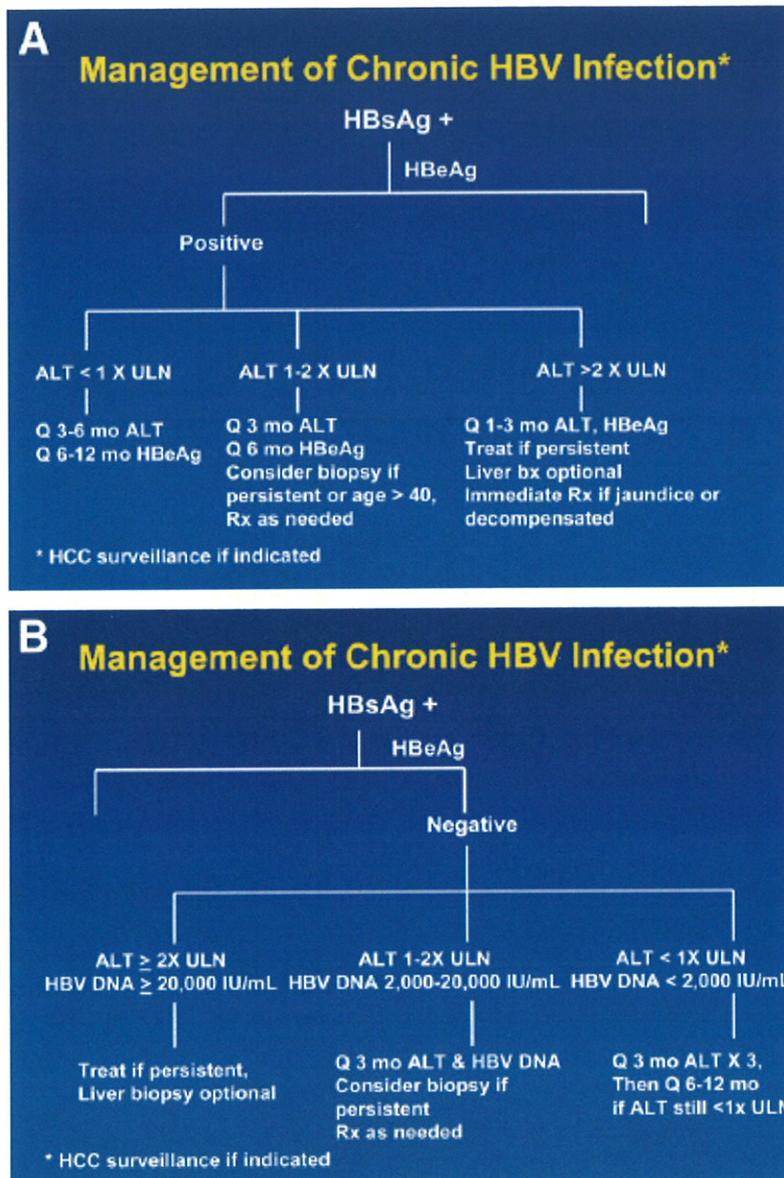


Figure 24 : Algorithme pour le sui des patients porteurs du virus de l'hépatite B. **A.** AgHBe positif. **B.** AgHBe négatif. ALT : alanine aminotransférase. ULN : upper limit of the normal ou limite supérieure de la normale. Rx : treat ou traitement. HCC : hepatocellular carcinoma ou carcinome hépatocellulaire.

.4.3. Cirrhose décompensée.

Les patients rentrent alors dans un programme de transplantation ; le délai sera déterminé par la présence ou non d'un carcinome hépato-cellulaire, des scores de gravité (classification de Child-Pugh-Turcotte, score de MELD). En attente d'une greffe, il est nécessaire de réduire au maximum la charge virale ; les deux molécules utilisées dans cette indication sont la lamivudine et l'adéfovir [349, 350]. Il est probable que les autres analogues nucléosidiques et nucléotodiques, compte tenu de leur efficacité, de leur relative innocuité et de leur barrière génétique plus élevée, puissent trouver ici une indication.

La surveillance concerne l'hépatite B, et notamment le taux d'ADN viral et la cirrhose (signes clinico-biologiques d'insuffisance hépato-cellulaire, fibroscopie oeso-gastroduodénale). Dans ce contexte précis, une attention particulière est apportée au dépistage du carcinome hépato-cellulaire [237].

.4.4. Carcinome hépato-cellulaire.

Le risque d'hépatocarcinome, en-dehors d'une cirrhose, est de 0,4 à 0,6 % chez les patients asiatiques, et seulement de 0,2 % chez les sujets caucasiens [204, 351]. Si le patient est au stade de cirrhose, le risque annuel est supérieur à 2 % par an, avec un risque cumulatif entre 15 et 20 % à 5 ans [352]. Le dépistage qui reste le meilleur moyen de prévention, notamment chez les populations à risque se base principalement sur l'imagerie, avec la pratique biannuelle d'une échographie abdominale, éventuellement couplée avec le dosage l'alpha-foeto-protéine (marqueur relativement spécifique, mais peu sensible) [353-355].

.4.5. Prise en charge en cas de résistance aux antiviraux.

En cas de résistance à la lamivudine, l'ajout de l'adéfovir est conseillé. Le taux de résistance à l'adéfovir est alors faible. En revanche, si la lamivudine est arrêtée, le taux de résistance à l'adéfovir est important. Ceci peut être expliqué par des mécanismes de sélection. Compte tenu des résistances croisées, l'entécavir n'est pas recommandé dans cette indication (risque de résistance à l'entécavir de 32 % à 3 ans) [356-360]. Bien que non décrit, le même

phénomène doit probablement exister pour les résistances à la telbivudine. Le ténofovir est aussi efficace que l'adéfovir sur les résistances à la lamivudine [361].

Si le patient développe une résistance à l'adéfovir (à 5 ans, apparition de la mutation chez 29 % des patients, échappement clinique dans 11 % des cas), l'ajout d'une autre molécule est conseillée (entécavir, lamivudine ou telbivudine) ; bien que non confirmé sur le plan clinique, cette recommandation est basée sur des données in vitro. Pour les mêmes raisons, et de manière empirique, une association est préférée à une monothérapie [362]. Il est probablement préférable de ne pas utiliser le ténofovir en monothérapie chez les patients résistant à l'adéfovir.

Chez les patients traités par entécavir, la survenue de phénomènes de résistance nécessite une mutation sur la séquence YMDD préalable. Le rajout d'autres mutations confère alors la résistance (dans ce cas, 7 % à un an, 30 % à 5 ans). Deux molécules peuvent être ajoutées dans ce cas : adéfovir ou ténofovir [361, 363-365].

En raison de mutations croisées, la lamivudine et l'emtricitabine sont déconseillées en cas de résistance à la telbivudine (et sûrement l'entécavir). L'adéfovir et le ténofovir sont les mieux indiqués ici [57, 366].

| | Lamivudine | Telbivudine | Entecavir | Adefovir | Tenofovir |
|-------------------------------|------------|-------------|-----------|----------|-----------|
| Sauvage | S | S | S | S | S |
| M204I | R | R | R | S | S |
| L180M + M204V | R | R | I | S | S |
| A181 T/V | I | S | S | R | S |
| N236T | S | S | S | R | I |
| I169T + V173L + M250V* | R | R | R | S | S |
| T184G + S202I/I/G * | R | R | R | S | S |

Tableau 5 : Résultats des tests de résistance croisée in vitro. *Tan J., Hepatology in press.*

R : résistant, I : intermédiaire, S : sensible. *: L180M + M204I/V.

.4.6. Coinfection hépatite B-hépatite Δ.

En cas d'hépatite aiguë, le traitement est identique à une mono-infection par le virus de l'hépatite B. Peu d'études ont été réalisées dans ce contexte. Ainsi, apparaît-il que la lamivudine et la ribavirine n'apportent pas d'effet bénéfique [367-369]. Les seuls traitements ayant fait preuve de leur efficacité sont l'interféron et sa version pégylée, avec des taux de réponse soutenues entre 17 et 43 %. Une chute supérieure à 3 log de la charge virale à 6 mois ou une normalisation des transaminases suggère une efficacité thérapeutique. Le traitement doit être poursuivi pour une durée prolongée, supérieure à 18-24 mois. Dans le cas contraire, il doit être arrêté [370, 371].

.4.7. Coinfection hépatite B-HIV.

Présente chez environ 10 % des patients porteurs du virus de l'hépatite B, le VIH accélère l'histoire naturelle de celui-ci. Les patients co-infectés ont ainsi plus de risques de développer des complications hépatiques et d'en décéder.

La prise en charge thérapeutique de ces patients est complexe en raison de la possibilité d'introduire des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques pouvant agir sur les deux virus (comme la lamivudine mais aussi l'emtricitabine et plus récemment l'entécavir), de la possible hépatotoxicité des médicaments actifs sur le VIH et de l'adaptation en fonction de la gravité de chacune des thérapeutiques.

L'interféron pégylé n'a qu'une activité réduite sur le VIH [372]. L'adéfovir a le mérite de pouvoir d'être actif sur le virus de l'hépatite B, mais expose au risque d'apparition de résistance croisée avec le ténofovir au niveau de la polymérase ADN du VIH [373]. L'entécavir, récemment démontré comme partiellement actif sur le VIH, pourrait également favoriser des résistances, à l'emtricitabine et à la lamivudine.

Les molécules conseillées dans cette indication sont la lamivudine, le ténofovir et l'emtricitabine. Il faut toutefois souligner que le risque de résistance à la lamivudine est accru dans cette indication (90 % à 5 ans), rendant difficile son emploi en monothérapie [374, 375]. Elle pourrait être remplacée par le ténofovir, mais l'utilisation de ces molécules en monothérapie n'est pas souhaitable et l'association d'emblée d'un analogue nucléosidique et nucléotidique type Truvada® apparaît tout à fait adaptée

Chez les patients dont l'infection par le VIH est peu avancée, l'emploi de molécules spécifiques au VIH n'est pas nécessaire. Dans le cas contraire, la combinaison d'inhibiteurs de la protéase, d'inhibiteurs de la transcriptase inverse non nucléosidiques avec des médicaments comportant de la lamivudine, de l'emtricitabine et du ténofovir est recommandée[57, 249].

Il est important de noter également que la mise en place d'un traitement spécifique au VIH, dans une forme avancée peut favoriser par l'intermédiaire d'un syndrome de reconstitution immunitaire (IRIS) une poussée importante de l'hépatite.

.4.8. Coinfection hépatite B-hépatite C.

Généralement, dans ce contexte de coinfection, un agent viral est actif, tandis que l'autre reste quiescent. Ainsi, chez les patients ayant un taux d'ADN viral inférieur à 20 000 UI/mL, et une PCR hépatite C positive, l'association interféron pégylé-ribavirine est privilégiée avec une efficacité équivalente à celle observée chez les patients mono-infectés [376]. Une surveillance du taux d'ADN viral chez ces patients est souhaitable. Si ce taux devient supérieur à 20 000 UI/mL, malgré l'interféron pégylé, une autre molécule (entécavir, adéfovir) peut être introduite [57, 249].

.4.9. Femmes enceintes.

Chez les jeunes femmes ayant un désir de procréation, l'introduction d'un traitement est discutée, notamment si l'atteinte hépatique (biologique, virologique, histologique) est minime ou modérée.

Concernant les molécules, la lamivudine et l'adéfovir sont de classe C (risque mutagène dans les essais in vitro), le ténofovir et la telbivudine de classe B (absence de mutagénicité in vitro). En revanche, l'expérience, qui concerne la lamivudine et le ténofovir, chez les patientes VIH enceintes, n'a pas montré d'effet indésirable pour le fœtus. La telbivudine n'a pas fait l'objet d'une expérience suffisante dans ce cas.

Traitées ou non, les femmes enceintes doivent être surveillées régulièrement, notamment concernant leur taux d'ADN viral. En effet, plus celui-ci est élevé, plus le risque de transmission à la naissance est élevé. Toutefois, ces enfants doivent systématiquement

bénéficier avant la douzième heure d'une vaccination et d'une immunothérapie passive. Le taux d'efficacité est important (95 %) [377]. Cependant, cette stratégie peut être insuffisante quand les mères ont une charge virale supérieure à 10^9 UI/mL (risque estimé à 28 %). La prise de lamivudine au cours du troisième trimestre de la grossesse diminue le risque de transmission materno-foetale dans ce contexte.

La possibilité d'une transmission a été décrite, essentiellement en Chine. Des perfusions d'immunoglobulines ont été réalisées avec des résultats discordants ; une étude suggère l'efficacité de la lamivudine [378, 379].

Le virus de l'hépatite B peut influencer sur le déroulement de la grossesse, en augmentant la fréquence du diabète gestationnel et d'accouchement prématuré.

L'infection par le virus de l'hépatite B n'est pas une contre-indication à l'allaitement en elle-même ; elle est rediscutée en fonction d'un éventuel traitement ou d'une coinfection VIH.

Il est important de rappeler que le dépistage du virus de l'hépatite B est obligatoire au 6^{ème} mois de la grossesse.

.4.10. Prise en charge chez les enfants.

Comme on l'a vu, le risque de transmission est important chez les enfants dans les zones de forte endémie, avec un risque de chronicisation de l'infection inversement proportionnel à l'âge. De rares cas de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire sont rapportés.

Une forte proportion de séroconversion de l'AgHBe est observée, autorisant une abstention thérapeutique, avec surveillance seule.

Chez les enfants porteurs de l'AgHBe+ et avec un taux d'ALAT élevé, une surveillance de 6 à 12 mois est initialement conseillée afin d'estimer les chances de séroconversion spontanée AgHBe-antiHBe. Il apparaît toutefois que cette séroconversion est plus fréquente une fois le traitement entrepris [380].

Les enfants chez qui existe une cytolysse persistante ou une activité histologique sont candidats à l'introduction d'une thérapie. Les deux molécules utilisées sont l'interféron et la lamivudine. Sur la base de 6 millions d'unité/m² d'interféron, au rythme de trois injections hebdomadaires pendant 24 semaines, il est constaté une augmentation du taux de séroconversion AgHBe-antiHBe et de négativation de la charge virale. Cependant, en plus des effets secondaires habituels liés à l'interféron, il est constaté une cassure de la croissance, qui

demeure toutefois transitoire [381, 382]. L'interféron n'est pas recommandé chez l'enfant de moins de trois ans, en raison d'un risque neurotoxique. La lamivudine permet l'obtention d'une réponse virale favorable (89 % deux ans après l'arrêt du traitement). Si le traitement est poursuivi, le risque de mutation de la séquence YMDD devient important (64 % à 3 ans) [383, 384]. De même, compte tenu d'une moindre chance de réussite en cas de charge virale élevée et d'un risque plus élevé de résistance en cas de retraitement ultérieur, la lamivudine n'est pas conseillée si les patients ont une charge virale élevée.

4.11. En cas d'immunosuppression.

Chez les patients devant bénéficier d'une transplantation d'un organe solide ou de moelle osseuse, devant subir une chimiothérapie ou devant recevoir une thérapie par anticorps monoclonaux, il existe un risque important de réactivation virale, accompagné souvent d'une cytolysse importante (30 à 50 % des patients concernés) [385]. Par ailleurs, la restauration immunitaire conduit non seulement à une réduction notable ou à l'arrêt spontané de la réactivation virale (avec possibilités de séroconversion AgHBe-antiHBe voire AgHBs-antiHBs), mais aussi à une aggravation parfois dramatique des lésions histologiques. Cette immunosuppression concerne les hépatocytes exprimant les antigènes viraux.

L'atteinte hépatique est chez ces patients d'autant plus importante que l'atteinte hépatique sous-jacente est marquée (fibrose éventuelle).

Le traitement concerne les patients porteurs de l'AgHBs. Là encore, la molécule la plus étudiée est la lamivudine [386]. De manière empirique, on peut estimer que les autres analogues, nucléosidiques et nucléotidiques, peuvent être indiqués. En revanche, l'interféron, par son action immunomodulatrice et ses effets secondaires, n'est pas retenu ici. Il est conseillé d'instituer un traitement sept jours avant l'introduction du traitement. Celui-ci est poursuivi pour une durée de 6 mois si l'immunosuppression n'est pas poursuivie et sur un plus long terme si elle est prolongée [387].

Chez les sujets de statut antiHBc+, et AgHBs-, un traitement est également logiquement recommandé étant donné le nombre de réactivation d'infections occultes décrit chez ces patients.

.4.12. Chez les insuffisants rénaux.

Sachant que le virus de l'hépatite B peut lui-même être à l'origine d'insuffisance rénale (glomérulopathie, PAN,...), un traitement antiviral peut-être bénéfique sur la fonction rénale. Parmi les molécules ayant fait preuve de leur efficacité, on retient l'interféron, la lamivudine et l'adéfovir (bien que, pour ce dernier, il existe une possible néphrotoxicité). Plus puissants, les récents analogues devraient trouver ici une indication [388, 389]. Toutefois, en raison d'une élimination rénale, les posologies sont adaptées en fonction de la clairance.

En pratique, le traitement est délivré à titre préemptif chez les patients dialysés candidats à une greffe rénale, indépendamment de la charge virale. En-dehors, il est proposé quand il existe une hépatopathie significative.

Les patients dialysés doivent par ailleurs bénéficier d'une vaccination (avec un contrôle du taux d'antiHBs et des rappels réguliers, en raison d'une mauvaise réponse).

.4.13. Professionnels de santé.

La vaccination reste obligatoire. Si celle-ci n'a pas eu lieu, en fonction du risque en cas de contact avec le virus de l'hépatite B, en plus du vaccin, une injection d'immunoglobulines dans les 72 heures est nécessaire.

Chez les professionnels de santé porteurs du virus de l'hépatite B, on considère que le risque de transmission est bas si le taux sanguin d'ADN viral est inférieur à 20 000 UI/mL. Au Royaume-Uni, il est nécessaire pour autoriser l'activité des chirurgiens que ce taux soit inférieur à 2 000 UI/mL [390].

.4.14. Chez les patients transplantés hépatiques.

En Europe, 5 à 10 % des transplantations hépatiques concernent une hépatopathie liée au virus de l'hépatite B. A 5 ans de la transplantation, le taux de survie actuel dans cette indication est de 85 %. Le risque de récurrence, en l'absence de prophylaxie, est de 80 % [297, 391].

Avant la transplantation, le but est d'atteindre un taux d'ADN viral minimal. En effet, en-dehors des cas d'insuffisance hépatique sévère, la transplantation n'est possible que si la charge virale est inférieure à 10^4 UI/mL.

La prophylaxie secondaire à la greffe consiste en l'injection de 10 000 unité d'immunoglobulines anti-HBs durant la phase d'anhépatie puis quotidiennement au cours des 6 premiers jours. Une surveillance régulière du taux d'anti-HBs est nécessaire ensuite ; en effet, dès que celui-ci devient trop bas (taux défini en fonction du risque de récurrence, de la durée de l'association avec des analogues), l'administration d'immunoglobulines devient indispensable. A celle-ci peut s'ajouter l'apport d'analogues ; ont été ainsi étudiés la lamivudine et l'adéfovir [392-394]; l'entécavir fait l'objet actuellement d'un protocole d'étude. Chez les patients dont le taux d'ADN viral pré-transplantation était bas, il peut se discuter à distance un arrêt des injections, sous condition d'un relais par analogues et vaccination. Cependant, la persistance démontrée d'ADN superenroulé chez ces patients doit faire demeurer prudent.

Toutefois, en raison de la survenue d'une mutation du gène S/préS ou du déterminant a, il peut apparaître dans 15 % des cas un échappement. Les récurrences d'hépatite B sur le greffon sont généralement sévères [395]. Celles-ci sont d'autant plus fréquentes que le foie du receveur est porteur d'un carcinome hépato-cellulaire [396]. Le choix thérapeutique dépend du traitement antérieur et du profil de résistance. Une monothérapie par lamivudine n'est pas recommandée ; l'adéfovir a fait preuve de son efficacité dans cette indication. Les nouvelles molécules doivent être évaluées.

D- Diagnostic virologique.

.1. Détection du génome viral.

.1.1. Quantification du l'ADN viral.

La présence d'ADN sérique du virus de l'hépatite B traduit la production de virions complets infectieux circulant dans le sang, et reflète l'intensité de la réplication virale.

Lors des hépatites aiguës, la mesure de la charge virale est inutile ; le diagnostic repose sur les sérologies.

Au contraire, au cours des hépatites chroniques, la mesure de la charge virale s'avère indispensable à l'évaluation de l'évolution de l'infection et à la décision thérapeutique. Chez les patients AgHBs-, la charge virale permet, en association avec d'autres arguments, de différencier le portage inactif (moins de 2 000 UI/mL) d'une infection active par mutant précore (réplication virale supérieure à 2 000 UI/mL). Elle sert également pour estimer le risque évolutif ; en effet, la présence d'une réplication virale accroît le risque d'hépatocarcinome. Une charge virale supérieure à 2 000 UI/mL, associée à des lésions hépatiques, est une indication à débiter un traitement ; en revanche, lorsqu'elle est supérieure à 2 millions, les chances de réponse au traitement sont moindres. Au cours du suivi, la mesure de la charge virale permet d'estimer la réponse au traitement et un éventuel échappement viral.

Lorsque l'ADN du virus n'est plus détectable, ceci ne signifie pas que celui-ci a disparu ; il peut persister sous forme intégrée ou superenroulée, notamment dans les hépatocytes, comme nous l'avons précédemment précisé.

La détection de l'ADN viral se fait par de nombreux tests, dont les progrès de la biologie moléculaire ont permis le développement en quantité et qualité, avec des seuils de détection et de 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 1 000 et 5 000 copies de génome/ml). La société Bayer a commercialisé un test basé sur l'amplification de signal (Versant HBV DNA 3.0 assay), présentant une spécificité intéressante, mais une sensibilité limitée. Actuellement, les techniques d'amplification par PCR sont les plus sensibles. De

développement récent, les trousse utilisant les technologies de PCR en temps réel ont des seuils de quantification inférieurs à ceux des PCR quantitatives « classiques » et des gammes de quantification plus étendues.

Il est également important de rapporter l'effort de l'OMS (par le biais de la *World Health Organization (WHO) Expert Committee on Biological Standardization*) qui a réalisé une standardisation des résultats : un sérum étalon de génotype A (appelé *WHO HBV International Standard*) issu de patients fortement virémiques s'est vu attribuer un titre de 10^6 UI/mL [397]. Ainsi, pour chaque trousse commercialisée, une calibration a-t-elle été effectuée avec ce standard et un facteur de conversion copies/mL-UI/mL calculé. Celui-ci est le plus souvent proche de 5.

| Test | Technologie | Seuil de détection | Seuil de quantification | Intervalle linéaire de quantification |
|---|--|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Artus RealArt HBV PCR kit [398] | 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 Amplicor™ HBV Monitor test (données du fabricant) | PCR (amplification de la cible) | 5-7 UI/mL | 12 UI/mL | 8 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 6 : Comparaison des principaux tests commerciaux actuellement disponibles pour la quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B.

.1.2. Détection des variants du virus de l'hépatite B.

.1.2.1. Génotypes.

Plusieurs méthodes ont été décrites pour pouvoir identifier les génotypes du virus de l'hépatite B . Le choix de la méthode dépend essentiellement de l'objectif des études menées [80, 399].

.1.2.1.1. Séquençage et étude phylogénétique.

Actuellement, le couplage du séquençage du génome entier du virus de l'hépatite B et de l'analyse phylogénétique est la méthode de référence pour le génotypage des souches du virus de l'hépatite B [400].

Le séquençage de l'ensemble du génome viral n'est pas toujours nécessaire pour déterminer le génotype du virus de l'hépatite B. Toutefois, il faut rester prudent sur le choix de la région séquencée ; les arbres phylogénétiques obtenus à partir des séquences des différents gènes de plusieurs souches diffèrent considérablement. La comparaison des séquences du génome entier et du gène S a montré que les séquences S permettaient d'identifier précisément les génotypes de A à F. Cependant, bien qu'étant la plus fiable pour déterminer le génotypage, la séquence S ne permet pas de détecter les éventuelles recombinaisons entre les souches du virus de l'hépatite B [401].

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

Par ailleurs, actuellement, aucune souche de référence n'est 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 du virus de l'hépatite B permet l'identification de nouveaux génotypes ou des recombinaisons inter-génotypes. Toutefois, cette méthode

manque de sensibilité pour la détection des mélanges de population. D'autres techniques exploitant la variabilité génétique du virus de l'hépatite B ont donc été développées. Bien que plus sensibles que la technique de séquençage pour la détection des mélanges de génotypes, elles reposent sur l'analyse d'une séquence protéique ou nucléotidique très courte et donnent des résultats moins fiables. En outre, ces méthodes nécessitent d'être adaptées chaque fois qu'une nouvelle mutation ou un nouveau génotype est identifié.

On distingue parmi ces techniques :

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

-l'analyse par polymorphisme de restriction (*restriction fragment length polymorphism* : RFLP).

-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).

.1.2.2. Variants S.

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

Compte tenu du nombre et de la variation des mutations rencontrées, la méthode de référence pour l'étude de ces variants repose sur la région d'intérêt. Actuellement, aucune technique permettant l'exploration de l'ensemble des mutations n'a été décrite. Les amorces nécessaires à l'amplification et le séquençage doivent être choisies dans les régions conservées entre les génotypes. Une équipe lyonnaise a 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 [402]. La trousse commercialisée par Bayer Diagnostics (Trugene HBV Kits) permet de détecter des mutations dans le cadre de lecture du gène S (acides aminés 100 à 227) simultanément à l'identification du génotype.

.1.2.3. Variants précore.

Au cours des hépatites chroniques, la détection de mutants dans la région précore ou dans le promoteur du core permet la distinction entre les patients infectés par le mutant précore de ceux en rémission.

Ces mutations sont mises en évidence soit par séquençage, à l'aide de techniques dites « maisons », soit grâce à des méthodes rapides, standardisées, mais se limitant à des 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.

Les variants recherchés en pratique courante 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 identifier ces mutations est le séquençage du domaine transcriptase inverse, à l'aide duquel on identifie l'ensemble des mutations de résistance, quel que soit le traitement antiviral utilisé.

Les mutations sont détectées, soit par séquençage direct du produit par PCR (trousse Trugene HBV, Bayer Diagnostics) , soit par hybridation du produit d'amplification du gène P avec des sondes spécifiques (test INNO-LIPA HBV DR, Immunogenetics). Cette dernière ne détecte dans sa version actuelle que les mutations de résistance à la lamivudine. Le test par séquençage direct, en revanche, permet la détection des résistances à la lamivudine et à l'adéfovir.

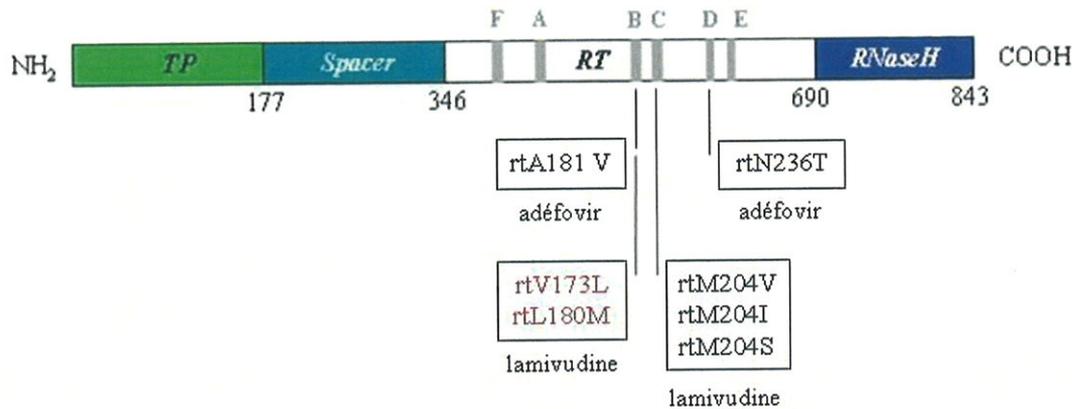


Figure 25 : Mutations de résistance actuellement connues pour la lamivudine et l'adéfovir. Les mutations rtV173L et rtL180M compensent in vitro la diminution de répllication virale observée chez les mutants [403].

.1.3. Recherche des formes persistantes de l'ADN du virus de l'hépatite B.

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

.1.3.1. Détection de l'ADN intégré.

Elle s'effectue essentiellement à partir de prélèvements histologiques, principalement au niveau hépatique. La plupart des techniques décrites reposent sur l'amplification des jonctions entre le virus de l'hépatite B et le génome humain par PCR puis l'analyse par séquençage ou par Southern Blot.

.1.3.2. Détection et/ou quantification de l'ADN superenroulé.

Responsable des réactivations lors de l'arrêt du traitement ou en cas d'immunosuppression, l'ADN superenroulé (ou *covalent closed circular DNA*, cccDNA)

représente un marqueur important pour le suivi des patients et l'évaluation de l'efficacité d'un traitement.

Auparavant recherché par Southern Blot, le cccDNA est actuellement détecté par des techniques de PCR basées sur l'utilisation d'amorces spécifiques, méthodes plus sensibles et plus simples d'utilisation. Les amorces sont choisies de part et d'autre du *gap* du génome viral, de telle façon que seul le cccDNA est amplifié.

Une autre technique, nommée invasive signal amplification (Invader assay) reposant sur l'amplification du signal a été développée [404]. Elle 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 ainsi libérée est amplifiée par PCR en temps réel.

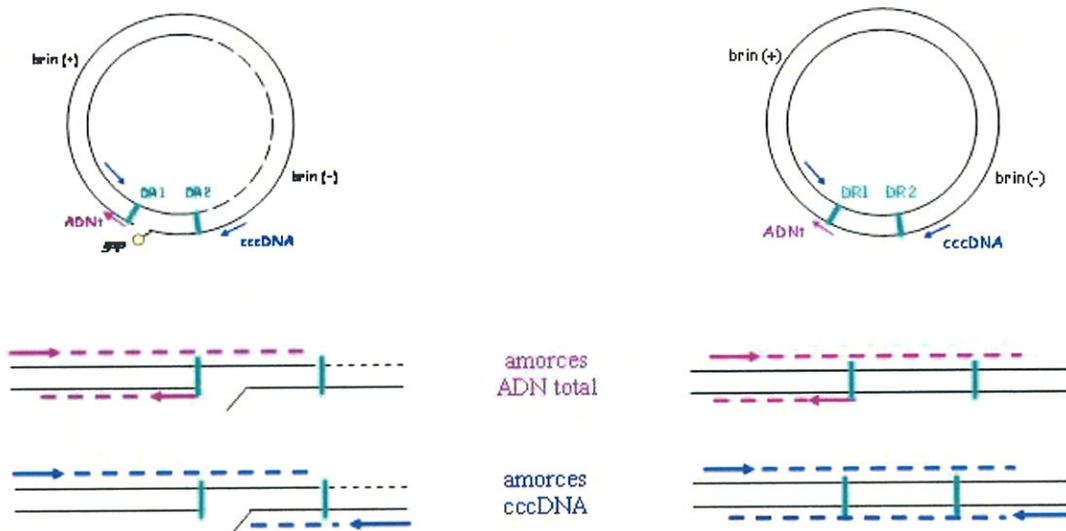


Figure 26 : Principe des PCR permettant l'amplification sélective du cccDNA.

.2. Diagnostic sérologique.

Les trois systèmes antigène-anticorps utilisés sont AgHBs/antiHBs, AgHBc/antiHBc, AgHBe/antiHBe.

.2.1. Le système HBs.

L'antigène HBs correspond à une production en excès de protéines d'enveloppe virale, traduisant la présence du virus de l'hépatite B. Les antigènes préS1 et préS2, qui sont le reflet de la réplication virale, ne sont pas recherchés en diagnostic de routine.

L'AgHBs est le premier marqueur sérique détecté dans le sang environ un à trois mois après la contamination. Il est recherché dans le sérum par l'intermédiaire de tests sérologiques immunoenzymatiques de type ELISA utilisant des anticorps monoclonaux. Quand l'AgHBs est détecté pour la première fois chez un patient, des tests de neutralisation (avec des anticorps antiHBs) permettent de renforcer la spécificité de la réaction et de confirmer le diagnostic.

Certains tests peuvent s'avérer négatifs, car l'AgHBs peut circuler sous forme de complexes immuns. Par ailleurs, 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. Même parmi les tests de dernière génération, certaines trousse sont incapables de détecter certains mutants dans le déterminant « a » et peuvent donc rendre parfois un résultat AgHBs faussement négatif [405].

Les anticorps antiHBs apparaissent progressivement au cours de l'élimination virale. Leur apparition correspond soit à l'arrêt de la réplication virale avec guérison, soit à une protection post-vaccinale. Ils sont recherchés dans le sérum par technique 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, même si, en pratique, la séroprotection n'est affirmée qu'à partir de 100 UI/L.

.2.2. Le système HBc.

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

Les anticorps antiHBe apparaissent précocement dans le sérum, quel que soit le stade évolutif de la maladie. Ils témoignent d'une infection, guérie ou non par le virus de l'hépatite B, en aucun cas d'une protection.

En cas de suspicion de primo-infection, la fraction IgM antiHBe est recherchée dosée parallèlement aux antiHBe totaux par technique ELISA. Elle est également mais inconstamment détectée en cas de réactivation. Dans les deux cas des taux significatifs d'IgM anti Hbe peuvent persister jusqu'à six mois.

.2.3. Le système HBe.

L'AgHBe est détectable dans le sérum par ELISA, mais aussi par RIA, électrosynérèse, immunodiffusion. Sa présence traduit la présence d'une réplication virale pour les souches sauvages.

La disparition de l'AgHBe, mais surtout l'apparition des antiHBe, parallèlement à la chute de l'ADN viral, témoignent d'une évolution favorable. Toutefois, elle ne traduit pas une guérison, mais le plus souvent un portage inactif. Si la charge virale reste élevée (ADN viral supérieur à 2 000 UI/L), on évoque une mutation précoce, qui n'a pas nécessairement besoin d'être recherchée en routine.

.3. Cinétique d'apparition des marqueurs.

.3.1. Hépatite aiguë.

Lors de la phase aiguë des hépatites virales B, la réplication virale est intense et la charge virale peut atteindre 10^9 UI/mL. En cas de résolution spontanée, elle décroît progressivement avant de devenir indétectable.

L'AgHBs apparaît en moyenne 1 à 3 semaines après la contamination et précède parfois les signes cliniques et l'élévation des transaminases. Il disparaît généralement en 1 à 2 mois, après disparition des signes cliniques et normalisation des transaminases. L'antigène HBe apparaît après l'AgHBs et disparaît rapidement. La séroconversion HBe annonce un arrêt

de la réplication virale. La présence de l'AgHBe au-delà de 3 semaines après le début des manifestations cliniques suggère une évolution de la maladie vers une chronicité. Ce marqueur, toutefois, n'a pas d'intérêt diagnostique au stade aigu. Les anticorps antiHBc deviennent détectables dans le sérum 2 à 4 semaines après l'AgHBs, et persistent toute la vie.

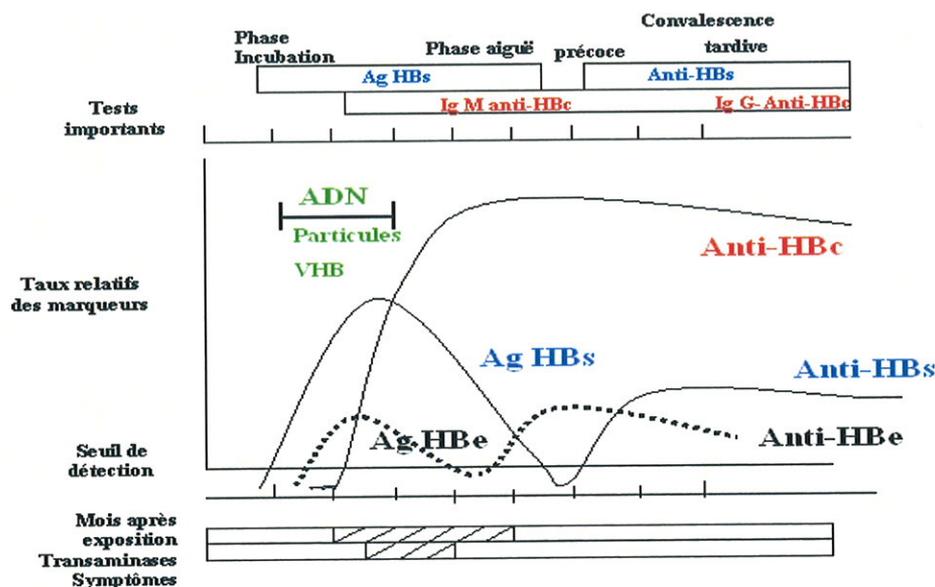


Figure 27 : Evolution des marqueurs virologiques et sérologiques après une hépatite aiguë d'évolution favorable.

.3.2. Hépatite fulminante.

Au cours des hépatites fulminantes, les IgM antiHBc sont présents à des titres élevés. Les autres marqueurs (AgHBs, antiHBs, AgHBe et taux d'ADN) sont inconstamment détectés dans le sérum.

En revanche, lors des hépatites fulminantes survenant chez des patients porteurs chroniques (en cas de réactivation spontanée, d'immunosuppression, ou de surinfection par le virus de l'hépatite delta), les IgM antiHBc sont plus rarement retrouvés.

.3.3. Hépatite chronique.

La charge virale, au cours des hépatites chroniques, varie en fonction des stades de l'évolution : elle est ainsi relativement élevée au cours de la phase d'immunotolérance, avant de chuter lors de la phase d'équilibre jusqu'à devenir parfois indétectable (selon la sensibilité de la technique employée). Les réactivations virales s'accompagnent d'une réascension du taux d'ADN viral à des niveaux élevés.

Les antigènes HBs et HBe (en cas d'infection par une souche sauvage) demeurent détectables pendant plus de 6 mois, parfois même plusieurs dizaines d'années. Une séroconversion HBe peut être observée après plusieurs années, sans nécessairement une disparition de l'ADN viral. Chez 5 à 10 % des patients, une séroconversion HBs est observée. Quel que soit le stade, même en cas de guérison, les antiHBc sont retrouvés.

Chez les patients immunodéprimés ou coinfectés par le VIH, il faut noter des épisodes de réapparition de l'AgHBs après « guérison » de l'infection. Ils témoignent soit d'une réactivation de la souche initiale, soit d'une réinfection par une autre souche du virus de l'hépatite B.

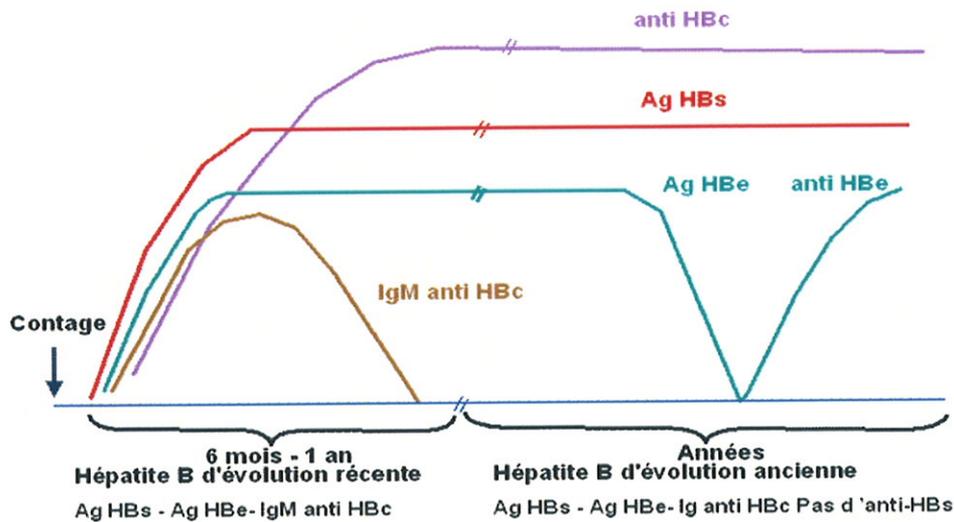


Figure 28 : Evolution des marqueurs virologiques et sérologiques après une hépatite aiguë évoluant vers la chronicité.

3.4. Carcinome hépatocellulaire.

La prévalence des marqueurs du virus de l'hépatite B varie en fonction du lieu. En effet, l'AgHBs est inconstamment retrouvé chez les patients en France (20 à 30 %), alors qu'en Asie et en Afrique, il est détecté chez 80 % des patients. La détection du génome viral sur les biopsies hépatiques tumorale pose un problème de sensibilité : il semble que les cellules cancéreuses des patients AgHBs- contiennent moins d'ADN du virus que celle des patients AgHBs+.

4. Profils sérologiques atypiques.

4.1. Profils liés à la présence de variants du Virus de l'hépatite B.

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'anticorps 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. 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.

Chapitre III : notre étude : cinétique du cccDNA et de l'HBV DNA total dans les lymphocytes, dans le sang total et dans le sérum chez des patients traités pour une hépatite chronique B par adéfovir dipivoxil et peginterferon alpha 2a dans les six premiers mois du traitement. A propos de 18 patients.

Cette étude observationnelle est une étude Loi Huriet ayant fait l'objet d'une acceptation par la DRC de Limoges et CCPPRB du Limousin

.A. Rationnel.

.1. Les difficultés posées par la persistance du virus.

Un des objectifs du traitement antiviral est d'atteindre les phases ultimes de l'histoire naturelle de la maladie, où le taux de répllication virale est faible et où le risque de maladie hépatique grave (cirrhose, carcinome hépatocellulaire) est moindre. Les progrès réalisés par la biologie moléculaire ont permis de définir des critères de réponse virologique, dépendant du taux d'ADN viral, du statut HBs et HBe du patient. Il apparaît dans les travaux les plus récents que la forme superenroulée de l'ADN ou cccDNA (*Covalently Closed Circular DextriboNuclueic Acid*) jouerait un rôle majeur dans la persistance du virus ainsi que sa réactivation.

.1.1. La guérison virologique.

Même si la recherche de cccDNA intra-hépatique, comme nous venons de le voir, apparaît de plus en primordial pour estimer l'évolution de la maladie, l'interprétation de la guérison virologique s'appuie l'utilisation de critères d'éradication virale ou critères d'évaluation à court terme, également nommés « surrogate markers ».

Pour rappel, on définit l'éradication virale en cas d'infection par le virus sauvage par la négativation de l'ADN du virus de l'hépatite B associée à une séroconversion AgHBe-antiHBe à distance de l'arrêt du traitement, et pour les infections par souches virales mutantes précore par la négativation de l'ADN à distance de l'arrêt du traitement.

A cet effet, il est nécessaire de bénéficier de méthodes de mesure sensibles de la quantité d'ADN du virus de l'hépatite B.

L'hétérogénéité de la sensibilité des techniques de quantification de la virémie utilisées dans la pratique quotidienne complique l'interprétation de la réponse virologique.

Les techniques d'hybridation utilisées dans les premières études, notamment celles concernant la lamivudine, avaient un seuil de détection compris entre 10^5 et 10^6 copies par mL. Celui-ci représente le seuil de résistance phénotypique.

L'avantage des techniques de biologie moléculaire est leur extrême sensibilité et leur reproductibilité qui permet d'anticiper sur l'émergence de mutants résistants aux médicaments lorsqu'il existe une réascension de la virémie (seuil de détection inférieur à 10^3 copies par mL) avant la traduction clinique de celle-ci (élévation des transaminases). La résistance génotypique est ainsi définie.

En cas de faible répllication virale, l'émergence d'un mutant ne s'accompagne pas toujours d'une recrudescence de la cytolyse. Cette mutation peut alors être détectée par une technique d'InnoLIPA à partir d'une prévalence de 4-8 % par rapport à la souche sauvage. Ainsi, l'utilisation de ces tests favorise-t-elle la détection de mutations du gène de la polymérase plusieurs mois avant la réascension de la virémie [406, 407].

Pour couvrir le large éventail de la quantification du virus de l'hépatite B, des obstacles sont rencontrés.

Les techniques d'amplification de signal comme l'Hybrid Capture (Digene corporation) ou l'ADN branché (Bayer Diagnostics) sont essentiellement utiles pour mesurer des quantités supérieures à 200 000 copies par mL. Les techniques d'amplification de cible comme la PCR (Roche Diagnostics), au contraire, ne mesurent sans dilution que jusqu' à 10^6 copies par mL.

Les techniques plus récentes (Taqman, Lightcycler,...) permettent, en partie de dépasser cet écueil.

Dans notre étude, deux méthodes de mesure de la virémie ont été employées : une PCR par COBAS AMPLICOR disponible en début de protocole puis une PCR en temps réel commercialisée Taqman 48, Roche et une PCR en temps réel « maison » par LightCycler..

Les définitions données de la guérison virologique ont leurs limites.

Pour interpréter une négatation de l'ADN du virus de l'hépatite B, les techniques sans amplification, qui peuvent s'avérer suffisantes en cas d'infection par virus sauvage (seuil

de 10^5 copies par mL, seuil de l'hybridation, fixé en 2001 par la *NIH, National Institute of Health Workshop*) ne sont pas adéquates en cas d'infection par mutant pré-core, où la réplication virale est plus faible. En effet, dans ce cas, les techniques de détection par PCR sont plus sensibles et le seuil de 10^5 copies par mL peu approprié.

Par ailleurs, concernant l'interprétation de la séroconversion AgHBe-antiHBe, la difficulté d'interprétation est amplifiée par l'expérience acquise avec les nouvelles molécules. La séroconversion peut n'être que transitoire voire aboutir à une séroréversion ou enfin correspondre à l'émergence d'un mutant pré-core avec réplication persistante.

Enfin, même les techniques récentes de détection de l'ADN du virus de l'hépatite B sont soumises à des limites. D'une part, même si leur sensibilité est de plus en plus importante, les techniques de mesure de la virémie ne peuvent détecter des taux de copies au-dessous de 6 UI/L (Taqman PCR, Roche). D'autre part, l'ADN de l'hépatite B est présent dans d'autres sites (foie, lymphocytes).

En somme, le dosage de l'ADN sérique se révèle être un marqueur peu fiable de guérison virologique. C'est la raison pour laquelle on cherche à développer des techniques de mesure des formes de persistance du virus. Si certains marqueurs, comme l'antigène relié à la protéine de core (HBcrAg) [408] ou l'ARN pré-génomique (pgARN) [409], sont intéressants, le plus prometteur et le plus étudié est le cccDNA.

.1.2. L'intérêt du cccDNA.

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

Au cours de l'infection par le virus de l'hépatite B, le cccDNA s'accumule au sein du noyau de la cellule où il persiste comme épisode et facilite la transcription des gènes du virus. Il est maintenu à un taux avoisinant 30 à 50 copies [78, 410]. Le cccDNA a une longue demi-vie (supérieure à celle des hépatocytes) et est très résistant. D'après des modèles mathématiques, la durée nécessaire à l'élimination totale du cccDNA serait de 14,5 ans [411].

On peut ainsi expliquer la réactivation d'hépatites considérées comme guéries (même ayant négativé leur AgHBs) chez les personnes immunodéprimées.

Compte tenu de la longue demi-vie du cccDNA et de sa stabilité (plus particulièrement dans les hépatocytes de demi-vie longue) [412, 413], le facteur limitant de l'élimination du virus semble être sa clairance [413, 414]. Deux mécanismes peuvent cependant la favoriser : l'effet de la cytolyse par le truchement duquel les cellules infectées seront remplacées par des cellules normales [415, 416]; l'effet direct de cytokines au sein de la cellule [412, 413, 418]. D'autres facteurs, tels que la production d'anticorps circulants prévenant l'infection par de nouveaux virus ou le blocage de la production de cccDNA dans les cellules déjà infectées, peuvent aussi intervenir dans le processus [419].

Les traitements antiviraux actuels n'ont peu d'effet sur le cccDNA. Ils n'empêchent pas sa formation quand le virus est inoculé à des animaux auparavant indemnes et recevant une prévention par analogues [420]. Seule l'élimination des cellules infectées permet son éradication, objectif seulement atteint au moins partiellement par l'interféron. Ainsi, l'objectif habituel des thérapeutiques est de limiter au maximum la réplication virale, afin que le système immunitaire détruise les cellules infectées sans qu'apparaissent de nouvelles cellules infectées [421].

Actuellement, le marqueur de suivi de référence pour les patients porteurs du virus de l'hépatite B n'est pas le cccDNA, mais le taux sérique d'ADN viral, qui représente les virions présents dans le sang et reflète la réplication virale.

Toutefois, comme nous l'avons vu, en pratique, ce marqueur est imparfait, car il ne témoigne pas de l'élimination des formes de persistance du virus. Il apparaît ainsi important de pouvoir détecter et quantifier ce cccDNA dans les cellules. Des techniques ont ainsi été développées dans cette optique [415, 422-424].

Ceci a permis de réaliser de nombreux travaux sur l'intérêt du dosage du cccDNA intrahépatique et de son implication dans la pratique quotidienne. Il apparaît ainsi que le taux de cccDNA intrahépatique n'est que peu affecté par la prise de molécules virostatiques, notamment dans les modèles animaux, même si sa variation suit celle des autres marqueurs de l'infection. Il semble même que le cccDNA devienne la forme prédominante du virus en cas de traitement prolongé [425]. Par ailleurs, comme le suggère un travail chinois [426], la baisse ou la négativation du taux de cccDNA intrahépatique se révèle être un paramètre fiable de réponse virale soutenue.

Du reste, comme en témoigne l'importance quantitative qu'il tient dans la littérature récente [427], le cccDNA intrahépatique est de plus en plus utilisé comme marqueur de réponse virale soutenue, et comme cible pour les différentes thérapies, notamment les plus récentes [428], leur but étant de plus en plus de tendre vers une séroconversion AgHBs-antiHBs, objectif qui devient envisageable dans un avenir plus ou moins proche.

Il est toutefois difficile de proposer une biopsie hépatique pur rechercher la négativation du cccDNA chez un patient qui répond favorablement au traitement antiviral. De plus, les méthodes de détection du cccDNA intrahépatique manquent de sensibilité et de spécificité. C'est pourquoi il semble indispensable de pouvoir établir d'autres marqueurs d'efficacité thérapeutique.

Il est établi que le virus de l'hépatite B n'infecte pas uniquement les hépatocytes. Le génome viral et le cccDNA ont en effet été retrouvés dans les cellules mononucléées du sang périphérique [419]. Sa quantification, décrite récemment [429] par notre équipe de virologie, grâce à l'utilisation d'une PCR en temps réel, ouvre de nouvelles perspectives.

Malgré ces avancées, certaines questions restent en suspens. En effet, on ignore si ces cellules mononucléées représentent un réservoir, au même titre que les hépatocytes ou si elles sont un simple vecteur, disséminant le virus, reflet de la charge virale circulante. De même, les variations du taux de cccDNA intra-lymphocytaire (quand il est présent) n'ont jamais été quantifiées au cours des traitements et on ne peut affirmer si cette quantité est corrélée à l'intensité de la réplication virale.

Nous souhaitons, à travers ce travail, chercher si le cccDNA intra-lymphocytaire est corrélé à la guérison virologique. En effet, a été développée au sein du laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène du CHU de Limoges, une méthode de mesure par quantification totale de l'ADN du virus de l'hépatite B intra-lymphocytaire et, en parallèle, du cccDNA. Cette technique peut être appliquée à la fois aux hépatocytes et aux cellules mononucléées du sang. C'est la raison pour laquelle nous nous proposons de suivre l'évolution du cccDNA intra-lymphocytaire, en parallèle avec celle de l'ADN HBV total sérique pour une série de patients traités. L'intérêt majeur de cette mesure pour le patient réside dans la possibilité de réaliser un simple prélèvement sanguin, alors que la recherche du

cccDNA intra-hépatique nécessite la réalisation d'une biopsie hépatique. Une simplification supplémentaire pourrait résider dans l'utilisation du sang total pour détecter l'ADN total et le cccDNA sérique ou lymphocytaire. Ce compartiment, couramment employé pour la surveillance de nombreux virus en transplantation (cytomégalovirus, virus BK, adénovirus) n'est que très peu utilisé dans le domaine des hépatites virales. Nous avons donc souhaité l'explorer.

.2. Le choix de l'association de l'adéfovir dipivoxil et du peginterferon.

Un traitement antiviral doit non seulement bloquer la réplication virale, mais aussi renforcer la réponse immune pour accélérer la clairance virale. Le choix de ces molécules et leur association séquentielle résultent de l'état des connaissances au moment où l'essai a été initié. A l'époque, on ne disposait pas des nouvelles molécules telles que l'entécavir, le ténofovir ou la telbivudine dans cette indication.

Le rationnel de l'utilisation séquentielle est décrit ci-dessous.

.2.1. L'adéfovir dipivoxil.

Le 9-[2-(phosphonométhoxy)éthyl]adénine (PMEA) ou adéfovir et sa prodrogue, l'adéfovir dipivoxil appartiennent à la famille des phosphonates de nucléosides acycliques ou analogues nucléotidiques. La forme active diphosphorylée est un inhibiteur des virus à ADN et des rétrovirus. Elle inhibe l'action des ADN polymérases et des transcriptases inverses par inhibition compétitive avec la désoxyadénosine triphosphate et par un mécanisme de terminaison de la chaîne d'ADN. In vitro, l'adéfovir agit en empêchant l'activité enzymatique des virus B sauvages et des mutants de la polymérase du virus de l'hépatite B résistant à la lamivudine ou au famciclovir.

L'efficacité de l'adéfovir a été démontrée non seulement chez les patients naïfs, AgHBe positifs ou négatifs, mais également chez ceux infectés par un virus porteur d'une mutation de résistance à la lamivudine. Son emploi est relativement récent (obtention d'une AMM (autorisation de mise sur le marché) en 2002 aux Etats-Unis, en 2003 en Europe).

Ainsi, chez les patients porteurs d'un virus de souche sauvage, un essai de phase III a comparé trois groupes, recevant respectivement deux doses de 10 et 30 milligrammes d'adéfovir et une dose de placebo [430]. A la 48^{ème} semaine, une réponse histologique était observée chez respectivement 53 %, 59 % et 25 % des patients. Les taux de séroconversion AgHBe-antiHBe étaient de 12 %, 14 % et 6 %, les baisses du taux d'ADN viral de 3,5, 4,8 et 0,6 log. Les transaminases se normalisaient respectivement chez 48 %, 55 % et 16 % des sujets. En-dehors de néphropathies plus fréquentes dans le groupe qui recevait 30 milligrammes d'adéfovir, il n'était pas constaté de différence significative entre les trois groupes. Cette étude conclue donc à une efficacité marquée de l'adéfovir, dont l'emploi doit se limiter à 10 milligrammes, en raison de l'absence de bénéfice net et de la plus grande fréquence d'effets secondaires à la dose de 30 milligrammes. Cependant, d'autres travaux ont rapporté que 20 à 50 % des patients traités par adéfovir ne présentaient pas de réponse virologique, ce qui suggère que la dose de 10 milligrammes pourrait être suboptimale [431]. Sur un suivi portant sur plusieurs années, il semble que des séroconversions AgHBs-antiHBs apparaissent, bien qu'aucune estimation chiffrée n'ait été rapportée.

Un autre essai de phase III a étudié l'infection par le mutant précore du virus de l'hépatite B [432]. Cette fois, deux bras ont été séparés, l'un recevant 10 milligrammes d'adéfovir, l'autre un placebo. Là aussi, que ce soit pour la réponse histologique (64 % vs. 3 %), la normalisation des transaminases (72 % vs. 29 %), l'absence de détection du virus par PCR (51 % vs. 0 %), il apparaissait très clairement une différence significative en faveur du traitement par adéfovir.

Il existe un intérêt probant à poursuivre le traitement par adéfovir : en effet, si le traitement est poursuivi au-delà de la première année, le pourcentage de patients dont la virémie est indétectable augmente à 71 % chez les patients qui restent traités, tandis qu'elle diminue à 8 % en cas d'arrêt [433].

Chez des populations recevant le traitement sur une durée plus longue, il apparaît clairement que le taux d'ADN viral dans le sérum restait indétectable chez 65 % des patients à 4 ans, et 67 % à 5 ans ; les transaminases étaient normalisées respectivement chez 70 % et 69 % des sujets [434].

La durabilité de la séroconversion AgHBe-antiHBe a été examinée chez 76 patients qui ont reçu un traitement par adéfovir pendant une première période médiane de 80 semaines suivie d'une seconde de 52 semaines de surveillance après l'arrêt. La séroconversion AgHBe-antiHBe est maintenue dans 92 % des cas. Ce résultat semble lié à la durée prolongée du

traitement d'une part et à la poursuite du traitement au-delà de la séroconversion [435]. Ce constat semble corroboré par le faible pourcentage (8) de patients porteurs du mutant précoce du virus qui maintiennent une suppression virale soutenue au-delà d'une année de traitement [433]. Compte tenu du caractère virostatique de la molécule, seuls 5 % des patients traités perdront leur antigène HBs après 5 ans de traitement.

L'emploi de l'adéfovir est également privilégié en cas de résistance à la lamivudine ; en effet, son ajout, après rebond virologique, mais avant rebond clinique, permet d'obtenir une virosuppression adaptée [357-359]. Des résultats analogues ont été décrits chez des patients en attente d'une greffe hépatique et porteurs d'une cirrhose compensée [436-438].

Le risque de développer des résistances au cours d'un traitement par adéfovir est moindre qu'en recevant de la lamivudine. Aucune mutation de résistance à l'adéfovir n'est décrite sur les premiers essais de phase III après un an de traitement [439].

Cependant, plusieurs mutations conférant une résistance à l'adéfovir ont été décrites. Ainsi, ont été mises en valeur les mutations N236T (remplacement d'une thréonine par une asparagine) et surtout A181V/T (substitution d'une valine ou threonine par une alanine) [440, 441]. Dans l'essai mené par Hadziyannis, les taux cumulés de résistance génotypique à 1, 2, 3, 4 et 5 ans sont respectivement de 0 %, 3 %, 11 %, 18 % et 29 %. Des études plus récentes, qui s'appuient sur des méthodes de détection de résistance plus sensibles, ont ainsi permis de détecter la présence de résistances à l'adéfovir après un an de traitement et des taux de résistance génotypique au-dessus de 20 % après deux ans.

La survenue de résistance peut se traduire par un rebond virologique, une flambée de l'hépatite, une décompensation de l'hépatopathie sous-jacente. Les risques de résistance sont principalement un traitement séquentiel en monothérapie ou après la lamivudine et une suppression virale suboptimale [442-446]. In vitro, il apparaît que les virus mutants résistants à l'adéfovir peuvent être sensibles à la lamivudine ou l'entécavir [441]. Cependant, chez les patients ayant développé une résistance à la lamivudine, puis une résistance à l'adéfovir, la réintroduction de la lamivudine s'accompagne d'une réémergence de mutations de résistance [443].

L'adéfovir est de plus en plus souvent remplacé par le ténofovir ; des cas de substitution entre les deux médicaments s'accompagnent d'une décroissance plus marquée du taux d'ADN viral ont ainsi été décrits. Il a également été rapporté des cas de patients porteurs de virus mutants résistants à l'adéfovir négativant leur charge virale sous entécavir [447, 448].

Malgré l'effet virostatique de l'adéfovir, 2 % des patients traités par adéfovir sont susceptibles de développer un carcinome hépato-cellulaire.

L'adéfovir est utilisé à la dose de 10 milligrammes ; il est communément retenu, avec l'arrivée d'analogues nucléotidiques ou nucléosidiques plus puissants, qu'il ne doit pas être employé en première intention en cas de charge virale élevée. De même, au bout de 48 semaines, si la charge virale demeure supérieure à 200 UI/mL, son remplacement, ou l'ajout d'une autre molécule doit être discuté [442].

Les principaux effets secondaires de l'adéfovir sont une hypophosphorémie, qui demeure bien tolérée sur le plan clinique, et une néphrotoxicité (tubulopathie avec perte de phosphore), contraignant d'une part à doser la créatinine régulièrement et d'autre part à éviter l'emploi d'autres molécules potentiellement néphrotoxiques (AINS,), plus particulièrement chez les patients à risque âgés, transplantés, insuffisants rénaux.

.2.2. Le peginterféron alpha2a.

Les interférons sont des molécules qui ont un effet antiviral, antiprolifératif et immunomodulateur [308, 449-453]. L'interféron intervient au niveau des cellules infectées en se fixant à des récepteurs membranaires spécifiques, ce qui permet de déclencher l'activation d'enzymes intracellulaires, qui vont favoriser la traduction de diverses protéines qui rendront la cellule plus résistante aux virus. Ainsi, une augmentation de l'activité de la 2'5' oligoadénylate synthétase activera certaines ribonucléases (telles que l'ARNase qui a la capacité de détruire l'ARN viral). De même, une protéine kinase sera activée, permettant l'arrêt de l'assemblage des ribosomes nécessaires à la synthèse des protéines virales.

L'action immunomodulatrice est pléiotrope. L'expression des antigènes de l'hôte, tels que des molécules HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe I, à la surface des cellules infectées, est stimulée, ce qui permet leur meilleure reconnaissance par le système immunitaire (notamment les lymphocytes T cytotoxiques) et favorise leur lyse.

Il faut également noter que l'interféron facilite la maturation des cellules T cytotoxiques et l'activation des cellules *natural killer* (NK).

Jusqu'au début des années 2000, ils étaient employés sous leur forme standard, nécessitant la réalisation de trois injections hebdomadaires de 2,5 millions d'unité par mètre carré pendant une durée de 4 à 6 mois. Environ 30 à 40 % des patients négativaient leur antigène HBe et leur ADN viral, et près de 10 % leur antigène HBs, tandis que dans les populations témoins, ces chiffres étaient respectivement de 15 et 0 % [308, 451-454]. Il a d'ailleurs été constaté au cours de ces essais que l'arrêt de la multiplication virale s'accompagnait non seulement d'une amélioration des index histologiques, mais également d'une exacerbation « biologique » de l'hépatite, d'autant plus symptomatique que la maladie sous-jacente est grave (risque de décompensation en cas de cirrhose avancée).

Depuis, c'est leur forme pégylée qui est employée : il s'agit du couplage à une molécule de polyéthylène glycol des interférons alfa recombinants. Deux formes sont utilisées : l'interféron pégylé alpha2a, commercialisé par Roche® qui a été le plus étudié dans l'hépatite B et qui demeure le seul à être commercialisé dans la plupart des pays, et l'interféron pégylé alpha2b, produit par Schering-Plough®. Cette forme permet une administration hebdomadaire au lieu d'une injection quotidienne, avec une pharmacocinétique conservée (allongement de la durée de vie du produit ou effet retard) ; elle est également mieux tolérée par les patients.

L'avantage des interférons, notamment par rapport aux analogues nucléosidiques et nucléotidiques est l'absence de résistance d'une part et une durée plus courte de traitement.

La dose recommandée est de 180 microgrammes par semaine, injectés en sous-cutané. Le traitement est généralement administré pendant 48 semaines. Cependant, des essais en phase II suggèrent un taux de réponse identique pour des doses de 90 microgrammes ; de même, une réponse identique est obtenue si la durée de traitement est raccourcie à 24 semaines, comme semblent l'établir des études de phase II et III [450, 451]. Toutefois, il n'est pas stipulé si une séroconversion AgHBe-antiHBe soutenue est modifiée par la durée du traitement.

Chez les patients porteurs d'une hépatite B chronique de souche sauvage, il est démontré des résultats plus satisfaisants de l'interféron dans sa version pégylée que dans sa version standard. Dans l'étude multicentrique internationale menée par Lau, il apparaît une efficacité plus marquée de l'interféron pégylé alpha2a par rapport à la lamivudine en monothérapie : même s'il n'existe pas de différence significative en ce qui concerne la séroconversion AgHBe-antiHBe à la fin du traitement, au bout de 48 semaines (respectivement 24 et 20 %), 24 semaines plus tard, les résultats (32 % de séroconversion

AgHBe-antiHBe vs 19 %) plaident en faveur de l'interféron pégylé. Des résultats similaires sont obtenus avec l'interféron alpha2b (29 % de séroconversion AgHBe-antiHBe à 24 semaines) [452, 455]. L'infection par virus sauvage demeure une indication solide de l'interféron pégylé.

Une seule étude de qualité a été menée pour infections avec un AgHBe négatif [456]. Son design était similaire à celui de Lau. La suppression virale et l'obtention d'une réponse soutenue prolongée étaient plus marquées chez les patients traités par interféron pégylé par rapport à ceux traités par lamivudine (respectivement 43 % vs 29 % et 15 % vs 6 %).

Il faut toutefois souligner que, dans ces études, l'emploi de la lamivudine n'est que de 48 semaines, ne correspondant pas à l'usage prolongé des molécules virostatiques.

Le facteur prédictif de séroconversion AgHBe-antiHBe le plus fort est le taux d'ALAT préthérapeutique. D'autres éléments, tels qu'un haut index d'activité histologique, un taux bas de DNA viral, sont prédictifs d'une meilleure réponse au traitement. Plus récemment, avec le développement des études sur le génotypage, il semble que les personnes porteuses des génotypes C et D sont moins susceptibles de répondre au traitement que celles infectées par les génotypes A et B [457-459]. Aucun facteur prédictif n'a été clairement déterminé pour les infections à AgHBe négatif.

L'emploi de l'interféron s'accompagne souvent d'effets secondaires, que ce soit sous sa forme standard ou sa forme pégylée. Le plus commun est un syndrome pseudo-grippal qui se manifeste par une fièvre, des frissons, des myalgies, des céphalées et parfois des malaises. D'autres effets adverses sont fréquents, tels une anorexie, une asthénie, des troubles de l'humeur. Les effets secondaires psychiatriques sont significativement moins fréquents dans l'hépatite B que dans l'hépatite C traitée par interféron. L'interféron est également cardiotoxique. Au niveau biologique, l'interféron a un pouvoir myélotoxique qui peut se traduire par une neutropénie ($< 1\ 000/\text{mm}^3$) ou une thrombopénie ($< 50\ 000/\text{mm}^3$); ceci survient essentiellement chez les patients dont les lignées cellulaires sont déjà basses avant le traitement. La survenue d'épisodes d'« exacerbation » des hépatites est un indicateur de réponse favorable, avec cependant risque d'une décompensation d'une hépatopathie avancée. L'interféron est également connu pour favoriser le développement de pathologies auto-immunes, et un déséquilibre thyroïdien. De nombreux autres effets mineurs (troubles de la vue, gêne thoracique, ...) ont été décrits.

.2.3. L'intérêt d'une association thérapeutique.

Malgré des taux manifestes de résistance en monothérapie pour les analogues et l'existence de succès de combinaisons thérapeutiques dans d'autres infections en particulier virales (VIH), une monothérapie reste essentiellement utilisée pour traiter le virus de l'hépatite B [460].

.2.3.1. L'exemple d'autres infections.

Il existe d'autres infections au décours desquelles apparaissent des phénomènes de résistance. Afin d'en limiter l'émergence et d'augmenter l'efficacité thérapeutique, des associations sont indispensables.

Deux exemples sont probants :

-la tuberculose [461] : en effet, dès les années 1940, l'apparition de résistance à la streptomycine, conduit à l'ajout de l'acide *p*-aminosalicylique. Actuellement, en raison de ces résistances d'une part, et afin de potentialiser l'efficacité thérapeutique, les patients porteurs d'une tuberculose, quelle que soit sa forme d'expression, bénéficient d'une polythérapie (par exemple, une quadrithérapie dans le cas d'une tuberculose pulmonaire).

-l'apparition de la pandémie du VIH dans les années 1980 a fourni des informations intéressantes concernant la prise en charge des infections virales. Il apparaît rapidement que l'emploi de bithérapie (AZT et DDI ou DDC) se révèle supérieur à une monothérapie [462], diminuant ainsi le risque de résistance. Ces résultats sont également établis chez des patients naïfs de tout traitement. Des études plus récentes [463] ont montré que l'ajout d'une troisième molécule (anti-protéase) augmentait l'efficacité du traitement. L'exemple du VIH est ici d'autant plus intéressant qu'il existe des analogies avec le virus de l'hépatite B (virus ADN, emploi d'une transcriptase inverse).

Le choix d'une monothérapie, ce d'autant que le panel des antiviraux disponibles semble offrir la possibilité de combinaisons entre différentes molécules, apparaît ainsi surprenant. Cependant ce choix est resté limité pendant de nombreuses années avant l'explosion récente.

2.3.2. Pour le virus de l'hépatite B.

Plusieurs raisons expliquent l'absence d'utilisation de combinaisons thérapeutiques pour les patients porteurs du virus de l'hépatite B. En effet, l'évolution du virus de l'hépatite B est beaucoup plus lente que pour le HIV. D'autre part, l'apparition de résistance est également plus lente : le risque de résistance à la lamivudine à un an est de 20 % pour le virus de l'hépatite B, alors que pour le VIH, des souches résistantes émergent au bout d'une semaine [464, 465]. Il faut également souligner que, compte tenu de l'emploi récent de traitements à la fois à puissance anti-virale et à barrière de résistance élevées, peu d'études ont concerné des combinaisons thérapeutiques. Enfin, la pression politique et de l'opinion n'est pas aussi importante pour le virus de l'hépatite B que pour le VIH, contribuant à l'écart des avancées thérapeutiques entre les deux maladies.

Sur le plan théorique, une association entre deux familles moléculaires différentes (un analogue nucléotidique et un analogue nucléosidique) s'avère intéressante. Elle permettrait de réduire l'apparition de résistances (ce d'autant plus qu'il existe peu de résistances croisées). Par ailleurs, à défaut de synergie, les effets bénéfiques seraient ajoutés sans augmentation de la toxicité toutefois.

Cette idée a déjà été exploitée il y a une vingtaine d'années : l'emploi d'une corticothérapie à doses régressives précédant l'emploi de l'interféron alpha ou d'une trithérapie séquentielle (corticothérapie courte puis vidarabine puis interféron alpha) avait montré un bénéfice par rapport à la monothérapie en termes d'arrêt de la multiplication virale B [357-359].

Depuis l'emploi des analogues nucléosidiques et nucléotidiques, les premières études concernèrent des thérapies séquentielles : en cas de résistance à la lamivudine, celle-ci était remplacée par l'adéfovir. Il apparaît une élévation du risque de résistance à l'adéfovir [466-468]. En revanche, dans le même cas de résistance à la lamivudine, si les deux molécules sont ajoutées, le risque de résistance croisée à l'adéfovir n'est pas accru [357, 468]. L'association « de novo » entre adéfovir et lamivudine a été comparée à une monothérapie par lamivudine et à une séquence lamivudine seule, suivie de l'association lamivudine-adéfovir en cas d'échappement viral. L'association « de novo » était plus efficace en terme de réponse virologique (82 % vs. 48 %), de négativation de l'ADN viral (95 % vs. 62 %) et d'échappement virologique (0 vs. 14 %) par rapport à la stratégie séquentielle. Si le pouvoir de la bithérapie semble être identique à celui d'une monothérapie par lamivudine, il semble

que sur la durée, la bithérapie soit plus avantageuse, notamment en diminuant le risque de résistance [469]. Ces résultats sont corroborés par un travail chinois, mené par Sung et al. [470], où des résultats similaires étaient obtenus. Il n'était pas noté de différence significative entre le groupe traité par lamivudine en monothérapie et celui qui recevait une bithérapie lamivudine-adéfovir pour la séroconversion AgHBe-antiHBe (respectivement 20 % et 15 %). Dans un essai publié récemment par une autre équipe chinoise, il est décrit que la combinaison de l'adéfovir et de l'émcitabine résulte en une suppression plus importante de l'ADN viral qu'une monothérapie par adéfovir ; toutefois, il n'a été montré d'effet ni sur la séroconversion AgHBe-antiHBe, ni sur les phénomènes de résistance [471].

Peu de travaux à ce jour ont étudié les bithérapies chez des patients naïfs. La combinaison interféron alpha-lamivudine a fait l'objet d'études pilotes, avant la mise sur le marché de la forme pégylée de l'interféron. Ainsi, dans un travail italien [472], 50 patients furent-ils répartis en deux bras, le premier recevant lamivudine seul pendant un an, le second la combinaison interféron alpha-lamivudine durant le même délai ; une période de surveillance post-thérapeutique de six mois suivait. Il en résultait que l'association thérapeutique se révélait supérieure à la monothérapie, en terme de survenue de résistance. Il n'apparaissait pas clairement de bénéfice sur des critères virologiques et biochimiques. Un essai de plus grande envergure, en 2000 [473], qui avait randomisé 230 patients en trois bras : monothérapie par lamivudine durant 52 semaines, monothérapie par interféron non pégylé sur une période de 16 semaines, combinaison interféron-lamivudine pendant 16 semaines, précédée d'une monothérapie par lamivudine pendant 8 semaines. A 52 semaines, il ressortait une séroconversion AgHBe-antiHBe plus élevée (36 % vs. 19 % et 19 %), d'autant plus marquée que le taux de transaminases est peu élevé. Là aussi, l'émergence de mutation YMDD n'était décrit que chez les sujets ayant reçu la lamivudine en monothérapie.

Plusieurs études ont été menées avec l'association de l'interféron pégylé alpha2a et la lamivudine, respectivement chez des patients AgHBe négatifs et positifs. Chez les patients, dont l'AgHbe est négatif, dans l'essai multicentrique cité au-dessus et mené par Marcellin [456], il n'apparaissait pas clairement de bénéfice au niveau de la réponse virologique dans le groupe recevant la bithérapie par rapport au groupe traité en monothérapie par l'interféron pégylé alpha2a (44 % vs 43 % vs 29 % chez les patients recevant lamivudine seul) après 48 semaines. Des résultats analogues sont décrits pour la séroconversion HBs (7 patients vs 5 vs aucun). En revanche, il ressort de cette étude que le taux de mutation de la zone YMDD est

réduit en cas de bithérapie par rapport à l'emploi de la lamivudine en monothérapie (18 % vs 1 %).

Chez les patients AgHBe positifs, l'association lamivudine-interféron pégylé alpha2b fut étudiée une première fois en 2001 par une équipe italienne [474] qui, sur un échantillon de 151 patients, comparait deux groupes, l'un traité par une monothérapie par lamivudine, l'autre recevant la bithérapie. Il était mis en évidence une séroconversion AgHBe-antiHBe avec ADN viral négatif en hybridation et une progression histologique plus marquées pour le groupe bénéficiant de la bithérapie (33 % vs. 15 % et 46 % vs. 27 %). Lau et al. [454], dans l'essai multicentrique, que nous avons déjà évoquée et dont le design est superposable, n'ont pas montré de bénéfice de la combinaison thérapeutique par rapport à la monothérapie par interféron pégylé : les taux de séroconversion à la fin du suivi étaient respectivement 27 % et 32 %, les réponses virologiques étaient de 34 et 32 % (il existait en revanche un bénéfice net par comparaison avec la lamivudine). De manière identique, le risque de résistance à la lamivudine était significativement plus bas chez les patients traités par bithérapie que ceux recevant seulement la lamivudine (4 % vs 27 %). Des résultats analogues ont également décrits en 2004 dans une étude randomisée chinoise [475] : chez les patients traités par bithérapie interféron pégylé alpha2b présentaient une réponse virologique soutenue plus importante (50 % vs. 10 %) que ceux bénéficiant d'une monothérapie. En revanche, la réponse biochimique (définie par une normalisation des transaminases) était identique entre les deux groupes.

L'association interféron-lamivudine a également été étudiée sous forme de traitement séquentiel [476]. Ainsi, un groupe de patients non répondeurs à l'interféron alpha, après avoir reçu successivement lamivudine puis interféron alpha, avait-il présenté des résultats encourageants. La négativation soutenue de l'ADN viral à 6 mois était de 57 % (8/14), le taux de séroconversion HBe est élevé à 45 % (5/11) et le taux de séroconversion HBs de 21 % (3/14). L'action synergique pourrait être expliquée par la baisse de la virémie sous lamivudine, facteur pronostique de bonne réponse sous interféron, mais également par le rétablissement de l'état d'hyporéponse des lymphocytes T contre le virus de l'hépatite B par la lamivudine. Dans un premier temps, la réponse CD4 contre l'antigène HBc (à 2 semaines), puis l'amélioration de l'activité CD8 sont démontrées [477]. Manesis et al. [478] ont également étudié un traitement séquentiel de lamivudine pendant six mois suivi d'une bithérapie lamivudine et interféron pégylé, puis d'une monothérapie par interféron pégylé durant six mois chez des patients porteurs d'un AgHBe négatif : ce schéma thérapeutique

permet l'obtention d'une réponse virale soutenue chez environ 30 % des patients. Un autre essai indien [479], intéressant la séquence lamivudine en monothérapie, suivie de l'association interféron standard-lamivudine puis lamivudine à nouveau en monothérapie, a permis, sur un faible effectif (deux groupes de 39 et 36 patients), l'obtention d'une négativation de 56 % de l'ADN du virus de l'hépatite B et 40 % de séroconversion AgHBe-antiHBe (chiffres proches de la significativité $-p=0,04-$ comparés à la lamivudine en monothérapie : respectivement 28 % et 8 %). Une autre étude randomisée en revanche semblait moins enthousiasmante pour le choix d'un traitement séquentiel. En effet, Dikici et al. [480] comparèrent 182 enfants, séparés en trois groupes, le premier recevant une monothérapie par interféron, le second et le troisième une bithérapie. Il n'apparaissait pas clairement de différence significative en terme de réponse virale soutenue. Dans un des deux groupes de bithérapie, la lamivudine prescrite deux mois avant l'introduction de l'interféron ne modifie pas les résultats en terme de réponse virale soutenue (environ 35 à 40 %). Récemment, une étude chinoise [481] a comparé trois groupes, de dix patients chacun, traités par lamivudine et interféron pégylé, respectivement débutés de manière silmutanée, lamivudine puis interféron pégylé, interféron pégylé puis lamivudine. La seule différence significative entre ces trois groupes concernait la séroconversion AgHBe-antiHBe, en faveur du groupe ayant commencé par une bithérapie.

La combinaison de l'interféron pégylé et de la lamivudine, si elle n'a montré qu'un bénéfice modeste en terme de réponse virologique, réduit nettement les risques de résistance virale, et il se peut que les critères de jugement soient imparfaits (virémie quantitative sans mesure de la charge virale intrahépatique ou de la concentration d'ADN viral superenroulé). Néanmoins, elle semble prometteuse, notamment dans un profil de traitement séquentiel.

Au moment du design de cette étude en 2004, nous avons choisi une association entre l'adéfovir dipivoxil (dont le profil de résistance est plus intéressant que celui de la lamivudine) et l'interféron pégylé alpha2a.

Quelques études plus récentes ont intéressé cette bithérapie par interféron pégylé et adéfovir. Deux travaux ont été menés récemment par une équipe allemande. Le premier d'entre eux [482] porte sur une durée de 48 semaines de bithérapie adéfovir-interféron alpha2b. Les taux respectifs d'ADN du virus de l'hépatite B et de cccDNA intra-hépatique ont respectivement diminué de 2,2 et 2,4 log, tandis qu'au niveau du sérum, la médiane du taux d'ADN du sérum a baissé de 4,9 log en moyenne, et chez 13 des 36 patients étudiés, la virémie devenait indétectable. Il était également relevé une diminution sensible du taux

d'AgHBs. Par ailleurs, 8 des 15 patients, dont l'AgHBe était positif avant le traitement, l'ont négativé. Le prolongement de l'étude [483] témoigne du maintien d'une charge virale faible intra-hépatique (en ADN et cccDNA). Cette association séquentielle a également été étudiée d'un point de vue économique par une équipe britannique [484]: elle s'avère plus intéressante que d'autres associations comportant de la lamivudine ou de l'interféron non pégylé.

En pratique nous avons choisi l'association séquentielle analogue-peginterféron. Nous sommes partis du principe d'une action synergique des deux molécules expliquée par la baisse de la virémie sous analogue, facteur pronostique de bonne réponse sous interféron, mais également par le rétablissement de l'état d'hyporéponse des lymphocytes T contre le virus B par l'analogue. Dans un premier temps, la réponse CD4 contre l'AgHBc (à 2 semaines), puis l'amélioration de l'activité cytotoxique CD8 ont été démontrées dans la littérature [485].

Notre choix s'est porté sur l'adéfovir, plutôt que sur la lamivudine, du fait de :

- l'absence significative de sélection de mutant résistant observée dans la littérature avant 96 semaines, dans l'état des connaissances au moment de la rédaction du protocole, ce qui s'est confirmé avec le recul, les mutations de résistance n'apparaissant que tardivement, à partir de la troisième année.

-une baisse de la virémie significative prévisible après 3 mois de monothérapie par adéfovir (2.80 à 3 log), même si cette baisse est moins spectaculaire qu'avec les analogues de nouvelle génération (entécavir ou ténofovir) qui, bien sûr, auraient été de meilleurs candidats (puissance antivirale mais aussi barrière de résistance élevées). L'adéfovir conserve comme la lamivudine l'action immunomodulatrice de rétablissement de l'état d'hyper-réponse des lymphocytes T au troisième mois.

.B. Objectifs.

.1. Objectif principal.

Notre principal souhait était d'étudier la cinétique du cccDNA dans les lymphocytes et dans le sang total en parallèle avec le taux d'ADN viral chez des patients porteurs d'une hépatite virale B chronique et traités par la séquence adéfovir dipivoxil puis adéfovir dipivoxil-interféron pégylé alpha2a.

.2. Objectifs secondaires.

Nous avons également cherché à :

- étudier parallèlement l'évolution de la cinétique de l'ADN total VHB dans le sérum et dans le sang total
- étudier la cinétique de l'ADN total du VHB dans les lymphocytes
- étudier la cinétique du pool de cccDNA dans le sérum en parallèle avec le sang total

Nous nous sommes attaché à corrélérer tous ces résultats à la réponse virologique sous et après arrêt du traitement.

.C. Matériels et méthodes.

Il s'agit d'une étude prospective observationnelle sans bénéfice individuel direct intéressant une cohorte de 18 patients.

.1. Patients.

.1.1. Nombre et origine.

16 patients seront analysés dans cette thèse. Les complications inhérentes au rapatriement des données de Guyane n'ont pu permettre l'analyse des deux derniers patients dans cette thèse.

.1.1. Critères d'éligibilité.

.1.2.1. Critères d'inclusion.

- Age compris entre 18 et 70 ans.
- Patients AgHBs positifs avec AgHBe positif et/ou taux d'ADN du virus de l'hépatite B supérieur ou égal à 10^4 copies par mL en PCR COBAS MONITOR.

-Hépatopathie chronique virale B confirmée par une biopsie datant de moins de 24 mois.

-Patients traités par adéfovir dipivoxil et interféron pégylé alpha2a.

-Patients naïfs de tout traitement préalable ou en rechute ou échec thérapeutique après monothérapie par lamivudine ou interféron alpha, ou bithérapie interféron alpha-lamivudine.

-Patients ayant une recherche d'hépatite virale C négative (datant de moins de 12 mois).

- Patients ayant une recherche du virus d'immunodéficience humaine négative (datant de moins de 12 mois).

.1.2.2. Critères d'exclusion.

-Patients ayant une hépatopathie non due au virus de l'hépatite B : virus de l'hépatite C, hémochromatose, déficit en alpha1-antitrypsine, maladie de Wilson, hépatite auto-immune, hépatite médicamenteuse, hépatopathie alcoolique.

-Patients souffrant de problèmes neuro-psychiques ne permettant pas une compréhension adéquate du protocole ou un consentement fiable.

-Patients ne pouvant participer au suivi prévu par l'étude.

-Patient transplanté quel que soit l'organe.

-Patient porteur d'une coinfection par le virus de l'hépatite C ou le virus d'immunodéficience humaine.

L'inclusion des patients n'a pu être réalisée qu'après avoir vérifié les critères d'inclusion et d'exclusion.

.2. Déroulement de l'étude.

Le protocole porte sur une durée de 48 semaines de traitement, précédant une période de suivi au moins égale à 24 semaines. Nous nous sommes intéressés dans cette thèse aux vingt-quatre premières semaines du traitement. Les autres données sont en cours d'analyse.

.2.1. Calendrier du suivi virologique.

Le calendrier est déterminé en fonction des différents paramètres virologiques nécessaires au suivi des patients. Nous avons ainsi pu constituer une sérothèque, une lymphothèque et une biothèque.

Les dosages étaient répartis ainsi :

-Antigène HBs, anticorps antiHBc, antigène HBe, anticorps antiHBe, anticorps antiHBs : semaine (S) -4 à -6, S12, S24, S36, S48, S60, S72.

-Les sérologie VIH et sérologie VHC si datant de plus de 12 mois. : S-4 à -6.

-Mesure de la charge virale VHB dans le sérum par PCR COBAS Monitor, résultats en copies par ml : S-4 à -6, S12, S24, S36, S48, puis tous les 3 mois pendant la période de monothérapie, puis pendant le suivi.

-Sérothèque : ces sérums ont été utilisés pour établir les courbes de cinétique virale en Taqman et la mesure de l'ADN total et du cccDNA par PCR en temps réel « maison ». D'autres études biologiques et/ou virologiques sur cette sérothèque pourront être envisagées ultérieurement comme des études de résistance en cas d'échappement thérapeutique : J0, S4, S8, S12, S16, S20, S24, S36, S48, S52, S56, S60, 1 point d'échappement, 1pt à l'arrêt du traitement, 1pt à 1, 2, 3 et 6 mois du suivi.

-Lymphothèque pour étude de l'évolution de la virémie quantitative (ADN total) dans les lymphocytes circulants et de l'évolution du cccDNA dans le compartiment lymphocytaire circulant par PCR en temps réel maison : J0, S4, S8, S12, S24, S36, S48, S60, 1pt d'échappement, 1pt à l'arrêt du traitement puis tous les 3 mois pendant le suivi.

-Biothèque de sang total aux mêmes temps que la lymphothèque.

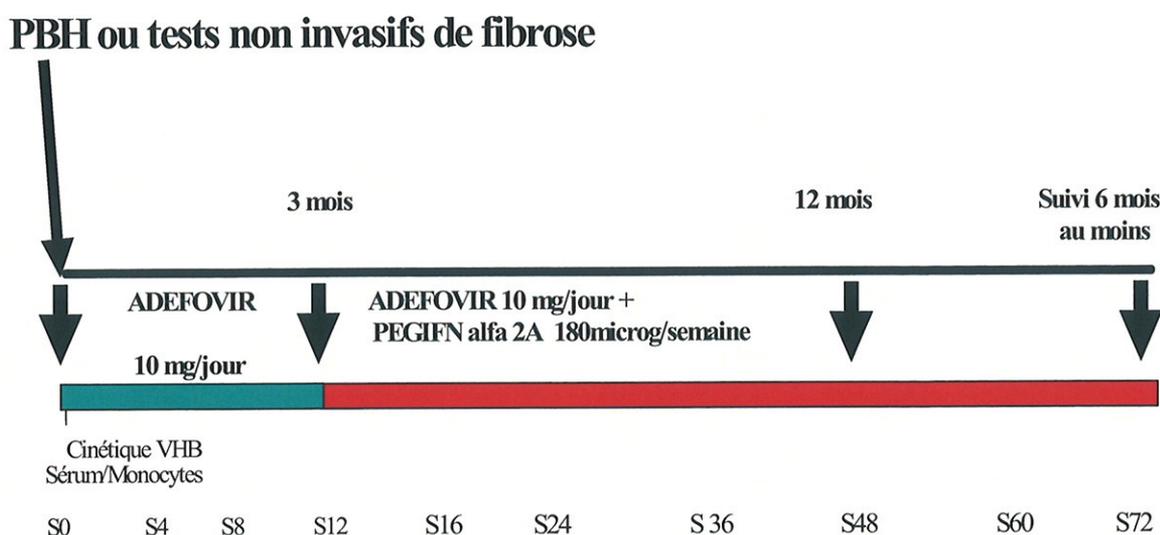


Figure 29 : Schéma thérapeutique de l'étude.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux prélèvements J0, S4, S8, S12, S16, S20 et S24, de sérum, de sang total et de monocytes, ce qui correspond au suivi évolutif des trois premiers mois d'adéfovir en monothérapie puis des trois premiers mois de bithérapie adéfovir-interféron pégylé.

.2.2. Calendrier thérapeutique.

Les patients recevaient une thérapie séquentielle comportant 10 milligrammes par jour d'adéfovir dipivoxil, représenté par Hepsera® (Gilead Sciences, Foster City, California, USA), et de l'interféron pégylé alpha2a, dont la dose était adaptée au poids, commercialisé sous le nom de Pegasys® (Roche, Bâle, Suisse).

L'introduction de l'adéfovir dipivoxil correspondait au début de l'étude (S0). De la douzième à la 48^{ème} semaine (S12 à S48), soit pendant une durée de 36 semaines, à l'adéfovir dipivoxil était ajouté l'interféron pégylé alpha2a.

Au-delà, une monothérapie par adéfovir dipivoxil était poursuivie sur décision de l'investigateur, en se basant sur une définition arbitraire de « guérison virologique » : au moins six mois après une séroconversion AgHBe-antiHBe maintenue pour les patients AgHBe+ et 12 mois au moins après la négativation de l'ADN viral par PCR pour les patients AgHBe-.

.D. Techniques virologiques.

.1. Synthèse des recherches virologiques.

.1.1. Quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B dans le sérum.

Elle est assurée au sein des laboratoires des centres investigateurs par la technique de COBAS® Amplicor™ HBV Monitor Test (Roche Diagnostics) (dit COBAS® Monitor). Une deuxième quantification est très vite pratiquée au sein du laboratoire de virologie du CHU de Limoges, par PCR quantitative, mesurée par PCR COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test (dit COBAS® Taqman®) en temps réel pour l'ADN total en remplacement de la PCR COBAS® Monitor.

.1.2. Quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B dans le sang total.

L'ADN total et le cccDNA du VHB ont été recherchés et quantifiés par la méthode de PCR quantitative développée au laboratoire, mesurée sur un thermocycleur Light-Cycler 1.0 (Roche).

.1.3. Quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B dans les lymphocytes.

L'ADN total et le cccDNA du VHB ont été recherchés et quantifiés selon la même méthode de PCR quantitative sur Light-Cycler (Roche).

.2. Description des techniques.

La mise au point et la validation des techniques résumées ci-dessous ont été réalisées par le Dr Anne Wagner dans le laboratoire de Virologie (Pr Denis) sous la direction du Pr Alain et publiée en 2006 [184, 399].

.2.1. PCR usuelles par amplification de cible et de signal.

La technique usuelle de référence en 2004, lors du lancement de l'étude, pour la quantification du virus de l'hépatite B, était le COBAS Amplicor™ HBV Monitor Test (développé par Roche Molecular Systems, Pleasanton, California).

La limite de détection était située à 38 UI/L, avec un seuil bas de quantification de $3,8 \times 10^4$ UI/L. La zone de détection couvrait 3 log₁₀. Le taux de reproduction était de 10,8 % intra-test et de 22,3 % inter-test (en fonction des concentrations d'ADN du virus de l'hépatite B ; le test était répété 2 fois ; données du fabricant). Son utilisation a été validée par différents travaux [486].

Ce test est basé sur l'amplification de l'ADN grâce à l'usage d'amorces spécifiques (alors que les tests habituels se basaient jusqu'ici sur l'amplification d'une séquence signal branchée à l'ADN, ou sur l'hybridation d'une sonde chimioluminescente) [487].

Récemment, des PCR en temps réel ont été employées pour détecter et quantifier les taux d'ADN du virus de l'hépatite B. Ce test est basé sur la relation entre les taux cibles initiaux d'ADN et le cycle seuil (*Threshold cycle : Ct*) des produits de l'amplification. La valeur du cycle seuil est d'autant plus basse que le taux cible initial d'ADN est haut.

Plusieurs études ont établi que la PCR en temps réel a une sensibilité plus importante, un échantillonnage plus large, une quantification plus précise de l'ADN du virus de l'hépatite B [488-491].

Les tests les plus récents et leurs spécificités sont listés dans le Tableau 6.

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 [492]. Pour chaque trousse commercialisée, une calibration a été effectuée avec ce standard et un facteur de conversion copies/mL - UI/mL a été calculé.

Actuellement, la technique la plus utilisée et sur laquelle se base notre travail est la PCR Ampliprep™COBAS Taqman HBV (Roche Diagnostics). La technologie de PCR en temps réel sur l'analyseur COBAS TaqMan 48, utilise les sondes TaqMan. La sonde TaqMan marquée à la fluorescence se fixe de façon spécifique sur le produit d'amplification. Au cours

de la phase d'amplification de la PCR, l'activité 5' exonucléase de la Taq DNA polymérase dégradant la sonde et libérant la fluorescence. Le suivi en temps réel de la fluorescence accumulée permet la quantification du produit de la PCR.

.2.2. Description de la technique de PCR « maison » temps réel de détection de l'ADN total, du cccDNA et description du Light-Cycler.

Pour simplifier nous appellerons cette technique PCR ADNt (pour ADN total) ou PCR cccDNA dans la suite du manuscrit.

.2.2.1. Extraction des acides nucléiques.

Les échantillons de sang étaient séparés sur des gradients utilisant le kit UNI-SEP+ (Novamed, Jerusalem, Israel). Des échantillons correspondants à 2×10^6 PBMC étaient collectés et lavés deux fois avec du PBS (phosphate-buffered saline). Le DNA était extrait à partir d'un ml de sérum, en utilisant le kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Mississauga, Ont., Canada) et à partir des PBMC, en utilisant le QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

L'extraction était précédée d'une phase de centrifugation suivie par un réchauffement au bain-marie.

La première étape de l'extraction différait d'un compartiment à l'autre.

Ainsi, pour le sang total, il était ajouté aux échantillons 20 μ L de protéase puis 200 μ l de Buffer AL. Le tout, était ensuite chauffé au bain-marie durant dix minutes à 70°C.

Pour le sérum, la procédure était plus longue, débutant par un précooling de trente minutes à 4°C. Les tubes ont été centrifugés ensuite durant une heure à 24 000 G ; le surnageant a été ensuite soustrait. Ont été ajoutés ensuite 20 μ l de protéase, 5 μ l de Carrier, 200 μ l de Buffer AL, avant une mise au bain-marie pendant dix minutes à 56°C.

Pour l'extraction de l'ADN des lymphocytes, il a été initialement ajouté 200 μ l de PBS stérile, 20 μ l de Protéinase K et 180 μ l Buffer AT aux échantillons, avant de les agiter à 56°C durant une heure. Deux cents μ l de Buffer AL ont été mélangés ensuite à la solution. Comme pour le sang total, le mélange a été laissé au bain-marie durant dix minutes à 70°C.

La seconde étape commune a débuté par une digestion avec 200µl d'éthanol. Les solutions obtenues ont été placées chacune sur une colonne du kit. Ont été successivement ajoutés 500 µl Buffer AW1 (suivi d'une centrifugation d'une minute à 6 000 G) et 500 µl de Buffer AW2 (précédant deux centrifugations successives à 20°C de 20 000 G, de trois, puis d'une minute). La digestion finale a été assurée par 200 µl de Buffer AE.

Le DNA extrait était stocké à +4°C jusqu'à usage (5 jours maximum) puis à -20°C.

Ces données sont détaillées dans l'annexe 1.

.2.2.2. Préparation des plasmides standards HBV.

Le plasmide standard pour la quantification de l'ADN total et le cccDNA a été assemblé en insérant une simple copie du génome du virus de l'hépatite B dans le vecteur pCR2.1, grâce au kit The Original TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Un ADN de génotype B du virus de l'hépatite B, a été isolé d'un patient porteur d'un virus AgHBs positif, avec une charge virale supérieure à 3,8 x 10⁴ UI/mL, comme déterminé par le Monitor Test. Son génome total a été amplifié selon la technique de l'équipe de Günther [493] : la PCR s'effectuait grâce à deux amorces P1 (nt 1821-1841, 5' CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA 3') et P2 (nt 1806-1825, 5' CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G 3'), incluant un site de restriction *SapI*, à l'aide du TaKaRa Ex Taq system (TaKaRa Bio Inc, Otsu, Japan).

Les échantillons ont été ensuite dénaturés à 94°C pendant trois minutes, avant une série de 35 cycles de 45 secondes à 94°C, 45 secondes à 60°C et 4 minutes à 72°C, suivis de l'élongation finale d'une durée de 10 minutes à 72°C.

Les produits de la PCR ont été ensuite clivés avec *SapI* pour former les séquences primaires hétérologues et permettre au génome HBV, par le truchement de la ligase T4 de l'ADN l'acquisition d'une forme circulaire du génome du virus de l'hépatite B. Cette structure a été ensuite linéarisée par digestion *BamHI*, et cet ADN a pu ensuite être inséré dans un vecteur pCR2.2, selon les instructions du fabricant.

Cette nouvelle structure a ensuite été utilisée pour transformer des cellules TOP10 compétentes (The Original TA Cloning Kit, Invitrogen), et les clones ont pu ainsi être étudiés

par séquençage à partir des amorces M13 Reverse et M13 Forward, en utilisant un ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le ABI Prism BigDye Terminator kit (Applied Biosystems).

Un clone contenant la séquence attendue a été sélectionné et le plasmide extrait, grâce au kit Qiagen kit (QIAprep Miniprep). La concentration en plasmides a été déterminée par spectrophotométrie à 260 nm. Des séries de dilution de 10^{10} à 10 copies/5 μ l ont été préparées dans de l'eau distillée, avec ou sans adjonction d'ADN humain en concentration fixe provenant de fibroblastes de poumons humains (MRC5). Les dilutions ont été stockées à +4°C, tandis que les préparations initiales concentrées étaient conservées aliquotées à -80°C.

.2.2.3. Préparation des plasmides standards Albumine.

L'ADN lié à l'albumine était quantifié dans chaque échantillon, pour estimer le taux d'ADN génomique, c'est-à-dire le calcul du nombre de cellules évalué à chaque PCR et la détection de l'ADN cellulaire dans le sérum. La détection de l'ADN lié à l'albumine permet d'exclure la possibilité de faux négatifs liés aux inhibiteurs de PCR. Les taux d'HBVDNA normalisés dans les cellules étaient exprimés en copies / 10^6 PBMC.

Un fragment de 140 kilobases provenant de l'intron 12 du gène de l'albumine humaine a été amplifié avec le système TaKaRa Ex Taq et les amorces AlbS/AlbAS décrites par Desire et al (2001) et utilisé pour de nouvelles quantifications.

Après avoir été dénaturé à 94°C pendant trois minutes, l'ADN a été soumis à 35 cycles de 45 secondes à 94°C, 45 secondes à 54°C et 1 minute à 72°C, avant l'élongation finale d'une durée de 10 minutes à 72°C. Le produit de la PCR a été inséré dans le pCR2.1 puis le plasmide l'albumine standard et ses dilutions ont été préparés comme ci-dessus.

.2.2.4. Courbes standard.

Pour chaque échantillon étudié, une courbe standard couvrant 6 log, de 10^1 à 10^6 copies par réaction était réalisée en diluant le plasmide standard. La stabilité des dilutions des standards est assurée par la reproductibilité des valeurs obtenues à chaque PCR. Les courbes standard étaient considérées acceptables si leurs pentes étaient comprises entre -3,74 et -3,32

(correspondant à une efficacité de la PCR entre 85% et 100%) et si les coefficients de corrélation (r^2) étaient supérieurs à 0,990. Si besoin, de nouvelles solutions standards étaient préparées à partir de plasmides fraîchement extraits et quantifiés.

.2.2.5. Les amorces et sondes spécifiques pour l'amplification de l'ADN total, du cccDNA et de l'albumine.

La forme relâchée de l'ADN viral (*relaxed circular DNA* : rcDNA) a un gap sur le brin moins près de DR1 et un brin plus incomplet avec une extrémité 5' définie (oligonucléotide) près de DR2.

Le cccDNA peut être ainsi préférentiellement amplifié avec des amorces précédant juste la région gap (brin-) et le bras incomplet de l'ADN (brin+). Par ce biais, la synthèse de l'ADN s'arrête à l'extrémité 5' de chaque échantillon, avant d'atteindre le site de l'amorce opposée. De plus, l'amorce se lie au bras négatif sur un côté du gap. Si l'ADN relâché est utilisé comme échantillon pour la PCR en temps réel, la polymérase ne peut atteindre la région du gap (Figure).

Les amorces du HBV total, détectent toutes les formes de l'ADN du virus, que ce soit sous forme relâchée, sous forme de cccDNA, ou les formes intermédiaires.

Les amorces et signaux utilisés pour la quantification de l'ADN total, du cccDNA et de l'albumine ont déjà été étudiés dans la littérature. L'analyse BLAST a été utilisée pour comparer les séquences de ces amorces et sondes avec les séquences GenBank pour confirmer leur correspondance et donc leur efficacité avec différents génotypes du virus de l'hépatite B. Les amorces sélectionnées dans notre étude pour l'amplification de l'ADN du virus de l'hépatite B ont été nommées HBV totF et HBV totR respectivement. Celles utilisées pour la quantification du cccDNA, se liant de chaque côté de la région gap étaient DRF1 et HBV totR [494, 495]. Enfin, la sonde du virus de l'hépatite B, conjuguée à la 5' FAM (6-carboxyfluoresceine) a servi pour la PCR en temps réel de l'ADN total et du cccDNA du virus de l'hépatite B [495].

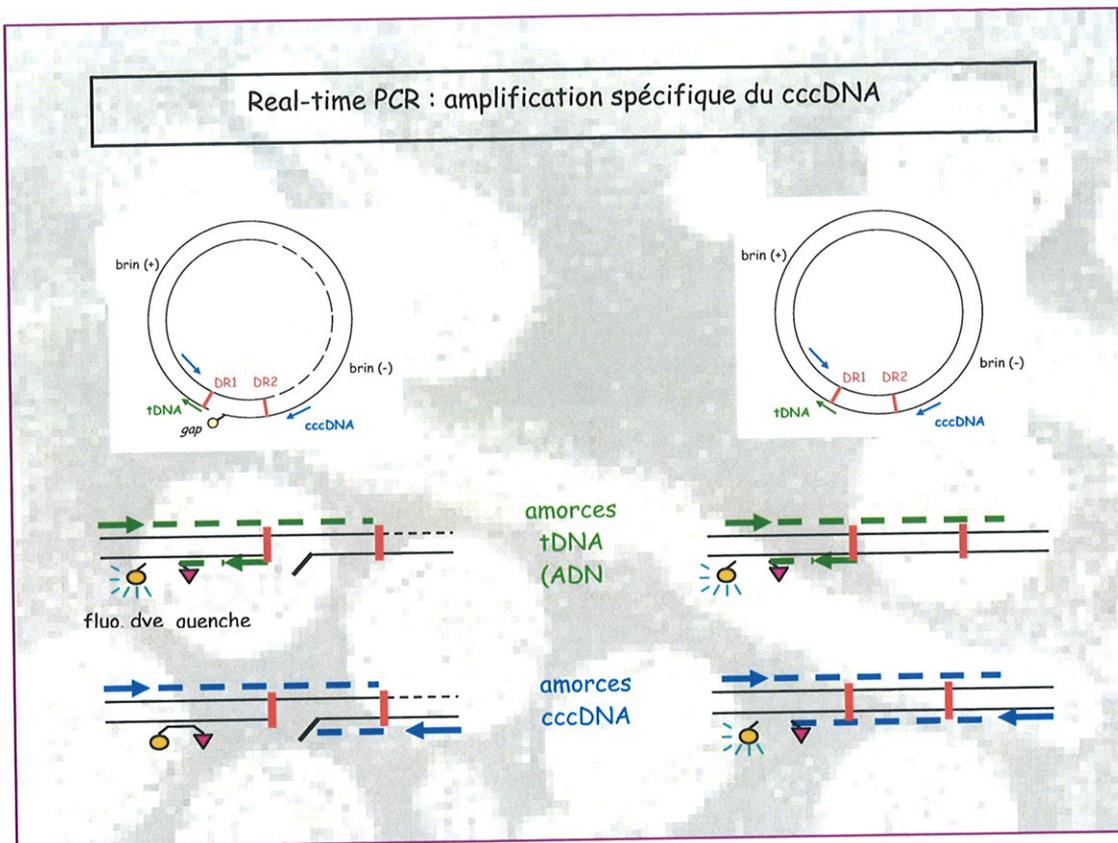


Figure 30: schéma figuratif du fonctionnement des amorces.

.2.2.6. Le prétraitement par DNase augmente la spécificité de la détection du cccDNA.

La nucléase du haricot mungo clive la région simple brin du gap et les régions triple-brins du gap. L'ADN extrait (5 μ L) a été traité avec 5 unités de nucléase du haricot mungo (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) dans 25 μ L du mélange de réaction contenant 50 millimoles d'acétate de sodium (pH : 5,0), 30 millimoles de NaCl, 1 millimole de ZnSO₄. Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 2.5 μ L d' EGTA (100 mmoles, pH 7.4). Finalement, 5 μ L de la préparation ont été utilisés en tant que support pour la détection de cccDNA par PCR en temps réel.

Malheureusement, la PCR a été inhibée par le réactif de l'enzyme ce qui nous a amené à utiliser une autre méthode

La Plasmid-Safe-ATP-Dependent DNase (Epicentre, Madison, WI, USA) hydrolyse préférentiellement les structures double brin linéaires de l'ADN, hydrolysant moins efficacement les formes superenroulées et linéaires simple brin. Une unité de cette enzyme

convertit une nanomole de désoxynucléotides sous forme d'ADN en une forme soluble après 30 minutes d'incubation à 37°C. La spécificité de la digestion de l'ADN sous sa forme relâchée a déjà été décrite par Singh et al.[496]. L'ADN extrait (10 µL) a été digéré par la DNase (jusqu'à 40 unités) pendant une heure à 37°C en présence d'1 millimole d'ATP et d'un tampon. Après incubation pendant 30 minutes à 70°C, 5 µL ont été utilisés pour la détection du cccDNA par la PCR en temps réel.

.2.2.7. La PCR en temps réel par LightCycler de l'ADN total, du cccDNA du virus de l'hépatite B et de l'albumine.

Cette technique a déjà été étudiée et validée dans différents travaux.

L'amplification par la PCR en temps réel a été réalisée avec le LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes kit (Roche Diagnostics), se basant sur un mélange de 20 µL, contenant 5 µL d'ADN extrait ou de dilutions de plasmide standard. L'efficacité de la PCR a pu être optimisée en ajustant les concentrations de MgCl₂, d'amorces et sondes. Les concentrations finales des réactifs étaient composées de la manière suivante : 3 millimoles de MgCl₂, 0,2 µmole de sonde, 0,9 µmole d'amorce pour le cccDNA ou 0,7 µmole d'amorce pour l'ADN total du virus de l'hépatite B ou 1 µmole d'amorce pour l'albumine. Dans le cas de l'amplification du cccDNA, du diméthylsulfoxyde (DMSO - Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA) était ajouté au mélange à la concentration finale de 4%.

Les conditions thermiques des cycles étaient les suivantes : 10 minutes à 95°C, suivis de 50 cycles de 15 secondes à 95°C et une minute à 61°C pour le virus de l'hépatite B et 65°C pour l'albumine. Les résultats étaient analysés avec le logiciel LightCycler v3.5 (Roche Diagnostics).

La capacité de la PCR en temps réel à différencier le cccDNA de l'ADN total a été étudié par comparaison avec un test par PCR en temps réel précédemment décrit, qui rapporte de forts taux de cccDNA [495].

Les effets de la digestion enzymatique furent testés avec deux sérums, contenant 4x 10⁹ UI d'ADN du virus de l'hépatite B, comme déterminé dans l'essai Monitor. Ces sérums servirent comme échantillon d'ADN total et le plasmide standard du virus de l'hépatite B comme échantillon pour le cccDNA. Le prétraitement de la nucléase du haricot mungo était assurée avec des sérums non dilués et séries de dilution standard de plasmides du virus de

l'hépatite B, s'étalant de 1.74×10^4 à 1.74×10^6 UI/mL. Pour la digestion par DNase, les dilutions du sérum de 5×10^2 à 5×10^7 UI par mL et les dilutions de plasmides de 7×10^5 à 7×10^9 UI par mL étaient traités avec 10, 20 et 40 unités de DNase.

La PCR en temps réel du virus de l'hépatite B détecte au moins une copie d'ADN du virus de l'hépatite B par réaction (27 UI par millilitre). La limite inférieure de quantification du virus l'hépatite B était situé à $2,7 \times 10^2$ UI par millilitre, correspondant aux résultats des tests VQC.

.2.3. Validation des techniques.

.2.3.1. La PCR en temps réel.

La PCR en temps réel a été réalisée au moins deux fois pour les dilutions standard et les échantillons et la valeur moyenne obtenue utilisée pour la quantification.

Les plasmides HBV standard ont été d'abord calibrés en utilisant le Viral Quality Control (VQC) HBV DNA genotype A panel 1999 (PELICHECK; CLB, Amsterdam, Netherlands), contenant 3×10^2 to 3×10^7 HBV genomes équivalent par millilitre. La sensibilité et la reproductibilité de la PCR en temps réel ont été ainsi déterminés.

L'essai a ensuite été évalué en comparant les résultats obtenus avec ceux d'une technique diagnostique de routine le COBAS Amplicor HBV Monitor Test. Un échantillon clinique contenant 5×10^9 IU d'HBV DNA/mL, déterminé deux fois par le test Monitor fut dilué dans du sérum humain ne contenant pas d'HBV et fut mesuré par la PCR en temps réel. De plus 15 sérums de patients infectés par différents génotypes (3 A, 3 B, 3 C, 3 D and 3 E) et deux échantillons négatifs ont été testés par les deux techniques. La corrélation obtenue entre les résultats en PCR temps réel et en Monitor a été évaluée par régression logistique et corrélation de Pearson.

.2.3.1.1. Calibration des plasmides HBV standard par le VQC HBV DNA standard.

Le VQC genotype A standard exprimé en génomes équivalents par millilitre (geq/mL), a été calibré par le World Health Organisation (WHO) international standard dans une étude collaborative. Une unité internationale a été démontrée comme approximativement équivalente à 7.4 copies du génome de l'HBV.

L'échantillon standard le plus faible quantifié de façon fiable et répétée contenait 3×10^3 copies d'ADN du virus de l'hépatite B par mL (4.05×10^2 IU/mL). La différence moyenne entre les titres référents du VQC et les valeurs de la PCR en temps réel était de $-0.09 \log_{10}$ unités. Ainsi, la quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B basée sur des plasmides standards utilisés dans cette PCR en temps réel était en accord avec les résultats obtenus avec les standards internationaux décrits pour l'hépatite. Les résultats en copies/mL obtenus par la PCR en temps réel pourraient ainsi être exprimés en UI/mL, en utilisant un facteur de multiplication basé sur le facteur de conversion VQC.

.2.3.1.2. Sensibilité et amplitude de détection de la PCR en temps réel.

L'amplitude de détection de l'essai a été établie en diluant le plasmide HBV standard dans de l'eau distillée en présence ou absence d'ADN humain en quantité constante. En l'absence de différence, l'eau distillée seule a été utilisée comme milieu de dilution pour les expériences suivantes.

Cette PCR en temps réel peut détecter au minimum une copies/ml (27 UI/mL). Cependant des résultats variables ont été obtenus lorsque des dilutions contenant moins de 10 copies par réaction ont été testés. Des courbes linéaires ont été observées entre 10 à 10^{10} copies d'HBV DNA total par réaction (correspondant à 2.7×10^2 à 2.7×10^{11} IU/mL) et de 10 à 10^7 copies d'albumine par réaction. Les relations entre les valeurs Ct et les \log_{10} de concentrations étaient parfaitement linéaires ($r^2 = 0.999$ et $r^2 = 0.997$ respectivement). La limite la plus basse de quantification de l'HBV a été déterminée à 2.7×10^2 IU/mL, en accord avec les résultats du test VQC.

.2.3.1.3. Reproductibilité.

La reproductibilité intra essai a été déterminée en répétant la quantification de l'ADN total sur les sérums de 4 patients AgHBs positifs. Ces échantillons ont été testés 5 fois lors d'un seul cycle et ont donné des coefficients de variation inférieurs à 15%.

La variabilité inter essai a été déterminée en testant les échantillons de sérums de 4 patients AgHBs positifs une fois par cycle dans 5 cycles différents de PCR d'ADN total. Les coefficients de variation obtenus pour la PCR ADN total se situaient entre 8.11 et 37.52%.

.2.3.1.4. Comparaison de la PCR en temps réel avec la PCR COBAS Amplicor HBV Monitor.

Dix dilutions d'un sérum préalablement quantifié avec le test Monitor ont été testées avec la PCR en temps réel. La dilution la plus basse (10^2 UI/mL) était légèrement au-dessous de la limite de quantification (établie à 2.43 unités \log_{10}) par PCR en temps réel. Les valeurs moyennes obtenues approchaient les 0.21 unités \log_{10} des concentrations attendues (différence moyenne : $-0.17 \log_{10}$ IU/mL).

Des résultats concordants ont été obtenus pour les deux sérums négatifs pour le VHB et pour 12 échantillons positifs alors que 17 sérums étaient testés simultanément avec le LightCycler assay et le test Monitor. Deux sérums restant ont donné des valeurs au-dessous du cut-off (1.51 et 1.82 unités \log_{10}). Un autre était au-dessous du seuil du cut-off du test Monitor (inférieur à 1.58 unités \log_{10}). Le dernier échantillon (1.82 unités \log_{10} en PCR en temps réel) était à $2 \times 10 \log_{10}$ UI d'ADN du virus de l'hépatite B avec le test Monitor. L'analyse statistique a montré que les résultats obtenus avec la PCR en temps réel et le test Monitor étaient significativement et fortement corrélés ($r = 0.997$; $P < 0.0001$). Les deux méthodes donnaient des résultats comparables pour mesurer le taux de DNA, la différence moyenne (-0.29 unités \log_{10}) n'étant pas significativement différente. De plus, la quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B a été démontrée indépendante du génotype.

.2.3.1.5. Intérêt des lavages de PBMC pour éliminer l'ADN du virus de l'hépatite B adsorbé à leur surface.

Comme attendu, nous n'avons pas détecté d'ADN du virus de l'hépatite B dans les PBMC du donneur HBV négatif. Après avoir incubé ces PBMC avec un sérum présentant un taux élevé d'ADN du VHB et après 1 à 4 lavages avec du PBS, nous avons détecté des taux d'ADN du VHB presque constants (titre moyen : 6.16×10^2 IU/ 10^6 cellules), quelque soit le nombre de lavages. Deux lavages ont donc été utilisés après avoir isolé les PBMC. Selon les résultats obtenus dans cette étude, la quantité d'ADN du VHB restant sur les PBMC après deux lavages était de 5.35×10^2 IU/ 10^6 cellules. Les vrais positifs pour la détection de l'ADN du VHB cellulaire furent donc définis par des titres d'ADN du VHB dans les PBMC au-dessus de 5.35×10^2 UI/ 10^6 cellules ou supérieurs aux concentrations sériques.

.2.3.2. Spécificité de la quantification du cccDNA dans le sérum et les PBMC.

.2.3.2.1. Spécificité des amorces du cccDNA.

Les mêmes échantillons ont été testés par PCR en temps réel de cette étude et par celle décrite par Chen et al.[497]. Les concentrations \log_{10} de cccDNA obtenus avec les amorces de Chen (HBV ccc F1, 5' ACT CTT GGA CTC BCA GCA ATG 3' and HBV ccc R1, 5' CTT TAT ACG GGT CAA TGT CCA 3') étaient deux fois plus élevées que les taux d'ADN total en moyenne. Par contre, les concentrations de cccDNA concentrations obtenues avec nos amorces (DRF1/HBV totR) étaient environ de 0.80 \log_{10} en dessous des concentrations d'ADN total.

.2.3.3. Intérêt de la digestion enzymatique des formes relâchées du DNA.

La digestion avec le Plasmid-Safe-ATP-Dependent DNase a montré que, comme attendu, le traitement par la DNase n'affectait pas le taux d'ADN du VHB total si on utilisait des plasmides standards de cccDNA. Après le traitement par DNase d'un premier sérum, sérum A, des quantités variables d'ADN total ont été détectées dans les différentes dilutions. L'ADN du VHB était détecté après traitement dans des dilutions contenant plus de 5×10^4 IU

d'ADN du VHB /mL après digestion avec 10 U de DNase, et dans les dilutions contenant plus de 5×10^5 IU d'HBV DNA/mL après traitement avec 20 U de DNase. L'ADN détecté pourrait correspondre à de petites quantités de cccDNA dans le sérum. Cependant, ceci est peu probable car l'ADN VHB total n'est détecté dans aucune des dilutions du sérum A traitées avec 40 unités de DNase.

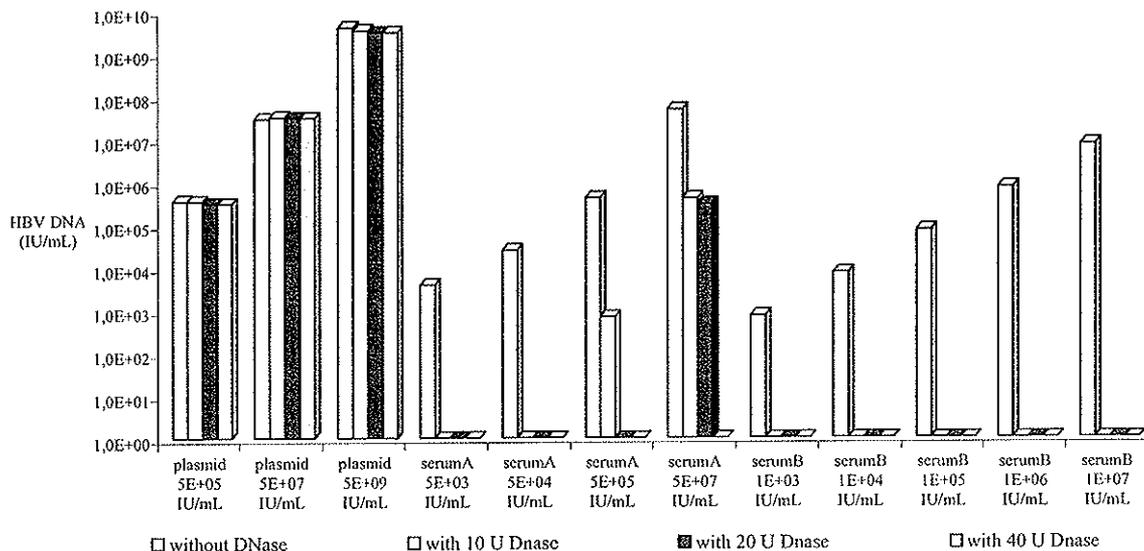
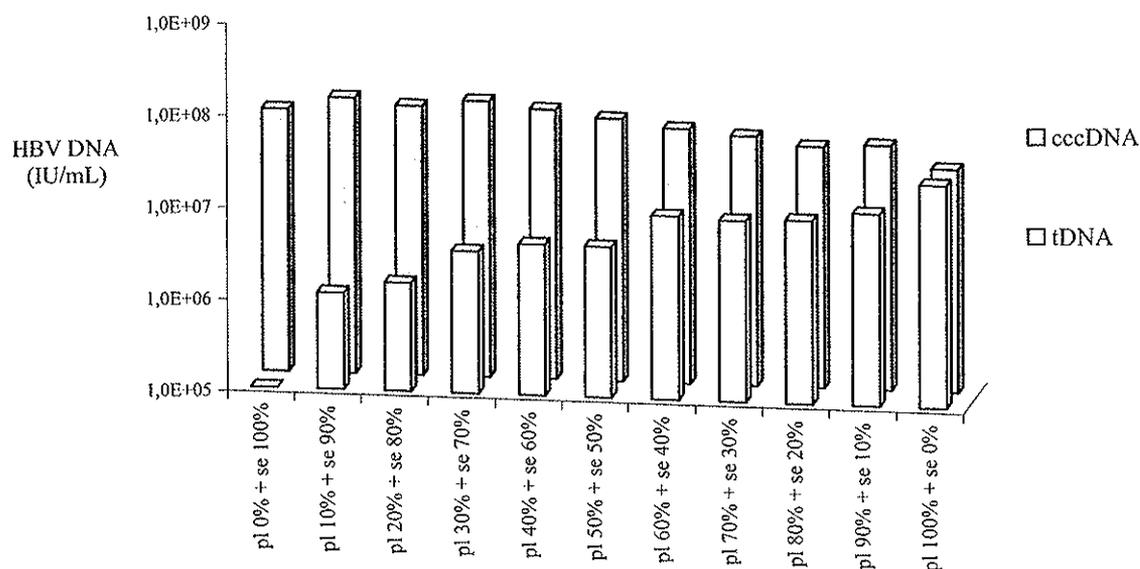


Figure 31 : effets de la digestion par la DNase.

Quand les dilutions du sérum B à haut titre d'HBV DNA étaient traitées avec des concentrations variables de DNase, aucun signal n'était obtenu avec les amorces d'ADN total, même quand on avait 10^7 IU d'HBV DNA/mL (Figure 32). L'ADN total détecté dans le sérum B était donc du rcDNA.

Le traitement de mélanges de cccDNA et d'ADN total avec 40 U de DNase éliminait spécifiquement le rcDNA (Figure 33).



en gris : ADN total dans sérum B (100% se = 10⁸ UI/mL), plasmide (pl 100% = 5×10⁷ UI/mL) et mélange de serum B + plasmide.

en blanc : cccDNA après traitement par 40 U de DNase.

se: sérum B; pl: plasmide.

Figure 32 : traitement des mélanges d'ADN total et de cccDNA par DNase.

.3. Report des données et méthodes statistiques.

Les différents données et résultats ont été reportées dans un fichier Excel®, à l'aide duquel les courbes de corrélation ont pu être créées. Lorsque les médianes des valeurs de l'albumine, des cccDNA et des cccDNA sériques devaient être comparées un test de Mann-Whitney était employé.

Les valeurs de l'albumine, de l'ADN total et du cccDNA étaient converties en log₁₀ pour pouvoir être analysées et comparées. La reproductibilité des essais était assurée grâce à

un coefficient de variation. La corrélation des charges virales sériques, de l'ADN total et du cccDNA dans les compartiments du sang total, du sérum et des lymphocytes était analysée à l'aide d'un test de corrélation Pearson. Les corrélations étaient reproduites dans des graphes, avec présence éventuelle d'une courbe de tendance. La significativité statistique était déterminée quand le seuil du p était inférieur à 0,05.

L'évolution des charges virales sériques, de l'ADN total et du cccDNA dans les différents compartiments précités a été illustrée par des box-plots à partir du logiciel Statview®.

.E. Résultats.

.1. Caractéristiques cliniques.

Les caractéristiques des 16 patients sont reproduites dans le tableau.

Ils sont répartis en cinq centres (Limoges, Tulle, Orléans, Angers, Clermont-Ferrand). On relève que la moitié d'entre eux est suivie sur Limoges, deux à Angers, un à Orléans, un à Clermont-Ferrand, un à Tulle, et un partageant sa prise en charge entre Orléans et Tulle.

La cohorte étudiée est à nette prédominance masculine, dans la mesure où le nombre de patients masculins est de 13 (donc 3 femmes).

Le patient le plus âgé au moment de l'inclusion est un homme de 58 ans, le plus jeune également un homme de 23 ans. L'âge médian au moment de l'inscription est de 36 ans, l'âge moyen 38 ans.

Huit patients sont de type caucasien, sept de type africain et un seul asiatique.

La contamination sexuelle est rapportée chez 2 patients, une transmission familiale dans trois cas, dont deux par voie materno-foetale. Elle est attribuée à une transfusion chez deux patients. Elle est liée à une toxicomanie chez un patient. Enfin, le mode de transmission demeure inconnu chez huit patients, dont un originaire d'une zone de forte endémie.

Le hasard a permis d'équilibrer la répartition des patients en deux groupes comprenant les patients Ag HBe+ et les patients Ag HBe-, chaque groupe étant composé de huit patients.

.2. Résultats virologiques.

.2.1. Dans le sérum.

Sans surprise, l'ADN est présent dans le sérum de chaque patient. Le cccDNA est détecté chez 36 % des patients (6/16). Un seul d'entre eux est AgHBe-.

.2.2. Dans les lymphocytes.

L'ADN du virus de l'hépatite B est détecté chez 100 % des patients (16/16). En revanche, le cccDNA n'est retrouvé que chez 3 des 16 patients (soit 18 %), dont deux patients porteurs de l'AgHBe.

.2.3. Expression du cccDNA en pourcentage d'ADN total.

Si on convertit les chiffres de cccDNA en pourcentage d'ADN total, on s'aperçoit que celui-ci est faible, traduisant la maigre représentation du cccDNA, dans chaque milieu. Les pourcentages exprimés les plus importants concernent le secteur intra-lymphocytaire, avec 1,81 % (écart-type : 13,2 %) pour l'ensemble des patients, et 4,23 % (écart-type : 2,0 %) pour les patients AgHBe-, 0,01 % pour les patients AgHBe+ (écart-type : 4,9 %). Si on enlève les résultats obtenus chez le patient 18, le pourcentage s'effondre à 0,01 % (écart-type : 4,9 %) pour l'ensemble des patients et devient nul si on se limite aux AgHBe-. On peut en déduire la très faible représentation du cccDNA dans la détection du virus de l'hépatite B dans le compartiment sanguin.

.2.4. Génotypes.

On a pu obtenir le génotype de 14 patients sur 16. La répartition des génotypes est très diversifiée. Le plus fréquemment retrouvé est le génotype E (six patients). Les autres génotypes sont représentés, par ordre décroissant par le génotype D (4 patients), le A et le C deux patients respectivement. Le nombre de patients de notre étude ne nous permet pas de

conclure à des relations statistiques entre génotype et présence ou valeur d'ADNt ou de cccDNA dans les différents compartiments. Par exemple, les patients porteurs de cccDNA dans le sérum, dans les PBMC ou le sang sont de génotypes variés : E (3 patients), A, C et D (2 patients chacun).

.2.5. Mutations précore.

Douze mutations précore ont été détectées, sur quinze prélèvements où la recherche a été possible. Parmi ces douze patients, sept d'entre eux étaient AgHBe+ (probable mélange de souches sauvage et mutante) et six avaient du cccDNA détectable (indépendamment du compartiment).

.3. Evolution sous bithérapie.

.3.1. Evolution globale.

On observe au cours du traitement une diminution franche des valeurs de la charge virale obtenues en Taqman 48 pour l'ensemble des 16 patients. Cette diminution se fait en deux temps : première pente entre J0 et S12, deuxième pente entre S12 et S24. La première pente ($-0,65 \log_{10}$ par semaine pour la charge virale, $-0,75$ pour l'ADN total dans le sang) est plus faible que la deuxième ($-0,77 \log_{10}$ par semaine pour la charge virale, $-0,84$ pour l'ADN total dans le sang). La première pente correspond sans surprise à l'action de l'adéfovir monothérapie et la deuxième à l'introduction de l'interféron pégylé (Annexe IV). Neuf patients sont négatifs à S24 ; parmi eux, deux avant l'instauration de l'interféron pégylé à S12 (un patient à S4, un à S12), sept après (trois patients à S16, un patient à S20, trois patients à S24).

Des résultats similaires sont obtenus avec la PCR par LightCycler (PCR « maison ») au niveau du sang total, et au niveau du sérum. Dans le sang total 10 patients sont négatifs à S24 et 9 dans le sérum.

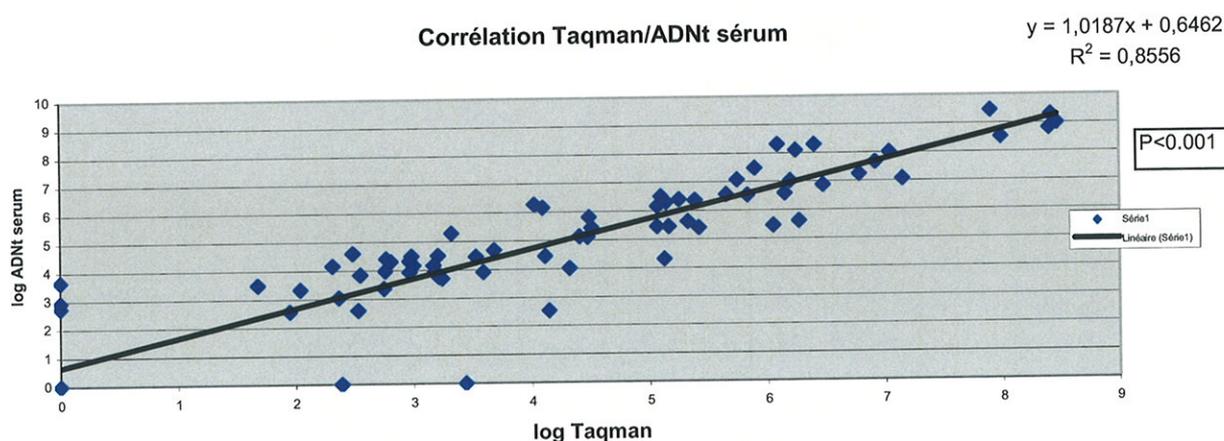
Dans le cas du cccDNA, l'interprétation est différente. Les valeurs sont beaucoup plus faibles que dans le compartiment extra-cellulaire; elles se négativent rapidement (avant S12 sauf pour un patient).

.3.2. Etude de corrélation entre notre PCR en temps réel et la technique de référence « Taqman 48 » et effet matrice sang.

.3.2.1. Les mesures réalisées par PCR en temps réel sont-elles bien corrélée avec celles obtenues par la nouvelle technique de référence Taqman 48 dans le compartiment extra-cellulaire, sérum ou plasma ?

Comme nous l'avons expliqué ci-dessus dans la description des méthodes (B.3.5.1.4), nous avons validé notre PCR en temps réel « maison » par rapport à la PCR Cobas Monitor, technique diagnostique de routine utilisée au moment de la genèse du protocole dans le sérum.

Nous avons dans cette étude utilisé une méthode de référence plus récente de PCR en temps réel Taqman : PCR Roche COBAS Taqman 48 commercialisée (dite Taqman 48). Les mesures par Taqman 48 ont été classiquement faites dans le plasma. Il était donc nécessaire de valider cette technique maison par rapport à la technique de référence Taqman 48.

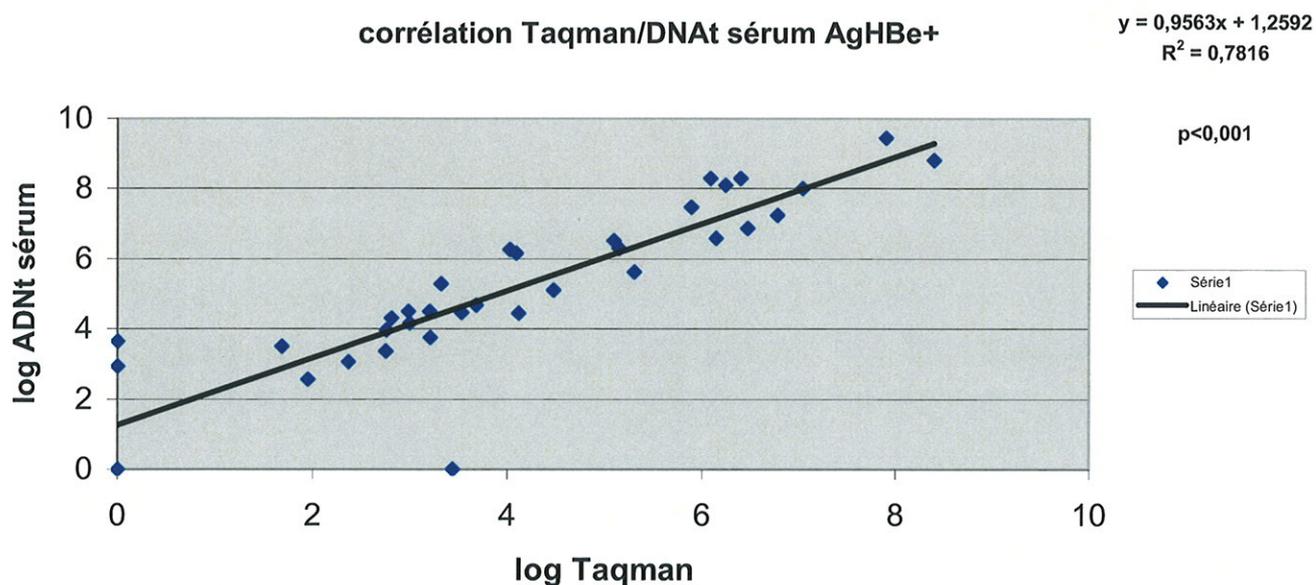


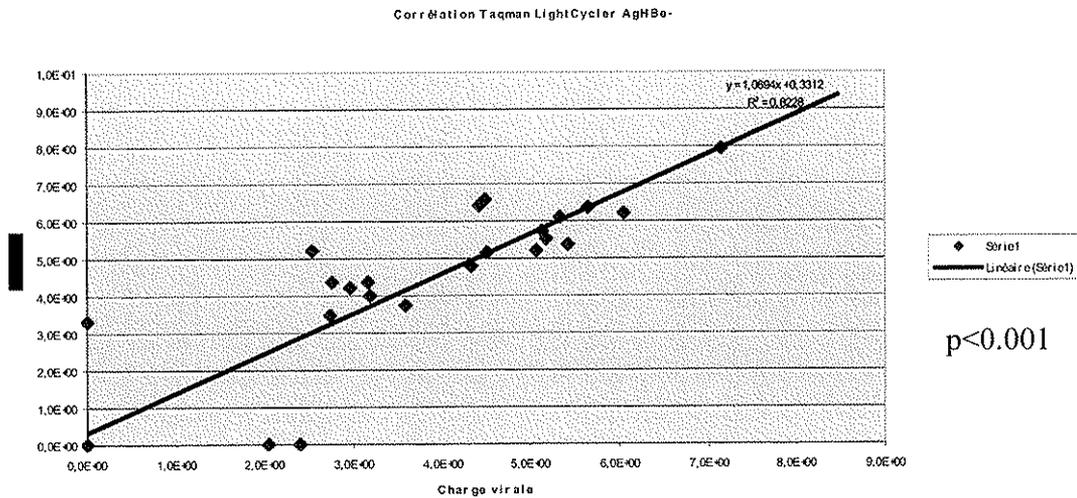
Graphe 1 : Corrélations entre PCR temps réel dans le sérum et le taqman 48 dans le plasma.

Nos résultats montrent une bonne corrélation entre les résultats obtenus par PCR en temps réel « maison » exprimée en \log_{10} dans le sérum et les \log_{10} de PCR Taqman dans le plasma ($R^2 = 0,8556$, $p < 0,001$) (Graphe 1).

Après conversion en \log_{10} les deux techniques fournissent des résultats équivalents. La pente de la droite de régression $\log_{10}\text{TaqMan} / \log_{10}\text{ADNt}$ ne diffère pas significativement d'une pente unité et l'ordonnée à l'origine (0,65) correspond approximativement à 2 copies (valeur inférieure à la limite de détection de la PCR en temps réel maison).

Si on sépare les patients AgHBe+ et AgHBe-, la même corrélation linéaire demeure (Graphes 2 et 3).



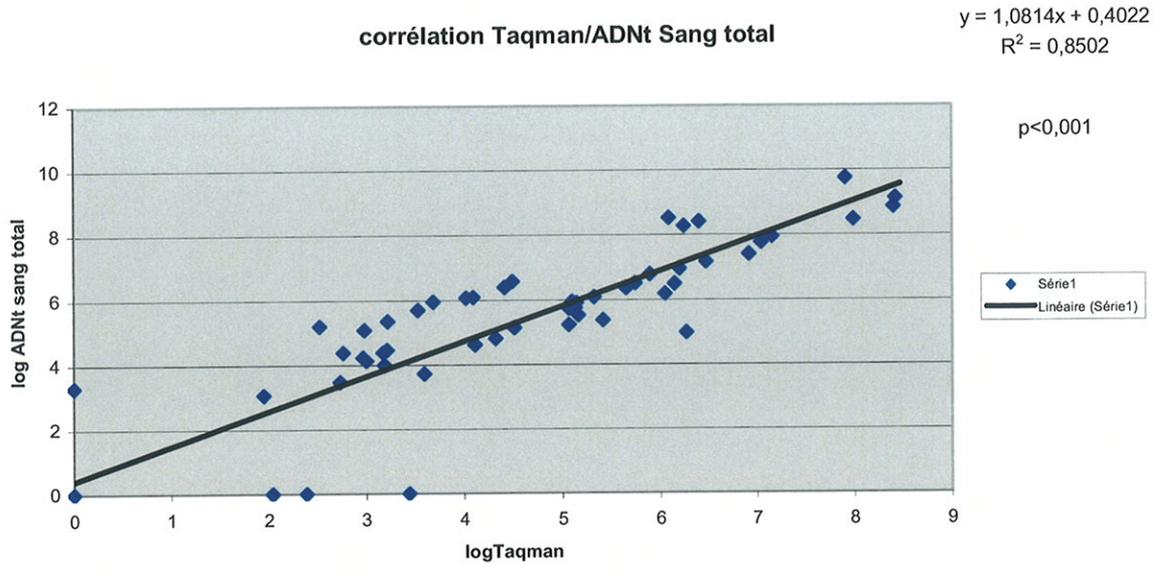


Graphes 2 et 3 Corrélations entre PCR temps réel dans le sérum et le taqman 48 dans le plasma chez les patients Ag HBe+ et les patients Ag HBe-

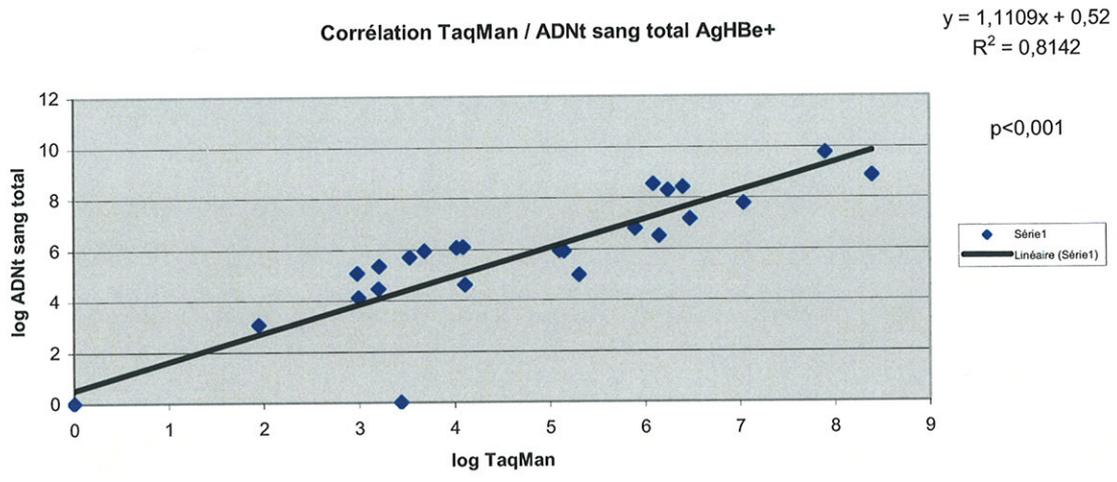
3.2.2. Cette corrélation demeure-t-elle lorsque les mesures d'ADNt sont effectuées dans le sang total ?

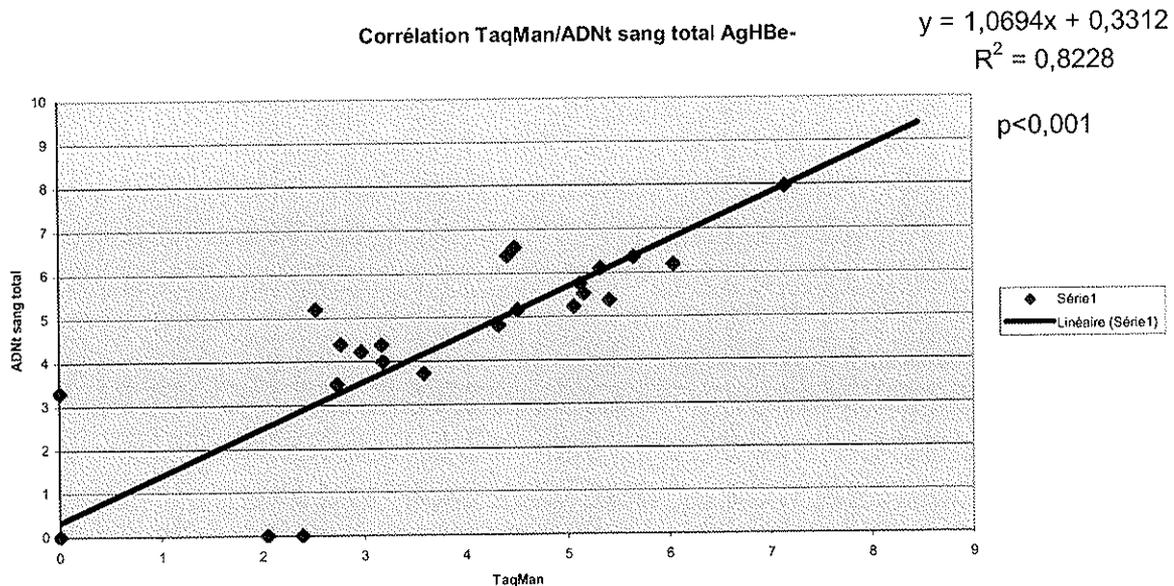
Il existe également une bonne corrélation entre les \log_{10} de PCR en temps réel « maison » dans le sang total et les log de PCR Taqman dans le plasma ($R^2 = 0,8502$, $p < 0.001$) (Graphe 4). Si on sépare les patients AgHBe+ et AgHBe-, la même corrélation demeure (Graphes 5 et 6).

Après conversion en \log_{10} les deux techniques fournissent des résultats équivalents. La pente de la droite de régression \log_{10} TaqMan/ \log_{10} ADNt sang total ne diffère pas significativement d'une pente unité et l'ordonnée à l'origine (0,40) correspond à moins de 2 copies (valeur inférieure à la limite de détection de la PCR en temps réel maison).



Graphe 5 : Corrélation Taqman 48 dans le plasma et notre PCR en temps réel dans le sang total.

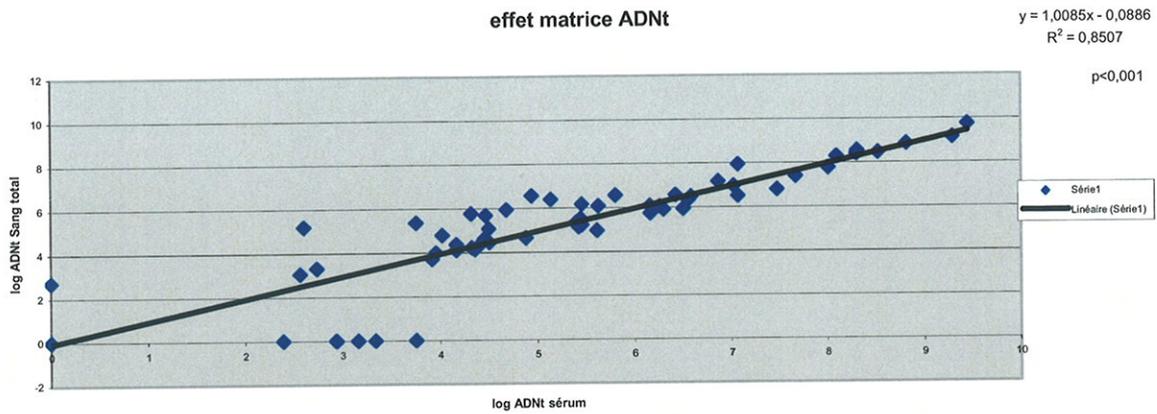




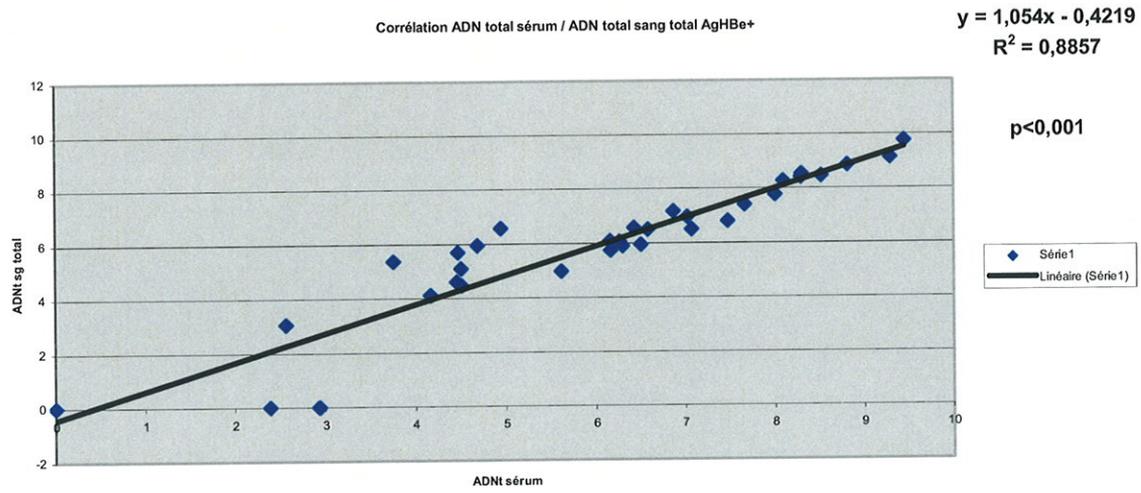
Graphes 6 et 7 : Corrélation Taqman 48 dans le plasma et notre PCR en temps réel dans le sang total chez les patients Ag HBe+ et Ag HBe-.

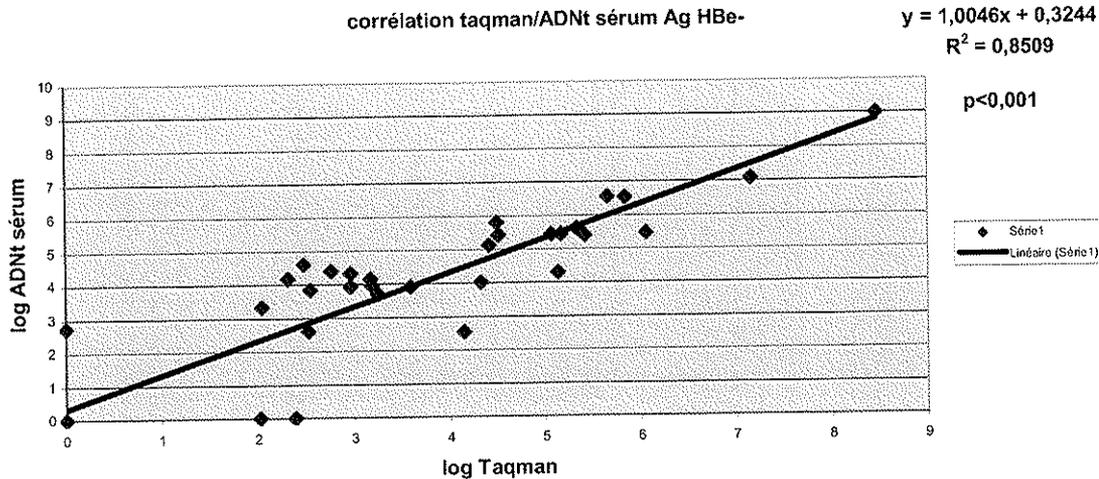
.3.2.3. Les mesures de la charge virale par notre technique sont-elles corrélées dans le compartiment extra-cellulaire (sérum ou plasma) et dans le sang total (effet « matrice » ADN total) ?

Les mesures réalisées par PCR en temps réel « maison » (exprimées en \log_{10}) dans les deux matrices que représentent le sang total et le sérum sont linéairement corrélées ($R^2 = 0,8507$, $p < 0.001$) (Graphe 8). Si on sépare les patients AgHBe+ et AgHBe-, la même corrélation demeure (graphes 9 et 10).



Graphe 8 : Effet « matrice » ADN total : corrélation ADN total sérum / ADN total sang total.





Graphes 9 et 10 : effet « matrice » ADN total : corrélation ADN total sérum / ADN total sang total chez les patients Ag HBe+ et Ag HBe-.

En conclusion :

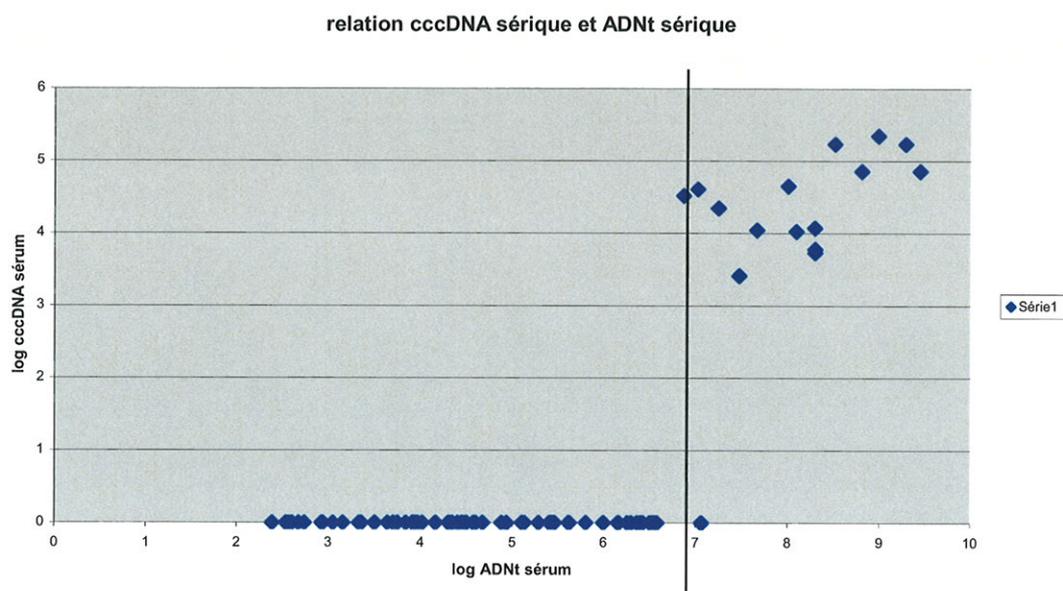
- 1- Il existe une bonne corrélation entre les résultats fournis par notre PCR dans le sérum et la PCR Taqman 48 dans le plasma. La corrélation est également correcte entre les mesures (en \log_{10}) faites par notre PCR en temps réel dans le sang total et la PCR Taqman 48 dans le plasma. Les résultats de notre PCR sont aussi corrélés dans le sérum et le sang total. Bien que l'utilisation du sang total ne soit pas habituelle en virologie des hépatites contrairement à d'autres virus, le sang total paraît donc une matrice qui reflète bien le compartiment extra-cellulaire et ce quelle que soit la technique de charge virale utilisée.

- 2- La forte corrélation linéaire, entre l'ADNt dans le sang total et dans le sérum, suggère que les autres compartiments (autres que le sérum dans le sang total) et en particulier les PBMC représentent une composante mineure de l'ADN total du sang total et qu'il va être difficile d'isoler ce compartiment en fonction de la sensibilité des techniques pour la recherche de l'ADN total et encore plus pour le cccDNA.

Nous considérerons donc en premier la recherche de cccDNA dans le sérum et le sang total avant de nous intéresser aux PBMC

.3.3. CccDNA sérique et sang total, corrélation avec l'ADN total sérum.

.3.3.1. Existe-t-il un lien entre le cccDNA dans le sérum et l'ADN total sérum ?



Graphe 11 : Distribution log(cccDNA) sérique et log(ADN total dans le sérum).

Le graphe 11 montre que les patients qui ont une charge virale sérique inférieure à 6,8 \log_{10} en PCR temps réel maison n'ont pas de cccDNA dans le sérum.

Les patients ayant du cccDNA dans le sérum sont les patients 1, 3, 12, 14, 17,19 à J0.

Evolution de ces patients :

Le cccDNA disparaît progressivement sous traitement.

A S4, les patients 12, 14, 17,19 ont encore du cccDNA.

A S8, les patients 14, 17,19 ont encore du cccDNA.

A S12, le patient 16 a encore du cccDNA.

A S16, le patient 16 a encore du cccDNA.

A S20 et S24, aucun patient n'a du cccDNA (il faut toutefois souligner que le patient 16 n'a pas été prélevé après S16).

Les résultats sont donc très cohérents, en faveur d'une non détection progressive sous traitement du cccDNA.

Une explication plausible est la perte de sensibilité de la PCR cccDNA par rapport à la PCR ADNt, avec persistance du cccDNA mais à titre infinitésimal. La baisse du cccDNA n'est cependant pas cohérente avec le mécanisme d'action des antiviraux actuels (et notamment sur un temps d'observation aussi bref, il est peu probable d'observer une baisse du cccDNA quelque soit le compartiment).

CccDNA sérique et charge virale à J0 :

La médiane de l'ADNt J0 dans le sérum des patients ayant du cccDNA sérique est de $8,082 \times 10^7$ (extrêmes $1,767 \times 10^7$ - $2,785 \times 10^9$) et significativement plus élevée que celle observée chez les patients n'ayant pas de cccDNA dans le sérum ($2,893 \times 10^5$; extrêmes $2,056 \times 10^4$ - $1,175 \times 10^7$) ($p < 0,0015$, Mann Whitney).

Les patients avec cccDNA sérique sont majoritairement Ag HBe+ (5/6)

Le cccDNA dans le sérum est donc associé à une charge virale élevée. Les résultats de nos précédents travaux (Wagner et al.), soulignent la bonne spécificité de la détection du cccDNA jusqu'à une charge virale en ADNt de 8 log (avec 40 unités de DNase), mais ne permettent pas d'éliminer une variabilité individuelle d'efficacité de la DNase.

La présence de cccDNA est-elle associée à une cytolysé (relargage hépatique) ou à une surproduction lytique ?

Les patients ayant du cccDNA dans le sérum ont une ALAT médiane de 170 (6 patients, extrêmes 23-315) contre 43 (10 patients, extrêmes 16-491) pour les patients n'ayant pas de cccDNA dans le sérum.

Une tendance cytolytique est observée chez ces patients mais n'est pas statistiquement significative peut-être du fait de trop faible de nombres de patients.

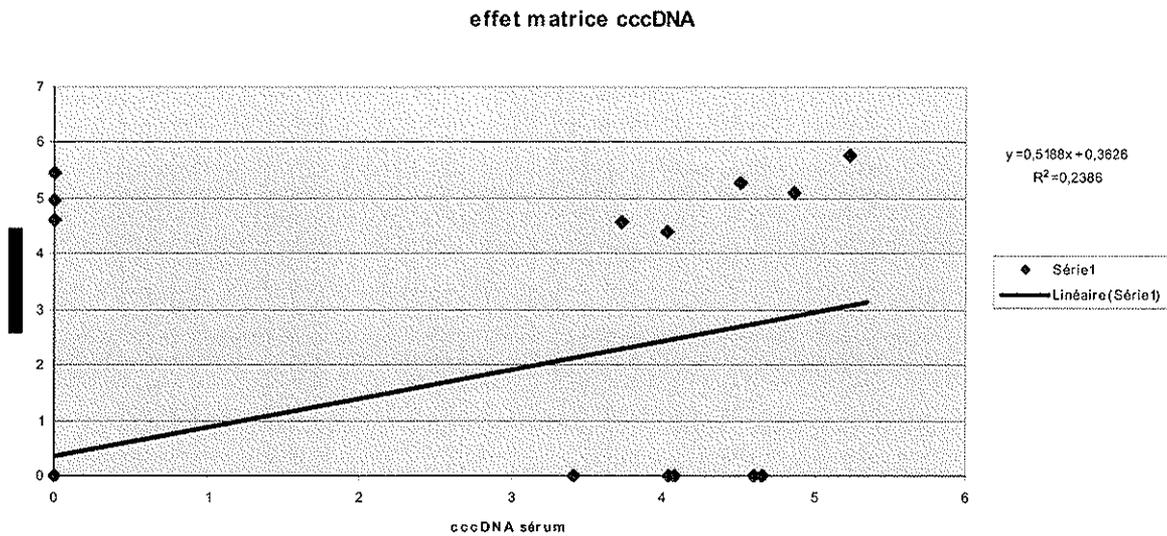
La présence de cccDNA sérique est-elle liée à la valeur de l'Ag HBs à J0 ?

La médiane des Ag Hbs dans le sérum des patients ayant du cccDNA sérique est de 10555 (n=6, extrêmes 3795 à 120335) alors qu'elle est de 3620 pour les patients n'ayant pas de cccDNA dans le sérum (n=10, extrêmes 405 à 17975). Il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$, test de Mann Whitney).

Conclusion : Il semble donc que la présence de cccDNA dans le sérum soit liée à une charge virale élevée simultanée (et peut-être à une ALAT plus élevée ?). Le cccDNA dans le sérum pourrait être lié à une multiplication virale plus intense et suppose l'existence d'un réservoir quelque part dans l'organisme qui relargue des formes répliquatives dans le sérum (foie ?)

En comparant le taux d'ADN de l'albumine dans les échantillons de sérums de patients porteurs de cccDNA et ceux qui n'en possèdent pas, il n'apparaît pas de différence significative entre les moyennes respectives ($2,60 \times 10^7$ versus $2,40 \times 10^7$; $p > 0,05$, test de Mann Whitney). Ceci plaide à l'encontre d'une éventuelle lyse cellulaire, qui devrait favoriser une augmentation de l'ADN de l'albumine.

.3.3.2. Existe-t-il un lien entre la présence de cccDNA dans le sérum et de cccDNA dans le sang total ?



$P < 0.02$

Graphe 12 : Corrélacion cccDNA sérum / cccDNA sang total.

Il existe une corrélation entre les mesures de cccDNA dans les deux matrices sérum et sang total malgré le faible nombre de patients positifs dans les deux matrices (Graphe 12).

Seuls 4 patients (patients n°19, 17, 14, 12), représentant 10 points sur le graphique, ont à la fois du cccDNA dans le sérum et le sang total. Ils sont tous AgHBe+ avec une charge virale initiale entre 7 et 8 log donc élevée. Tous ces prélèvements ont été traités avec 40 unités de DNase.

Deux patients ont du cccDNA dans le sang total sans en avoir dans le sérum.

Un patient (n°18), AgHBe-, qui a du cccDNA dans les PBMC à J0, a un comportement particulier. Sa charge virale initiale est de l'ordre de 5 log₁₀, donc peu élevée et le cccDNA détecté dans le sang total semble chez ce patient exclusivement lymphocytaire.

L'autre patient (n°7), a du cccDNA dans le sang total, mais ni dans le sérum ni dans les PBMC, ce qui peut paraître paradoxal. On peut évoquer, après la confirmation de cette discordance, un problème de sensibilité de la technique dans les PBMC.

Pour 3 points positifs dans le sérum, le cccDNA n'a pu être recherché dans le sang total.

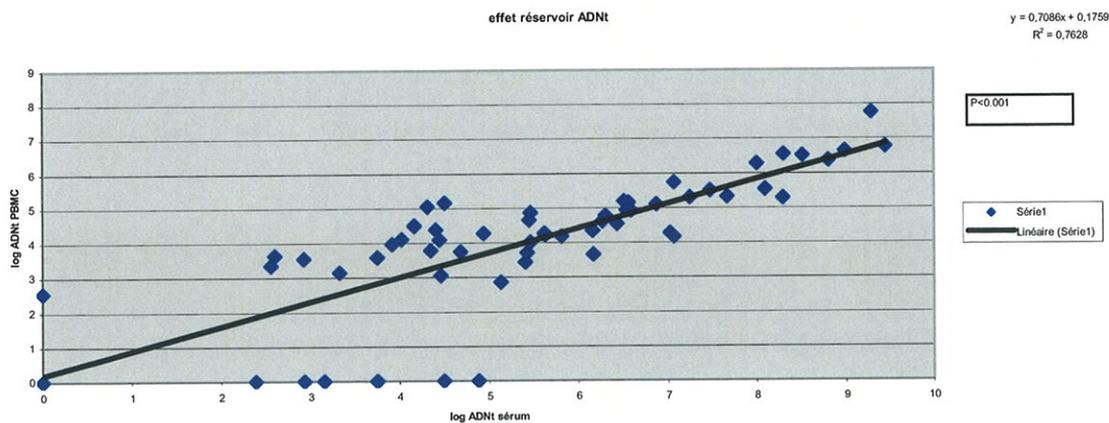
En dehors de ces particularités, quand le cccDNA n'est pas détecté dans le sang total, il ne l'est pas non plus dans le sérum.

Conclusion : cette corrélation globale entre la détection de cccDNA dans le sérum et dans le sang total montre que dans le sang total, le sérum représente le compartiment principal du cccDNA et que le PBMC est un réservoir faiblement représenté. Pour un seul patient, n°18, l'importance du compartiment PBMC au sein du sang total est majeure.

.3.4. Rôle des PBMC.

Leur rôle sera discuté en cherchant à expliquer d'abord la signification de la présence d'ADNt dans les PBMC puis de cccDNA dans ce même compartiment.

.3.4.1. Y a-t-il une corrélation entre l'ADN total dans le sérum et l'ADN total dans les PBMC ?



Graphe 13 Effet réservoir des PBMC pour l'ADNt :

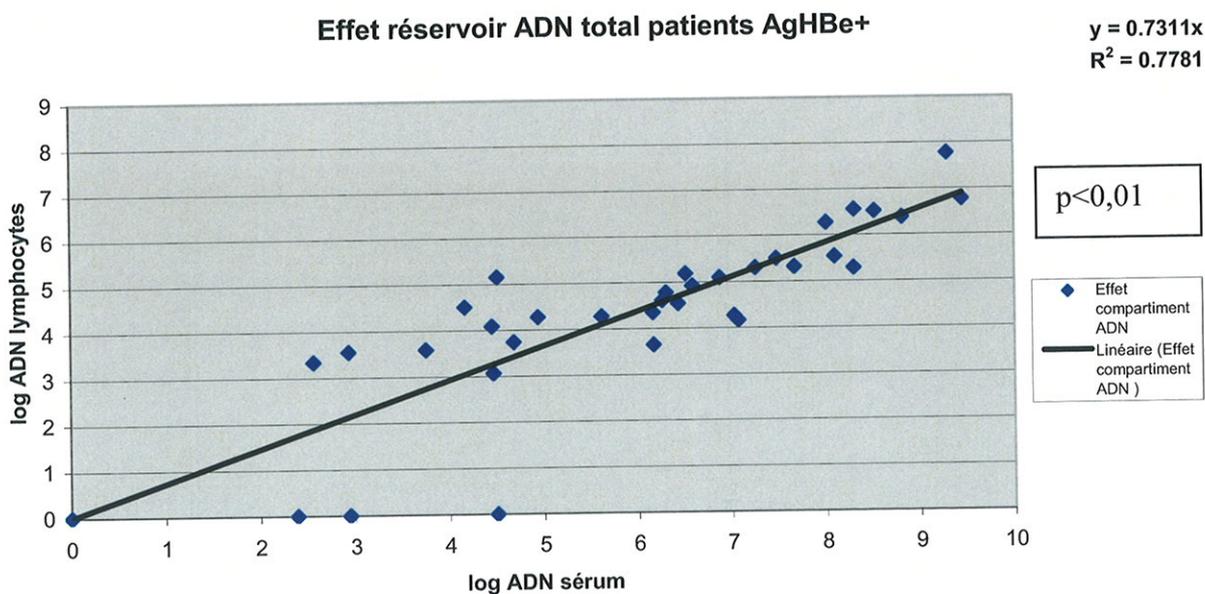
Il existe une corrélation entre les log d'ADNt dans le sérum et les log d'ADNt dans les PBMC ($R^2 = 0,7628$, $p < 0,001$) (graphe 13).

Il ne semble pas exister d'effet seuil de virémie sérique pour détecter l'ADN total dans les lymphocytes. L'ADN total est détecté dans les PBMC à partir de 2,38 log₁₀ d'ADNt dans le sérum, ce qui est aussi la valeur la plus faible non nulle d'ADNt dans le sérum détectée avec la PCR « maison » chez nos patients. Les mêmes observations sont faites que le patient soit AgHBe+ ou AgHBe- (graphe 14 et 15).

Après conversion en log₁₀, la pente de la droite de régression log ADNt sérum/log ADNt PBMC ne diffère pas significativement d'une pente unité et l'ordonnée à l'origine (0,17) correspond approximativement à 1 copie (valeur inférieure à la limite de détection de la PCR en temps réel maison).

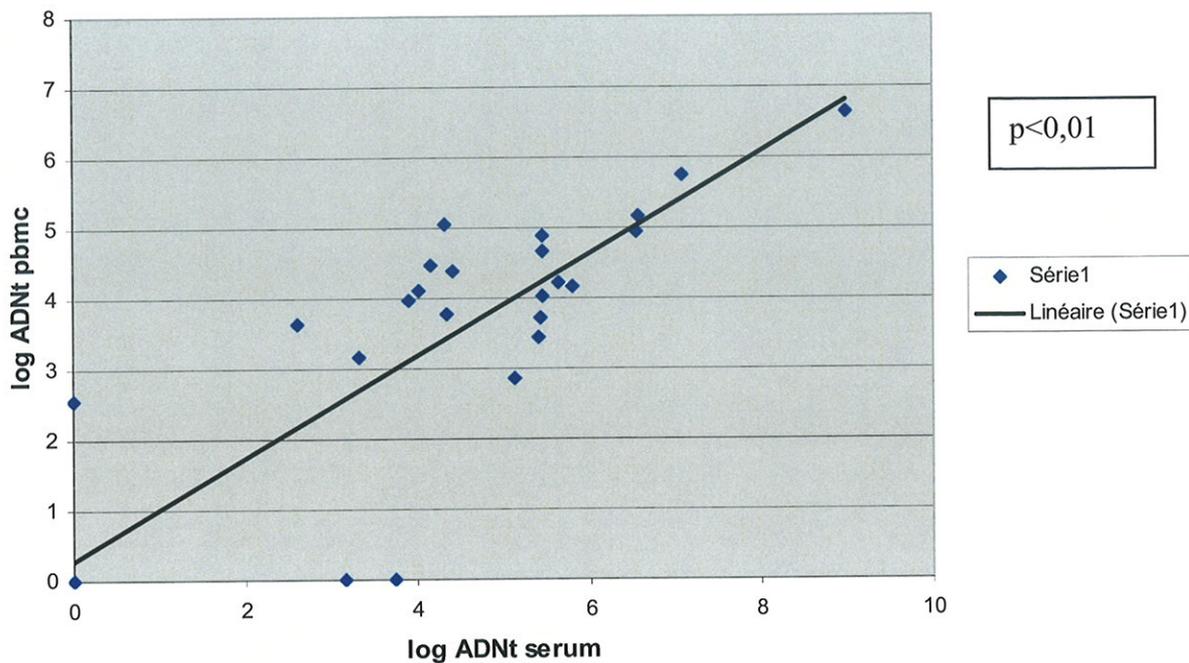
Les résultats obtenus sont d'autant plus intéressants que le prétraitement des échantillons de PBMC inclut des phases de lavage destinées à éliminer les virions adsorbés et que le bruit de fond généré par les virions résiduels (mesuré dans un travail précédent est systématiquement soustrait des résultats de charge virale).

Nous pouvons donc suspecter un rôle réservoir passif des PBMC pour l'ADNt.



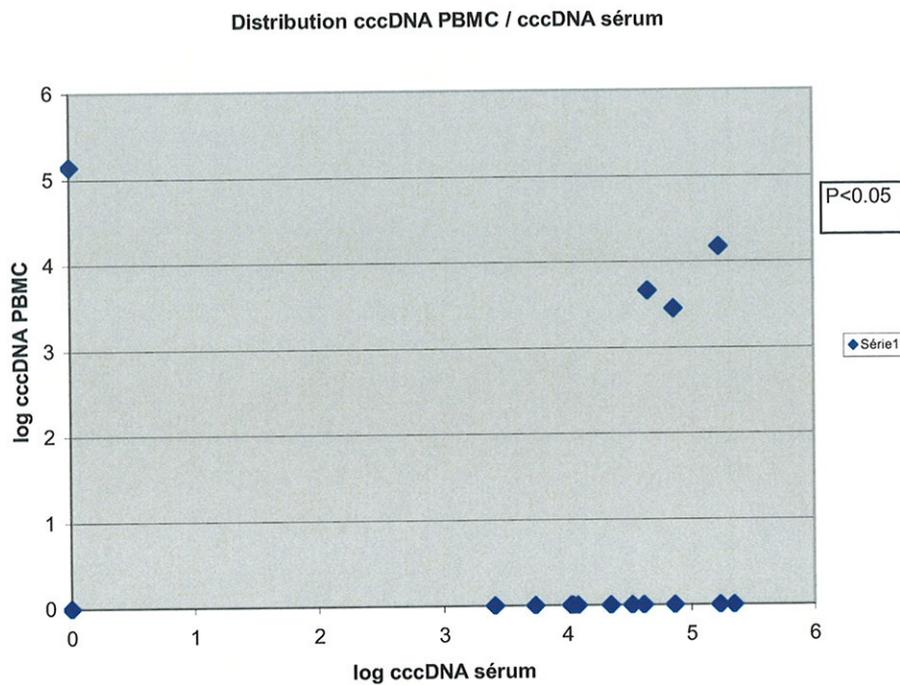
Effet réservoir ADNtotal patients AgHBe-

$$y = 0,7274x + 0,2778$$
$$R^2 = 0,7758$$



Graphes 14 et 15 : Effet réservoir des PBMC pour l'ADNt pour les patients Ag HBe + et Ag HBe-.

.3.4.2. Existe-t-il un lien entre la présence de cccDNA dans les PBMC et le cccDNA dans le sérum ?

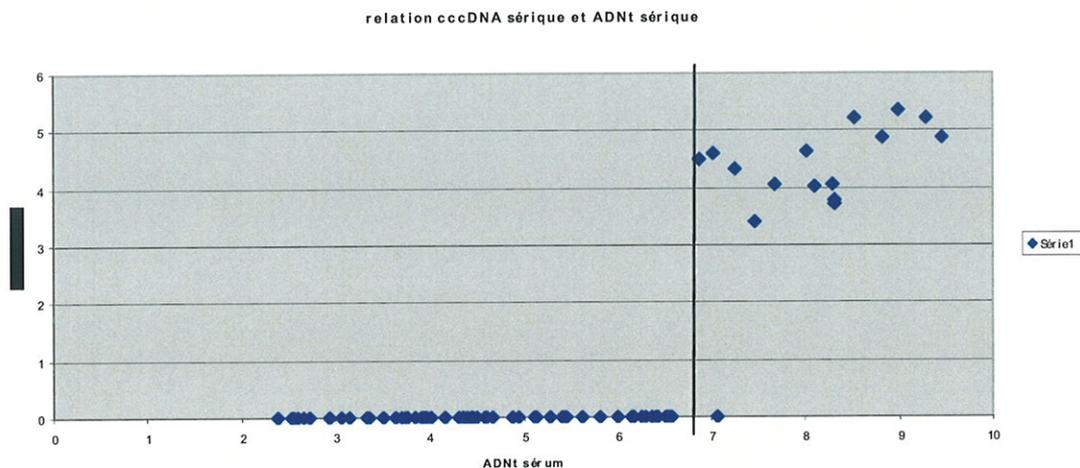


Graphe 16 : Distribution des points cccDNA sérum/cccDNA PBMC.

La majorité des points pour le cccDNA dans les PBMC sont négatifs et il n'est pas possible de rechercher une corrélation linéaire (graphe 16).

Deux patients, correspondant à trois points sur le graphique ont à la fois du cccDNA dans le sérum et dans les PBMC. Il s'agit des patients n°12, J0 et n°14, J0 et S4), patients AgHBe+ avec forte charge virale.

.3.4.3. Existe-t-il un lien entre la présence de cccDNA dans les PBMC et l'ADN total sérum ?



Graphe 17 : Distribution des points cccDNA dans les PBMC et ADNt dans le sérum.

La majorité des points sont nuls pour le cccDNA dans le PBMC et il n'est pas possible de rechercher une corrélation linéaire.

Trois patients (patient n° 12, J0 S4, patient n° 14 J0, et patient n° 18, J0), représentant 4 points sur le graphique, sont positifs dans les PBMC pour le cccDNA ; deux sont Ag HBe+ avec une charge virale initiale parmi les plus élevées, $2,490 \times 10^8$, $2,590 \times 10^8$ copies /ml, alors que la médiane des charges virales initiales des autres patients est de 1.117×10^6 copies /ml (range 2.552×10^4 - 2.914×10^8 copies /ml). Un patient (n°18), toujours le même, Ag HBe- avec une charge virale initiale modérée, $4,481 \times 10^5$ copies /ml, possède du cccDNA détecté dans le sang total, les PBMC, mais pas dans le sérum

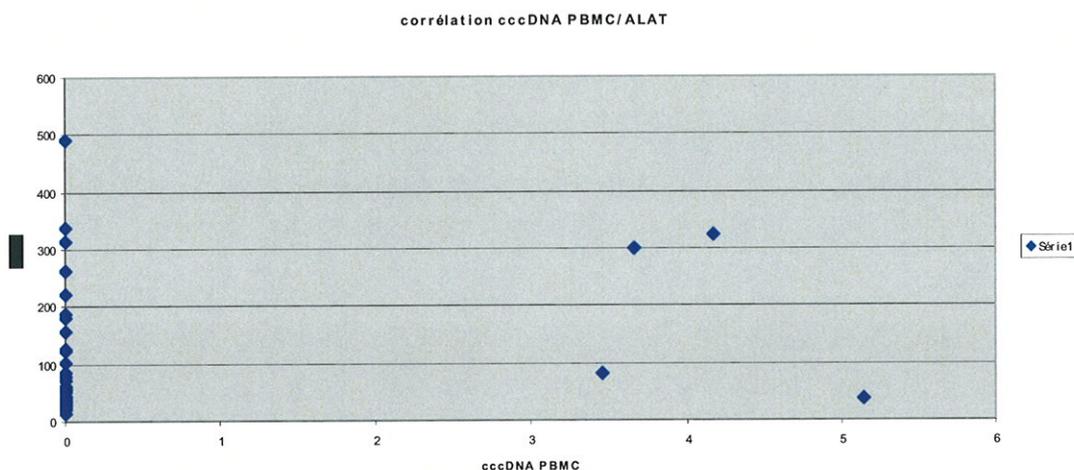
Les patients ayant du cccDNA dans les PBMC ont une ALAT médiane au moment de la détection du cccDNA de 191 (83, 323, 299, et 36 UI/L) contre 46 (valeur inter quartile = 49, extrêmes 14-491) pour les patients n'ayant pas de cccDNA dans les PBMC)

Conclusion : La détection de cccDNA dans les PBMC des patients porteurs d'une hépatite chronique B ayant un profil AgHBs+ avec une charge virale significative est très faible et a été observée chez deux patients (2/8), qui présentaient, en outre, une charge virale

élevée (patients AgHBe+). Cependant d'autres patients semblent pouvoir avoir un comportement différent comme le patient n°18. Ce patient originaire d'une zone endémique (Asie), de génotype C, est Ag HBe- avec une charge virale initiale plus faible (et ainsi plus proche des patients ayant des anticorps antiHBe isolés ou des patients coinfectés par le VIH).

.3.5. Existe-t-il un lien entre la présence de cccDNA dans le sérum ou les PBMC et le taux de transaminases (Effet cytolyse)?

.3.4.1. Existe-t-il une corrélation entre la présence de cccDNA PBMC et le taux d'ALAT ?

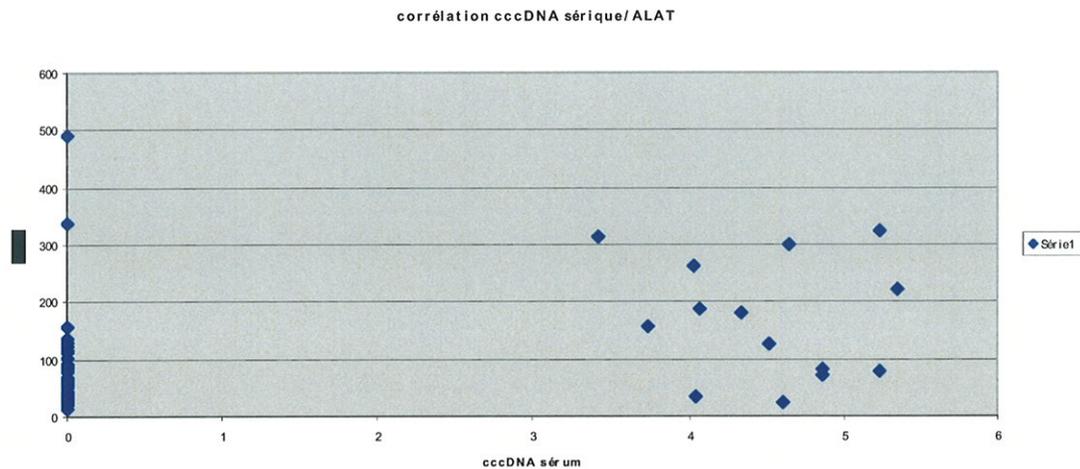


Graphe 18 : Corrélation cccDNA PBMC et ALAT.

Il n'y a pas de corrélation entre les mesures de cccDNA dans les PBMC et le taux d'ALAT (Graphe 18), ce qui va contre un effet de relargage du cccDNA au moment d'une destruction des cellules hépatiques (cytolyse).

Cependant, nous avons observé plus haut que les patients ayant du cccDNA dans les PBMC ont une ALAT médiane au moment de la détection du cccDNA de 191 contre 46 (extrêmes 14-491) pour les patients n'ayant pas de cccDNA dans les PBMC sans pouvoir en donner de conclusion significative.

3.4.2. Existe-t-il une corrélation entre les mesures cccDNA sérique et le taux d'ALAT ?



Graph 19 : Corrélation cccDNA sérique et ALAT.

Il n'y a pas de corrélation entre les mesures du cccDNA dans le sérum et le taux d'ALAT (Graph 19).

Même s'il n'existe pas de corrélation globale entre les valeurs de cccDNA dans le sérum et le taux d'ALAT, on remarque que les patients ayant du cccDNA dans le sérum ont une ALAT médiane de 170 (extrêmes 23-315) contre 43 (extrêmes 16-491) pour les patients n'ayant pas de cccDNA dans le sérum.

En conclusion : bien qu'on observe une tendance plus marquée à la cytolysé chez les patients présentant du cccDNA dans les sérum et les PBMC, il n'est pas possible de conclure sur ce point. En effet, le nombre de copies du gène de l'albumine dans le sérum, témoin de la lyse cellulaire, n'est pas modifié chez ces patients et aucune corrélation globale ne peut être démontrée entre taux d'ALAT et cccDNA. Ceci va à l'encontre des résultats observés par d'autres équipes mais avec des techniques de recherche de cccDNA moins spécifiques et moins sensibles.

F. Discussion.

Comme nous l'avons vu dans la partie « bibliographie » de l'étude, de nombreuses interrogations subsistent quant au rôle des différents compartiments (sang total, sérum, PBMC) comme réservoir du virus de l'hépatite B. Une étude préalable chez les patients AgHBs- nous avait suggéré un rôle possible des PBMC et la persistance de formes virales dans ces cellules. Il nous paraissait important de vérifier cette hypothèse chez les patients AgHBs+.

L'authentification de la présence de ces formes permettrait de signer l'existence d'un réservoir actif extra-hépatique du virus B avec toutes ses conséquences : réactivation virale, transmission au cours de la transplantation notamment pour les patients porteurs du virus B mais sans AgHBs (hépatite B occulte) voire certains patients considérés comme guéris.

Nous n'avons que très peu d'idée sur le rôle du cccDNA dans les PBMC chez les patients porteurs d'une forme floride de l'infection virale B c'est-à-dire AgHBs+ et virémiques et encore moins de son évolution sous traitement dans ce compartiment.

C'est à cette interrogation que nous avons tenté de répondre dans ce travail

Les résultats globaux de notre travail montrent que chez les patients Ag HBs+ virémiques, l'ADN total est présent dans les trois compartiments étudiés : sang total, sérum, et PBMC. L'ADNt dans les PBMC est corrélé à l'ADNt dans le sérum. Le cccDNA est détecté dans le sérum chez 6/16 patients par une technique de PCR maison validée et chez 3/16 patients dans les PBMC. Le cccDNA disparaît très rapidement après l'introduction du traitement.

Le préalable à l'interprétation de tout travail sur l'ADN total et le cccDNA dans différents compartiments est la fiabilité de la technique. Nous commenterons dans un premier temps ces aspects techniques avant d'évaluer le rôle du cccDNA, notamment dans les PBMC, puis d'en mesurer les conséquences cliniques. Enfin, nous concluons ce travail sur les perspectives qu'il peut nous faire imaginer.

.1. Aspects Techniques.

.1.1. La PCR en temps réel par LightCycler, une méthode éprouvée et efficace.

Cette méthode spécifiquement développée dans la région DR1-DR2 du génome pour détecter l'ADN total et le comparer au cccDNA présente plusieurs avantages :

- son coût, très inférieur à celui des méthodes automatisées habituelles de PCR comme le Taqman 48 ou le COBAS Monitor ;

- la région cible choisie (zone DR1-DR2) est également utilisée pour la détection du cccDNA, ce qui permet une comparaison plus précise du cccDNA et de l'ADN total, en utilisant les mêmes cycles d'amplification ;

- l'association systématique à l'amplification d'un gène qui permet de contrôler le rendement d'extraction et, de contrôler la lyse cellulaire dans le sérum ;

- l'autre avantage est qu'elle s'effectue en milieu clos, ce qui diminue les risques de contamination croisées, et donc accroît les chances d'obtenir des résultats plus spécifiques.

Cette méthode « maison » a déjà été employée lors d'une étude précédente [184, 399], comparée alors à la PCR Cobas Monitor, technique diagnostique de routine utilisée au moment de la genèse du protocole. Il avait été ainsi établi un seuil de détection à 27 UI/L, un champ de détection couvrant 9 log₁₀. La reproductibilité inter-essai et intra-essai était satisfaisante. Lorsqu'on compare la nôtre aux autres techniques de détection dites « maison », il apparaît que le seuil et la magnitude de détection sont tout à fait satisfaisants; les résultats sont également probants si on compare à d'autres tests que la PCR en temps réel (bdNA, hybrid-capture, compétitive PCR, Invader) [493-497].

La technique COBAS Monitor a été remplacée en routine au laboratoire par la technique Taqman 48 qui amplifie un fragment du gène préC/C.

Nous avons dans cette étude utilisé cette méthode en référence. Les mesures par Taqman ont été classiquement faites dans le plasma. Nous avons ainsi vérifié la bonne corrélation entre la PCR en temps réel « maison » dans le sérum et la PCR en temps réel Taqman dans le plasma.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes assurés de la bonne corrélation entre l'ADN total mesuré dans le sang total par notre méthode « maison » et la mesure d'ADN total

par notre technique dans le sérum pour vérifier la possibilité d'utilisation de notre technique dans ce milieu.

Bien que l'utilisation du sang total ne soit pas habituelle en virologie des hépatites, elle l'est pour d'autres virus, comme la famille des Herpesviridae, dont l'exemple du CMV [498, 499]. L'utilisation du sang total au lieu du sérum ou du plasma pourrait simplifier la pratique courante en diminuant les manipulations préalables à la conservation de l'échantillon ou au dosage.

Comme nous avons pu le voir dans notre travail, nous avons été confrontés à de nombreux prélèvements où le cccDNA était indétectable. L'hypothèse la plus évidente, sachant que le taux de cccDNA a diminué au cours du traitement en même temps que la charge virale, serait de penser que le cccDNA a disparu. Néanmoins, nous serions plutôt enclins à penser que le cccDNA reste présent à des taux infimes dans cette population et que notre technique de recherche même si sensible ne l'est pas suffisamment.

.1.2. Des mesures entourées de précaution.

Nous nous sommes d'abord assurés de mesurer réellement le cccDNA, sans les formes relâchées de l'ADN. Aussi, avons-nous sélectionné les amorces et les sondes les plus spécifiques et ajouté une étape de digestion par la DNase.

Nous avons ainsi procédé à la digestion des formes relâchées de l'ADN du virus de l'hépatite B préalablement à la détection du cccDNA, afin d'éliminer des artefacts de quantification. Cette démarche avait été auparavant testée dans le travail d'A. Wagner. Il apparaissait ainsi que la détection n'était pas possible dans notre expérience avec un prétraitement par nucléase d'haricot mungo ou d'autres réactifs.

Nous avons également montré qu'une quantité de DNase suffisante, entre 20 et 40 unités, était nécessaire. D'autres études utilisant la DNase ou la nucléase sur haricot mungo, [496, 500-502], n'ont pas pris la précaution de tester les différents taux d'enzymes en fonction des dilutions du plasmide et du sérum. Nous pensons que la digestion de l'ADN non superenroulé pourrait nécessiter dans certains cas des taux plus importants de DNase. Ceci amène à rester prudent sur l'interprétation des études n'ayant pas appliqué ces précautions. Il faut également noter que les PCR qui détectent le cccDNA peuvent aussi détecter une fraction d'ADN intégré.

Dans une étude ancienne en 1996, Köck et al. [503] ont montré que l'ADN du virus de l'hépatite B détecté dans les cellules mononucléées provenait des virus adsorbés, raison pour laquelle le taux d'ADN associé aux PBMCs était en rapport direct avec la concentration sérique. Nous avons donc prétraité les échantillons de PBMC par plusieurs lavages destinés à éliminer les virions adsorbés. De plus, le bruit de fond généré par les virions résiduels (mesuré dans un travail précédent) a été systématiquement soustrait des résultats de charge virale. Nous avons estimé le bruit de fond à 5.35×10^2 IU/10⁶ cellules, seuil au-dessous duquel nous n'avons pas tenu compte des résultats.

Dans notre travail, le cccDNA sérique n'était détectable que si l'ADN total sérique avait une valeur supérieure à 6,8 log copies par mL. Or, nous avons montré dans un premier travail que l'utilisation de 40 unités de DNase permettait une bonne spécificité de la détection du cccDNA jusqu'à une charge virale de 8 log même si nous ne pouvons éliminer une variabilité interindividuelle de l'action de la DNase. Au regard des résultats obtenus dans notre étude, la détection du cccDNA dans les PBMC est très vraisemblablement spécifique et le rapport cccDNA PBMC /ADNtotal est inférieur à 1 %.

Seul le patient n°18 a un rapport proche de 10% et un comportement différent que nous analyserons ultérieurement.

.1.3. Nouvelles perspectives pour affiner nos techniques.

.1.3.1. La possibilité d'amplifier le génome.

La découverte très récente d'un nouvel outil, la RCA (Rolling Circle Amplification) ouvre de nouvelles perspectives. Ces nouvelles techniques d'amplification devraient faciliter la détection du génome entier en cas de charge virale faible. Le cccDNA par cette technique a pu être détecté dans le foie directement jusqu'à un seuil de quantification de 13 copies [504]. Les auteurs concluent aussi à l'intérêt de cette technique pour dépister au sein du cccDNA d'éventuelles mutations archivées en son sein.

Nous proposons d'ailleurs de confronter ultérieurement les résultats de cette technique aux nôtres et dans un deuxième temps de l'appliquer à la détection du cccDNA dans les PBMC.

Cette méthode d'amplification, récemment décrite, prendrait toute sa mesure, par exemple, pour l'identification du génome du patient 16, dont le comportement viral diffère des autres patients AgHBs+, et s'apparente à celui des patients porteurs d'une infection occulte avec antiHBc isolés ou coinfectés par le VIH.

.1.3.2. La recherche d'ADN intégré et d'ARN.

L'hypothèse de la faible détection de cccDNA comme forme répliquative du virus B dans les PBMC, pourrait être liée à l'intégration du génome cellulaire. L'intégration de l'ADN viral dans le génome lymphocytaire pourrait alors expliquer la persistance du virus de l'hépatite B dans ces cellules.

L'intégration de l'ADN du virus dans le génome hépatocytaire a été démontrée à plusieurs reprises chez les patients AgHBs+ ; peu d'études, en revanche, rapportent sa présence dans les PBMC des patients [505, 506]. Ainsi, Murakami et al. établissaient-ils la présence d'ADN intégré chez 22 % des patients (2/9).

Dans le travail précédent de notre équipe [184, 399] et dans celui de Torii et al. [187], malgré une recherche effectuée dans ce but, aucun ADN intégré n'avait été décelé. Murakami et al. [505] suggéraient que le nombre de copies d'ADN viral intégré par la cellule dans les PBMC était très faible comparativement au foie chez les patients AgHBs-, ce qui pourrait expliquer l'absence de détection. Une autre explication technique pourrait être la présence d'ADN intégré sous forme fragmentée ou délétée, qui ne serait pas détectée avec les amorces dans le gène C ou X.

Dans un autre travail, une équipe japonaise [507] avait mis en évidence la présence de génome viral dans les ganglions lymphatiques et dans les PBMC de donneurs vivants de tissus hépatiques AgHBs- et ont montré l'intégration de l'ADN du virus de l'hépatite B dans les ganglions. La présence éventuelle d'ADN intégré dans les PBMC n'avait toutefois pas été recherchée.

Le rôle physiopathologique de l'ADN intégré reste donc à définir.

.2. Apport du dosage du cccDNA et de l'ADNt dans les PBMC pour la compréhension de la physiopathologie des infections virales B.

Tout l'intérêt que nous avons porté à la mise au point de la technique de détection de l'ADN du virus de l'hépatite B et de sa forme superenroulée dans les PBMC résulte de l'observation d'un patient coinfected VIH-VHB-VHC en 2004 [429]. Le patient présentait une double infection par deux virus de l'hépatite B de génotypes différents (A et D), avec un profil sérologique marqué par un Ac anti HBc isolé. Lorsque le patient était AgHBs-, deux génotypes représentaient alternativement la population majoritaire dans les échantillons cliniques. Ce patient a présenté une réactivation B au cours du temps. Un point particulièrement intéressant fut la détection du variant à l'origine de la réactivation virale dans les PBMC du patient suggérant un rôle privilégié des PBMC dans la réactivation.

De nombreux arguments dans la littérature invitent à s'intéresser au cccDNA dans les PBMC. Les études concernent surtout les hépatites B dites occultes.

Nous verrons successivement les modèles d'études disponibles, qu'ils soient animal ou humain, en insistant sur les hépatites B occultes et leurs différences avec notre population AgHBs+.

.2.1. Modèles expérimentaux.

.2.1.1. Modèle animal.

Chez l'animal, l'infection occulte est définie par l'existence d'ADN du virus de l'hépatite B dans le sérum, les cellules du système lymphoïdes, et éventuellement dans les cellules hépatiques, en l'absence d'antigène HBs. Sont définies chez l'animal deux types d'infections expérimentales : l'infection occulte primaire et sa forme secondaire. Les études animales émanent essentiellement d'une équipe canadienne [508]. La forme primaire d'infection occulte a été décrite à partir du virus de l'hépatite B de la marmotte (WHBV, de la famille des hepadnaviridae) [509], qui, après avoir été injecté en très faible quantité, était détecté dans le sérum ou les lymphocytes, en l'absence de marqueurs sérologiques et d'infection du foie. L'infection occulte primaire, n'offre pas de protection pour des réinfections. Ce profil a pu être obtenu à partir d'injections intra-veineuses inférieures à mille

virions [510]. Lorsque cette quantité administrée franchissait ce seuil, elle s'accompagnait d'une atteinte hépatique significative. De ces expériences, il était conclu que la dose de virions nécessaires pour infecter seulement le tissu lymphoïde était comprise de 100 à 1 000. Il était également souligné que la variation de séquence du virus n'était pas responsable des formes différentes d'infection.

A l'inverse, l'infection occulte secondaire, conséquence de la résolution apparente d'une hépatite B aiguë (disparition des marqueurs sériques) peut s'accompagner d'une infection des PBMC et des hépatocytes, d'une inflammation hépatique persistante, voire de développement de carcinome hépatocellulaire [511]. Parallèlement, des réactivations virales ont été constatées au décours d'immunosuppression acquises ou provoquées chez l'animal [512]. Le cccDNA était détecté dans les lymphocytes pour chaque mode d'infection occulte, et dans le foie dans les infections occultes primaires développées en cas de dose de virions utilisée supérieures à 1000.

En résumé, le modèle proposé par Michalak et al, comme modèle d'infection lymphocytaire pure lorsque l'inoculation de virus est très faible est un bon argument en faveur d'une infection spécifique des PBMC par le virus de l'hépatite B.

Etant donné le haut degré de similitude entre le WHBV et le virus humain de l'hépatite B et des infections qu'elles induisent, les résultats de ces expérimentations pourraient être extrapolés à l'homme, comme peuvent en témoigner les réponses immunes spécifiques qui impliquent les cellules T et les CTL.

.2.1.2. Modèle cellulaire d'infection des PBMC humains.

Comme nous l'avons dit, Köck et al. [503] en 1996 avaient cherché à infecter *in vitro* les PBMC. Malgré une technique discriminante pour l'époque, s'ils avaient mis en évidence dans les PBMC la présence d'ADN et de rcDNA, le cccDNA n'y avait pas été détecté. Les auteurs n'excluaient pas la présence de virions adsorbés à la surface des PBMC. Cependant, leur PCR n'avait pas les mêmes sensibilité et spécificité, et n'était pas entourée des mêmes précautions que les plus récentes. Depuis, avec les progrès techniques, la détection de l'ADN total du virus de l'hépatite B dont, notamment, sa forme super-enroulée, est devenue plus aisée, comme le prouvent les modèles cliniques.

.2.2. Modèles cliniques.

La description de l'ADN du virus de l'hépatite B, et de sa forme superenroulée dans le PBMC date d'une dizaine d'années [502, 503].

Le meilleur modèle du rôle de l'infection des PBMC chez l'homme est probablement la transplantation hépatique. D'autres situations particulières, où l'infection des PBMC par le virus de l'hépatite B a un rôle majeur, ont été plus récemment individualisées.

.2.2.1. La transplantation hépatique.

Au cours de la transplantation hépatique, malgré l'extraction du foie malade, il existe un risque de réactivation virale (d'autant plus favorisée, que le rejet est prévenu par un traitement immunosuppresseur). Malgré la mise en place d'une prévention standardisée et validée post-transplantation, certains patients développent une récurrence de leur hépatite virale [189, 293, 297]. A partir de ce constat, se pose la question de l'existence de sites extra-hépatiques réservoirs où le virus persiste.

D'anciens travaux [513] ont montré la présence d'ADN du virus de l'hépatite B dans les leucocytes de patients infectés par le VHB et transplantés (7 sur 11) ayant reçu une prophylaxie par immunoglobulines post-transplantation, et présentant un statut sérologique AgHBs-. Il est à noter la mise en évidence au cours de ce travail de l'absence d'ADN dans le foie chez 23 de ces 24 patients AgHBs-. Par comparaison, les 6 patients AgHBs positifs témoins avaient tous de l'ADN intra-hépatique. Ce travail plaide en faveur de la persistance du virus dans les réservoirs extra-hépatiques après la greffe.

La question cruciale est de prouver que cette réserve « PBMC » était à l'origine de la réinfection en mettant en évidence du cccDNA dans les PBMC dans cette population. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée spécifiquement aux PBMC dans cette circonstance. Par contre deux études ont examiné le rôle du cccDNA dans les hépatocytes du foie transplanté, hépatocytes normaux ou hépatocytes tumoraux.

Une étude américaine conduite avec des techniques virologiques performantes n'a pas pu prouver le rôle du cccDNA intra-hépatique dans le risque de récurrence de l'infection virale après transplantation [514]. En revanche, il existe un risque de réinfection occulte,

comme tendent à le prouver les prélèvements histologiques pratiqués dans le suivi post-transplantation : sur les 25 patients ayant subi une biopsie post-transplantation, l'ADN est détecté dans 83 % des cas, sa forme superenroulée dans 17 %, malgré la prévention post-transplantation ; seuls, cependant 2 % des patients ont présenté une récurrence de la maladie virale. Il s'agissait de patients très virémiques avant la transplantation. Il est ainsi suggéré que le risque de réinfection persiste après la transplantation et que la prophylaxie classique, même avec les nouvelles molécules antivirales devrait être proposée « à vie ».

Un réservoir viral pourrait être représenté aussi par les cellules tumorales chez les patients transplantés pour carcinome hépatocellulaire. Des études plus récentes se sont intéressées à la teneur en ADN viral des carcinomes hépatocellulaires. Ainsi, une équipe chinoise [515] a-t-elle établi en étudiant 25 patients porteurs d'un carcinome hépatocellulaire la présence d'un taux d'ADN du virus de l'hépatite B inférieur dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains. Néanmoins, la forme prédominante est le cccDNA. Une étude française [516], portant sur 99 patients transplantés pour hépatite virale B, dont 31 avaient développé un carcinome hépatocellulaire, a montré le rôle de ce dernier comme facteur indépendant de récurrence de l'infection B (11/31 patients développaient une récurrence versus 3/68). Parmi les 31 patients, la récurrence virale était associée à la réapparition d'un carcinome hépatocellulaire (7/8 contre 2/23). Le point à souligner ici est la mise en évidence de cccDNA non seulement dans les cellules du carcinome hépatocellulaire et dans les cellules non-tumorales avant transplantation (respectivement 11/16 et 12/16 foies explantés étudiés) mais surtout chez 2 des 3 patients après transplantation qui développaient une récurrence de leur infection virale B et de leur carcinome hépatocellulaire. Les auteurs suggèrent ainsi un rôle réservoir des cellules tumorales.

D. Samuel et AM. Roque-Alfonso dans un éditorial publié dans *Liver transplantation* [517] se sont interrogés sur la nécessité de disposer de nouveaux outils de détection intra-hépatiques du virus de l'hépatite B chez les patients transplantés pour une hépatite virale B. Ils préconisaient l'adoption de méthodes plus sensibles et mieux standardisées.

L'ensemble de ces travaux suggère l'hypothèse d'un rôle de l'ADN (et plus précisément sa forme super-enroulée) présent dans des sites ayant une fonction de réservoirs extra-hépatiques (PBMC, éventuelles cellules tumorales) comme facteur favorisant le risque de récurrence de l'infection du greffon. Il semble donc intéressant de pouvoir d'une part établir la présence de cccDNA dans le compartiment PBMC (et éventuellement sérique) et

d'autre part d'étudier son rôle dans la réactivation post-transplantation. Ces sites extra-hépatiques pourraient être des marqueurs de réactivation virale et pourraient permettre de moduler la prophylaxie par immunoglobulines anti-HBs et antiviraux.

Un deuxième modèle permettant l'étude du rôle des PBMC dans la réactivation virale est l'infection occulte

.2.2.2. Infections occultes.

Suspectées depuis plus de 20 ans, les infections occultes (présence d'un génome viral chez des patients AgHBs-) ont pu être détectées grâce à des outils diagnostiques de biologie moléculaire de plus en plus performants. Elles ont une importance clinique particulière liée aux risques d'aggravation de l'hépatopathie notamment en cas de coinfection et au risque d'hépatocarcinome.

Contrairement à sa forme intra-hépatocytaire, le cccDNA intra-lymphocytaire a fait l'objet de peu d'études dans cette circonstance. Sa présence est cependant indiscutable [502]. Cependant son infectivité et ses capacités répliquatives demeurent inconnues.

Notre équipe avait établi l'importance du cccDNA dans les infections occultes [184, 399, 429], retrouvant la présence d'ADN de l'hépatite B et de sa forme super-enroulée par la même technique robuste que celle utilisée ici chez les patients Ag HBs+, et suggéré l'utilité de sa recherche dans ce contexte. Les autres études sur les infections occultes s'appuient sur des outils de détection de sensibilité et surtout de spécificité variable.

.2.2.2.1. Persistance du virus de l'hépatite B après « guérison » sérologique.

La présence du virus de l'hépatite B dans les PBMC a été retrouvée chez des patients ayant guéri d'une hépatite virale B aiguë ou après une séroconversion AgHBs-antiHBs au décours d'une hépatite chronique, confirmant le rôle important de ce réservoir dans les hépatites B [187, 518]. Le cccDNA y est certes plus rare que l'ADN du virus, mais un point intéressant est que le séquençage génomique de l'ADN du virus de l'hépatite B dans le sérum et les lymphocytes peut être différent, suggérant un rôle propre de l'ADN intra-lymphocytaire

(rôle réservoir) avec possibilité de réémergence dans certaines circonstances par exemple d'immunodépression. Il est à noter qu'aucun ADN intégré n'a été détecté dans les PBMC.

Dans un travail antérieur de notre équipe utilisant notre technique de PCR en temps réel maison [399], nous avons détecté l'ADNt du virus B dans les PBMC chez 3/8 patients AgHHBs- non coinfectés par le virus C (2/8 dans le sérum) et chez 5/10 patients infectés par le virus C (5/10 dans le sérum). Malheureusement nous n'avons pas pu mettre en évidence le cccDNA ni dans le sérum ni dans les PBMC, laissant suspecter une sensibilité insuffisante de notre technique PCR sur le cccDNA pour des quantités probablement infimes.

.2.2.2.2. Patients mono-infectés VHB

De nombreux exemples d'infections occultes chez les patients mono-infectés parsèment la littérature. C'est le cas par exemple des populations à risque comme les patients dialysés [519, 520], qui présentent un risque de réactivation virale accrue, de même que les patients diabétiques [521] ou les femmes enceintes [522]. Ces infections occultes ont été également décrites chez les donneurs de sang [523] et chez les personnes usagers de drogue [524].

Le cccDNA n'a à notre connaissance été recherché que dans une seule étude [525] ; il était retrouvé dans 47% des cas. Ce chiffre particulièrement élevé remettait en question la spécificité de la technique utilisée.

Dans le même travail antérieur de notre équipe cité antérieurement [399], nous avons démontré la présence d'ADNt dans les PBMC de ces patients mono-infectés dans 64,7% (11/17) des cas, alors qu'il n'était retrouvé que dans 5,9% (1/17) des cas dans le sérum. Nous n'avons cependant pas comme précédemment mis en évidence de cccDNA ni dans le sérum, ni dans les PBMC.

.2.2.2.3. Patients coinfectés VIH/et ou VHC avec le VHB

C'est dans ces populations que le cccDNA semble jouer un rôle particulièrement important. Nous déjà cité notre expérience d'un patient coinfecté porteur d'une hépatite B occulte avec deux génotypes et qui réactive avec le virus présent dans ses PBMC comme s'il était resté à l'abri du système immunitaire jusqu'à cette réactivation.

Chez les patients porteurs du VIH, en fonction des travaux, la prévalence d'infections occultes par le virus de l'hépatite B varie de moins d'un à 62 % [526-536]. L'étude la plus récente [537] a documenté la présence du VHB chez 5/43 patients coinfectés étudiés, non porteurs de l'AgHBs. Les facteurs prédisposant étaient d'une part une virémie faible, d'autre part la présence de mutations de l'AgHBs. Ces mutations étaient favorisées par une coinfection par le virus de l'hépatite C. Dans notre étude antérieure [184, 399], l'ADNt du VHB est retrouvé dans le sérum chez 45,5% des patients ayant une infection B occulte VHC- (10/22) et chez 41,7% des patients VHC+ (5/12) mais chez un seul patient dans les PBMC. Le cccDNA est retrouvé dans le sérum de 4/22 patients VHC- et 2/12 patients VHC+ ; Chez ces patients, il représente entre 79 et 100% de l'ADNt.

Dans les infections par le virus de l'hépatite C, la première description d'infection B occulte date de 1999 dans le *New England Journal of Medicine* [538]; elle rapportait la présence de virus de l'hépatite B chez 33 % des patients. La coinfection favorisait par ailleurs l'évolution vers la cirrhose et diminuait les chances de réussite d'un traitement par interféron. Ces résultats ont également été constatés dans une étude française, menée par l'équipe lyonnaise ; celle-ci soulignait de plus que la charge virale du VHC était plus élevée en cas d'infection occulte associée [539]. Cependant, deux travaux taiwanais [540] et brésilien [541] intéressant une population de même importance allaient à l'encontre de ces résultats, ne constatant pas de différence significative entre les patients porteurs d'une coinfection et ceux atteints seulement d'une hépatite virale C, que ce soit en terme d'évolution de la maladie (cirrhose ou hépatocarcinome) ou de réponse au traitement. Dans les suites d'une transplantation hépatique [542], une autre étude montrait que chez les patients porteurs du VHC et d'une infection occulte par VHB, le risque de fibrose n'était pas accéléré, par rapport aux patients mono-infectés par le VHC.

Plus récemment en 2004, par contre, une étude japonaise [543] établissait un risque accru de carcinome hépatocellulaire chez les patients VHC+ porteurs d'une infection B occulte.

Dans l'étude antérieure de notre équipe consacrée aux patients coinfectés VHC mais VIH-, nous avons mis en évidence de l'ADNt du VHC dans les PBMC chez 50 % des patients (12/24) mais du cccDNA chez aucun d'entre eux. Trois malades sur 24 seulement avaient de l'ADNt dans le sérum.

A partir de ces résultats, deux conclusions se dessinent malgré quelques études contradictoires. La première est l'importance du rôle joué par l'infection occulte par le virus de l'hépatite B chez les patients coinfecteds avec ses conséquences sur la gravité de la maladie et ses risques de résistance thérapeutique. La deuxième est le rôle réservoir majeur des PBMC dans cette population coinfectede, où vont résider l'ADN du virus de l'hépatite B et le cccDNA, agent potentiel de la réactivation alors que le sérum ne contient que rarement de l'ADN.

.2.2.2.4. Réactivation chez les patients porteurs d'anticorps antiHbc isolés ou avec des anticorps antiHBs.

Cet aspect du rôle du cccDNA dans les PBMC au cours des réactivations B chez des patients porteurs d'anticorps antiHBc isolés ou « guéris » (antiHbs+) n'a malheureusement pas été étudié dans la littérature et mérite toute notre attention comme source d'études futures.

Comme nous l'avons indiqué dans notre bibliographie, certaines situations précises où le système immunitaire est déficient (traitement immunosuppresseur ou cytotoxique, déficiences immunitaires comme l'infection par le HIV ou la présence de tumeurs malignes), il existe un risque de réactivation virale. Cette situation est classiquement décrite chez les patients porteurs asymptomatiques du virus de l'hépatite B.

Dans le cas des infections virales considérées comme occultes, elles ont surtout été étudiées chez les patients recevant une chimiothérapie [544-546]. Des rapports de cas concernent également d'autres traitements cytotoxiques [547] ou étant atteint de tumeurs malignes [548] ou par une infection HIV [549]. Malheureusement, même pour les patients devant recevoir une chimiothérapie, où la cohorte est nombreuse, aucune étude n'a inclus la recherche de cccDNA, notamment dans le compartiment des PBMC.

Toutefois aussi, après une hépatite aiguë, comme le laissent penser certains travaux [187, 550, 551], même après guérison sérologique et apparition d'anticorps antiHBs, le virus de l'hépatite B persiste, dans le foie ou dans les PBMC et de rares cas de réactivation ont été observés (cf. .2.2.2.1.). Des constats identiques ont été réalisés chez les patients porteurs d'une hépatite virale B chronique après clairance de l'AgHBs [552].

Ce rappel sur le rôle du PBMC dans les infections occultes nous amène au centre de notre discussion qui est la comparaison entre ces résultats et nos résultats sur une population très différente AgHBs+ et très virémique.

.2.2.3. Comparaison infections occultes Ag HBs- avec les patients AgHBs+.de notre étude

Notre travail s'est focalisé sur une population pratiquement non explorée dans la littérature et qui manifestement se comporte très différemment de la population avec infection occulte. La première recherche d'ADNt et de cccDNA dans les PBMC date de 1997 [502], où l'ARNm et le cccDNA avaient été retrouvé chez trois patients AgHBs+ virémiques.

Nos résultats actuels évalués sur une population prospective et évolutive sous traitement, restent parfaitement reproductibles, et cohérents avec l'étude rétrospective princeps réalisée par notre équipe sur une population test et sans suivi évolutif (thèse A non publiée).

Par ailleurs, nous avons la chance de disposer pour comparer les résultats de nos patients AgHBs+ prospectifs, de disposer en parallèle d'une population rétrospective d'hépatite B occultes étudiée avec les mêmes méthodes virologiques.

Nous pouvons ainsi conclure avec fiabilité que le comportement du virus de l'hépatite B diffère entre les populations AgHBs- et AgHBs+. Dans la population Ag HBs+, il est certes mis en évidence la présence de cccDNA dans les PBMC, mais sa présence est faible (lorsqu'elle est détectée), comme en témoigne son ratio avec l'ADN total. (environ 1% contre 10% en moyenne pour les patients sans Ag HBs).

Sous traitement, le cccDNA des PBMC des patients AgHBs+ se négative très rapidement et beaucoup plus tôt que la charge virale mesurée en parallèle (avant S12). Par ailleurs, avant traitement de nombreux prélèvements sont négatifs dans les PBMC mais aussi dans le sérum.

Notre explication la plus probable est, nous le répétons, plutôt une sensibilité insuffisante de la technique PCR pour le cccDNA que l'absence ou la disparition du cccDNA dans ce réservoir. La possibilité de bénéficier de nouvelles techniques de détection (RCA)

pourrait aider à répondre à cette interrogation [504]. Nous envisageons de tester nos échantillons avec le RCA.

Enfin, dans cette population, il semble que la charge virale dans les PBMC reflète les fluctuations de la charge virale sérique et il ne semble pas exister de seuil de virémie sérique pour détecter l'ADN total dans les lymphocytes.

Toutefois, certains patients comme notre patient n° 18 pourraient avoir des souches virales à comportement différent. Le patient n°18, AgHBs+, AgHBe- avec charge virale modérée, originaire d'une zone endémique (sans qu'aucune autre cause n'ait pu être déterminée) a une présentation différente des autres patients AgHBs+ de notre étude, dans la mesure où son ratio cccDNA/ADNt est proche de 10 %, ce qui est comparable aux patients porteurs d'infections occultes. L'une des pistes pour expliquer ce comportement est le mode de contamination, probablement très ancien, qui peut nous orienter vers un mélange de souches, ou une éventuelle réactivation. Malheureusement, nous ne disposons pas de l'histoire naturelle de sa maladie. Des explorations complémentaires (étude du génome viral dans les différents compartiments et dans le foie) sont nécessaires afin d'expliquer cette différence.

.3. Quelle utilisation clinique des données sur le cccDNA sérique et dans les PBMC dans la population AgHbs+ virémique ?

.3.1. Le cccDNA intra-lymphocytaire, n'est pas à ce jour un bon marqueur du suivi de l'infection virale B traitée.

Comme nous avons pu le voir, le cccDNA intra-lymphocytaire semble jouer un rôle chez le patient atteint d'hépatite B occulte. On peut toutefois s'interroger sur son rôle chez les patients traités.

Nos présents travaux, qui concernent la cinétique du cccDNA sous traitement montrent sa rapide disparition dans le sérum et les PBMC, même s'il persiste de l'ADN total dans ce compartiment comme dans le sérum. Ces résultats suggèrent l'absence d'intérêt de son dosage en pratique quotidienne, pour évaluer l'efficacité d'une thérapie. Il faut toutefois souligner que les résultats rapportés concernent une population peu nombreuse sur un temps

limité et que l'utilisation de techniques très récentes ultra-sensibles (RCA) pour détecter le cccDNA pourrait changer la donne.

Au total, l'ensemble de ces travaux suggère un effet réservoir du cccDNA intra-lymphocytaire, ne lui procurant qu'un rôle accessoire en cas d'infection active, mais une place prépondérante dans les autres situations, notamment si virus de l'hépatite B n'est pas détecté par les méthodes classiques. Ainsi, est-il intéressant de connaître les taux d'ADN du virus de l'hépatite B et plus particulièrement de sa forme super-enroulée dans les PBMC chez les patients considérés comme guéris virologiquement, et de les comparer aux taux d'ADN et de cccDNA intra-hépatiques.

.3.2. Le cccDNA sérique, facteur prédictif de l'évolution de la maladie virale comme reflet de la lyse cellulaire.

Une équipe chinoise [553] a suggéré le rôle prédictif de réactivation virale B du cccDNA sérique, en retrouvant une corrélation entre cccDNA sérique cytolysé et charge virale. Dans cette étude, les auteurs ont dosé et différencié l'ADN total du virus de l'hépatite B et le cccDNA dans le sérum et le foie de patients porteurs d'une hépatite B par une technique de PCR en temps réel très sensible. Le cccDNA était présent dans tous les prélèvements biopsiques et le rapport HBVDNA/cccdNA très variable de 1 à 3406. Le ratio cccDNA sérique sur HBVDNA variait de 0 à 1.77%. Une étude longitudinale a montré que le cccDNA était détecté dans le sérum des patients en réactivation, ce qui n'était pas le cas dans la situation contraire. Le niveau de cccDNA dans le sérum était ainsi corrélé avec l'ALAT et la charge virale chez les patients en réactivation.

Dans notre étude toutefois, même si on constate un taux plus élevé d'ALAT chez les patients porteurs de cccDNA dans le sérum ou les PBMC, on ne peut établir de corrélation statistiquement significative entre ces données ; de plus, l'absence de modification des taux des gènes de l'albumine chez ces patients ne va pas dans le sens d'une lyse cellulaire.

Les résultats obtenus par l'équipe de Chen comme les nôtres sont à prendre avec prudence étant donné la faiblesse des échantillons (10 malades pour Chen et 16 dans notre étude).

.3.3.Lien entre Ag HBs sérique et cccDNA sérique ou lymphocytaire.

Il n'apparaît pas clairement de variation nette du taux d'AgHBs au cours du traitement dans notre étude sur une période de six mois. Il n'est pas établi par ailleurs de corrélation avec les taux de cccDNA, notamment intra-lymphocytaire.

L'Ag HBs est un marqueur en plein développement d'évaluation des patients traités et serait un bon reflet du cccDNA intra-hépatique. Sa baisse serait prédictive de fortes chances de guérison virologique.

Déjà, en 2005, Kohmoto et al. [554] avaient montré un intérêt du dosage l'antigène HBs dans la surveillance de patients traités par la lamivudine. Il apparaissait ainsi une décroissance du taux d'antigène HBs plus lente que celle de l'ADN du VHB, mais également une réascension en cas d'émergence de résistance, qui annonçait l'échappement biochimique. Dans cette étude, les valeurs de l'AgHBs étaient plus élevées chez les patients AgHBe+ que chez les patients AgHBe-. Le travail d'une équipe chinoise [555] intéressant une cohorte de vingt-six patients traités durant deux ans par lamivudine, dont trente-deux semaines associée à l'interféron pégylé, décrivait une baisse significative du taux sanguin d'AgHBs. Celle-ci était par ailleurs corrélée à la décroissance du taux de cccDNA intra-hépatique ($r=0,68$; $p<0,001$) et la diminution du taux de l'ADN intra-hépatique du virus de l'hépatite B ($r=0,65$; $p<0,001$). Un taux d'AgHBs pré-thérapeutique inférieur à 10 000 UI/mL avait une spécificité, une sensibilité et des valeurs prédictives positive et négative de réponse soutenue respectivement de 86%, 56%, 43%, et 92%.

L'absence de corrélation dans notre étude entre le cccDNA lymphocytaire et l'Ag HBs initial peut relever de plusieurs explications :

- d'abord la quantité très faible de cccDNA dans les lymphocytes chez les patients AgHBs et donc la trop faible sensibilité de notre technique PCR pour le cccDNA, (de nombreux prélèvements étant négatifs) ;
- la faiblesse de l'échantillon de patients ;
- il n'est pas possible d'exclure non plus de vrais négatifs du cccDNA lymphocytaire ce qui validerait l'absence de lien entre le cccDNA lymphocytaire, l'AgHbs et donc en conséquence le cccDNA intra-hépatique.

Enfin, il est impossible de chercher un lien évolutif avec l'AgHBs sur les six mois de notre étude, temps trop court pour juger d'une baisse de l'AgHBs dont la cinétique de décroissance est lente.

.4. Conclusions et perspectives.

Nos travaux et ceux de la littérature suggèrent un effet réservoir du cccDNA intra-lymphocytaire ou sérique. Ce rôle est clairement démontré dans les infections occultes chez les patients coinfectés. Il est probable dans le cas des réactivations après immunodépression ou dans les récurrences post-transplantation hépatique ; il reste cependant à démontrer dans ces circonstances.

Le rôle qui lui est attribuable dans l'infection B active semble plus accessoire ; notre travail est le premier à notre connaissance dans la littérature à s'intéresser à l'évolution du cccDNA dans le sérum et dans les PBMC, parallèlement à l'ADN total sérique et lymphocytaire chez des patients AgHBs+ virémiques avant et sous traitement. La quantité de cccDNA et la fréquence de sa positivité chez ces patients est faible, suggérant un rôle accessoire en cas d'infection active. Cependant, l'absence de détection (survenant avant S12) du cccDNA au cours du traitement nous semble être plutôt un faux négatif lié au manque de sensibilité de la technique PCR pour le cccDNA dans un groupe de patients où le cccDNA représente un % très faible de l'ADN total (<1%). Cet outil ne sera pas utilisable dans l'état actuel de sensibilité des techniques pour surveiller l'éradication virale au cours de la thérapeutique, et l'AgHBs, marqueur non invasif, semble actuellement l'outil le plus accessible et le plus fiable pour prédire la guérison virologique. Le cccDNA intra-hépatique dont la disparition reste la référence de la guérison, est bien corrélé à la concentration en AgHBs, mais difficilement utilisable en pratique, car sa réalisation nécessiterait la répétition de biopsies hépatiques, actes invasifs, ce qui n'est pas envisageable. Cependant comme nous l'avons suggéré dans les perspectives d'amélioration des outils virologiques, des techniques comme le RCA pourrait rendre accessible le suivi du cccDNA sérique et lymphocytaire.

Notre expérience nous a permis de comparer avec la même technique de PCR robuste et éprouvée cette population AgHBs+ virémique avec une population AgHBs- coinfectée ou non avec le virus de l'hépatite C et/ou le virus VIH (population étudiée dans un travail précédent). Dans cette population peu ou pas virémique, l'ADNt est présent essentiellement

dans les PBMC chez les patients anti-HBc isolés ou coinfectés par le VHC+ alors que le cccDNA peut représenter jusqu'à 100% de l'ADNt sérique chez les patients VIH+.

Le cccDNA explique vraisemblablement les phénomènes de réactivation spontanée ou induite par l'immunodépression chez ces patients comme nous l'avons documenté par les exemples dans les modèles animaux et chez l'homme.

Nos perspectives de travail sont ainsi de poursuivre le suivi virologique au-delà du sixième mois dans la population de l'étude et voir si la survenue de réactivation notamment induite par les mutations aux antiviraux peut s'accompagner d'une réapparition du cccDNA dans le sérum et les PBMC, de suivre les patients « guéris » selon les définitions données dans le protocole.

Par ailleurs, l'utilisation de la technique RCA décrite il y a quelques mois pourrait permettre d'affiner nos résultats.

D'autres populations non explorées jusqu'à maintenant dans les PBMC nous paraissent également très intéressantes : patients transplantés hépatiques, patients non virémiques AgHBs- avec ou sans anticorps antiHBs (« patients guéris »).

Ainsi, notre travail n'est-il qu'un point de départ vers de nouvelles perspectives de recherche, tant sur le plan de l'affinement des techniques de biologie moléculaire que sur leur application dans d'autres populations porteuses du virus de l'hépatite B non encore étudiées dans le sérum et les cellules mononucléées.

RERFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- .1. Payen J.L. : De la jaunisse à l'hépatite C : 5000 ans d'histoire. *E.D.K. éditions*, Paris. 2002.
- .2. Thorwald W. : Histoire de la médecine dans l'antiquité. *Dromersche Verlagsanstalt*, Munich. 1962.
- .3. Gonzales J. : Initiation à l'histoire de la médecine. *Editions Heures de France*, Thoiry. 1997.
- .4. Meunier L. : Histoire de la médecine. Depuis ses origines jusqu'à nos jours. *Librairie Baillères et fils*, Paris. 1911.
- .5. Hippocrate. Hippocrate et l'art médical. *Librairie générale française*, Paris. 1994.
- .6. Galien. Galien, épitomé en quatre parties. *Unions latines d'éditions*, Paris. 1962.
- .7. Daremberg C., Ruelle C.. Oeuvres de Rufus d'Ephèse. *Imprimerie nationale*, Paris. 1879.
- .8. Dieulafoy G.. Manuel de pathologie interne. 11^{ème} édition. *Masson et Cie*, Paris. 1898.
- .9. Lürman A.. Eine icterusepidemie. *Berliner Klinisch Wochenschrift*. 1885; 22: 20-7.
- .10. Levaditi C., Lepine P.. Les ultravirus des maladies humaines, 2^{ème} édition. Maloine, Paris. 1948.
- .11. Havens W.. Properties of the etiological agent of infectious hepatitis. *Proc. Soc. Experimental Biol. Med.*. 1945; 58: 203-4.
- .12. Mac Callum.. Homologous serum hepatitis. *Lancet*. 1945 ; 2 : 691-2.
- .13. Blumberg BS.. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science*. 1977; 197: 17-25.
- .14. Dane D., Cameron CN., Briggs M.. Virus-like particles in serum of patients with australia antigen associated virus. *Lancet*. 1970 ; 1 : 695-8.
- .15. Magnius L., Epsmark J.. New specificities in australia antigen positive sera distct from "Le Bouvier" determinants. *J.Immunol.*. 1972 ; 109 : 1017-21.
- .16. Maupas P., Goudeau A., Coursaget P., Drucker J., Bagros P., Baudin S.. La vaccination contre l'hépatite B chez l'homme. *Revue de médecine de Toulouse*. 1976 ; n° spécial II : 1975-1980.
- .17. Maupas P., Coursaget P., Goudeau A., et al.. La vaccination contre l'hépatite B chez l'homme. *Bull. Acad. Nat. Med.*. 1976 ; 160 : 461-470.
- .18. Maupas P., Goudeau A., Coursaget P. et al.. Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet*. 1976 ; 1 : 1367-70.
- .19. Maupas P., Chiron JP., Barin F., Coursaget P., Goudeau A., Perrin J. et al.. Efficacy of hepatitis B vaccine in prevention in early HBs Ag carrier state in children-controlled trial in an endemic area (Senegal). *Lancet*. 1981, i : 289-282.
- .20. Maiga I., Venard V., Muller C., Le Faou A. : Evolution du virus de l'hépatite B. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*. 2003, 18 :281-286.
- .21. Robertson BH., Margolis HS. : Primate hepatitis B viruses-genetic diversity, geography and evolution. *Rev. Med. Virol.*. 2004, 12: 133-141.
- .22. Kidd-Ljunggren K., Miyakawa Y., Kidd AH.: Genetic variability in hepatitis B viruses. *J. Gen. Virol.*. 2002, 83: 1267-1280.
- .23. Ganem D.: *Hepadnaviridae* and their replication. In *Field's virology*. Third edition. Edited by Fields BN., Knipe DM., Howley P. Philadelphia: Lippcott-Raven; 1996: 2738-2807.

- .24. Kann M., Gerlich W.: Structure and molecular Virology. In *Viral Hepatitis*. Volume Section III: Hepadnaviridae. Second Edition. Edited by Zuckerman AR., Thomas HC.. London: Churchill Livingstone; 1998: 77-99.
- .25. Ljunggren J.. *Gen. Virol.* 2002, 83 : 1267-1280.
- .26. Zoulim F., Kay A., Merle P., Trépo C.: Virologie de l'hépatite B. *EMC* (Elsevier SAS, Paris), Hépatologie, 7-015-B-30, 2006.
- .27. 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.
- .28. 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.
- .29. Duclos-Vallée 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.
- .30. 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.
- .31. 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.
- .32. Neurath AR., Kent SB., Strick N., Parker K.: Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding on hepatitis B virus. *Cell*. 1986, 46: 429-436.
- .33. Paran N., Geiger B., Shaul Y.: HBV Infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *Embo. J.* 2001, 20: 4443-4453.
- .34. Chang C., Zhou S., Standing DN. : Phenotypic mixing between different hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cis preferential. *J.Virol.* 1994, 68:5225-5231.
- .35. Seifer M., Zhou S., Standing DN. : A micromolecular 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.
- .36. Gallina A., Bonelli F., Zentilin L., Rindi G., Muttini M., Milanesi 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.
- .37. Nassal M. The arginin-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.
- .38. 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.
- .39. 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.
- .40. Millich 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.
- .41. Millich DR., Jones JE., Hughes JL., Price J., Raney AK., MacLachlan A.. Is a function of the secreted hepatitis B antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, 87: 6599-6603.
- .42. Denis F., Thibault V., Alain S.. *Hepadnaviridae*. Virus de l'hépatite B (HBV). In *Virologie humaine*. Edited by Hureauux JM., Nicolas JC., Agut H., Peigue-Lafeuille H.. ESTEM, Paris. 2003: 293-306.

- .43. Radziwill G., Tucker W., Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNaseH activity. *J. Virol.* 1990 ; 64 : 613-620.
- .44. Stuyver LJ., Locarnini SA., Lok A., Richman DD., Carman WF., Dienstag JL., et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology.* 2001 ; 33 : 751-757.
- .45. Sirma H., Weil R., Rosmodure O., Urban S., Israek 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.
- .46. Block TM., Mehta AS., Fimmel CJ., Jordan R.. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2003, 22: 5093-5107.
- .47. Soussan P., Garreau F., Brechot C., Kremsdorf D.. Une nouvelle protéine du virus de l'hépatite B. *Médecine/Sciences.* 2000, 16 : 855-857.
- .48. Seeger C., Summers J., Mason WS.. Viral DNA synthesis *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1991, 168 : 41-59
- .49. Seeger C., Mason W.. Hepadnavirus replication and approaches to antiviral therapy. *Virus strategies Berlin: VCH.* 1993, 77-93
- .50. Kuroki K., Eng F., Ishikawa T., Turck C., Harada F., Ganem D.. gp180, a host cell glycoprotein that blinds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 15022-15028.
- .51. Urban S., Kruse S., 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.
- .52. 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 (Pt3): 637-639.
- .53. 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.
- .54. 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.
- .55. Mason WS., Halpern MS., England JM., Seal G., Egan J., Coates L., Aldrich C., Summers J.. Experimental transmission of duck hepatitis B virus infection. *Virology.* 1983, 131: 375-384.
- .56. 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.
- .57. 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.
- .58. Schaller H., Fischer M.. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression Current topics in microbiology and immunology. Hepadnaviruses. *Molecular biology and pathogenesis.* Springer-Verlag, Berlin. 1991, 41-60.
- .59. Moola N., Kew M., Arbuthnot P.. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J. Virol. Hepat.* 2002, 9: 323-331.
- .60. Wang GH., Zoulim F., Leber E., Kitson J., Seeger C.. The role of RNA in enzymatic activity of the reverse transcriptase of hepatitis B viruses. *J. Virol.* 1994 , 68 : 8437-8442.
- .61. Hu J., Seeger C.. Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1996, 93 : 1060-1064.

- .62. Hu J., Toft D., Seeger C.. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J.* 1997, 16 : 59-68.
- .63. Bartenschlager R., Junker-Niepmann M., Schaller H.. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* 1990, 64 : 5324-5332.
- .64. Pollack JR., Ganem D.. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* 1993, 67: 3254-3263.
- .65. 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.
- .66. Wang G.H., Seeger C.. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell.* 1992, 71 : 633-670.
- .67. Seeger C., Ganem D., Varmus HE.. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science.* 1986, 232 : 477-484.
- .68. 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.
- .69. 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.
- .70. 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.
- .71. Yang W., Summers J.. Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination. *J. Virol.* 1995, 69: 4029-2036.
- .72. Lenhoff RJ., Luscombe CA., Summers J.: Competition in vivo between a cytopathi variant and a wild-type duck hepatitis B virus. *Virology.* 1998, 251: 85-95.
- .73. Summers J., Smith PM., Horwich AL.. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J. Virol.* 1990, 64: 2819-2824.
- .74. Luscombe C., Pedersen J., Uren E., Locarnini S.. Long-term ganciclovir chemotherapy for congenital duck hepatitis B virus infection in vivo: effect on intra-hepatic-viral DNA, RNA, and protein expression. *Hepatology.* 1996, 24: 766-773.
- .75. 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.
- .76. 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.
- .77. 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.
- .78. Tuttleman J., Pourcel C., Summers J.. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus infected cells. *Cell.* 1986, 47 : 451-460.
- .79. Ganem D., Prince AM.. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N. Eng. J. Med.* 2004, 350: 1118-1129.
- .80. Wagner A., Denis F., Ranger-Rogez S., Loustaud-Ratti V., Alain S.. Génotypes du virus de l'hépatite B. *Imm. Bio.* 2004, 19 : 330-42.

- .81. Halfon P., Pol S., Bourlière M., Cacoub P. Les génotypes du virus de l'hépatite B : implications cliniques, épidémiologiques et thérapeutiques. *Gastroenterol. Clin. Biol.*. 2002, 26: 1005-1012.
- .82. Pawlotsky JM.. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J. Clin. Virol.*. 2005, 34 Suppl. 1 : S125-129.
- .83. 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.
- .84. 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 .
- .85. 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.
- .86. 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.
- .87. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo RI., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi W.. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.*. 1988, 69 (Pt 10): 2575-2583.
- .88. Norder H., Courouce AM., Coursaget P., Echevarria JM., Lee SD., Mushahwar IK., et al.; Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HB(s)Ag subtypes. *Intervirology*. 2004, 47 : 289-309.
- .89. 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.
- .90. 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 (Pt8) : 2059-2073.
- .91. Schaefer S.. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J. Viral Hepat.*. 2005, 12: 111-124.
- .92. 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.
- .93. Bartholomeusz A., Schaefer S.. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev. Med. Virol.*. 2004, 14(1): 3-16.
- .94. Miyakawa Y., Mizokami M.. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology*. 2003, 46(6) : 329-38.
- .95. 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.
- .96. 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.
- .97. 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.
- .98. Lok AS., MacMahon BJ.. AASLD Guidelines : chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007, 507-536.
- .99. 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.

- .100. Liu CJ., Kao JH., Chen DS.. Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. *Liver Int.* 2005, 25: 1097-1107.
- .101. 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.
- .102. Pichoud C., Seignères B., Wang Z., Trepo C., Zoulim F.. Transient selection of a hepatitis B virus polymerase gene mutant associated with a decreased replication capacity and famciclovir resistance. *Hepatology.* 1999, 29 : 230-237.
- .103. Westland C., Delaney WT., Yang H., Chen SS., Marcellin P., Hadziyannis S., et al.. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology.* 2003, 125 : 107-116 .
- .104. François 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.
- .105. Tong SP., Li JS., Vivitski 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.
- .106. Carman WF., Trautwein C., van Deursen FJ., Colman K., Dornan E., McIntyre G., Walters 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.
- .107. Protzer-Knolle U., Naumann U., Bartenschlager R., Berg T., Hopf U., Meyer zum Buschenfelde KH., Neuhaus P., Gerken G.. Hepatitis B virus with antigenetically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. *Hepatology.* 1998, 27: 254-263.
- .108. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., et al.. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet.* 1990, 336 : 325-329.
- .109. Weber B.. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005, 32: 102-112.
- .110. 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.
- .111. Tuttleman JS., Pugh JC., Summers JW.. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J. Virol.* 1986, 58 : 17-25.
- .112. Gripon P., Diot C., Theze N., Fourel I., Loreal O., Brechot C., et al.. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Virol.* 1988, 62 : 4136-4143.
- .113. Aldrich CE., Coates L., Wu TT., Newbold J., Tennant BC., Summers J., et al.. In vitro infection of woodchuck hepatocytes with woodchuck hepatitis virus and ground squirrel hepatitis virus. *Virology* 1989, 172 : 247-252.
- .114. Gripon P., Rumin S., Urban S., Le Seyec J., Glaise D., Cannie I., et al.. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99 : 15655-15660.
- .115. Pichoud C., Seignères B., Wang Z., Trepo C., Zoulim F.. Transient selection of a hepatitis B virus polymerase gene mutant associated with a decreased replication capacity and famciclovir resistance. *Hepatology.* 1999, 29 : 230-237.
- .116. Seignerés B., Martin P., Werle B., Schorr O., Jamard C., Rimsky L., et al.. Effects of pyrimidine and purine analog combinations in the duck hepatitis B virus infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47 : 1842-1852.

- .117. Seigneres B., Pichoud C., Ahmed SS., Hantz O., Trepo C., Zoulim F.. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene sequence during famciclovir therapy for chronic hepatitis B. *J. Infect. Dis.* 2000, 181 : 1221-1233.
- .118. Villeneuve JP., Durantel D., Durantel S., Westland C., Xiong S., Brosgart CL., et al.. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J. Hepatol.* 2003, 39 : 1085-1089.
- .119. Petersen J., Dandri M., Gupta S., Rogler CE.. Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95 : 310-315.
- .120. Cavanaugh V.J., Guidotti L., Chisari FV.. Interleukine-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* 1997, 71 : 3236-3243.
- .121. Chisari F.. Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology.* 1995, 22 : 1316-1325.
- .122. Guidotti LG., Borrow P., Brown A., McClary H., Koch R., Chisari FV.. Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. *J. Exp. Med.* 1999, 189 : 1555-1564.
- .123. Guidotti LG., Morris A., Mendez H., Koch R., Silverman RH., Williams BR., et al.. Interferon-regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* 2002, 76 : 2617-2621.
- .124. Mason W.S., Seal G., Summers J.. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 1980, 36 : 829-836.
- .125. Fourel I., Cullen JM., Saputelli J., Aldrich CE., Schaffer P., Averett DR., et al.. Evidence that hepatocyte turnover is required for rapid clearance of duck hepatitis B virus during antiviral therapy of chronically infected ducks. *J. Virol.* 1994, 68 : 8321-8330.
- .126. Rollier C., Sunyach C., Barraud L., Madani N., Jamard C., Trepo C., et al.. Protective and therapeutic effect of DNA-based immunization against hepadnavirus large envelope protein. *Gastroenterology.* 1999, 116 : 658-665.
- .127. Rollier C., Charollos C., Jamard C., Trepo C., Cova L.. Maternally transferred antibodies from DNA-immunized avians protect offspring against hepadnavirus infection. *J. Virol.* 2000, 74 : 4908-4911.
- .128. Le Guerhier F., Thermet A., Guerret S., Chevallier M., Jamard C., Gibbs C.S., et al.. Antiviral effect of adefovir in combination with a DNA vaccine in the duck hepatitis B virus infection model. *J. Hepatol.* 2003, 38 : 328-334.
- .129. Summers J., Smolec JM., Snyder R.. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1978, 75: 4533-4537.
- .130. Fourel G., Trepo C., Bougueleret L., Henglein B., Ponzetto A., Tiollais P., et al.. Frequent activation of N-myc genes by hepadnavirus insertion in woodchuck liver tumors. *Nature.* 1990, 347 : 294-298.
- .131. Le Guerhier F., Pichoud C., Jamard C., Guerret S., Chevallier M., Peyrol S., et al.. Antiviral activity of beta-L-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluorocytidine in woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45 : 1065-1077.
- .132. Summers J., Jilbert AR., Yang W., Aldrich CE., Saputelli J., Litwin S., et al.. Hepatocyte turnover during resolution of a transient hepadnaviral infection. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100 : 11652-11659.
- .133. Guo JT., Zhou H., Liu C., Aldrich C., Saputelli J., Whitaker T., et al.. Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections. *J. Virol.* 2000, 74 : 1495-1505[In Process Citation].
- .134. Chin J.. Control of communicable diseases manuel. *APHA*, Washington D.C.. 2000: 243-251.

- .135. Lee WM.. Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1997, 337 : 1733-1745.
- .136. Hepatitis B vaccines. *WHO web site*.
- .137. Childhood diseases in Africa. *WHO web site*.
- .138. Mahoney FJ., Kane M.. Hepatitis B vaccine. *Saunders*, Philadelphia. 1999.
- .139. Lok AS., Heathcote EJ., Hoofnagle JH.. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology*. 2001, 120 : 1828-1853.
- .140. Chang MH., Chen CJ., Lai MS., Hsu HM., Wu TC., Kong MS., et al.. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N. Engl. J. Med.* 1997, 336 : 1855-1859.
- .141. Stroffolini T., Mele A., Tosti ME., Gallo G., Balocchini E., Ragni P., et al.. The impact of the hepatitis B mass immunisation campaign on the incidence and risk factors of acute hepatitis B in Italy. *J. Hepatol.* 2000, 33 : 980-985.
- .142. Antona D., Delarocque-Astagneau E., Lévy-Bruhl D.. Déclaration obligatoire des hépatites aiguës : résultats de la première année de surveillance , France, 1^{er} mars 2003-1^{er} mars 2004. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 2005, 31 : 157-160.
- .143. 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 en France métropolitaine. www.invs.gouv.fr.
- .144. Ranger S., Mounier M., Denis F., Alain J., Baudet JH., Tabaste JL. et al.. Prévalence des marqueurs des virus de l'hépatite B et delta chez près de 10 000 femmes enceintes à Limoges (France). *Path. Biol.* 1990, 38 : 364-699.
- .145. www.sante.gouv.fr/htm/actu/hepatites/situation.htm
- .146. Denis F., Tabaste JL., Ranger-Rogez S.. Prévalence de l'AgHBs chez 21 478 femmes enceintes. Enquête de 12 CHU français. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 1994, 12 :53-4.
- .147. Denis F., Berges P., Chastagner M., Delpyroux C.. Dépistage de l'AgHBs chez les femmes enceintes. Quel taux de couverture ? Enquête en Haute-Vienne ? 1999. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 2003, 33 :157-8.
- .148. Denis F., Ranger-Rogez S., Mounier M., Carcenac G., Delpyroux C., Tabaste JL. et al.. Screening of pregnant women for hepatitis B markers in french provincial university hospital (Limoges) during fifteen years. *Eur. J. Epidemiol.* 2004.
- .149. Gust ID.. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. *Gut*. 1996, 38 Suppl. 2 : S 18-23.
- .150. Lok AS.. Chronic hepatitis B. *N. Eng. J. Med.* 2002, 346 : 1682-1683.
- .151. Schummis GA., Zicker F., Cruz JR., Cuchi P.. Safety of blod supply for infetious diseases in Latin American countries, 1994-1997. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001, 65 : 924-930.
- .152. Bouvet E.. Transmission nosocomiale de l'hépatite B. *Med. Mal. Infect.* 2003, 33 (suppl. A) : 42-45.
- .153. Schapiro CN.. Epidemiology of hepatitis B. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1993, 1 : 433-437.
- .154. Antona D.. L'hépatite B en France : aspects épidémiologiques et stratégies vaccinales. *FMC-HGE*, post-u' 2006.
- .155. www.sante.gouv.fr/htm/actu/hepatites/situation.htm
- .156. 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.

- .157. Hadziyannis SJ. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B : from clinical recognition to pathogenesis and treatment. *Viral Hepat. Rev.* 1995, 1 : 7-36.
- .158. 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 : 503-516.
- .159. 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.
- .160. Rehmann 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.
- .161. 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.
- .162. Guo JT., Zhou H., Liu C., Aldrich CE., Saputelli J., Whitaker T., et al.. Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections. *J. Virol.* 2000, 74 : 1495-1505.
- .163. Guidotti LG., Rochford R., Chung J., Shapiro M., Purcell R., Chisari FV.. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*. 1999, 284 : 825-829.
- .164. Tsui LV., Guidotti LG., 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.
- .165. Wieland SF., Guidotti LG., Chisari FV.. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing cpsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Virol.* 200, 74 : 4165-4173.
- .166. Summers J., Jilbert AR., Yang W., Aldrich CE., Saputelli J., Litwin S., et al.. Hepatocyte turnover during resolution of a transient hepadnaviral infection. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2003 ; 100 : 11652-11659.
- .167. Lok AS.. Hepatitis B infection : pathogenesis and management. *J. Hepatol.* 200, 32 : 89-97.
- .168. Chisari FV., Ferrari C.. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann. Rev. Immunol.* 1995, 13 : 29-60.
- .169. Hyams KC.. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection : a review. *Clin. Infect. Dis.* 1995, 20 : 992-1000.
- .170. Ranger-Rogez S., Alain S., Denis F.. Hepatitis viruses : mother to child transmission. *Pathol. Biol. Paris*. 2002, 50 : 568-575.
- .171. McMahon BJ., Alward WL., Hall DB., Heyward WL., Bender TL., 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.
- .172. Chang MH.. Natural history of hepatitis B virus infection in children. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000, 15. Suppl. : E16-19.
- .173. Lee WM.. Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1997, 337 : 1733-1745.
- .174. Lok AS.. Clinical manifestations and natural history of hepatitis B virus infection. Wellesley, U.A.. *UpToDate*. 2000.
- .175. Millich 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.

- .176. Beath SV., Boxall EH., Watson RM., Tarlow MJ., Kelly DA.. Fulminant hepatitis B in infants born to anti-HBe hepatitis B carriers mothers. *Bmj.* 1992, 304 : 1169-1170.
- .177. Kosaka Y., Takase K., Kojima M., Shimuzu M., Inoue K., Yoshiba 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.
- .178. Forster 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, 100 : 1087-1094.
- .179. 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.
- .180. 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.
- .181. Bertoletti 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.
- .182. 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 infections. *J. Clin. Invest.* 1995, 96 : 1527-1534.
- .183. Yoffe B., Burns BJ., Bhatt HS., Combes B.. Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences variation in patients with acute hepatitis B infection. *Hepatology.* 1990, 12 : 187-192.
- .184. Mazet-Wagner AA., Baclet AM., Loustaud-Ratti V., Denis F., Alain S.. Real-time PCR quantification of hepatitis B virus total and covalently closed circular DNA in peripheric blood mononuclear cells from hepatitis B virus-infected patients. *J. Virol.* 2006, 138 : 70-79.
- .185. Murakami Y., Minami M., Daimon Y., Okanou T.. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheric blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J. Med. Virol.* 2004, 72 : 203-214.
- .186. 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.
- .187. Torii N., Hasegawa K., Joh R., Hayashi N.. Configurations and replication competence of hepatitis B virus DNA in peripheric blood mononuclear cells from chronic hepatitis B patients and patients who have recovered from acute self-limited hepatitis. *Hepatol. Res.* 2003, 25 : 234-243.
- .188. 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.
- .189. Roche B., Feray C., Gigou M., Roque-Alfonso AM., Arulnaden JL., Delvart V., Dussaix E., Guettier C., Bismuth H., Samuel S.. HBV DNA persistence 10 years after liver transplantation despite successful anti-HBs passive immunoprophylaxis. *Hepatology.* 2003, 38 : 86-95.
- .190. 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.
- .191. 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.
- .192. Lok AS., McMahon BJ.. Chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2001, 34 : 1225-1241.

- .193. Lok AS., Heathcote EJ., Hoofnagle JH.. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology*. 2001, 120 : 1828-1853.
- .194. Lok AS., Lai CL., Wu PC., Leung EK., Lam TS.. Spontaneous hepatitis e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 1987, 92 : 1839-1843.
- .195. 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.
- .196. 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.
- .197. 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.
- .198. Davis GL., Hoofnagle JH., Waggoner JG.. Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 1984, 86 : 230-235.
- .199. 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.
- .200. Fattovich G., Giustina G., Schalm SW., Hadziyannis S., Sanche-Tapias J.K., 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.
- .201. Chen CJ., Yang HI., Su J., Jen CL., You SL., Lu SN., Huang GT., Iloeje UH., for the REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006, 295 : 65-73.
- .202. Iloeje UH., Yang HI., Su J., Jen CL., You SL., Chen CJ.; Risk Evaluation of Viral Load Elevation and Associated Liver Disease/Cancer-In HBV (the REVEAL-HBV) Study Group. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology*. 2006, 130(3) : 678-86.
- .203. Beasley RP.. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1988, 61 : 1942-1956.
- .204. McMahon BJ., Alberts SR., Wainwright RB., Bulkow L., Laneir AP.. Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 patients hepatitis B surface antigen-positive Alaska native-carriers. *Arch. Intern. Med.* 1990, 150 : 1051-1054.
- .205. 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.
- .206. 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 on cirrhosis. A prospective study. *Cancer*. 1994, 74 : 2442-2448.
- .207. Tsai JF., Jeng JE., Ho MS., Chang MY., Hsieh MY., Lin ZY., Tsai JH.. Effect of hepatitis B and C virus infection on risk of hepatocellular carcinoma : a prospective study. *Br. J. Cancer*. 1997, 76 : 968-974.
- .208. Feitelson MA.. Hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *J. Cell. Physiol.* 1999, 181 : 1888-202.
- .209. 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.

- .210. Yeh CT.. Hepatitis B virus X protein : searching for a role in hepatocarcinogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000, 15 : 339-341.
- .211. Tai PC., Suk FM., Gerlich WH., Neurath AR., Shih C.. Hypermodification and immune escapen of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. *Virology.* 2002, 292 : 44-58.
- .212. 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 endoplasmoc reticulum. *J. Virol.* 1997, 71 : 7387-7392.
- .213. Block TM., Mehta AS., Fimmel CJ., Jordan R.. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2003, 22(33) : 5093-107.
- .214. O'Grady JG., Schalm SW., Williams R.. Acute liver failure : redefining the syndromes. *Lancet.* 1993, 342(8866):273-5.
- .215. Liang T., Hasegawa K., Rimon N., Wands J., Ben-Porath E.. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 1991, 324 : 1705-1709.
- .216. Omata M., Ehata T., Yokosuka O., Hosoda K., Ohto M.. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 1991, 324 : 1699-1704.
- .217. Sternbeck M., Günther S., Santantonio T., Fischer L., Broelsch C.E., Greten H., et al.. Hepatitis B virus genomes of patients with fulminant hepatitis do not share a specific mutation. *J. Virol.* 1996, 24 : 300-306.
- .218. Stuyver L., De Gendt S., Cadranel JF., Van Geyt C., Van Reybroeck G., Dorent R., et al.. Three cases of severe subfulminant hepatitis in heart-transplanted patients after nosocomial transmission of a mutant hepatitis B virus. *Hepatology.* 1999, 29 : 1876-1883.
- .219. Tong S., Li J., Vivitski L., Trépo C.. Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an inactive pre-C region. *Virology.* 1990, 176 : 596-603.
- .220. Tong SP., Diot C., Gripon P., Li J., Vitvitski L., Trepo C., et al.. In vitro replication competence of a cloned hepatitis B virus variant with a nonsense mutation in the distal pre-C region. *Virology.* 1991, 181 : 733-737.
- .221. Tong SP., Li JS., Vitvitski L., Trepo C.. Replication capacities of natural and artificial precore stop codon mutants of hepatitis B virus: relevance of pregenome encapsidation signal. *Virology.* 1992, 191 : 237-245.
- .222. Scaglioni PP., Melegari M., Wands JR.. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. *J. Virol.* 1997, 71 : 345-353.
- .223. Scaglioni PP., Melegari M., Wands JR.. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997, 233 : 374-381.
- .224. Brunetto M., Oliveri F., Rocca G., Criscuolo D., Chiaberge E., Capalbo M., et al.. Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. *Hepatology.* 1989, 10 : 198-202.
- .225. Brunetto M., Giarin M., Oliveri F., Chiaberge E., Baldi M., Alfarano A., et al.. Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991, 88 : 4186-4190.
- .226. Brunetto MR., Oliveri F., Coco B., Leandro G., Colombatto P., Gorin JM., et al.. 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.
- .227. Zarski JP. et al.. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2004, 28 : A23.
- .228. Davis GL., Hoofnagle JH., Waggoner JG.. Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 1984, 86 : 230-235.

- .229. Lau GK., Liang R., Chiu EK., Lee CK., Lam SK.. Hepatic events after bone marrow transplantation in patients with hepatitis B infection: a case controlled study *Bone Marrow Transplant.* 1997, 19 : 795-799.
- .230. Trepo C., Thivolet J.. Hepatitis associated antigen and periarteritis nodosa (PAN) *Vox Sang.* 1970, 19 : 410-411.
- .231. Trepo C., Ouzan D., Delmont J., Tremisi J.. Superiority of a new etiopathogenic treatment curing periarteritis nodosa caused by hepatitis B virus, using a combination of brief corticotherapy, vidarabine and plasma exchange. *Presse Med.* 1988, 17 : 1527-1531.
- .232. Wartelle-Bladou C., Lafon J., Trepo C., Pichoud C., Picon M., Pellissier JF., et al.. Successful combination therapy of polyarteritis nodosa associated with a pre-core promoter mutant hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2001, 34 : 774-779.
- .233. Fattovich G., Brollo L., Giustina G., Noventa F., Pontisso P., Alberti A., Realdi G., Ruol A.. Natural history and pronostic factors for chronic hepatitis B. *Gut.* 1991, 32 : 294-298.
- .234. Realdi G., Fattovich G., Hadziyannis S., Schalm S., Almasio P., Sanchez-Tapias J., et al.. Survival and prognostic factors in 366 patients with compensated cirrhosis type B: a multicenter study. *J. Hepatol.* 1994, 21 : 656-666.
- .235. Yang HL., Lu SN., Liaw YF., You SL., Sun CA., Wang LY., et al.. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2002, 347 : 168-174.
- .236. Wands JR.. Prevention of hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2004, 35 : 1521-1531.
- .237. Prise en charge des patients à risque de cirrhose : amélioration de l'évaluation de la fibrose hépatique et du diagnostic de la cirrhose non compliquée. www.has.fi. 2007.
- .238. Hadziyannis SJ.. Hepatitis D. *Clin. Liver Dis.* 1999:309-325.
- .239. Gaeta GB., Stroffolini T., Chiaramonte M., Ascione T., Stornaiuolo G., Lobello S., et al.. Chronic hepatitis D: a vanishing Disease? An Italian multicenter study. *Hepatology.* 2000, 32:824-827.
- .240. Caredda F., Rossi E., d'Arminio Monteforte A., Zampini L., Re T., Meroni B., et al.. Hepatitis B virus-associated coinfection and superinfection with delta agent: indistinguishable disease with different outcome. *J. Infect. Dis.* 1985, 925-928.
- .241. Fattovich G., Boscaro S., Noventa F., Pomaro E., Stenico D., Alberti A., et al.. Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. *J. Infect. Dis.* 1987, 155 : 931-935.
- .242. Fattovich G., Giustina G., Christensen E., Pantalena M., Zagni I., Realdi G., et al.. 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.
- .243. Benhamou Y., Bochet M., Thibault V., Calvez V., Fievet MH., Vig P., et al.. Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients co-infected with HIV-1 and lamivudine-resistant hepatitis B virus: an open-label pilot study. *Lancet.* 2001, 358 : 718-723.
- .244. Colgrove R., Simon G., Ganem D.. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus gene product in cells permissive for viral replication. *J. Virol.* 1989, 63 : 4019-4026.
- .245. Benhamou Y., Katlama C., Lunel F., Coutellier A., Dohin E., Hamm N., et al.. Effects of Lamivudine on replication of hepatitis B virus in HIV-infected men. *Ann. Intern. Med.* 1996, 125 : 705-712.
- .246. Benhamou Y., Bochet M., Thibault V., Di Martino V., Caumes E., Bricaire F., et al.. Long-term incidence of hepatitis B virus resistance to lamivudine in human immunodeficiency virus-infected patients. *Hepatology.* 1999, 30 : 1302-1306.

- .247. Pol S., Vallet-Pichard A.. Hépatite chronique B : situations rares : dialyse, transplantation rénale et traitements pré-emptifs en situation d'immunosuppression. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2008, 32 Suppl. 34-41.
- .248. EASL international conference of consensus. *J. Hepatol.* 2003, 39 : S3-S25.
- .249. Sherman M., Shafran S., Burak K. et al.. Management of chronic hepatitis B : consensus guidelines. *Can. J. Gastroenterol.* 2007, 21 (Suppl. C) : 5C-24C.
- .250. Tine F., Liberati A., Craxi A., Almosio P., Pagliaro L.. Interferon treatment in patients with chronic hepatitis B : a meta-analysis of the published literature. *J. Hepatol.* 1993, 18 : 154-162.
- .251. 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. Eng. J. Med.* 1996, 334 : 1422-1427.
- .252. Bravo AA., Sheth SG., Chopra S.. Liver biopsy. *N. Engl. J. Med.* 2001, 344:495-500.
- .253. Callard P., Sibony M.. Comment traiter une biopsie hépatique? La biopsie hépatique en pathologie non tumorale du foie. Groupe METAVIR. *Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS*, Paris. 2000, 2-12..
- .254. Chatelain D., Terris B.. Mémento de pathologie : pathologie digestive : Adem C., Petit T.. *Editions Vernazobres-Grego*. 2005, 55.
- .255. Duclos-Vallée JC.. La cirrhose. DU. de réanimation hépatique, Samuel D., Ichai P., CHB. P. Brousse. 2007.
- .256. Knodell RG., Ishak KG., Black WC., Chen TS., Craig R., Kaplowitz N., Kiernan TW., Wollman J.. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981, 1(5):431-5.
- .257. Scheuer PJ.. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J. Hepatol.* 1991, 13(3):372-374.
- .258. Bedossa P., Poynard T.. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996, 24 : 289-293.
- .259. Ishak K., Baptista A., Bianchi L. et al.. Histological grading staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.* 1995, 22 : 696-699.
- .260. Piccinino F., Sagnelli E., Pasquale G., Giusti G.. Complications following percutaneous liver biopsy : a multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J. Hepatol.* 1986, 2 : 165-171.
- .261. Wai CT., Greenson JK., Fontana RJ., Kalbfleish JD., Marrero JA., Conjeevaram HS., Lok AS.. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003, 38 : 518-526.
- .262. Forns X., Ampurdanes S., Llovet JM., Aponte J., Quinto L., Martinez-Bauer E., Bruguera M., Sanchez-Tapias JM., Rodes J.. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002, 36 : 986-992.
- .263. Imbert-Bismut F., Ratziu V., Pieroni L., Charlotte F., Benhamou Y., Poynard T.. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection : a prospective study. *Lancet*. 2001, 357 : 1069-1075.
- .264. Giannini E., Rizzo D., Botta F., Chiarbonello B., Fasoli A., Malfatti F., Romagnoli P., Testa E., Ceppa P., Testa R.. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ration in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Arch. Intern. Med.* 2003, 163 : 218-224.
- .265. Islam S., Antonsson L., Westin J., Lagging M.. Cirrhosis in hepatitis C virus-infected patients can be excluded using an index of standard biochemical serum markers. *Scand. J. Gastroenterol.* 2005, 40 : 867-872.

- .266. Huy AY., Chan HL., Wong VW., Liew CT., Chim AM., Chan FK., Sung JJ.. Identification of chronic hepatitis B patients without significant liver fibrosis by a simple non-invasive model. *Am. J. Gastroenterol.* 2005, 100 : 616-623.
- .267. Sebastiani G., Vario A., Guido M., Alberti A.. Sequential algorithms combining non-invasive markers and biopsy for the assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J. Gastroenterol.* 2007, 13(4) : 525-531.
- .268. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di Martino V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* 2003, 39(2) : 222-30.
- .269. Calès P., Oberti F., Michalak S., Hubert-Fouchard I., Rousselet MC., Konate A. et al.. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology.* 2005, 42(6) : 1373-1381.
- .270. Calès P.. Mesure de la fibrose hépatique. EMC, traité d'hépatologie. 2004, 7-010-A-10.
- .271. Méthodes d'évaluation de la fibrose hépatique. Recommandations de l'HAS. 2007, www.has-sante.fr/portail/jcms/c_476400/avis-has-tests-non-invasifs-mesure-fibrose-cirrhose
- .272. Sandrin L., Tanter M., Genisson JL., Catheline S., Fink M.. Shear elastocity probe for soft tissues with 1D transient elastography. *IEEE. Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.* 2002, 49 : 436-446.
- .273. Sandrin L., Fourquet B., Haquenoph JM., Yon S., Fournier C., Mal F., Christidis C., Zioli M., Poulet B., Kazemi F., Beaugrand M., Palau R.. Transient elastometry : a new non invasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med. Biol.* 2003, 29(12) : 1705-1713.
- .274. Sandrin L., Fournier C., Miette V., Yon S., Hasquenoph JM.. Fibroscan : un outil non invasif de mesure de la dureté du foie par élastométrie. *ITBM-RBM.* 2005, article in press.
- .275. Arena U., Vizzutti F., Corti G., Ambu S., Stasi C., Bresci S., Moscarella S., Boddi V., Petrarca A., Laffi G., Marra F., Pinzani M.. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology.* 2008, 47(2) : 380-384.
- .276. Coco B., Oliveri F., Maina AM., Ciccorossi P., Sacco R., Colombatto P., Bonino F., Brunetto MR.. Transient elastography : a new surrogate marker of liver fibrosis influences by major changes of transaminases. *Journ. Viral Hepatitis.* 2007, 14 : 360-369.
- .277. Marcellin et al.. *Liver Int.* 2008; in press.
- .278. Castera L., Vergniol J., Foucher J. et al.. Prospective comparison of transient elastometry, fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005, 128 : 343-350.
- .279. Ganne-Carrié N., Zioli M., de Ledinghen V., Douvin C., Marcellin P., Castera L., Dhumeaux D., Trinchet JC., Beaugrand M.. Accuracy of liver stiffness measurement for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatology.* 2007, 46(1):282; author reply 282-3.
- .280. Denis F.. Vaccination contre l'hépatite B. *EMC (Elsevier Masson SAS).* 2007, 7-015-B32.
- .281. Denis F., Abitbol V., Aufrère A.. Evolution des stratégies vaccinales et couverture vaccinale contre l'hépatite B en France, pays de faible endémie. *Med. et mal. infect.* 2004, 34 : 149-158.
- .282. Denis F., Mounier M.. Le point sur la vaccination contre l'hépatite B. *Hygiene's.* 2000, 8 : 113-119.
- .283. Goudeau A.. La vaccination contre l'hépatite B : vingt ans d'expérience clinique. *Virologie.* 1998, 2 : 16-29.
- .284. Hepatitis B. WHO Web site.
- .285. Siegrist CA.. Non, le vaccin contre l'hépatite B ne provoque pas la sclérose en plaques. Retour sur un psychodrame collectif. *Recherche.* 2000, 329 : 80-4.

- .286. Zipp F., Weil JG., Einhaupl M.. No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination. *Nat. Med.* 1995, 5 : 964-965.
- .287. Mikaeloff Y., Caridade G., Assi S., Tardieu M., Suissa S.. KIDSEP study group of the French Neuropaediatric Society. Hepatitis B vaccine and risk of relapse after a first childhood episode of CNS inflammatory demyelination. *Brain*. 2007, 130 : 1105-1110.
- .288. 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.
- .289. Denis F.. Hepatitis B vaccination in France : vaccination coverage in 2002. *Bull. Acad. Natl Med.* 2004, 188 : 115-123.
- .290. Margeridon S., Lachaux A., Zoulim F., Trepo C., Kay A.. Persistence de l'infection par le virus de l'hépatite B malgré la présence d'un titre élevé d'anticorps anti-HBs. *JFPD*. 2004.
- .291. Castaing D., Samuel D., Adam R., Azoulay D., Saliba F., Roche B.. Guide de l'interne et de l'étudiant hospitalier du centre hépato-biliaire. 2008, 196-197.
- .292. 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.
- .293. Samuel D., Bismuth A., Mathieu D., Arulnaden JL., Reynes M., Benhamou JP., et al.. Passive immunoprophylaxis after liver transplantation in HBsAg-positive patients. *Lancet*. 1991, 337 : 813-815.
- .294. Shouval D., Samuel D.. Hepatitis B immune globulin to prevent HBV graft reinfection following liver transplantation : a concise review. *Hepatology*. 2000, 32 : 1189-1195.
- .295. Perillo R., Rakela J., Dienstag J., Levy G., Martin P., Wright T. et al.. Multicenter study of Lamivudine therapy for Hepatitis B after liver transplantation. *Hepatology*. 1999, 29 : 1581-1586.
- .296. Schiff E., Lai CL., Hadziyannis S., Neuhaus P., Terrault N., Colombo M. et al.. Adefovir dipivoxil for wait-listed and post-liver transplantation patients with lamivudine-resistant hepatitis B : final long-term results. *Liver Transplant*. 2007, 13 : 349-360.
- .297. Samuel D.. Transplantation pour hépatite chronique B. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2008, 32 : S25-33.
- .298. Lok AS. The maze of treatments for hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352(26):2743-6.
- .299. Manesis EK., Schina M., Le Gal F., Agelopoulou O., Papaioannou C., Kalligeros C., Arseniou V., Manolakopoulos S., Hadziyannis ES., Gault E., Koskinas J., Papatheodoridis G., Archimandritis AJ.. Quantitative analysis of hepatitis D virus RNA and hepatitis B surface antigen serum levels in chronic delta hepatitis improves treatment monitoring. *Antivir. Ther.* 2007, 12(3) : 381-8.
- .300. Chan HL., Wong VW., Tse AM., Tse CH., Chim AM., Chan HY., Wong GL., Sung JJ.. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2007, 5(12) : 1462-8.
- .301. Brunetto, EASL 2007 Abst. 487.
- .302. Thomas F., Foster G., Platis D.. Mechanisms of action interferon and nucleoside analogues. *J. Hepatol.* 2003, 39, Suppl. 1 : S93-98.
- .303. Brook MG., Karayiannis P., Thomas HC.. Which patients with chronic hepatitis B virus infection will respond to alpha-interferon therapy? A statistical analysis of predictive factors. *Hepatology*. 1989, 10:761-763.
- .306. Perrillo RP., Schiff ER., Davis GL., Bodenheimer HC. Jr., Lindsay K., Payne J., et al.. A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* 1990, 323:295-301.

- .307. Lok AS., Chung HT., Liu VW., Ma OC.. Long-term follow-up of chronic hepatitis B patients treated with interferon alfa. *Gastroenterology*. 1993, 105:1833-1838.
- .308. Korenman J., Baker B., Waggoner J., Everhart JE., Di Bisceglie AM., Hoofnagle JH.. Long-term remission of chronic hepatitis B after alpha-interferon therapy. *Ann. of Intern. Med.*. 1991, 114:629-634.
- .309. Carreno V., Castillo I., Molina J., Porres JC., Bartolome J.. Long-term follow-up of hepatitis B chronic carriers who responded to interferon therapy. *J. Hepatol.*. 1992, 15:102-106.
- .310. van Zonneveld M., Honkoop P., Hansen BE., Niesters HG., Murad SD., de Man RA., et al.. Long-term follow-up of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2004, 39:804-810.
- .311. Lok AS., Lai CL., Leung N., Yao GB., Cui ZY., Schiff ER., et al.. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2003, 125:1714-1722.
- .312. Leung NW., Lai CL., Chang TT., Guan R., Lee CM., Ng KY., 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.
- .313. Chang TT., Lai CL., Chien RN., Guan R., Lim SG., Lee CM., et al.. Four years of lamivudine treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B. *J. Gastroenterol. Hepatol.*. 2004, 19:1276-1282.
- .314. Liaw YF., Sung JJ., Chow WC., Farrell G., Lee CZ., Yuen H., Tanwandee T., Tao QM., Shue K., Keene ON., Dixon JS., Gray DF., Sabbat J.; Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N. Engl. J. Med.*. 2004, 351(15) : 1521-31.
- .315. Allen MI., Deslauriers M., Andrews CW., Tipples GA., Walters KA., Tyrrell DL., Brown N., et al.. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology*. 1998, 27:1670-1677.
- .316. Stuyver LJ., Locarnini SA., Lok AS., Richman DD., Carman WF., Dienstag JL., Schinazi RF.. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*. 2001, 33:751-757.
- .317. Dienstag JL., Schiff ER., Wright TL., Perrillo RP., Hann HW., Goodman Z., et al.. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *New Engl. J. Med.*. 1999, 341:1256-1263.
- .318. Lai CL., Chien RN., Leung NW., Chang TT., Guan R., Tai DI., et al.. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *New Engl. J. Med.*. 1998, 339:61-68.
- .319. Schalm SW., Heathcote J., Cianciara J., Farrell G., Sherman M., Willems B., et al.. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial. *Gut*. 2000, 46:562-568.
- .320. Liaw YF., Leung NW., Chang TT., Guan R., Tai DI., Ng KY., et al.. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology*. 2000, 119:172-180.
- .321. Yuen MF., Sablon E., Hui CK., Yuan HJ., Decraemer H., Lai CL.. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*. 2001, 34:785-791.
- .322. Chang TT., Lai CL., Chien RN., Guan R., Lim SG., Lee CM., et al.. Four years of lamivudine treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B. *J. Gastroenterol. Hepatol.*. 2004, 19:1276-1282.
- .323. Liaw YF., Sung JJ., Chow WC. et al.. Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N. Eng. J. Med.*. 2004, 351 : 1521-1531.
- .324. Gish R., Chang TT., de Man R., Gadano A., Sollano J., Han KH., et al.. Entecavir results in substantial virologic and biochemical improvement and HBeAg seroconversion through 96 weeks of treatment in HBeAg(-). Chronic hepatitis B patients (Study ETV-022). *Hepatology*. 2005, 42(Suppl.) : 267A.

- .325. Lai CL., Shouval D., Lok AS., Chang TT., Cheinquer H., Goodman Z., et al.. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.*. 2006, 354:1011-1020.
- .326. S. Han. AASLD. 2007. Abstract.
- .327. Rapport d'étude clinique AI463027.
- .328. Colonna R., Rose R., Baldick C., Levine S., Pokornowski K., Yu C., et al.. Resistance after two years of entecavir treatment in nucleoside-naïve patients is rare. *Hepatology*. 2006, 45:1656-1665.
- .329. Tenney DJ., Levine SM., Rose RE., Walsh AW., Weinheimer SP., Discotto L., et al.. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob. Agents Chemother.*. 2004, 48:3498-3507.
- .330. Villeneuve JP., Durantel D., Durantel S., Westland C., Xiong S., Brosgart CL., et al.. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J. Hepatol.*. 2003, 39:1085-1089.
- .331. Lok AS., Schiff E., Tsai SL., Rustgi VK., Schiffman M., Martin P., et al.. Entecavir is effective irrespective of Baseline Alt nad HBV DNA Strata for Histological and Virological Endpoints. *Gastroenterology*. 2005, 128:742.
- .332. Lai CL., Leung NW., Teo EK., Tong M., Wong F., HannHWY., et al.. Phase IIB extended-treatment trial of telbivudine (LdT) vs lamivudine vs combination treatment in hepatitis B patients: two year results. *Gastroenterology*. 2005, 128: A692.
- .333. Lai CL., Gane E., Liaw YF., Thongsawat S., Wang Y., Chen Y., et al.. Telbivudine (LDT) vs. Lamivudine for Chronic Hepatitis B: First year results from the international phase III globe trial. *Hepatology*. 2005, 42(Suppl.):748A.
- .334. Tillmann HL., McHutchison JG.. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.*. 2008, 358(14) : 1517.
- .335. Di Bisceglie AM., Lai CL., Gane E., Chen YC., Thongsawat S., Wang Y., et al.. Telbivudine Globe Trial: Maximal early HBV suppression is predictive of optimal two-year efficacy in nucleoside-treated hepatitis B patients. *Hepatology*. 2006, 44(Suppl.) :230A-231A.
- .336. Lim SG., Ng TM., Kung N., Krastev Z., Volfova M., Husa P., et al.. A double-blind placebo-controlled study of emtricitabine in chronic hepatitis B. *Arch. Intern. Med.*. 2006, 166 : 49-56.
- .337. Yoo BC., Kim H., Lee KS., Kim TH., Paik SW., Ryu SH., et al.. A 24-week clevudine monotherapy produced profound on-treatment viral suppression as as sustained viral suppression and normalization of aminotransferase levels for 24 weeks off-treatment in HBEAg(-) chronic hepatitis B patients. *Hepatology*. 2005, 42(Suppl.) : 270A.
- .338. Yoo BC., Koh KC., Chung YH., Han BH., Byun KS., Um S., et al.. Clevudine is highly efficacious in HBEAg(-) chronic Hepatitis B patients with a sustained antiviral effect after cessation of therapy. *Hepatology*. 2005, 42(Suppl.) : 268A.
- .339. Marcellin P. et al.. EASL. 2008, Abstr. 57.
- .340. Heathcote J. et al.. 58th AASLD. 2007.
- .341. van Bommel F., Wunsche T., Mauss S., Reinke P., Bergk A., Schurmann D., et al.. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2004, 40:1421-1425.
- .342. van Bommel F., Berg T.. Reactivation of viral replication after replacement of tenofovir by adefovir. *Hepatology*. 2005, 42 : 239-240.

- .343. Benhamou Y., Fleury H., Trimoulet P., Pellegrin I., Urbinelli R., Katlama C., et al.. Anti-hepatitis B virus efficacy of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients. *Hepatology*. 2006, 43 : 548-555.
- .344. Bourlière M., Castellani P.. Traitement de l'hépatite chronique B : nouvelles perspectives. *Gastroenterol. Clin. Biol.*. 2008, S64-69.
- .345. Lebray P., Vallet-Pichard A., Michel ML., Fontaine H., Sobesky R., Bréchet C., Pol S.. Immunomodulatory drugs and therapeutic vaccine in chronic hepatitis B infection. *J. Hepatol.*. 2003, 39 Suppl. 1 : S151-9.
- .346. Kondili LA, Osman H., Mutimer D.. The use of lamivudine for patients with acute hepatitis B (a series of cases). *J. Viral Hepat.*. 2004, 11:427-431.
- .347. Tillmann HL., Haden J., Leifeld L., Zachou K., Canbay A., Eisenbach C., et al.. Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B: A multicenter experience. *J. Viral Hepatol.*. 2006, 4 : 256-263.
- .348. Tassopoulos NC., Koutelou MG., Polychronaki H., Paraloglou-Ioannides M., Hadziyannis SJ.. Recombinant interferon-alpha therapy for acute hepatitis B: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J. Viral Hepat.*. 1997, 4 : 387-394.
- .349. Villeneuve JP., Condreay LD., Willems B., Pomier-Layrargues G., Fenyves D., Bilodeau M., et al.. Lamivudine treatment for decompensated cirrhosis resulting from chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2000, 31 : 207-210.
- .350. Sponseller CA., Bacon BR., Di Bisceglie AM.. Clinical improvement in patients with decompensated liver disease caused by hepatitis B after treatment with lamivudine. *Liver Transpl.*. 2000, 6 : 715-720.
- .351. Beasley RP.. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1988, 61 : 1942-1956.
- .352. Realdi G., Fattovich G., Hadziyannis S. et al.. Survival and prognostic factors in 366 patients with compensated cirrhosis type B. A multicenter study. The Investigators of the European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *J. Hepatol.*. 1994, 21 : 656-666.
- .353. Degos F., Christidis C., Ganne-Carrie N. et al.. Hepatitis C virus related cirrhosis : time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut*. 2000, 47 : 131-136.
- .354. Chiaramonte M., Stroffolini T., Vian A. et al.. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer*. 1999, 85 : 2132-2137.
- .355. Bruix J., Sherman M.. Practice guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005, 42 : 1208-1236.
- .356. Trevisani F., D'Intino PE., Morselli-Labate AM. et al.. Serum alpha-feto-protein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. Influence of HBsAg and anti-HCV status. *J. Hepatol.*. 2001, 43 : 570-575.
- .357. Lampertico P., Vigano M., Manenti E., Iavarone M., Lunghi G., Colombo M.. Adefovir rapidly suppresses hepatitis B in HBeAg-negative patients developing genotypic resistance to lamivudine. *Hepatology*. 2005, 42 : 1414-1419.
- .358. Rapti I., Dimou E., Mitsoula P., Hadziyannis S.. Adding-on versus switching-to adefovir therapy in lamivudine-resistant HBe-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007, 45 : 307-313.
- .359. Liaw YF., Lee CM., Chien RN., Yeh CT.. Switching to adefovir monotherapy after emergence of lamivudine-resistant mutations in patients with liver cirrhosis. *J. Viral Hepatol.*. 2006, 13 : 250-255.

- .360. Colonna RJ., Rose RE., Pokornowski K. et al.. Assessment at three years show high barrier to resistance is maintained in entecavir-treated nucleoside naive patients while resistance emergence increases over time in lamivudine refractory patients. *Hepatology*. 2006, 44 (Suppl. 1) : 229A-230A.
- .361. Manns MP. EASL. 2008, abstr. 74.
- .362. Hadziyannis S., Tassopoulos N., Heathcote J. et al.. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years of therapy. *Gastroenterology*. 2006, 131 : 1743-1751.
- .363. Sherman M., Yurdaydin C., Sollano J., Silva M., Liaw YF., Cianciara J., et al.. Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2006, 130 : 2039-2049.
- .364. Tenney DJ., Levine SM., Rose RE., Walsh AW., Weinheimer SP., Discotto L., et al.. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob. Agents Chemother.*. 2004, 48 : 3498-3507.
- .365. Sheldon J., Camino N., Rodes B. et al.. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir. Ther.*. 2005, 10 : 727-734.
- .366. van Bommel F., Wunsche T., Mauss S., Reinke P., Bergk A., Schurmann D., et al.. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2004, 40 : 1421-1425.
- .367. Castelnau C., Le Gal F., Ripault MP., Gordien E., Martinot-Peignoux M., Boyer N., et al.. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology*. 2006, 44 : 728-735.
- .368. Lau DT., Doo E., Park Y., Kleiner DE., Schmid P., Kuhns MC., et al.. Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology*. 1999, 30 : 546-54.
- .369. Niro G., Ciancio A., Gaeta GB., Smedile A., Marrone A., Olivero A., et al.. Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta. *Hepatology*. 2006, 44 : 713-720.
- .370. Farci P., Roskams T., Chessa L., Peddis G., Mazzoleni AP., Scioscia R., et al.. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology*. 2004, 126 : 1740-1749.
- .371. Farci P., Mandas A., Coiana A., Lai ME., Desmet V., Van Eyken P., et al.. Treatment of chronic hepatitis D with interferon alfa-2a. *N. Engl. J. Med.*. 1994, 330 : 88-94.
- .372. Di Martino V., Thevenot T., Colin JF., Boyer N., Martinot M., Degos F., et al.. Influence of HIV infection on the response to interferon therapy and the long-term outcome of chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2002, 123 : 1812-1822.
- .373. Sheldon JA., Corral A., Rodes B., Mauss S., Rockstroh J., Berger F., et al.. Risk of selecting K65R in antiretroviral-naive HIV-infected individuals with chronic hepatitis B treated with adefovir. *AIDS*. 2005, 19:2036-2038.
- .374. Benhamou Y., Bochet M., Thibault V., Di Martino V., Caumes E., Bricaire F., et al.. Long-term incidence of hepatitis B virus resistance to lamivudine in human immunodeficiency virus-infected patients. *Hepatology*. 2000, 31:1030-1031.
- .375. van Bommel F., Wunsche T., Mauss S. et al.. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2004, 40 : 1421-1425.
- .376. Liu CJ., Chen PJ., Lai MY., Kao JH., Jeng YM., Chen DS.. Ribavirin and interferon is effective for hepatitis C virus clearance in hepatitis B and C dually infected patients. *Hepatology*. 2003, 37 : 568-576.
- .377. Euler GL., Copeland JR., Rangel MC., Williams WW.. Antibody response to postexposure prophylaxis in infants born to hepatitis B surface antigen-positive women. *Pediatr. Infect. Dis. J.*. 2003, 22 : 123-129.

- .378. von Zonneveld M., van Nunen AB., Niesters HG., de Man RA., Schalm SW., Janssen HL.. Lamivudine treatment during pregnancy to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *J. Virol. Hepat.* 2003, 10 : 294-297.
- .379. Xu WM., Cui YT., Wang L. et al.. Efficacy and safety of lamivudine in late pregnancy for the prevention of mother-child transmission of hepatitis B (a multicenter, randomised, double-blind, placebo-controlled study). *Hepatology*. 2004, 40 : 273A.
- .380. Marx G., Martin SR., Chicoine JF., Alvarez F.. Longterm follow-up of chronic hepatitis B virus infection in children of different ethnic origin. *J. Infect. Dis.* 2002, 186 : 295-301.
- .381. Bortolotti F., Jara P., Barbera C. et al.. Long term effect of alpha in children with chronic hepatitis B. *Gut*. 2000, 46 : 715-718.
- .382. Sokal EM., Conjeevaram HS., Roberts EA. et al.. Interferon alpha therapy for chronic hepatitis B in children : a multinational randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 1998, 114 : 988-995.
- .383. Jonas MM., Kelley DA., Mizerski J. et al.. Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B. *N. Eng. J. Med.* 2002, 346 : 1706-1713.
- .384. Sokal EM., Kelley DA., Mizerski J. et al.. Long-term lamivudine therapy in children with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2006, 43 : 225-232.
- .385. Simpson ND., Simpson PW., Ahmed AM. et al.. Prophylaxis against chemotherapy-induced reactivation of hepatitis B virus infection with lamivudine. *J. Clin. Gastroenterol.* 2003, 37 : 68-71.
- .386. Lau GK., He ML., Fong DY., Bartholomeusz A., Au WY., Lie AK., et al.. Preemptive use of lamivudine reduces hepatitis B exacerbation after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Hepatology*. 2002, 36 : 702-709.
- .387. Kohrt HE., Ouyang DL., Keeffe EB.. Systematic review : lamivudine prophylaxis for chemotherapy-induced reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2006, 24 : 1003-1016.
- .388. Lin CY.. Treatment of hepatitis B virus-associated membranous nephropathy with recombinant alpha-interferon. *Kidney Int.* 1995, 47 : 225-240.
- .389. Gan SL., Devlin SM., Scott-Douglas NW., Burak KW.. Lamivudine for treatment of membranous glomerulopathy secondary to chronic hepatitis B infection. *Can. J. Gastroenterol.* 2005, 19 : 625-629.
- .390. Gunson RN., Shouval D., Roggendorf M. et al.. European Consensus Group. Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections in health care workers (HCWs) : Guidelines for prevention of transmission of HBV and HCV from HCW to patients. *J. Clin. Virol.* 2003, 27 : 213-230.
- .391. Samuel D., Muller R., Alexander G., Fassati L., Ducot B., Benhamou JP. et al.. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *N. Eng. J. Med.* 1993, 329 : 1842-1847.
- .392. Terrault NA., Roche B., Samuel D.. Management of the hepatitis B virus in liver transplantation setting : a European and an American perspective. *Liver Transplant.* 2005, 11 : 716-732.
- .393. Grellier L., Mutimer D., Ahmed M., Brown D., Burroughs AK., Rolles K. et al.. Lamivudine prophylaxis against reinfection in liver transplantation for hepatitis B cirrhosis. *Lancet*. 1996, 348 : 1212-1215.
- .394. Lo CM., Liu CL., Lau GK., Chan SC., Ng IO., Fan ST.. Liver transplantation for chronic hepatitis B with lamivudine-resistant YMDD mutant using add-on adefovir dipivoxil plus lamivudine. *Liver Transplant.* 2005, 11 : 807-813.
- .395. Terrault NA., Zhou S., McCoy RW., Pruett TL., Lake JR., Roberts JP. et al.. Incidence and clinical consequences of surface and polymerase gene mutations in liver transplant recipients on hepatitis B immunoglobulin. *Hepatology*. 1998, 28 : 555-561.

- .396. Faria LC., Gigoli M., Roque-Alfonso AM., Sebah M., Roche B., Fallot G., Ferrari TC., Guettier C., Dussaix E., Castaing D., Brechot C., Samuel D.. Hepatocellular carcinoma is associated with an increase risk of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2008, 134 : 1890-1899.
- .397. Saldanha J., Gerlich W., Lelie N., Dawson O., 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.
- .398. 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.
- .399. Wagner AA.. Thèse : les infections occultes par le VHB : mécanismes possibles et rôle des leucocytes du sang périphérique. 2006.
- .400. Norder H., Couroucé AM., Coursaget P., Echevarria JM., Lee SD., Mushahwar IK., Robertson BH., Locarnini S., Magnius LO.. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004, 47(6) : 289-309.
- .401. 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.
- .402. Chemin I., Zoulim F., Merle P., Arkhis A., Chevallier M., Kay A., Cova I., 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.
- .403. Pawlotsky JM.. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J. Clin. Virol.* 2005, 34 Suppl.1:S125-129.
- .404. Kwiatkowski RW., Lyamichev V., de Arruda M., Neri B.. Clinical, genetic, pharmacogenetic applications of the Invader assay. *Mol. Diagn.* 1999, 4 : 353-364.
- .405. Coleman PF.. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12 : 198-203.
- .406. Nafa S.. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2000, 32 : 1078-1088.
- .407. Lok AS. et al.. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus-infected patients during lamivudine therapy : evaluation of performance of InnoLIPA HBV-DR assay. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40 : 3729-3734.
- .408. Wong DK., Tanaka Y., Lai CL., Mizokami M., Fung J., Yuen MF.. Hepatitis B virus core-related antigens as markers for monitoring chronic hepatitis B infection. *J Clin Microbiol*. 2007, 45(12) : 3942-7.
- .409. Laras A., Koskinas J., Dimou E., Kostamena A., Hadziyannis SJ.. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology*. 2006, 44(3) : 694-702.
- .410. Newbold JE., Xin H., Tencza M., Sherman G., Dean J., Bowden S., Locarnini S.. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J. Virol.* 1995, 69(6):3350-7.
- .411. Caruntu FA., Molagic V.. CccDNA persistence during natural evolution of chronic VHB infection. *Rom. J. Gastroenterol.* 2005, 14(4) : 373-7.
- .412. Guidotti LG., Chisari FV.. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 2001, 19 : 65-91.
- .413. Guidotti LG., Rochford R., Chung J., Shapiro M., Purcell R., Chisari V.. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*. 1999, 284 : 825-829.

- .414. 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(12):9392-9.
- .415. Mason WS., Cullen J., Moraleda G., Saputelli J., Aldrich CE., Miller DS., Tennat B., Frick L., Averett A., Condreay LD., Jilbert AJ.. Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks. *Virology.* 1998, 245 : 18-32.
- .416. Fourel I, Cullen JM, Saputelli J, Aldrich CE, Schaffer P, Averett DR, Pugh J, Mason WS.. Evidence that hepatocyte turnover is required for rapid clearance of duck hepatitis B virus during antiviral therapy of chronically infected ducks. *J. Virol.* 1994, 68(12) : 8321-30.
- .417. Guo H., Zhou T., Jiang D., Cuconati A., Xiao GH., Block TM., Guo JT.. Regulation of hepatitis B virus replication by the phosphatidylinositol 3-kinase-akt signal transduction pathway. *J. Virol.* 2007, 81(18):10072-80.
- .418. Wieland SF., Spangenberg HC., Thimme R., Purcell RH., Chisari FV.. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101 : 2129-2134.
- .419. Zoulim F.. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J. Hepatol.* 2005, 42 : 302-308.
- .420. Kock J., Baumert J., Delany WE., Blum HE., von Weizsacker F.. Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus in primary tupaia hepatocytes. *Hepatology.* 2003, 38 : 1410-1418.
- .421. Pawlotsky JM.. Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets. *J. Hepatol.* 2006, 44(1 Suppl.) : S10-3.
- .422. Ying C., Sze J., He ML.. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal liver damage. *J. Gastroenterol.* 2004, 10(1) : 82-85.
- .423. Delmas J., Schorr O., Jamard C., Gibbs C., Trépo C., Hantz O., Zoulim F.. Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus-infected hepatocytes in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46 : 425-433.
- .424. He ML. et al.. A new sensitive method for quantification of HBV cccDNA by realtime PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 295 : 1102-1107.
- .425. Bohne F., Chmielewski M., Ebert G., Wiegmann K., Kürschner T., Schulze A., Urban S., Krönke M., Abken H., Protzer U.. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology.* 2008, 134(1) : 239-47.
- .426. Sung JY., Wong ML., Bowden S., Liew CT., Hui AY., Wong VWS., Leung NWY., Locarnini S., Chan HLY.. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. *Gastroenterol.* 2005, 128 : 1890-1897.
- .427. Wong DK., Yuen MF., Ngai VW., Fung J., Lai CL.. One-year entecavir or lamivudine therapy results in reduction of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA levels. *Antivir. ther.* 2006, 11(7) : 909-16.
- .428. www.pubmed.com: search : cccDNA + « hepatitis B »
- .429. Wagner AA., Denis F., Weinbreck P., Loustaud V., Autofage F., Rogez S., Alain S.. 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. *AIDS.* 2004, 18(3) : 569-71.
- .430. Marcellin P., Chang TT., Lim SG., Tong MJ., Sievert W., Shiffman ML., et al.. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348 : 808-816.

- .431. Fung SK., Chae HB., Fontana RJ., Conjeevaram H., Marrero J., Oberhelman K., et al.. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* 2006, 44 : 283-290.
- .432. Hadziyannis SJ., Tassopoulos NC., Heathcote EJ., Chang TT., Kitis G., Rizzetto M., et al.. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348 : 800-807.
- .433. Hadziyannis SJ., Tassopoulos NC., Heathcote EJ., Chang TT., Kitis G., Rizzetto M., et al.. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352 : 2673-2681.
- .434. Hadziyannis S., Tassopoulos N., Chang TT., Heathcote J., Kitis G., Rizzetto M., et al.. Long-term adefovir dipivoxil treatment induces regression of liver fibrosis in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: Results after 5 years of therapy. *Hepatology.* 2005, 42(Suppl.) : 754A.
- .435. Chang TT., Gish R., Man R., Gadano A., Sollano J., Han KH., et al.. Entecavir is superior to Lamivudine for the treatment of HBeAg(-) chronic hepatitis B: Results of Phase III study ETV - 022 in Nucleoside-Naive patients. *Hepatology.* 2004, 40(Suppl.) : 193A.
- .436. Schiff ER., Lai CL., Hadziyannis S., Neuhaus P., Terrault N., Colombo M., et al.. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology.* 2003, 38:1419-1427.
- .437. Schiff E., Lai CL., Neuhaus P., Tillmann HL., Samuel D., Villeneuve JP.. Adefovir Dipivoxil (ADV) provides significant clinical benefit, reduces meld score and prevents transplantation in chronic hepatitis B patients wait-listed for liver transplantation (OLT) with Lamivudine-Resistance (LAM-R). *J. Hepatol.* 2005, 42(Suppl. 2) : 5.
- .438. Snow A., Thibault V., Qi X., Zhu Y., Westland C., Arterburn S., et al.. Combination of Adefovir Dipivoxil (ADV) and Lamivudine (LAM) prevented emergence of ADV resistance Mutations in chronic Hepatitis B (CHB) patients with LAM-Resistant HBV. *Gastroenterology.* 2005, 128 : M945.
- .439. Westland CE., Yang H., Delaney WE., Gibbs CS., Miller MD., Wulfsohn M., et al.. Week 48 resistance surveillance in two phase 3 clinical studies of adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2003, 38 : 96-103.
- .440. Angus P., Vaughan R., Xiong S., Yang H., Delaney W., Gibbs C., et al.. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology.* 2003, 125 : 292-297.
- .441. Villeneuve JP., Durantel D., Durantel S., Westland C., Xiong S., Brosgart CL., et al.. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J. Hepatol.* 2003, 39 : 1085-1089.
- .442. Locarnini S., Qi X., Arterburn S., Snow A., Brosgart CL., Currie G., et al.. Incidence and predictors of emergence of Adefovir resistant HBV during four years of Adefovir Dipivoxil (ADV) Therapy for patients with chronic hepatitis B (CHB). *J. Hepatol.* 2005, 42 : 17.
- .443. Lee YS., Suh DJ., Lim YS., Jung SW., Kim KM., Lee HC., et al.. Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. *Hepatology.* 2006, 43 : 1385-1391.
- .444. Fung SK., Andreone P., Han SH., Reddy KR., Regev A., Keeffe EB., et al.. Adefovir-resistant hepatitis B can be associated with viral rebound and hepatic decompensation. *J. Hepatol.* 2005, 43 : 937-943.
- .445. Durantel S., Werle B., Durantel D., Pichoud C., Currie G., Xiong S., et al.. Different profiles of response to Adefovir Dipivoxil and factors that may influence response in patients with chronic Hepatitis B. *Hepatology.* 2004, 40 : 654A.
- .446. Fung SK., Chae HB., Fontana RJ., Conjeevaram H., Marrero J., Oberhelman K., et al.. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* 2006, 44 : 283-290.

- .447. Marcellin P., et al.. 58th AASLD, Boston, USA. 2007, LB2.
- .448. Heathcote J., et al., 58th AASLD, Boston, USA. 2007, n°LB6.
- .450. Niederau K., Heintge T., Lange S., Goldmann G., Niederau CM., Mohr L. et al.. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alpha for chronic hepatitis B. *N. Eng J. Med.*. 1996, 334 : 1422-1427.
- .451. Tinè 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.
- .452. Hoofnagle JH., Peters M. Mullen KD., Jones DB., Rustgi V., Di Bisceglie A. et al.. Randomized, controlled trial of recombinant human alpha-Interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 1988, 95 : 1318-1325.
- .453. Wong DK., Cheung AM., O'Rourke K., Naylor CD., Detsky AS., Heathcote J.. Effect of alpha-interferon in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B : a meta-analysis. *Ann. Int. Med.*. 1993, 119 : 312-323.
- .454. Lau GK., Piratvisuth T., Luo KX., Marcellin P., Thongsawat S., Cooksley G., et al.. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.*. 2005, 352 : 2682-2695.
- .455. Cooksley WG., Piratvisuth T., Lee SD., Mahachai V., Chao YC., Tanwandee T., et al.. Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.*. 2003, 10 : 298-305.
- .456. Marcellin P., Lau GK., Bonino F., Farci P., Hadziyannis S., Jin R., Lu ZM., Piratvisuth T., Germanidis G., Yurdaydin C., Diago M., Gurel S., Lai MY., Button P., Pluck N.; Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B Study Group. 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(12) : 1206-17.
- .457. Janssen HL., van Zonneveld M., Senturk H., Zeuzem S., Akarca US., Cakaloglu Y., et al.. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet*. 2005, 365 : 123-129.
- .458. Perillo RP., Regenstein FG., Peters MG., DeSchryver-Kecskemeti K., Bodicky CJ., Campbell CR. et al.. Prednisone withdrawal followed by recombinant alpha-Interferon in the treatment of chronic type B hepatitis. *Ann. Int. Med.*. 1998, 109 : 95-100.
- .459. Campbell CR., Kuhns MC.. Prednisone withdrawal followed by recombinant alpha-Interferon in the treatment of chronic type B hepatitis. A randomized trial. *Ann. Int. Med.*. 1988, 109 : 95.458. Sasadeusz JJ., Locarnini SL., Macdonald ML.. Why do we not yet have combination chemotherapy for chronic hepatitis B ? *Med. J. Australia*. 2007, 186 (4): 204-206.
- .460. Sasadeusz JJ., Locarnini SL., Macdonald ML.. Why do we not yet have combination chemotherapy for chronic hepatitis B ? *Med. J. Australia*. 2007, 186 (4): 204-206.
- .461. Kucers A.. Evolution of antituberculous therapy. In: Kucers A., Crowe S., Grayson M., Hoy J., editors. The use of antibiotics. 5th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997: 1194.
- .462. Delta Coordinating Committee. Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. *Lancet*. 1996, 348: 283-291.
- .463. Hammer S., Squires K., Hughes M., et al.. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *N Engl. J. Med.*. 1997, 337: 725-733.

- .464. Delaney WI., Locarnini S., Shaw T.. Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation. *Antivir. Chem. Chemother.*. 2001, 12: 1-35.
- .465. Wainberg M., Salomon H., Gu Z., et al.. Development of HIV-1 resistance to (-)2'-deoxy-3'-thiacytidine in patients with AIDS or advanced AIDS-related complex. *AIDS*. 1995, 9: 351-357.
- .466. Pol S.. Traitement de l'hépatite chronique B. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hépatologie. 2008, 7-015-b-31.
- .467. Angus P., Vaughan R., Xiong S., et al.. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology*. 2003, 125: 292-297.
- .468. Lampertico P., Marzano A., Levrero M., et al.. A multicenter Italian study of rescue adefovir dipivoxil therapy in lamivudine resistant patients : a 2-year analysis of 650 patients. 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver; 2006 Apr 26-30; Vienna, Austria. Abstract 116.
- .469. Puoti M., Zacchi S., Zaltron A., Spinetti S., Rossi S., Prestini K., Mendini M., Biasi L., Carosi G.. « De novo » combination with adefovir and lamivudine is more effective than adefovir « add on » and as effective as lamivudine monotherapy in antiviral treatment of chronic HBV infection. *Dig. and Liv. Dis.*. 2008, 40 : A18.
- .470. Sung JJ., Lai JY., Zeuzem S., Chow WC., Heathcote EJ., Perrillo RP., Brosgart CL., Woessner MA., Scott SA., Gray DF., Gardner SD.. Lamivudine compared with lamivudine and adefovir dipivoxil for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J. Hepatol.*. 2008, 48(5) : 728-35.
- .471. Hui CK., Zhang HY., Bowden S., Locarnini S., Luk JM., Leung KW., Yueng YH., Wong A., Rousseau F., Yuen KY., Naoumov N., Lau GK.. 96 weeks of combination of adefovir dipivoxil plus emcitabine vs. adefovir dipivoxil monotherapy in the treatment of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.*. 2008, 48 : 714-720.
- .472. Santantonio T., Niro GA., Sinisi E., Leandro G., Insalata M., Guastadisegni A., Facciorusso D., Gravinese E., Andriulli, Pastore G.. Lamivudine/interferon combination therapy in anti-HBe positive chronic hepatitis B patients : a controlled pilot study. *J. Hepatol.*. 2002, 799-804.
- .473. 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 randomized trial. *Gut*. 2000, 46 : 562-568.
- .474. Barbaro G., Zechini F., Pellicelli AM., Francavilla R., Scotto G., Bacca D., Bruno M., Babudieri S., Annese M., Matrizzo F., Di Stefano G., Barbarini G., for the Lamivudine Italian Study Group Investigators. Long-term efficacy of interferon alpha-2b and lamivudine in combination compared to lamivudine monotherapy in patients with chronic hepatitis B. An Italian multicenter randomized study. *J. Hepatol.*. 2001, 35 : 406-411.
- .475. Sung JY., Chan HLY., Hui AY., Chan FKL., Chim AML., Wong ML., Leung NWY.. Combination of pegylated interferon and lamivudine is superior to lamivudine monotherapy in the treatment of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.*. 2003, 38 (Suppl. 2) : abstract 95.
- .476. Serfaty L. et al.. Sequential treatment with lamivudine and interferon monotherapies in patients with chronic hepatitis B not interferon alone : results of a pilot study. *Hepatology*. 2001, 34 : 573-577.
- .477. Boni C., Bertoletti A., Penna A., Cavalli A., Pilli M., Urbani S., Scognamiglio P., Boehme R., Panebianco R., Fiaccadori F., Ferrari C.. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J. Clin. Invest.*. 1998, 102 : 968-975.
- .478. Manesis EK., Papatheodoridis GV., Alexopoulou A.. Treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B (CHBE-) with sequential lamivudine (LAM) and interferon alpha (IFN) courses of 12-month duration and a 6-month overlap. *J. Hepatol.*. 2003, 38 (Suppl. 2) : abst. 526.
- .479. Scharma BC., Saron SK., Kumar S., Guptan RC., Kumar R., Kazim SN., Malhotra V.. Higher efficacy of lamivudine and interferon-A vs. Imaivudine monotherapy in patients with HBeAg positive chronic hepatitis B (CHB) : a prospective randomized controlled study.

- .480. Dikici B., Ozgenc F., Kalayci AG., Targan S., Ozkan T., Selimoglu A., Doganci T., Kansu A., Tosun S., Arslan N., Kasirga E., Bosnak M., Haspolat K., Buyukgebiz B., Aydogdu S., Girgin N., Yagci RV.. Current therapeutic approaches in childhood chronic hepatitis B infection: a multicenter study. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004, 19(2) : 127-33.
- .481. Chan HL., Wong VW., Chim AM., Choi PC., Chan HY., Hui AY., Wong GL., Sung JJ.. Virological response to different combination regimes of peginterferon alpha-2b and lamivudine in hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B. *Antivir. Ther.* 2007, 12(5) : 815-23.
- .482. Wursthorn K., Lutgehetmann M., Dandri M., Volz T., Buggisch P., Zollner B., Longerich T., Schirmacher P., Metzler F., Zankel M., Fischer C., Currie G., Brosgart C., Petersen J.. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2006, 44(3) : 675-84.
- .483. Lutgehetmann M., Volz T., Quaas A., Zankel M., Fischer C., Dandri M., Petersen J.. Sequential combination therapy leads to biochemical and histological improvement despite low ongoing intrahepatic hepatitis B virus replication. *Antivir. Ther.* 2008, 13(1) : 57-66.
- .484. Shepherd J., Jones J., Takeda A., Davidson P., Price A.. Adefovir dipivoxil and pegylated interferon alfa-2a for the treatment of chronic hepatitis B: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.* 2006, 10(28):iii-iv, xi-xiv, 1-183.
- .485. Stoop JN., van der Molen RG., Kuipers EJ., Kusters JG., Janssen HL.. Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B. *Virology*. 2007, 361(1) : 141-148.
- .486. Lopez VA., Bourne EJ., Lutz MW., Condreay LD.. Assessment of the COBAS Amplicor HBV Monitor Test for quantitation of serum hepatitis B virus DNA levels. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40(6) : 1972-6.
- .487. Shi M., Zhang Y., Zhu YH., Zhang J., Xu WJ.. Comparison of real-time polymerase chain reaction with the COBAS Amplicor test for quantitation of hepatitis B virus DNA in serum samples. *World J. Gastroenterol.* 2008, 14(3) : 479-483.
- .488. Abe A., Inoue K., Tanaka T., Kato J., Kajiyama N., Kawaguchi R., Tanaka S., Yoshida M., Kohara M.. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37: 2899-2903.
- .489. Ronsin C., Pillet A., Bali C., Denoyel GA.. Evaluation of the COBAS AmpliPrep-total nucleic acid isolation-COBAS TaqMan hepatitis B virus (HBV) quantitative test and comparison to the VERSANT HBV DNA 3.0 assay. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 1390-1399.
- .490. Sum SS., Wong DK., Yuen JC., Lai CL., Yuen MF.. Comparison of the COBAS TaqMan HBV test with the COBAS Amplicor monitor test for measurement of hepatitis B virus DNA in serum. *J. Med. Virol.* 2005; 77: 486-490.
- .491. Pas SD., Fries E., De Man RA., Osterhaus AD., Niesters HG.. Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 2897-2901.
- .492. 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.
- .493. 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.
- .494. Hennig H., Puchta I., Luhm J., Schlenke P., Goerg S., Kirchner H.. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood*. 2002, 100 : 2637-2641.

- .495. 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.
- .496. Singh M., Dicaire A., Wakil AE., Luscombe C., Sacks SL.. Quantitation of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in the liver of HBV-infected patients by LightCycler real-time PCR. *J. Virol. Methods*. 2004, 118(2) : 159-67.
- .497. 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.
- .498. Garrigue I., Boucher S., Couzi L., Caumont A., Dromerc C., Neau-Cransac M., Tabrizi R., Schrive MH., Fleury H., Lafon ME.. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients. *J. Clin. Virol.* 2006, 36 : 72-75.
- .499. Garrigue I., Doussau A., Asselineau J., Bricout H., Couzi L., Rio C., Merville P., Fleury H., Lafon ME., Thiébaud R.. Prediction of Cytomegalovirus (CMV) Plasma Load from Evaluation of CMV Whole-Blood Load in Samples from Renal Transplant Recipients. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46(2) : 493-498.
- .500. Wong DK., Yuen MF., Poon RT., Yuen JC., Fung J., Lai CL.. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2006, 45(4) : 553-9.
- .501. Werle B., Cinquin K., Marcellin P., Pol S., Maynard M., Trépo C., Zoulim F.. Evolution of hepatitis B viral load and viral genome sequence during adefovir dipivoxil therapy. *J. Viral. Hepat.* 2004, 11(1):74-83.
- .502. 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(7) : 5399-5407.
- .503. Köck 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(3):405-13.
- .504. Margeridon S., Carrouée-Durantel S., Chemin I., Barraud L., Zoulim F., Trépo C., Kay A.. Rolling circle amplification, a powerful tool for genetic and functional studies of complete hepatitis B virus genomes from low-level infections and for directly probing covalently closed circular DNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52(9) :3068-73.
- .505. 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.
- .506. 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.
- .507. 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.
- .508. Mulrooney-Cousins PM., Michalak TI.. Persistent occult hepatitis B virus infection: Experimental findings and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* 2007, 13(43) : 5682-5686.
- .509. Michalak TI.. Occult persistence and lymphotropism of hepadnaviral infection: insights from the woodchuck viral hepatitis model. *Immunol. Rev.* 2000, 174 : 98-111.
- .510. Michalak TI., Mulrooney PM., Coffin CS.. Low doses of hepadnavirus induce infection of the lymphatic system that does not engage the liver. *J. Virol.* 2004, 78: 1730-1738.
- .511. 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.

- .512. Menne S., Cote PJ., Butler SD., Toshkov IA., Gerin JL., Tennant BC.. Immunosuppression reactivates viral replication long after resolution of woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology*. 2007, 45 : 614-622.
- .513. Féray 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(6) : 1155-8.
- .514. Hussain M., Soldevila-Pico C., Emre S., Luketic V., Lok AS., NIH HBV-OLT Study Group. Presence of intrahepatic (total and ccc) HBV DNA is not predictive of HBV recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2007, 13(8):1137-44.
- .515. Wong DK., Yuen MF., Poon RT., Yuen JC., Fung J., Lai CL.. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2006, 45(4) : 553-9.
- .516. Faria LC., Gigou M., Roque-Afonso AM., Sebah M., Roche B., Fallot G., Ferrari TC., Guettier C., Dussaix E., Castaing D., Brechot C., Samuel D.. Hepatocellular carcinoma is associated with an increased risk of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2008, 134(7):1890-9.
- .517. Samuel D., Roque-Afonso AM.. New sensitive tools for hepatitis B virus (HBV) detection in liver transplantation: what will be their impact on the prophylaxis of HBV infection? *Liver Transpl.* 2007, 13(8):1137-44.
- .518. Laguno M., Larrousse M., Blanco JL., Leon A., Milinkovic A., Martínez-Rebozler M., Loncá M., Martínez E., Sanchez-Tapias JM., de Lazzari E., Gatell JM., Costa J., Mallolas J.. Prevalence and clinical relevance of occult hepatitis B in the fibrosis progression and antiviral response to INF therapy in HIV-HCV-coinfected patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2008, 24(4) : 547-553.
- .519. Fabrizi F., Messa PG., Lunghi G., Aucella F., Bisegna S., Mangano S., Villa M., Barbisoni F., Rusconi E., Martin P.. Occult hepatitis B virus infection in dialysis patients: a multicentre survey. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2005, 21(11) : 1341-7.
- .520. Peres AA., Dias EA., Chesky M., Alvares-da-Silva MR., Jobim LF., Gonçalves LF., Manfro RC.. Occult hepatitis B in renal transplant patients. *Transpl. Infect. Dis.* 2005, 7(2) : 51-6.
- .521. Demir M., Serin E., Göktürk S., Ozturk NA., Kulaksizoglu S., Ylmaz U.. The prevalence of occult hepatitis B virus infection in type 2 diabetes mellitus patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008, 20(7) : 668-73.
- .522. Kwon CI., Hwang SG., Shin SJ., Chang SW., Kim SY., Ko KH., Hong SP., Park PW., Rim KS., Kang MS., Chung HJ., Hong SP.. Occult hepatitis B virus infection in pregnant woman and its clinical implication. *Liver Int.* 2008, 28(5) : 667-74.
- .523. Behzad-Behbahani A., Mafi-Nejad A., Tabei SZ., Lankarani KB., Torab A., Moaddeb A.. Anti-HBc & HBV-DNA detection in blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen in reducing risk of transfusion associated HBV infection. *Indian J. Med. Res.* 2006, 123(1) : 37-42.
- .524. Torbenson M., Kannangai R., Astemborski J., Strathdee SA., Vlahov D., Thomas DL.. High prevalence of occult hepatitis B in Baltimore injection drug users. *Hepatology*. 2004, 39(1) : 51-7.
- .525. Cabrerizo M., Bartolomé 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(1) : 116-23.
- .526. Piroth L., Lafon ME., Binquet C., Bertillon P., Gervais A., Lootvoet E., Lang JM., De Jaureguiberry JP., Chene G., Lepout C., Co TA., Group AC.. Occult hepatitis B in HIV-HCV coinfecting patients. *Scand. J. Infect. Dis.* 2008, 31:1-5.
- .527. Fabris P., Biasin MR., Giordani MT., Berardo L., Menini V., Carlotto A., Miotti MG., Manfrin V., Baldo V., Nebbia G., Infantolino D.. Impact of occult HBV infection in HIV/HCV co-infected patients: HBV-DNA detection in liver specimens and in serum samples. *Curr. HIV Res.* 2008, 6(2) : 173-9.

- .528. Raffa G., Maimone S., Cargnel A., Santantonio T., Antonucci G., Massari M., Schiavini M., Caccamo G., Pollicino T., Raimondo G.. Analysis of occult hepatitis B virus infection in liver tissue of HIV patients with chronic hepatitis C. *AIDS*. 2007, 21(16) : 2171-5.
- .529. Rai RR., Mathur A., Mathur D., Udawat HP., Nepalia S., Nijhawan S., Mathur A.. Prevalence of occult hepatitis B & C in HIV patients infected through sexual transmission. *Trop. Gastroenterol.* 2007, 28(1) : 19-23.
- .530. Laguno M., Larrousse M., Blanco JL., Leon A., Milinkovic A., Martinez-Rebozler M., Loncá M., Martínez E., Sanchez-Tapias JM., de Lazzari E., Gatell JM., Costa J., Mallolas J.. Prevalence and clinical relevance of occult hepatitis B in the fibrosis progression and antiviral response to INF therapy in HIV-HCV-coinfected patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2008, 24(4) : 547-553.
- .531. Mphahlele MJ., Lukhwareni A., Burnett RJ., Moropeng LM., Ngobeni JM.. High risk of occult hepatitis B virus infection in HIV-positive patients from South Africa. *J. Clin. Virol.* 2006, 35(1) : 14-20.
- .532. Rodríguez-Torres M., Gonzalez-Garcia J., Bräu N., Solá R., Moreno S., Rockstroh J., Smaill F., Mendes-Correa MC., DePamphilis J., Torriani FJ.; APRICOT Investigators. Occult hepatitis B virus infection in the setting of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) co-infection: clinically relevant or a diagnostic problem? *J. Med. Virol.* 2007, 79(6) : 694-700.
- .533. Lo Re V. 3rd, Frank I., Gross R., Dockter J., Linnen JM., Giachetti C., Tebas P., Stern J., Synnestvedt M., Localio AR., Kostman JR., Strom BL.. Prevalence, risk factors, and outcomes for occult hepatitis B virus infection among HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2007, 44(3) : 315-20.
- .534. Nebbia G., Garcia-Diaz A., Ayliffe U., Smith C., Dervisevic S., Johnson M., Gilson R., Tedder R., Geretti AM.. Predictors and kinetics of occult hepatitis B virus infection in HIV-infected persons. *J. Med. Virol.* 2007, 79(10) : 1464-71.
- .535. Shire NJ., Rouster SD., Stanford SD., Blackard JT., Martin CM., Fichtenbaum CJ., Sherman KE.. The prevalence and significance of occult hepatitis B virus in a prospective cohort of HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2007, 44(3) : 309-14.
- .536. Santos EA., Yoshida CF., Rolla VC., Mendes JM., Vieira IF., Arabe J., Gomes SA.. Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003 Feb;22(2):92-8.
- .537. Araujo NM., Branco-Vieira M., Silva AC., Pilotto JH., Grinsztejn B., de Almeida AJ., Trepo C., Gomes SA.. Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients: Evaluation of biochemical, virological and molecular parameters. *Hepatol. Res.* 2008, Jun. 24.
- .538. 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(1) : 22-6.
- .539. Mrani S., Chemin I., Menouar K., Guillaud O., Pradat P., Borghi G., Trabaud MA., Chevallier P., Chevallier M., Zoulim F., Trépo C.. Occult HBV infection may represent a major risk factor of non-response to antiviral therapy of chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 2007, 79(8):1075-81.
- .540. Kao JH., Chen PJ., Lai MY., Chen DS.. Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40(11) : 4068-71.
- .541. Branco F., Mattos AA., Coral GP., Vanderborcht B., Santos DE., França P., Alexandre C.. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in Brazil. *Arg. Gastroenterol.* 2007, 44(1) : 58-63.
- .542. Hui CK., Lau E., Monto A., Kim M., Luk JM., Poon RT., Leung N., Lo CM., Fan ST., Lau GK., Wright TL.. Natural history of patients with recurrent chronic hepatitis C virus and occult hepatitis B co-infection after liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 2006, 6(7) : 1600-8.

- .543. Tanaka T., Inoue K., Hayashi Y., Abe A., Tsukiyama-Kohara K., Nuriya H., Aoki Y., Kawaguchi R., Kubota K., Yoshida M., Koike M., Tanaka S., Kohara M.. Virological significance of low-level hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C virus associated liver disease. *J. Med. Virol.* 2004, 72(2):223-9.
- .544. Lok AS., Liang RH., Chiu EK., Wong KL., Chan TK., Todd D.. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. *Gastroenterology*. 1991, 100 : 182-188.
- .545. Hui CK., Cheung WW., Zhang HY., Au WY., Yueng YH., Leung AY., Leung N., Luk JM., Lie AK., Kwong YL., Liang R., Lau GK.. Kinetics and risk of de novo hepatitis B infection in HBsAg-negative patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *Gastroenterology*. 2006, 131 : 59-68.
- .546. Yeo W., Johnson PJ.. Diagnosis, prevention and management of hepatitis B virus reactivation during anticancer therapy. *Hepatology*. 2006, 43: 209-220.
- .547. Madonia S., Orlando A., Scimeca D., Olivo M., Rossi F., Cottone M.. Occult hepatitis B and infliximab-induced HBV reactivation. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007, 13 : 508-509.
- .548. Lalazar G., Rund D., Shouval D.. Screening, prevention and treatment of viral hepatitis B reactivation in patients with haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 2007, 136 : 699-712
- .549. 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.
- .550. Yuki N., Nagaoka T., Yamashiro M., Mochizuki K., Kaneko A., Yamamoto K., Omura M., Hikiji K., Kato M.. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 2003, 37 : 1172-1179.
- .551. Blackberg J., Kidd-Ljunggren K.. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. *J. Hepatol.* 2000, 33 : 992-997.
- .552. Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I., Squadrito G.. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2007, 46(1) : 160-170.
- .553. 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(1) : 82-85.
- .554. Kohmoto M., Enomoto M., Tamori A., Habu D., Takeda T., Kawada N., Sakaguchi H., Seki S., Shiomi S., Nishiguchi S.. Quantitative detection of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. *J. Med. Virol.* 2005, 75(2) : 235-239.
- .555. Chan HL., Wong VW., Tse AM., Tse CH., Chim AM., Chan HY., Wong GL., Sung JJ.. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2007, 5(12):1462-8.

ANNEXE 1 : EXTRACTIONS DNA EVAL :

12h30 : mettre la centrifugeuse en précooling, les tubes de sérum à dégeler

13h : mettre les tubes de sérum à tourner dans la centrifugeuse, les lymphos au bain marie et les tubes de sang à dégeler

14h : commencer les extractions

| SANG TOTAL | SERUM | LYMPHOS |
|--|--|--|
| <u>Mini Kit DNA Blood</u> | | <u>Mini Kit DNA</u> |
| | Mettre centri en précooling 30 min 4°C (prog P) | |
| | | Ajouter 200µl de PBS stérile 20µl de Protéinase K 180µl Buffer ATL et vortexer 15 sec |
| | Centrifuger 1h 24 000g 4°C (prog 1) avec trait à l'extérieur des tubes | Mettre au moins 1h à 56°C sous agitation (bouton vert bas) |
| | Enlever 800µl de surnageant | |
| Ajouter 20µl Protéase 200µl Buffer AL et vortexer 15 sec | Ajouter 20µl Protéase 5µl Carrier 200µl Buffer AL et vortexer 15 sec | Centrifuger brièvement Ajouter 200µl Buffer AL et vortexer 15 sec |
| Mettre 10min à 70°C | Mettre 10min à 56°C | Mettre 10 min à 70°C |
| Préparer 1 colonne + 3 collecteurs + 1 Eppendorf | | Préparer 1 colonne + 4 collecteurs + 1 Eppendorf |
| Centrifuger brièvement | | |
| Ajouter 200µl Ethanol et vortexer 15 sec | | |
| Centrifuger brièvement | | |
| Faire passer sur colonne en 1 fois (≈ 620µl) | | Faire passer sur colonne en 2 fois (≈ 2 x 410µl) |
| Centrifuger 1min 10 000rpm (ou 6 000g) sur centrifugeuse sous hotte (ou prog 5 sur grosse centrifugeuse si plus de 12 tubes) | | |
| Changer tube collecteur | | |

| |
|--|
| Ajouter 500µl Buffer AW1 |
| Centrifuger 1min 10 000rpm (ou 6 000g) sur centrifugeuse sous hotte (ou prog 5 sur grosse centrifugeuse si plus de 12 tubes) |
| Changer tube collecteur |
| Ajouter 500µl Buffer AW2 |
| Centrifuger 3min 20 000g 20°C (prog 7) sur grosse centrifugeuse |
| Changer tube collecteur |
| Centrifuger 1min 20 000g 20°C (prog 7) sur grosse centrifugeuse |
| Placer les colonnes sur tube Eppendorf |
| Ajouter 200µl Buffer AE |
| Laisser 3min à température ambiante |
| Centrifuger 1min 10 000rpm (ou 6 000g) en mettant 1 tube sur 2 |
| Jeter les colonnes |

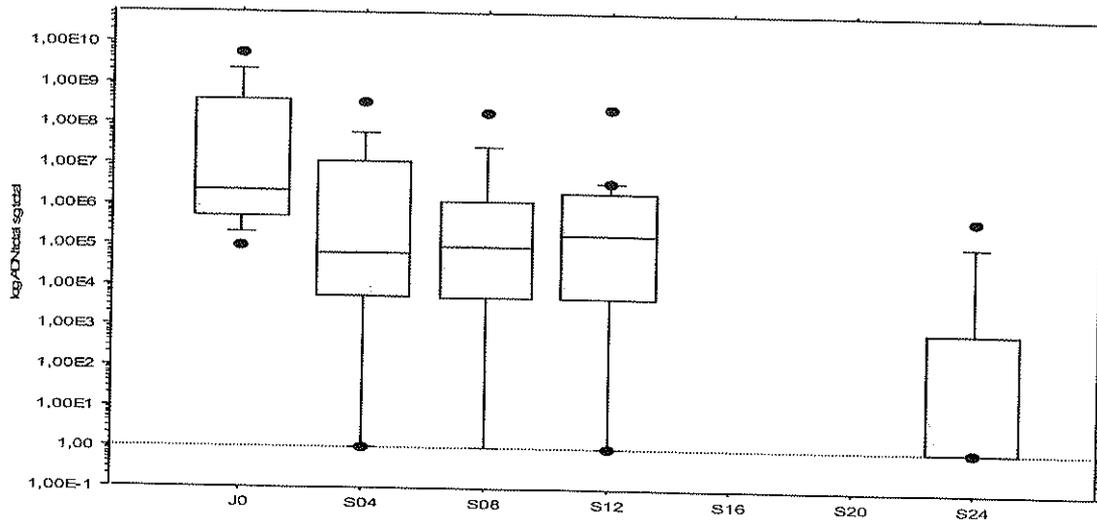
ANNEXE 2 : SEQUENCES D'AMORCES ET SONDAS UTILISEES POUR LA PCR EN TEMPS REEL SUR ALBUMINE ET VIRUS DE L'HEPATITE B.

| Primers and probes | Sequence (5' 3') | Position in HBV genome |
|--------------------|---|------------------------|
| Alb S [Desire] | GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T | |
| Alb AS [Desire] | AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T | |
| Alb probe [Desire] | FAM – CCT GTC ATG CCC ACA CAA ATC TCT CC - TAMRA | |
| HBV tot F [Hennig] | GCA ACT TTT TCA CCT CTG CCT A | 1816 - 1837 |
| HBV tot R [Hennig] | AGT AAC TCC ACA GTA GCT CCA AAT T | 1923 - 1947 |
| DRF1 [Mason] | GTC TGT GCC TTC TCA TCT GC | 1553 - 1572 |
| HBV probe [Hennig] | FAM – TTC AAG CCT CCA AGC TGT GCC TTG GGT GGC - TAMRA | 1863 - 1892 |

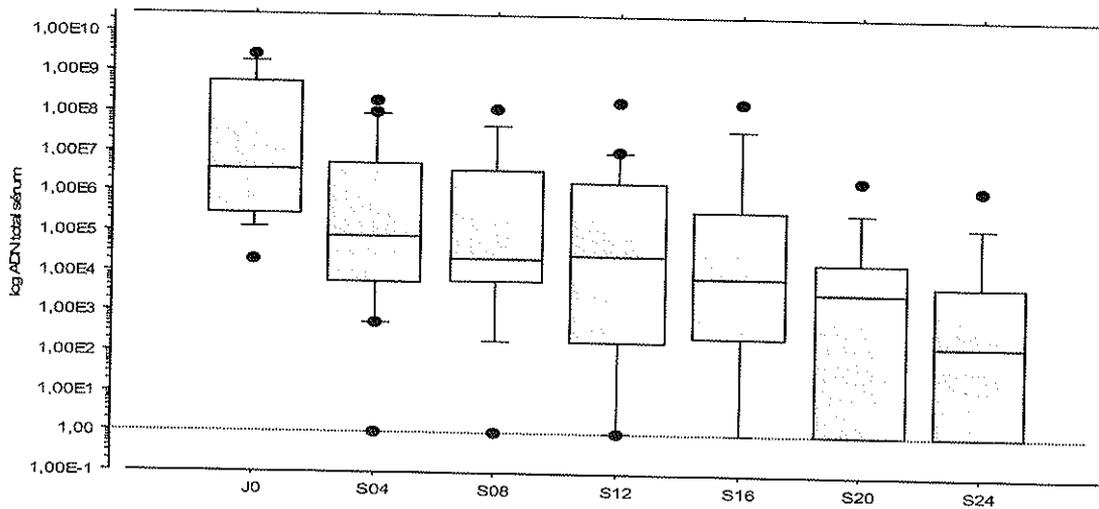
ANNEXE 3 : EVOLUTIONS.

Légende : les lignes du milieu représentent la médiane, les extrémités supérieure et inférieure des boîtes les 25^{ème} et 75^{ème} percentiles, les barres les 10^{ème} et 90^{ème} percentiles, et les points les extrêmes.

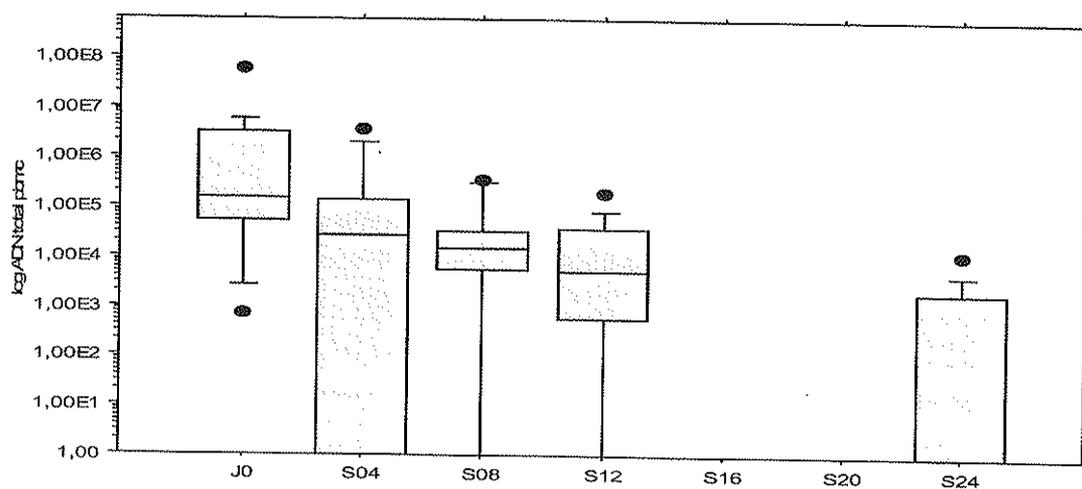
ADN total sang total (log) par période de traitement.



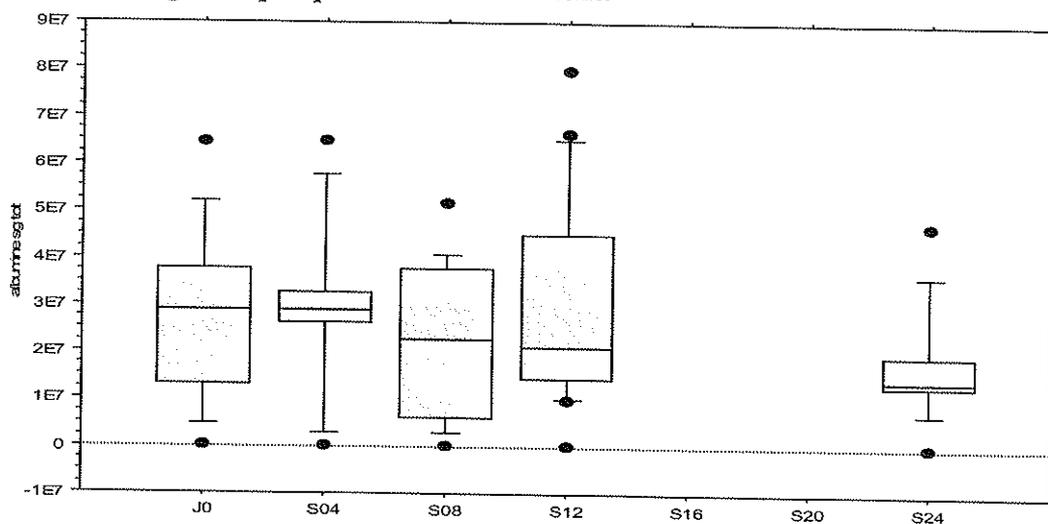
ADN total sérum (log) par période de traitement.



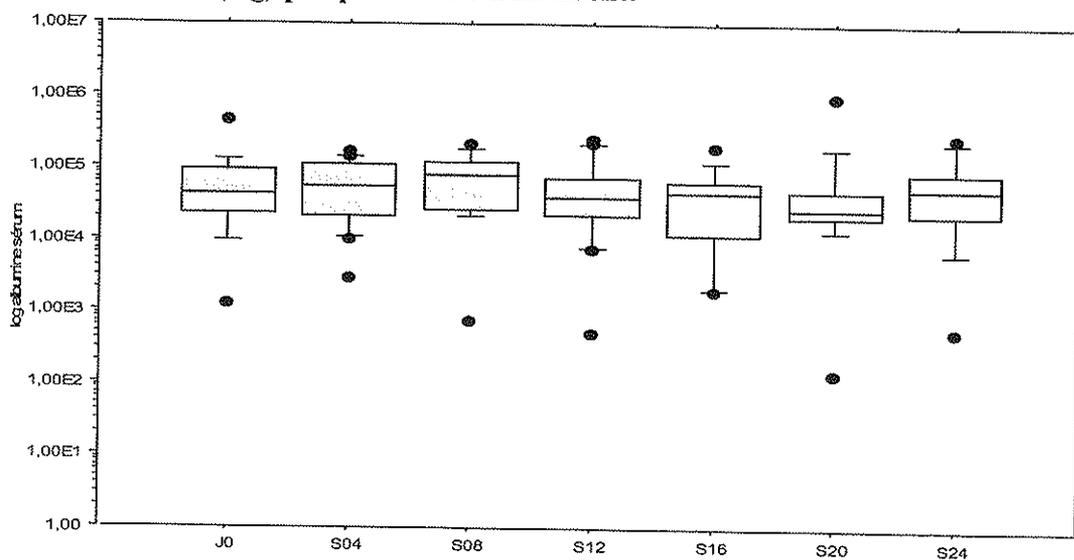
ADN total PBMC (log) par période de traitement.



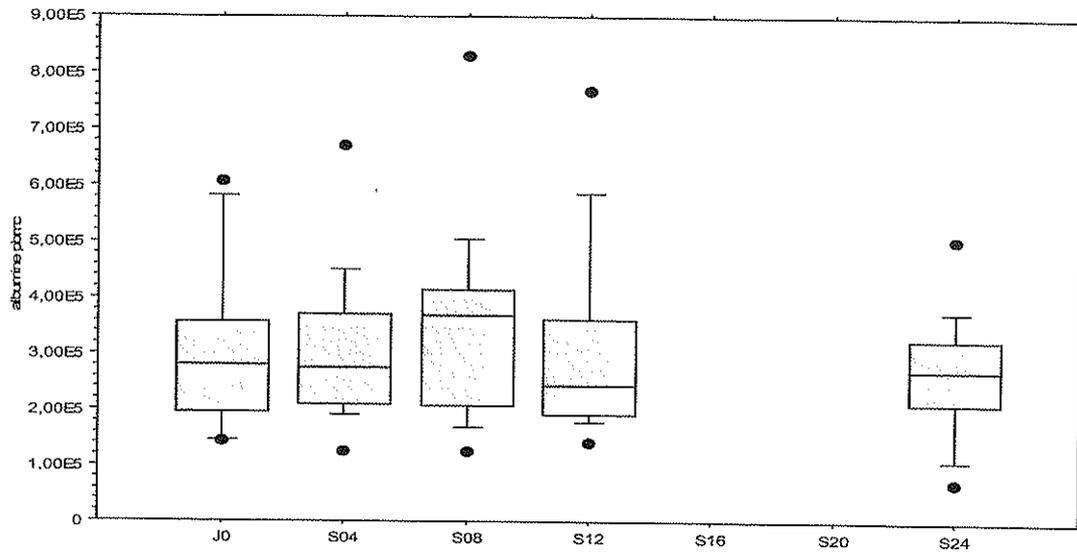
Albumine sang total par période de traitement.



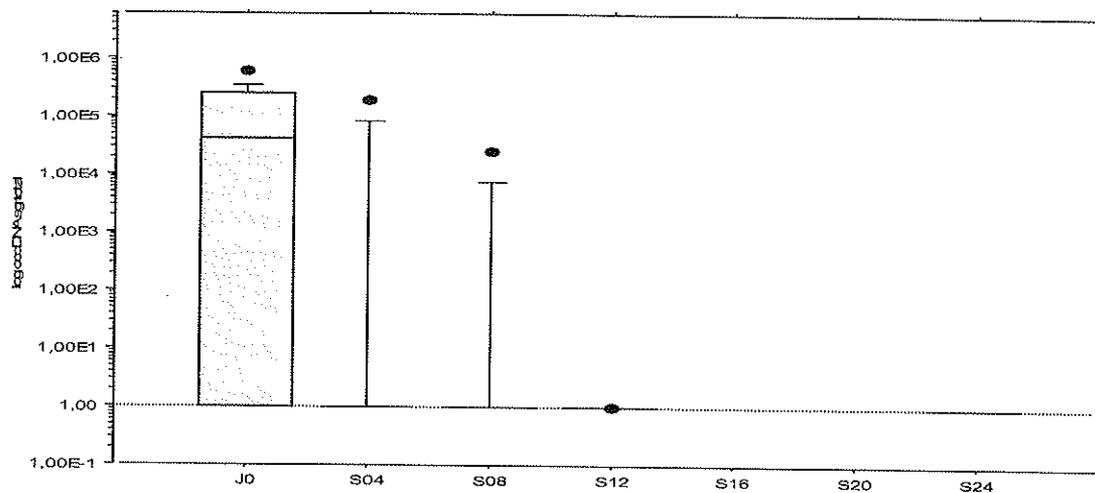
Albumine sérum (log) par période de traitement.



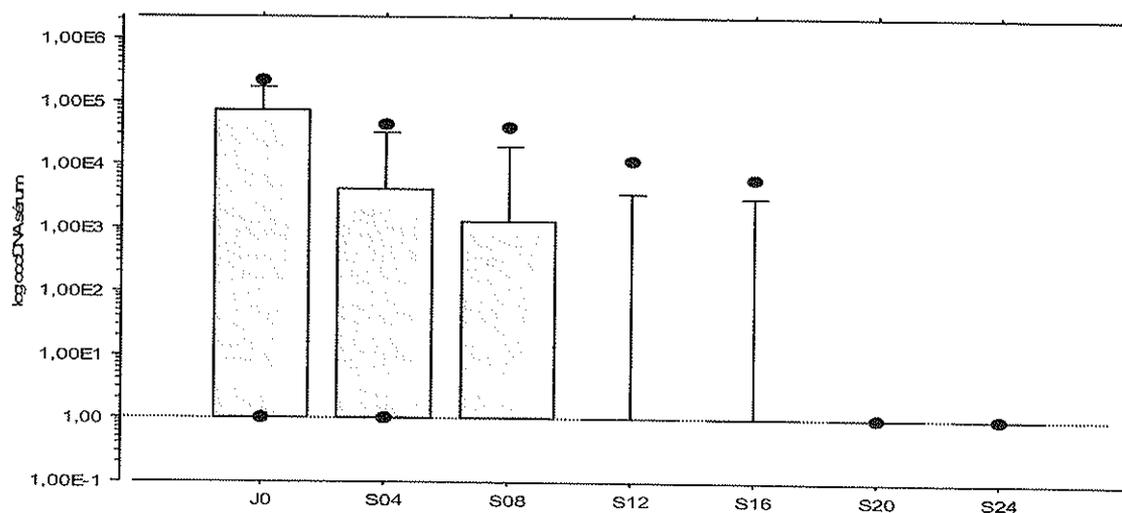
Albumine PBMC par période de traitement.



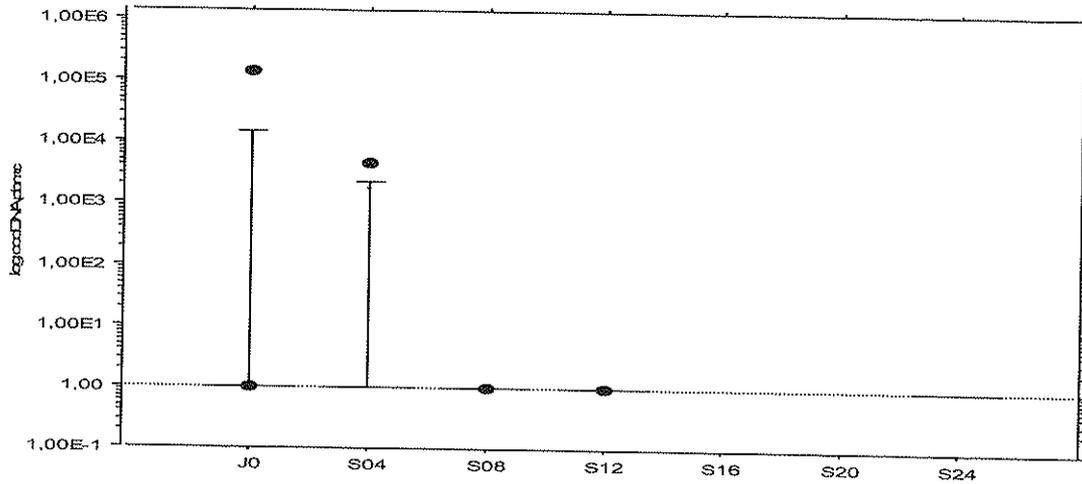
cccDNA sang total (log) par période de traitement.



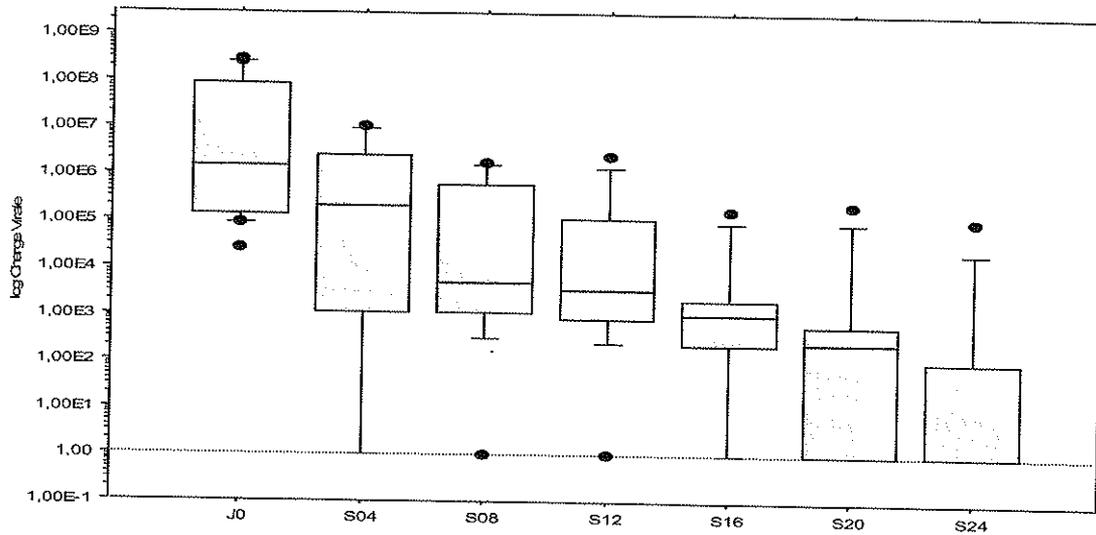
cccDNA sérum (log) par période de traitement.



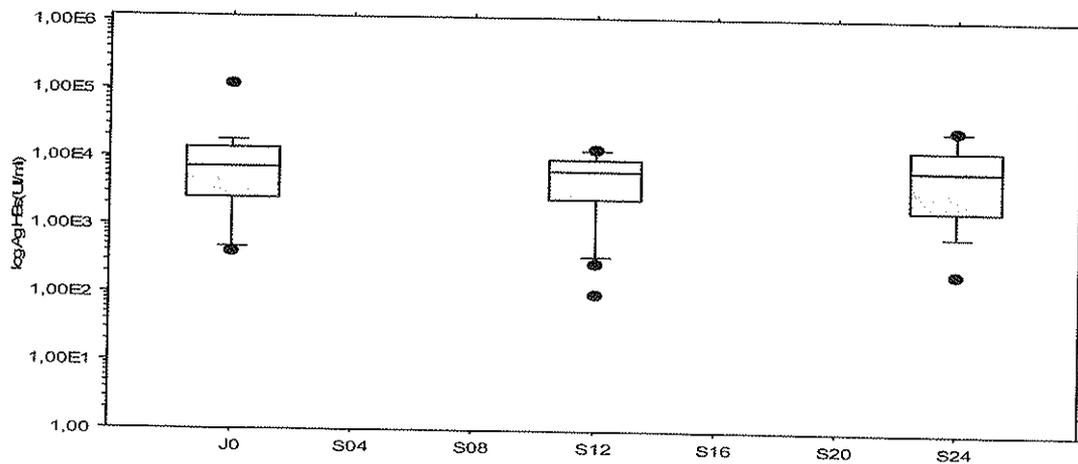
cccDNA PBMC (log) par période de traitement.



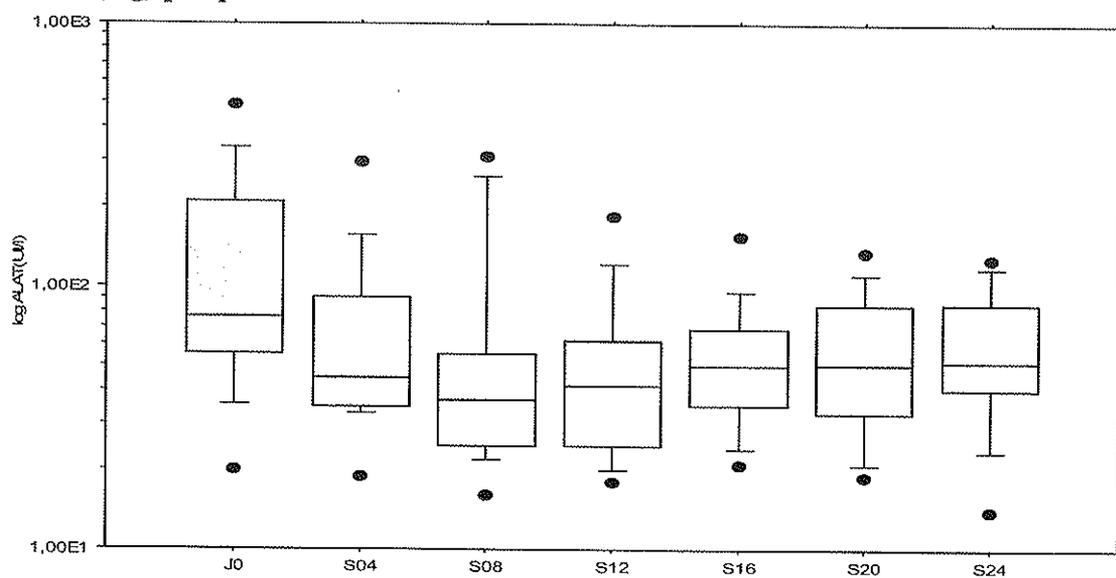
Charge Virale (log) par période de traitement.



AgHBs (log) par période de traitement.



ALAT (log) par période de traitement.



ANNEXE IV

| Lgcs | e- | CV (copies/ml) | SANG TOTAL (copies/ml) | | | SERUM (copies/ml) | | | LYMPHOCYTES | | | Ag HBs (UI/ml) | ALAT (UI/l) | Génotype |
|------|----|-------------------|------------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|------------------|-----------|------------------------|-------------------|----------------|----------|
| | | | albumine | | cccDNA | albumine | | cccDNA | (copies/cellule) | | (copies/10e6 cellules) | | | |
| | | | ADN total | ADN total | ADN total | ADN total | ADN total | albumine | ADN total | cccDNA | | | | |
| N°1 | J0 | 2,914E+08 | | | | 4,384E+05 | 9,756E+08 | 2,212E+05 | 1,453E+05 | 4,424E+06 | 1 | 3795 | 220 | D |
| S5 | | 6,776E+05 | | | | 3,753E+04 | 3,421E+06 | 1 | 2,970E+05 | 8,704E+04 | 1 | | 101 | |
| S8 | | //////// | 4,342E+06 | 1,246E+06 | 1 | | | | 1,744E+05 | 8,498E+04 | 1 | | 57 | |
| S13 | | 3,069E+04 | 1,598E+07 | 3,788E+06 | 1 | 9,012E+04 | 6,376E+05 | 1 | 3,206E+05 | 1,498E+04 | 1 | 4200 | 43 | |
| S16 | | 1,191E+03 | | | | | | | | | | | 72 | |
| S22 | | 2,070E+02 | | | | 3,540E+04 | 1,468E+04 | 1 | | | | | 78 | |
| S26 | | 1 | 1,422E+07 | 1 | //////// | | | | 2,666E+05 | 1 | //////// | pos | 82 | |

| Lgcs | e+ | CV | SANG TOTAL (copies/ml) | | | SERUM (copies/ml) | | | LYMPHOCYTES | | | Ag HBs (UI/ml) | ALAT (UI/l) | Génotype |
|------|----|-----------|------------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|----------|------------------|-----------|------------------------|-------------------|----------------|----------|
| | | | albumine | | cccDNA | albumine | | cccDNA | (copies/cellule) | | (copies/10e6 cellules) | | | |
| | | | ADN total | ADN total | ADN total | ADN total | ADN total | albumine | ADN total | cccDNA | | | | |
| N°2 | S0 | 8,931E+04 | | | | 1,854E+04 | 2,683E+06 | 1 | 1,249E+05 | 3,502E+04 | 1 | 2415 | 78 | E |
| S4 | | //////// | 2,992E+06 | 3,782E+06 | 1 | 2,564E+04 | 1,440E+06 | 1 | 1,741E+05 | 2,256E+04 | 1 | | 61 | |
| S9 | | 1,236E+04 | 3,216E+06 | 1,244E+06 | 1 | 2,261E+04 | 1,824E+06 | 1 | 2,057E+05 | 4,066E+04 | 1 | 1490 | 51 | |
| S13 | | 1,052E+04 | 1,554E+07 | 1,145E+06 | 1 | 1,206E+04 | 1,943E+05 | 1 | | | | | 60 | |
| S17 | | 2,086E+03 | | | | 1,803E+04 | 2,016E+04 | 1 | | | | | 156 | |
| S21 | | 6,380E+02 | | | | 2,289E+04 | 3,146E+04 | 1 | | | | | 136 | |
| S25 | | 9,540E+02 | 7,080E+06 | 1,225E+05 | 1 | | | | 2,701E+05 | 1 | //////// | 1840 | 116 | |

| Lgcs | e+ | CV | SANG TOTAL (copies/ml) | | | SERUM (copies/ml) | | | LYMPHOCYTES | | | Ag HBs (UI/ml) | ALAT (UI/l) | Génotype |
|------|----|-----------|------------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|------------------|-----------|------------------------|-------------------|----------------|----------|
| | | | albumine | | cccDNA | albumine | | cccDNA | (copies/cellule) | | (copies/10e6 cellules) | | | |
| | | | ADN total | ADN total | ADN total | ADN total | ADN total | albumine | ADN total | cccDNA | | | | |
| N°3 | S0 | 6,007E+06 | | | | 6,332E+04 | 1,767E+07 | 2,200E+04 | 3,018E+05 | 2,022E+05 | 1 | pos | 182 | C |
| S4 | | //////// | 3,258E+07 | 3,786E+06 | 1 | 2,513E+04 | 8,712E+04 | 1 | 1,985E+05 | 1,911E+04 | 1 | | 41 | |
| S8 | | 4,793E+03 | 2,378E+07 | 8,884E+05 | 1 | 2,614E+04 | 4,784E+04 | 1 | 2,185E+05 | 5,524E+03 | 1 | | 28 | |
| S12 | | 3,362E+03 | 2,996E+07 | 4,910E+05 | 1 | 3,750E+04 | 2,904E+04 | 1 | 4,029E+05 | 1,159E+03 | 1 | 6900 | 20 | |
| S16 | | 2,330E+02 | | | | 4,796E+04 | 1,136E+03 | 1 | | | | | 25 | |
| S20 | | 4,800E+01 | | | | 9,288E+04 | 3,189E+03 | 1 | | | | | 19 | |
| S24 | | 1 | 1,647E+07 | 1 | //////// | 7,792E+04 | 8,504E+02 | 1 | 1,080E+05 | 3,602E+03 | 1 | 6085 | 14 | |

| Lgcs | e- | CV | SANG TOTAL (copies/ml) | | | SERUM (copies/ml) | | | LYMPHOCYTES | | | Ag HBs (UI/ml) | ALAT (UI/l) | Génotype |
|------|----|-----------|------------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|----------|------------------|-----------|------------------------|-------------------|----------------|----------|
| | | | albumine | | cccDNA | albumine | | cccDNA | (copies/cellule) | | (copies/10e6 cellules) | | | |
| | | | ADN total | ADN total | ADN total | ADN total | ADN total | albumine | ADN total | cccDNA | | | | |
| N°4 | J0 | 2,552E+04 | 2,950E+07 | 2,500E+06 | 1 | 4,252E+04 | 1,364E+05 | 1 | 5,807E+05 | 7,269E+02 | 1 | 1475 | 20 | E |
| S4 | | 1 | 3,130E+07 | 1 | //////// | 1,408E+05 | 1 | //////// | 3,331E+05 | 1 | //////// | | 19 | |
| S8 | | 1 | 3,832E+07 | 1 | //////// | 1,394E+05 | 1 | //////// | 4,688E+05 | 1 | //////// | | 16 | |
| S12 | | 1 | 3,828E+07 | 1 | //////// | 2,547E+05 | 1 | //////// | 3,499E+05 | 1 | //////// | 1025 | 18 | |
| S16 | | 1 | | | | 1,941E+05 | 1 | //////// | | | | | 38 | |
| S20 | | 1 | | | | 3,650E+04 | 1 | //////// | | | | | 21 | |
| S25 | | 1 | 1,376E+07 | 1 | //////// | 5,836E+04 | 1 | //////// | 3,409E+05 | 1 | //////// | 1795 | 42 | |

| Tulle/Orléans | e+ | SANG TOTAL (copies/ml) | | | | SERUM (copies/ml) | | | | LYMPHOCYTES | | | | ALAT (UI/l) | Génotype | |
|---------------|----|------------------------|-----------|-----------|----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|----------|-----------------------------------|---------|-------------|----------|----------------|
| | | CV (copies/ml) | | cccDNA | | albumine | | ADN total | | (copies/cellule) | | (copies/10 ⁶ cellules) | | | | Ag HBs (UI/ml) |
| | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | cccDNA | | | | | |
| N°5 | J0 | 1,250E+05 | 1,878E+05 | 8,798E+05 | 1 | 1,248E+03 | 3,216E+06 | 1 | 2,726E+05 | 1,548E+05 | 1 | 14005 | /////// | D | | |
| S4 | | 1,600E+03 | 1,332E+05 | 2,88E+04 | 1 | 2,821E+03 | 3,204E+04 | 1 | 2,084E+05 | 1,434E+05 | 1 | | /////// | | | |
| S8 | | 9,890E+02 | 1,866E+05 | 1,32E+04 | 1 | 7,338E+02 | 1,451E+04 | 1 | 4,085E+05 | 3,236E+04 | 1 | 11555 | 22 | | | |
| S13 | | 1,629E+03 | 1,071E+05 | 2,29E+05 | 1 | 4,987E+02 | 5,660E+03 | 1 | 5,873E+05 | 3,891E+03 | 1 | | 30 | | | |
| S17 | | 5,700E+02 | | | | 1,934E+03 | 9,384E+03 | 1 | | | | | 27 | | | |
| S21 | | 1 | | | | 1,406E+02 | 4,388E+03 | 1 | | | | | 51 | | | |
| S26 | | 1 | 1,161E+05 | 1 | //////// | 5,456E+02 | 1 | //////// | 1,980E+05 | 1 | //////// | 29010 | 52 | | | |

| Tulle | | e+ | | SANG TOTAL (copies/ml) | | | | SERUM (copies/ml) | | | | LYMPHOCYTES | | | | ALAT (UI/l) | Génotype | |
|-------|----|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|--------|-----------------------------------|--|-------------|----------|----------------|
| | | | | CV (copies/ml) | | cccDNA | | albumine | | ADN total | | (copies/cellule) | | (copies/10 ⁶ cellules) | | | | Ag HBs (UI/ml) |
| | | | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | cccDNA | | | | | |
| N°6 | J0 | 1,850E+06 | 1,969E+07 | 9,442E+04 | 1 | 1,012E+05 | 4,128E+05 | 1 | 2,803E+05 | 1,914E+04 | 1 | 4435 | 491 | | | | | |
| S4 | | //////// | 2,560E+07 | 1 | //////// | 2,319E+04 | 8,732E+02 | 1 | 6,695E+05 | 1 | //////// | | 65 | | | | | |
| S8 | | //////// | 3,726E+07 | 1 | //////// | 3,353E+04 | 2,443E+02 | 1 | 8,306E+05 | 1 | //////// | | 33 | | | | | |
| S11 | | 2,732E+03 | 5,160E+07 | 1 | //////// | 4,248E+04 | 1 | //////// | 2,735E+05 | 1 | //////// | 7615 | 30 | | | | | |
| S16 | | //////// | | | | | | | | | | | 61 | | | | | |
| S20 | | //////// | | | | 2,561E+04 | 1 | //////// | | | | | 33 | | | | | |
| S25 | | 1 | 2,034E+07 | 1 | //////// | 7,100E+04 | 1 | //////// | 3,007E+05 | 1 | //////// | 3775 | 43 | | | | | |

| Lège | | e- | | SANG TOTAL (copies/ml) | | | | SERUM (copies/ml) | | | | LYMPHOCYTES | | | | ALAT (UI/l) | Génotype | |
|------|----|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|--------|-----------------------------------|---|-------------|----------|----------------|
| | | | | CV (copies/ml) | | cccDNA | | albumine | | ADN total | | (copies/cellule) | | (copies/10 ⁶ cellules) | | | | Ag HBs (UI/ml) |
| | | | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | cccDNA | | | | | |
| N°7 | J0 | 1,406E+07 | 3,822E+07 | 9,046E+07 | 2,810E+05 | 1 | 9,464E+03 | 1,175E+07 | 1 | 2,323E+05 | 5,613E+05 | 1 | 12190 | 50 | D | | | |
| S4 | | 2,123E+05 | 2,760E+07 | 1,248E+06 | 1 | 1,921E+04 | 4,228E+05 | 1 | 2,179E+05 | 1,630E+04 | 1 | | 38 | | | | | |
| S8 | | 1,161E+05 | 6,138E+06 | 1,693E+05 | 1 | 2,538E+04 | 2,858E+05 | 1 | 2,356E+05 | 1,066E+04 | 1 | | 37 | | | | | |
| S12 | | 3,213E+04 | 1,262E+07 | 1,396E+05 | 1 | 3,135E+04 | 2,669E+05 | 1 | 1,877E+05 | 5,112E+03 | 1 | 6180 | 31 | | | | | |
| S17 | | 1,730E+03 | | | | 9,988E+03 | 5,060E+03 | 1 | | | | | 50 | | | | | |
| S21 | | 3,030E+02 | | | | 2,630E+04 | 4,028E+04 | 1 | | | | | 33 | | | | | |
| S25 | | 1,100E+02 | 1,291E+07 | 1 | //////// | 8,448E+04 | 2,160E+03 | 1 | 2,650E+05 | 1,443E+03 | 1 | 18365 | 36 | | | | | |

| Angers | | e- | | SANG TOTAL (copies/ml) | | | | SERUM (copies/ml) | | | | LYMPHOCYTES | | | | ALAT (UI/l) | Génotype | |
|--------|----|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|--------|-----------------------------------|--|-------------|----------|----------------|
| | | | | CV (copies/ml) | | cccDNA | | albumine | | ADN total | | (copies/cellule) | | (copies/10 ⁶ cellules) | | | | Ag HBs (UI/ml) |
| | | | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | cccDNA | | | | | |
| N°8 | J0 | 1,462E+05 | 1,168E+07 | 3,288E+05 | 1 | 5,788E+04 | 2,804E+05 | 1 | 3,366E+05 | 4,581E+04 | 1 | 17975 | 59 | E | | | | |
| S4 | | 9,224E+02 | 2,900E+07 | 1,675E+04 | 1 | 1,360E+05 | 2,084E+04 | 1 | | | | | 42 | | | | | |
| S8 | | 1,462E+03 | 1,557E+07 | 2,372E+04 | 1 | 6,400E+04 | 1,451E+04 | 1 | 2,067E+05 | 3,054E+04 | 1 | | 46 | | | | | |
| S11 | | 5,820E+02 | 1,800E+07 | 2,428E+04 | 1 | 1,183E+04 | 2,548E+04 | 1 | 1,923E+05 | 2,376E+04 | 1 | 13545 | 42 | | | | | |
| S15 | | 9,224E+02 | | | | 1,412E+04 | 8,540E+03 | 1 | | | | | 69 | | | | | |
| S19 | | 3,507E+02 | | | | 2,105E+04 | 7,004E+03 | 1 | | | | | 87 | | | | | |
| S24 | | 1 | 1,366E+07 | 1 | //////// | 7,044E+03 | 1 | //////// | 2,891E+05 | 1 | //////// | 11350 | 56 | | | | | |

| Tulle/Orléans | e+ | SANG TOTAL (copies/ml) | | | | SERUM (copies/ml) | | | | LYMPHOCYTES | | | | ALAT (UI/l) | Génotype | |
|---------------|----|------------------------|-----------|--------|-----------|-------------------|--------|-----------|-----------|------------------|--------|-----------------------------------|---|-------------|----------|----------------|
| | | CV (copies/ml) | | cccDNA | | albumine | | cccDNA | | (copies/cellule) | | (copies/10 ⁶ cellules) | | | | Ag HBs (UI/ml) |
| | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | cccDNA | | | | | |
| N°5 | J0 | 1,250E+05 | 8,798E+05 | 1 | 1,248E+03 | 3,216E+06 | 1 | 2,726E+05 | 1,548E+05 | 1 | 14005 | /////// | D | | | |
| S4 | | 1,600E+03 | 2,88E+04 | 1 | 2,82E+03 | 3,204E+04 | 1 | 2,084E+05 | 1,434E+05 | 1 | | /////// | | | | |
| S8 | | 9,890E+02 | 1,866E+05 | 1 | 7,338E+02 | 1,451E+04 | 1 | 4,085E+05 | 3,236E+04 | 1 | | 22 | | | | |
| S13 | | 1,629E+03 | 1,071E+05 | 1 | 4,987E+02 | 5,660E+03 | 1 | 5,873E+05 | 3,891E+03 | 1 | 11555 | 30 | | | | |
| S17 | | 5,700E+02 | | | 1,934E+03 | 9,384E+03 | 1 | | | | | 27 | | | | |
| S21 | | 1 | | | 1,406E+02 | 4,388E+03 | 1 | | | | | 51 | | | | |
| S26 | | 1 | 1,161E+05 | 1 | 5,456E+02 | | 1 | 1,980E+05 | | 1 | 29010 | 52 | | | | |

| Tulle e+ | | SANG TOTAL (copies/ml) | | | | SERUM (copies/ml) | | | | LYMPHOCYTES | | | | ALAT (UI/l) | Génotype | |
|----------|----|------------------------|-----------|-----------|----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|----------|-----------------------------------|--------|-------------|----------|----------------|
| | | CV (copies/ml) | | cccDNA | | albumine | | cccDNA | | (copies/cellule) | | (copies/10 ⁶ cellules) | | | | Ag HBs (UI/ml) |
| | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | | | |
| N°6 | J0 | 1,850E+06 | 1,969E+07 | 9,442E+04 | 1 | 1,012E+05 | 4,128E+05 | 1 | 2,803E+05 | 1,914E+04 | 1 | 4435 | 491 | | | |
| S4 | | /////// | 2,560E+07 | 1 | /////// | 2,319E+04 | 8,732E+02 | 1 | 6,695E+05 | 1 | /////// | | 65 | | | |
| S8 | | /////// | 3,726E+07 | 1 | /////// | 3,353E+04 | 2,443E+02 | 1 | 8,306E+05 | 1 | /////// | | 33 | | | |
| S11 | | 2,732E+03 | 5,160E+07 | 1 | /////// | 4,248E+04 | 1 | 2,735E+05 | 1 | /////// | | 7615 | 30 | | | |
| S16 | | /////// | | | | | | | | | | | 61 | | | |
| S20 | | /////// | | | | 2,561E+04 | 1 | /////// | | | | | 33 | | | |
| S25 | | 1 | 2,034E+07 | 1 | /////// | 7,100E+04 | 1 | 3,007E+05 | 1 | /////// | | 3775 | 43 | | | |

| Lège e- | | SANG TOTAL (copies/ml) | | | | SERUM (copies/ml) | | | | LYMPHOCYTES | | | | ALAT (UI/l) | Génotype | |
|---------|----|------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-----------|----------|-----------|------------------|----------|-----------------------------------|--------|-------------|----------|----------------|
| | | CV (copies/ml) | | cccDNA | | albumine | | cccDNA | | (copies/cellule) | | (copies/10 ⁶ cellules) | | | | Ag HBs (UI/ml) |
| | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | | | |
| N°7 | J0 | 1,406E+07 | 3,822E+07 | 9,046E+07 | 2,810E+05 | 9,464E+03 | 1,175E+07 | 1 | 2,323E+05 | 5,613E+05 | 1 | 12190 | 50 | | | |
| S4 | | 2,123E+05 | 2,760E+07 | 1,248E+06 | 1 | 1,921E+04 | 4,228E+05 | 1 | 2,179E+05 | 1,630E+04 | 1 | | 38 | | | |
| S8 | | 1,161E+05 | 6,138E+06 | 1,693E+05 | 1 | 2,538E+04 | 2,858E+05 | 1 | 2,356E+05 | 1,066E+04 | 1 | | 37 | | | |
| S12 | | 3,213E+04 | 1,262E+07 | 1,396E+05 | 1 | 3,135E+04 | 2,669E+05 | 1 | 1,877E+05 | 5,112E+03 | 1 | 6180 | 31 | | | |
| S17 | | 1,730E+03 | | | | 9,988E+03 | 5,060E+03 | 1 | | | | | 50 | | | |
| S21 | | 3,030E+02 | | | | 2,630E+04 | 4,028E+04 | 1 | | | | | 33 | | | |
| S25 | | 1,100E+02 | 1,291E+07 | 1 | /////// | 8,448E+04 | 2,160E+03 | 1 | 2,650E+05 | 1,443E+03 | 1 | 18365 | 36 | | | |

| Angers e- | | SANG TOTAL (copies/ml) | | | | SERUM (copies/ml) | | | | LYMPHOCYTES | | | | ALAT (UI/l) | Génotype | |
|-----------|----|------------------------|-----------|-----------|----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|----------|-----------------------------------|--------|-------------|----------|----------------|
| | | CV (copies/ml) | | cccDNA | | albumine | | cccDNA | | (copies/cellule) | | (copies/10 ⁶ cellules) | | | | Ag HBs (UI/ml) |
| | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | | | |
| N°8 | J0 | 1,462E+05 | 1,168E+07 | 3,288E+05 | 1 | 5,788E+04 | 2,804E+05 | 1 | 3,366E+05 | 4,581E+04 | 1 | 17975 | 59 | | | |
| S4 | | 9,224E+02 | 2,900E+07 | 1,675E+04 | 1 | 1,360E+05 | 2,084E+04 | 1 | | | | | 42 | | | |
| S8 | | 1,462E+03 | 1,557E+07 | 2,372E+04 | 1 | 6,400E+04 | 1,451E+04 | 1 | 2,067E+05 | 3,054E+04 | 1 | | 46 | | | |
| S11 | | 5,820E+02 | 1,800E+07 | 2,428E+04 | 1 | 1,183E+04 | 2,548E+04 | 1 | 1,923E+05 | 2,376E+04 | 1 | 13545 | 42 | | | |
| S15 | | 9,224E+02 | | | | 1,412E+04 | 8,540E+03 | 1 | | | | | 69 | | | |
| S19 | | 3,507E+02 | | | | 2,105E+04 | 7,004E+03 | 1 | | | | | 87 | | | |
| S24 | | 1 | 1,366E+07 | 1 | /////// | 7,044E+03 | 1 | 2,891E+05 | 1 | /////// | | 11350 | 56 | | | |

| Lges | e- | CV (copies/ml) | | | | SANG TOTAL (copies/ml) | | | | SERUM (copies/ml) | | | | LYMPHOCYTES (copies/cellule) | | | | Ag HBs (UI/ml) | ALAT (UI/l) | Génotype | | |
|------|----|----------------|-----------|-----------|------------|------------------------|-----------|------------|-----------|-------------------|-----------|-----------|--------|------------------------------|-----------|-----------|----------|----------------|-------------|----------|-----------|--------|
| | | albumine | | ADN total | | cccDNA | | albumine | | ADN total | | cccDNA | | albumine | | ADN total | | | | | cccDNA | |
| | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | | | | ADN total | cccDNA |
| N°9 | J0 | 1,342E+05 | 4,874E+07 | 5,732E+05 | 2,016E+03 | 1,000E+00 | 2,050E+04 | 2,056E+04 | 1 | 4,137E+05 | 1,123E+05 | 1 | 2805 | 339 | A | | | | | | | |
| S4 | | 1 | 4,988E+07 | 2,016E+03 | 1 | 9,692E+03 | 5,464E+02 | 1 | 4,052E+05 | 3,458E+03 | 1 | 3495 | 33 | | | | | | | | | |
| S9 | | 5,350E+02 | 3,764E+07 | 3,006E+03 | 1 | 5,736E+04 | 1 | 7,677E+05 | 3,636E+02 | 1 | 1 | 1 | 27 | | | | | | | | | |
| S12 | | ////////// | 6,644E+07 | 5,066E+02 | 1 | 5,484E+04 | 1 | 5,051E+05 | 1 | 1 | 1 | 1 | 23 | | | | | | | | | |
| S16 | | ////////// | | | | | | | | | | | 21 | | | | | | | | | |
| S20 | | 1 | 3,628E+07 | 1 | ////////// | 2,750E+05 | 1 | ////////// | 1 | ////////// | 1 | 5490 | 26 | | | | | | | | | |
| S24 | | 1 | | | | | | | | | | | 26 | | | | | | | | | |

Orléans e-

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|----|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|---|-----------|-----------|------------|-------|----|---|
| N°10 | J0 | 1,117E+06 | 6,442E+07 | 1,529E+06 | 1 | 3,954E+04 | 2,893E+05 | 1 | 6,065E+05 | 7,589E+04 | 1 | 10780 | 55 | D |
| S4 | | ////////// | 5,748E+07 | 4,450E+04 | 1 | 7,700E+04 | 7,624E+04 | 1 | 2,549E+05 | 1 | ////////// | 34 | | |
| S8 | | ////////// | 5,170E+07 | 1,363E+04 | 1 | 1,111E+05 | 2,248E+04 | 1 | 4,039E+05 | 6,118E+03 | 1 | 39 | | |
| S12 | | 1,513E+03 | 5,324E+07 | 9,770E+03 | 1 | 2,228E+05 | 8,944E+03 | 1 | 3,739E+05 | 1 | ////////// | 45 | | |
| S16 | | 1,397E+04 | | | | 4,732E+04 | 3,452E+02 | 1 | | | | 112 | | |
| S22 | | ////////// | | | | 9,963E+05 | 3,97E+02 | 1 | | | | 128 | | |
| S26 | | ////////// | 2,148E+07 | 1 | ////////// | 1,741E+05 | 5,624E+03 | 1 | | | | | | |

Lges 11 e+

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|----|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|---|
| N°12 | J0 | 2,490E+08 | 5,832E+06 | 7,240E+08 | 2,343E+05 | 3,850E+04 | 6,408E+08 | 7,220E+04 | 3,643E+05 | 2,404E+06 | 2,862E+03 | 120335 | 83 | E |
| S4 | | 2,970E+06 | 3,250E+07 | 1,464E+07 | 1,868E+05 | 2,410E+04 | 7,372E+06 | 3,274E+04 | 4,172E+05 | 1,267E+05 | 1 | 125 | | |
| S8 | | ////////// | | | | | | | | | | ////////// | | |
| S12 | | 1,400E+06 | 9,836E+06 | 3,152E+06 | 1 | 3,840E+04 | 3,810E+06 | 1 | 1,952E+05 | 8,386E+04 | 1 | 13655 | 63 | |
| S15 | | ////////// | | | | 4,496E+04 | 1,000E+06 | 1 | | | | 39 | | |
| S20 | | 2,979E+04 | | | | 2,728E+04 | 1,278E+05 | 1 | | | | 92 | | |
| S24 | | 1,297E+04 | 1,454E+07 | 4,126E+04 | 1 | 3,192E+04 | 2,818E+04 | 1 | 3,065E+05 | 1,234E+04 | 1 | 26705 | ////////// | |

Lges 12 e+

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|----|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----|---|
| N°14 | J0 | 2,590E+08 | 2,876E+07 | 1,368E+09 | 2,865E+05 | 2,684E+04 | 1,933E+09 | 1,707E+05 | 2,653E+05 | 5,925E+07 | 1,502E+04 | 7145 | 323 | A |
| S4 | | 1,090E+07 | 3,108E+07 | 6,004E+07 | 2,03E+04 | 1,649E+05 | 1,006E+08 | 4,444E+04 | 3,705E+05 | 1,886E+06 | 4,606E+03 | 299 | | |
| S8 | | 7,828E+05 | 3,060E+07 | 6,208E+06 | 6,42E+05 | 8,812E+04 | 2,974E+07 | 2,572E+03 | 3,341E+05 | 3,194E+05 | 1 | 315 | | |
| S12 | | 1,393E+05 | 2,430E+07 | 8,026E+05 | 1 | 8,740E+04 | 1,997E+06 | 1 | 2,422E+05 | 6,040E+04 | 1 | 5120 | 122 | |
| S16 | | ////////// | | | | 9,918E+04 | 3,800E+04 | 1 | | | | ////////// | | |
| S21 | | 5,590E+02 | | | | 1,457E+04 | 2,296E+03 | 1 | | | | 82 | | |
| S25 | | 8,900E+01 | 4,708E+07 | 1,171E+03 | 1 | 2,210E+05 | 3,673E+02 | 1 | 7,077E+04 | 2,196E+03 | 1 | 8225 | 84 | |

| e- Clermont 13 | CV (copies/ml) | SANG TOTAL (copies/ml) | | SERUM (copies/ml) | | LYMPHOCYTES (copies/cellule) | | | Ag HBs (UI/ml) | ALAT (UI/l) | Génotype | | |
|-------------------|-------------------|------------------------|-----------|-------------------|-----------|---------------------------------|----------|-------------|-------------------|----------------|----------|-----------|--------|
| | | albumine | ADN total | cccDNA | albumine | ADN total | cccDNA | Lymphocytes | | | | | |
| | | | | | | | | albumine | | | | ADN total | cccDNA |
| N°16 J0 | 2,609E+05 | 3,760E+07 | 2,354E+05 | 1 | 1,304E+05 | 2,545E+05 | 1 | 1,830E+05 | 2,717E+03 | 1 | 475 | 57 | D |
| S4 | //////// | 6,470E+07 | 1 | //////// | 7,108E+04 | 1,438E+03 | 1 | 3,261E+05 | 1 | //////// | | 61 | |
| S8 | //////// | | | | 2,139E+05 | 4,716E+02 | 1 | | | | | 65 | |
| S12 | 2,444E+02 | 7,992E+07 | 1 | //////// | 2,021E+04 | 1 | //////// | 1,898E+05 | 1 | //////// | 285 | 99 | |
| S16 | //////// | | | | 7,168E+04 | 1 | //////// | | | | | 81 | |
| S20 | //////// | | | | | | | | | | | 58 | |
| S24 | 1 | 1,369E+07 | 1 | //////// | 3,921E+04 | 1 | //////// | 2,479E+05 | 1 | //////// | 855 | 93 | |

Orléans 14 e+

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---|-------|----------|---|
| N°17 J0 | 7,915E+07 | 1,343E+07 | 5,716E+09 | 1,267E+05 | 2,168E+04 | 2,785E+09 | 7,214E+04 | 1,822E+05 | 5,900E+06 | 1 | 13765 | 73 | E |
| S4 | 1,219E+06 | 2,780E+07 | 3,426E+08 | 3,827E+04 | 1,060E+05 | 1,992E+08 | 5,390E+03 | 2,027E+05 | 3,561E+06 | 1 | | 158 | |
| S8 | 1,740E+06 | 2,158E+07 | 1,931E+08 | 2,533E+04 | 1,693E+05 | 1,236E+08 | 1,061E+04 | 4,336E+05 | 3,450E+05 | 1 | | 262 | |
| S12 | 2,508E+06 | 1,676E+07 | 2,578E+08 | 9,56E+04 | 7,328E+03 | 1,968E+08 | 1,183E+04 | 1,776E+05 | 1,923E+05 | 1 | 10150 | 186 | |
| S17 | //////// | | | | 2,031E+03 | 1,994E+08 | 5,980E+03 | | | | | //////// | |
| S20 | //////// | | | | | | | | | | | | |
| S24 | //////// | | | | | | | | | | | | |

Lges 15 e-

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----|----------|---|
| N°18 J0 | 4,481E+05 | 2,216E+07 | 2,258E+06 | 8,936E+04 | 1,095E+05 | 3,618E+06 | 1 | 1,431E+05 | 1,433E+05 | 1,393E+05 | 405 | 36 | C |
| S4 | 2,091E+04 | 1,243E+07 | 6,386E+04 | 1 | 7,696E+04 | 1,048E+04 | 1 | 2,233E+05 | 1,294E+04 | 1 | | 45 | |
| S8 | 3,864E+03 | 1,152E+07 | 5,230E+03 | 1 | 9,672E+04 | 8,208E+03 | 1 | 1,239E+05 | 9,144E+03 | 1 | | 24 | |
| S11 | 3,350E+02 | 1,349E+07 | 1,542E+05 | 1 | 2,434E+04 | 4,008E+02 | 1 | 1,398E+05 | 4,350E+03 | 1 | 100 | //////// | |
| S16 | 1 | | | | 1,543E+04 | 1 | //////// | | | | | 39 | |
| S20 | 1 | | | | 2,261E+04 | 1 | //////// | | | | | 35 | |
| S24 | 1 | 8,808E+06 | 1 | //////// | 1,257E+04 | 1 | //////// | 1,284E+05 | 1 | //////// | 220 | //////// | |

Angers16 e+

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---|-------|----|---|
| N°19 J0 | 9,659E+07 | 3,380E+07 | 2,900E+08 | 5,928E+05 | 4,780E+04 | 3,263E+08 | 1,705E+05 | 3,246E+05 | 3,303E+06 | 1 | 10555 | 77 | E |
| S4 | 8,221E+06 | 2,838E+07 | 2,584E+07 | 1 | 1,108E+05 | 4,624E+07 | 1,000E+00 | 4,254E+05 | 2,099E+05 | 1 | | 34 | |
| S8 | 1,566E+06 | 3,936E+07 | 9,276E+06 | 1 | 7,988E+04 | 1,054E+07 | 1,000E+00 | 4,131E+05 | 1,869E+04 | 1 | | 23 | |
| S12 | 5,558E+05 | 3,130E+07 | 3,244E+06 | 1 | 5,000E+04 | 1,168E+07 | 1 | 3,656E+05 | 1,470E+04 | 1 | 8870 | 23 | |
| S17 | 1,781E+05 | | | | 6,252E+04 | 2,522E+06 | 1 | | | | | 52 | |
| S20 | 2,426E+05 | | | | 4,812E+04 | 2,315E+06 | 1 | | | | | 46 | |
| S24 | 1,161E+05 | 1,444E+07 | 5,504E+05 | 1 | 4,540E+04 | 1,463E+06 | 1 | 3,300E+05 | 4,476E+03 | 1 | 8005 | 43 | |

SERMENT D'HIPPOCRATE :

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire. Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément. Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés. J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

Serment d'Hippocrate actualisé en 1996

(Professeur Bernard HOERNI,

Bulletin de l'Ordre des Médecins).

BON A IMPRIMER N° 3146.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Le cccDNA est une forme répliquative du virus de l'hépatite B (HBV) intra-hépatocytaire. Il a été aussi retrouvé dans les PBMC (peripheric blood mononuclear cells), qui pourraient ainsi jouer un rôle réservoir dans les infections B occultes. En revanche, aucune donnée n'est disponible chez les patients Ag HBs+ virémiques avant et sous traitement. Nous avons conduit une étude virologique observationnelle prospective dans une population Ag HBs+ traitée par adéfovir dipivoxil pendant 3 mois puis interféron pégylé $\alpha 2a$ /adéfovir dipivoxil. L'ADN total (ADNt) et le cccDNA ont été recherchés et suivis dans le sang total, le sérum et les PBMC, par PCR temps réel maison LightCycler sensible et spécifique chez 16 patients. L'ADNt dans les PBMC était corrélé à l'ADNt dans le sérum. Le cccDNA était présent dans le sérum et les PBMC de 6/16 et 3/16 patients respectivement avec un ratio cccDNA/ADNt inférieur à 1 %. Sous traitement, 9 patients ont un ADNt négatif à S24. Le cccDNA se négative avant S12 dans le sérum et les PBMC. En conclusion, le cccDNA est présent en très faible quantité dans le sérum et les PBMC des patients AgHBs+ virémiques, contrairement aux patients atteints d'affection occulte suggérant un rôle différent. Il ne peut constituer ainsi un marqueur de suivi virologique dans cette population. Ces résultats restent à confirmer sur toute la durée du traitement et avec les techniques de nouvelle génération.

CccDNA and hepatitis B virus DNA's evolution in PBMC, serum and total blood during treatment by adefovir dipivoxil and pegylated interferon $\alpha 2a$ in chronic hepatitis.

CccDNA is a replicative form of hepatitis B virus (HBV) mainly described in hepatocytes. Its role in PBMC (peripheric blood mononuclear cells), serving as an active reservoir, has been suggested in HBsAg-negative populations. However, it has never been studied in HBsAg+ patients undergoing treatment.

Sixteen hepatitis B patients, prospectively were assigned a combination therapy of adefovir dipivoxil and pegylated interferon $\alpha 2a$. Total DNA (tDNA) and cccDNA were measured in blood, serum and PBMC with a sensitive and specific "in-house" real-time polymerase chain reaction (PCR) (LightCycler).

tDNA values were correlated in serum and PBMC. CccDNA was found in 6 patients' sera and in 3 patients' PBMC with a ratio of cccDNA/tDNA under 1 %. At the end of the follow-up (24 weeks), 9 patients' samples were undetectable for tDNA. CccDNA in serum and PBMC were not detected after the 12th week. To conclude, taking into account the limits of our method for cccDNA detection, cccDNA doesn't seem to have a major role in HBsAg+ patients with detectable viremia contrary to patients with occult infection. It will probably not be an available method for virological follow-up under treatment. These results have to be confirmed by a longer follow-up and with the most recent amplification methods.

Discipline : Médecine. Hépatogastroentérologie.

Mots clés : cccDNA, virus de l'hépatite B, AgHBs+, PBMC, PCR temps réel maison.

Key words : cccDNA, hepatitis B virus, HBs-positive, PBMC, « in house » real time PCR.

Adresse : Laboratoire de Virologie (Bactériologie-Virologie-Hygiène). CHU de Limoges. 2, ave. ML. King.87042 Limoges.