



HAL
open science

Variabilité génétique du virus de l'hépatite B et implication sur le diagnostic et la pathogénèse

Nora Martel

► **To cite this version:**

Nora Martel. Variabilité génétique du virus de l'hépatite B et implication sur le diagnostic et la pathogénèse. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I; Fundação Oswaldo Cruz, 2012. Français. NNT : 2012LYO10026 . tel-00865253

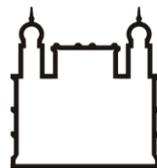
HAL Id: tel-00865253

<https://theses.hal.science/tel-00865253>

Submitted on 24 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre 026/2012

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

préparée en cotutelle avec

La FIOCRUZ Rio de Janeiro

et l'école doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Variabilité génétique du virus de l'hépatite B et implication sur le diagnostic et la pathogénèse

Diplôme de doctorat de biologie

(arrêté du 7 août 2006 / arrêté du 6 janvier 2005)

soutenue publiquement le 16 Mars 2012

par

Mlle Nora Martel

Dr Dina Kremsdorf
Dr Flor Pujol
Pr Sophie Alain
Pr Bruno Lina
Dr Selma de Andrade Gomes
Dr Alan Kay

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur,
Co-encadrante
Directeur de thèse

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé pendant ces trois années et sans qui ce travail n'aurait pas abouti:

Tout d'abord je souhaite remercier:

Les membres de mon jury de thèse, le Dr Dina Kremsdorf, le Dr Flor Pujol, le Pr Sophie Alain et le Pr Bruno Lina pour avoir accepté d'évaluer mon travail;

Le Pr Alain Puisieux de m'avoir accueillie dans le Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon ;

Le Pr Fabien Zoulim de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant mon année de Master 2 et ces 3 années de thèse;

Le Dr Isabelle Chemin, le Pr Philippe Merle et le Pr Christian Trépo de m'avoir intégré dans leur équipe;

Le Dr Selma de Andrade Gomes et le Dr Alan Kay de m'avoir encadré;

Les membres de mon comité de suivi de thèse le Dr Isabelle Chemin, le Dr Olivier Hantz et le Dr Patrick Soussan, pour leurs disponibilités et leurs conseils;

Les membres de l'unité U871, Maud et Christian pour leurs conseils techniques, Marie-Agnès, Hervé, Fabien, Lavoc, Ivi pour leur présence tout au long de ces 3 années et leur soutien lors des coups de panique;

Les membres du laboratoire de Virologia molecular de Rio de Janeiro pour leur accueil si chaleureux et leur aide lors de mes voyages à Rio. Je remercie tout particulièrement Monique et Caroline et leur famille de m'avoir hébergé et fait partager leur vie Carioca. Je remercie bien évidemment Baby, Chico, Fino, Flavia, Kelly, Nathalia, Leo, Oscar, Vanessa et tous les autres...

Les membres du laboratoire de Virologie de l'IVIC pour leur accueil et les visites de Caracas.

Enfin je remercie très chaleureusement amis et famille qui ont été à mes côtés.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur: M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur: M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur: M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur: M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur: M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur: M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur: M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur: M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur: Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur: M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur: M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur: M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur: M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur: Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur: Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur: M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur: M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur: M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur: M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur: M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur: M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur: M. R. Bernard

Table des matières

Liste des abréviations	6
Table des figures.....	8
Table des tableaux	9
Chapitre 1: Le virus de l'hépatite B.....	11
1. La famille des hépadnavirus	11
2. Le virus.....	13
3. Organisation génétique	15
3.1 Nomenclature.....	15
3.2 Les cadres ouverts de lectures	16
3.3 Régulation génétique	16
3.4 Promoteurs et transcrits	18
3.5 Epissage et particules défectives.....	20
4. Les protéines virales	20
4.1 La polymérase.....	20
4.2 L'antigène HBc	22
4.3 L'antigène HBe	24
4.4 Les protéines de surface.....	24
4.4.1 Topologies et modifications post-traductionnelles des protéines de surface	26
4.4.2 L'antigène HBs.....	28
4.4.3 La protéine PrÉS2	30
4.4.4 La protéine PrÉS1	30
4.5 L'antigène HBx	30
4.6 La protéine non structurale HBSP	32
5. Le cycle viral	34
6. La prévalence du virus de l'hépatite B.....	38
Chapitre 2: La variabilité du HBV	40
1. La variabilité génotypique	40
1.1 Les sérotypes	40
1.2 Les géotypes	42
1.2.1 Caractéristiques physiques des géotypes	44
1.2.2 Les géotypes A à H.....	44
1.2.2.1 Le géotype I.....	48
1.2.2.2 Le géotype J.....	49
1.3 Sur-infection et souches recombinantes	50
1.4 Géotypes et influence sur la maladie hépatique.....	52
2. La variabilité phénotypique	54
2.1 Réservoirs du HBV et immunotolérance	54
2.2 L'infection par le HBV.....	55
2.2.1 L'infection aiguë	55
2.2.2 L'infection chronique.....	56
2.2.2.1 Les phases de l'infection chronique et la variabilité virale	57
2.2.2.2 Les particules défectives.....	59
2.2.3 Les mutants HBV	61
2.2.3.1 Les mutants PréC/C	61
2.2.3.1.1 Les mutants PréCore et altération de la synthèse de l'AgHBe.....	61
2.2.3.1.2 Les mutants PréCore et altération de la transcription	65
2.2.3.2 Les mutants Core	65
2.2.3.2.1 Les mutants Core par substitutions et insertions.....	65
2.2.3.2.2 Les mutants Core par délétions.....	66
2.2.3.3 Les mutants de la protéine X	67
2.2.3.4 Les mutants de la polymérase	68

2.2.3.5	Les mutants des protéines de surface.....	70
2.2.3.5.1	Les mutants S.....	71
2.2.3.5.2	Les sérotypes dans les phénomènes d'échappement.....	74
2.2.3.5.3	Les mutants Prés1 et Prés2.....	75
2.2.3.1	Chevauchement des gènes Pol/S, implication dans les phénomènes de résistances.....	75
2.2.4	L'infection occulte.....	79
2.2.4.1	Définition.....	79
2.2.4.2	Importance de la molécule d'ADNccc et des réservoirs extrahépatiques.....	81
2.2.4.3	Absence de détection de l'AgHBs et le système immunitaire.....	82
2.2.4.4	Co-infections virales.....	82
2.2.4.4.1	Coinfection HBV/HCV.....	83
2.2.4.4.2	Coinfection HBV/HIV.....	83
2.2.4.5	Absence de détection l'AgHBs et des transcrits Prés2/S.....	85
Objectifs des travaux de recherche.....		86
Etude 1: Développement d'une nouvelle méthode d'amplification des génomes entiers de HBV.....		89
	Introduction.....	89
	Amplification de génomes entiers de HBV à partir d'une matrice d'ADN relâché circulaire.....	89
	Amplification de génomes entiers de HBV à partir d'une matrice d'ADN circulaire clos de manière covalente.....	91
	Développement d'une nouvelle méthode d'amplification de génomes entiers de HBV.....	92
	Matériels et méthodes.....	93
	Résultats.....	95
	Discussion.....	99
	Vers une application de cette méthode d'amplification à l'analyse de quasi-espèces virales.....	103
	Matériels et méthodes.....	103
	Résultats.....	105
	Discussion.....	106
Etude 2.....		110
	Expression of hepatitis B virus (HBV) surface antigen containing Y100C variant frequently detected in occult HBV infection.....	110
	Introduction.....	110
Article 1.....		112
	Discussion.....	116
Etude 3.....		118
	Probable corticosteroid-induced reactivation of a latent HBV infection in an HIV-positive patient involving immune-escape.....	118
	Introduction.....	118
Article 2.....		121
	Discussion.....	130
Conclusions générales et perspectives.....		134
Annexe.....		138
Etude 4.....		139
	Détection d'infections HBV occultes chez une cohorte Brésilienne HIV+/AgHBs- et analyse moléculaire.....	139
	Introduction.....	139
	Matériels et méthodes.....	140
	Résultats.....	141
	Discussion.....	143
Présentation des travaux.....		146
Bibliographie.....		147

Liste des abréviations

a: déterminant sérotypique majeur de l'AgHBs
aa : acide aminé
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNccc: ADN circulaire clos de manière covalente
ADN-RC: ADN relâché circulaire
ADNss: ADN simple brin
AgHBc: antigène HBc
AgHBe: antigène HBe
AgHBs: antigène HBs
ARN: acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ARNpg: ARN pré-génomique
ALAT: alanine aminotransférase
ASAT: aspartate aminotransférase
C: gène codant l'AgHBe et l'AgHBc
CHC: carcinome hépatocellulaire
DHBV: Duck Hepatitis B Virus
DR1/2: région répétée 1/2 (direct repeat)
d/y: déterminants sérotypiques *d* ou *y*
Enh1/2: enhanceur de transcription
GAPDH: glyceraldehyde phosphate deshydrogenase
GRE: glucocorticoïde responsive element
GR : glucocorticoïde
FTC : emtricitabine
HAART: highly active antiretroviral treatment
HBc: protéine core de l'AgHBc
HBe: protéine précore de l'AgHBc
HBIG: immunoglobuline anti-HBV
HBs : protéine majeure de l'enveloppe virale
HBSP: Hepatitis B spliced protein
HBV: Hepatitis B Virus
HCV: Hepatitis C Virus
HIV: Human Immunodeficiency Virus
HNF1: Hepatocyte nuclear factor 1
kb: kilo base
KDa: kilo dalton
L: grande protéine de surface
M: moyenne protéine de surface
NLS: nuclear localization signal
nt: nucléotide
OBI: Occult B Infection
P: gène P codant la polymérase virale
PBMC: poly blood mononuclear cell
PCR: polymerisation chain reaction
pDC: plasmaticoid dendritic cell
Pol: polymérase virale
PRE: posttranscriptional regulatory element
S : gène S
RCA: rolling circle amplification
RE: réticulum endoplasmique
RMH: region majeure hydrophile
RT : reverse transcriptase

r/w: déterminant sérotypique r ou w
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
TP: terminal protein
WHV: Woodchuck Hepatitis Virus
WMHBV: Woolly Monkey Hepatitis B Virus
WT : wilde type
X : protéine X

Table des figures

Figure 1: Arbre phylogénétique de la famille des hépadnavirus.....	10
Figure 2: Schéma des particules virales.....	10
Figure 3: Carte génétique et transcriptionnelle du HBV.....	12
Figure 4: Nomenclature des gènes Pol et S en fonction du génotype de la souche virale.....	14
Figure 5: Les principaux variants d'épissage du HBV.....	19
Figure 6: La protéine polymérase et ses sous-domaines.....	21
Figure 7: Synthèse des antigènes HBc et HBe.....	23
Figure 8: Représentation des protéines L, M et S.....	25
Figure 9: Conformation des protéines S et M.....	25
Figure 10: Représentation conformationnelle en 2 dimensions de la protéine S.....	27
Figure 11: Représentation de la boucle antigénique majeure.....	27
Figure 12: Conformations de la protéine L.....	29
Figure 13: Formation de la protéine HBSP issu de l'épissage de l'ARNpg.....	31
Figure 14: Cycle viral du HBV.....	33
Figure 15: Les principales étapes du cycle de réplication du HBV.....	35
Figure 16 : Distribution géographique mondiale de l'infection par le HBV en 2006.....	37
Figure 17: Arbre phylogénétique composé par les génotypes du HBV et les souches simiennes.....	41
Figure 18 : Distribution mondiale des génotypes et sérotypes de HBV.....	43
Figure 19: Modèle de la théorie de la virulence appliquée au HBV.....	45
Figure 20 : Les phases de l'infection chronique et l'émergence de mutations.....	58
Figure 21 : Signal d'encapsidation et mutation affectant l'expression de l'AgHBe.....	62
Figure 22: Impact des mutations A1762T et G1764A sur la séquence nucléique en lien avec les séquences du récepteur nucléaire et du facteur de transcription HNF1.....	64
Figure 23: Concept de la progression des infections occultes, aiguës et chronique sur l'évolution de la maladie hépatique chez la marmotte adulte.....	80
Figure 24: Amorçage des oligoribonucléotides P1 et P2 sur la molécule d'ADN-RC.....	90
Figure 25: Impact du traitement RNase sur la complémentation-ligation et l'amplification par RCA.....	94
Figure 26: Amplification de génomes entiers de HBV à partir d'une matrice sous forme d'ADN-RC.....	96
Figure 27: Comparaison de la sensibilité de l'amplification par PCR P1P2 et Complémentation-Ligation-RCA.....	98
Figure 28: Représentation des formes d'ADN-RC après complémentation-ligation.....	100
Figure 29: Résumé sérologique du patient B.....	102
Figure 30: Impact des mutations aux positions 1764/1766/1768 sur le site de liaison aux récepteurs nucléaire HNF1.....	104
Figure 31: Résumé sérologique du patient P.....	119
Figure 32: Scénario d'apparition du mutant d'échappement sK122R/sD144E.....	132

Table des tableaux

Tableau 1: Les principaux transcrits et les principales protéines du HBV.....	17
Tableau 2: Déterminants sérologiques 'd/y' et 'r/w'.....	39
Tableau 3: Bases moléculaires des sérotypes du HBV.....	39
Tableau 4 : Caractéristiques des génotypes/sous-génotypes/ sérotypes du HBV.....	47
Tableau 5 : Facteurs influençant la maladie hépatique lors d'infection par le HBV.....	51
Tableau 6: Principales mutations altérant la traduction ou la maturation de l'AgHBe.....	60
Tableau 7: Principales mutations altérant la transcription de l'ARNm PréC/C.....	64
Tableau 8 : Mutations de résistances aux traitements antiviraux.....	69
Tableau 9 : Positions et mutations impliquées dans des échappements au système immunitaire et/ou aux tests de détection.....	72
Tableau 10: Chevauchement des gènes Pol et S: Implication des mutations de résistances et d'échappements.....	76
Tableau 11 : Prévalence des infections occultes par le HBV selon les groupes à risques.....	78
Tableau 12 : Marqueurs sérologique de l'infection occulte au HBV.....	78
Tableau 13: Amorces utilisées pour les PCR P1P2.....	90
Tableau 14: Amorces utilisées lors de la réaction de RCA.....	90
Tableau 15: Séquençage direct des produits PCR B1 et B2.....	104
Tableau 16: Analyse moléculaire de la région PréC/C des clones B1 et B2.....	107
Tableau 17: Profils sérologiques associés à la mutation Y100C.....	111
Tableau 18: Suivi virologique et biochimique du patient P.....	120
Tableau 19: Amorces utilisées pour la détection d'infection occulte.....	140
Tableau 20: Températures d'hybridation utilisées selon les couples d'amorces utilisés.....	140
Tableau 21: Profil sérologique des marqueurs d'expositions au HBV chez la cohorte de patients HIV (+)/AgHBs (-).....	142
Tableau 22: Caractéristiques sérologiques associées à la détection de l'infection occulte.....	142

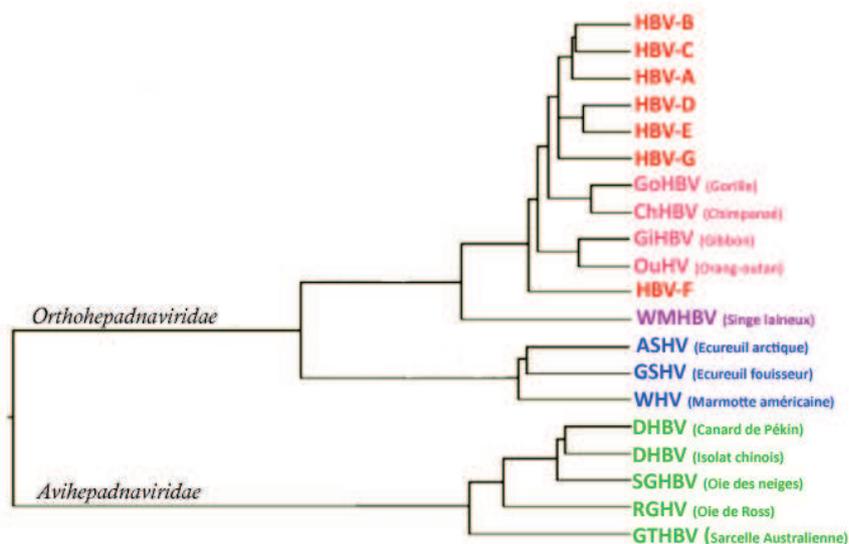


Figure 1: Arbre phylogénétique de la famille des hépadnavirus.

Représentation de l'arbre phylogénétique des hépadnavirus. Les souches appartenant à la famille des avihepadnavirus (vert) et les souches appartenant à la famille des orthohepadnavirus sont représentées: en bleu (virus de rongeurs), violet (virus infectant le singe laineux) et rouge (souches virales infectant les humains et les grands singes). Figure d'après Gerlich, 2002 (Doerr and Gerlich 2002; Kay 2006))

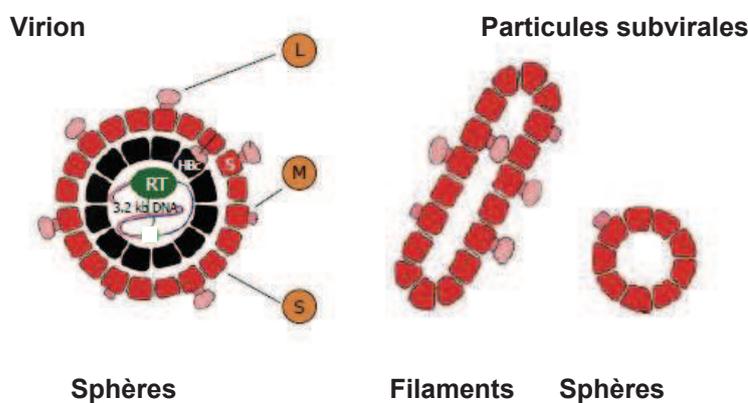


Figure 2: Schéma des particules virales

Le sérum de patient infecté par le HBV contient des particules virales infectieuses (ou particules de Dane) et des particules subvirales non infectieuses.

Le virion d'environ 42 nm est composé d'une bicouche lipidique dans laquelle les protéines de surface virales sont ancrées (L: protéine majeure, M: protéine moyenne, S: petite protéine). La capside virale formée des protéines de capside (Hbc) protège le génome viral, qui est sous forme d'ADN double brin relâché-circulaire de 3,2 kb, la polymérase virale est liée à l'extrémité 5' du brin d'ADN (-) (RT: domaine de reverse transcription de la polymérase virale).

Les particules subvirales sont composées d'une simple couche lipidique dans laquelle sont ancrées principalement les petites protéines d'enveloppe S. Les particules subvirales ne contiennent pas de matériel génétique et peuvent adopter deux formes (bâtonnets ou sphères). La taille des bâtonnets est variable et peut atteindre jusqu'à 100 nm de long, les sphères vides ont une taille d'environ 22 nm, d'après (Glebe and Urban 2007).

Chapitre 1: Le virus de l'hépatite B

1. La famille des hépadnavirus

Le virus de l'hépatite B humain (HBV) appartient à la famille des *hepadnavirus* (groupe des pararétrovirus). La famille des *hepadnavirus* regroupe 2 genres : les orthohepadnavirus dont les hôtes sont des mammifères et les avihepadnavirus dont les hôtes sont aviaires (figure 1). Les virus appartenant à cette famille partagent : (i) une même organisation génétique composée d'un petit ADN double brin partiellement circulaire (ii) un cycle viral composé d'une étape de transcription inverse (iii) un tropisme principalement hépatique (iv) et une spécificité d'hôte très étroite (Kidd-Ljunggren, Miyakawa et al. 2002; Schaefer 2007). Ces virus sont enveloppés et le matériel génétique est protégé par une capsidie icosaédrique. La membrane virale ne dérive pas de la membrane plasmique des cellules infectées mais est le résultat de l'assemblage de la bicouche phospholipidique provenant des membranes du réticulum endoplasmique (RE) cellulaire dans laquelle sont insérées les 3 protéines de surface virale (Eble, MacRae et al. 1987; Huovila, Eder et al. 1992).

Avec une spécificité d'hôte très étroite, seuls quelques oiseaux sont susceptibles à l'infection par les virus aviaires de l'hépatite B (oies, sarcelles, canard) et seuls quelques canards (canard de Pékin, canard à col vert) sont infectables par le virus du canard DHBV (Duck Hepatitis B Virus) (Mason, Seal et al. 1980; Lambert, Cova et al. 1991). Les virus aviaires ne partagent que 40% d'homologie nucléique avec les virus humains. Même si l'organisation et l'expression génétique du virus n'est pas totalement similaire au virus humain, le modèle d'infection DHBV/canard de Pékin a été utilisé et a permis d'élucider les principales étapes du cycle de réplication virale. Le genre des orthohépadnavirus qui regroupe les virus dont les hôtes sont des mammifères, comme la marmotte américaine qui est susceptible au WHV (Woodchuck Hepatitis Virus) (Summers, Smolec et al. 1978). Le WHV partage une grande proximité génétique (80% d'homologie) avec le HBV. Dans le modèle d'étude de la marmotte, les profils sérologiques d'infections sont très similaires à ceux observés chez l'homme. C'est pourquoi ce modèle a été utilisé pour approfondir les connaissances sur la biologie de l'infection par les hépadnavirus, ainsi que sur les réservoirs cellulaires viraux extrahépatiques. Enfin, différentes espèces de primates sont porteuses de virus apparentés au virus de l'hépatite B humains. On peut citer parmi les singes du nouveau monde le singe laineux, qui a son propre virus, le WMHBV (Woolly Monkey Hepatitis B Virus) mais qui est assez éloigné phylogénétiquement du HBV. D'autres grands singes comme les chimpanzés, les gorilles les orang-outans et les gibbons sont susceptibles à l'infection par un virus qui est phylogénétiquement très proche du HBV (Dienes, Purcell et al. 1990; Lanford, Chavez et al. 2000). La nomenclature nomme ces souches HBV précédées des initiales de l'hôte chez qui la souche a été isolée. Pour des questions d'éthique les grands singes ne sont quasiment pas utilisés comme modèle d'étude de l'infection par le HBV (Schaefer 2007).

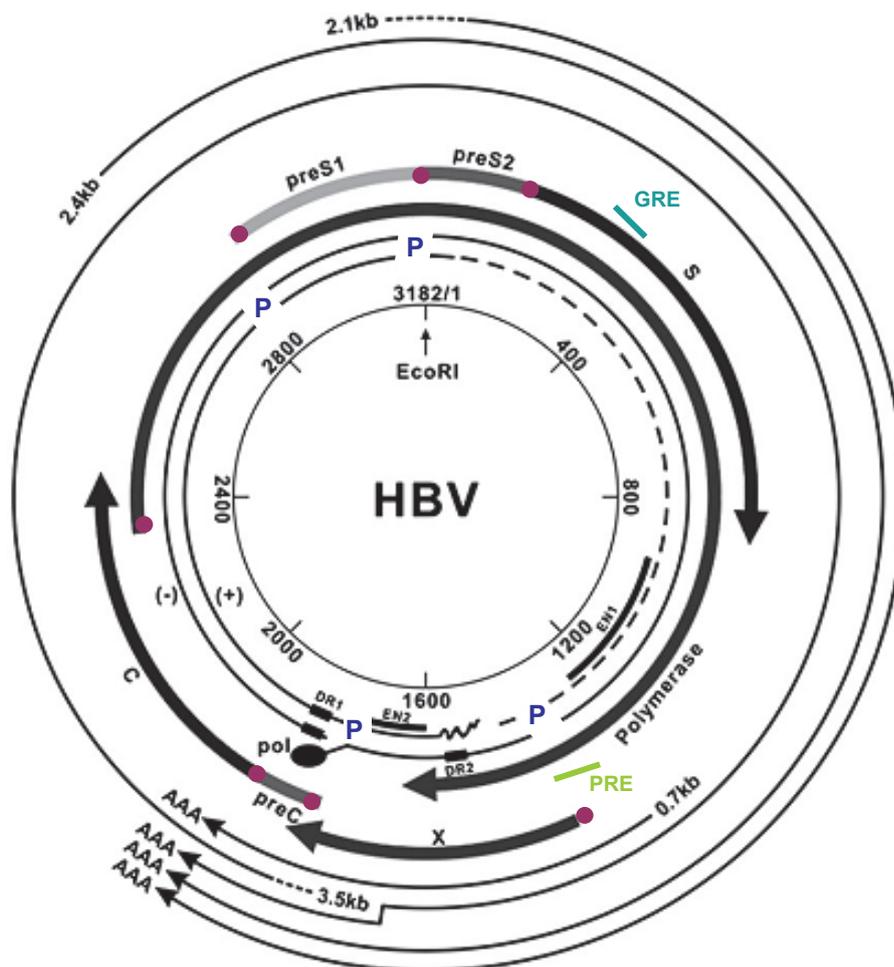


Figure 3: Carte génétique et transcriptionnelle du HBV

Un génome de référence de génotype D est utilisé pour illustrer la carte génétique du HBV. Dans le virion circulant le génome d'environ 3200pb est sous forme d'ADN double brin relâché partiellement circulaire. L'extrémité 5' du brin d'ADN (-) est liée à la polymérase virale par une liaison phosphotyrosine. Le brin d'ADN (+) incomplet possède une extrémité 3' variable et une extrémité 5' fixe à laquelle est liée un court oligoribonucléotide. Le site EcoRI est utilisé comme origine. Quatre promoteurs (P): PréS1, S, PréC/C et X permettent l'expression des ARN messagers et ARN pré-génomiques viraux, qui partagent le même site de polyadénylation. Les transcrits ainsi que leur taille est représenté autour de la matrice d'ADN et sont caractérisés par leur extrémité Poly A commune. Les sites d'initiations des 7 protéines virales majoritaires sont représentés par "●". Le génome est composé: d'éléments régulateurs de transcription (EN: enhanceurs 1 et 2), un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE, séquence 5'-TGTTCCCT-3' répétées aux positions nt 341 et 370), un élément de régulation post-traductionnel (PRE, position nt1217-1582) et d'éléments structuraux (DR1 et DR2). Figure adaptée Block TM, 2007 (Block, Guo et al. 2007).

2. Le virus

Le virus de l'hépatite B est à ce jour le plus petit virus à ADN double brin infectant l'homme décrit. Les particules de Dane ou particules infectieuses (42nm) sont formées d'une bi-couche lipidique dans laquelle sont insérées les trois protéines virales de surface S, M et L (Dane, Cameron et al. 1970; Stibbe and Gerlich 1983; Heermann, Goldmann et al. 1984) (Figure 2). L'enveloppe entoure la nucléocapside virale icosaédrique (36nm) formée de protéines de capsid (Core ou AgHBc), qui protège le génome et la polymérase virale (Crowther, Kiselev et al. 1994). Dans le sérum on trouve en large excès des particules subvirales vides sous forme de sphères (22nm) et bâtonnets (pouvant atteindre 100nm de long, 22 nm de diamètre). Ces particules qui ne contiennent ni ADN ni capsid peuvent être plus de 1000 fois plus nombreuses que les particules infectieuses. Leur rôle exact dans le cycle de réplication du virus n'est pas connu. Il a été suggéré que les particules vides faciliteraient la dissémination du virus et son maintien dans l'organisme en réduisant le pool d'anticorps neutralisants disponibles pour interagir avec les particules infectieuses (Ganem and Prince 2004).

Dans les particules de Dane, le génome est composé d'un ADN nommé ADN-RC (Relâché-Circulaire) d'environ 3,2kb qui est partiellement double brin et non clos de manière covalente (Figure 3). Il est constitué d'un brin d'ADN négatif (-) qui contient la totalité de l'information génétique. Chacune des extrémités 3' et 5' de ce brin possède une courte redondance contenant entre autre la région répétée DR1 (Direct Repeat 1). Les redondances sont essentielles car elles assurent le maintien de l'intégralité de l'information génétique pendant la réplication virale. L'extrémité 5' du brin (-) est liée à la polymérase virale par une liaison phospho-tyrosine (Beck and Nassal (2011); Molnar-Kimber, Summers et al. 1983). La liaison entre la polymérase virale et le brin d'ADN (-) se fait par l'intermédiaire du résidu Tyrosine qui selon les génotypes viraux, est l'acide aminé (aa) à la position 63 ou 65 du gène de la polymérase virale. C'est le brin d'ADN (+) qui assure la circularité du génome en chevauchant les deux extrémités du brin (-). Le brin d'ADN positif (+) est de longueur variable (entre 50% et 80% de la taille du génome). Il est composé d'une extrémité 5' fixe qui est liée à un court oligoribonucléotide et d'une extrémité 3' variable. La stratégie réplivative du HBV est d'une grande originalité. Malgré une petite taille génomique le virus porte une grande quantité d'information génétique. L'utilisation des 3 phases de lectures possibles et le chevauchement des 4 cadres ouverts de lecture (ORF) S, C, P et X optimise l'utilisation du code génétique. Ainsi le génome code 7 protéines majeures distinctes : les protéines structurales (protéines d'enveloppe et capsid) et les protéines non structurales (polymérase virale, antigène HBe et HBx). Par cette stratégie chaque nucléotide code au moins une protéine virale, certains participent au codage de 4 protéines différentes. La réplication est en partie régulée par des éléments viraux (promoteurs, enhanceurs de transcription, signal d'encapsidation, signal de polyadénylation, éléments répétés) situés tout au long du génome, qui chevauchent obligatoirement les cadres de lectures.

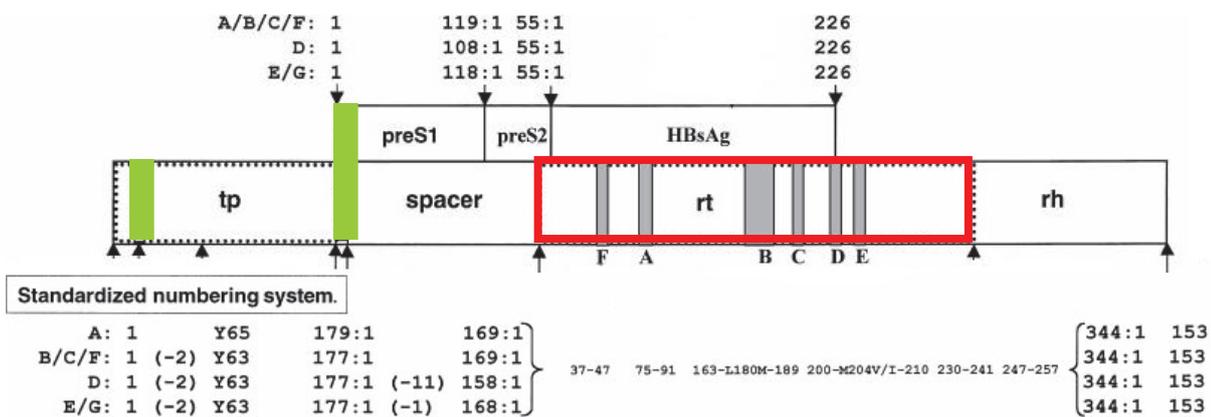


Figure 4: Nomenclature du gène de la polymérase selon le génotype de la souche virale.

Le gène de la polymérase virale et ses sous-domaines (tp: terminale protein, spacer: région charnière ou espaceur, rt : reverse transcription et rh : RNase H). Les régions vertes représentent des régions variables en taille. Le rectangle rouge représente la sous-région rt de la polymérase. Les sous-régions grisées dans le domaine rt sont les régions qui sont conservées quelque soit le génotype. Les génotypes (A à G) sont indiqués ainsi que la numérotation qui en lien. (-1, -2 ou -11) représente les délétions d'aa spécifique à certain génotype. Y63 ou Y65 représente le résidu Tyrosine à la position 63 ou 65 de la polymérase virale qui est lié à l'extrémité 5' du brin d'ADN (-). La numérotation utilisée pour les souches simiennes est la même que celle utilisée pour le génotype D humain. D'après Stuyver *et al.* (Stuyver, Locarnini et al. 2001)

Le génome du HBV est donc extrêmement compact ce qui impose de fortes contraintes concernant les variations qui peuvent être tolérées par le virus (Seeger and Mason 2000). Une telle organisation n'est à ce jour retrouvée que chez le virus de la mosaïque du chou-fleur (groupe apparenté *Caulimoviridae*). Selon les souches, il y a d'autres cadres de lectures possibles mais seulement les 4 ORF matérialisés sur le brin d'ADN (+) sont utilisés systématiquement. Des protéines non-essentielle et non-structurales pour le virus sont codées par d'autres cadres de lectures dits alternatifs, qui sont issus de phénomènes d'épissages de l'ARN viral. La protéine HBSP (Hepatitis B Spliced Protein) illustre parfaitement ce cas (Soussan, Garreau et al. 2000).

3. Organisation génétique

3.1 Nomenclature

Deux nomenclatures ont été développées et sont utilisées pour décrire les modifications nucléotidiques et protéiques du génome du HBV.

La première nomenclature utilise le milieu du 'site' de restriction EcoRI (GAATTC) pour définir l'origine (figure 3). Le premier génome de HBV cloné l'a été en utilisant un site de restriction unique EcoRI qui se trouve dans la région PréS2 et quand le génome a été séquencé ce site a été utilisé comme origine. Bien que le site EcoRI ne soit pas conservé chez tous les génomes, son emplacement hypothétique au début de la région PréS2 est facilement réparable, sauf pour les mutants ayant une délétion à cet endroit. D'une manière générale la taille des génomes selon les génotypes est invariable sur les premiers 2/3 du génome. Cette nomenclature permet donc d'identifier avec précision des mutations importantes des promoteurs PréCore, Core et des variations qui affectent le signal d'encapsidation. Pour les protéines virales, la situation est différente car selon les génotypes les protéines Pol, C et PréS1 varient naturellement en taille. Un polymorphisme naturel (insertions/délétions) affecte plus précisément les régions TP et spacer de la Pol. Par chevauchement ces variations affectent la région PréS1, qui peut elle aussi subir des modifications qui seront sans conséquences majeures sur la réplication. Avec la nomenclature décrite ci-dessus et selon les études et les souches de HBV étudiées, une même mutation de résistance à des molécules antivirales comme la lamuvidine pouvait être rapportée aux positions M539V, M549V, M550V ou M552V.

Dans un but de clarté, une nouvelle nomenclature a été développée. Elle prend en compte le polymorphisme naturel de la polymérase et permet de décrire des modifications du gène quels que soient le génotype et la taille du génome. La polymérase virale est divisée selon ses sous-domaines fonctionnels (TP, Spacer, RT, RH) (figure 4). Dorénavant une mutation de la Pol s'écrit avec en minuscule la région sous-génique à laquelle on fait référence et la position est entourée par le résidu sauvage et par la substitution observée. La même mutation de résistance décrite par l'ancienne nomenclature aux positions 539, 549, 550 ou 552 est maintenant fixée à l'unique position possible rtM204V (Stuyver, Locarnini et al. 2001). Les phénomènes de polymorphisme de taille affectent d'autres protéines virales (AgHBc et PréS1) mais n'ont pas une importance clinique suffisante pour imposer une nomenclature particulière.

3.2 Les cadres ouverts de lectures

Quatre cadres ouverts de lecture ou Open Reading Frame (ORF) se partagent le génome (figure 3). L'ORF Pol qui code la polymérase virale est le plus grand, il couvre 80% du génome et chevauche au moins partiellement tous les autres cadres de lecture. L'ORF S code les 3 protéines de surface par l'utilisation de 3 codons d'initiation ATG en phase. Ces trois protéines sont nommées en fonction de leur taille S (Small ou AgHBs), M (Middle ou Prés2), L (Large ou Prés1) et diffèrent par la taille de leur partie N-terminale. L'ORF PréC/C code deux protéines, la protéine précore précurseur de l'antigène HBe et la protéine structurale de la capsid Core ou AgHBc. Enfin l'ORF X code la plus petite protéine du HBV, la protéine transactivatrice HBx (Kay, Mandart et al. 1985).

3.3 Régulation génétique

La régulation de la transcription et de la réplication virale est assurée par différents éléments (Moolla, Kew et al. 2002).

Le signal epsilon (ϵ) ou signal d'encapsidation est particulièrement conservé chez les orthohepadnavirus. Le signal ϵ adopte une structure en tige-boucle qui joue un rôle primordial dans les étapes précoces d'encapsidation et d'interaction entre la polymérase virale et l'ARNpg pour initier la transcription inverse (Kramvis and Kew 1998). La boucle interne de ce signal est considérée comme l'origine de réplication chez les hépadnavirus (Beck and Nassal 2007).

Les répétitions directes composées de 11 paires de bases nommées DR1 et DR2 (5'-TTCACCTCTGC-3') sont nécessaires à la réplication et guident les translocations lors de la synthèse des brins d'ADN viraux naissants. La DR1 et le signal d'encapsidation sont situés entre le site d'initiation de la transcription de l'ARNpg et le site de polyadénylation des ARN viraux si bien qu'ils sont répétés deux fois sur cet ARN et comme nous le verrons, ceci est essentiel au maintien de l'information génétique lors de la transcription inverse.

Le signal de polyadénylation composé d'une séquence non canonique chez les orthohepadnavirus (AATAAA) et canonique chez les avihepadnavirus (TATAAA) est localisé immédiatement en 3' du signal ϵ . La transcription débute en amont du signal d'encapsidation, un élément situé en 5' permet alors d'ignorer le signal d'encapsidation lors du premier passage. Le signal ne sera reconnu efficacement que lors du second passage (Cherrington, Russnak et al. 1992). La transcription des hépadnavirus a lieu dans le noyau de la cellule via la machinerie transcriptionnelle cellulaire de l'hôte et notamment en utilisant l'ARN Polymérase II. La transcription est initiée au niveau des promoteurs présents sur le brin d'ADN (-) et tous les transcrits viraux se terminent au niveau du site unique de polyadénylation présent dans le gène C ce qui explique leur extrémité 3' commune.

Deux éléments régulateurs de la transcription nommés enhanceurs (Enh1 et Enh2) sont également présents. L'Enh1 se trouve en amont du gène X et possède une activité même dans les cellules non hépatiques. L'Enh2 se trouve en amont du promoteur Core et du cadre de lecture C.

Tableau 1: Les principaux transcrits et les principales protéines du HBV.

Transcrits	Cadre ouverts de lecture (ORF)	Taille (en Kb)	Protéines traduites	Taille apparente (en KDa)
ARN pg	C	3,5	Protéine Core	22
	Pol	3,5	Protéine Pol	90
ARNm PréC	PréC/C	3,5	Précurseur AgHBe	25
ARNm PréS1	PréS1/PréS2/S	2,4	Protéine L : Gp 46 (N-Glycosylée) p 43 (Non Glycosylée)	39
ARNm PréS2/S	PréS2/S	2,1	Protéine M : Gp 36 (N-Bi-Glycosylée) Gp 33 (N-Glycosylée)	31
	S	2,1	Protéine S : Gp 28 (N-Glycosylée) p 25 (Non-Glycosylée)	25
ARN X	X	0,7	Protéine X	17

Les enhanceurs possèdent des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription spécifique des hépatocytes comme HNF1, HNF3 et HNF4 (Hepatocyte nuclear factor) ce qui confère une activité maximale de réplication virale dans les cellules du foie.

L'élément de régulateur post-transcriptionnel (PRE pour Post-transcriptional Regulatory Element) chevauche complètement le promoteur X, partiellement l'Enh1 et le début du gène X. Son rôle n'est pas entièrement élucidé, mais il a été avancé, qu'il pourrait avec l'aide de facteurs cellulaires être impliqué dans l'export des ARNm viraux non-épissés du noyau vers le cytoplasme, mais aussi dans la régulation de l'épissage des ARN viraux (Patzel and Sczakiel 1997; Heise, Sommer et al. 2006).

L'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE pour Glucocorticoid Response Element) est composé de deux motifs répétés 5'-TGTTCCT-3' aux positions 341 et 370 dans le gène S. L'activation de ces récepteurs hormonaux par voie naturelle ou médicamenteuse augmente la transcription et la réplication virale (Tur-Kaspa, Shaul et al. 1988).

3.4 Promoteurs et transcrits

Le promoteur core régule la transcription de deux ARN messagers d'environ 3,5kb, l'un code l'ARNm PréC/C et le second code l'ARN prégénomique (ARNpg). Ces ARN ne diffèrent que par environ 26 nucléotides et ont pour particularité d'être plus long que le génome. Ceci est dû au fait que le signal de polyadénylation (au début des 2 transcrits) se trouve dans le gène C mais n'est reconnu que lors du second passage. Cela a pour effet de créer une redondance aux extrémités 5' et 3' de l'ARNpg. Les séquences redondantes sont composées de la séquence nucléotidique présente entre le site d'initiation de la transcription de l'ARNpg et le site de polyadénylation, elles comprennent donc les séquences DR1 et le signal d'encapsidation. L'ARNm PréCore le plus long permet la traduction de la protéine PréCore précurseur de l'AgHBe.

L'ARNpg est initié en aval de l'ATG initiateur de la protéine PréC. Il sert d'ARNm pour les protéines HBc et Pol mais aussi de matrice pour la synthèse du brin d'ADN (-) du génome viral.

Le promoteur basal du corps (BCP pour Basale Core Promoteur) constitue le noyau du promoteur Core, et peut réguler la transcription non seulement de l'ARNm du PréC mais également celle de l'ARN prégénomique (ARNpg). Il possède des sites de liaisons pour des facteurs de transcription hépatiques même si il possède une activité intrinsèque. Son activité peut-être modulée positivement par l'Enh2 et plus faiblement par l'Enh1 (Moolla, Kew et al. 2002).

Le Promoteur PréS1 contrôle la transcription de l'ARNm de la protéine PréS1 correspondant à un ARN de 2,4 kb. C'est un promoteur à faible spécificité hépatique. Il a pour particularité d'être le seul promoteur des hépadnavirus à posséder une TATA box, élément retrouvé chez la plupart des promoteurs eucaryotes (Siddiqui, Jameel et al. 1986). La régulation de l'expression de PréS1 est un point essentiel du cycle viral car l'excès de protéine PréS1 par rapport à la protéine S inhibe la sécrétion des particules virales (Lu, Chen et al. 1995).

Le promoteur S contrôle la transcription des ARNm (2,1kb) de la protéine PréS2 et S. Ce promoteur est régulé positivement par l'Enh 2 et plus faiblement par l'Enh 1.

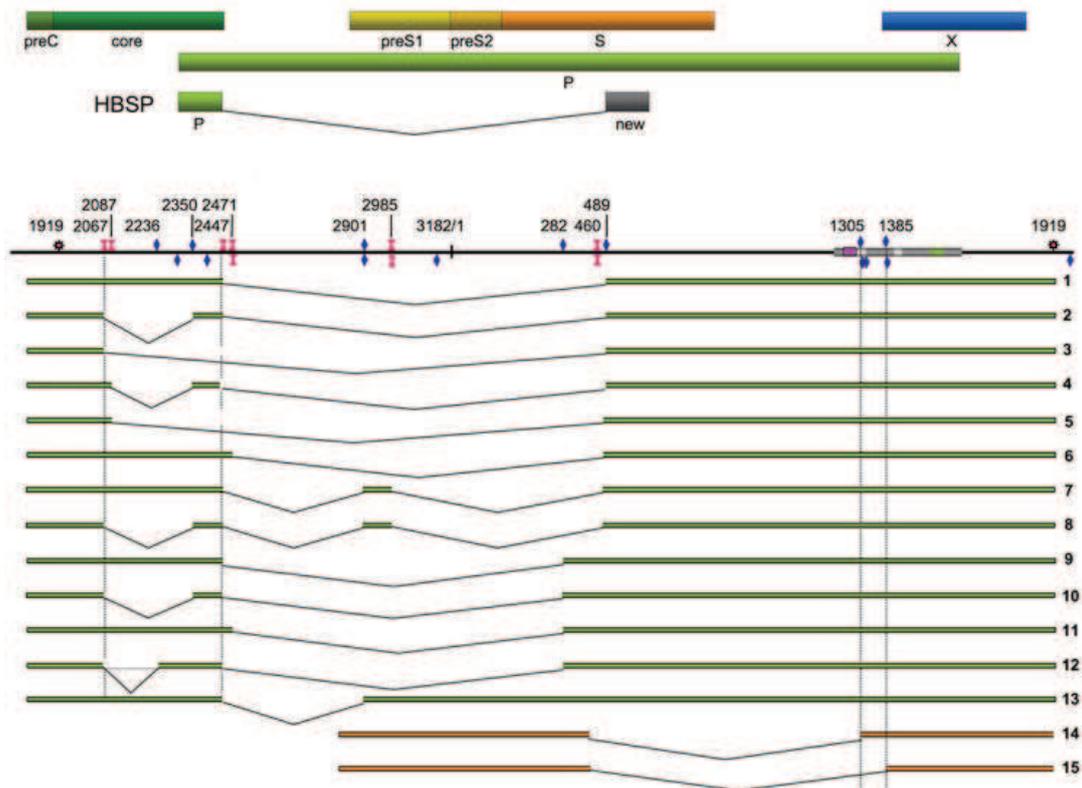


Figure 5: Les principaux variants d'épissage du HBV

Résumé de l'ensemble des ARN épissés connu du HBV d'après Sommer et al. (Sommer and Heise 2008). Un génome de HBV de génotype D linéarisé sert de référence, il est matérialisé par un trait noir. Les sites d'épissages sont numérotés selon leur position et leur orientation 5' (repère magenta) et 3' (repère bleu). Seule la protéine HBSP (HBSP: HBV splice protein) issues de l'épissage de l'ARN pré-génomique est représentée sous le cadre de lecture du HBV. Le PRE (Post-transcriptional Regulatory element) est indiqué en gris. Les différents variant d'épissage de l'ARNpg/PréC connus sont représentés en vert (1 à 13), les deux variants épissés sur l'ARNm PréS2/S sont représentés en orange (14 et 15). Le signal de polyadénylation est représenté par une étoile rouge (nt 1919).

Il possède plusieurs sites de liaisons pour différents facteurs de transcriptions et a une activité même dans les cellules non hépatiques ; cependant son activité est maximale dans les hépatocytes différenciés.

Le promoteur X, mal connu, contrôle la transcription d'un petit ARN de 0.7kb.

3.5 Epissage et particules défectives

Les principaux transcrits du HBV représentés dans le tableau 1 sont des ARN non épissés. Cependant, le génome du HBV peut subir des phénomènes d'épissage. L'ARN épissé majeur est un ARN pour lequel il manque un intron (positions 2447/489, figure 13). Cet ARN peut représenter jusqu'à 30% des transcrits, comme il a été montré en modèle cellulaire mais aussi dans le foie de patients chroniquement infectés (Wu, Chen et al. 1991). De nombreux ARN épissés de tailles variables ont été identifiés et sont décrits (figure 5). Les mécanismes contrôlant les phénomènes d'épissage ne sont pas élucidés, mais ils impliquent très probablement des facteurs de l'hôte et du virus (Soussan, Tuveri et al. 2003; Park, Kim et al. 2008). L'élément régulateur post-transcriptionnel (PRE) joue un rôle en facilitant l'export des ARN PréS/S non épissés du noyau vers le cytoplasme (Patzel and Sczakiel 1997) et a aussi été identifié comme étant l'un des régulateurs de l'épissage de l'ARNpg (Heise, Sommer et al. 2006). Dans la théorie, tous les ARN épissés qui possèdent les signaux d'encapsidation, les régions DR1/DR2, et qui sont encapsidés avec une polymérase virale fonctionnelle peuvent être rétro-transcrits et sécrétés en tant que particules défectives dans le milieu (Gunther, Sommer et al. 1997). Les particules défectives sont maintenues dans la population virale grâce à la transcomplémentation par des particules 'sauvages' ou virus helper (Rosmorduc, Petit et al. 1995). Il a été suggéré que le domaine C-Terminale de la protéine C permettrait de réguler l'encapsidation des ARN épissés (Kock, Nassal et al. 2004; Le Pogam, Chua et al. 2005). Le rôle des particules virales défectives dans l'histoire naturelle du HBV n'est pas totalement élucidé mais contribue probablement aux phénomènes d'échappement viraux et de persistance.

4. Les protéines virales

4.1 La polymérase

Pol est le plus grand gène du HBV, il chevauche entièrement l'ORF S mais aussi une partie des ORFs C et X. Ce chevauchement est très important car une simple modification nucléotidique pourra avoir un impact sur un ou deux gènes. La polymérase virale est une protéine d'environ 850 acides aminés (aa) qui possède les activités: Polymérase ARN-dépendante (reverse transcriptase), Polymérase ADN-dépendante (réplication) et RNase H (Radziwill, Tucker et al. 1990) (figure 6). Cette protéine est composée de quatre domaines protéiques:

Le domaine protéine terminale (TP pour Terminal Protein) est essentiel à l'initiation de la reverse transcription et permet la fixation de la polymérase virale de manière covalente à l'extrémité 5' du brin d'ADN (-) (Beck and Nassal 2007).

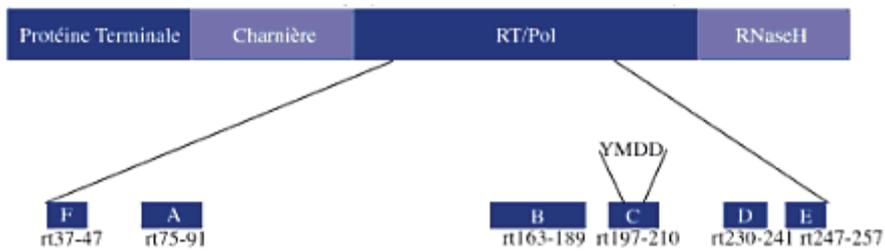


Figure 6: La protéine polymérase et ses sous-domaines

La polymérase virale est composée de 4 sous-domaines: protéine terminale, région charnière, spacer, région rt/Pol qui possède la fonction de reverse transcription et le domaine RNase H. Le sous-domaine rt est constitué de régions très conservées nommées A à F. Le motif YMDD est le site enzymatique. Les positions de chaque sous-domaines sont indiquées, d'après le livre hépatite virale B et C, éditions John Libbey Eurotex, 2006 p20 (Kay 2006)

Fait unique la polymérase va amorcer elle-même la synthèse du brin d'ADN (-) à partir de son résidu Tyrosine à la position 65 ou 63 selon le génotype (Wang and Seeger 1992).

Le domaine espaceur (spacer) ou charnière est la région qui assure la flexibilité de la polymérase virale. Cette région est indispensable à l'activité enzymatique. Malgré le chevauchement avec les régions PrÉS1 et PrÉS2 le domaine spacer peut supporter de nombreuses mutations (insertions/délétions) sans que cela soit délétère au virus.

Le domaine de transcriptase inverse/ADN polymérase (RT) assure les fonctions de rétro transcription inverse et d'ADN polymérase. Comme toutes les polymérases ARN-dépendante, la Pol du HBV ne possède pas de fonctions de correction et les erreurs sont fréquentes. Il est estimé qu'il en survient une toutes les 10^4 - 10^5 paires de bases (Park, Kim et al. 2003). La région RT est divisée en sous-domaines notés A à F. Le sous domaine C porte le domaine catalytique ou motif YMDD. Ce sous-domaine est conservé chez les hépadnavirus et même chez les rétrovirus. Des mutations de résistances aux molécules antivirales dans le domaine YMDD peuvent altérer l'activité enzymatique de la Pol.

Le domaine C-terminal ou RNase H est associé à l'activité ribonucléasique dégradant l'ARN présent dans l'hélice ARN/ADN lors de l'étape de reverse transcription (Seeger and Mason 2000).

4.2 L'antigène HBc

L'AgHBc est la protéine structurale de la capsid, elle est composée de 183 à 185 aa. Cette protéine est composée de deux régions principales :

La région N-terminal (résidu 1 à 149) permet aux protéines de capsid d'interagir et de s'assembler en capsid icosaédrique. Les 140 premiers résidus forment le domaine d'assemblage suivi par 9 aa de liaison (Belnap, Watts et al. 2003). Le domaine d'assemblage est composé de 10 hélices α qui se forment en épingles. Seulement deux épingles sont accessibles à la surface de la capsid et définissent les épitopes B immunodominants (position 76-81 et 127-133) (Pumpens and Grens 2001).

La région C-terminal (résidu 150 à 183) est composée de 34 résidus basiques (dont 17 arginines) qui forment un domaine de liaison aux acides nucléiques.

Cette région joue un rôle essentiel lors du cycle de réplication du virus en permettant dans un premier temps, l'adressage de la capsid vers le noyau médiée par un signal de localisation nucléaire (NLS). Dans un second temps, les résidus basiques permettent l'encapsidation de l'ARNpg et de la polymérase virale dans les capsides néoformées (Stahl, Beck et al. 2007). La présence de signaux de phosphorylations permettent la régulation de l'activité de reverse transcription (Basagoudanavar, Perlman et al. 2007).

L'AgHBc est très immunogène. Cependant les anticorps anti-HBc ne sont pas neutralisants car la capsid dans les particules infectieuses circulantes est protégée des anticorps par l'enveloppe virale. Les premiers marqueurs d'infection au HBV sont de type IgM anti-HBc mais ces anticorps vont décroître très rapidement sous le seuil de détection. En réalité, les anticorps de type IgM fluctuent à de très faibles taux et peuvent réapparaître lors de réactivation virale. Une réponse B mémoire apparaît médiée par les anticorps de type IgG et persiste à vie que l'infection soit aiguë ou chronique.

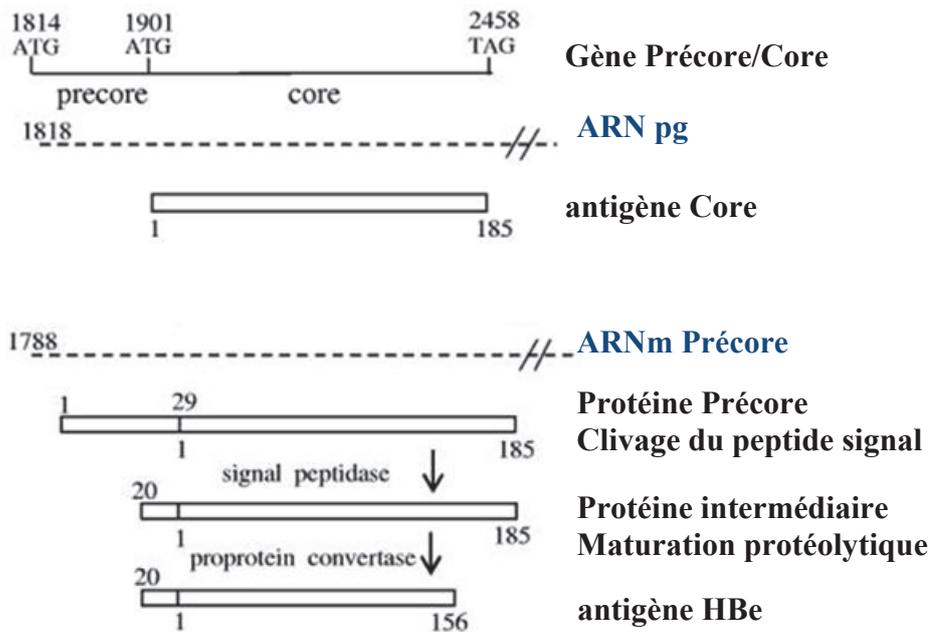


Figure 7: Synthèse des antigènes HBc et HBe.

L'ADN est représenté par un trait plein, l'ARN est représenté par des tirets et les protéines par des rectangles. Les positions des ATG initiateurs sur le brin d'ADN et le nombre d'acide aminé composant les protéines sont indiqués. L'antigène core est traduit à partir de l'ARNpg (ARN pré-génomique). L'antigène HBe est traduit à partir de l'ARNm PréC/C. La synthèse de l'antigène HBe se fait par clivage du peptide signal d'une protéine intermédiaire suivit d'une maturation protéolytique.

La présence des anticorps IgG est le signe d'une infection aiguë en cours, chronique ou d'une infection ancienne et résolue (Gerlich, Uy et al. 1986; Rodella, Galli et al. 2006).

La présence des anticorps anti-HBc seul (dit isolés) peut correspondre à divers contextes cliniques: (i) à la fenêtre sérologique d'une infection aiguë pendant laquelle les AgHBs ont disparus alors que les anticorps anti-HBs ne sont pas encore apparus (ii) ou bien refléter une infection aiguë passée et résolue depuis des dizaines d'années; les anticorps anti-HBs ont disparu et seuls ont persistés les anticorps de type IgG à cause d'une forte immunogénicité de l'antigène de capsid (iii) ou alors le statut anticorps anti-HBc seul est associé à une infection chronique inactive pour laquelle la réplication virale est très faible mais pour laquelle l'AgHBc est détecté par le système immunitaire de l'hôte sans que les antigènes viraux HBs et/ou HBe ne soient détectés (Grob, Jilg et al. (Grob, Jilg et al. 2000).

4.3 L'antigène HBe

L'antigène HBe est une protéine non structurale qui est sécrétée dans le sérum des patients infectés. Dans un premier temps, la protéine PréCore (AgHBe) est synthétisée en tant que pro-protéine de 25kDa avec en N-terminal les 29 aa supplémentaires codés par la région PréC. Le peptide signal constitué de 29 aa supplémentaires adresse la protéine naissante vers le réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion. Pendant la maturation la pro-protéine est clivée à la fois en N-terminal dans le peptide signal et en C-terminal dans la queue basique, ce qui donne naissance à une protéine soluble de 17kDa nommée antigène HBe (figure 7).

Si l'AgHBe n'est pas essentiel au cycle réplcatif ni au pouvoir infectieux du virus, sa présence est clairement reliée aux phases de réplication virale active et à l'établissement de la chronicité (Milich and Liang 2003). Lors des phases de réplication, l'AgHBe est fortement sécrété et ce phénomène contribue très probablement aux mécanismes d'échappement viraux en modulant la réponse immunitaire et en servant de leurre aux cellules T (Milich, Chen et al. 1998). Tout comme l'AgHBc, l'AgHBe est très immunogène, cependant, il ne partage pas les mêmes déterminants antigéniques, ni les mêmes conformations spatiales que l'AgHBc. Il existe donc deux systèmes distincts AgHBe/anti-HBe et AgHBc/anti-HBc. En général, la séroconversion anti-HBe marque la fin de la réplication virale et le début de la résolution de l'infection. Enfin, des souches de HBV AgHBe (-) peuvent émerger: i) suite à des mutations dans la région PréC qui altèrent la production de l'AgHBe en créant un codon de terminaison, ii) en déstabilisant le site de clivage du peptide signal (Chen, Crowther et al. 2008), iii) par des mutations dans le promoteur core qui affectent préférentiellement la transcription de l'ARNm précore. Les souches AgHBe (-) sont maintenant devenues la forme majoritaire des infections chroniques HBV dans le monde (3).

4.4 Les protéines de surface

L'ORF S code les trois protéines de surfaces à partir de trois codons d'initiation différents qui sont en phase, les 3 protéines partagent le même codon stop. Les trois protéines S (AgHBs), M (PréS2), L (PréS1) partagent la même extrémité C-terminale hydrophobe et diffèrent en taille par leur extrémité N-terminale (figure 8).

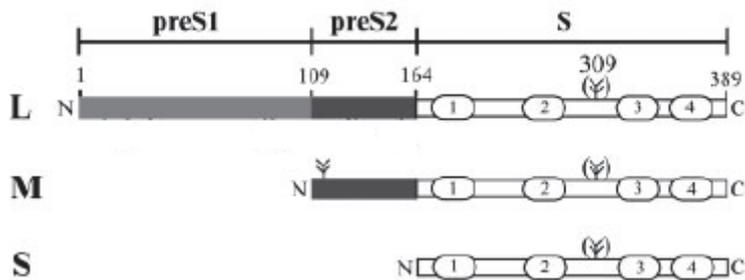


Figure 8: Représentation des protéines L, M et S.

Les domaines PréS1, PréS2, S, la position des acides aminés et les extrémités C et N terminales sont indiquées. Les trois protéines de surface partagent le même domaine S composé de 226 aa, les protéines L et M sont composées de 55 aa supplémentaires et la protéine L contient 108 aa additionnels. La région S partagée par les 3 protéines contient: 4 domaines hydrophobes représentés par les ovals numérotés de 1 à 4, un domaine de N-Glycosylation sur le résidu Asn 309 indiqué par les doubles traits entre parenthèses. Un second site de glycosylation est présent dans le domaine PréS2. Figure adaptée de Lambert et al. (Lambert and Prange 2001).

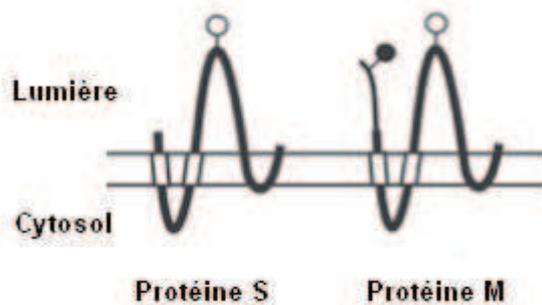


Figure 9: Conformation des protéines S et M

Les protéines S et M adoptent très probablement une même topologie. Les extrémités C et N terminales sont exposées à la lumière. Les domaines transmembranaires 1 et 2 (barres blanches) et les domaines transmembranaires 3 et 4 (trait plein noir). Le modèle prédit que les protéines S et M seraient composées de deux boucles exposées du côté cytosolique et d'une boucle exposée à la surface du virion. Les ronds exposés à la lumière représentent les sites de glycosylation. Figure adaptée de Bruss et al. (Bruss 2007).

Ces protéines sont particulièrement importantes car avec la membrane cellulaire hôte, elles forment l'enveloppe des particules virales. Elles sont exposées à la surface des virions et jouent un rôle déterminant dans les processus de reconnaissance cellulaire (attachement et entrée du virus dans l'hépatocyte et les interactions avec le système immunitaire). Il est suggéré que les particules infectieuses sont composées d'une bi-couche lipidique provenant de la cellule hôte, dans laquelle sont ancrées les trois protéines de surface alors que les particules vides sont composées d'une simple couche lipidique dans laquelle n'est insérée presque exclusivement que l'AgHBs. Il est estimé que les particules infectieuses sont composées majoritairement des protéines S (70%) et que les 30% restants sont partagés équitablement par les protéines M et L. Les protéines d'enveloppe possèdent des épitopes antigéniques fortement immunogènes qui peuvent induire la production d'anticorps neutralisants et protecteurs (Bruss 2007).

4.4.1 Topologies et modifications post-traductionnelles des protéines de surface

Bien que les structures tridimensionnelles des protéines de surface ne soient pas connues avec certitude, on pense que ces trois protéines partagent les mêmes domaines transmembranaires portés par la région S. La protéine S est composée de quatre domaines transmembranaires et les extrémités C et N terminales sont exposées à la surface (figure 9).

D'après la plupart des modèles, les protéines S et M adoptent la même topologie. Alors que la protéine L peut adopter deux topologies transmembranaires distinctes (figure 12). Lors de la synthèse des protéines d'enveloppes, celles-ci sont maturées dans le réticulum endoplasmique et forment des hétérodimères stabilisés par des interactions hydrophobes. Les complexes protéiques bourgeonnent à la lumière du réticulum endoplasmique et sont transportés dans l'appareil de Golgi en vue d'être sécrétés ou ancrés dans la membrane de la cellule hôte pour former l'enveloppe virale. La conformation spatiale des protéines stabilisées par les interactions disulfures des résidus cystéines sont importantes pour les phénomènes de maturations protéiques. La modification des résidus cystéines peut altérer très fortement la maturation de la protéine S et la sécrétion des particules virales (Wounderlich and Bruss 1996).

Lors de la synthèse des protéines d'enveloppes des étapes de maturation au niveau du réticulum endoplasmique mais aussi des modifications post-traductionnelles (de type glycosylation, myristilation) ont lieu. Ces étapes sont nécessaires à la formation de la particule virale et/ou de son infectiosité. Les trois protéines de surface possèdent un site commun de N-glycosylation (représenté sur la figure 9 par des ronds) sur l'asparagine 146 de la protéine S mais qui n'est utilisé que partiellement (Peterson, Nath et al. 1982). Un second site est présent dans le domaine Prés2 mais n'est utilisé que par la protéine M (Lu, Mehta et al. 1995; Werr and Prange 1998). La protéine M subit également une modification de type O-glycosylation au résidu thréonine 37, cette modification ne semble pas jouer de rôle dans les processus d'assemblage viraux (Shiraki, Ochiai et al. 1992). La protéine L est la seule à être myristilée au niveau de sa partie N-terminale (Persing 1987), cette modification lui confère un rôle essentiel dans les processus d'infectiosité et de reconnaissance virus récepteur cellulaire.

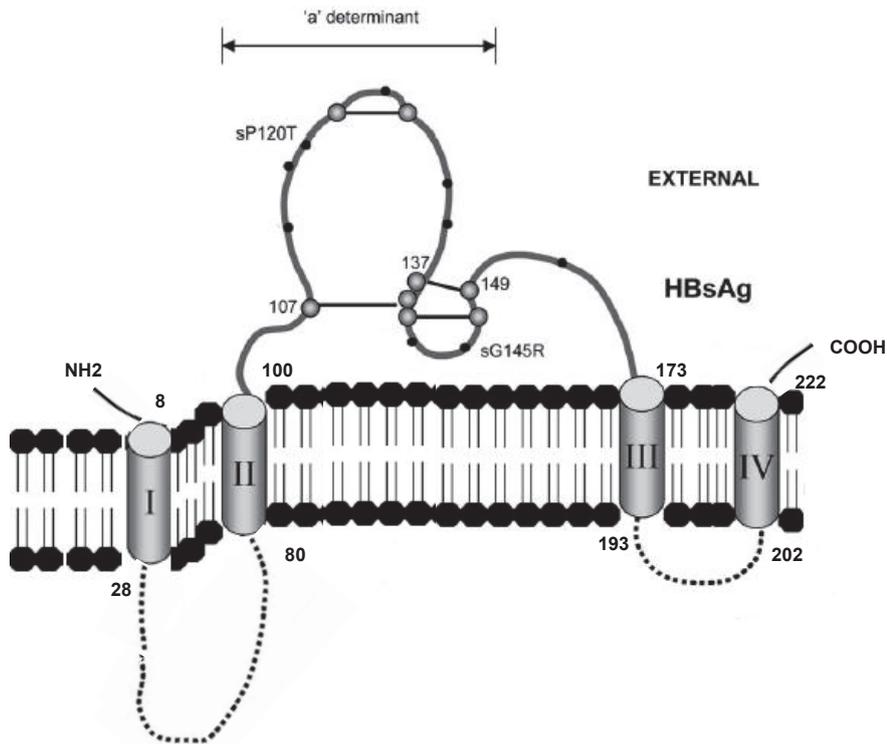


Figure 10: Représentation conformationnelle en 2 dimensions de la protéine S

Les hélices α , formant les 4 domaines transmembranaires sont représentées par des cylindres numérotés I à IV. Les domaines transmembranaires sont ancrés dans la membrane qui est composée d'une bicouche lipidique, les extrémités C et N terminales sont exposées du côté luminal. La position relative des aa est indiquée. Les résidus cystéines formant la boucle antigénique majeure sont représentés par des ronds gris. Les liaisons disulfures potentielles entre les résidus cystéines sont représentées par des traits noirs. Le déterminant 'a' composé des aa 124 à 149 est indiqué. Cette figure est adaptée d'une figure de Torresi 2002, (Torresi 2002) et basée sur des données proposées par Persson and Argos (Persson and Argos 1994)).

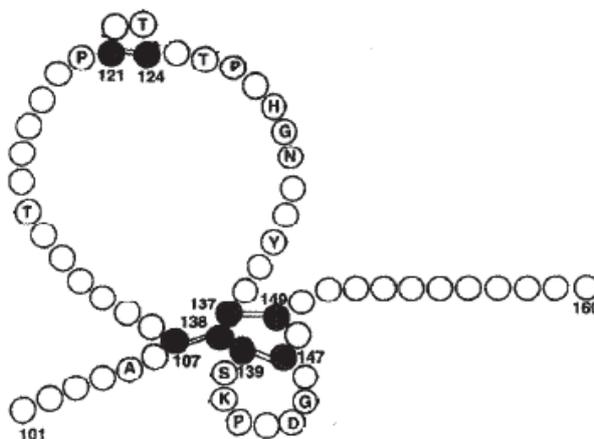


Figure 11: Représentation de la boucle antigénique majeure

Modèle d'interaction entre les résidus cystéines formant la boucle antigénique majeure. Les résidus cystéines sont représentés par des ronds noirs et la position des aa est indiquée, d'après la figure proposée par Carman *et al.* (Carman, Owsianka et al. 1999).

4.4.2 L'antigène HBs

Cet antigène de 226 aa est le constituant majeur de l'enveloppe virale. Sa structure exacte n'est pas encore connue et dans le modèle présenté dans la figure 10, les résidus nucléotidiques sont nommés à titre indicatif et ne reflètent peut-être pas la réalité. La protéine serait composée de 4 régions hydrophobes qui forment 4 hélices transmembranaires (TM1 à TM4), les extrémités C et N-terminale seraient exposées à la surface du virion (Persson and Argos 1994). Si les domaines transmembranaires 1 et 2 sont composés d'acides aminés hydrophobes, propres aux hélices transmembranaires, c'est moins évident pour les domaines 3 et 4. Cependant si l'on accepte ce modèle, l'AgHBs serait composé de deux boucles exposées du côté cytosolique et une boucle antigénique majeure formée des résidus 100 à 173 située entre les domaines transmembranaires 2 et 3 et exposée à la surface des virions. Les quatorze résidus cystéines qui structurent l'AgHBs sont essentiels aux étapes d'assemblage, de sécrétion et d'infectiosité des particules virales (Mangold, Unckell et al. 1997) (Salisse and Sureau 2009). Ces résidus jouent un rôle conformationnel important en stabilisant la protéine par les liaisons disulfures (figure 11). De telles liaisons permettent des interactions intra et intermoléculaires nécessaires à la morphogénèse des particules virales et à la stabilisation de celles-ci.

Le déterminant sérologique 'a' ou boucle antigénique dite majeure est formée par les aa 124 à 149 et elle est structurée entre autre par 8 résidus cystéines. La structure tertiaire de cette boucle est très importante car le déterminant 'a' est composé de plusieurs épitopes dont certains sont neutralisants (Carman, Owsianka et al. 1999). De nombreux résidus nucléotidiques qui composent le déterminant 'a' sont extrêmement conservés quelque soit le génotype, ce qui indique que la conformation spatiale l'est probablement autant. L'AgHBs est très immunogène et la présence des anticorps anti-HBs élicités naturellement ou par la vaccination protègent d'une infection au HBV. Cependant, des mutations altérant la conformation du déterminant 'a' peut mettre en défaut la reconnaissance de l'AgHBs par les anticorps anti-HBs et/ou des tests de détection enzymatique (Carman, Jacyna et al. 1989).

La présence de l'antigène AgHBs dans le sérum est le signe d'une infection en cours aiguë ou chronique. La persistance de l'AgHBs pendant plus de 6 mois signe le début d'une infection chronique. La protéine S se trouve majoritairement sous forme de particules vides qui sont beaucoup plus nombreuses que les particules infectieuses. Lors des phases de réplication la protéine HBs est fortement sécrétée dans le milieu. Il est supposé que cela joue un rôle dans les phénomènes d'immunotolérance et serve de leurre au système immunitaire. Comme les particules vides possèdent peu ou pas du tout de protéine PrÉS1, elles ne devraient pas entrer en compétition avec les particules infectieuses lors de la reconnaissance des hépatocytes et des processus d'entrée des particules virales.

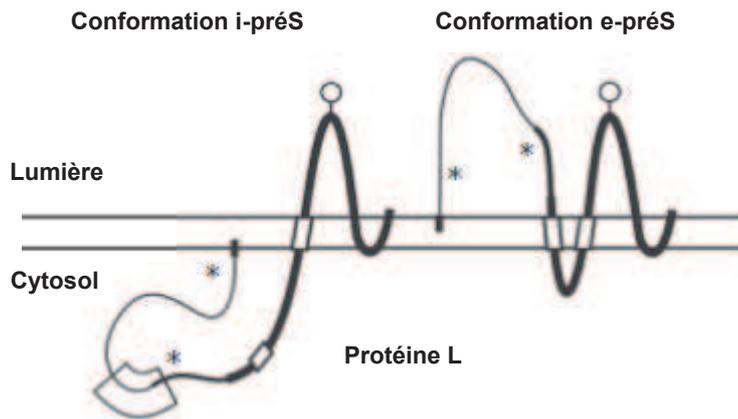


Figure 12: Conformations de la protéine L

Modèles des deux conformations spatiales que peut adopter la protéine L. L'extrémité N-terminale myristillée est ancrée dans la membrane, ou bien la boucle est interne (conformation i-prés) ou bien la boucle est externe (conformation e-prés). La conformation i-prés est indispensable pour la formation des particules infectieuses alors que la conformation e-prés est indispensable pour les étapes de l'attachement du virus aux hépatocytes et l'internalisation du virus. Les ronds représentent le site de glycosylation présent dans la région S utilisé, les étoiles représentent les sites de N-glycosylation inutilisés. Les domaines transmembranaires 1 et 2 sont représentés par des rectangles blancs alors que les domaines transmembranaires 3 et 4 sont en noirs. Le rectangle présent sur la conformation i-prés représente la zone d'interaction possible entre la protéine PrÉS1 et la capsid. Figure adaptée (Bruss 2007)

4.4.3 La protéine PrÉS2

La protéine PrÉS2 ou M contient en plus de la séquence de l'AgHBs 55 aa supplémentaires. Les fonctions de cette protéine ne sont pas totalement élucidées. Il a été montré qu'elle n'était pas essentielle aux étapes d'entrée du virus dans la cellule hôte ni dans les étapes de morphogénèse virale (Fernholz, Stemler et al. 1991). Même si elle ne semble pas indispensable aux grandes étapes du cycle viral, cette protéine est conservée chez tous les orthohepadnavirus ce qui suggère que même si sa fonction est inconnue elle est probablement importante. Son site de glycosylation est utilisé systématiquement, peut-être que cela participe au contrôle de la qualité de l'assemblage des particules virales dans le réticulum endoplasmique.

4.4.4 La protéine PrÉS1

La protéine PrÉS1 ou L est composée des régions S, PrÉS2 et d'une partie variable allant de 100 à 120 aa. Sa longueur variable n'est possible que parce que la région PrÉS1 chevauche la région spacer de la Pol qui peut elle aussi supporter une grande variabilité génétique sans que cela soit délétère pour le virus. La protéine L est indispensable à la formation des particules virales infectieuses ainsi qu'à la reconnaissance des hépatocytes par le virus et à l'internalisation de celui-ci (Le Duff, Blanchet et al. 2009). Cette grande protéine peut adopter deux topologies transmembranaires: une topologie cytosolique nommée i-prÉS (pour interne) et une topologie externe nommée e-prÉS (figure 12). Ces deux topologies confèrent deux fonctions distinctes: la topologie i-prÉS permet l'interaction entre la protéine d'enveloppe et les protéines de capsid (indispensable à la formation des particules infectieuses) (Lepere, Regnard et al. 2007) alors que la topologie e-prÉS est susceptible d'interagir avec le milieu extérieur et participerait aux processus de reconnaissance cellulaire par l'intermédiaire des récepteurs membranaires hépatocytaires (attachement et internalisation des particules virales). Le basculement entre les deux topologies doit avoir lieu après le passage dans le réticulum endoplasmique et le pré-golgi car le site de glycosylation présent dans la partie PrÉS2 n'est pas utilisé.

De plus, cette protéine possède dans sa région N-Terminale un site de myristilation qui permet l'ancrage de cette extrémité dans la membrane de l'enveloppe. La myristilation n'est pas nécessaire à la formation des particules virales, mais en absence de myristilation la particule virale n'est plus infectieuse (Urban and Gripon 2002).

4.5 L'antigène HBx

Codée par le cadre de lecture X, l'antigène HBx est une protéine non structurale de 154 aa (Kay, Mandart et al. 1985). Cette petite protéine a pour particularité d'avoir un temps de demi-vie très court, rendant sa mise en évidence difficile. La réalité de son existence a été confirmée par la présence d'anticorps anti-HBx dans le sérum des patients infectés. A ce jour, son rôle dans le cycle viral n'est pas encore élucidé. De nombreuses études ont suggéré que cette protéine interagirait avec différents

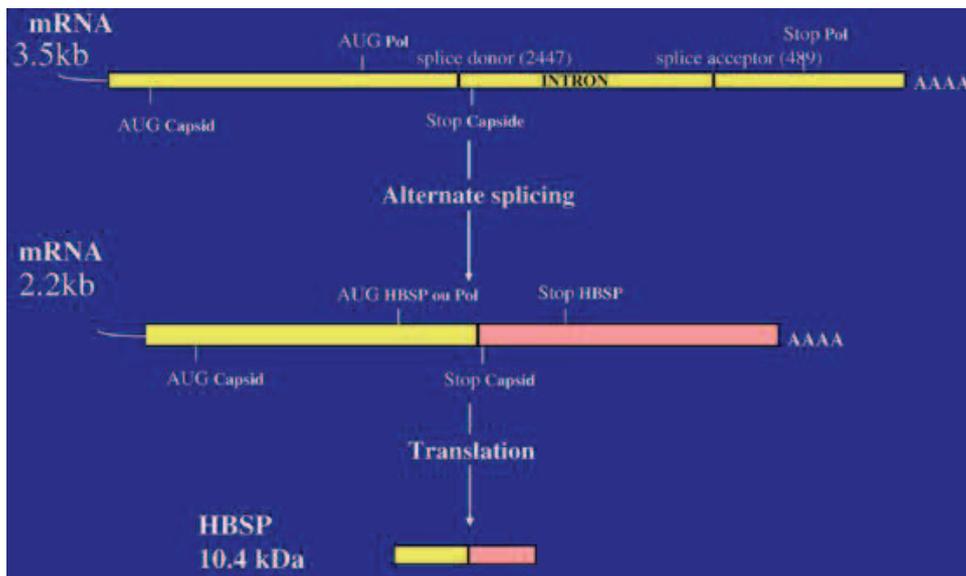


Figure 13: Formation de la protéine HBSP issu de l'épissage de l'ARNpg

Représentation schématique de l'épissage de l'ARNpg aux positions (nt 2447-489) menant à la synthèse de la protéine HBSP de 10,4 kDa. La séquence 'sauvage' de l'ARN viral est représentée en jaune, en rose est représentée la séquence issue de l'épissage et du décalage du cadre de lecture. Figure adaptée de Soussan et al. (Soussan, Garreau et al. 2000)

partenaires cellulaires et viraux, et modifierait diverses voies de signalisation. L'abondante littérature montre qu'elle possède un effet pléiotrope important dont il est difficile de dégager un consensus (Bouchard and Schneider 2004). Cette protéine ne possède pas de caractéristiques biochimiques importantes (phosphorylations, glycosylations), elle est essentiellement non-structurée, elle n'interagit ni avec l'ADN ni avec l'ARN et aurait une localisation cellulaire cytoplasmique et nucléaire. Il a été suggéré que cette protéine jouerait un rôle dans l'initiation et le maintien de l'infection virale et serait impliquée dans les processus de cancérisation. Le rôle de la protéine X a été largement étudié dans les modèles animaux sans pour autant que les résultats puissent lui attribuer un rôle clair. Il a été montré chez le virus de l'hépatite B de la marmotte (WHV) que la protéine est nécessaire à l'établissement de l'infection (Zoulim, Saputelli et al. 1994). Dans le même temps, les génomes des avihepadnavirus ne possèdent pas de protéine X. Chez le DHBV l'absence de la protéine X n'est pas incompatible à l'établissement de l'infection chronique dans le modèle canard/DHBV. Enfin, alors que chez les marmottes infectées par le WHV le développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) est très fréquent, le canard de Pékin infecté par le DHBV ne développe jamais de CHC. Chez le virus de l'hépatite B humain, l'implication de la protéine X dans les processus de cancérisation est encore largement explorée. Rien à ce jour, en tout cas chez l'homme ne montre que cette protéine ait un pouvoir oncogène direct fort.

4.6 La protéine non structurale HBSP

HBSP pour HBV Spliced Protein est une protéine non structurale, découverte tardivement, qui a pour particularité d'être codée par un ARN de 2,2 kb issu de l'épissage de l'ARNpg (Soussan, Garreau et al. 2000). Elle est traduite à partir du codon initiateur de la polymérase virale, sa séquence contient pour moitié une partie de la séquence de la polymérase virale et pour seconde moitié une séquence originale provenant d'un ORF qui n'est pas utilisé habituellement (figure 13). Cette protéine peut être sécrétée, et des anticorps anti-HBSP sont détectables dans le sérum de porteurs chroniques (Soussan, Tuveri et al. 2003). Le rôle de cette protéine n'est pas connu, elle n'est pas nécessaire au virus, mais sa présence corrèle avec la sévérité de la maladie hépatique et avec le stade fibrotique.

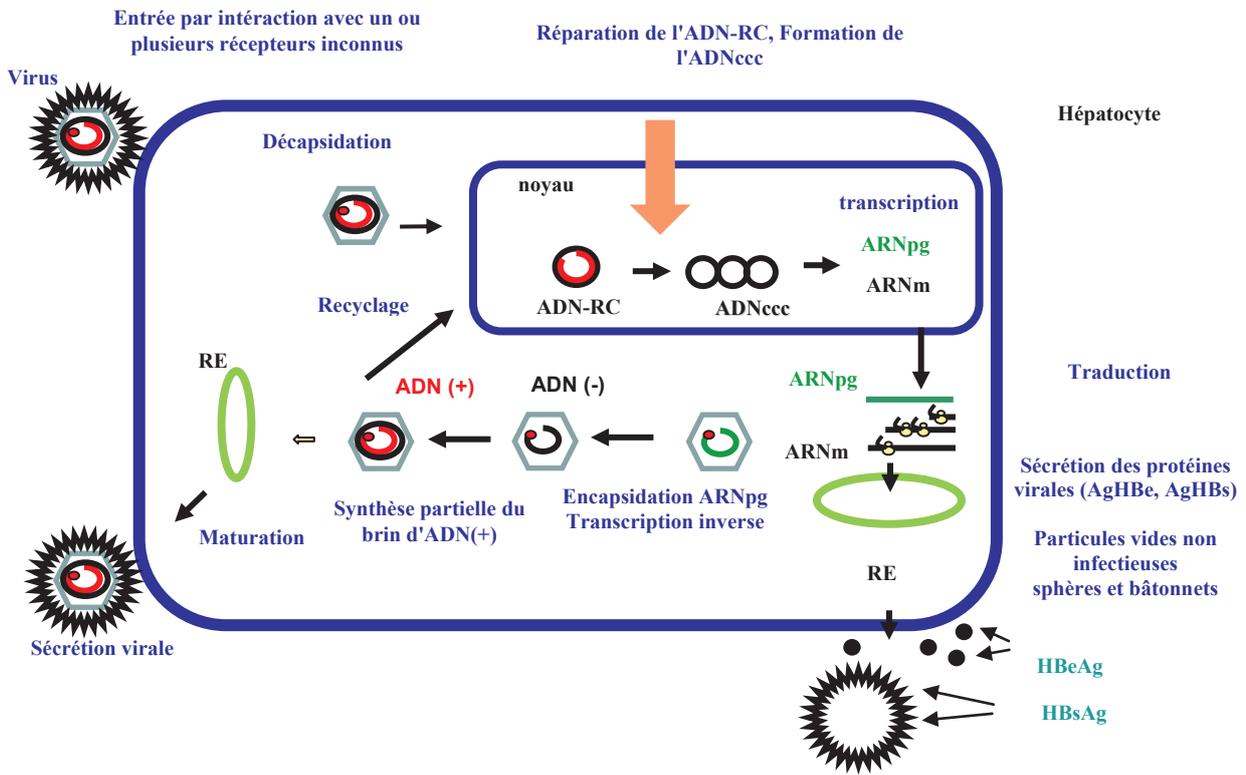


Figure 14: Cycle viral du HBV

Le virus infecte l'hépatocyte en se fixant sur le ou les récepteurs qui sont encore inconnus. Le virus est internalisé par endocytose et libère la nucléocapside dans le cytoplasme, qui migre ensuite le noyau pour délivrer le génome viral. L'ADN viral sous forme relâché circulaire (ADN-RC) est converti en ADN totalement double brin circulaire (ADNccc). Cet ADN parfaitement circulaire servira de matrice à la transcription. Les transcrits viraux sont transportés dans le cytoplasme où ils sont traduits. L'ARN pré-génomique (ARNpg, en vert) est encapsidé avec la polymérase virale (rond rouge) et sert de matrice pour l'étape de reverse transcription. La capsid a alors deux devenir possibles ou bien elle est redirigée vers le noyau et sert à amplifier le stock d'ADNccc ou alors elle subit des phénomènes de maturation et d'enveloppement dans le réticulum endoplasmique (RE) en vue d'être sécrétée (Nguyen, Ludgate et al. 2008). Des particules subvirales et des AgHBc sont sécrétées en large excès. Les bâtonnets ne sont pas représentés sur cette figure.

5. Le cycle viral

Du fait de l'absence d'un système de culture cellulaire simple capable de reproduire la totalité du cycle viral du HBV, certaines étapes sont mal connues notamment les premières étapes de néoinfection (Lu and Block 2004).

Le virion circulant interagit avec l'hépatocyte par l'intermédiaire d'un ou plusieurs récepteurs à ce jour inconnus (figure 14). Le virus est internalisé par endocytose puis les membranes virales et de l'endosome fusionnent pour libérer la nucléocapside dans le cytoplasme. La nucléocapside est ensuite adressée vers le noyau par l'intermédiaire des signaux NLS (pour nuclear localization signals) (Li, Huang et al. 2010). Elle est désassemblée au niveau du pore nucléaire libérant ainsi la molécule d'ADN-RC dans le noyau. Une fois dans le noyau l'ADN-RC est réparé en ADN circulaire covalent clos superenroulé nommé ADN ccc.

Les processus exacts qui permettent la conversion de l'ADN-RC en ADNccc ne sont pas connus mais on sait que la polymérase virale liée de manière covalente en 5' du brin (-) n'est pas utilisée pour cette étape (Kock and Schlicht 1993). Les étapes impliquent de dégrader l'oligoribonucléotide qui se trouve à l'extrémité 5' du brin d'ADN (+), de compléter le brin d'ADN (+), de se débarrasser de la polymérase liée de manière covalente à l'extrémité 5' du brin d'ADN (-), d'ôter la redondance terminale du brin (-) et finalement de ligaturer les deux brins d'ADN pour former une structure nucléique circulaire covalent clos. Toutes les étapes se font dans le noyau sous l'action d'enzymes cellulaires. C'est pourquoi les analogues de nucléosides utilisés dans le traitement anti-HBV n'ont pas n'impact sur la formation des molécules d'ADNccc. Cette structure nucléique (ADNccc) forme un minichromosome qui est associé aux histones cellulaires et persiste librement dans le noyau. La forme super enroulée confère à l'ADN viral une grande résistance et contribue à la persistance du virus dans le noyau des cellules hépatocytaires (Zoulim 2005). C'est l'ADNccc qui sert de matrice à la synthèse des transcrits viraux sous la régulation de mécanismes épigénétiques (acétylation des histones H3, H4) (Pollicino, Belloni et al. 2006). Ensuite les transcrits viraux, l'ARNpg et les ARNm sont exportés dans le cytoplasme pour être traduits.

L'ARNpg sert de matrice à l'étape de reverse transcription. Cet ARN dont la taille est supérieure à un génome de HBV a pour particularité d'avoir des séquences redondantes aux extrémités 3' et 5'. La polymérase virale interagit avec l'ARNpg par l'intermédiaire du signal d'encapsidation. L'initiation de la reverse transcription débute sur le signal d'encapsidation qui se trouve à l'extrémité 5' de l'ARNpg par la polymérisation d'une molécule de dGTP avec le résidu tyrosine du domaine TP de la Pol puis par l'addition de deux nucléotides supplémentaires (figure 15). C'est probablement la boucle intérieure du signal d'encapsidation qui sert de matrice pour l'addition des 2 nucléotides. Le complexe d'ADN naissant/polymérase est ensuite transloqué au niveau de la région DR1 qui se trouve en 3' de l'ARNpg grâce à la complémentarité des 3 nucléotides et de l'extrémité de DR1. Cette hybridation permet l'élongation du brin d'ADN (-) jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARNpg, la matrice d'ARN est dégradée simultanément par le domaine RNaseH de la Pol.

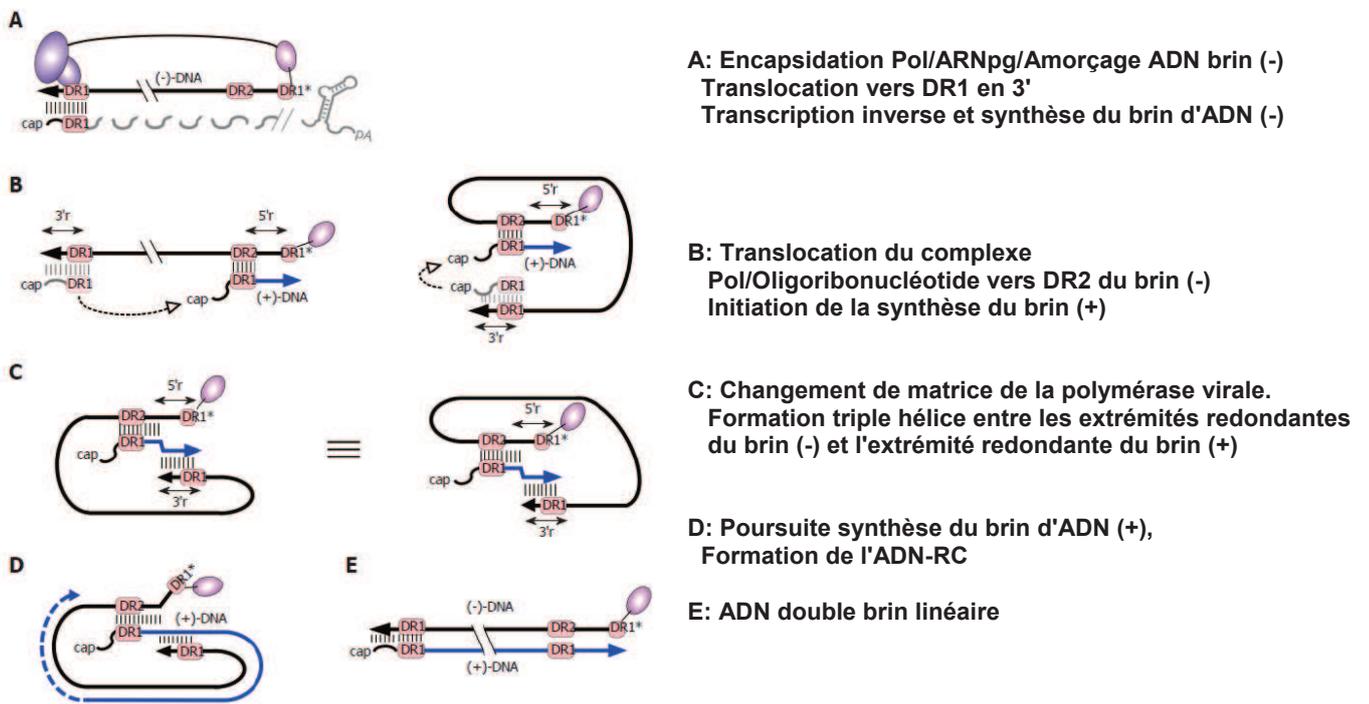


Figure 15: Les principales étapes du cycle de réplication du HBV

Figure adaptée Beck J, World J Gastroenterol, 2007 (Beck and Nassal 2007)

A la fin de la synthèse du brin (-) un court oligoribonucléotide contenant une courte séquence DR1 et une partie de l'extrémité 5' de l'ARNpg reste associé au domaine RT et est donc protégé de l'action de la RNase H. La polymérase et ce court oligoribonucléotide sont transférés en 5' du brin d'ADN (-) au niveau de la séquence DR2 où la séquence DR1 peut s'hybrider avec la séquence DR2 et c'est l'oligoribonucléotide qui sert d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN (+). Le devenir de ce court oligoribonucléotide n'est pas connu avec certitude, on pense qu'il reste fixé sur l'ADN-RC plus précisément sur l'extrémité 5' du brin d'ADN (+). Mais il est aussi possible qu'il soit dégradé. La Polymérase arrive rapidement à l'extrémité 5' du brin (-) qui sert de matrice. On pense qu'il y a formation d'une triple hélice entre l'ADN (+) naissant et les deux extrémités redondantes de l'ADN (-). Une telle structure permet le changement de matrice et de continuer la synthèse du brin (+) à partir de l'extrémité 3' du brin (-), ce qui donne naissance à une molécule d'ADN sous forme relâchée circulaire.

La nucléocapside subit ensuite des processus de maturation en vue d'être sécrétée. Pendant ces processus, les molécules d'AgHBc qui forment la capsidite sont déphosphorylées ce qui a pour conséquence de rigidifier la capsidite et la rendre alors moins perméable aux nucléotides. On pense que cette déphosphorylation est responsable de l'arrêt de la synthèse de brin d'ADN (+) en épuisant le milieu en dNTPs mais aussi en renforçant l'interaction entre les queues basiques de l'AgHBc et l'ADN. A ce stade, l'ADN-RC encapsidé a deux devenir possibles. Ou bien la nucléocapside subit des phénomènes de maturation, s'associe avec les protéines de l'enveloppe néo-synthétisées insérée dans la membrane cellulaire du réticulum endoplasmique et le virion complet pourra être sécrété. Ou bien la nucléocapside est redirigée vers le noyau pour amplifier le stock d'ADNccc. Autant chez le DHBV ce phénomène est relativement important et le stock d'ADNccc peut passer de 1 à plus de 40 copies par cellule plusieurs jours après infection, autant chez le HBV ce phénomène semble limité au moins dans le modèle d'infection des cellules HepaRG (Kock, Rosler et al. 2010). De toute façon, dans les deux cas c'est la voie de sécrétion des nucléocapsides qui est largement favorisée. Enfin, des anomalies peuvent survenir lors de la dernière étape de translocation menant ainsi à la création d'un ADN double brin qui sera sous forme linéaire (figure 15E).

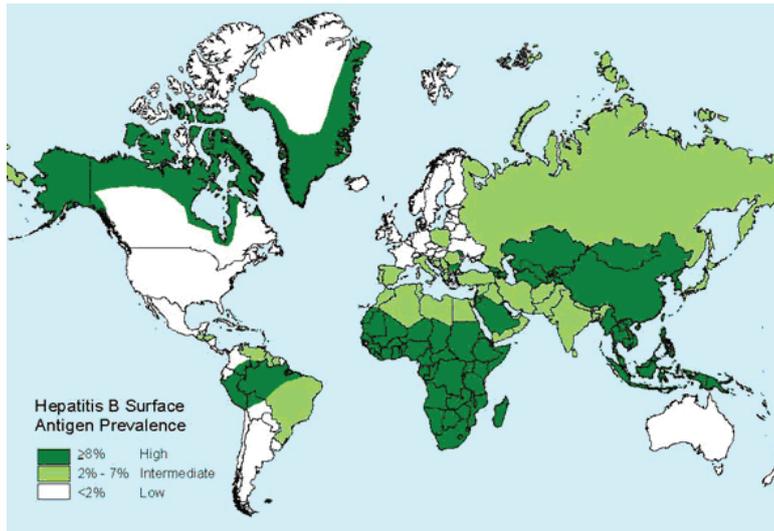


Figure 16 : Distribution géographique mondiale de l'infection par le HBV en 2006

L'infection par le HBV est fortement endémique en Chine, Amazonie, Asie, Afrique et au Groenland (plus de 8% de la population est porteur de l'AgHBs). Les pays d'Asie centrale, Moyen-Orient et d'Europe de l'est la prévalence est moyenne (entre 2 et 7%). En Europe Occidentale et en Amérique du Nord la prévalence est inférieure à 2%. (Center for Disease Control and Prevention (2))

6. La prévalence du virus de l'hépatite B.

Le virus a développé des capacités de dissémination et de résistances exceptionnelles. Bien que ce soit un virus enveloppé, il est extrêmement résistant et peut subir des traitements de 10 minutes à 65°C, 6 mois à 30°C et 15 ans à -15°C sans perdre complètement son pouvoir infectieux. Chez les patients positifs pour l'AgHBe, les particules infectieuses sont retrouvées dans le sang à des concentrations pouvant dépasser jusqu'à 10^8 à 10^9 particules infectieuses/ml. On retrouve des titres viraux plus faibles dans les sécrétions sexuelles, la salive et le lait maternel (Kidd-Ljunggren, Holmberg et al. 2006). La dissémination se fait par voie horizontale (voie sanguine, sexuelle, salive) ou pseudo-verticale (transmission périnatale, mère à enfant par le lait ou le sang). Une forte résistance au milieu extérieur, l'abondance des particules virales, et diverses possibilités de dissémination rendent ce virus extrêmement transmissible (10 fois plus que le HCV et 100 fois plus que le HIV).

Dans ce contexte, il est estimé que 2 milliards de personnes présentent au moins un marqueur d'infection aiguë résolue au HBV (anti-HBc associé ou non aux anti-HBs) et que 350 millions sont chroniquement infectées (1). Avec une population mondiale estimée à 7 milliards d'individus, un peu plus d'une personne sur trois a été en contact avec le virus au moins une fois dans sa vie.

Sans que l'on sache pourquoi certaines personnes sont plus enclines au développement d'une infection chronique que d'autres. L'établissement de la chronicité est le résultat d'un équilibre entre des facteurs propres à la relation hôte-pathogène. L'âge de primo-infection est l'un déterminant presque essentiel au développement des hépatites chroniques. Ainsi 90% des enfants infectés à la naissance et 60 à 90% dans les premières années de vie vont développer une infection chronique. Plus le système immunitaire se développe et devient mature, plus le risque de devenir un porteur chronique diminue, risque estimé entre 20 et 30 % à l'adolescence contre 1 à 5% à l'âge adulte (2).

La répartition mondiale de l'infection au HBV est très hétérogène et varie selon les régions de 0.1 à 20% (figure 16). On distingue des zones de forte, moyenne et faible prévalence. Les modes de transmission du virus varient selon ces zones. Dans les zones de forte endémie il existe deux cas de figure, en Asie une transmission essentiellement materno-fœtale et en Afrique et en Amazonie une transmission pendant l'enfance. A l'opposée, dans les zones de faible endémie la transmission se fait principalement à l'âge adulte par voie sanguine ou sexuelle chez des groupes à risque bien définis, tels que les hémodialysés, les utilisateurs de drogues injectables ou les personnes ayant des pratiques sexuelles à risque. Dans les zones de moyenne endémie (prévalence comprise entre 2 à 7%), la contamination par le HBV peut exister par les différentes voies de contamination.

Tableau 2: Déterminants sérologiques 'd/y' et 'r/w'.

Résidus Lysine (Lys) et/ou Arginine (Arg) mutuellement exclusifs aux positions 122 et 160 impliqués dans les déterminants 'd/y' et 'r/w'

		Résidu à la position 160	
		Lys	Arg
Résidu à la position 122	Lys	dw	dr
	Arg	yw	yr

Tableau 3: Bases moléculaires des sérotypes du HBV

Les résidus aux positions 122, 127, 134, 159, 160, 177, 178 sont déterminants pour définir le sérotype des souches de HBV.

Sérotype	Séquence de l'AgHBs
ayw1	122R, 160K, 127P, (134F et/ou 159A)
ayw2	122R, 160K, 127P
ayw3	122R, 160K, 127T
ayw4	122R, 160K, 127L
ayr	122R, 160R
adw2	122K, 160K, 127P
adw3	122K, 160K, 127T
adw4q-	122K, 160K, 127L, 178Q
adrq+	122K, 160R, 177V, 178P
adrq-	122K, 160K, 177A

Chapitre 2: La variabilité du HBV

Malgré la petite taille du génome et les contraintes imposées par son organisation le HBV présente une grande variabilité. Cette variabilité est le résultat du grand nombre d'erreurs générées lors de l'étape de reverse transcription, du fort taux de réplication viral et des processus d'adaptation hôte-virus. Un équilibre s'établit entre la structure génomique qui impose une grande stabilité et le nombre élevé de mutations produites.

Dans ce chapitre la variabilité associée au HBV sera déclinée sous deux angles. Une première partie traitera de la variabilité génotypique, qui est le résultat de l'analyse moléculaire des souches virales et le classement de celles-ci en génotype et sous-génotypes. Cette partie présentera les différents génotypes et leurs caractéristiques qui leur sont propres. Une seconde partie présentera la variabilité phénotypique qui est le résultat de l'émergence de variant suite à des pressions de sélections (traitements antiviraux ou pression immunitaire de l'hôte). Cette partie présentera les processus de sélection des quasi-espèces virales ainsi que les différentes modifications nucléotidiques et leur impact sur la biologie de l'infection par le HBV.

1. La variabilité génotypique

L'origine du HBV n'est pas connue mais le virus est probablement très ancien. L'arbre phylogénétique du HBV comprend des virus apparentés dont les hôtes sont aviaires et mammifères. Dans ce contexte, il est plus probable que les virus aviaires et de mammifères aient un ancêtre commun plutôt qu'ils aient évolué indépendamment. Ceci implique alors que l'ancêtre commun ait plus de 65 millions d'années période à laquelle est estimée la spéciation entre les oiseaux et les mammifères. On pense que le HBV s'est ensuite disséminé dans la population humaine en suivant les mouvements migratoires des tribus. Les souches de HBV se sont fixées et ont évolué indépendamment. La variabilité génotypique du HBV, reflète son évolution et suit les mouvements de populations humaines. Initialement, la classification de cette variabilité était basée sur les caractéristiques sérologiques (sérotypes) de l'AgHBs mais avec l'avancée des technologies et du séquençage la variabilité est maintenant basée sur l'étude des génomes entiers.

1.1 Les sérotypes

La variabilité du HBV a été initialement mise en évidence selon les propriétés antigéniques de l'AgHBs. Dix sérotypes ont été définis: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4q-*, *adw4q+*, *adrq+* et *adrq-*. La base moléculaire des sérotypes et des sous-sérotypes dépend largement mais non-seulement des résidus Lys/Arg aux positions 122 et 160 qui forment des couples de déterminants antigéniques "d/y", "r/w" mutuellement exclusifs (tableau 2). Le résidu à la position 127 est important pour définir le statut w1 à w4, les souches w1/w2, w3 et w4 codent respectivement les aa Pro, Thr et Leu.

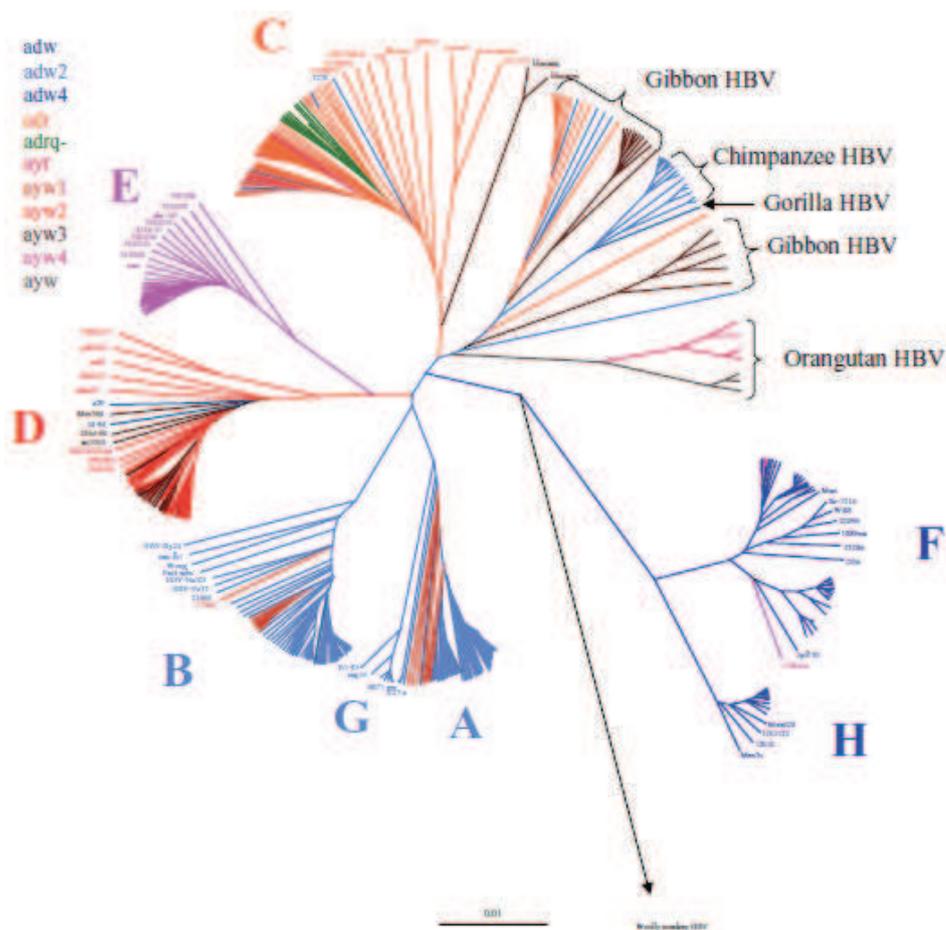


Figure 17: Arbre phylogénétique composé par les génotypes du HBV et les souches simiennes

Arbre phylogénétique obtenu à partir de l'analyse de 630 séquences du gène S de souches de HBV humaines et simiennes analysées par la méthode UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean). Les génotypes (A à H) sont indiqués en face des branches, les sérotypes sont indiqués selon le code couleur présenté à gauche de l'arbre. Figure adaptée (Norder, Courouce et al. 2004)

Le statut w1 dépend en plus des résidus Arg 122, Phe 134 et/ ou Ala 159. Quant au déterminant 'q' il est exprimé chez la quasi-totalité des souches HBV excepté chez les souches adw4 et quelques souches de sérotypes adr. Les résidus importants pour l'identification du déterminant 'q' sont aux positions 177 et 178 (tableau 3) (Norder, Courouce et al. 2004). Le sérotype est encore utilisé et représente une information essentielle dans le classement des souches.

1.2 Les génotypes

Avec l'essor du séquençage, la classification selon les sérotypes a progressivement été remplacée par celle des génotypes. Cette classification est plus précise et prend en compte la totalité de la séquence nucléotidique du génome et plus seulement la séquence protéique de l'AgHBs. Un nouveau génotype est défini par une séquence qui diffère de celles des autres génotypes connus par au moins 8% (Okamoto, Tsuda et al. 1988; Norder, Courouce et al. 1994). Huit génotypes principaux ont été décrits et sont désignés par les lettres allant de A à H. A l'exception des génotypes E, G et H tous les génotypes sont divisés en sous-génotypes (tableau 4). Un sous-génotype est caractérisé par une divergence nucléotidique comprise entre 4 et 8 % mais aussi par un motif d'aa qui lui est propre (Norder, Courouce et al. 2004; Kramvis, Arakawa et al. 2008). Enfin, il a été proposé d'intégrer deux nouveaux génotypes I et J aux 8 génotypes existants. La distribution géographique des génotypes et sous-génotypes est 'relativement' stable et une relation entre génotype, géographie et flux migratoires peut-être dégagée (figure 18).

Les souches simiennes (exceptées celles isolées chez le singe laineux, qui appartient au nouveau monde) sont phylogénétiquement très proches des souches humaines du 'vieux monde' (génotype A, B, C, D), elles sont endogènes à leur hôte et forment chacune un 'génotype'. Dans l'arbre phylogénétique présenté dans la figure 17 les souches isolées chez les Gorilles et Chimpanzés forment un seul génotype. Le Gorille chez lequel on a isolé la souche était en réalité en captivité dans une cage avec des Chimpanzés infectés par le CpzHBV, il est pensé qu'une transmission zoonotique a eu lieu (Grethe, Heckel et al. 2000). Pendant longtemps on a pensé que les virus simiens étaient le résultat d'une transmission humaine lors de la captivité des singes. De nombreuses données sont maintenant accumulées et démontrent que les singes ont leur propre virus même s'il est fortement apparenté au HBV humain (Robertson and Margolis 2002). De nombreuses études ont essayé de retracer l'histoire évolutive du HBV et d'estimer la période où le virus humain s'est séparé de son cousin simien. Dans le cas du HBV, il est très difficile de retracer cette histoire évolutive car la fixation d'une mutation ne dépend pas seulement du taux de mutations mais aussi des contraintes physiques imposées par la structure du génome. Dans l'étude menée par Simmonds, l'ancêtre commun aurait existé il y a 2300-3100 ans (Simmonds 2001), alors que son existence est estimée il y a 6000 ans dans l'étude de Fares (Fares and Holmes 2002).



Figure 18 : Distribution mondiale des génotypes et sérotypes de HBV

Seuls certains sous-génotypes sont représentés. Les génotypes A et D sont ubiquitaires, les génotypes B et C sont trouvés majoritairement en Asie, le génotype E est spécifique de l'Afrique de l'est, les génotypes F et H sont trouvés principalement en Amérique centrale, le génotype G est retrouvé sporadiquement aux Amériques, en Europe. Figure adaptée (Schaefer 2007)

1.2.1 Caractéristiques physiques des génotypes

Les génotypes reflètent l'évolution du HBV par des caractéristiques génomiques conservées telles que des insertions/délétions (tableau 4). Le génotype A diffère des autres génotypes par 6 nt supplémentaires dans la partie C-terminal du gène C (augmentation de la taille de l'AgHBc et la Pol de 2aa), alors que le génotype G diffère des autres génotypes par 36 nt supplémentaires dans la partie du N-terminale de l'AgHBc (augmentation de la taille de l'AgHBc sans affecter la Pol). Par rapport à la plupart des autres génotypes, le génotype D a 33 nt de moins dans la partie 5' de la région PréS1 ce qui diminue aussi la Pol de 11 aa. Les génotypes E et G n'ont que 3 nt en moins à cette position. La taille canonique des génotypes varie donc de 3182 nt (génotype D) à 3248 nt (génotype G) (tableau 4).

1.2.2 Les génotypes A à H

On peut supposer que le virus a été disséminé à travers le monde lors des premiers flux migratoires humains. La fixation des souches dans les tribus isolées a favorisé une évolution indépendante de ces souches et est probablement à l'origine des différents génotypes observés actuellement. Ainsi pour des raisons historiques et des déplacements de populations humaines, il y a une corrélation entre génotypes et zones géographiques, cependant des cas de répartitions atypiques peuvent être observés. Ainsi on peut retrouver des souches de génotype A européen à Hong Kong ou en Afrique Sub-saharienne et plus récemment des souches de génotype E ont été retrouvées en Europe mais chez des groupes particuliers comme les migrants Africains.

Les génotypes A et D sont ubiquitaires mais le génotype D est plus rare en Europe du Nord et en Amérique du Nord. Le génotype A est caractérisé par 2 sous-génotypes principaux, le sous-génotype A1 retrouvé principalement en Afrique et le sous génotype A2 retrouvé principalement en Europe. Une des particularités des sous-génotypes A1 et A2 est leur distribution sur le continent Américain. Le sous-génotype A1 'Africain' est retrouvé significativement au Brésil alors que le sous-génotype A2 'Européen' est retrouvé en Amérique du Nord et les autres pays d'Amérique Latine, comme l'Argentine qui est composée par une population largement issue de l'émigration Européenne.

Il a été récemment proposé que la théorie évolutionniste de la virulence s'applique aux sous-génotypes du HBV, et permette d'expliquer la distribution des sous-génotypes A1 et A2 au moins sur le continent Américain (Araujo, Waizbort et al. (2011)) (figure 19). Cependant cette théorie ne prend pas en compte l'ensemble de la variabilité des sous-génotypes HBV. La base de la théorie de la virulence est qu'il existe pour chaque agent pathogène un compromis entre virulence et transmission. Ainsi, un équilibre doit nécessairement s'instaurer entre l'expression de la virulence, assurer la survie de l'agent pathogène, de l'hôte mais aussi assurer sa dissémination selon la mobilité de l'hôte. Il existe donc une virulence optimale qui est un équilibre entre les voies de transmission de l'agent pathogène, l'expression des facteurs de virulence et la mobilité de l'hôte. Si l'agent pathogène est transmis indépendamment de la mobilité de son hôte alors l'expression de la virulence sera forte. En revanche, si la transmission de l'agent pathogène dépend de la mobilité de son hôte alors l'agent pathogène très virulent sera contre sélectionné au profit d'un pathogène favorisant une infection chronique souvent asymptomatique.

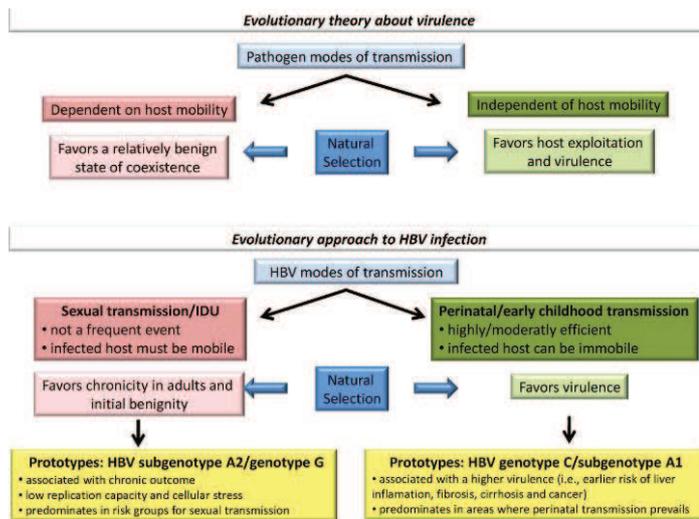


Figure 19: Modèle de la théorie de la virulence appliquée au HBV.

Figure adaptée (Araujo, Waizbort et al. (2011))

De ce fait, il pourra donc profiter de la mobilité de son hôte pour assurer sa propre transmission.

Cette théorie a été appliquée à quelques sous-génotypes du HBV pour expliquer les différences en termes de pathogénicité mais aussi en terme de distribution. Ainsi il est proposé que les génotypes A2 et G dont la transmission se ferait majoritairement chez l'adulte par voie sexuelle et sanguine favoriseraient une infection chronique car ils seraient dépendant de la mobilité de leur hôte. En revanche les génotypes A1 et C qui sont transmis majoritairement par voie materno-fœtale ou pendant l'enfance et sont donc indépendants de la mobilité de leurs hôtes et favoriseront ainsi la virulence et le développement de CHC.

Le génotype A est composé de nombreux sous-génotypes dont la diversité s'exprime principalement en Afrique (Hubschen, Mbah et al. 2011), c'est pourquoi il est suggéré que l'origine du génotype A serait Africaine (Hannoun, Soderstrom et al. 2005). Le sous-génotype A1 est retrouvé principalement en Afrique de l'est, du sud-est mais aussi en Asie et en Amérique du Sud. Le génotype A2 qui est trouvé majoritairement en Europe est aussi retrouvé en Afrique du Sud. Le sous génotype A3 en Afrique de l'Ouest (Cameroun et Gabon), les sous génotypes A4 et A5 en Afrique Sub-saharienne, A4 plus particulièrement au Mali et en Gambie. Les premiers isolats de sous génotype A5 ont été isolés au Nigéria et plus récemment en Haïti. La présence du sous-génotype A5 dans cette île caribéenne s'explique par les mouvements de population lors de l'esclavage. Plus récemment, c'est le sous génotype A6 qui a été proposé, est composé d'isolats Africano-Belge de patients originaires du Congo et du Rwanda. Le dernier sous génotype A7 intègre des souches qui ont été isolées uniquement au Cameroun et au Rwanda. Le génotype A7 n'est pas retrouvé aux Antilles ce qui suggérerait que son introduction en Afrique soit récente.

Les génotypes B et C sont prédominant en Asie. Le génotype B comprend 9 sous-génotypes répartis selon une distribution géographique spécifique. D'une manière générale le sous génotype B1 ou Bj, considéré comme le 'vrai' génotype B est majoritairement trouvé au Japon. Les génotypes B2 à B5 et B7 à B9 ou Ba, sont majoritairement retrouvés en Asie, et sont tous des sous-génotypes recombinants (recombinaison entre les génotypes B et C). Le sous génotype B2 est trouvé principalement en Chine, B3 en Indonésie, B4 au Vietnam, B5 aux Philippines, les sous génotypes B7, B8 et B9 dans les îles de la Sonde orientales, Timor (Thedja, Muljono et al. 2011). Le sous-génotype B6 est relié phylogénétiquement au sous-génotype Bj, et est principalement trouvé chez les populations autochtones d'Alaska, Canada et Groenland. Sa présence dans l'extrême nord du continent américain s'explique principalement par les flux migratoires nippons (Sakamoto, Tanaka et al. 2007). De manière intéressante, il a été montré que la distribution des sous génotypes B dans l'archipel indonésien était associée à l'origine ethnique plutôt qu'à la localisation géographique (Nurainy, Muljono et al. 2008). Les données archéologiques et anthropologiques ont révélée que deux flux de migrations majeurs avaient eu lieu dans l'archipel. Le premier il y a 60 000 ans qui correspond à l'arrivée de l'homme moderne alors que le second plus récent il y a 3000 à 5000 correspond à une partie de la diaspora des populations Austronésiennes dans l'archipel.

Tableau 4 : Caractéristiques des génotypes/sous-génotypes/ sérotypes du HBV

Génotype	Sous-génotype ^a	Sérotipe	Distribution géographique	génom (pb)	Caractéristique du génome
A	A1 (Aa)	adw2 , ayw1	Afrique, Asie	3221	Insertion de 2 aa position 153 et 154 dans l'AgHBc
	A2 (Ae)	adw2 , ayw1	Amérique du Nord Europe du Nord		Insertion de 2 aa position 153 et 154 dans l'AgHBc
	A3, A4, A5, A6 A7		Cameroun, Mali, Haïti, Afrique de l'est, Congo, Rwanda		Insertion de 2 aa position 153 et 154 dans l'AgHBc
B	B1 (Bj)	adw2	Japon	3215	
	B2 (Ba), B3 B4	adw2 , ayw1, adw3 adw2 ,	Reste de l'Asie Vietnam, Cambodge		
	B5-B7-B8-B9 B6	ayw1 , adw2	Asie, Indonésie Alaska, Canada		
	C1-C2	adrq+ , ayr, adw2, ayw1	Asie du sud est	3215	
C	C3-C5 à C10, C11 à C16	adrq-, adrq+	Ile du pacifique, Indonésie		
	C4	ayw3	Australie (aborigènes)		Délétion des aa 1 à 11 PréS1 ^b
D	D1	ayw2 , adw1, ayw1	Moyen Orient, Europe, Egypte, Inde, Asie	3182	Délétion des aa 1 à 11 PréS1
	D2	ayw3 , ayw1	Japon, Europe		
	D3	ayw3 , ayw2, ayw4	Asie, Afrique du sud, USA, Europe		
	D4	ayw2 , ayw3	Australie, Japon, Nouvelle Guinée		
	D5-D6 D7		Inde, Japon, Indonésie Tunisie, République Centre Africaine		
E		ayw4 , ayw2	Afrique Sub-saharienne, Angleterre, France	3212	Délétion de l'aa 11 dans PréS1
F	F1a F1b	adw4 , ayw4 adw4	Amérique centrale Argentine, Venezuela, Japon, USA	3215	
	F2	adw4	Venezuela, Nicaragua, Brésil,		
	F3	adw4	Venezuela, Panama, Colombie		
	F4	adw4	Argentine, Bolivie, France		
G		adw2	USA, Allemagne, Japon, Mexique, France	3248	Insertion de 11aa dans l'AgHBc Délétion de l'aa 11 dans PréS1
H		adw4	USA, Japon, Nicaragua	3215	
Possible I		adw	Vietnam	3215	Recombinant A/C/G
Possible J		adw	Japon (Bornéo)	3182	Proche souche HBVC4 et HBVgbn/ HBVoru

adapté (Kay and Zoulim 2007), (Hubschen, Mbah et al. 2011; Mulyanto, Depamede et al 2011.; Mulyanto, Pancawardani et al 2012.; Thedja, Muljono et al. 2011; Norder, Courouce et al. 2004; Schaefer 2007)

^a : principaux sous-génotypes identifiés pour chaque génotypes

^b : Certains sous génotypes C4 possède une délétion de 11aa

Les sérotypes principaux sont notés en gras

La taille des AgHBs (226 aa), de la région PréS2 (55 aa) et de la région X (154 aa) est identique chez tous les génotypes

Il est suggéré que le génotype C aurait été introduit lors du premier flux migratoire. Le second flux migratoire et l'arrivée de la population Austronésienne aurait introduit des souches HBV de génotype B. Les processus de recombinaison entre les génotypes B et C et les caractéristiques ethniques des populations auraient favorisé l'émergence de différents sous génotypes. Ces données ne sont pas en accord avec l'histoire évolutive du HBV et de la spéciation du virus humain et simien qui est estimé au plus tard il y a 6000 ans (Fares and Holmes 2002).

Le génotype C est principalement trouvé en Asie du Sud-est et dans les îles du pacifique. On a récemment ajouté 6 sous génotypes C (C11 à C16) (Mulyanto, Depamede et al 2011.; Mulyanto, Pancawardani et al. 2012). L'analyse des génotypes B, C, D et de certains sous génotypes dans l'archipel indonésien a montré que leurs distributions étaient reliées au langage parlé par les populations Austronésiennes et les non Austronésiennes.

L'ensemble des données sur les sous génotypes viraux montrent que le HBV suit et évolue avec les populations humaines. Mais aussi cela suggère qu'un fond génétique et une spécificité ethnique puisse contribuer à expliquer la distribution des sous génotypes viraux.

Le génotype F est trouvé majoritairement chez les populations Amérindiennes d'Amérique centrale et du Sud (Devesa and Pujol 2007) mais est aussi retrouvé chez les populations autochtones d'Alaska (sous-type F1a). Le génotype H est présent en Amérique centrale et est retrouvé ponctuellement au sud des Etats Unis, présence probablement due aux flux migratoires humains.

Le génotype G est trouvé sporadiquement (Amérique du Nord, Mexique, France), et étonnement tous les isolats portent les mutations PréCore et BCP (Araujo, Waizbort et al. (2011); Kato, Orito et al. 2002). Il est retrouvé très fréquemment en coinfection avec des isolats de génotype A. De manière intéressante, ce virus semble avoir une réplication altérée qui nécessite une double infection pour rétablir 'le potentiel répliatif' et/ou de compléter en trans la sécrétion de l'AgHBe. Le génotype G en 'mono-infection' est uniquement responsable d'infections aiguës (Zaaijer, Boot et al.2011; Chudy, Schmidt et al. 2006).

Le génotype E est restreint à l'Afrique et n'est pas retrouvé de façon significative sur le continent Américain. L'absence de génotype E en Amérique pourrait s'expliquer par son apparition il y a moins de 300 ans dans la population Africaine et plus précisément après le commerce triangulaire du XVI siècle. Cette hypothèse est appuyée par la faible diversité génétique observée entre les souches de génotype E ce qui suggère une apparition récente (Andernach, Hubschen et al. 2009). Ou bien le génotype E était déjà établi dans la population Africaine mais sans que l'on sache pourquoi les conditions de sa dissémination en Amérique du Sud n'étaient pas favorables et le génotype A1 aurait pris le dessus ?

1.2.1 Le génotype I

En 2008, Tran et al ont isolé une souche de HBV atypique (Tran, Trinh et al. 2008), dont l'analyse moléculaire a révélé que la séquence génétique était très divergente de ce qui était connu.

L'isolat présentait une grande similarité avec une souche recombinante isolée 8 ans auparavant par l'équipe de Lindh (Hannoun, Norder et al. 2000). Les deux souches ont pour caractéristiques communes: (i) d'avoir été isolées à Hanoi (Vietnam): (ii) une divergence nucléotidique > 8% par rapport aux génotypes connus (A à H), (iii) un profil de recombinaison inter-génotypique complexe (génotypes A/C et G) dont les points de rupture sont semblables (iv) le même sérotype *adw*. Par les résultats obtenus, l'équipe de Abe a proposé de définir un nouveau génotype nommé I et qui aurait comme premiers représentants ces deux souches virales. Ces résultats ne sont pas restés sans suite, et sont à l'origine d'une polémique concernant l'existence ou non du génotype I. Deux mois après la publication de cette étude, une publication dans laquelle étaient ré-analysés les profils de recombinaisons de ces mêmes souches a été publiée par *Mizokami et al* dans *Journal of Virology* (Kurbanov, Tanaka et al. 2008). Les auteurs ont utilisé un autre logiciel d'analyse et les résultats obtenus ne permettaient pas d'assigner ces souches à un nouveau génotype mais de les inclure au sein du génotype C.

Parallèlement, des travaux menés par Olinger et al. ont identifié 19 souches de HBV isolées au Laos dont l'analyse moléculaire a montré que ces souches étaient difficilement assimilables à aucun génotype existant (Olinger, Jutavijittum et al. 2008). Ces souches présentent un profil de recombinaison complexe (génotype A/C et G). Leur analyse est basée sur les résultats présentés par Tran et al et intègre ces 19 souches dans le génotype I. Dans leur travail, ils vont même plus loin en définissant deux sous-génotypes I1 et I2. Ils proposent donc d'intégrer ces 19 souches au possible nouveau génotype I. Enfin, plus récemment c'est une souche de HBV isolée chez un porteur inactif en Chine qui a été proposée pour intégrer le génotype I (Yu, Yuan et al. 2010). Les profils de recombinaison sont les mêmes que ceux observés dans les études menées par Tran et Olinger. L'existence du génotype I n'a pas encore été officialisée à ce jour, mais ces résultats soulignent l'importance des phénomènes de recombinaisons inter-génotypique dans l'évolution et la variabilité du HBV.

1.2.2 Le génotype J

Plus récemment un isolat de HBV a été proposé en tant qu'unique représentant d'un nouveau génotype nommé J (Tatematsu, Tanaka et al. 2009). Cette souche a été isolée chez un patient de 88 ans, seul membre de sa famille à avoir contracté une infection par le HBV. Ce patient d'origine japonaise a participé à la seconde guerre mondiale et a été mobilisé sur l'île de Bornéo. L'isolat de sérotype *adw*, est positionné phylogénétiquement entre le génotype C4 du HBV humain et un embranchement non humain proche des Gibbons et des Orang Outans. Le génotype C4 est déjà une souche recombinante entre une souche humaine et une souche de Gibbon. La séquence isolée partage avec 'quelques' génotypes C4 et les génotypes non humains (Gibbon et Orang Outan) une délétion de 33 nucléotides dans la région PrS1. Les propriétés fonctionnelles de l'isolat ont été testées dans un système d'étude *in vivo* de souris dont les cellules du foie avaient été humanisées, il a été montré que le virus était compétent pour la réplication et est capable d'exprimer tous les antigènes viraux. Cependant, une séquence à elle seule ne peut pas suffire à définir un génotype. Le génotype J, est dans l'attente de nouveaux représentants pour pouvoir exister en tant que tel.

1.3 Sur-infection et souches recombinantes

La sur-infection est définie par la présence chez un même patient de 2 géotypes différents. D'un point de vue clinique, ces infections peuvent être accompagnées par une exacerbation de la maladie hépatique. Ces infections sont observées dans les zones où co-circulent au moins deux géotypes majoritaires. Il se pourrait aussi que ces phénomènes soient sous-estimés. Une souche pourrait prendre le dessus sur l'autre et cacher ainsi la présence de la seconde. L'observation de la seconde souche se ferait uniquement lors de la disparition de la première. De tels cas ont pu être observés après le commencement d'un traitement anti-HBV suivi d'un rebond viral. Avant traitement, le virus prédominant était de géotype A alors qu'après le rebond viral un géotype D a émergé (Hannoun, Krogsgaard et al. 2002). Selon les méthodes de géotypage utilisées et les études, les doubles infections sont rapportées à des prévalences variables comprises entre 4,4 et 17,5% des patients HBV+ (Chen, Kao et al. 2004). La coinfection de deux géotypes différents peut mener à des échanges de matériel génétique et créer ainsi des mutants qui sont des recombinants inter-géotypiques qui contribuent à l'enrichissement de la diversité génétique.

Les mécanismes de recombinaison inter-géotypique en tant que tel ne sont pas clairs. Est-ce que la recombinaison apparaît lors de l'étape de reverse transcription de l'ARN pré-génomique ? Ceci impliquerait que deux ARNpg soient encapsidés dans la même capsid, phénomène à ce jour jamais observé. Plus raisonnablement, la recombinaison pourrait avoir lieu dans le noyau où pourrait coexister deux copies d'ADNccc de géotypes différents et pour lesquels l'échange de matériel génétique serait alors possible. Des points de rupture ont été identifiés tout au long du génome du HBV et seraient concentrés au voisinage des régions : DR1 (nt 1640-1900), PréS1/PréS2 (nt 3150-100), extrémité 3' de la région Core (nt 2330-2450) et l'extrémité 3' de la région S (nt 650-830). Ces points de rupture favoriseraient les phénomènes de recombinaisons (Simmonds and Midgley 2005) (Yang, Xing et al. 2006).

Quasiment tous les géotypes ont été rapportés dans des cas de recombinaison inter-géotypique. Les géotypes A et C sont le plus souvent cités alors que le géotype H ne l'est pas. Cela peut venir du fait qu'un nombre plus important d'isolats de géotype A et C ont été séquencés à ce jour contrairement au géotype H, qui est peu représenté dans les banques de séquences HBV. Des cas de triple recombinaison ont même été décrits (Chen, Kao et al. 2004).

La recombinaison entre des séquences humaines et non humaines a aussi été décrite (Simmonds and Midgley 2005). Dans ces cas elles impliquaient la recombinaison entre des géotypes C humains et des virus apparentés appartenant à des Chimpanzés et des Gibbons. Ces phénomènes; même si ils sont rares sont très importants car cela implique que le passage de la barrière de l'espèce est possible entre les virus apparentés au HBV simiens et humain. Récemment, il a été montré que des souches de virus apparentés appartenant au Gibbon et à l'Orang Outan pouvaient répliquer dans un modèle *in vivo* de souris dont les cellules du foie avaient été humanisées (Sa-Nguanmoo, Tanaka et al. 2011). Le sous-géotype C4 est le résultat d'une recombinaison entre un virus humain et un virus apparenté au

Tableau 5 : Facteurs influençant la maladie hépatique lors d'infection par le HBV.

Des facteurs biologiques, environnementaux mais aussi viraux peuvent influencer le devenir la maladie hépatique et le développement de carcinome hépatocellulaire.

Facteurs biologiques	Facteurs environnementaux	Facteurs viraux
Statut Homme-Femme	Exposition aux Aflatoxines	Charge virale circulante
Zone de prévalence	Ethnicité	Mutations associées au développement de CHC
Age de primo infection	Consommation d'alcool	ADN viral intégré ou non
Accès au traitement	Tabagisme	Statut AgHBe

Gibbon, qui a persisté dans la population humaine et qui fait maintenant pleinement partie du génotype C. La recombinaison inter et intra-génotypique fait entièrement partie des processus évolutifs et de l'enrichissement de l'espèce virale. Les virions issus de certaines recombinaisons ont non seulement été capables de se maintenir dans la population virale mais aussi de se disséminer et enfin de former un sous-génotype particulier avec une distribution propre. Les meilleurs exemples illustrant ces phénomènes de recombinaison inter-génotypiques sont : (i) les sous-génotypes Ba qui sont issus des processus de recombinaison entre les génotypes B et C (Sugauchi, Orito et al. 2002) (ii) le sous-génotype Tibétain issu de la recombinaison entre les génotypes C et D (Cui, Shi et al. 2002). Par ailleurs, de nombreux cas de recombinaisons intra-génotypiques ont été rapportées chez les génotypes A/D/F et H (Simmonds and Midgley 2005). Ces cas sont plus difficilement détectables mais participent aussi à l'enrichissement entre les sous-génotypes.

1.4 Génotypes et influence sur la maladie hépatique

Il a souvent été tentant d'associer un génotype particulier du HBV avec des formes sévères d'hépatites et au développement de CHC mais les résultats sont contradictoires et ne peuvent se satisfaire uniquement du génotype de la souche virale sans prendre en compte des facteurs biologiques, environnementaux et viraux pouvant influencer l'évolution de la maladie hépatique (tableau 5).

Il existe pléthore d'études sur ce sujet, dont il ressort tout de même que les génotypes et sous-génotypes C, B2 à B5 et F1 sont associés à un risque plus élevé de développer une cirrhose et un CHC que les autres génotypes (McMahon 2009). Peu de données sont disponibles concernant le génotype F. Cependant, l'étude de Livingston menée sur 1176 patients chroniquement infectés d'Alaska, suivis pendant 20 ans, montre que le risque de développer un CHC est plus important chez les patients infectés par un génotype F1 ou C2 que lors d'infection par les génotypes A2, B6 ou D (Livingston, Simonetti et al. 2007). De plus, le CHC apparaît plus précocement lors d'infection par un génotype F1 qu'avec n'importe quel autre génotype A2, C2 ou D (22,5 ans contre 60 ans). Ceci pourrait suggérer que les mécanismes impliqués dans le développement de CHC ne sont pas les mêmes entre le génotype F1 et les génotypes A2, C2 et D.

Concernant l'évolution de la maladie hépatique, une distinction entre les sous-génotypes Bj et Ba est faite, la séroconversion anti-HBe est plus précoce chez les personnes infectées par le sous-génotype Bj que Ba. L'antigène HBe est retrouvé plus fréquemment chez les patients de plus de 30 ans infectés par le sous-génotype Ba que Bj (respectivement 32% contre 9%) (Kobayashi, Suzuki et al. 2005). Enfin, la mutation BCP est associée au risque de développer un CHC et est retrouvée de manière significativement plus élevée chez les isolats de sous-génotypes Ba que de Bj (Sugauchi, Orito et al. 2006).

Le génotype C apparaît comme étant le génotype le plus virulent de tous les génotypes, pour lequel le taux de morbidité associé est le plus élevé (McMahon 2009). Les patients infectés par le génotype C montre un taux d'ADN viral plus élevé, une positivité AgHBe plus longue, une séroconversion plus

tardive. La forte virémie, prolongée contribue à augmenter les processus d'intégration du virus et à aggraver la maladie hépatique (Chan, Tse et al. 2008). Le développement de CHC est plus important et plus précoce chez les patients infectés par un génotype C (Lee, Chen et al. 2003).

En résumé, la distribution des souches de HBV est hétérogène et varie encore de nos jours selon les mouvements des populations humaines. Le brassage génétique continu des souches HBV associé aux phénomènes de mutations et de recombinaisons sont à l'origine de leurs évolutions et de leurs diversités. L'analyse moléculaire des isolats viraux a permis de les classer selon 8 génotypes auxquels s'ajoutent deux 'nouveaux' prétendants. Ainsi malgré une organisation génétique très compacte qui impose des contraintes structurales fortes la variabilité génotypique du HBV est très importante. Les modifications du génétique du virus sont des événements complexes dépendant non seulement des contraintes du milieu (Jazayeri, Alavian et al. 2010) mais aussi des caractéristiques de la génétique humaine pouvant dépendre de l'ethnicité et de sa diversité.

2. La variabilité phénotypique

Lors de l'infection par le HBV, chaque hôte héberge une population virale distincte, caractérisée par un patrimoine génétique collectif nommé pool génétique. Ce pool représente la somme des génotypes individuels dont les modifications génétiques peuvent affecter chacun des gènes et/ou les séquences régulatrices exprimés chez les patients à un moment donné. Ce sont les quasi-espèces virales qui traduisent cette diversité en exprimant l'ensemble des phénotypes possibles au sein de la population virale. Les quasi-espèces sont génétiquement très proches et permettent l'expression de phénotypes différents en fonction de la pression de sélection exercée sur la population virale.

La sélection naturelle agit comme un filtre et sélectionne au niveau de la quasi-espèce, la ou les plus aptes pour permettre la meilleure adaptation aux variations du milieu. Les quasi-espèces jouent donc un rôle important dans les phénomènes de résistances et d'échappement viraux. Cette partie traitera dans un premier temps de l'importance du réservoir viral et de l'établissement de l'infection chronique dans les processus de sélection des quasi-espèces. Dans un second temps, les principales mutations de chaque gène et leur implication sur le cycle viral et/ou la biologie de l'infection au HBV seront présentées. Enfin dans une dernière partie je présenterai les cas d'infections par le HBV dites occultes.

2.1 Réservoirs du HBV et immunotolérance

Les virus responsables des infections chroniques sont le plus souvent retrouvés dans des réservoirs difficilement accessibles par le système immunitaire. Ceci s'applique aussi pour le virus de l'hépatite B dont le tropisme est majoritairement hépatique. Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain, il est composé de 60% à 70% de cellules hépatocytaires puis, en plus faible proportion des cellules des canaux biliaires, des cellules de Küppfer (macrophages), des cellules d'Ito et des lymphocytes hépatocytaires. Le foie est un organe central qui assure diverses fonctions vitales pour l'organisme, dont des fonctions métabolique. En permanence, le foie joue aussi un rôle dans la purification du sang. Il filtre le sang qui arrive de la circulation splanchnique vers la circulation générale, ce qui l'expose à un grand nombre de toxines et corps étrangers. Pour ces raisons le foie est considéré comme un organe immunotolérant. Le HBV est un virus non cytopathique qui ne cause pas de lésions hépatiques directes, celles-ci sont la conséquence de la destruction des hépatocytes par les cellules du système immunitaire. Des études menées sur des chimpanzés ont montrées que l'infection par le HBV n'affectait pas les profils de transcription des voies de l'immunité cellulaire et n'induisait pas de réponse cellulaire de type interféron (Wieland and Chisari 2005). C'est à partir de ces résultats que le virus de l'hépatite B a longtemps été considéré comme un virus 'silencieux'.

Cependant les données récentes montrent que le HBV n'est pas si silencieux qu'on ne le pensait jusqu'alors et que non seulement il était détecté précocement par les cellules du système immunitaire mais aussi qu'il serait capable de contrer la réponse immunitaire (pDC et lymphocytes B) pour persister dans l'organisme (Vincent, Zannetti et al. 2011). Néanmoins, le foie se comporte comme un organe 'tolérant' à l'infection. Ce statut immunoprivilégié associé à la longue demi-vie des cellules hépatocytaires et de l'ADNccc contribuent aux phénomènes de persistance virale (Bauer, Sprinzl et al. (2011); Protzer and Schaller 2000). Chez l'homme, l'ADN viral a aussi été détecté dans des compartiments extra-hépatiques comme les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et à l'état de trace dans la moelle osseuse, les reins, la rate, le cœur. Bien qu'aucune démonstration claire d'une réplication virale active dans ces compartiments n'ait été faite jusqu'à présent, les réservoirs extrahépatiques jouent probablement un rôle central dans la persistance virale (Pontisso, Vidalino et al. 2008). Le modèle d'étude WHV/marmotte, a démontré que le WHV répliquait dans le foie mais aussi dans les compartiments extra-hépatiques comme les PBMC, la moelle osseuse, la rate, les ganglions lymphatiques et occasionnellement dans le thymus (Michalak 2000).

L'infection chronique par le HBV est un facteur de risque très important dans le développement de carcinome hépatocellulaire (Brecht, Kremsdorf et al. (2010)). La transformation cellulaire vers le CHC par le HBV est probablement multifactorielle et fait intervenir des mécanismes de l'hôte mais aussi du virus. Du côté de l'hôte, c'est la destruction des hépatocytes infectés par le système immunitaire et les processus de régénération cellulaire associés qui seraient un des facteurs majeurs de transformation associés à l'évolution vers l'état de cirrhose et fibrose. Du côté du virus, on attribue à la protéine X des propriétés transactivatrices impliquées dans les processus de transformation cellulaire. Cependant aucun rôle oncogénique fort ne peut lui être attribué directement. Même si le cycle de réplication du HBV ne nécessite pas l'intégration du génome viral, des séquences peuvent s'intégrer au hasard dans le génome cellulaire. L'intégration a lieu majoritairement lors de réplication intense que l'infection soit aiguë ou chronique (Kimbi, Kramvis et al. 2005). De nombreuses intégrations de séquences génomiques virales ont été observées, cependant l'intégration d'un génome entier intacte n'a jamais été démontrée. Par ailleurs, le développement de CHC viro-induit par le HBV est associé à une grande instabilité chromosomique. On peut aussi penser que l'intégration aléatoire de gènes viraux peut affecter la régulation de certains gènes cellulaires ce qui participerait aussi aux processus de cancérogénèse. L'ADN viral intégré est retrouvé chez 80% des patients chroniquement infectés.

2.2 L'infection par le HBV

2.2.1 L'infection aiguë

L'infection aiguë chez l'adulte est une infection le plus souvent transitoire caractérisée par le portage de l'AgHBs pendant une durée inférieure à 6 mois. Bien que la réplication virale soit intense, dans la plupart des cas la mise en place d'une réponse immunitaire forte et spécifique caractérisée par l'apparition des anticorps neutralisants anti-HBs permet une diminution rapide de la charge virale et une

résolution de l'infection. Dans 75% des cas l'infection aiguë passe inaperçue et n'est associée à aucun signe clinique. Dans certains cas, des signes tels que la jaunisse et/ou des variations des transaminases sériques (ALAT, ASAT) apparaissent lors de l'infection mais ils ne seront que passagers.

Dans 1% des cas, des infections dites fulminantes sont observées. Ces infections sont caractérisées par une atteinte hépatique très rapide et très forte pouvant mener à la mort du patient (Lee 1997). C'est probablement une dérégulation intense de la réponse immunitaire cellulaire qui conduit à une destruction massive des cellules du foie. La coinfection avec le virus de l'hépatite delta (HDV) est aussi associée aux formes d'hépatites fulminantes (Koff 1987).

2.2.2 L'infection chronique

Le portage chronique se caractérise par la persistance des particules virales infectieuses et de l'AgHBs pendant une durée supérieure à 6 mois. Les mécanismes impliqués dans l'établissement de la chronicité sont multiples et dépendent de l'âge de primo infection, de la maturité du système immunitaire et de la souche virale impliquée. Chez plus de 90% des adultes, l'infection se résout par elle-même tandis que chez un faible pourcentage un portage chronique s'initie. Il a été montré chez des chimpanzés adultes que la charge virale au moment de l'infection était déterminante dans l'établissement de l'infection chronique (Asabe, Wieland et al. 2009). Plus l'inoculum de départ était élevé plus la réponse immunitaire était efficace et permettait de résoudre l'infection au HBV. Au contraire, lors d'infection par un inoculum faiblement virémique (inférieur à 10^4 copies/ml) c'est le portage chronique qui est favorisé. Il a été observé que lors de l'infection avec un inoculum dont la charge virale était faible, le recrutement de cellules lymphocytaires CD4 + était diminué et l'activité des cellules lymphocytaires CD8 + amoindrie. Les auteurs de l'étude suggèrent que ce sont les cellules lymphocytaires CD4+ qui jouent un rôle prépondérant dans la résolution ou l'établissement de l'infection chronique.

Il existe 4 grands types d'infections chroniques qui se distinguent selon (i) la charge virale circulante, (ii) la concentration des transaminases sériques (ASAT: aspartate amino transférase, ALAT: alanine amino transférase), (iii) et la positivité de l'AgHBs.

On différencie 1) les hépatites chroniques actives, AgHBs positif, des transaminases (ASAT, ALAT) élevées et des taux d'ADN HBV sériques $>10^5$ copies/ml ; 2) les hépatites chroniques associées à une tolérance immunitaire, AgHBs positif avec l'ADN HBV sérique $>10^5$ copies/ml mais avec des transaminases normales ; 3) des hépatites chroniques inactives, AgHBs positifs avec des transaminases normales et des taux d'ADN HBV sérique $<10^5$ copies/ml ; 4) des infections à HBV occultes, AgHBs négatifs, transaminases normales ou fluctuantes, l'ADN HBV est alors généralement $< 10^3$ copies/ml (Liaw, Brunetto et al. 2010).

La plupart des données existantes sur l'étude de la variabilité du HBV reposent sur l'analyse de souches impliquées dans des infections chroniques à fortes charges virales. Cependant, quelque soit le type d'infection chronique, c'est lors de portage prolongé qu'une étroite relation entre l'hôte et le virus s'établit.

2.2.2.1 Les phases de l'infection chronique et la variabilité virale

Quatre phases principales se succèdent dans l'évolution de la maladie chronique active auxquelles peuvent être reliées l'apparition de certains mutants (figure 20).

La première phase de l'infection chronique est une phase dite de **tolérance immune** caractérisée par (i) une réplication virale intense (pouvant aller jusqu'à $>10^9$ copies/ml), (ii) la présence des antigènes viraux (AgHBs, AgHBe), (iii) une séroconversion anti-HBc précoce bien qu'il ne soit pas neutralisant. Aucune atteinte hépatique, ni modification des transaminases (ALAT alanine aminotransférase, ASAT aspartate aminotransférase) n'est observée. Selon le mode de transmission de la souche HBV, l'âge du patient, le statut AgHBe cette phase peut perdurer dans le temps. Lors de transmission verticale materno-fœtale de souche AgHBe (+) cette phase peut durer plusieurs dizaines d'années alors que lors de transmission horizontale et ce même dans l'enfance cette phase peut-être extrêmement rapide (Yim and Lok 2006).

La seconde phase dite de **réactivité immunitaire** est caractérisée par la séroconversion anti-HBe (McMahon 2009). Le taux de virions circulant diminue mais reste élevé ($> 10^4$ copies/ml), les antigènes viraux sont toujours détectables dans le sérum. Le taux des transaminases sériques (ALAT, ASAT) augmente. C'est à ce stade que l'atteinte hépatique est initiée, les hépatocytes infectés sont détruits par les cellules du système immunitaire. Si la réponse immunitaire n'est pas assez efficace pour éliminer les hépatocytes répliquant le virus, un équilibre s'opère entre la réplication virale et la réponse immunitaire et les lésions hépatiques s'installent de façon durable. Dans cette situation, il est alors impératif de proposer un traitement antiviral afin d'empêcher l'évolution vers la cirrhose. Cette phase dure de quelques semaines à quelques mois.

La troisième phase dite de **tolérance** ou portage inactif est caractérisée par la négativité des antigènes (AgHBs et AgHBe) et la présence des anticorps anti-HBc/anti-HBe.

Le taux d'ADN viral circulant passe en dessous du seuil de 10^4 copies/ml, la séroconversion anti-HBs n'est pas systématique et est même très rare. Malgré une réponse immunitaire efficace l'ADNccc persiste dans le noyau des hépatocytes en répliquant à bas bruit. Des phénomènes d'intégrations de gènes viraux ont lieu et participent aux processus de transformation hépatique et de cancérisation (Brechot, Pourcel et al. 1981; Murakami, Minami et al. 2004; Minami, Daimon et al. 2005).

Enfin une phase de **réactivation virale** est observée chez la plupart des patients et constitue la dernière phase de l'infection chronique (Liaw, Brunetto et al. 2010). Seulement 2% des patients par an résolvent totalement l'infection chronique. Les réactivations sont observées plus fréquemment chez les hommes et les patients infectés par les génotypes D, C et B. Chez les patients traités par des molécules antivirales des phases de réactivations similaires nommés rebonds viraux sont observées et associées à l'apparition de mutants de résistance au traitement.

Dès le commencement de l'infection et l'établissement du pool d'ADNccc dans le noyau des hépatocytes les processus de sélection des quasi-espèces débutent.

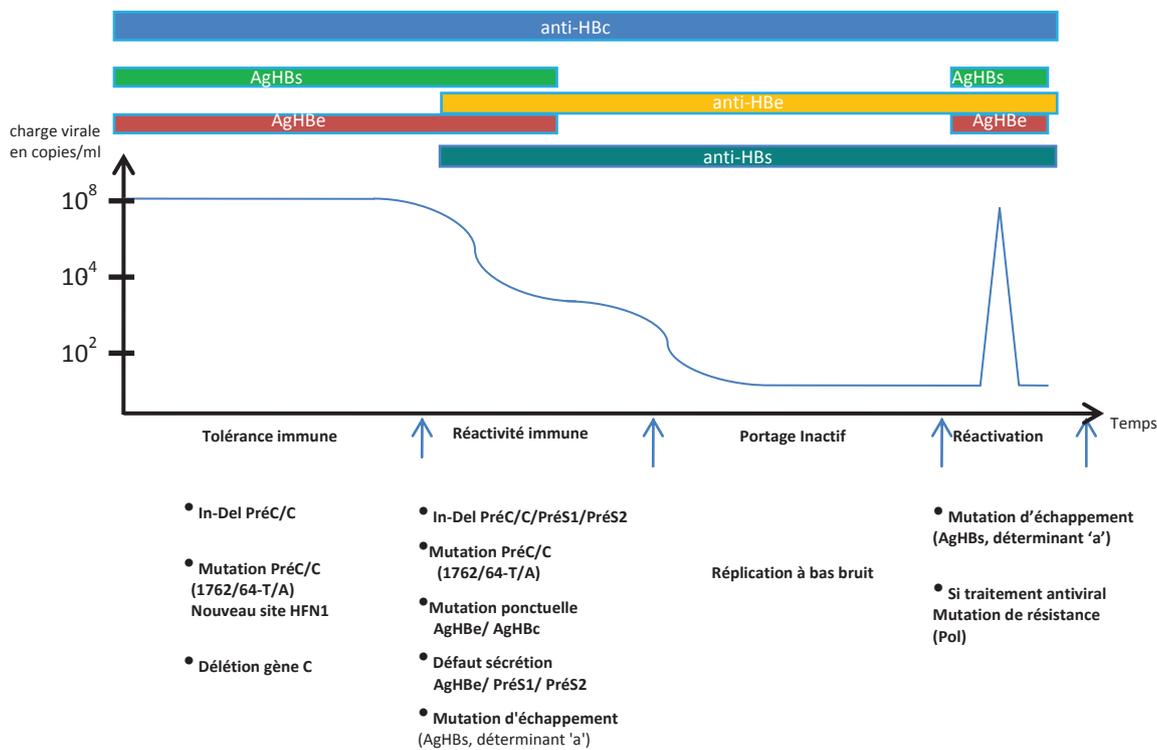


Figure 20 : Les phases de l'infection chronique et l'émergence de mutations

Représentation schématique de l'évolution de l'infection chronique et de l'émergence de mutations spécifiques selon la phase de l'infection. Les marqueurs sérologiques sont indiqués (AgHBs: antigène s, AgHBe: antigène e, anti-HBc: anticorps anti-HBc, anti-HBe: anticorps anti-HBe, anti-HBs: anticorps anti-HBs (la présence des anticorps anti-HBs n'est pas systématique)). La virémie exprimée en copies/ml est indiquées, l'évolution des transaminases hépatique (ALAT, ASAT) en fonction des phases de l'infection n'est pas indiquée. In-Del: insertion-délétion. Figure adaptée de Gunther, 2006, Journal Clin virol (Gunther 2006).

Les mutations apparaissent durant l'étape de reverse transcription, elles peuvent se propager et enrichir le 'pool' d'ADNccc : soit (i) par recyclage de l'ADN-RC muté dans le noyau, (ii) par sécrétion de virions porteurs de mutations qui vont réinfecter une cellule dans laquelle l'ADN-RC sera converti en ADNccc. L'archivage des mutations dans le 'pool' d'ADNccc est une des étapes clé dans les phénomènes de persistance virale.

A chaque phase de l'infection chronique décrite précédemment peut être associée l'apparition de mutations caractéristiques (figure 20). Quasiment tous les mutants HBV sont transmissibles donc dès la phase de tolérance immune de nombreux mutants peuvent préexister. Selon la pression de sélection exercée dans l'organisme néo-infecté il y aura la sélection de certains et la disparition d'autres.

Lors des phases de réplication intense un grand nombre de particules infectieuses circulantes sont produites par jour. Il est estimé que l'organisme détruit 90% des particules produites, et donc on ne détecte dans la circulation sanguine seulement 10% des virions produits. Malgré cela, durant les phases de forte réplication, on peut détecter des charges virales allant jusqu'à 10^9 particules par ml. Dans ces cas, l'absence de fonction de correction de la polymérase virale est à l'origine du grand nombre de mutants générés. Parmi ceux-ci, des mutants délétés dans les régions PréC/C et PréS2/S s'accumulent. Ces mutants ne sont pas fonctionnels mais participent à l'enrichissement des quasi-espèces virales et servent de leurre au système immunitaire (Marschenz, Brinckmann et al. 2008).

Lors de la phase de réactivité immune, avec l'apparition des anticorps anti-HBs et/ou anti-HBe, ce sont les mutants d'échappement au système immunitaire ou des souches AgHBe (-) qui seront sélectionnées. Si le patient est traité par un traitement antiviral pour son infection au HBV, la phase de réactivation coïncide le plus souvent avec un rebond viral et la réémergence d'un mutant de résistance aux drogues utilisées. Selon les molécules utilisées, ce sont plusieurs rebonds viraux qui peuvent se succéder, traduisant des phénomènes de résistances croisées. Enfin, dans certains cas bien particuliers des mutants d'échappement aux anticorps anti-HBs peuvent émerger après une grande période de latence et ce malgré la présence des anticorps anti-HBs.

2.2.2.2 Les particules défectives

Plusieurs études ont montré la présence de particules défectives dans le sérum de patients chroniquement infectés par le HBV (Rosmorduc, Petit et al. 1995). Ces particules sont le résultat de l'encapsidation d'un ARNpg épissé avec une polymérase virale fonctionnelle. Ces ARN possèdent nécessairement les répétitions directes DR1 et DR2 ainsi que le signal d'encapsidation qui sont indispensables à l'encapsidation mais aussi aux étapes de reverse transcription. L'ARNpg épissé est rétrotranscrit, la particule virale est maturée pour devenir une particule infectieuse. Même si cette particule ne code pas l'intégrité du génome HBV elle pourra être sécrétée hors de l'hépatocyte dans le sérum du patient et pourra réinfecter un hépatocyte. Le maintien dans la population virale des particules défectives nécessite la transcomplémentation de toutes les fonctions nécessaires au cycle viral qui

Tableau 6: Principales mutations altérant la traduction ou la maturation de l'AgHBe.

Tableau adapté (Stuyver, De Gendt et al. 2000; Chen, Crowther et al. 2008; Kramvis, Arakawa et al. 2008)

Mutations génomiques altérant l'expression de l'AgHBe	Position nucléotidique	Codon affecté
Région PréC	G1809T/A1811T/C, C1812T	Séquence Kozak, perturbe la traduction de la protéine précore
	A1814C	Perte ATG initiateur
	T1815C	Perte ATG initiateur
	G1816C	Perte ATG initiateur
	C1817A/T	Codon 2 (T= stop) Spécifique génotype G
	G1862T	Codon 17 (déstabilisation du site clivage)
G1896A	Codon 28-Stop	
G1897A	Codon 28-Stop	

seront apportées par un virus helper. Les particules défectives sont importantes dans la biologie de l'infection par le HBV. Elles pourraient interférer avec la réplication des particules infectieuses sauvages et jouer un rôle dans la persistance virale et l'immunotolérance. En théorie tous les ARN épissés contenant les régions DR1 et DR2 et le signal d'encapsidation peuvent contribuer à l'enrichissement du pool de particules défectives. Les analyses réalisées *ex vivo* sont basées principalement sur la détection des particules défectives issues de l'épissage de l'ARNpg. Ces études ont montré que les particules défectives corrélaient avec le statut chronique de l'infection par le HBV. En revanche la relation entre particules défectives et la sévérité de la maladie hépatique est plus difficile à établir.

2.2.3 Les mutants HBV

2.2.3.1 Les mutants PréC/C

Les régions BCP et PréC/C sont riches en éléments régulateurs si bien qu'une simple mutation peut avoir un impact sur les étapes de transcription, d'encapsidation du virus mais aussi sur la synthèse des protéines HBe et HBc. Quelques mutations caractéristiques ont émergé et se sont fixées, mais de nombreux variants PréC/C existent. La présence de ces variants dans la population virale est associée à une atteinte hépatique importante et au développement de CHC (Lin, Ma et al. 2002). Comme une simple mutation peut avoir un impact très important sur le cycle viral, à l'inverse certaines positions nucléotidiques seront quant à elles très conservées. Il a été montré que certaines positions clés comprises entre les nucléotides 1653 et 1900 permettaient non seulement de distinguer des souches de génotypes et même de sous-génotypes différents avec une grande sensibilité et spécificité (Kramvis, Arakawa et al. 2008).

2.2.3.1.1 Les mutants PréCore et altération de la synthèse de l'AgHBe

Le statut AgHBe est l'un des déterminants majeurs pour l'établissement de l'infection chronique chez les personnes immunocompétentes (Milich and Liang 2003). Il existe deux entités d'infections chroniques qui se distinguent selon le statut antigénique HBe (AgHBe + et AgHBe -) (Araujo, Waizbord et al.(2011); Kay and Zoulim 2007). La séroconversion anti-HBe signe généralement la résolution de l'infection. Cependant, la pression de sélection exercée par les anticorps est à l'origine de l'apparition de souches AgHBe (-). La forme majoritaire des infections chroniques dans le monde est maintenant associée à une forme chronique AgHBe (-) (3). La séronégativité de l'antigène est due principalement à des mutations menant à la perte du codon initiateur ou à l'introduction d'un codon stop à la position 28 de la région précore. Les mutants Précore sont stables, une souche AgHBe (-) sera transmise par les mêmes voies qu'une souche WT (transmission materno-fœtale, sanguine, sexuelle). Les charges virales associées aux souches AgHBe (-) sont 10 à 100 fois plus faibles que chez un isolat AgHBe (+). On estime que lors de transmission materno-fœtale le risque d'infection chronique est diminué par 10 si la souche virale impliquée est AgHBe (-). Cependant, on ne sait pas si cela vient du fait que la souche est

AgHBe (-), si c'est parce que la charge virale est plus faible ou bien, l'association des deux. Le rôle des souches

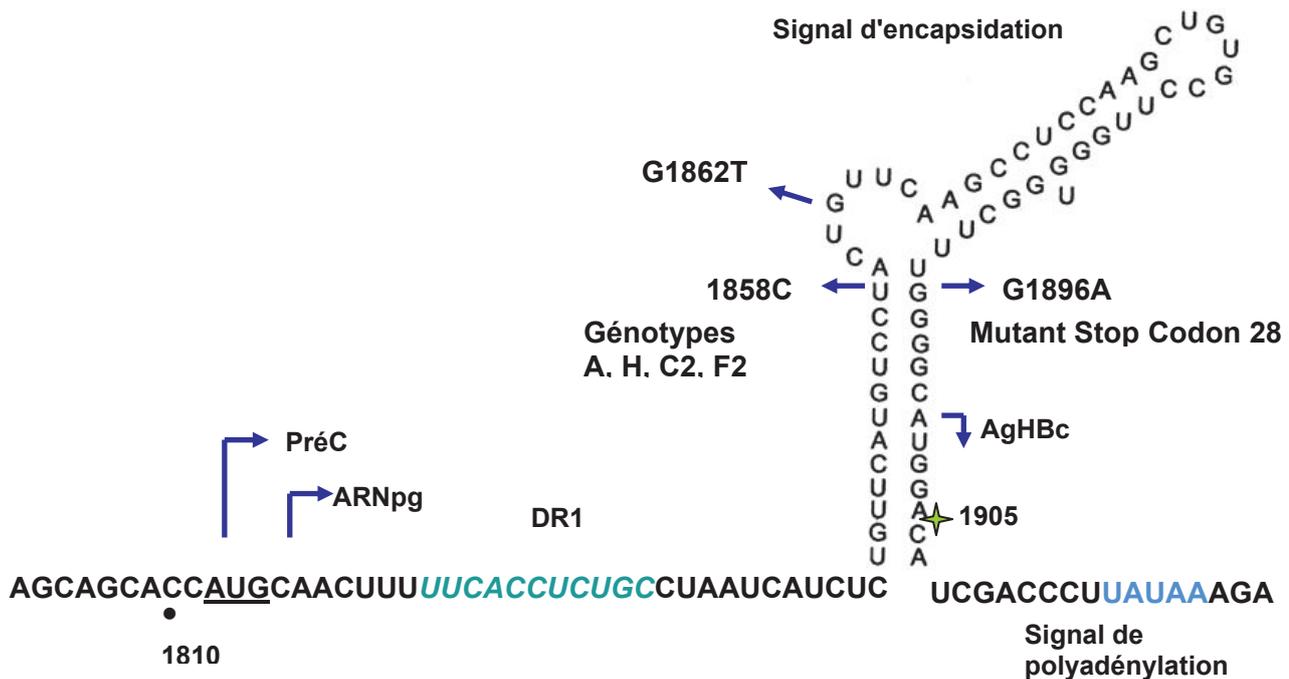


Figure 21 : Signal d'encapsidation et mutation affectant l'expression de l'AgHBe.

Représentation schématique de la région BCP et de la structure du signal d'encapsidation Epsilon. La position des nucléotides, les sites d'initiation de la protéine PréC, de la transcription de l'ARN pg (ARN pré-génomique), la région DR1 (direct repeat 1) et le signal de polyadénylation sont indiqués. La mutation stop G1896A et le polymorphisme génotype dépendant à la position 1856 sont indiqués. Cette représentation est vraie pour la majorité des génotypes, excepté pour le génotype G, pour lequel une insertion de 33nt est présente à partir du codon 1905 représentée par l'étoile.

AgHBe (-) est tout aussi dévastateur dans l'évolution de la maladie. Chez les patients AgHBe (+), la perspective d'une séroconversion anti-HBe et de résolution de l'infection est espérée alors que les patients infectés par des souches AgHBe (-) ne pourront jamais faire une séroconversion anti-HBe et seront plus difficiles à traiter (Hadziyannis and Vassilopoulos 2001).

La mutation principale altérant l'expression de l'AgHBe crée un codon stop sur le codon 28 de la protéine précore (Brunetto, Oliveri et al. 1989; Carman, Jacyna et al. 1989) (tableau 6, figure 21). La substitution G1896A transforme le codon 28 qui code normalement un Tryptophane (TGG) en codon stop (TAG) et empêche toute traduction de la protéine AgHBe. La position 1896 est importante car elle se trouve dans la structure même du signal d'encapsidation. Pour stabiliser la structure en épingle du signal ϵ le nucléotide à la position 1858 qui est un C chez la majorité des génotypes un T s'apparie avec le nucléotide 1896 qui est un G chez la majorité des génotypes. Ainsi, la transition 1896 G->A n'affecte pas drastiquement la structure du signal d'encapsidation et cette mutation peut se fixer dans la population virale. Cependant, chez les génotypes A, H et les sous-génotypes C2 et F2 le résidu à la position 1858 est naturellement un C. La mutation stop à la position 1896 introduit non seulement un codon stop (TAG) mais déstabilise trop fortement la structure en épingle (impossibilité d'un appariement C-A entre les nucléotides aux positions 1858 et 1896) (figure 21). Les rares mutants précore recensés chez ces génotypes, la simple mutation C1898A n'est pas tolérée et la fixation de la mutation stop nécessite la présence d'un T à la position 1858 (Parvez, Thakur et al. 2001). Cette mutation est peut-être un prérequis à l'apparition de la mutation stop. Pour ces souches, la mutation stop à la position 28 est contre sélectionnée car elle affecte la réplication virale et nécessite l'apparition et la fixation d'une seconde mutation, ce qui est un événement moins probable qu'une simple mutation (Grandjacques, Pradat et al. 2000).

Une seconde mutation G1862T peut affecter la voie de synthèse de l'AgHBe (tableau 6, figure 21). Cette mutation se situe dans la boucle du signal d'encapsidation et pourrait alors interférer avec la réplication du virus (Chen, Crowther et al. 2008). D'un point de vue fonctionnel, il a été montré *in vitro* que cette mutation diminuait la réplication des isolats de génotype D. En revanche, aucune anomalie n'est observée *in vitro* pour un isolat de génotype A. Ce résultat expliquerait pourquoi la mutation G1862T est plus fréquemment retrouvée chez des isolats de génotype A que D. Pour se maintenir, le virus a besoin d'avoir une réplication constante et non diminuée. Par chevauchement, la position 1862 affecte aussi l'ARNm PréC/C et modifie le résidu qui se situe à la position -3 du signal de clivage de la protéine intermédiaire HBe. Cette substitution modifie le résidu valine en phénylalanine, l'introduction d'un noyau aromatique masque alors le peptide signal et empêche le clivage et la maturation de la protéine HBe.

Les séquences proches du codon d'initiation PréC sont très conservées chez tous les génotypes. Les nucléotides 1808 à 1817 forment ce qui est appelé la séquence Kozak (5'-GCC^A/_C-CAUGG-3') (Kozak 1999) (tableau 6). Cette séquence est nécessaire à l'initiation de la traduction. De nombreuses mutations dans cette séquence ont été observées chez des isolats de patients originaires d'Afrique du Sud, infectés par des souches de HBV de génotype A1.

Séquence du récepteur nucléaire

AGGTCAN**AG**TCA

Séquence génotype A 'sauvage' :

GGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTATTAGGAGGCT

Séquence génotype A mutant BCP :
(A1762T/ G1764A)

GGGGGAGGAGATTAGGTTAA**TGA**TCTTTGTATTAGGAGGCT
GTTAA**TNA**TTANC

Séquence du facteur de transcription HNF1

Figure 22: Impact des mutations A1762T et G1764A sur la séquence nucléique en lien avec les séquences du récepteur nucléaire et du facteur de transcription HNF1

Tableau 7: Principales mutations altérant la transcription de l'ARNm PréC/C

Mutations génomiques altérant la transcription de l'ARNm PréC/C	Position nucléotidique	
Région BCP	T1753C A1755C G1757A A1762T G1764A/T C1766T T1768A Délétion 1763-1770	Nouveau site HNF1 Nouveau site HNF1 Nouveau site HNF1

Les analyses fonctionnelles ont montré que des mutations altérant la séquence Kozak étaient responsables d'une diminution de l'expression de l'antigène HBe (Ahn, Kramvis et al. 2003).

2.2.3.1.2 Les mutants PréCore et altération de la transcription

De nombreuses mutations dans la région BCP ont été identifiées et associées à un phénotype pour lequel l'expression de l'AgHBe est altérée. La double mutation A1762T/G1764A est la plus fréquemment retrouvée et est associée à une diminution du taux de synthèse de l'AgHBe et d'une augmentation de la transcription de l'ARNpg (Scaglioni, Melegari et al. 1997; Jammeh, Tavner et al. 2008). La substitution de ces deux résidus a pour effet de modifier les sites de liaison pour certains facteurs de transcription et de créer un site qui favorise une interaction avec un site de liaison hépatocytaire de la famille des récepteurs nucléaires HNF1 (pour Hepatocyte nuclear factor) (figure 22, tableau 7). De ce fait, la transcription de l'ARNm de la protéine précore est inhibée, contrairement à la transcription de l'ARNpg. Des études menées in vitro ont montré que l'association de la double mutation A1762T/G1764A à la mutation T1753C augmentait par 4 le taux de réplication et diminuait de 30% la synthèse de l'AgHBe (Jammeh, Tavner et al. 2008). La triple mutation A1762T/G1764A/C1766T augmentait quant à elle le taux relatif de la réplication virale par 8 et diminuait la synthèse de l'AgHBe de 75%. Sur le plan clinique, ces mutations sont associées à une aggravation de la maladie hépatique et une augmentation du risque de développement de CHC. Par chevauchement des gènes viraux, la double mutation A1762T/G1764A substitue les deux résidus V131I et F132Y de la protéine X. Il a été suggéré que cette modification pourrait altérer les fonctions transactivatrices de la protéine et aussi contribuer à l'aggravation hépatique.

2.2.3.2 Les mutants Core

2.2.3.2.1 Les mutants Core par substitutions et insertions

De nombreuses mutations, insertions et délétions peuvent altérer le gène Core. Les mutations ponctuelles sont principalement localisées dans les régions ciblées par les lymphocytes B (nt 76-89, nt 130-135, nt 146-159) et des lymphocytes T (nt 61-85, nt 81-105 et nt 117-131) (Pumpens and Grens 2001). D'une manière générale, les acides aminés qui forment le centre de la protéine et la structure en épingle sont fréquemment mutés. Alors que les séquences impliquées dans les processus de morphogénèse et l'assemblage des particules sont conservées (nt des extrémités 5' et 3' de la protéine). Le résidu à la position 183 est particulièrement conservé car il intervient dans de nombreuses fonctions (interaction ARNpg/Polymérase virale, maturation de la capsid, interaction avec le réticulum endoplasmique). Des mutations altérant la sécrétion de la capsid ont été décrites.

Dans la majorité des cas, c'est la modification du codon 97 (F->L) qui est responsable d'une sécrétion immature de particules (Yuan, Sahu et al. 1999). Les substitutions P5T et L60V ont été

décrites pour conférer *in vitro* un phénotype pour lequel la sécrétion des particules virales étaient inhibée (Le Pogam, Yuan et al. 2000).

Les insertions dans le gène C sont très rares, deux souches isolées chez des patients chroniquement infectés ont été rapportées. A l'époque, ces isolats ont été considérés comme étant des variants d'insertions mais en réalité c'était des souches de génotypes G qui avaient été isolées. Dans les deux cas, une insertion de 36 nucléotides après la méthionine 1 est observée (Bhat, Ulrich et al. 1990; Tran, Kremsdorf et al. 1991). La protéine core synthétisée est alors de taille supérieure à la protéine core sauvage (24KDa au lieu de 21KDa). Elle est cependant capable de former des particules virales et la réplication n'est pas inhibée. Les études fonctionnelles basées sur des cotransfections ont montré que les souches isolées avaient un profil de réplication altéré et que le taux de réplication virale était plus élevé en cotransfection (Kremsdorf, Garreau et al. 1996). Ces études ont montré les caractéristiques propres au génotype G : un AgHBc plus grand mais capable de former des capsides, les isolats sont compétents pour la réplication mais dont la transcomplémentation avec un autre génotype permet une meilleure réplication.

2.2.3.2.2 Les mutants Core par délétions

L'évolution de l'infection vers la chronicité est associée à l'apparition de mutants HBV caractérisés par des insertions et délétions dans les régions PréC/C et Prés2. Des réarrangements nucléotidiques importants peuvent avoir lieu.

Il a été montré que chez les patients chroniquement infectés, la population virale était non seulement complexe mais constituée d'une part de mutants délétés dans les régions PréC/C et Prés2 et de souches sauvages non délétées. Très fréquemment, les sous-populations virales délétées et sauvages portent la double mutation BCP aux positions 1762 et 1764. Il est possible que la mutation BCP puissent servir de pré-requis pour l'émergence de mutants délétés (Preikschat, Gunther et al. 2002; Marschenz, Brinckmann et al. 2008), mais aussi de garant de la réplication virale. Les délétions dans le gène core affectent fortement la structure de la protéine et ce même si le cadre de lecture nucléotidique est maintenu. Une protéine C délétée ne sera pas fonctionnelle et ce sont les étapes d'assemblages de la capsid, d'encapsidation de l'ARNpg, de reverse transcription qui seront affectées. Il n'y a pas un profil caractéristique de délétion, la taille des délétions est variable et touche de multiples nucléotides. L'émergence de mutants délétés dans la population virale nécessite la présence d'une quasi-espèce même minoritaire dont le gène C est intact pour transcomplémenter la protéine C (Yuan, Lin et al. 1998). La transcomplémentation est plus difficile lorsqu'il s'agit de transcomplémenter une protéine structurale, que lorsqu'il s'agit de transcomplémenter une activité enzymatique. La capsid est formée de 180 molécules d'AgHBc, on peut supposer que les capsides seront formées par un mélange de capsides sauvages et mutées. Ou bien uniquement de capsid sauvage si les capsides mutées perdent totalement leur potentiel d'assemblage.

L'analyse des quasi-espèces virales a montré que la proportion de mutants d'insertion et de délétions dans les régions PréC/C et Prés2 étaient associée à la fibrose (Preikschat, Gunther et al.

2002). Ces résultats suggèrent que la persistance d'une sous-population virale délétée contribue à la pathogénèse hépatique. L'absence de modèle d'études *in vitro* permettant une 'vraie' infection par le HBV est à l'origine des nombreuses difficultés liées à l'étude des propriétés fonctionnelles des isolats viraux. Dans la majorité des cas, les analyses sont faites à partir de transfection de génomes entiers et seulement un génome fonctionnel appartenant à la sous population majoritaire est utilisé. Très peu de données sont disponibles concernant l'analyse fonctionnelle de quasi-espèces et l'impact des mutants sur la réplication de souches sauvages. Il a été montré que la cotransfection d'un génome HBV portant une délétion dans le gène C avec un plasmide pCMV exprimant de manière exogène la protéine Core était responsable au moins *in vitro* d'une augmentation de la réplication virale (Gunther, Piwon et al. 2000). Une seconde étude, portant sur l'analyse fonctionnelle des mutants PréC/C et PréS2 *in vitro* a montré que des co-transfections de variants délétés dans la région C et/ou PréS2 avec des souches sauvages modifiaient drastiquement le phénotype des isolats comparé à une transfection d'une souche contrôle. L'analyse a montré de multiples modifications (i) une diminution des ARNm C et S, une augmentation des transcrits pré-génomique, (ii) un épissage réduit de l'ARNpg, (iii) une augmentation de la réplication virale, (iv) une réduction de l'expression et/ou de la sécrétion des protéines virales (HBe, HBs et Core) et enfin une localisation aberrante des protéines de surface dans le réticulum endoplasmique (Marschenz, Endres et al. 2006).

Ces résultats montrent que, *in vitro*, les mutants délétés interfèrent très fortement dans le cycle viral et que *in vivo* ces modifications pourraient contribuer à l'atteinte hépatique (augmentation de la cytotoxicité, accumulation des protéines virales dans le cytoplasme et/ou dans le RE). L'augmentation de la réplication observée est indépendante du ratio de souches délétée/sauvage transfectées. Enfin, selon les variants de grandes différences étaient observées. L'analyse fonctionnelle de ces variants est très complexe, il a été montré que la modification de la réplication virale n'était pas la somme de deux phénotypes individuels mais qu'il existait un effet synergique (Marschenz, Brinckmann et al. 2008).

En conclusion, la présence de quasi-espèces portant des insertions ou des délétions dans la région PréC/C contrarie fortement le phénotype des souches sauvages. Les mécanismes responsables de ces modifications ne sont pas élucidés. L'accumulation de protéine C non fonctionnelle contribue très probablement à la déstabilisation de certaines étapes du cycle viral et à l'aggravation de la maladie hépatique.

2.2.3.3 Les mutants de la protéine X

De nombreuses mutations affectent la protéine X. Cependant, comme son rôle n'est pas totalement élucidé, on ne connaît pas l'impact de ces mutations sur la protéine et/ou sur les voies de transduction. Les mutations qui affectent la région BCP par chevauchement des gènes ont aussi un impact sur le gène X. Les principales mutations observées sont la conséquence de la double mutation A1762T/G1764A qui modifie les résidus V131I et F132Y de l'extrémité C terminale de la protéine X. Il a été suggéré que ces mutations pourraient altérer les fonctions transactivatrices de la protéine et contribuer à l'atteinte hépatique. Par ailleurs, les délétions/insertions qui ont lieu dans la région BCP sont

à l'origine du décalage du cadre de lecture pouvant mener à des protéines X tronquées. Chez la marmotte, il a été montré que la protéine X et tout particulièrement son extrémité C terminale sont nécessaires à l'établissement de l'infection (Chen, Kaneko et al. 1993; Zoulim 2011, Saputelli et al. 1994). Ceci n'a pas encore été démontré pour le HBV, cependant, la fonction de la protéine X tronquée *in vivo* est transcomplémentée par des protéines X sauvages (Gunther, Piwon et al. 1996).

2.2.3.4 Les mutants de la polymérase.

Les premiers traitements utilisés contre le HBV ne ciblaient pas le virus mais cherchaient à moduler la réponse immunitaire de l'hôte en utilisant des molécules de type immunoglobulines ou interféron. L'interféron a été largement utilisé mais seul un tiers des patients sont répondeurs au traitement et de nombreux effets secondaires sont observés. L'interféron- α pégylé a été développé, afin de renforcer l'action modulatrice sur le système immunitaire, tout en diminuant les effets secondaires associés au traitement. Par la suite, la lutte contre le HBV a largement bénéficié des recherches sur le HIV et particulièrement dans le domaine des traitements par des molécules anti-polymérase.

La lamuvidine initialement développée contre le HIV a été la première molécule anti-polymérase utilisée contre le HBV. Elle a tout d'abord montré des résultats très prometteurs, mais rapidement, des mutants résistants ont émergé. Il est estimé qu'après un an de traitement des souches résistantes émergent chez 20% des patients, chez 50% des patients au bout de 2 ans et entre 50% à 70% des patients sont porteurs d'une souche résistante après 5 ans de traitement (Lai, Dienstag et al. 2003). Les principales mutations de résistances à la lamuvidine sont localisées dans le domaine catalytique enzymatique YMDD et impliquent les substitutions rtM204V/I. Des études ont tentées d'associer l'apparition de mutation de résistance à la lamuvidine selon les sérotypes et les génotypes viraux. Les résultats ne sont pas clairs. Une première étude a montré que les souches de sérotypes *adw* avaient 20 fois plus de risque de développer une résistance à la lamuvidine (rtM204V/I) que les souches de sérotypes *ayw* (Zollner, Petersen et al. 2001). Cependant, dans cette étude les génotypes des isolats ne sont pas indiqués (sérototype *adw*-génotype A, sérototype *ayw*-génotype D). Une seconde étude a montré, que les génotypes A et D développaient des mutations de résistances à la lamuvidine mais pas aux mêmes positions. Pour les souches de génotypes D c'est la mutation rtM204I (67%) qui est favorisée contre 19% pour les souches de génotypes A. En revanche, pour les souches de génotypes A ce sont les mutations aux positions rtM204V et rtL180M (81% et 81%) qui sont favorisées contre 33 % et 44 % respectivement pour le génotype D (Zollner, Petersen et al. 2004). Avec l'utilisation massive de la lamuvidine, des mutations de résistances à la position 204 ont été observées chez tous les génotypes. Les mutations aux positions 204 altèrent la conformation spatiale du domaine catalytique, si bien que les souches porteuses de ces mutations répliquent moins bien qu'une souche sauvage. C'est pourquoi, l'émergence de la mutation à la position 204 dans le domaine RT est fréquemment associée à l'apparition de mutations compensatoires (rtL180M, rtV173L). Il a été montré *in vitro* que les mutations compensatoires restauraient au moins partiellement la capacité répliquative 'diminuée' par la mutation à la position rt204 (Delaney, Yang et al. 2003).

Tableau 8 : Mutations de résistances aux traitements antiviraux.

Les principales mutations touchent le domaine catalytique de la polymérase virale

Molécules antivirales	sous domaine de la polymérase		
	B	C (domaine catalytique)	D
Lamuvudine ^a (LAM) Emtricitabine ^a (FTC)	rtV173L/ rtL180M rtL180M	rtM204V/I/S	
Telvivudine ^a (LdT)		rtM204I	
Adéfovir ^b (ADV)	rtA181T/V		rtN236T
Entécavir ^b (ETV)	rtI169T rtL180M+ rtT184G	rtS202G/I+ rtM204V	rtM250V
Ténofovir ^b (TDF)	A194T, défaut de métabolisme		

^aAnalogue de pyrimidine (L-nucléosides)

^bAnalogue de purine (D-nucléos(t)ides)

De nouvelles molécules antivirales ont été développées mais toutes partagent le même mode d'action qui cible le site catalytique enzymatique. Leur action à long terme est limitée principalement par l'apparition de mutants résistants, mais aussi par des phénomènes de résistances croisées (tableau 8). Par exemple, la mutation à la position rt204 confère une résistance à la lamuvidine mais aussi à la telbivudine et à l'entécavir. Les phénomènes de résistances sont à l'origine de complications cliniques importantes pouvant être associées à une aggravation de la maladie hépatique (Zoulim 2011) (Delaney, Locarnini et al. 2001; Yatsuji, Noguchi et al. 2006; Warner and Locarnini 2008).

Egalement utilisé contre le HIV, le ténofovir est la dernière molécule qui a été mise sur le marché pour lutter contre le HBV. Son apparition récente ne permet d'avoir un recul suffisant pour analyser les phénomènes de résistance. Cependant, quelques cas de résistances phénotypiques à cette molécule ont déjà été observés. Dans un premier cas, c'est une mutation dans le gène de la polymérase qui a été identifiée et qui conférait, au moins *in vitro*, une résistance au ténofovir. Les résultats indiquent que cette mutation restaure le potentiel répliatif aux souches portant la mutation de résistance à la lamuvidine (Sheldon, Camino et al. 2005). Dans un second cas, une souche HBV a réactivé chez un patient coinfécté par le HIV et traité par l'emtricitabine et ténofovir. Le virus de l'hépatite B ne présentait aucune mutation de résistance aux molécules antivirales mais était associé à des mutations d'échappement. Il a été montré que la concentration plasmatique des deux drogues (emtricitabine et ténofovir) était étonnement faible, même 4h après ingestion (Schirmer, Winters et al. 2011). Dans ce cas, c'est un défaut de métabolisation des drogues qui est à l'origine de l'échec du traitement au ténofovir.

Les drogues utilisées actuellement contre le HBV ont un spectre d'action limité qui ne cible que l'étape de reverse transcription. Dans la plupart des cas, leur utilisation permet de réduire très fortement la charge virale. Cependant, ces molécules n'ont que peu d'impact sur la transcription et la synthèse des protéines virale AgHBs et AgHBe. Dans certains cas, la concentration sérique des antigènes est très forte, même si la charge virale HBV n'est plus détectable. Ceci est dû au fait que les drogues utilisées n'ont aucun effet sur la molécule d'ADNccc. La matrice de transcription des ARNm viraux persiste et peut être à l'origine d'un rebond viral si le traitement antiviral est arrêté précocement. Le traitement contre le HBV est donc forcément long, ce qui favorise l'émergence de mutants résistants. Le faible spectre d'action des molécules antivirales, principalement dirigé contre la polymérase a motivé le développement de nouvelles stratégies antivirales qui agiraient sur les étapes d'entrée du virus ou sur la formation ou la stabilité de la capsid (Schieck, Muller et al. 2010).

2.2.3.5 Les mutants des protéines de surface.

L'infection par le HBV peut-être contrôlée naturellement par la réponse immunitaire hôte mais aussi élicitee par la vaccination. Chez les personnes vaccinées, la réponse anti-HBs permet de neutraliser et de prévenir l'infection. Chez 90% des adultes non vaccinés qui déclarent une infection aiguë au HBV, la réponse humorale hôte est capable de contrôler l'infection et d'éliminer le virus. Dans les deux cas, les anticorps neutralisants sont principalement dirigés contre l'AgHBs et plus

particulièrement contre le déterminant 'a'. Une concentration minimale d'anti-HBs est considérée comme étant protectrice, concentration qui doit être $> 10\text{IU/L}^{-1}$ (Jack, Hall et al. 1999). Cependant, cette valeur ne prend pas en compte la 'qualité' de la réponse immunitaire, ni des épitopes contre laquelle elle est dirigée. Une réponse immunitaire faible et/ou sérologiquement inadaptée peut permettre l'émergence de mutants d'échappement au système immunitaire, ce qui explique alors la coexistence entre les anticorps neutralisants anti-HBs et l'AgHBs (Pawlotsky 2005).

2.2.3.5.1 Les mutants S

Les mutants de l'AgHBs émergent et sont sélectionnés suite à la pression du système immunitaire élicité naturellement, par vaccination anti-HBV et/ou traitement avec des immunoglobulines anti-HBV (Carman 1997; Ghany, Ayola et al. 1998; Protzer-Knolle, Naumann et al. 1998). Des modifications protéiques dans la région hydrophile majeure (RMH, résidus 103-173) (Persson and Argos 1994) de l'AgHBs et plus précisément dans le déterminant 'a' (résidus 124-147) peuvent induire des changements conformationnels abolissant la liaison aux anticorps. La plupart des mutations affectant l'AgHBs sont de simples substitutions, les délétions ou insertions sont très rares et ne sont *a priori* pas viables pour le virus sauf en cas de transcomplémentation avec une souche 'sauvage' (Weinberger, Zoulek et al. 1999).

Les tests de détections de l'AgHBs ont tout d'abord été développés à partir d'anticorps polyclonaux reconnaissant la structure tertiaire d'un antigène HBs 'sauvage'. Ensuite et pour des raisons surtout industrielles, les anticorps polyclonaux ont été remplacés par des anticorps monoclonaux. La découverte de variants d'échappement a montré les limites de cette approche. Le premier mutant d'échappement sG145R n'a pas été reconnu par les tests monoclonaux de l'époque et ce sont des tests ayant au moins un bras polyclonal qui ont permis sa détection. Maintenant, l'amélioration des outils industriels a permis de développer des tests de détection de l'AgHBs très sensibles qui utilisent des protéines recombinantes pour la production des anticorps monoclonaux. Les tests actuels, très fiables utilisent des anticorps polyclonaux pour la capture de l'antigène HBs et la révélation se fait par un cocktail d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux qui sont capables de reconnaître les mutants d'échappement quelque soit le génotype ou le sous-génotype. Cependant, aujourd'hui encore, certains mutants échappent à la détection principalement à cause d'une charge virale faible. Ainsi, la détection de l'AgHBs dépend de la modification possible de sa conformation et donc de son affinité avec les anticorps utilisés dans le test, mais aussi de sa disponibilité en nombre.

Les premiers mutants d'échappement à la vaccination ont été identifiés chez un groupe d'enfants nés de mères HBV+ (Carman, Zanetti et al. 1990). Ces enfants ont été suivis dans le cadre d'une étude sur l'efficacité de la vaccination anti-HBV. Alors que la réponse immunitaire avait été stimulée par la vaccination et que les anticorps anti-HBs étaient bien apparus, un test de détection polyclonale a mis en évidence chez certains enfants la présence de l'AgHBs.

Tableau 9 : Positions et mutations impliquées dans des échappements au système immunitaire et/ou aux tests de détection

Mutation dans l'AgHBs	Déterminant 'a'	hors déterminant 'a'
Position	I/T126A/N, A128V, Q129H/R, G130N, M133L/T, K141E, S143L, D144A/H/E, G145R	Y100C, Q101H, S117N, T118R, P120S/T/Q Polymorphisme position 122 Polymorphisme position 160

(Swenson, Escobar et al. 1983; Coursaget, Yvonnet et al. 1987; Waters, Kennedy et al. 1992; Karthigesu, Allison et al. 1994; Carman, Korula et al. 1995; Carman, Owsianka et al. 1999; Torresi 2002; Sayiner, Agca et al. 2007)

Tous les isolats présentaient une substitution sG145R qui après analyse s'est révélée être responsable de l'échappement aux anticorps. Depuis cette mutation a été retrouvée dans de nombreux cas, il a été montré que ces souches pouvaient être transmises verticalement mais aussi horizontalement (Oon, Chen et al. 2000; Chakravarty, Neogi et al. 2002; Weber 2005). La dissémination d'une telle souche échappant à la vaccination aurait pu avoir un impact sanitaire très important. Cependant, avec maintenant 20 ans de recul, il apparaît que les mutants échappant à la vaccination sont des événements rares, et leur prévalence reste faible. Les modèles mathématiques ont prévu que dans le pire des scénarii, les mutants sG145R ne seraient pas prédominants avant au moins 50 ans (Wilson, Nokes et al. 1999). Il est tout de même étonnant qu'il y ait si peu de mutants au regard du nombre de personnes vaccinées, du fort taux d'erreur de la reverse transcription et que seule une mutation ponctuelle puisse générer un tel phénotype.

Plusieurs raisons pourraient expliquer ce phénomène : (i) la quasi-espèce minoritaire préexistante est éliminée avant que les mutants d'échappement puissent émerger (ii) avant d'être disséminés de manière stable, les génomes des mutants ont besoin d'être intégrés au 'pool' d'ADNccc. Pour une raison inconnue la présence de cette mutation empêche ce phénomène (iii) la réponse anti-HBs de l'hôte n'est généralement pas dirigée contre un épitope seulement. En conséquence, les phénomènes d'échappement ne sont pas le résultat d'une simple substitution mais impliquent des mécanismes bien plus complexes. L'émergence de mutants suppose non seulement des conditions particulières, probablement chez des patients pour lesquels la réponse immunitaire est insuffisante, mais aussi certaines particularités de la quasi-espèce virale.

D'une manière générale, les patients chez lesquels coexistent l'AgHBs et les anticorps anti-HBs présentent une accumulation de mutations dans le gène S. Ainsi, de nombreuses mutations dans le déterminant 'a' mais aussi en dehors ont été décrites comme étant impliquées dans des phénomènes d'échappement (tableau 9). Les mutations altérant les codons 144 et 145 ont largement été décrites seules ou en associations dans des cas d'échappement suite à une transplantation hépatique ou suite à un échec de traitement par immunoglobulines/anti-HBs (Ghany, Ayola et al. 1998; Protzer-Knolle, Naumann et al. 1998; Ijaz, Torre et al. 2001) (Schirmer, Winters et al. 2011). La mutation sD144E substitue un acide aspartique en acide glutamique. Bien que cela ne soit pas un changement nucléotidique majeur, il a été montré *in vitro* que cette mutation réduisait l'affinité entre les anticorps anti-HBs et l'AgHBs muté (Kim, Lee et al. 2003). Des mutations retrouvées hors du déterminant 'a' peuvent aussi être impliquées dans des cas d'échappements du virus au contrôle des anticorps anti-HBs.

Par exemple, la mutation Y100C est retrouvée sporadiquement dans des cas où l'antigène HBs échappe aux tests de détection dans divers contextes cliniques chez des donneurs de sang au Vénézuéla (Gutierrez, Devesa et al. 2004), en Espagne (Zaaijer, Torres et al. 2008), mais aussi au Brésil chez des patients hémodialysés (Motta, Mello et al. 2010). Cette mutation a aussi été isolée chez une jeune patiente chez laquelle co-circulent l'AgHBs muté et les anticorps anti-HBs (Cuestas, Rivero et al. 2010). Cependant, son rôle dans l'échappement n'a jamais été établie clairement.

2.2.3.5.2 Les sérotypes dans les phénomènes d'échappement

Les résidus Lysine et Arginine aux positions 122 et 160 définissent les déterminants sérotypiques *d/r* et *y/w*. Ces résidus sont importants pour le sérotypage des souches virales, si bien que l'on parle préférentiellement de polymorphisme, plutôt que de mutation pour évoquer la variabilité à ces positions. Au même titre, que les résidus formants le déterminant 'a' sont importants pour la réaction immunitaire de l'hôte les résidus à ces positions le sont tout autant. Des souches exprimant des sérotypes 'atypiques' ont été rapportées dans les années 70 dans des cas bien particulier, où coexistaient les anticorps anti-HBs et l'AgHBs. Les premiers cas ont été rapportés dans les années 70.

La caractérisation sérologique de ce phénomène a été mise en évidence par l'étude de deux souches virales, dont les seules modifications de l'AgHBs pouvant expliquer l'échappement aux anticorps anti-HBs étaient les déterminants *d/r* ou *y/w*. Il a été montré par immunodiffusion qu'en réalité la souche reconnue par les anticorps du patient avait été éliminée et que la souche ayant émergé était du second sérotype. Ainsi, pour l'un des patients, c'est la modification sur le résidu 122 qui a permis un échappement alors que chez l'autre patient c'est la modification du résidu 160 qui en est à l'origine. Il a été montré par immunodiffusion que la reconnaissance de l'AgHBs 'de sérotype atypique' par les anticorps anti-HBs des patients était affectée (Koziol, Alter et al. 1976; Le Bouvier, Capper et al. 1976; Sasaki, Ohkubo et al. 1976).

Ensuite, les bases moléculaires de ces phénomènes ont été clarifiées. Chez deux donneurs de sang positifs pour l'AgHBs et les anticorps anti-HBs ce sont des souches qui variaient aussi dans le gène S par leurs résidus aux positions 122 et 160 qui ont été identifiées. L'analyse moléculaire des souches a montré que chez l'un des patients un polymorphisme à la position 122 était responsable de la co-circulation des sérotypes en proportion variable *adr* (25%), *ayr* (63%) et *adyr* (12%). Alors que chez le second patient c'est un polymorphisme à la position 160 qui est responsable de la co-circulation des sérotypes *adr* (71%) et *adwr* (21%) (Okamoto, Imai et al. 1987). Cette étude montre que des sérotypes différents peuvent coexister et que ceux-ci représentent probablement une étape de transition menant à un échappement complet aux anticorps anti-HBs propre à chaque patient. Bien que l'on ne puisse pas l'exclure, il est peu probable que chaque patient ait été réinfecté par une souche virale dont le polymorphisme réside précisément aux positions 122 ou 160. L'émergence d'un second sérotype est probablement le résultat de la pression exercée par les anticorps-anti-HBs. Il est suggéré que la réponse anti-HBs soit dirigée contre un épitope sérotypique particulier et que l'émergence du second sérotype permette l'échappement aux anticorps. Plus récemment encore, il a été confirmé que l'échappement au système immunitaire d'une souche pouvait être dû uniquement à l'émergence d'un mutant avec une simple mutation à la position 122 de l'AgHBs (Margeridon, Lachaux et al. 2005). La mutation substituait le résidu Arginine à la position 122 (sérotype *ayr*) par un résidu Lysine (sérotype *adr*). Il a été montré que les anticorps du patient étaient incapables de reconnaître l'AgHBs des souches de sérotype *adr* mais la reconnaissance de l'AgHBs par les anticorps anti-HBs était restituée par l'introduction d'un résidu Arginine à la position 122. Ces résultats suggèrent que la réponse anti-HBs est dirigée très majoritairement contre un seul épitope. Dans ce cas particulier, la réponse anti-HBs est dirigée contre l'épitope *y* et le changement de l'épitope en déterminant *d* est responsable de l'échappement. Lors de

cette expérience, un sérum contrôle venant d'une personne vaccinée a été utilisé et quelques soient les modifications protéiques de l'AgHBs, aucune altération de la reconnaissance n'a été observée. Ainsi, il apparaît plus clairement que les phénomènes d'échappement immuns ne sont pas uniquement dus à la présence d'un antigène HBs muté, mais également à une réponse immunitaire trop restreinte. Ceci souligne qu'une étroite relation entre l'hôte et le virus est à l'origine d'échappements viraux et contribue à expliquer, entre autre, pourquoi il n'y a pas eu une dissémination majeure dans la population humaine de mutant HBV sG145R.

2.2.3.5.3 Les mutants PréS1 et PréS2

Des mutations et des délétions affectant les protéines PréS1 et PréS2 ont été décrites (Gerken, Kremsdorf et al. 1991). PréS2 chevauche la région spacer de la polymérase virale, région, qui peut aussi supporter de nombreuses variations. Généralement les mutations dans la région PréS2 sont possibles si les délétions ne décalent pas le cadre de lecture des protéines d'enveloppe ou de la Pol et que la fonction (hypothétique) de la protéine PréS2 est transcomplémentée par une protéine 'sauvage' (Marschenz, Endres et al. 2006). Par ailleurs, les variants de la région PréS2 sont généralement associés à une sévérité de la maladie hépatique (Raimondo, Costantino et al. 2004). On ne sait pas si ces mutants émergent parce que c'est faisable ou alors si la réponse immunitaire est agressive et spécifiquement dirigée contre cette protéine. Dans ce dernier cas alors cela suggérerait que la protéine PréS2 aurait une fonction importante bien qu'elle soit encore inconnue. La protéine PréS1 est essentielle à de nombreux processus de morphogénèses et de reconnaissances virales. Elle ne peut donc pas supporter de nombreuses mutations ou alors sa fonction sera transcomplémentée par une protéine 'sauvage'. Par ailleurs ces deux protéines jouent aussi un rôle immunogène et leurs épitopes sont reconnus par les cellules T cytotoxiques. Des délétions et mutations peuvent contribuer à la persistance virale et à l'échappement.

2.2.3.1 Chevauchement des gènes Pol/S, implication dans les phénomènes de résistances.

Le gène Pol chevauche entièrement le gène S, ainsi un changement nucléotidique sur le gène Pol peut altérer le gène de surface et inversement (tableau 10). Les mutations de résistance au codon rt204 de la Pol affecte la structure de l'AgHBs en modifiant les résidus aux positions 195 ou 196 (Torresi 2002). Cependant de telles modifications du gène S ne devraient pas affecter fortement la structure antigénique de l'antigène car elles impliquent la deuxième boucle cytosolique (voir le modèle proposé chapitre 1 figure 10). Une étude a montré que la triple mutation de résistance rtV173L + rL180M + rtM204V responsables des substitutions sE164D + sI195M dans le gène S étaient responsables d'une réduction de l'affinité des AgHBs aux anticorps anti-HBs; sans affecter les processus de maturation et sécrétion virales (Sheldon and Soriano 2008). Ces résultats sont intéressants, mais on peut se demander si l'apparition de mutation altérant l'antigénicité de la protéine S est réellement importante chez des patients qui ont probablement une défaillance immunitaire et donc pour lesquels un traitement antiviral est nécessaire.

Tableau 10: Chevauchement des gènes Pol et S: Implication des mutations de résistances et d'échappements

Mutation conférant des résistances aux traitements antiviraux et son impact dans le gène S.	Mutation d'échappement au système immunitaire et/ou la vaccination et l'impact sur la polymérase
rtV173L → sE164D	sP120T/S → rtT128N/I
rtL180M → Pas de changement	sD144E → Pas de changement
rtA181T → sW172L/ Stop	sG145R → rtW153Q
rtA181V → sL173F	
rtM204V → sI195M	
rtM204I → sW196S/L/ Stop	
rtN236T → affecte un codon situé en aval du Stop S	

(Torresi 2002; Villet, Pichoud et al. 2006; Sheldon and Soriano 2008)

Par ailleurs, certaines mutations de résistance à la lamuvidine (rtM204I) ou à l'adéfovir (rtA181T) peuvent être responsables de l'introduction d'un codon stop dans le gène S. De telles souches ne sont *a priori* pas viables, on peut supposer que l'AgHBs est transcomplémenté par une population minoritaire 'sauvage'. Il est très probable que les virus portant l'association: mutation de résistance à un traitement antiviral et mutation stop dans le gène S soit contre sélectionnées car le gain apporté par la mutation de résistance est perdu par l'absence de synthèse de la protéine S.

Une étude a révélée la présence de variants de l'AgHBs associés à des mutations de résistance à la lamuvidine et à l'adéfovir. Ce cas est très rare, la mutation d'échappement impliquait la substitution sP120S mais aussi une sous population virale portant un codon stop dans le gène S à la position 107 (Villet, Pichoud et al. 2006). L'analyse des quasi-espèces a par ailleurs révélé que les souches portant la mutation Stop ont été au cours du temps contre sélectionnée pour former après 80 mois de suivi moins de 5% de la population virale.

En conclusion, bien que les gènes S et Pol soient chevauchants et que la modification d'un nucléotide puisse altérer les 2 gènes, les mutations sélectionnées soit pour échapper au système immunitaire soit pour échapper aux traitements antiviraux sont probablement des événements indépendants. Pour l'instant, aucun super virus HBV échappant aux anticorps et aux traitements antiviraux n'a été isolé.

Tableau 11 : Prévalence des infections occultes par le HBV selon les groupes à risques

Prévalence OBI	Méthode utilisée	Population étudiée
16.3% (16/98)	Nested PCR	Population générale (Raimondo, 2008, J Hepatol)
0.7% (7/1047)	Multiplexe real time PCR	Population générale (Song EY, 2009, Intervirology)
0.016% (2/12 461)	Nested PCR	Donneur de sang Coréen (Seo DH, 2011, Transfusion)
51.2% (22/43)	Nested PCR	Cohorte de patients hémophile (Toyoda, 2004 J Med Virol)
30% (15/50)	Nested PCR	Hépatite chronique d'étiologie inconnue (Chemin, 2001, J Hepat)
11% (9/82)	Nested PCR	Hépatite chronique (CHC) d'étiologie inconnue (Ikeda, 2009, J Viral Hepat)
89% (51/57)	Nested PCR	Cohorte de patient HIV (+) (Hofer, 1998, Eur J Clin Micr Inf Dis)
22% (31/140)	Nested PCR	Cohorte de patient HIV (+) (Mphahlele, 2006, AIDS)
37% (11/30)	Nested PCR	Cohorte de patient HIV (+) (Wagner, 2004, AIDS)
14.8% (31/210)	Nested PCR	Cohorte de patient HCV (+) (Kao, 2002, J Clin Microbiol)
33% (66/200)	Nested PCR	Cohorte de patient HCV (+) (Cacciola, 1999, New England J of Med)

Les données présentées dans ce tableau sont très exhaustives. (Seo, Whang et al.2011; Cacciola, Pollicino et al. 1999; Chemin, Zoulim et al. 2001; Kao, Chen et al. 2002; Toyoda, Hayashi et al. 2004; Raimondo, Allain et al. 2008; Raimondo, Navarra et al. 2008; Ikeda, Kobayashi et al. 2009; Song, Yun et al. 2009)

Tableau 12 : Marqueurs sérologique de l'infection occulte au HBV

	OBI séronégative	OBI séropositive
Détection de l'AgHBs dans le sérum et/ou le foie	-	-
Détection de l'ADN viral dans le sérum et/ou le foie	+	+
Séroconversion anticorps anti-HBs et/ou anti-HBc	-	+

2.2.4 L'infection occulte

2.2.4.1 Définition

L'infection occulte par le HBV (Occult B Infection ou OBI) est caractérisée par l'absence de détection de l'AgHBs dans le sérum alors que l'ADN viral est détectable dans les cellules hépatocytaires et/ou dans le sérum. L'infection occulte est une infection chronique, c'est-à-dire avec la persistance dans le temps d'une réplication virale même faible mais dont la différence majeure repose sur l'absence de détection de l'AgHBs. Dans la grande majorité des cas, la charge virale associée à ces infections est très faible ($<10^3$ cp/ml) mais elle peut varier pour atteindre des charges virales fortes (Chemin, Guillaud et al. 2009). La recherche de ces infections se fait par l'utilisation de PCR sensibles, il n'existe pas de méthode standardisée pour leur détection si bien que les données disponibles sont très hétérogènes (Torbensohn and Thomas 2002). L'absence de détection de l'AgHBs n'exclut pas la circulation de particules virales infectieuses dans le sang. Ces infections sont retrouvées aussi bien dans la population générale mais certains groupes sont plus à risque que d'autres (patients hémodialysés, atteints d'hépatite d'étiologie inconnue, coinfecté par d'autres agents infectieux tels que le HCV et ou le HIV). Selon les études, les techniques utilisées et les populations étudiées la prévalence de l'infection occulte varie (tableau 11). Dans la majorité des cas l'infection occulte passe inaperçue ce qui pose des problèmes sanitaires importants, tels que la transmission du virus lors de transfusions sanguines et de transplantations (Ceneli, Ozkurt et al. 2010; Brechot, Thiers et al. 2001; Shetty, Hussain et al. 2008; Candotti and Allain 2009). Ce type d'infection par le HBV est largement négligé par le simple fait que la détection de l'infection par le HBV repose sur la présence de l'AgHBs. Sur le plan sérologique, les infections occultes dites séronégatives sont caractérisées par l'absence des anticorps anti-HBs et anti-HBc et se distinguent des infections occultes dites séropositives qui sont associées à une séroconversion des anticorps anti-HBs et/ou anti-HBc (tableau 12). De nombreuses études ont montré que la présence des anticorps anti-HBc isolés corrèle avec la statut occulte de l'infection par le HBV (Zaaijer, Boot et al 2011.; Raimondo, Allain et al. 2008). Cependant, chez 20% des patients porteurs d'une infection occulte aucun marqueur d'infection au HBV n'est observé (Torbensohn and Thomas 2002). On ne sait pas si cette séronégativité complète est le résultat d'une disparition sur de longues années des anticorps suite à une infection aiguë et résolue ou alors si la disparition des marqueurs viraux se fait très précocement après la primo infection ou enfin si dans certains cas le virus serait totalement silencieux. D'un point de vue clinique plusieurs études ont démontré la présence significative des infections occultes dans des cirrhoses et des hépatocarcinomes d'étiologie inconnue. Le virus persiste sous forme épisomale, transcriptionnellement actif en maintenant son potentiel réplicatif ainsi que ces propriétés oncogéniques (De Mitri, Cassini et al. 2010; Pollicino, Squadrito et al. 2004). La persistance de l'ADN viral dans le noyau favorise les phénomènes d'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire et participent aux processus de transformations cellulaires. L'analyse génétique des souches isolées dans des cas d'infections occultes ne permet pas d'expliquer le statut occulte d'un point

de vue moléculaire, les régions régulatrices et promotrices sont presque toujours intactes (Bruni, Prosperi et al. (2011))

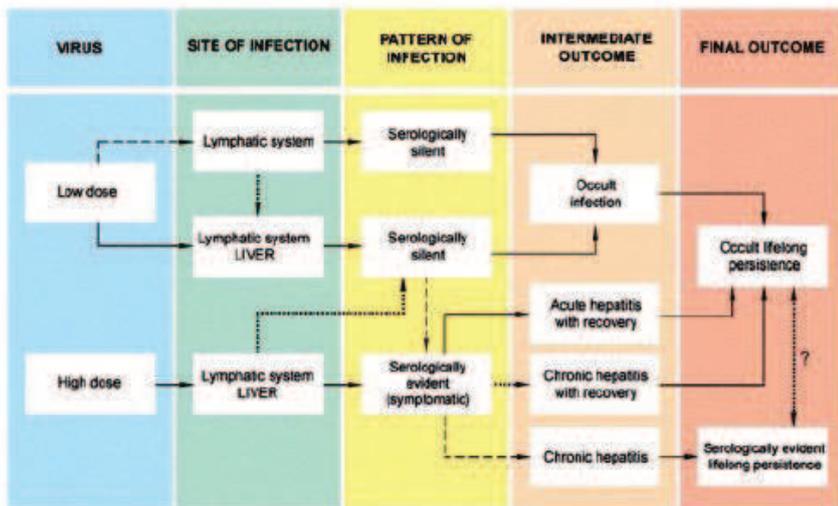


Figure 23: Concept de la progression des infections occultes, aiguës et chroniques sur l'évolution de la maladie hépatique chez la marmotte adulte.

Cette figure présente l'évolution de la maladie hépatique (aiguë, chronique et occulte) en fonction de la charge virale au moment de la primo-infection, du site d'infection (cellules hépatocytaires et/ou les cellules du système immunitaire PBMCs) et les réservoirs cellulaires viraux chez la marmotte. Que l'infection soit symptomatique (sérologiquement évidente) ou silencieuse (sérologiquement undetectable) de l'ADN viral est retrouvé dans les cellules du système immunitaire (PBMCs) ce qui contribue à la persistance virale. Les flèches pleines indiquent un mécanisme prédominant, les flèches hachurées indiquent un phénomène moins fréquent alors que les flèches en pointillées indiquent un phénomène très rare. Le point d'interrogation indique un phénomène possible mais qui n'a jamais été démontré. (Michalak 2000)

Le statut occulte semble être principalement dû à une très forte suppression temporaire de la réplication virale et des gènes viraux. Ceci est soutenu par le fait que les souches sont transmissibles, peuvent réactiver et un profil sérologique classique d'infection aiguë au HBV est alors observé (réapparition des antigènes viraux HBs, HBe, HBc) (Raimondo, Allain et al. 2008).

On peut trouver dans la littérature différente sémantique (occulte et latente) utilisée pour décrire les infections pour lesquelles on ne détecte pas l'AgHBs. Pour certains l'infection occulte est caractérisée (i) par une charge virale faible qui varie très peu (ii) et une atteinte hépatique importante. Alors que l'infection latente par le HBV est définie par (i) une charge virale faible mais qui peut varier (ii) aucune atteinte hépatique n'est observée (Gunther 2006). Les difficultés liées à l'étude des infections occultes dans le temps ne permettent pas de trancher réellement la question. On peut suggérer que l'infection latente, qui est caractérisée par l'absence de détection de l'AgHBs fait pleinement partie de la grande famille des infections occultes. L'ensemble des données disponibles suggèrent que le statut occulte est multifactoriel et implique des facteurs propres à l'hôte et au virus. La faible réplication et l'absence de détection de l'AgHBs sont attribués à: (i) des mécanismes épigénétiques, (ii) des mutations altérant les étapes de transcription, (iii) un défaut de surveillance du système immunitaire mais aussi à la coinfection avec un autre agent infectieux.

2.2.4.2 Importance de la molécule d'ADNccc et des réservoirs extrahépatiques

La longue vie des hépatocytes associée à la persistance de l'ADN viral sous forme épisomale dans le noyau des cellules contribue très certainement à la persistance virale (Zoulim 2005). On ne sait pas comment est régulée l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc dans le noyau des hépatocytes. Il a été montré que l'inhibition de la réplication virale pouvait être maintenue par l'action d'enzymes telle que des déacétylases, et des méthylases cellulaires. Par ailleurs, des mécanismes épigénétiques cellulaires pourraient également contribuer à la régulation de la transcription et de la réplication du HBV (Pollicino, Belloni et al. 2006).

Les principales études sur la persistance virale ont été réalisées chez la marmotte. Ce modèle très proche sur le plan immunologique du système d'infection homme/HBV, a permis de démontrer que non seulement l'ADN du WHV était présent dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Mais aussi que ces cellules constituent un réservoir extrahépatique dans lesquelles un cycle de réplication viral complet peut s'établir (Korba, Cote et al. 1988; Michalak 2000). On ne sait pas si l'infection occulte est le résultat de la persistance d'ADN viral après (i) la résolution d'une infection aiguë (ii) la résolution d'une infection chronique ou (iii) si elle est le résultat d'une infection totalement silencieuse. Il a été montré chez la marmotte qu'une infection occulte pouvait se transmettre silencieusement d'une mère à son petit. Mais aussi que de l'ADN viral pouvait persister dans les hépatocytes et les PBMC même après la résolution d'une infection aiguë. Ces résultats ont permis de proposer un modèle liant la charge virale au moment de l'infection, aux sites de réplifications et l'impact sur la maladie hépatique et son évolution (figure 23). Ce modèle renforce l'idée que l'infection par le

HBV (qu'elle soit aiguë, chronique et occulte) est un ensemble dynamique qui dépend de nombreux facteurs qui sont probablement liés.

Chez l'homme la réalité de la réplication virale dans les réservoirs extra hépatiques n'a jamais été démontrée clairement. L'ADN viral sous forme relâché circulaire a été détecté dans les PBMC mais la présence d'ADNccc et d'ARNpg est encore soumise à controverse. Même si le virus n'est pas transcriptionnellement actif ces cellules peuvent servir de réservoir viral, dans lequel le virus persiste tout en étant protégé du système immunitaire.

2.2.4.3 Absence de détection de l'AgHBs et le système immunitaire

La réponse immunitaire hôte joue aussi probablement un rôle critique dans l'établissement et le maintien de l'infection occulte. Dans de nombreux cas, la réponse cellulaire anti-HBs permet l'élimination du virus et sera encore efficace de nombreuses années après. Dans les cas d'infections occultes il est possible que la réponse cellulaire n'ait pas été suffisante pour éliminer totalement le virus. Un équilibre peut alors s'établir entre une faible réplication virale et la pression de sélection exercée par la réponse immunitaire elle-même. Dans ce cas, l'infection occulte se trouve à l'interface entre la résolution d'une infection aiguë et la progression vers une infection chronique avérée. L'absence de détection de l'AgHBs peut s'expliquer par la présence d'un mutant d'échappement. Il a été suggéré que les anticorps anti-HBs et l'AgHBs puissent s'associer pour former un complexe immun. La formation de ces complexes pourrait abolir la reconnaissance de l'AgHBs par les tests de détection. Peu de données sont disponibles concernant la réponse immunitaire médiée lors des infections occultes. De nombreuses études ont rapporté que la réactivation des infections occultes étaient associée à des états immunodépressifs médicamenteux ou viro-induits. Ces réactivations sont dans la plupart des cas accompagnées des marqueurs de réplication virale HBV (AgHBe (+) et AgHBs (+))(Yeo, Chan et al. 2008). Par ailleurs, le statut occulte corrèle avec la présence des anticorps anti-HBc. Indirectement ces résultats semblent indiquer que peut être le système immunitaire serait capable d'inhiber la réplication virale. Alors même si dans la plupart des cas on ne sait pas si les anticorps sont de type IgM ou IgG. On peut penser que lors d'infection occulte ou la réplication est faible une réponse anti-HBc de type IgM pourrait être présente et même à des taux très faible. Ce qui permettrait d'activer le complément et par ce biais inhiber la réplication virale.

2.2.4.4 Co-infections virales

Les infections occultes sont largement retrouvées en coinfections avec les agents viraux de l'hépatite C (HCV) et du virus l'immunodéficience humaine (HIV). Ces trois virus partagent les mêmes voies de contamination, si bien que les cas de coinfections ne sont pas rares. Les populations infectées par le HCV ou le HIV sont plus enclines à l'infection occulte. Les cas de coinfections sont caractérisés par une exacerbation de l'atteinte hépatique et une très forte augmentation du risque de développer un CHC.

2.2.4.4.1 Coinfection HBV/HCV

Le virus de l'hépatite C appartient à la famille des *flaviviridae*. Il est estimé que 130 millions de personnes sont porteurs du HCV dans le monde et que les cas de coinfections HBV/HCV concernent 7 à 20 millions de personnes. Ces deux virus partagent le même tropisme hépatique. Les cas de coinfections sont associés à une augmentation de la sévérité de la maladie hépatique, un développement plus rapide vers les stades de fibroses, cirrhoses et CHC que lors des cas de mono-infection qu'ils soient par le HBV ou le HCV (Potthoff, Manns et al. 2010). Des études menées *in vitro* ont montré que le HCV jouait un effet dominant négatif qui inhiberait la réplication du HBV et qui serait médié par la protéine Core du HCV (Shih, Lo et al. 1993) (Schuttler, Fiedler et al. 2002). Une seconde étude a, quant à elle, observé un effet contraire, suggérant que le HBV inhiberait la réplication du HCV (Pontisso, Ruvoletto et al. 1993). Cependant la ou les interactions entre le HBV et le HCV restent très difficiles à étudier et ce principalement à cause du manque de systèmes d'études *in vitro* appropriés. L'équipe de Bellecave, a pu montrer que ces deux virus pouvaient répliquer dans la même cellule sans *a priori* interagir directement. L'interférence virale serait indirecte et médiée par des mécanismes moléculaires qui pourraient être responsable de ces inhibitions réciproques observées (Koike, Yasuda et al. 1995; Bellecave, Gouttenoire et al. 2009; Eyre, Phillips et al. 2009).

Le HCV est capable d'induire une réponse interféron, on peut alors penser que ce mécanisme moléculaire puisse contribuer à l'établissement de l'infection occulte HBV chez les patients coinfectés. Les données montrent que les patients infectés par le HCV représentent une population particulièrement à risque pour les OBI. Il est très probable que les mécanismes d'interférences virales contribuent au statut occulte mais n'expliquent surement pas l'ensemble des cas. Dans ce contexte l'ADN du HBV est détectable chez un tiers des porteurs HCV+/AgHBs- du bassin méditerranéen (Cacciola, Pollicino et al. 1999; Mrani, Chemin et al. 2007), une prévalence encore plus forte, comprise entre 37 et 95% a été rapportées chez les populations asiatiques (Koike, Kobayashi et al. 1998).

2.2.4.4.2 Coinfection HBV/HIV

Le HIV appartient à la famille des *lentivirus*, il ne partage que peu de caractéristiques avec le HBV. Cependant chacun de ces virus possède une étape de reverse transcription qui est une des cibles majeures des traitements antiviraux. Actuellement 33 millions de personnes dans le monde sont porteurs du HIV, la répartition mondiale du virus est très hétérogène. Dans les zones de fortes endémicités pour le HIV et le HBV, il est estimé que 6 à 14% des patients infectés par le HIV+ le sont aussi par le HBV (Alter 2006). Dans les zones de faibles prévalences les cas de coinfections sont moins fréquents. Si la coinfection par le HBV semble avoir peu d'impact sur les maladies liées à l'infection par le HIV le contraire n'est pas vrai : (i) la probabilité qu'une infection à HBV aiguë progresse vers une infection à HBV chronique est plus importante chez des personnes infectées par le HIV (Koblin, Taylor et al. 1992) (ii) lors d'infection chronique la réplication du HBV est plus élevée (iii) les probabilités de

séroconversion anti-HBs ou anti-HBe sont moindres chez les personnes coinfectées que chez les mono-infectées par le HBV (iv) la progression vers la fibrose et la cirrhose est plus rapide (Bonacini 1997). Les phénomènes de coinfection HBV/HIV restent toutefois mal compris. Le traitement des coinfections est délicat, (i) des molécules actives contre les deux virus, ciblant l'étape de reverse transcriptase existent et sont 'bien tolérées', mais le risque de voir l'émergence de mutant HBV ou HIV résistants à ces molécules est très élevé (Sturmer, Doerr et al. 2009) (ii) certaines molécules utilisées dans les traitements antirétroviraux peuvent être hépatotoxiques (Wit, Weverling et al. 2002) (iii) il y a de nombreuses interactions entre les drogues utilisées contre les deux virus (Perronne 2006). Avec l'amélioration du traitement anti-HIV, les coinfections par les hépatites virales (HBV et HCV) sont devenues l'une des nouvelles grandes causes de morbidité et mortalité chez les patients HIV (+). Ceci n'est vrai que pour les populations des pays développés pour lesquelles l'accès au traitement est facilité.

La prévalence de l'infection occulte par le HBV a largement été recherchée chez les patients HIV (+) et selon les études elle varie entre 0 et 89% (Raimondo, Pollicino et al. 2007). Le manque d'outils standardisés pour la détection de l'infection occulte est à l'origine d'un écart aussi aberrant. Cependant, l'infection au HIV est clairement un facteur de risque à l'infection occulte par le HBV et la prévalence chez les patients HIV (+) est supérieure à ce qui est trouvé dans la population générale (Ramezani, Banifazl et al. 2011). Chez les patients HIV (+), on ne sait pas si une interaction par exemple moléculaire indirecte entre les deux virus existe et pourrait inhiber la réplication du HBV. Un des problèmes principaux dans les cas de coinfections HIV/HBV occulte est la réactivation de l'infection au HBV. Les phénomènes de réactivation des infections occultes par le HBV ne sont pas totalement élucidés mais sont fréquemment observés suite à l'arrêt ou la discontinuité du traitement HAART contre le HIV (Costantini, Marinelli et al. 2011; Bessesen, Ives et al. 1999). Même si les patients sont traités contre le HIV avec des molécules actives aussi contre le HBV, la réactivation de souche HBV résistantes est rare. De manière intéressante des cas de réactivation d'infections occultes ont été rapportés indépendamment de l'apparition de mutation de résistance à la lamuvidine, mais associés à la disparition des anticorps anti-HBs ou à des états d'immunodépression (Schirmer, Winters et al 2011.; Manegold, Hannoun et al. 2001; Henke-Gendo, Amini-Bavil-Olyaei et al. 2008). L'analyse moléculaire des souches HBV présentées dans ces 2 études a montrée l'accumulation de mutation dans l'AgHBs à des positions clés Y100C, P120T, sK122R, sD144A. Dans deux études les mutations sK122R sont rapportées et impliquent des génotypes A, substitutions extrêmement rare chez ce génotype. L'absence des anticorps au moment de la réactivation n'a pas permis de réaliser d'analyses fonctionnelles sur la reconnaissance de l'AgHBs et des anticorps anti-HBs des patients. On peut imaginer que l'apparition de la mutation est le résultat de la pression de sélection du système immunitaire sur le virus. Mais que la réactivation du HBV n'a été possible que par l'absence des anticorps anti-HBs. Les phénomènes de réactivation des infections occultes chez les patients HIV (+). Une autre étude a montré que la réactivation d'infection occulte chez deux patients HIV (+) était indépendante des mutations de résistance à la lamuvidine et de l'état d'immunodépression (Manegold, Hannoun et al. 2001).

2.2.4.5 Absence de détection l'AgHBs et des transcrits Prés2/S

Dans la compréhension des infections occultes, Hass et al. ont rapporté un cas pour lequel une mutation silencieuse dans le gène S interférait avec les processus post-transcriptionnels de l'ARN Prés2/S (Hass, Hannoun et al. 2005). Le patient HIV (+) a réactivé une OBI. L'analyse des populations virales du HBV a montré que deux quasi-espèces étaient présentes dont l'une avec une substitution G→A dans le gène S à la position 458. L'étude fonctionnelle des isolats portant la substitution sG458A a montré que les isolats étaient répliquants. Mais après transfection une faible sécrétion (i) des particules virales encapsidées (ii) de l'AgHBs dans le milieu des cellules transfectées étaient observées. L'analyse des transcrits ne montre aucune perturbation l'ARNpg ni de l'ARN Prés1. En revanche, les transcrits Prés2/S sont eux fortement affectés et ne sont pas détectés par Northern Blot. Ce résultat explique l'absence de détection de l'AgHBs dans le milieu cellulaire des cellules transfectées. La mutation sG458A se trouve être adjacente à un site d'épissage 5' dans l'ARNm du gène S. Les expériences menées *in vitro* montrent que les mutants sont défectifs pour l'utilisation de ce site d'épissage. Les analyses complémentaires ont montré que cette substitution affectait des processus post-transcriptionnels au niveau de l'accumulation des transcrits dans le noyau et/ou de l'export de ce dernier dans le cytoplasme. L'élément de régulation post-transcriptionnel (PRE) est positionné à l'extrémité 3' de l'ARNm S, soit environ 750 nt en aval de la mutation sG458A. On peut supposer qu'il n'y ait pas d'interaction directe de la mutation sur le PRE. Hass et al. ont proposé un modèle pour lequel l'épissage des transcrit en 5' se fait par le recrutement de facteurs cellulaires afin de former le splicéosome. Ces facteurs sont également nécessaires pour l'export des transcrits Prés2/S non-épissés vers le cytoplasme. La mutation sG458A jouerait un rôle lors de la première étape impliquée dans les processus d'épissage et empêcherait l'assemblage du splicéosome et du complexe de la jonction d'exon, empêchant à la fois l'épissage et l'export nucléaire. Cet exemple souligne l'importance des mutations dites silencieuses et de leur impact sur la transcription ou sur les processus post-transcriptionnels

L'infection par le HBV est caractérisée par des interactions hôte-pathogènes très étroites. L'établissement de la chronicité est un système dynamique dans lequel le virus s'adapte en permanence pour assurer son maintien. De nombreuses stratégies virales sont utilisées pour échapper au système immunitaire comme la sécrétion massive des particules non infectieuses et des antigènes viraux (AgHBe et AgHBs) lors des infections chroniques. Ou au contraire une capacité pour le virus à rester silencieux comme c'est le cas lors d'infection occulte (faible virémie et absence des antigènes viraux).

La variabilité des quasi-espèces virales joue un rôle clé dans les mécanismes d'échappement aux traitements antiviraux et au système immunitaire. Les études menées *in vitro* ont démontrées la complexité des interactions entre les quasi-espèces dans le cycle de réplication viral. En conclusion, que l'infection soit chronique ou occulte la réplication virale est un ensemble dynamique qui fluctue en fonction de nombreux facteurs (système immunitaire, traitement antiviraux, coinfections). Le développement d'outils moléculaires plus sensibles pour l'étude des génomes entiers viraux permettrait d'améliorer les connaissances sur la variabilité du virus mais aussi sur la dynamique des quasi-espèces et de leur impact sur la maladie hépatique.

Objectifs des travaux de recherche

L'objectif de mon travail de recherche était initialement basé sur l'étude moléculaire et biologique de souches de HBV occulte en coinfection avec le HIV. Nos connaissances actuelles sur les résistances reposent sur l'étude de patients avec une charge virale HBV initialement élevée. Les patients à faible charge virale ou infections occultes ne sont habituellement pas traités contre le HBV. On ne connaît donc pas le comportement de ces souches face aux traitements antiviraux. Certaines molécules utilisées dans le traitement HAART contre le HIV sont aussi actives contre le HBV. Les patients HIV (+)/AgHBs (-) représente une cohorte unique pour l'étude des résistances virales chez les souches à faibles charges virales impliquées dans des cas d'infections occultes. Les difficultés liées au recrutement de patients dans la cohorte, à la qualité des échantillons et la faible virémie des infections occultes ont été des obstacles à la finalisation de ce travail. Seuls des résultats préliminaires sur ce sujet qui reste très intéressant et important seront présentés dans la partie annexe en tant qu'étude 4.

La détection du virus de l'hépatite B ainsi que l'étude des propriétés moléculaires et fonctionnelles du HBV sont dépendantes des méthodes d'amplification existantes. L'amélioration des outils de détection a permis une avancée dans les connaissances sur les infections à faible charge virale. Une des particularités du virus de l'hépatite B est que son information génétique peut être sous forme relâchée circulaire (ADN-RC) dans les virions circulants ou sous forme parfaitement circulaire (ADNccc) dans le noyau des cellules hépatocytaires infectées. La particularité de la structure de l'ADN-RC est à l'origine des difficultés rencontrées pour l'amplification de génomes entiers. Dans la majorité des cas le matériel biologique disponible pour l'étude des infections au HBV est le sérum, l'ADN viral est alors sous forme RC. Pour amplifier des génomes entiers à partir de sérum, la méthode la plus couramment utilisée est une PCR génomique (P1P2 Günther). Une seconde méthode pour l'amplification des génomes entiers en une étape PCR existe. Cette technique récente, dite amplification par cercle roulant (Rolling Circle Amplification ou RCA) est très fidèle et sensible mais elle nécessite une matrice parfaitement circulaire. Dans la technique originale il a été montré que l'ADN-RC pouvait être complété et ligaturé *in vitro* pour être ensuite amplifié par RCA. Dans ce cas, alors l'étape de complémentation du brin d'ADN (+) repose sur l'activité et les propriétés de la polymérase virale endogène. C'est dans un second temps que l'ADN viral est extrait du sérum puis le brin d'ADN (+) est ligaturé pour former une matrice d'ADN circulaire. Cette méthode dépend largement de la bonne conservation des échantillons et implique que l'activité de la polymérase virale soit encore fonctionnelle. Nous avons développé une méthode, qui permet de compléter et circulariser le brin d'ADN (+) de l'ADN-RC en une étape afin qu'il serve de matrice à une amplification par cercle roulant. Ces avancées nous permettent de nous affranchir de l'utilisation de l'activité de la polymérase virale. Les résultats présentés dans l'étude 1 montrent que non seulement l'amplification par cette nouvelle méthode est fidèle mais aussi plus sensible que les méthodes existantes.

Le développement de cette nouvelle méthode d'amplification nous a permis d'initier un travail sur les quasi-espèces d'un mutant PréC/C dont les résultats préliminaires sont présentés à la suite de l'étude 1.

La détection de l'infection par le HBV repose sur la présence de l'AgHBs, cependant dans certains cas, des modifications moléculaires de l'AgHBs peuvent mettre en défaut les tests de détection enzymatique. La mutation Y100C dans le gène S est retrouvée sporadiquement et est impliquée dans des cas où l'AgHBs échappe à la détection des tests enzymatiques (donneurs de sang, infection occulte). Nous avons étudié *in vitro* l'impact de la mutation Y100C sur la protéine S du HBV et principalement sur la reconnaissance de l'AgHBs par un test de détection enzymatique. Nous voulions savoir si cette mutation à elle seule modifiait l'épitope immunodominant et était capable de mettre en défaut au moins un test de détection enzymatique.

Lors de l'infection par le HBV la présence des anticorps anti-HBs signe le plus souvent la résolution de l'infection par le HBV et l'élimination du virus. Dans certains cas, une réponse immunitaire inadaptée peut mener à la sélection de quasi-espèces virales échappant à la pression immunitaire. Ces variants peuvent persister dans l'organisme tout en répliquant à bas bruit et sans être détecté par le système immunitaire. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux modifications de l'AgHBs et de leurs impacts sur l'échappement aux anticorps anti-HBs du patient. Le patient qui fait l'objet de cette étude était considéré comme guéri pour l'infection au HBV mais une infection latente a réactivée et ce probablement suite à une interaction médicamenteuse. Afin de comprendre les mécanismes d'échappement viraux mis en jeu, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'AgHBs et tout particulièrement de sa reconnaissance par les anticorps anti-HBs du patient. Des expériences d'immunoprécipitation nous ont permis de proposer un scénario expliquant l'apparition des phénomènes mutationnels qui ont mené à cet échappement viral. Ce travail, présenté comme étude 3, illustre la complexité des interactions hôte-pathogène impliquées dans les phénomènes d'échappement.

Etude 1: Développement d'une nouvelle méthode d'amplification des génomes entiers de HBV

Une des particularités du HBV est que son information génétique peut exister sous différentes formes nucléiques. Ainsi les stratégies d'amplifications pour l'obtention de génomes entiers ne sont pas les mêmes selon le matériel biologique disponible (sérum ou biopsie). Dans le virion sérique, l'information est sous forme d'ADN relâché circulaire alors que dans le noyau des hépatocytes infectés, l'information est retrouvée majoritairement sous forme d'ADN double brin circulaire clos de manière covalente (ADNccc). Deux principales méthodes d'amplification des génomes entiers sont utilisées selon le matériel nucléique disponible. En introduction à cette étude ces deux techniques seront présentées.

Nous avons développé une méthode qui permet de compléter et ligaturer le brin d'ADN (+) de l'ADN-RC en ADN clos de manière circulaire. La matrice alors générée qui est totalement circulaire peut servir de matrice pour une amplification par cercle roulant. La méthode d'amplification que nous avons développé nous a permis d'initier un travail sur l'étude des quasi-espèces d'un mutant Core. Les résultats préliminaires obtenus seront présentés dans la dernière partie de cette étude.

Introduction

Amplification de génomes entiers de HBV à partir d'une matrice d'ADN relâché circulaire

La structure de l'ADN-RC impose des contraintes pour l'amplification et l'obtention de génomes entiers en un seul fragment. Le brin d'ADN (-) contient la totalité de l'information génétique et de courtes séquences redondantes à ses extrémités 5' et 3'. La polymérase virale est liée par une liaison-phospho tyrosine à l'extrémité 5' de ce brin, ce qui empêche la circularité du brin d'ADN (-). C'est le brin d'ADN (+) qui assure la circularité du génome viral en chevauchant les extrémités non closes du brin d'ADN (-). L'extrémité 5' variable du brin d'ADN (+) est liée à un court oligoribonucléotide (ADN polymérase ARN et ADN dépendante)(Lien, Aldrich et al. 1986). Ce brin est incomplet dans la structure d'ADN-RC et ne porte qu'entre 50% et 80% de la totalité de l'information génétique virale (Nassal 2008).

Une des méthodes les plus communément utilisées pour amplifier la totalité du génome de HBV a été développée par Günther en 1995 (Gunther, Li et al. 1995). Cette méthode joue sur les propriétés structurales de l'ADN-RC et principalement sur la redondance nucléotidique du brin d'ADN (-) aux extrémités 3' et 5'. Chacune des amorces utilisées (P1, séquence sens et P2, séquence anti sens) comprend cette redondance puis une dizaine de nucléotides provenant des séquences adjacentes à la redondance, soit sur le brin (+) soit sur le brin (-) (tableau 13, figure 24). La région ciblée par les amorces P1 et P2 est particulièrement conservée chez tous les génotypes de HBV, conférant ainsi un large spectre d'amplification.

Tableau 13: Amorces utilisées pour les PCR P1P2

P1 (amorce sens)	5'-CCGGA AAGCTT GAGCTCTC <u>TTTTT CACCTCTGCCTAATCA</u> -3'	1821-1841
P2 (amorce anti-sens)	5'-CCGGA AAGCTT GAGCTCTC <u>AAAAA GTTGCATGGTGCTTGG</u> -3'	1825-1806

Les amorces représentées sont utilisées pour amplifier des génomes entiers de HBV. La position ainsi que les séquences spécifiques du HBV (séquences soulignées) et les séquences adaptatrices (séquences non soulignées) sont représentées.

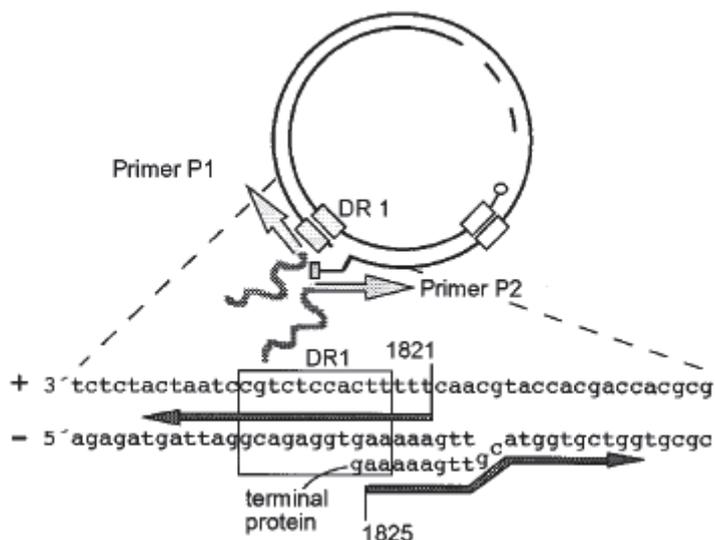


Figure 24: Amorçage des oligonucléotides P1 et P2 sur la molécule d'ADN-RC

Les amorces P1 et P2 hybridées à la molécule d'ADN-RC sont représentées

Tableau 14: Amorces utilisées lors de la réaction de RCA

Amorces	Séquences	Positions
RCA1	AATCCTCACAATA*C*C	226-240
RCA2	GATGGGATGGGAA*T*A	615-601
RCA3	CCTATGGGAGTGG*G*C	637-651
RCA4	GCAACGGGGTAAA*G*G	1154-1140
RCA5	ATGCAACTTTTC*A*C	1814-1828
RCA6	TCCAAATCTTTA*T*A	1930-1916
RCA7	TAGAAGAAGAACT*C*C	2368-2382
RCA8	AGAATATGGTGAC*C*C	2828-2814

*Modification Phosphotiorate

Pour permettre le clonage des génomes, chaque amorce est flanquée en 5' des séquences de HBV d'une courte région contenant des sites d'enzymes de restriction qui sont rarement trouvés dans les génomes de HBV. Immédiatement à côté de la redondance (5 T ou 5 A selon le brin, tableau 13) se trouve un site de reconnaissance de l'enzyme Sap I (ou son isoschizomère Lgu I). Cette enzyme a la particularité d'avoir un site de reconnaissance asymétrique de 7 nucléotides (GCTCTTC) qui est très rare dans les génomes de HBV. Une fois le génome de HBV amplifié et/ou cloné, l'utilisation de cette enzyme permet l'excision d'un génome entier de HBV sans nucléotide supplémentaire et doté de bouts cohésifs (TTT sur le brin (+) et AAA sur le brin (-)) (figure 24).

La sensibilité des réactions de polymérisation *in vitro* peut être évaluée mais dépend entre autre (i) de la matrice d'ADN et de sa disponibilité en nombre dans le milieu réactionnel, (ii) de la taille de l'amplicon (iii) de la méthode utilisée pour extraire l'acide nucléique si on travaille à partir d'ADN sérique ou d'ADN plasmidique et (iv) de facteurs intrinsèques à la réaction de polymérase propre à chaque enzyme. Dans ce contexte, l'estimation de la sensibilité d'une PCR est délicate. La sensibilité d'amplification de la PCR P1P2 a été estimée par quantification de l'ADN sérique et a permis d'amplifier l'équivalent de 300 copies d'ADN-RC présentes dans le milieu réactionnel. Enfin, parfois l'amplification peut s'avérer impossible et ce malgré une forte charge virale. Les difficultés rencontrées sont attribuées à la présence d'inhibiteurs de PCR qui sont présents dans le milieu d'extraction et qui sont très probablement issus du sérum lui-même.

Amplification de génomes entiers de HBV à partir d'une matrice d'ADN circulaire clos de manière covalente.

Dans le noyau des hépatocytes l'ADN viral est sous forme double brin totalement circulaire et clos de façon covalente. Les deux brins d'ADN portent alors la totalité de l'information génétique. Cette particularité est à l'origine d'une stratégie d'amplification par cercle roulant (Rolling Circle Amplification ou RCA) (Margeridon, Carrouee-Durantel et al. 2008). Cette méthode utilise les propriétés de l'enzyme Phi 29 qui permet l'amplification à partir d'une matrice d'ADN circulaire simple ou double brin. La réaction d'amplification nécessite dans un premier temps d'hybrider huit courtes amorces spécifiques (tableau 14) de HBV provenant du brin (+) et du brin (-) à la matrice d'ADN circulaire. Ensuite la réaction est isothermale (30°C) et longue (entre 17 et 24 heures). La polymérase Phi 29 est particulièrement processive et peut polymériser plus de 70000 nucléotides (> 20 génomes HBV) sans se détacher de la matrice initiale. L'amplification se fait en cercle roulant, l'enzyme tourne autour de la cible circulaire et lorsqu'elle rencontre un autre brin en cours de synthèse elle le déplace et continue ainsi son élongation. De nouvelles amorces se fixent sur le brin d'ADN déplacé et initient une nouvelle synthèse d'ADN. De nombreux brins sont alors synthétisés en même temps, ce qui génère un concaténat de produits d'amplification double brin de hauts poids moléculaire. La forte activité exonucléasique 3'->5' d'édition est responsable de la haute fidélité d'amplification mais nécessite de protéger les amorces par des liaisons phosphorothiorates à leurs extrémités 3'.

La réaction de RCA génère des concaténats d'acide nucléiques qui sont composés d'ADN du HBV mais aussi d'autres ADN (ADN mitochondrial), ce qui explique que même le témoin négatif de réaction peut montrer de l'ADN de haut poids moléculaire. La réaction de RCA est particulièrement sensible et permet l'amplification de génomes entiers même à partir de dix copies d'ADNccc dans le milieu réactionnel (Margeridon, Carrouee-Durantel et al. 2008). Enfin, cette réaction génère de long concaténats d'ADN. Les génomes entiers monomériques de HBV sont libérés, soit par digestion par une enzyme de restriction ayant un site unique dans le génome du viral, soit en utilisant, une faible proportion de ces concaténats comme matrice pour une PCR génomique de type P1P2 Günther. L'avantage alors est que l'on n'est plus obligé de se restreindre à utiliser des amorces au niveau de la redondance aux extrémités 5' et 3' du brin d'ADN (+), n'importe quelle séquence de HBV peut servir d'amorce. Nous utilisons préférentiellement des amorces situées dans la région S qui chevauchent un site de restriction unique dans le génome du HBV, le site de restriction Spe1 qui ne se trouve qu'une fois dans plus de 95% des génomes HBV connus.

La méthode initialement mise au point (Margeridon, Carrouee-Durantel et al. 2008) permet d'amplifier de l'ADN de HBV soit à partir de l'ADNccc naturellement circulaire présent dans des biopsies de foie, soit à partir de l'ADN-RC présent dans les virions sériques. L'amplification à partir d'une matrice d'ADN-RC se fait en utilisant l'activité enzymatique de la Polymérase virale endogène dans les particules virales. Dans un premier temps, le brin d'ADN (+) est complété et c'est seulement après extraction que le brin d'ADN (+) sera ligaturé pour former une structure totalement circulaire qui pourra être amplifiée par RCA. Cette méthode présente plusieurs inconvénients: (i) il faut que les échantillons soient suffisamment bien conservés pour que la polymérase virale soit encore fonctionnelle, (ii) la méthode sera inefficace sur des souches mutantes où l'activité de la Pol est sérieusement affectée. Dans le cas d'un mélange de souches mutantes ou sauvages, on risque d'amplifier préférentiellement la souche sauvage, même si elle est minoritaire. La multiplication des étapes avant l'amplification proprement dite augmente considérablement le risque de contaminations croisées.

Développement d'une nouvelle méthode d'amplification de génomes entiers de HBV

Nous avons travaillé sur la mise au point d'une réaction comprenant une DNA polymérase et une DNA ligase permettant de compléter le brin d'ADN (+) et de le ligaturer directement à partir de produits d'extractions. Nous avons commencé par utiliser un mélange de DNA polymérase/DNA ligase thermostables contenu dans le kit QuickChange de Stratagène. Cette méthode fonctionne parfaitement mais les deux enzymes (Turbo DNA Polymérase et Turbo DNA Ligase) utilisées ne sont pas inactivables par la chaleur. L'inactivation se fait alors par un traitement au phénol ce qui introduit dans l'expérience une étape à haut risque de contamination (travail en sorbonne plutôt que sous des enceintes dédiées, précipitation à l'alcool). Nous avons finalement développé une technique qui utilise conjointement les propriétés de la T4 DNA polymérase et de la T4 DNA ligase (inactivable par la chaleur) pour former une structure nucléique circulaire en une seule étape avant de procéder à la RCA.

Matériels et méthodes

Matériel biologique

L'ADN viral a été extrait à partir de différents sérums positifs pour le HBV. L'extrait V+ est de génotype D1 et l'extrait V- est de génotype A2. La charge virale associée à l'extrait V+ est supérieure à 10^7 copies/ml et la charge virale associée à l'extrait V- est de $3,10^4$ copies/ml. Des isolats de sous-génotypes B2, C1, D1, E, F1b et G ont aussi été utilisés. Pour ces isolats la charge virale exacte n'est pas connue avec certitude mais est supérieure à 10^5 copies/ml.

Complémentation-Ligation du brin d'ADN (+) de l'ADN-RC

L'ADN viral a été extrait à partir de 200 µl de sérum avec le kit d'extraction 'High Pure Viral Nucleic acid Kit' (Roche) et élué dans 50µl de tampon d'éluion. Le brin d'ADN de polarité positive est complété et ligaturé en utilisant l'activité conjointe des enzymes T4 DNA polymérase et T4 DNA Ligase. Le milieu réactionnel est composé du Tampon φ 29 (1X), BSA (0.4 mg/ml), dNTPs (25 mM chaque), rATP (0.5 mM), T4 DNA Polymérase (0.15U/ml) (New England Biolabs), T4 DNA Ligase (20U/ml) (New England Biolabs) auquel est ajouté 7.2 µl de produit d'extraction. La réaction est menée pendant 45 minutes à 30°C suivi de 20 minutes d'inactivation enzymatique à 75 °C

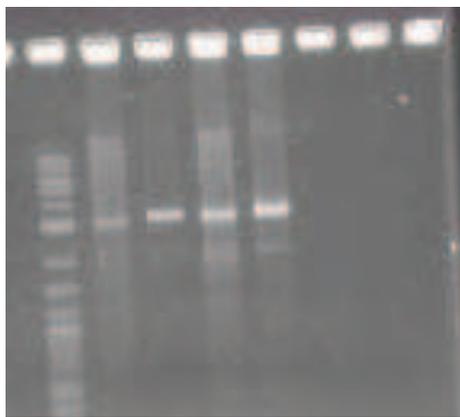
Amplification de l'ADN circulaire par RCA

La première étape de RCA consiste à hybrider les 8 amorces spécifiques sur la matrice d'ADN dans une solution contenant: Tampon Phi29 1X final, les huit amorces utilisées pour la réaction de RCA à une concentration de 0.68 µM final chaque, qsp 10µl avec le produit de complémentation/ligation. L'Hybridation se fait dans les conditions suivantes: 2 min à 95°C, 15 sec à 50°C, 15 sec 30°C, 10 min à 20°C puis les tubes sont placés dans la glace. La réaction d'amplification se fait par ajout de 10 µl de mixe de réaction contenant le tampon Phi 29 1X, de nouveau les 8 amorces de RCA (0.68µM final chaque), 0.4 mg/ml de BSA, (0.4mg/ml final), DTT (4mM final), dNTPs (4mM final chaque) et 10 U de l'ADN polymérase Phi29 (New England Biolabs). La réaction est menée sur la nuit à 30°C et arrêtée par 10 minutes à 65°C. Les produits sont analysés par hybridation avec une sonde HBV et/ou excision de monomères de génomes de HBV par une enzyme de restriction qui ne coupe le génome de HBV qu'une fois. Nous utilisons généralement Bcu I (qui est un isoschizomère de Spe I) dont le site n'est présent qu'une fois (dans le gène S) dans plus de 95% des génomes HBV répertoriés.

PCR génomique.

Les génomes entiers de HBV sont amplifiés par PCR en utilisant la technique de Gunther et al et les amorces spécifiques P1 et P2 (Tableau). La réaction d'amplification (50µl final) se fait selon les conditions suivantes : Tampon Herculase 1X, dNTPs (250 µM final chacun), les amorces P1 et P2 à 0.25 µM final chaque et 1µl d'Herculase II Fusion DNA polymérase (Stratagene), portés à 95°C, maintenu pendant 2 min à 95°C suivi de 40 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 60°C, 150 sec à 72°C, et terminé par 7 min à 72°C. Pour les PCR génomiques réalisées directement à partir des produits d'extraction, 7,2µl de produit d'extraction sont utilisés. Pour amplifier du matériel génétique à partir d'une réaction de RCA c'est 1/50 du produit de RCA qui est utilisé comme matrice.

Traitement		1	2	1	2
RNase	L	+	+	-	-



← 3,2Kpb

Gel coloré au BET

Figure 25: Impact du traitement RNase sur la complémentation-ligation et l'amplification par RCA.

Gel agarose 1% coloré au BET. Pour cette expérience deux extraits différents 1 et 2 ont été utilisés. Les produits de RCA ont été coupés par Bcu1 (Spe1) avant d'être déposé sur gel. Le témoin négatif de réaction d'amplification n'apparaît pas sur la figure. L: 2Log DNA Ladder

Résultats

Nous avons développé une nouvelle méthode d'amplification de génome entier de HBV qui permet de convertir la molécule d'ADN-RC en une matrice d'ADN circulaire. Ceci implique la ligation des extrémités 3' et 5' d'au moins un des deux brins d'ADN. L'organisation de la molécule d'ADN-RC impose des contraintes structurales fortes, dans la méthode que nous avons développée nous ne savons pas avec exactitude quel brin est ligaturé. Cependant, le brin d'ADN (-), qui est plus long que le génome est aussi lié à son extrémité 5' à la polymérase virale par une liaison phospho-tyrosine, ce qui représente un obstacle majeur à la ligation des deux extrémités du brin d'ADN (-). Ces caractéristiques structurales nous ont amené à envisager que seul le brin d'ADN (+) complété pouvait être ligaturé. Le brin d'ADN (+) est caractérisé par une extrémité 3' variable et une extrémité 5' fixe liée à un court oligoribonucléotide. Nous ne savons pas quel est le devenir de ce court oligoribonucléotide et si il est un frein à la ligation des deux extrémités 3' et 5' du brin d'ADN (+).

Afin de savoir si la présence du court oligoribonucléotide à l'extrémité 5' du brin d'ADN (+) pouvait être un obstacle à la ligation du brin d'ADN (+), nous avons testé différentes conditions expérimentales pour lesquelles les produits d'extractions étaient traités ou non par de la RNase A et de la RNase T1 (figure 25). Ces extraits ont ensuite été amplifiés par complément-ligation suivie d'une RCA. Aucune différence majeure n'a été observée et pour chaque condition l'ADN viral était amplifié par cette nouvelle méthode. Voir même il semblerait que l'amplification est meilleure en absence de traitement Rnase. Un des contrôles préalable au développement de la nouvelle méthode d'amplification a été de vérifier l'absence d'ADNccc dans les produits d'extraction de sérum. Pour cela, nous avons réalisé une RCA directement sur les extraits. Un témoin positif de RCA correspondant à de l'ADNccc extrait 5 jours après infection *in vitro* d'hépatocytes primaires humains, généreusement donné par le Dr O. Hantz a été utilisé mais dans un souci de clarté je ne l'ai pas fait apparaître sur la figure 26. Un des résultats obtenus après RCA sur les extraits est assez déroutant. En effet, pour l'extrait V+, nous voyons, sur le gel coloré au BET, une bande d'ADN proche de la taille d'un génome entier de HBV. Cependant, l'hybridation montre que cette bande est non spécifique, ce qui confirme ainsi l'absence d'ADNccc dans les sérums.

Nous avons comparé la méthode que nous avons développée aux méthodes d'amplification de génomes entiers existantes (PCR génomique P1P2 et RCA) (figure 26). Pour ce faire, nous avons choisi deux extraits, un fortement virémique ($> 10^7$ copies/ml) et un faiblement virémique (10^4 copies/ml). Nous avons utilisé la même quantité de produit d'extraction pour chaque réaction d'amplification. Ainsi chaque réaction de PCR a été réalisée avec la même quantité d'ADN initiale. Les résultats sont présentés sur gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium (BET) et en Southern blot hybridé avec une sonde ^{32}P spécifique préparée avec des génomes entiers de HBV. Le marqueur de taille utilisé est le 2Log DNA ladder (New England Biolabs) dans lequel nous avons ajouté 1ng d'ADN HBV linéarisé, ce qui nous permet de visualiser la taille des fragments HBV en Southern blot.

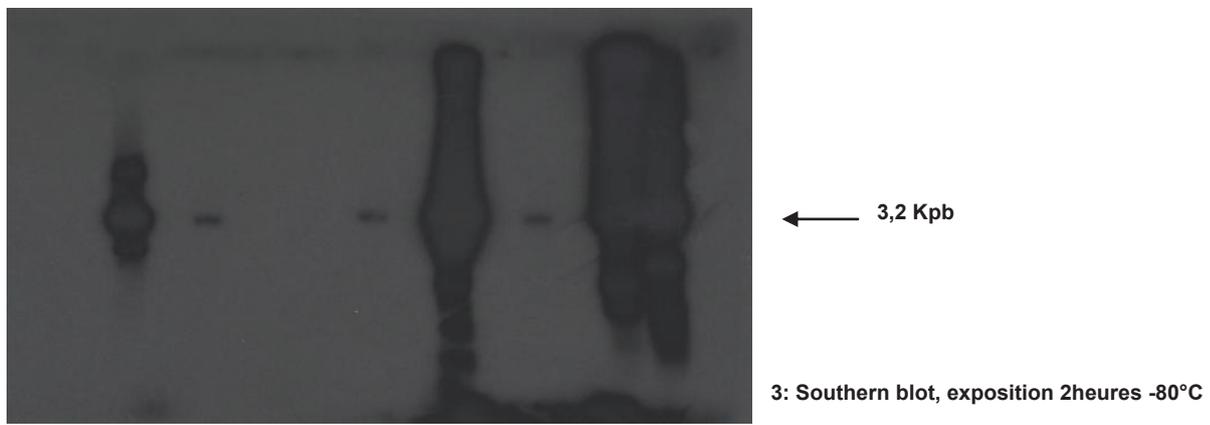
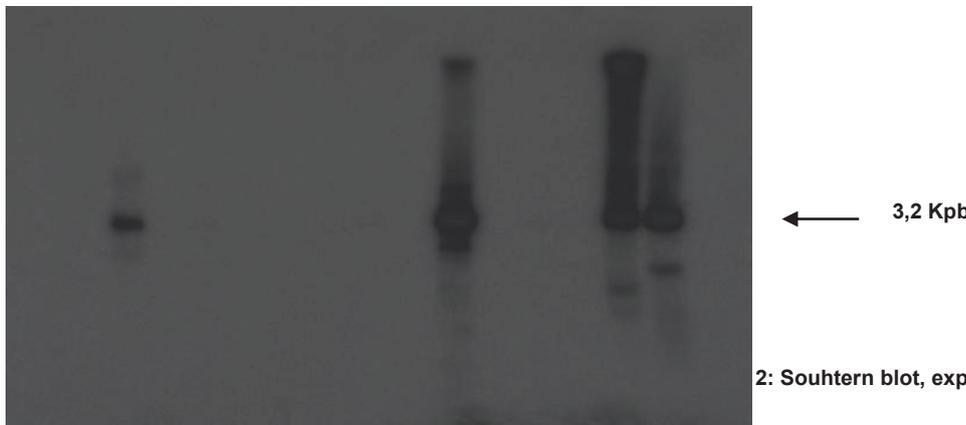
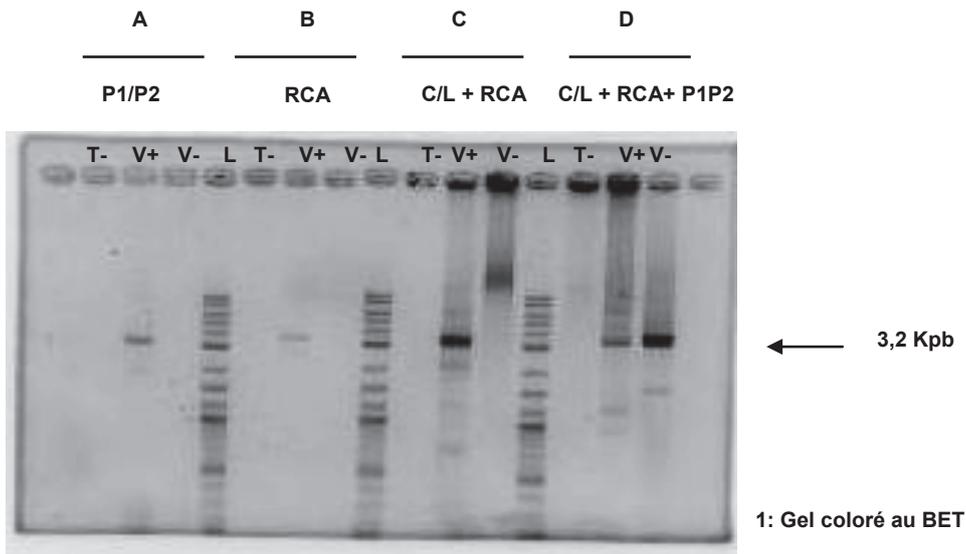


Figure 26: Amplification de génomes entiers de HBV à partir d'une matrice sous forme d'ADN-RC

1: Gel agarose 1% coloré au BET. T-: sérum humain normal, V+: extrait fortement virémique ($> 10^7$ cp/ml), V-: extrait peu virémique (10^4 cp/ml). L: 2Log DNA Ladder + 1 ng d'ADN HBV linéarisé

2: Southern blot exposé 30 min à température ambiante

3: Southern blot exposé 2 heures à -80°C

A: Amplification de l'ADN-RC par la PCR génomique Günther, 10% de produit PCR est déposé sur gel

B: amplification de l'ADN-RC par RCA, 10% de produit RCA digéré par l'enzyme de restriction Spe1 (coupant une fois dans le génome du HBV) est déposé sur gel.

C: Amplification de l'ADN par Complémentation-Ligation suivie d'une RCA. 10% du produit RCA digéré par Spe1 est déposé sur gel.

D: PCR P1P2 sur 0.5% du produit d'amplification C/L + RC

Dans un premier temps, nous avons amplifié les ADN HBV présent dans les extraits par PCR P1P2 directement. Les résultats obtenus montrent que l'extrait virémique (V+) est amplifiable facilement par PCR génomique mais que l'extrait faiblement virémique (V-) ne l'est pas.

Nous avons ensuite appliqué notre nouvelle technique d'amplification sur les extraits V+ et V- : l'ADN HBV est amplifié très facilement à partir de l'extrait V+ alors que l'ADN viral présent dans l'extrait V- n'était pas amplifié en une réaction RCA. En revanche, si l'on réalise une PCR génomique P1P2 sur 1/50 du produit de la première étape (Complémentation-Ligation + RCA) alors les génomes entiers HBV de l'extrait V- sont amplifiés. Le principe appliqué à V- peut alors être comparé à une nested PCR qui ne génère néanmoins pas de fragments sous-génomiques mais des génomes entiers de HBV. Le premier round consiste en l'étape de complémentation-ligation suivie de la RCA et le second round est composé de la PCR génomique P1P2. Nous avons ainsi pu montrer que cette méthode permet l'amplification de génomes entiers de HBV qui ne pourraient être amplifiés par les techniques classiques.

Par la suite, nous avons vérifié la fidélité d'amplification de cette méthode. Pour cela nous disposons d'ADN extraits à partir de sérum de patients coinfectés HBV/HDV pour lesquels des PCR classiques ciblant le gène C et/ou S du HBV avaient été réalisées. A partir de ces mêmes extraits nous avons amplifié les génomes entiers. Nous avons séquencé et comparé les séquences amplifiées par complémentation-ligation RCA aux séquences établies précédemment. Les résultats obtenus ne montrent pas de différences au niveau des séquences nucléiques ce qui confirme la fidélité de l'amplification par cette méthode.

Nous avons vérifié que notre méthode était compatible pour l'amplification de 7 des 8 génotypes du HBV existant (A, B, C, D, E, F, et G, résultats non montrés). Pour cela nous avons utilisé un échantillon de chaque génotype disponible au laboratoire et dont les charges virales ne sont pas connues avec exactitude mais qui sont supérieures à 10^5 copies/ml. Nous n'avons pas pris en compte l'ensemble des sous-sérotypes de HBV existants. Pour les génotypes A et D ce sont des souches européennes de sous-génotypes A2 et D1 qui ont été utilisées. Les isolats de génotypes B, C et F sont de sous-génotypes B2, C1 et F1b. Nous ne disposons pas d'échantillon de génotype H au laboratoire. Les 7 échantillons ont été amplifiés par cette méthode .

Nous avons comparé la sensibilité d'amplification de cette nouvelle méthode d'amplification avec la PCR génomique Günther. Pour cela nous avons réalisé des dilutions de 10 en 10 à partir d'un extrait virémique et nous avons comparé les deux méthodes d'amplifications (figure 27). Cette expérience a été réalisée 3 fois indépendamment et avec 3 extraits sériques différents pour lesquels les dilutions étaient réalisées fraîchement avant l'expérience.

Les résultats obtenus montrent que la complémentation-ligation suivi d'une réaction de RCA permet d'améliorer de 2 log la sensibilité d'amplification. L'introduction d'une réaction d'amplification supplémentaire type 'PCR nichée' permet d'améliorer la sensibilité d'un log additionnel. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que la réaction de PCR P1P2 qui suit l'amplification par RCA est d'autant plus efficace que la quantité d'ADN initial utilisé est faible.

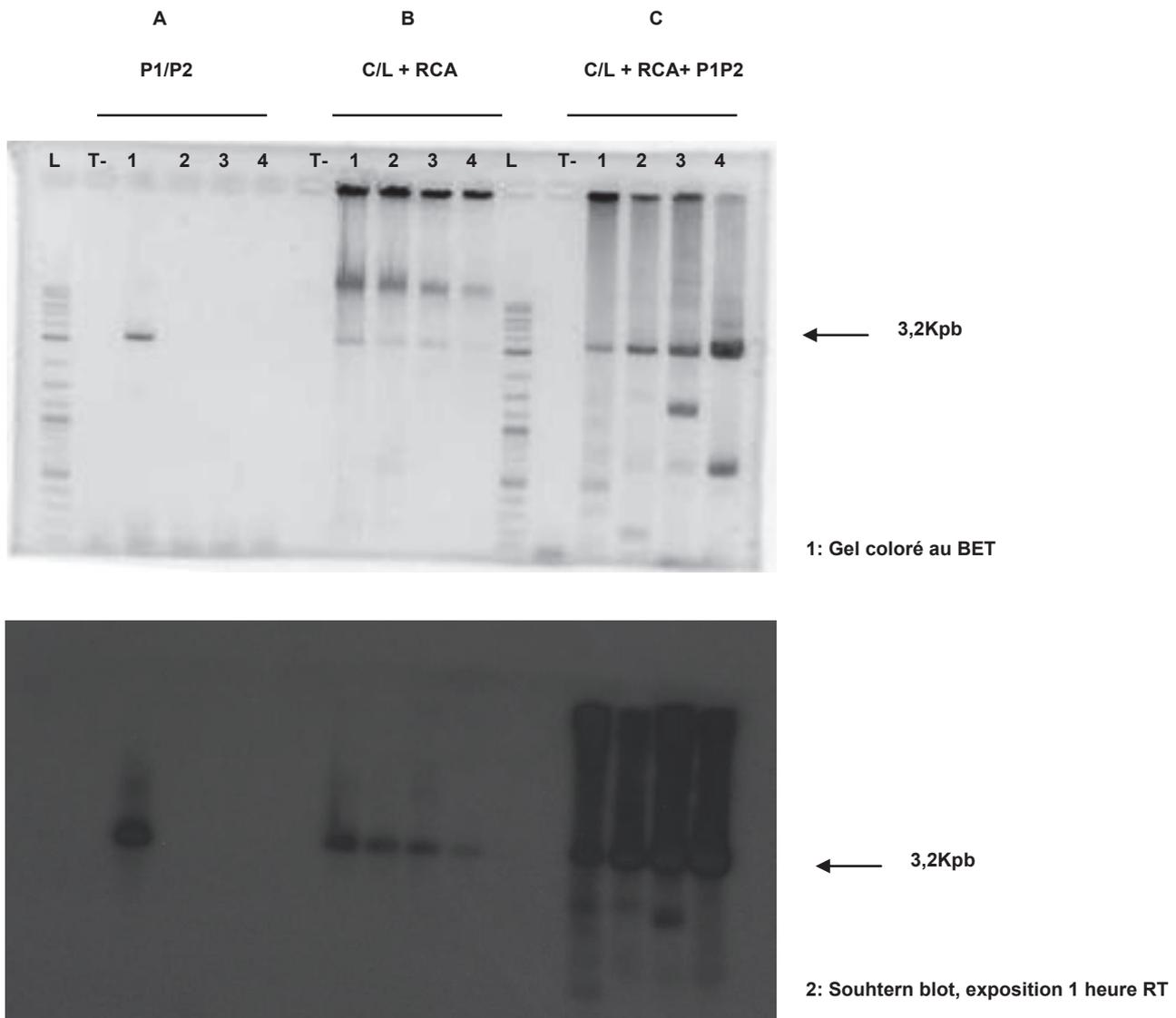


Figure 27: Comparaison de la sensibilité de l'amplification par PCR P1P2 et Complémentation-Ligation-RCA

Gel agarose 1% coloré au BET. L: 2Log DNA Ladder + 1 ng d'ADN HBV linéarisé
 Southern blot exposé 30 min à température ambiante

- 1: extrait d'ADN virémie 10^7 copies/ml
- 2: extrait d'ADN virémie 10^6 copies/ml
- 3: extrait d'ADN virémie 10^5 copies/ml
- 4: extrait d'ADN virémie 10^4 copies/ml

A: Amplification de l'ADN-RC par la PCR génomique Günther, 10% de produit PCR est déposé sur gel
 B: Amplification de l'ADN par Complémentation-Ligation suivie d'une RCA. 10% du produit RCA digéré par Spe1 est déposé sur gel.
 C: PCR P1P2 sur 0.5% du produit d'amplification C/L + RCA

Discussion

Les résultats obtenus nous permettent de conclure que cette méthode d'amplification est non seulement fonctionnelle mais même plus sensible que les méthodes utilisées actuellement. Nous avons pu montrer que nous arrivions en une étape à compléter et ligaturer un brin d'ADN pour qu'il forme une matrice circulaire amplifiable par RCA.

Un des contrôles préalables à cette étude a été de vérifier l'absence d'ADNccc dans le sérum. La RCA est probablement la méthode la plus adaptée pour la détection de l'ADNccc. Nous sommes partis du postulat qu'au regard de la sensibilité de cette technique (10 copies/ml) si de l'ADNccc était présent nous l'aurions amplifié. La présence d'ADNccc dans le sérum est sujette à polémique. Quelques études ont rapporté la présence d'ADNccc dans le sérum (Wong, Yuen et al. 2004; Mazet-Wagner, Baclet et al. 2006). On peut concevoir que lors d'une atteinte hépatique importante et particulièrement lors de la destruction des hépatocytes de l'ADN viral sous sa forme ccc puisse être libéré dans le sérum. A notre connaissance jamais la réaction de RCA n'a été utilisée pour rechercher de l'ADNccc dans des extraits sériques. Les PCR couramment utilisées amplifient un court fragment d'ADN comprenant les deux régions DR1 et DR2. Généralement une des amorces se trouve dans la région d'ADN qui est simple brin et la seconde amorce est au-delà de la région DR1. Ainsi définies les amorces n'amplifient en théorie de l'ADN que si il est sous forme ccc car si il est sous forme RC non seulement une des amorces ne peut pas s'hybrider et même si la seconde amorce s'hybride à la matrice, l'étape de dénaturation libèrent les extrémités 3' et 5' redondantes de l'ADN (-) non closes ; ce qui ne permet pas de continuer la réaction de PCR. Dans les faits, l'ADN-RC peut tout de même être amplifié par cette PCR mais avec une sensibilité bien moindre (100 fois moins bien) (Werle-Lapostolle, Bowden et al. 2004). Afin d'éviter cette amplification non spécifique dans certaines études, des enzymes dégradant tous les ADN qui ne sont pas totalement double brin et totalement circulaires sont utilisées. Dans cette étude, nous avons cherché systématiquement la présence d'ADNccc par RCA dans les extraits utilisés et les résultats ont toujours été négatifs. Ces résultats sont en accords avec les données existantes et confirment le caractère exceptionnel de la détection d'ADNccc dans le sérum.

Durant l'étape de complémententation-ligation nous ne savons pas avec certitude lequel des deux brins de l'ADN-RC est complété et circularisé et si c'est un seul des brins qui est ciblé. Cependant, nous pensons que seul le brin d'ADN (+) est complété et circularisé. Cet argument repose principalement sur les particularités structurales du brin d'ADN (-) qui possède non seulement des séquences redondantes à ces extrémités 3' et 5' mais plus particulièrement sur la présence de la polymérase virale qui est liée par une liaison phosphoro-tyrosine à l'extrémité 5'. Nous pensons qu'après l'étape d'extraction qui utilise la protéinase K, la liaison phospho-tyrosine n'est pas affectée et donc que l'extrémité 5' du brin d'ADN (-) est encore liée au résidu tyrosine. L'extrémité 5' du brin d'ADN (-) n'est donc pas disponible et ne peut pas se lier à l'extrémité 3' de ce même brin. Cependant, penser que c'est le brin d'ADN (+) qui est circularisé pose la question de la présence du court l'oligoribonucléotide à l'extrémité 5' fixe du brin d'ADN (+) et de son importance dans l'étape de ligation. Nous avons montré expérimentalement que le traitement des extraits avant la réaction d'amplification par de la RNase A et T1 n'avait aucun impact sur l'amplification.

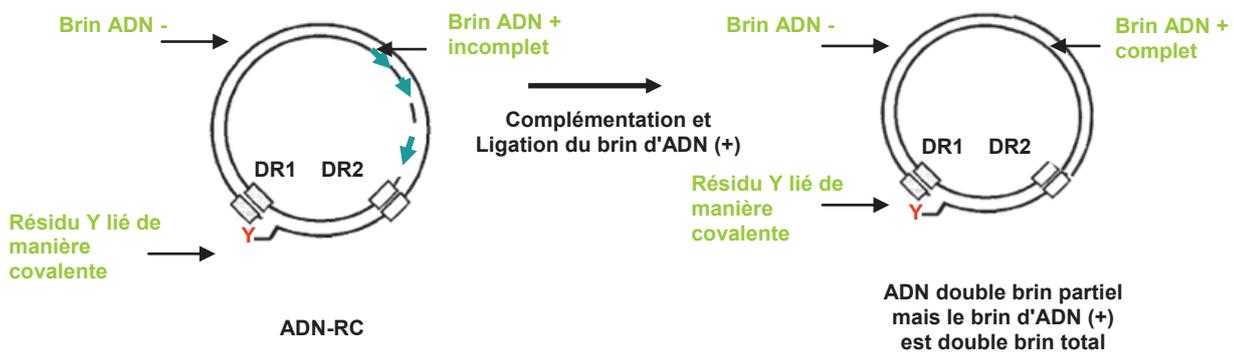


Figure 28: Représentation des formes d'ADN-RC après complémentation-ligation

Le brin d'ADN (+) est complété et ligaturé sous l'action des enzymes T4 DNA Polymérase et T4 DNA ligase.

Il est possible que la présence du court oligoribonucléotide n'affecte pas la circularisation du brin d'ADN (-) car la T4 DNA Ligase peut ligaturer à la fois de l'ADN et de l'ARN. Cependant, cet oligoribonucléotide provient de l'extrémité 5' de l'ARNpg et une coiffe devrait être présente (Lien, Aldrich et al. 1986) et devrait empêcher la ligation. Plus raisonnablement, on peut penser que le court oligoribonucléotide est totalement ou partiellement dégradé dans le virion ou pendant l'étape d'extraction. On ne connaît pas les mécanismes exacts impliqués dans la synthèse de l'ADN-RC. Il est envisageable que lors de la synthèse du brin d'ADN (+) et plus particulièrement lors de la formation de la triple hélice, l'oligoribonucléotide qui était auparavant protégé de l'action de la RNase H ne soit plus protégé et soit dégradé. Nous proposons comme schéma structural de l'ADN-RC avant et après extraction tel qu'il est représenté dans la figure 28 c'est-à-dire sans oligoribonucléotide à l'extrémité 5' fixe du brin d'ADN (-) au moins après l'étape d'extraction.

Nous avons évalué la sensibilité de l'amplification de notre méthode à la PCR génomique P1P2 développé par Günther. Les résultats montrent que notre méthode d'amplification est plus sensible que la PCR génomique P1P2. La complémentation-ligation suivi d'une réaction de RCA permet d'améliorer de 2 log la sensibilité d'amplification. L'introduction d'une réaction d'amplification supplémentaire type 'PCR nichée' permet d'améliorer la sensibilité d'un log additionnel. Ces résultats nous amènent à nous interroger sur la qualité de l'amplification que nous obtenons avec la PCR P1P2 directement sur les extraits. L'estimation de la sensibilité d'une PCR est difficile et dépend entre autre des conditions du milieu mais aussi de l'ADN utilisé. Cette différence peut s'expliquer par le fait que nous ne travaillons pas sur le même matériel biologique et que nous n'utilisons pas les mêmes polymérases (Taq + Pow/Herculase Fusion II) pour la réaction d'amplification. Par ailleurs, nous n'utilisons pas exactement le même cycle d'amplification. Alors que la méthode originale utilise une incrémentation du temps d'élongation nous utilisons toujours une même durée dans le cycle PCR.

Les résultats obtenus pour évaluer la sensibilité d'amplification montrent aussi que la réaction de PCR génomique qui suit l'amplification par RCA est d'autant plus efficace que la quantité d'ADN HBV est faible. Plus la quantité d'ADN HBV dans les concaténats est forte initialement plus la fixation des deux amorces (P1 et P2) sur un même génome est un phénomène rare et donc va à l'encontre d'une bonne réaction d'amplification. Une plus faible quantité de matrice HBV dans le milieu réactionnel augmente la probabilité que les 2 amorces se fixent sur la même cible d'ADN et permette une meilleure amplification de génomes monomériques.

Enfin, nous avons évalué le potentiel d'amplification de cette méthode sur les différents génotypes existant. Pour réaliser cette expérience nous avons utilisé différents génotypes disponibles au laboratoire indépendamment de leurs sous-génotypes et de leurs charges virales élevées. Par cette expérience nous avons confirmé le large spectre d'amplification de cette méthode. Cependant, nous ne pouvons pas dire si certains génotypes voire sous-génotypes sont plus facilement amplifiables que d'autres. Il est tout de même important de noter que les amorces utilisées lors de la réaction de RCA sont de courts oligonucléotides qui ciblent des régions extrêmement conservées chez au moins tous les génotypes HBV. L'utilisation de telles amorces assurent *de facto* un large spectre d'amplification tous

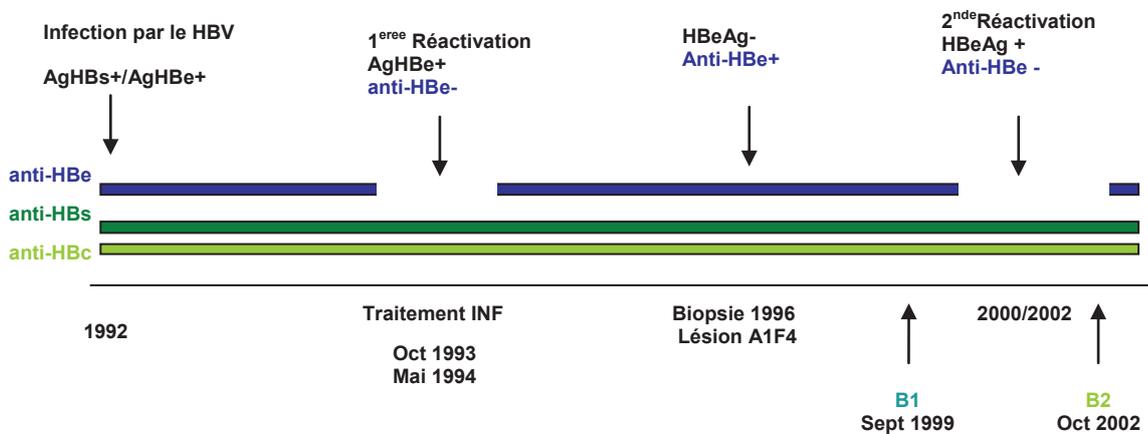


Figure 29: Résumé sérologique du patient B

L'infection au HBV a été mise en évidence en 1992. Elle était considérée comme résolue (anticorps anti-HBs/anti-HBc/anti-HBe). Un épisode de réactivation virale est observé en octobre 1993, le patient est alors traité par interféron pendant 7 mois jusqu'à ce que la charge virale HBV devienne indétectable. Un second épisode de réactivation virale est observé malgré la présence des anticorps anti-HBs. La réactivation s'accompagne de la réapparition des AgHBe et de la disparition des anticorps anti-HBe. Nous disposons pour cette étude des échantillons nommés B1 (avant la réactivation) et B2 (pendant la réactivation) relatifs au deuxième épisode de réactivation.

génotypes confondus. Dans la théorie ces oligos permettent l'amplification de tous les génotypes, nous ne pouvons pas exclure que la variabilité intra-génotypique et la modification de certains nucléotides viennent altérer l'hybridation des amorces sur la matrice ADN.

Vers une application de cette méthode d'amplification à l'analyse de quasi-espèces virales.

Nous avons appliqué cette méthode d'amplification pour analyser la composition de quasi-espèces d'un mutant HBV avant et pendant un épisode de réactivation virale. Ce travail dont les résultats ne sont que préliminaires avait pour objectifs de confirmer que la méthode d'amplification était compatible avec une étude moléculaire mais aussi pour l'étude de la dynamique des quasi-espèces avant et pendant un épisode de réactivation. Nous nous sommes intéressés à un cas particulier d'un mutant HBV de la région PréC/C portant une triple mutation dans la région basale du promoteur Core.

Contexte

Chez ce patient une infection aiguë au HBV a été mise en évidence en 1992. Alors que l'infection était considérée comme résolue (présence des anticorps anti-HBs et anti-HBe), un épisode de réactivation virale est observé en octobre 1993 et le patient est alors traité par interféron pendant 7 mois jusqu'à ce que la charge virale HBV devienne indétectable (figure 29). Une biopsie est réalisée en janvier 1996 montre des lésions hépatiques classées A1F4. Fin 2002, un deuxième épisode de réactivation virale est observé malgré la présence des anticorps anti-HBs. La réactivation s'accompagne de la réapparition des AgHBe et de la disparition des anticorps anti-HBe. Sur le plan virologique, il a été montré dès 1999 que la souche impliquée était de génotype A2 et portait une triple mutation dans la région BCP (G1764A, C1766T, T1768A).

Matériels et méthodes

Nous disposons pour cette étude des échantillons nommés B1 et B2 relatifs au deuxième épisode de réactivation virale. L'échantillon B1, est un échantillon faiblement virémique prélevé avant l'épisode de réactivation virale alors que B2 est un échantillon très virémique qui correspond à l'épisode de réactivation (figure 29). Nous ne disposons pas d'extraits sériques mais que des produits d'extraction. Les réactions de PCR génomiques types Günther réalisées précédemment n'avaient pas permis d'amplifier l'extrait B1 de faible virémie.

Amplification

Les génomes entiers de HBV des deux échantillons ont été amplifiés par complémententation-ligation + RCA suivie d'une PCR génomique, telle que nous l'avons décrite précédemment. Un séquençage direct des produits PCR dans la région PréC/C et S ont été réalisés avec comme amorce de séquençage les oligos C1-: 3'CAATCATARGGAACCTGWGT5' et S-56F: 5'CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC3' (tableau 18).

Tableau 15: Séquençage direct des produits PCR B1 et B2

	Avant réactivation B1	Après réactivation B2
Mutation dans le gène S	sS45A	sS45A
Mutation dans le gène X	94H, V131I, F132Y	H94Y, V131I, F132Y
Mutation dans la région BCP	G1764A, C1766T, T1768A	G1764A, C1766T, T1768A
Mutation dans le gène C	9F, 12T, 5P, 60L 50CCT	F9Y, T12S, P5T, L60V 50CCG

L'analyse des séquences est faite en comparant les séquences avec une séquence de référence de génotype A2. Les régions X/préC/C et S ont été séquencées.

Séquence du récepteur nucléaire

```

AGGTCANAGGTCA
GGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTATTAGGAGGCT
GGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGATTTATGTATTAGGAGGCT
GTTAATNATTANC
HNF1
    
```

Figure 30: Impact des mutations aux positions 1764/1766/1768 sur le site de liaison aux récepteurs nucléaires HNF1.

Pour l'analyse des quasi-espèces avant et pendant réactivation des clones HBV contenant une unité de génome ont été construits. Pour cela les produits PCR et le plasmide pGEM-T ont été digérés par l'enzyme de restriction Bcu1 (Fermentas, isoschizomère de Spe1) et purifiés sur gel. Les produits de ligation (75 ng insert, 25 ng vecteur) ont été électroporés dans des bactéries JM109. Les plasmides ont été purifiés par Miniprep (Invitrogen). La bonne insertion de l'ADN HBV dans l'insert a été vérifiée par digestion enzymatique. Les clones présentant un profil de digestion correcte ont été séquencés dans la région PréC/C en utilisant comme amorce de séquençage l'oligo C1-.

Résultats

Analyse des produits PCR

Nous avons amplifié les génomes entiers de HBV correspondant aux extraits B1 et B2. Les produits de PCR ont été séquencés dans les régions PréC/C et S. Les résultats obtenus ont confirmé que les souches B1 et B2 étaient de génotype A2 (sérotype ayw2) et que les deux isolats possèdent la triple mutation BCP: G1764A/C1766T/T1768A (tableau 15). Par chevauchement des régions BCP et X la triple mutation est responsable de la double mutation V131I, F132Y dans le gène X. L'échantillon B2 présente des mutations additionnelles dans la région X : H94Y et dans la région C : P5T, F9Y, T12S, L60V. L'analyse de la région S ne montre aucune modification nucléique majeure de l'A_gHBs, seule la simple mutation sS45A a été identifiée chez les clones B1 et B2.

Analyse des quasi-espèces B1 et B2

Nous avons isolés 16 clones B1 (avant la réactivation) et 18 clones B2 (pendant la réactivation). Seule la région PréC/C a été séquencée (tableau 16). L'analyse moléculaire montre que la triple mutation BCP (G1764A, C1766T, T1768A) est présente chez tous les clones avant et pendant réactivation, excepté chez l'un des clones B2 qui présente une délétion entre les nt 1763 et 1770.

La sous-population B1 est caractérisée par 7 clones sur 16 (44%) qui portent la substitution C1858T et 4 clones sur 16 (25%) ont l'insertion d'une guanine à la position 2100.

La sous-population B2 est caractérisée par les mutations : dans la région X (H94Y) et dans la région C (P5T, T12S et L60V) présentent chez 12 des 18 (66%) clones. Seul 1 clone porte une guanine insérée à la position 2100. Aucun des clones de la sous-population B2 ne porte la substitution C1858T (tableau 16).

Discussion

La méthode d'amplification mise au point nous a permis d'amplifier facilement les génomes entiers de HBV B1 et B2. Les souches isolées ont pour caractéristiques de porter une triple mutation dans la région BCP (G1764A, C1766T, T1768A). Des études moléculaires réalisées lors du premier épisode de réactivation (1993) avaient montré que la souche impliquée portait cette triple mutation. Non seulement les résultats obtenus sont en accord avec les données obtenus précédemment mais montrent aussi que la triple mutation est conservée dans le temps.

La mutation BCP la plus fréquemment retrouvée est la double mutation A1762T/G1764A. Les analyses fonctionnelles réalisées *in vitro* sur les isolats ont montré que cette double mutation était responsable d'une augmentation de la transcription de l'ARNpg, d'une diminution de l'expression de l'AgHBe sans altération du taux de réplication chez des isolats de génotype A et C (Parekh, Zoulim et al. 2003; Jammeh, Tavner et al. 2008). Dans notre cas, les électrophorogrammes obtenus ne montrent aucune ambiguïté sur le nucléotide à la position 1762, le résidu est sauvage.

La triple mutation dans la région BCP la plus fréquemment décrite implique les résidus A1762T/G1764A/C1766T. L'association de la mutation G1764A et des mutations C1766T, T1768A a été décrite (Parekh, Zoulim et al. 2003; Jammeh, Tavner et al. 2008), mais cette association semble être rare. Il est fort possible que la triple mutation tout comme la double mutation aux positions 1762/1764 modifie le site de fixation HNF1 (3). On ne sait pas quel est l'impact d'une telle association sur les étapes de transcription, de la réplication virale et de l'expression de l'AgHBe (figure 30). Part le chevauchement de la région Pré/C et l'extrémité C terminale du gène X, la triple mutation G1764A, C1766T, T1768A modifie la séquence de la protéine X en modifiant les aa V131I, F132Y. La double mutation aux positions 1762/1764 modifie de la même manière la séquence du gène X. Ainsi les substitutions V131I, F132Y ont fréquemment été décrites. Cependant, leur impact n'est pas connu avec certitude. En effet, par chevauchement des gènes l'impact d'une mutation est difficile à établir. Il a été montré que ces mutations étaient associées à la sévérité de la maladie hépatique. On ne sait pas si cela vient du fait que la mutation BCP altère les profils de transcription ou bien si la double mutation modifie les résidus à l'extrémité C terminale de la protéine X et altère les propriétés transactivatrices de cette protéine.

Le profil sérologique du patient est caractérisé par la présence des anticorps anti-HBs avant mais aussi pendant l'épisode de réactivation virale. Nous n'avons identifié aucune modification moléculaire de la protéine S qui permettrait d'expliquer la coexistence des anticorps anti-HBs et de l'AgHBs au moment de la réactivation virale. Le séquençage du gène S n'a montré aucune modification majeure dans la région antigénique, nous avons identifié pour chaque clone (B1 et B2) une simple substitution à la position sS45A. La structure tertiaire de l'AgHBs n'est pas connue avec certitude et dans les modèles proposés la position 45 se trouve dans la première boucle intracellulaire. On ne sait pas quel est l'impact de la modification d'un acide aminé de la boucle intracellulaire sur la structure tertiaire de la protéine. Cependant, il est peu probable que la substitution sS45A ait un impact majeur sur la structure tertiaire de la boucle antigénique. Cette mutation a été décrite dans une étude analysant les caractéristiques de la protéine S chez un patient chez lequel coexistaient les anticorps anti-HBs et l'AgHBs.

Tableau 16: Analyse moléculaire de la région PréC/C des clones B1 et B2

Quasi-espèces B1 (16 clones) Avant réactivation	Quasi-espèces B2 (18 clones) Pendant réactivation
G1764A, C1766T, T1768A (16/16)	G1764A, C1766T, T1768A (17/18)
	délétion 1763-1770 (1/18)
C1858T (7/16)	
A1850T (2/16)	A1850T (4/18)
	H94Y (12/18) (gène X)
A146T (4/16) (gène X)	A146V 2/18) (gène X)
	P5T (12/18) (gène C)
	F9Y (12/18) (gène C)
Mutation silencieuse aa13 (GTG -> GTT (2/16)) (gène C)	cT12S (12/18) (gène C)
	c14 GAG ->GAA (1/18) (gène C)
	c22 GAC->GAT (1/18) (gène C)
Mutation silencieuse aa45 (CCT->CCA (1/16)) (gène C)	
	Mutation silencieuse c50 (CCT- CCG (12/18)) (gène C)
	cL60V (12/18)
insertion +G nt 2100 (4/16) (gène C)	insertion +G nt 2100 (1/18) (gène C)

Dans l'étude menée par Cuestas l'analyse moléculaire de la protéine S a été réalisée sur une partie de la sous-population virale en analysant 6 clones. Les résultats montrent que 2 clones sur 6 possèdent la mutation sS45A. Bien que la mutation ne soit pas présente dans toute la population, les auteurs suggèrent une implication possible de cette mutation dans l'échappement aux anticorps anti-HBs, sans que les mécanismes soient clairs (Cuestas, Mathet et al. 2006). Dans notre cas, il est possible que la coexistence des antigènes HBs et de l'AgHBs vienne d'une réponse immunitaire hôte inadaptée.

Analyse des quasi-espèces virales

Nous avons initié une analyse des quasi-espèces virales sur 16 clones obtenus avant l'épisode de réactivation et 18 clones obtenus pendant l'épisode de réactivation. Nos résultats préliminaires se sont focalisés sur l'analyse de 800 paires de bases dans la région PréC/C. De ce fait, les résultats ne traduisent pas l'ensemble de la variabilité génétique de l'ensemble du génome. L'analyse des séquences des clones avant et pendant la réactivation montrent une très faible variabilité sur les 800 paires de bases. Des modifications nucléotidiques à des positions caractéristiques semblent être associées à l'épisode de latence et de réactivation.

La sous-population B1 est caractérisée par la substitution C1858T et l'insertion d'une guanine à la position 2100. La substitution C1858T est rare et cette position est importante car elle est dans la structure même du signal d'encapsidation. L'appariement des résidus aux positions 1858 et 1896 permet de maintenir la structure du signal d'encapsidation. La modification de l'un de ces résidus peut aussi altérer la structure du signal et avoir un impact sur les étapes de réplication virale. Pour des génotypes A 'sauvages' le résidu G (position 1896) s'apparie avec un C (position 1858). Chez les génotypes A, la synthèse de l'AgHBe peut être inhibée par l'apparition d'une mutation stop à la position G1896A. Mais pour que cette mutation se fixe dans la population virale il faut que le résidu à la position 1858 soit un T.

Ainsi tous les isolats de génotype A ayant la mutation G1896A ont systématiquement la mutation secondaire C1858T qui permet de stabiliser le signal d'encapsidation. Il a été suggéré que la mutation C1858T soit un prérequis pour l'apparition de la mutation stop G1896A. On aurait pu s'attendre lors de l'épisode de réactivation à l'apparition de la mutation G1896A, mais il n'en est rien. Nous seulement aucune mutation stop n'est retrouvée à la position 1896 chez l'ensemble des 18 clones B2 et la substitution C1858T n'est pas conservée. On ne connaît pas l'impact de la mutation C1858T sur la réplication virale. L'absence de cette mutation dans la sous-population B2 pose la question de son impact sur la structure du signal d'encapsidation. Même si le résidu à la position 1896 est un G et peut donc s'apparier avec un C ou un U.

On peut alors se demander si la mutation C1858T n'aurait pas un impact sur la réplication virale et déstabiliserait la structure du signal d'encapsidation. Ceci permettrait d'expliquer l'absence de la mutation C1858T chez les 18 clones B2. Un phénomène insertionnel est retrouvé chez un quart des clones B1 et chez un clone B2. Si aucune autre modification nucléique n'affecte la région PréC/C alors l'insertion d'une guanine à la position 2100 décale le cadre de lecture de l'AgHBc et l'AgHBe. Pour que

de tels clones se maintiennent dans la sous-population virale, il faut alors que la fonction au moins des protéines de capsid soit transcomplémentée. Il est possible que cette insertion soit responsable d'une altération de la réplication. L'analyse de la sous-population B1 montre que les clones ont un profil mutationnel particulier (C1858T, +1G au nt 2100) et qui ne semble pas compatible avec l'expression d'une forte réplication et une forte synthèse des protéines de capsid et de l'AgHBe.

Les clones composants la sous-population B2 sont caractérisés par l'absence de la mutation C1858T et l'apparition de mutations dans la région C aux positions 5, 9, 12, 50 et 60. Les mutations cP5T et cL60V ont déjà été décrites et seraient responsables *in vitro* d'un phénotype pour lequel la sécrétion des particules virales serait inhibée (Le Pogam, Yuan et al. 2000). Les résultats obtenus dans cette étude sont peu en accord avec ce que nous observons *in vivo*, à savoir que dans notre cas ces mutations sont sélectionnées lors de la réactivation virale. Cependant, on peut imaginer que si les mutations P5T et L60V sont responsables aussi *in vivo* d'un phénomène d'inhibition de sécrétion des particules virales que des mutations compensatoires (F9Y, cT12S ou à la mutation silencieuse à la position 50) pourraient venir restaurer un phénotype fonctionnel pour la sécrétion des particules virales.

Enfin un des clones possède une délétion de 7 nucléotides entre les nt 1763 et 1770. Cette délétion non seulement décale le cadre de lecture mais l'absence de ces résidus n'est pas compatible avec un profil compétent pour la réplication. Des délétions similaires ont déjà été décrites et de tels clones sont principalement observés dans des cas où la sous-population est complexe (Marschenz, Endres et al. 2006; Marschenz, Brinckmann et al. 2008). Ce résultat est en accord avec les données existantes et il apparaît clairement que lors d'épisode de forte réplication de nombreux clones puissent être générés.

En conclusion de ces résultats préliminaires sur l'analyse des quasi-espèces virales: malgré la faible variabilité observée, les deux sous-populations virales sont distinctes et caractérisées par des mutations spécifiques dont l'analyse est complexe. Nous ne savons si les profils de mutations identifiés peuvent à elles seules expliquer les phénotypes de faibles et fortes réplication observés respectivement chez les souches B1 et B2. Pour la suite de l'étude, il serait primordial d'étudier les propriétés fonctionnelles (transcription, réplication, synthèse des antigènes viraux et sécrétion des particules virales) des clones seuls mais surtout en association.

Etude 2

Expression of hepatitis B virus (HBV) surface antigen containing Y100C variant frequently detected in occult HBV infection.

Introduction

L'infection occulte par le HBV est caractérisée par la présence de l'ADN viral dans le foie et/ou le sérum en absence de détection de l'AgHBs. Ces infections sont retrouvées dans divers contextes cliniques (transfusion sanguine, transplantation) et sont associées à une aggravation de l'atteinte hépatique pouvant conduire au développement de fibrose et de carcinome hépatocellulaire (Torbenson and Thomas 2002; Chemin and Trepo 2005; Raimondo, Allain et al. 2008). Les charges virales associées à ces infections sont le plus souvent faibles mais peuvent fluctuer pour atteindre de fortes charges virales (Chemin, Guillaud et al. 2009). On ne connaît pas les mécanismes responsables des infections occultes mais ce statut est très probablement multifactoriel (Hu 2002). L'absence de détection de l'AgHBs peut être attribuée dans certains cas à la présence de mutant d'échappement mais est majoritairement le fait d'une faible réplication. Il a été suggéré que des mécanismes épigénétiques, une interférence virale avec un second agent infectieux, puissent être responsable de la faible réplication (Hollinger and Sood 2010; Torbenson and Thomas 2002; Raimondo, Pollicino et al. 2007).

Les analyses moléculaires des souches impliquées dans des cas d'infections occultes et/ou coexistent l'AgHBs et les anticorps anti-HBs ont indiqué la présence certes sporadique mais récurrente de la substitution d'une tyrosine en cystéine au résidu 100 de l'AgHBs. Cette mutation est retrouvée dans divers contextes cliniques chez des donneurs de sang au Vénézuéla (Gutierrez, Devesa et al. 2004), en Espagne (Zaaijer, Torres et al. 2008), mais aussi au Brésil chez des patients hémodialysés (Motta, Mello et al. 2010) et au sein d'une communauté afro brésilienne (Motta-Castro, Martins et al. 2008). Cette mutation a aussi été isolée chez des patients chez lesquels cocirculent l'AgHBs portant la mutation Y100C et les anticorps anti-HBs (Zhang, Li et al. 2011) (tableau 17).

L'analyse des séquences du gène S dans GenBank montre que la mutation Y100C est retrouvée chez différents génotypes (A, B, C; D, F). Cette mutation est rapportée dans de nombreuses études sans pour autant que son importance dans les phénomènes d'échappement ne soient clairement dégagés. La mutation Y100C est retrouvée dans des cohortes de donneurs de sang en Pologne (Grabarczyk, Garmiri et al. 2010), en Guinée (Garmiri, Loua et al. 2009), en Malaisie (Meldal, Bon et al. 2011), en Iran (Garmiri, Rezvan et al. 2011), en Tunisie (Meldal, Moula et al. 2009). Enfin cette mutation est retrouvée dans de nombreuses analyses phylogénétiques réalisées à partir d'isolats d'origine

Africaine (Abdou Chekaraou (2010), Brichler et al.; Hannoun, Soderstrom et al. 2005; Kurbanov, Tanaka et al. 2005; Olinger, Venard et al. 2006; Hubschen, Mugabo et al. 2009).

Y100C	Cohorte étudiée	Statut de l'infection au HBV	anti-HBs	anti-HBc	Cas identifiés	Génotype	Référence
	Donneurs de sang AgHBs (-) Venezuela	Occulte	Neg	Pos	4/11	4 génotypes A1	Gutierrez et al.
	Donneurs de sang AgHBs (+) Venezuela	chronique	NE	NE	1/21	NE	Devesa et al
	Donneurs de sang AgHBs (-) Espagne	Occulte	Pos	Pos	1/15	D	Cuestas et al
	Cohorte de patients hémodialysés AgHBs (-) Brésil	Occulte			4/15	4 génotypes A1	Motta et al
	Cohorte de patients d'une communauté semi Afro-Brésilienne	Occulte	NE	NE	6/40	6 génotypes A1	Motta castro et al
Cas rapporté	Cohorte porteur chronique Argentine	chronique	Pos	Pos	1/13	F1b	Cuestas et al
	Patient, analyse de la sous population virale	chronique	Pos	ND	4/20 clones	B2, ayw2	Zang et al

Tableau 17: Profils sérologiques associés à la mutation Y100C

Ce tableau montre les cas dans lesquels la mutation Y100C a été décrite. La cohorte, le statut de l'infection, la présence ou non des anti-coprs anti-HBs/HBc, le nombre de cas et les génotypes identifiés sont indiqués. NE: Non Expliqué, ND: Non Déterminé

La structure tridimensionnelle de l'AgHBs n'est pas connue, d'après le modèle proposé par Person et Argos, la position 100 serait exposée à la base externe du second domaine transmembranaire, qui forme le déterminant antigénique majeur (Persson and Argos 1994). Des modifications de ce déterminant et principalement du déterminant 'a' (aa) peuvent être responsables d'échappement au système immunitaire mais aussi aux tests de détection (Torresi 2002). On ne connaît pas l'impact des substitutions des résidus formant la base de la boucle antigénique sur la structure de cette même boucle et de l'impact possible sur l'antigénicité.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'impact de la mutation Y100C sur à la reconnaissance de l'AgHBs par au moins un test de détection enzymatique. Nous avons produit *in vitro* par ingénierie génétique des protéines S sauvages et mutées à la position Y100C. Nous voulions savoir si cette mutation à elle seule pouvait mettre en défaut les tests de détection et expliquer un phénotype de mutant d'échappement aux tests de détection.

Research Article

Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen Containing Y100C Variant Frequently Detected in Occult HBV Infection

Francisco C. A. Mello,¹ Nora Martel,² Selma A. Gomes,¹ and Natalia M. Araujo¹

¹Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²INSERM U871, 151 Cours Albert Thomas, 69424 Lyon, France

Correspondence should be addressed to Selma A. Gomes, selma@ioc.fiocruz.br

Received 22 November 2010; Accepted 4 January 2011

Academic Editor: William Irving

Copyright © 2011 Francisco C. A. Mello et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Small hepatitis B virus surface protein (S-HBsAg) variant Y100C has been associated with HBsAg-negative phenotype. To determine whether Y100C substitution yields impaired HBsAg or small amounts of HBsAg that may reduce HBsAg detection by commercial anti-HBsAg antibodies, two eukaryotic expression plasmids, one containing a wild-type S and the other an S gene from a Y100C variant, were constructed and their levels of HBsAg compared by ELISA after transfection of Huh7 cells. Unexpectedly, the extracellular HBsAg levels detected with Y100C plasmid were higher than those observed with the wild-type plasmid, but without statistical significance. We concluded that the Y100C substitution alone did not play a role in reducing HBsAg amounts or HBsAg affinity by commercial ELISA assay. Further studies on *in vitro* replication fitness with the complete genome of HBV isolates displaying or not Y100C substitution may elucidate whether this mutation affects HBV replication and consequently HBsAg production.

1. Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infection still constitutes a major problem of public health since 360 million people worldwide are chronically infected [1] and exposed to a progressive disease that may lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [2]. HBV surface antigen (HBsAg) is the established serological marker for the diagnosis of acute or chronic HBV infection, and the absence of HBsAg in serum has been used as a surrogate marker for the absence of DNA and active viral replication. However, in the last decade, the development of highly sensitive molecular biology techniques allowed the detection of low levels of HBV DNA in serum samples and/or liver of individuals negative for HBsAg [3, 4]. This peculiar form of chronic viral infection has been termed occult HBV infection [5–7].

Different mechanisms may be responsible for the absence of HBsAg in occult infection, which includes (i) low rate of HBV replication due to host's immune response or coinfection with other infectious agents [8–10], (ii) association of HBsAg to anti-HBs resulting in the formation of immune complexes that reduce the circulation of free antigen [5],

or (iii) mutations that inhibit HBsAg expression [11] or change HBsAg antigenicity, thus preventing detection by commercial assays [6, 12–16].

Tyrosine (Y) to cysteine (C) substitution in HBsAg residue 100 (Y100C) has been associated with HBsAg-negative phenotype in blood donors from Venezuela [17] and Spain [18], and is frequently found in cases of occult HBV infection in Brazil [12, 19, 20]. Additionally, this substitution has also been described in one Argentinean patient exhibiting cocirculation of HBsAg and anti-HBs antibodies [21].

In this study, the role of Y100C substitution in reducing amount of HBsAg or changing HBsAg affinity by commercial antibodies was investigated by comparison of HBsAg levels obtained from recombinant plasmids with or without Y100C substitution.

2. Materials and Methods

2.1. Construction of HBsAg Expression Plasmids. Two different HBV isolates previously characterized in our laboratory as belonging to HBV subgenotype A1 were used for plasmid

constructions. One isolate had deduced amino acid sequence for small S gene that was identical to a consensus sequence of wild-type HBV subgenotype A1. Consensus was originated from an alignment of 100 HBV complete genome sequences from HBV subgenotype A1 available in GenBank. The other has a unique Y100C variation in its amino acid sequence. These two viral strains were used to construct two recombinant expression plasmids under CMV promoter, representing a wild-type and a Y100C variant of HBV S gene (named pcDNA3-SA1 and pcDNA3-Y100C, resp.). Briefly, HBV DNAs were phenol/chloroform extracted from 250 μ L of serum as previously described [22]. The region coding for S-HBsAg was amplified by seminested PCR assay. The first round of amplification was performed with PS1 and S2 primers and the second round of amplification with S1 and S2 primers, as previously described [12]. S gene PCR products were cloned into the pCR4 cloning vector (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen, San Diego, CA) and subcloned into the EcoRI polylinker region of the mammalian cell expression vector pcDNA3 (Invitrogen) as previously described [12]. S-HBsAg expression plasmids were purified using S.N.A.P. Midiprep kit (Invitrogen). HBV nucleotide sequences were determined using BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, CA, USA). Sequencing reactions were analyzed on an ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems). Bioinformatics analysis of the sequences was performed using MEGA version 3.1 software [23]. Wild-type and Y100C variant sequences determined have been deposited in the GenBank database, accession numbers HQ840709 and EF690524, respectively.

2.2. Cell Culture and Transfection Assays. Transient transfection assays were performed using human hepatoma HuH7 cells maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were plated at a density of 5×10^5 cells per well of 6-well plates and transfected with 2 μ g of HBsAg expressing plasmid using FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Three independent transfection assays were performed using three different plasmid preparations of each construct. Culture supernatants were collected on day 5 after transfection and clarified by centrifugation at 1,500 g for 5 min. To evaluate HBsAg levels inside cells, cell monolayers were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), scraped with 1 mL of PBS and centrifuged at 2,500 g for 5 min. Cell pellets were frozen/thawed three times and resuspended in 0.4 mL of PBS. Medium and cell extracts were tested for the presence of HBsAg by a commercial immunoassay (BioELISA HBsAg colour, Biokit, Barcelona, Spain) after a serial dilution of 10 times in the medium. Mock-transfected HuH7 cells were used as negative control. HBsAg were quantified using an international panel of reference sera containing different concentrations of HBsAg (Boston Biomedica Inc, USA). HBsAg concentrations of the panel are expressed in ng/mL and in international units (IU). The detection limit of the assay is about 0.25 ng/mL corresponding to 0.05 IU. HBsAg levels produced by both plasmids were compared using

Mann-Whitney U test with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, IL, USA), version 17.0. Significance was set at a *P* value of less than .05.

3. Results

Nucleotide sequencing of HBV S gene inserted in recombinant expression plasmids pcDNA3-SA1 and pcDNA3-Y100C had confirmed the high similarity between both sequences. A total of four nucleotide mismatches (T36G, A299G, T432C, and C666T) between pcDNA3-Y100C and pcDNA3-SA1 was found along the 681-bp fragment of S gene (not shown). The A299G is the only nonsynonymous substitution changing amino acid Y to C in HBsAg residue 100 of small S protein (Figure 1).

HBsAg levels of medium and cells extracts of pcDNA3-SA1 and pcDNA3-Y100C constructs, tested in three independent transfection assays, were shown in Figure 2. HBsAg levels detected in medium of transfected cells with pcDNA3-SA1 ranged from 700 to 800 ng/mL (mean and median values of 740 ng/mL, (corresponding to 144 IU) and 720 ng/mL (143 IU), resp.), while variation in pcDNA3-Y100C construct ranged from 790 to 1200 ng/mL (mean and median values of 1,013 ng/mL (230 IU) and 1,050 ng/mL (250 IU), resp.). The difference between the amount of HBsAg produced by pcDNA3-SA1 and pcDNA3-Y100C was not significant (*P* = .13). Overall, the mean values of extracellular HBsAg of pcDNA3-Y100C plasmid were 1.5-fold higher than those observed when the wild-type plasmid was transfected. Values of HBsAg detected in cell extracts were much lower than those in medium with both plasmids (pcDNA3-SA1 and pcDNA3-Y100C), indicating that S-HBsAg was secreted well in both cases. HBsAg levels detected in extracellular medium were about 27-fold and 15-fold higher than that of cells extracts with pcDNA3-SA1 and pcDNA3-Y100C plasmids, respectively.

4. Discussion

Occult hepatitis B infection has been the subject of several studies due to different clinical contexts associated with it such as the transmission of HBV in blood transfusion and organ transplantation, virological and clinical reactivation, negative influence on the clinical outcome of other chronic liver diseases, and development of hepatocellular carcinoma [6]. The Y100C variation of the small S protein has been frequently detected in the absence of HBsAg and has been statistically associated with occult infection in studies conducted in Venezuela [17] and in Brazil [12, 19, 20]. A variety of explanations for persistence of HBV DNA in HBsAg-negative individuals have been proposed, including the occurrence of amino acid substitutions in the HBsAg. Several HBsAg variants with reduced reactivity against anti-HBs antibodies have been characterized, most of them with specific mutations in the a determinant of HBsAg [24–28]. Viruses with G145R replacement have been almost invariably isolated as a major escape mutant after HBV vaccination [16, 25, 27, 29]. Besides mutations leading to reduced

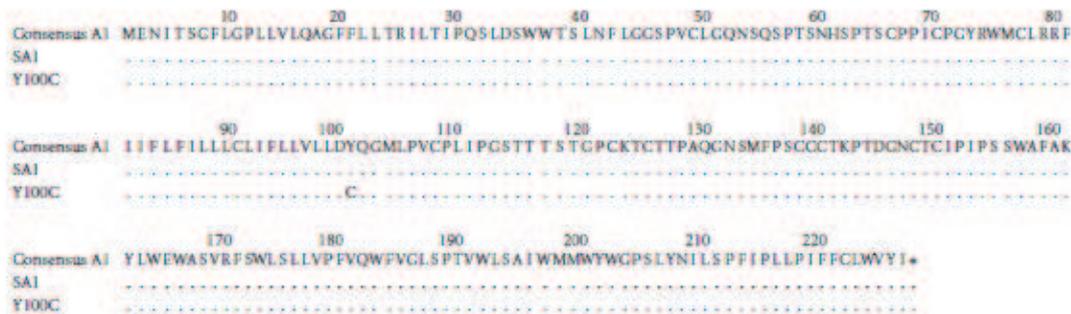


FIGURE 1: Comparison of HBsAg sequences, deduced from recombinant plasmids representing a wild-type (pcDNA3-SA1) and a mutated (pcDNA3-Y100C) HBV with a consensus sequence of HBV subgenotype A1. Consensus was originated from an alignment of 100 HBV complete genome sequences from HBV subgenotype A1 available in GenBank.

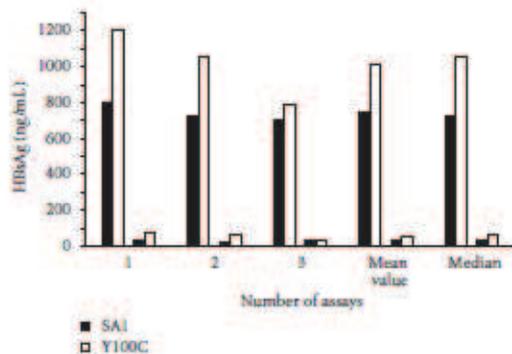


FIGURE 2: Detection of extracellular (upper columns) and intracellular (lower columns) levels of HBsAg by ELISA after transfection of Huh7 cells. Black columns: SA1; white columns: Y100C variant. 1, 2, 3: HBsAg levels obtained in each transfection assay.

reactivity against anti-HBs antibodies, some mutations may cause intracellular retention of HBsAg and might play roles in the several types of situations in which HBV DNA is detected in the absence of HBsAg [13, 30, 31]. In the present study, we evaluated if Y100C substitution alone may influence the secretion pattern of HBsAg and/or may modify reactivity against commercial antibodies. Previous studies have shown that the presence of charged or polar amino acids in a transmembrane (TM) segment had a crucial role in endoplasmic reticulum (ER) retention [32, 33]. In the case of Y100C variant, the replacement by a more polar amino acid at the end of TM2 segment (position 100) and the presence of a free sulfhydryl group in the amino acid C which increases its reactivity allowing the link to other molecules of C could have altered the conformation of HBsAg, affecting detection due to impaired recognition of epitopes and/or secretion due to defective insertion into the ER membrane and intracellular retention. However, HBsAg levels produced *in vitro* by Y100C variant were slightly higher (about 1.5-fold) than the levels produced by wild-type strain.

Our findings indicated that Y100C mutation, which is potentially capable of altering protein conformation, reduce neither the production nor secretion of HBsAg.

5. Conclusions

Since previous studies have described that Y100C variation of the small S protein was frequently detected in the absence of HBsAg and was statistically associated with occult infection, the potential influence of this substitution in the occurrence of this peculiar type of chronic hepatitis B was investigated here. Our findings indicated that Y100C substitution alone did not negatively affect the detection and/or secretion of HBsAg. Further studies analyzing the complete genome of HBV strains with the Y100C substitution may elucidate whether this mutation affects HBV replication or if there are mutations in other HBV genomic region that could explain the association of these variants with occult hepatitis B infection.

Acknowledgments

The authors thank the Plataforma Genómica—Secuenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ for performing the DNA sequencing. This work was supported by a grant from Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales (ANRS) programme 12149.

References

- [1] C. W. Shepard, E. P. Simard, L. Finelli, A. E. Fiore, and B. P. Bell, "Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination," *Epidemiologic Reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 112–125, 2006.
- [2] V. Carreno, J. Bartolomé, I. Castillo, and J. A. Quiroga, "Occult hepatitis B virus and hepatitis C virus infections," *Reviews in Medical Virology*, vol. 18, no. 3, pp. 139–157, 2008.
- [3] S. A. Gomes, C. F. T. Yoshida, and C. Niel, "Detection of hepatitis B virus DNA in hepatitis B surface antigen-negative serum by polymerase chain reaction: evaluation of different

- primer pairs and conditions," *Acta Virologica*, vol. 40, no. 3, pp. 133–138, 1996.
- [4] D. Jeantet, I. Chemin, B. Mandrand, F. Zoulim, C. Trepo, and A. Kay, "Characterization of two hepatitis B virus populations isolated from a hepatitis B surface antigen-negative patient," *Hepatology*, vol. 35, no. 5, pp. 1215–1224, 2002.
 - [5] K. Q. Hu, "Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications," *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 9, no. 4, pp. 243–257, 2002.
 - [6] G. Raimondo, T. Pollicino, I. Cacciola, and G. Squadrito, "Occult hepatitis B virus infection," *Journal of Hepatology*, vol. 46, no. 1, pp. 160–170, 2007.
 - [7] M. Torbenson and D. L. Thomas, "Occult hepatitis B," *Lancet Infectious Diseases*, vol. 2, no. 8, pp. 479–486, 2002.
 - [8] S. Y. Chen, C. F. Kao, C. M. Chen et al., "Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 1, pp. 591–607, 2003.
 - [9] F. B. Hollinger and G. Sood, "Occult hepatitis B virus infection: a covert operation," *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 17, no. 1, pp. 1–15, 2010.
 - [10] C. G. Schüttler, N. Fiedler, K. Schmidt, R. Repp, W. H. Gerlich, and S. Schaefer, "Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein," *Journal of Hepatology*, vol. 37, no. 6, pp. 855–862, 2002.
 - [11] V. Chaudhuri, R. Tayal, B. Nayak, S. K. Acharya, and S. K. Panda, "Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter," *Gastroenterology*, vol. 127, no. 5, pp. 1356–1371, 2004.
 - [12] N. M. Araujo, M. Branco-Vieira, A. C. M. Silva et al., "Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients: evaluation of biochemical, virological and molecular parameters," *Hepatology Research*, vol. 38, no. 12, pp. 1194–1203, 2008.
 - [13] D. Jeantet, I. Chemin, B. Mandrand et al., "Cloning and expression of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays," *Journal of Medical Virology*, vol. 73, no. 4, pp. 508–515, 2004.
 - [14] C. Kreutz, "Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 6, no. 1, pp. 113–143, 2002.
 - [15] K. M. Weinberger, T. Baur, S. Böhm, and W. Jilg, "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," *Journal of General Virology*, vol. 81, no. 5, pp. 1165–1174, 2000.
 - [16] K. Yamamoto, M. Horikita, F. Tsuda et al., "Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen," *Journal of Virology*, vol. 68, no. 4, pp. 2671–2676, 1994.
 - [17] C. Gutiérrez, M. Devesa, C. L. Loureiro, G. León, F. Liprandi, and E. H. Pujol, "Molecular and serological evaluation of surface antigen negative hepatitis B virus infection in blood donors from Venezuela," *Journal of Medical Virology*, vol. 73, no. 2, pp. 200–207, 2004.
 - [18] H. L. Zaaier, P. Torres, A. Ontanón et al., "Multiple surface antigen mutations in five blood donors with occult hepatitis B virus infection," *Journal of Medical Virology*, vol. 80, no. 8, pp. 1344–1349, 2008.
 - [19] J. S. Motta, F. C. Mello, B. V. Lago, R. M. Perez, S. A. Gomes, and E. F. Figueiredo, "Occult hepatitis B virus infection and lamivudine-resistant mutations in isolates from renal patients undergoing hemodialysis," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 25, no. 1, pp. 101–106, 2010.
 - [20] A. R. C. Motta-Castro, R. M. B. Martins, N. M. Aratijo et al., "Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community," *Archives of Virology*, vol. 153, no. 12, pp. 2197–2205, 2008.
 - [21] M. L. Cuestas, C. W. Rivero, M. L. Minassian et al., "Naturally occurring hepatitis B virus (HBV) variants with primary resistance to antiviral therapy and S-mutants with potential primary resistance to adefovir in Argentina," *Antiviral Research*, vol. 87, no. 1, pp. 74–77, 2010.
 - [22] C. Niel, M. T. B. Meraes, A. M. C. Gaspar, R. F. T. Yoshida, and S. A. Gomes, "Genetic diversity of hepatitis B virus strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil," *Journal of Medical Virology*, vol. 44, no. 2, pp. 180–186, 1994.
 - [23] S. Kumar, K. Tamura, and M. Nei, "MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers," *Computer Applications in the Biosciences*, vol. 10, no. 2, pp. 189–191, 1994.
 - [24] P. F. Coleman, Y. C. J. Chen, and I. K. Mushahwar, "Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants," *Journal of Medical Virology*, vol. 59, no. 1, pp. 19–24, 1999.
 - [25] M. P. Cooreman, M. H. Van Roosmalen, R. Te Morsche et al., "Characterization of the reactivity pattern of murine monoclonal antibodies against wild-type hepatitis B surface antigen to G145R and other naturally occurring 'a' loop escape mutations," *Hepatology*, vol. 30, no. 5, pp. 1287–1292, 1999.
 - [26] J. H. Ireland, B. O'Donnell, A. A. Basuni et al., "Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays," *Hepatology*, vol. 31, no. 5, pp. 1176–1182, 2000.
 - [27] C. Jolivet-Reynaud, M. Lserchal, B. O'Donnell et al., "Localization of hepatitis B surface antigen epitopes present on variants and specifically recognised by anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibodies," *Journal of Medical Virology*, vol. 65, no. 2, pp. 241–249, 2001.
 - [28] A. I. Zuckerman and J. N. Zuckerman, "Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutants," *Journal of Medical Virology*, vol. 58, no. 3, pp. 193–195, 1999.
 - [29] W. F. Carman, J. Korula, L. Wallace, R. MacPhee, L. Mimms, and R. Decker, "Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA," *Lancet*, vol. 345, no. 8962, pp. 1406–1407, 1995.
 - [30] I. Chemin, D. Jeantet, A. Kay, and C. Trépo, "Role of silent hepatitis B virus in chronic hepatitis B surface antigen(-) liver disease," *Antiviral Research*, vol. 52, no. 2, pp. 117–123, 2001.
 - [31] S. Sengupta, S. Rehman, H. Durgapal, S. K. Acharya, and S. K. Panda, "Role of surface promoter mutations in hepatitis B surface antigen production and secretion in occult hepatitis B virus infection," *Journal of Medical Virology*, vol. 79, no. 3, pp. 220–228, 2007.
 - [32] J. S. Bonifacino, P. Cosson, N. Shah, and R. D. Klausner, "Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum," *EMBO Journal*, vol. 10, no. 10, pp. 2783–2794, 1991.
 - [33] K. Sato, M. Sato, and A. Nakano, "Ret1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 14, no. 9, pp. 3605–3616, 2003.

Discussion

Dans le système d'étude *in vitro* utilisé, l'expression de la petite protéine de surface est placée sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur exogène fort. Il n'existe pas de méthode 'type' pour étudier l'antigénicité de l'AgHBs *in vitro*. Dans la plupart des cas, comme dans le nôtre le gène S est placé sous le contrôle d'un promoteur exogène fort (type promoteur CMV) auquel est ajouté un signal de polyadénylation type SV40 qui augmente la stabilité des ARN. De nombreuses études sur l'AgHBs utilisent différents plasmides d'expression eucaryotes pCI (Jeantet, Chemin et al. 2004), pJI (Ireland, O'Donnell et al. 2000). Par ailleurs, la présence d'un intron dans la construction plasmidique est recommandée car cela permet un meilleur export du transcrit hors du noyau. La construction plasmidique que nous avons utilisée avait pour but de produire de grandes quantités de protéines S sauvage et mutée. Cependant notre construction ne possède pas d'intron. Des données personnelles ont par la suite montré que l'expression de l'AgHBs était largement améliorée dans la construction plasmidique pCI-HBs tel qu'il est utilisé dans le travail de Jeantet et al. L'utilisation du plasmide pcDNA3-HBs n'est pas fréquente pour étudier l'antigénicité de l'AgHBs et à ce jour n'a pas été utilisé par d'autres équipes. Des constructions plasmidiques similaires ont été utilisées pour étudier l'impact de l'immunisation par vaccin à ADN nu dans des modèles animaux de souris et de canard (Michel, Davis et al. 1995; Triyatni, Jilbert et al. 1998). Cependant, les constructions plasmidiques n'étaient pas totalement identiques car les séquences PrÉS étaient ajoutées à la séquence S. Le choix de cette construction plasmidique reposait alors sur la capacité du plasmide à exprimer de manière forte et spécifique la protéine PrÉS2/S pour obtenir après immunisation une réponse humorale spécifique.

Dans notre modèle d'étude qui est très artificiel, nous avons montré que la substitution sY100C n'affectait pas la reconnaissance de l'AgHBs par un test de détection enzymatique. On ne peut pas exclure que la mutation sY100C n'ait pas un impact sur l'antigénicité de l'AgHBs dans un contexte de génome entier. Même si lors des 3 transfections la quantité d'AgHBs produites par les 2 plasmides n'est pas significativement différente, il aurait été intéressant de réaliser un contrôle en northern blot des transcrits du gène S. Ceci nous aurait permis de contrôler avec précision l'efficacité de transfection pour chacune des constructions plasmidiques dans chacune des expériences réalisées.

La structure tertiaire de l'AgHBs n'est pas connue avec certitude. La position 100 de la protéine S se trouve très probablement à la base externe du second domaine transmembranaire. La substitution d'une Tyrosine en Cystéine modifie la séquence protéique en remplaçant un acide aminé polaire hydrophile formé d'un noyau aromatique en acide aminé chargé formé d'un groupement sulfhydryle. Les résidus Cystéines sont potentiellement importants pour la structure des protéines. Les liaisons disulfures stabilisent la conformation tridimensionnelle de la protéine et permettent aussi de créer des liaisons intermoléculaires. On sait que dans le cas de l'AgHBs ces résidus jouent un rôle majeur dans la structure tridimensionnelle, dans l'immunogénicité et dans les phénomènes d'interactions avec la cellule hôte lors des étapes d'entrée (infectiosité) (Carman, Owsianka et al. 1999). Même si dans notre expérience nous n'observons pas d'effet de la mutation, on ne peut pas exclure qu'*in vivo* ou dans un

modèle d'étude où ce sont des génomes entiers qui sont transfectés, l'introduction d'un résidu cystéine supplémentaire ne vient pas perturber l'équilibre des ponts disulfures des protéines de surface S, PréS1 et/ou PréS2. On peut supposer aussi que des nouveaux ponts disulfures intermoléculaires puissent être créés entre ces protéines. Par chevauchement des gènes, la substitution impliquée dans la mutation Y100C est responsable d'une mutation silencieuse à la position 108 du domaine rt de la polymérase virale, ce qui *a priori* n'affecte pas la réplication virale.

L'analyse des séquences de HBV présentes dans GenBank montre clairement que la mutation Y100C est trouvée principalement chez des isolats de génotypes A et dans une moindre mesure chez des isolats de génotype C. Les souches de génotype A sont principalement d'origine Africaine ce qui peut expliquer que l'on retrouve cette mutation dans une communauté Afro-brésilienne (Motta-Castro, Martins et al. 2008). Dans la banque de données GenBank les isolats contenant cette mutation sont associés à des phénotypes particuliers où l'AgHBs échappe aux tests de détection mais aussi aux anticorps. Bien que nous n'ayons pas observé d'effet de la mutation Y100C sur la reconnaissance de l'AgHBs par un test enzymatique, on ne peut pas exclure un effet de la mutation sur la protéine S dans un contexte plus proche de la réalité.

Etude 3

Probable corticosteroid-induced reactivation of a latent HBV infection in an HIV-positive patient involving immune-escape.

Dans cette étude nous présentons un cas de réactivation atypique de HBV en coinfection avec le HIV. La réactivation virale s'est faite suite à un traitement aux corticostéroïdes et ce malgré la présence des anticorps anti-HBs. Notre travail s'est focalisé sur l'étude des propriétés antigéniques de la souche HBV isolée et sur la qualité de la réponse anti-HBs du patient. Nos objectifs ont été de comprendre pourquoi cette réactivation virale avait eu lieu et comment l'échappement aux anticorps était possible.

Introduction

Le patient qui fait l'objet de cette étude est suivi pour une infection au HIV et est au stade SIDA depuis 1995 (figure 31, tableau 18). Il était considéré comme guéri pour l'infection au HBV grâce à la présence des anticorps anti-HBs et anti-HBc. Suite à un traitement aux glucocorticostéroïdes une infection au HBV a réactivée et ce malgré la présence des anticorps anti-HBs (>400 UI/L) présent en quantité considérée comme protectrice (Jack, Hall et al. 1999).

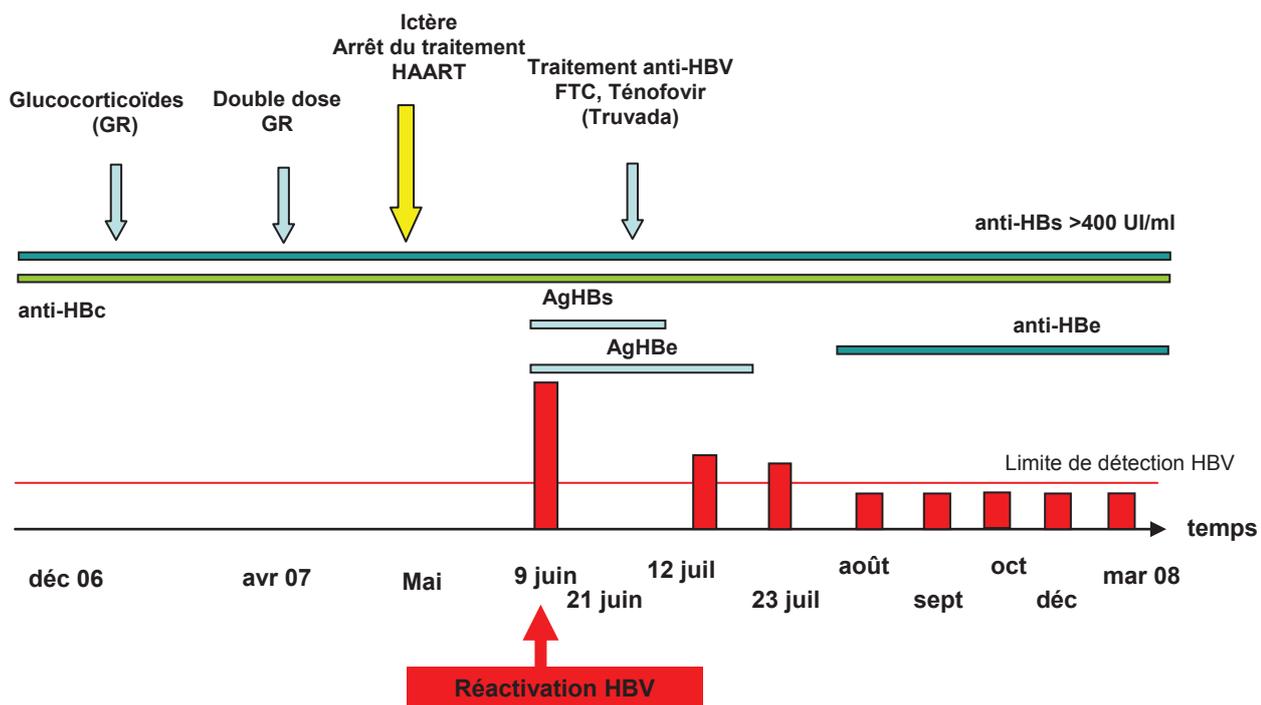


Figure 31: Résumé sérologique du patient P

Le patient HIV (+) positif pour les anticorps anti-HBs et anti-HBc était considéré comme guéri pour son infection au HBV. Une infection latente au HBV a réactivé suite à un traitement aux glucocorticoïdes (GR), le traitement antirétroviral (HAART) a été arrêté de peur d'aggraver l'atteinte hépatique. La résolution de l'infection au HBV avec une diminution rapide de la charge virale a été obtenue grâce à l'utilisation de molécules efficace contre le HBV (FTC : emtricitabine et du ténofovir). En 2 mois la charge virale était indétectable. La limite de détection de la charge virale HBV est indiquée et correspond à une virémie inférieure à 100 copies/ml La séroconversion anti-HBe signe probablement la résolution de l'infection au HBV. Les données sérologiques sont indiquées: anticorps anti-HBs: anti-HBs; anticorps anti-HBc: anti-HBc, anticorps anti-HBe: anti-HBe, ainsi que les antigènes viraux antigène HBs: AgHBs, antigène HBe: AgHBe. Le temps est donné à titre indicatif

Tableau 18: Suivi virologique et biochimique du patient P.

Date	α -HBs (IU/L ⁻¹) (1)	ADN HBV copies/ml (6)	HBsAg (2)	α -HBc (3)	HBeAg (5)	α -HBe (4)	HIV1 copies/ml (7)	CD4+ cellule s/mm ³	ASAT (IU/L ⁻¹)	ALAT (IU/L ⁻¹)	Traitement
1995 (SIDA)	+	ND	ND	+		ND	+	< 50	ND	ND	HAART ψ
Mars 2006	197	-	-	+	ND	-	+	ND	20	14	HAART ψ
Dec 2006	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	HAART ψ Fluticasone Triacinolone
Avr 2007	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	150	ND	ND	HAART 2X: Fluticasone Triacinolone
Mai 2007	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Jaunisse
Juin 2007	+	4.393.391	+	+	+	-	5.3x10 ⁵	332	1964	2094	HAART*
Juil 2007	120	319	-		+	+	1392	408	57	61	HAART*
Août 2007	606	< 70	-		-	+	263	344			HAART*
Sept 2007	841	< 100	-	+	ND	+	140	< 100	ND	ND	HAART*

ND : Non Déterminé

Les outils utilisés pour les tests sérologiques sont exprimés en unité internationale, les techniques utilisées pour réaliser les tests sérologiques sont indiquées; 1 : Bayer Centaur; 2 Biorad Monolisa HBsAg; 3: Biorad Monolisa anti-HBc plus; 4 : Modular E170 anti-HBe- Roche, 5: réaction immunoenzymatique technique ABBOTT AxSYM; 6: Siemens VERSANT HBV 3.0; 7: Cobas-AmpliPrep et Cobas Taqman HIV-1 Test Roche Diagnostic. Les traitements HAART (Highly active anti-retroviral treatment) avant et après la réactivation sont indiqués. ψ : Traitement HAART avant la réactivation : Saquinavir, Lopinavir-Ritonavir and Abacavir; * Traitement HAART après la réactivation: Lopinavir-Norvir, Truvada (Ténofovir + Emtricitabine), Enfuvirtide.

Article 2

Cet article a été accepté comme Brief Report, le 9 décembre 2011 dans Journal of Infectious Disease.

Probable corticosteroid-induced reactivation of a latent HBV infection in an HIV-positive patient involving immune-escape

Nora Martel^{1,5}, Laurent Cotte^{1,2}, Mary-Anne Trabaud³, Christian Trepo^{1,4}, Fabien Zoulim^{1,4}, Selma A. Gomes⁵, Alan Kay¹

¹Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL); INSERM, U1052; CNRS, UMR 5286; UCBL1, S_1052, 69003 Lyon, France

²Infectious Diseases Unit, Hôpital de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France

³Virology Laboratory, Hôpital de la Croix Rousse, 69004 Lyon, France

⁴Hepato-Gastroenterology Unit, Hôpital de la Croix Rousse, 69004 Lyon, France

⁵Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author: Alan Kay. Fax: (33) (0)4 72 68 19 71; Tel: (33) (0)4 72 68 19 82; e-mail: alan.kay@inserm.fr

Running head: Latent HBV reactivation

Word count:

Abstract – 99

Text – 1945

Footnote Page

- 1) Conflict of interest: none of the authors has a commercial or other conflict of interest related to the study reported in this paper.
- 2) Financial support: Agence National de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS) [Grant N° 12149]; ANRS training grant to N.M; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France)-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Brazil) collaborative program; Région Rhône-Alpes student exchange program (ExploRA'Doc); and Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL1) co-thesis programme.
- 3) Part of this work was presented at the 9th Annual ANRS Meeting on Viral Hepatitis, Paris, 22-23 January 2009 and at the 20th Brazilian Society of Virology Meeting, Brasilia, 1-4 November 2009.
- 4) Corresponding Author: Alan Kay, INSERM U1052, 151 cours Albert Thomas, 69424 Lyon CEDEX 03, France. Tel: (33) (0)4 72 68 19 82; Fax: (33) (0)4 72 68 19 71; e-mail: alan.kay@inserm.fr
- 5) Alternate Corresponding Author: Laurent Cotte, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital de la Croix-Rousse, 103 Grande-Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France. Tel : (33) (0)4 26 73 26 56; Fax : (33) (0)4 72 07 17 50; e-mail: laurent.cotte@chu-lyon.fr

Abstract

We describe a patient infected with human immunodeficiency virus who possessed a serological profile suggesting a previous cleared acute hepatitis B virus (HBV) infection, including high levels of anti-HBs. Following the administration of inhaled glucocorticosteroids combined with protease-inhibitor based antiretroviral treatment, the patient developed an unexpected severe acute hepatitis despite persistence of anti-HBs. A genotype A2 strain emerges with two major mutations in the S gene, sK122R and sD144E. Molecular and biological analyses strongly suggested reactivation of a latent HBV infection. The importance and the molecular basis of these two epitopes in immune-escape mechanisms and host-virus interactions are discussed.

Key words: Latent HBV infection, Glucocorticosteroid treatment, Immune escape mutant, HBV-HIV coinfection.

Introduction

Glucocorticosteroid treatment can activate chronic Hepatitis B Virus (HBV) infections (CHB) (Sagnelli, Manzillo et al. 1980; Nowicki, Tong et al. 1984), and a glucocorticosteroid response element (GRE) stimulating replication has been identified (Tur-Kaspa, Shaul et al. 1988). Also, pharmacokinetic interactions with antiretroviral protease inhibitors that inhibit CYP3A can potentiate glucocorticosteroid effects (Josephson 2010). We describe a case of reactivation of a latent HBV infection in an HIV co-infected patient after glucocorticosteroid treatment for an opportunistic infection. The patient's HBV serological profile included high levels of anti-HBs and falsely suggested that in the past he had cleared acute HBV infection. We show the molecular basis for this immune-escape and describe the probable series of events that lead to this situation.

Methods.

A 57 year-old HIV-infected patient was hospitalized in 2007 for severe jaundice. HIV infection was diagnosed in 1995, and his medical history revealed episodes of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, Kaposi's sarcoma and intestinal microsporidiosis. The patient was repeatedly anti-HBc+, anti-HBs+, HBeAg and HBsAg-negative and HBV DNA-negative by tests available at that time. It was thought that he had cleared a prior HBV infection, although in 2006 he tested anti-HBe negative. At hospitalization, the patient had been receiving boosted-Lopinavir/Saquinavir/Abacavir for 3 years but was considered to be in therapeutic failure through poor compliance. He reported chronic use of inhaled fluticasone/salmeterol/triamcinolone for obstructive pulmonary disease in the previous 6 months. No steroid dosage was available. CD4 cell counts were 332/mm³ and HIV viral load was 5.6x10⁵ copies/ml. Serum aminotransferases were >50 upper limit normal. Anti-HBc and high levels of anti-HBs (433 IU/L) were detected in serum as well as HBeAg, HBsAg and high HBV viral loads (>10⁶ copies/ml). There was no evidence of hepatitis C, D or E infection, nor evidence of other causes of hepatic cytolysis. The diagnosis retained was presumed glucocorticoid-induced HBV reactivation secondary to Ritonavir-Fluticasone drug interactions. An antiretroviral treatment consisting of boosted-lopinavir/tenofovir/emtricitabine/enfuvirtide was started, leading to normalisation of transaminases in 4 weeks. HBV-DNA became undetectable (<70 copies/ml) at week 6, HBeAg became negative and the patient seroconverted to anti-HBe at week 8. The HIV infection is now controlled with viral load <50 copies/ml and CD4+ counts near 200/mm³. Informed consent was obtained from the patient.

HBV DNA was isolated from the only highly viremic serum available and first amplified by Rolling-Circle Amplification (RCA) (Margeridon, Carrouee-Durantel et al. 2008). Briefly, completion/ligation of HBV RC-DNA was performed with a mixture of T4 DNA ligase/polymerase. RCA used Phi29 DNA polymerase and 8 HBV-specific primers for 20 hr at 30°C, followed by a genomic-PCR using HBV-specific primers containing Sap1 sites (Gunther, Li et al. 1995). Products were cloned into a vector modified to accommodate Sap1 digested HBV genomes. Several clones were sequenced in the S-gene, and 2 clones (P5.9, P2.2.11) were selected for full-length genome sequencing (Accession Numbers:

HE576988, HE576989). For each clone, the S gene (position 155-835) was cloned into the expression vector pCI (Promega).

To test functional capacities of the cloned genomes, HuH7 cells were transiently transfected as described previously (Jeantet, Chemin et al. 2002). Extra- and intra-intracellular nucleic acids were extracted and HBV DNA, RNA and HBsAg levels were measured. HBsAg secretion was measured using MonoLisa HBsAg Ultra (BioRad). A standard curve of quantified HBsAg was run in parallel.

To test what the patient's serum could recognize, site-directed mutagenesis was used to introduce or eliminate mutations in an S-gene derived from clone P5.9 cloned in pCI (Margeridon, Lachaux et al. 2005). The pCI-S gene constructions were transfected into HuH7 cells, ³⁵S-labeled and HBsAg was immunoprecipitated (Margeridon, Lachaux et al. 2005).

Results

Initial testing using line-probe assays (InnoGenetics) indicated that the HBV genome was genotype A without lamivudine-resistance mutations.

Full-length HBV genomes were amplified and products were directly sequenced in the S-gene. Phylogenetic analysis showed that the genome was sub-genotype A2, confirming preliminary line-probe assays. By comparison of the amino acid sequence of HBsAg of patient P with HBsAg sequences of A2 isolates, there were 4 potential substitutions in or near the HBsAg "a" determinant: sK122R, sT143P, sD144E and sS154L. From direct sequencing signals, one could assume that substitutions sK122R and sD144E are expressed by most HBV genomes while substitutions sT143P and sS154L would arise from only some genomes. Full-length genomes were cloned and 6 clones were sequenced in the S gene. All clones contained sK122R/sD144E, but no clone encoded sT143P. Two clones were selected, P5.9 encoding sK122R/sD144E and P2.2.11 encoding sK122R/sD144E/sS154L, and were fully sequenced. Protein sequence differences were deduced from nucleotide sequences of the clones and a consensus subtype A2 sequence (Figure 1A). Clones P5.9 and P2.2.11 differ from the consensus nucleotide sequence at 13 (0.4%) and 15 (0.47%) positions respectively and between themselves at 8 (0.25%) positions. There are no insertions/deletions, precore or core-promoter mutations, mutations known to be associated with resistance to antiviral drugs and the GRE is intact.

Functional capacities of the genomes were compared to wild-type genomes of genotype D (15803) and subgenotype A2 (LB1CI5) that were previously characterized (Jeantet, Chemin et al. 2002; Margeridon, Carrouee-Durantel et al. 2008). Both clones were replication competent and secreted HBV DNA (not shown). However, Northern blotting showed that P5.9 expressed much higher levels of S-mRNA than wild-type genomes while clone P2.2.11 underexpressed S-mRNA (Figure 1B). This was confirmed by measuring secreted HBsAg levels (Figure 1C). There are no obvious reasons for overexpression of S-mRNA by P5.9. Compared to the sequence of LB1CI5, P5.9 contains no mutations altering known transcription-factor binding sites in the PreS1 or PreS2/S promoters. Concerning underexpression by P2.2.11, Hass et al have described a similar phenotype, also in a clone isolated during occult HBV reactivation in an HIV-positive patient (Hass, Hannoun et al. 2005). Their explanation is a G/A mutation at position 458 that through long-range effects inhibits nucleus-to-cytoplasm export of

PreS2/S transcripts. P2.2.11 has an A/G mutation at position 457 that may play a similar role. Both S genes were cloned into pCI vectors under the control of a CMV promoter and transfected. In this context, high overexpression or underexpression of S-mRNA (Figure 1D) or HBsAg secretion (Figure 1E) were not observed.

To analyze what the patient's serum could recognize, we introduced or eliminated by site-directed mutagenesis mutations at position 122, 144 and 154 (Figure 2A), using pCI-HBs5.9 as backbone. The different constructions as well as a control pCI-HBsWT (genotype D, serotype *ayw*) were transfected, ³⁵S-labeled and immunoprecipitated. The patient's serum easily recognizes HBsAg with s122K, the normal residue for genotype A (Figure 2B). However, the single introduction of s122R markedly reduced immunoprecipitation with the patient's serum, especially in the context of the pCI-HBs5.9 backbone. The single introduction of s144E severely reduced immunoprecipitation and the double mutation s122R/s144E completely abolished recognition of HBsAg by the patient's serum (Figure 2C).

Discussion

Two questions arise from this sudden reactivation of a latent HBV infection: why did the infection reactivate after years of latency and how did the reactivation occur despite high-titer anti-HBs, far higher than that considered protective?

The answer to the first question probably lies, at least partially, with the glucocorticosteroid treatment. It is known that such treatments can activate CHB with increased viral replication (Sagnelli, Manzillo et al. 1980; Nowicki, Tong et al. 1984) and deleterious effects on morbidity and mortality (Lam, Lai et al. 1981). Concomitant treatment with antiretroviral protease inhibitors can lead to systemic corticosteroid effects (Josephson 2010).

The answer to the second question obviously involves mutation of HBsAg, especially in or near the immunodominant "a" determinant. Four potential mutations were initially identified: sK122R, sT143P, sD144E and sS154L.

By itself, the presence of Arg at position s122 is not surprising because the nature of this residue defines the *d/y* sub-serotypes, *d* when it is Lys and *y* when it is Arg. However, R¹²² is very rare in subgenotypes A1 and A2 (Henke-Gendo, Amini-Bavil-Olyaei et al. 2008), although it is found in some newer A subgenotypes. Of 236 complete HBV genomes from GenBank phylogenetically classified as subtype A2, only 4 isolates (1.7%) encoded HBsAg with R¹²², and 3 came from drug users in an Argentinian outbreak, probably arising from one original strain.

Substitution sD144E has been implicated in immune-escape and/or diminished affinity for monoclonal antibodies (Protzer-Knolle, Naumann et al. 1998; Kim, Lee et al. 2003). Substitutions sT143P and sS154L are rare, irrespective of genotype (2 and 6 occurrences respectively in the SwissProt database). Their possible implication in immune-escape is unknown.

The mutation leading to sK122R is neutral in the overlapping Pol gene but the sD144E mutation results in W501R. This does not seem to seriously affect viral fitness (Henke-Gendo, Amini-Bavil-Olyaei et al. 2008).

Using genetically engineered HBsAg and immunoprecipitation with the patient's serum, we could show that the serum perfectly recognized what was in all probability the HBsAg encoded by the subgenotype A2 strain that originally infected the patient, with residues s122K and s144D. Single substitution of sK122R results in important but incomplete diminution of recognition of the modified HBsAg by the patient's serum. Adding on sD144E completely abolishes recognition of the modified HBsAg. Can we deduce the course of events that occurred in this patient? Two lines of evidence suggest that the sK122R substitution emerged first. This substitution can only occur in the acute phase of HBV infection when the host starts to mount an anti-HBs response. Residues 122 and 160 of HBsAg are very important immunologically, since they determine the *d/y* (K122/R122) and *r/w* (K160/R160) serological determinants that are mutually exclusive (HBsAg is *d* or *y* and *r* or *w*) (Norder, Courouce et al. 2004). Shortly after discovery of HBV and its associated serotypes, it became apparent that there were cases of co-existence of anti-HBs and active viremia and that this involved the *d/y* or *w/r* determinants, i.e. the patients' sera recognized one of the mutually exclusive determinants but the circulating virus now possessed the other. In fact, such sera were actually used for serotyping (Le Bouvier, Capper et al. 1976). At that time, lack of nucleic acid and protein sequence data meant that the molecular basis was not established, but we have recently shown in a case of co-existence of anti-HBs and active viremia that the only explanation is a *y*→*d* substitution (sR122K), the opposite of what is found here (Margeridon, Lachaux et al. 2005). Such substitutions must arise before the host anti-HBs response eliminates the virus. The second line of evidence is that in data-mining of the SwissProt databank containing more than 7000 non-redundant HBsAg sequences, only 15 possessed sD144E. Of these, none being genotype A, only one possessed sK122, suggesting that sR122 is an important prerequisite for the emergence of sD144E immune-escape mutants. Did the sD144E mutation also arise during the acute phase of the HBV infection? This cannot be excluded, but the answer would seem to be no. The patient's serum still has residual recognition of HBsAg despite the sK122R substitution. The patient apparently managed to control but not completely eliminate the HBV infection for over 10 years. We think it probable that the glucocorticosteroid treatment stimulated not only HBV replication but also that the host immune responses lead to selection of the sD144E mutation at this time and to full-blown reactivation of the HBV infection. This is consistent with the idea that HBV escape mutants can arise from host factors and not just from antiviral treatment, vaccination or HBIG administration (Henke-Gendo, Amini-Bavil-Olyaei et al. 2008).

Could it be reinfection? Initially, infection must have been with HBV expressing s122K/s144D since the patient made antibodies against these two epitopes. That he was reinfected with an A2 strain possessing both s122R (very rare in A2) and s144E (unknown in A2) seems highly improbable. This unusual virus has been sculpted by the host's immune responses.

Thanks to prompt re-introduction of antiretroviral therapy including Tenofovir/Emtricitabine that are very effective against HBV, HBV viral loads dropped and the patient also seroconverted to anti-HBe.

It is notable that the positive control serum (from a vaccinated person) recognizes all HBsAg, including that 3-times mutated, showing that anti-HBs protection is not just a question of quantity but also of quality, the breadth of the anti-HBs response.

HBV immune-escape mutants usually emerge during acute infections or re-infection of transplanted livers but can also emerge in exceptional circumstances. Such situations should be recognized in order to offer patients the most appropriate treatment.

Funding

This work was supported by the Agence National de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS) [grant number 12149] to A.K. and S.G.; an ANRS training grant to N.M.; the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France)-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Brazil) collaborative program to A.K., C.T. and S.G.; the Région Rhône-Alpes student exchange program (ExploRA'Doc) to N.M.; and the Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL1) co-thesis program to N.M.

References

1. Nowicki MJ, Tong MJ, Nair PV, Stevenson D. Detection of anti-HBc IgM following prednisone treatment in patients with chronic active hepatitis B virus infection. *Hepatology* **1984**; 4:1129-33.
2. Sagnelli E, Manzillo G, Maio G, et al. Serum levels of hepatitis B surface and core antigens during immunosuppressive treatment of HBsAg-positive chronic active hepatitis. *Lancet* **1980**; 2:395-7.
3. Tur-Kaspa R, Shaul Y, Moore DD, et al. The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer. *Virology* **1988**; 167:630-3.
4. Josephson F. Drug-drug interactions in the treatment of HIV infection: focus on pharmacokinetic enhancement through CYP3A inhibition. *J Intern Med* **2010**; 268:530-9.
5. Margeridon S, Carrouee-Durantel S, Chemin I, et al. 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**; 52:3068-73.
6. 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**; 69:5437-44.
7. 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**; 35:1215-24.
8. Margeridon S, Lachaux A, Trepo C, Zoulim F, Kay A. A quasi-monoclonal anti-HBs response can lead to immune escape of 'wild-type' hepatitis B virus. *J Gen Virol* **2005**; 86:1687-93.
9. Hass M, Hannoun C, Kalinina T, Sommer G, Manegold C, Gunther S. Functional analysis of hepatitis B virus reactivating in hepatitis B surface antigen-negative individuals. *Hepatology* **2005**; 42:93-103.
10. Lam KC, Lai CL, Ng RP, Trepo C, Wu PC. Deleterious Effect of Prednisolone in HBsAg-positive Chronic Active Hepatitis. *New England Journal of Medicine* **1981**; 304:380-6.
11. Henke-Gendo C, Amini-Bavil-Olyaei S, Challapalli D, et al. Symptomatic hepatitis B virus (HBV) reactivation despite reduced viral fitness is associated with HBV test and immune escape mutations in an HIV-coinfected patient. *J Infect Dis* **2008**; 198:1620-4.
12. Kim KH, Lee KH, Chang HY, et al. Evolution of hepatitis B virus sequence from a liver transplant recipient with rapid breakthrough despite hepatitis B immune globulin prophylaxis and lamivudine therapy. *J Med Virol* **2003**; 71:367-75.
13. Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, et al. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. *Hepatology* **1998**; 27:254-63.
14. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* **2004**; 47:289-309.
15. Le Bouvier GL, Capper RA, Williams AE, Pelletier M, Katz AJ. Concurrently circulating hepatitis B surface antigen and heterotypic anti-HBs antibody. *J Immunol* **1976**; 117:2262-4.

Clone	HBcAg	PreS2	HBsAg	Pol
P5.9	T90N		F8L, L42Q, K122R, D144E	V199F, Y288H, I366T, A386T, W501R,
P2.2.11	E77Q	S5P	K122R, D144E, S154L	E75D, V199F, Y288H, F306S, A386T, R458G, W501R

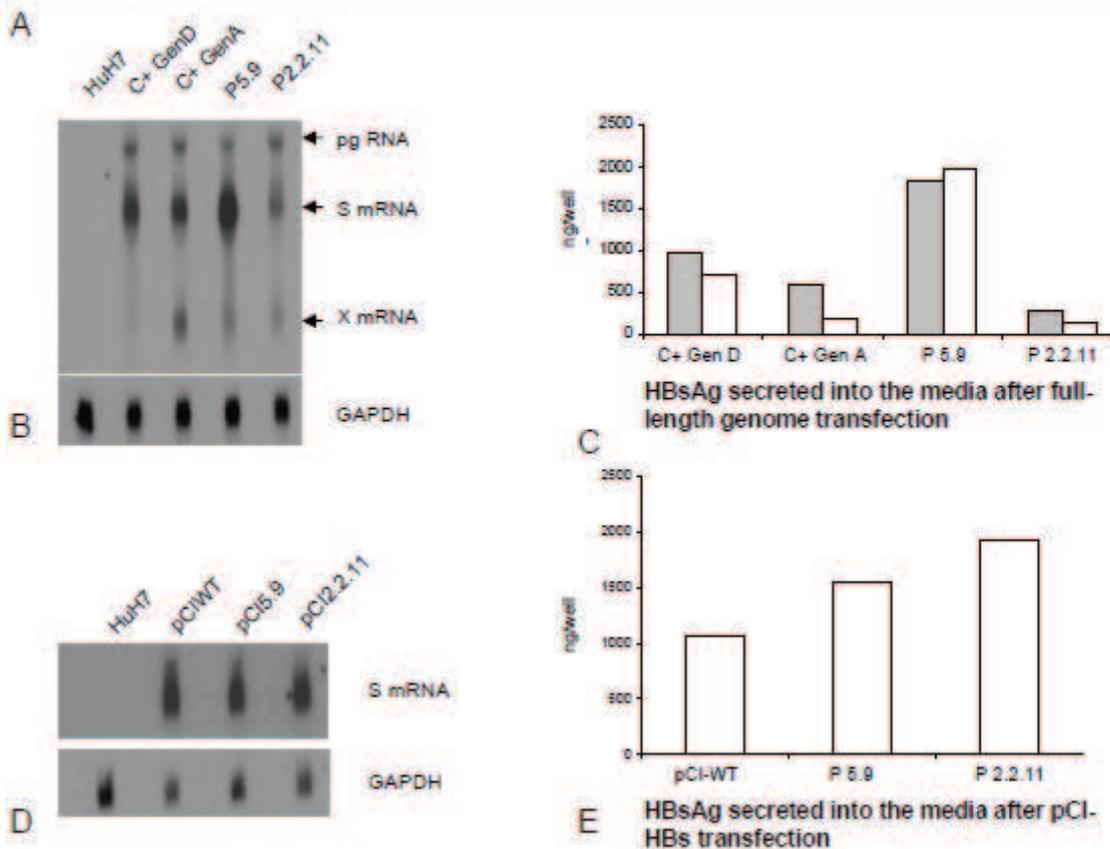


Figure 1.

A: Amino acid substitutions found in clones 5.9 and 2.2.11. Translated ORFs were compared to translations of a consensus sequence constructed from 236 complete HBV genomes from GenBank that could be identified as subgenotype A2

B: Northern blot analysis 5 days after transfection of HBV genomes into HuH7 cells. HuH7 - negative transfection control; C+ GenD - HBV genotype D positive control (accession number AJ344117); C+ GenA - HBV subgenotype A2 positive control (accession number AM295795). Ten micrograms of total RNA were glyoxylated and separated on 1% agarose gels. Hybridization was with 32 P-labeled oligonucleotides situated in the X-gene so that all HBV transcripts are evenly labeled [7]

C: Cumulated HBsAg secretion detected in the supernatant of HuH7 cells 5 days after transfection (two independent transfections).

D: Northern blot analysis 5 days after transfection of pCI-HBs constructs into HuH7 cells. HuH7 - negative transfection control; pCIWT-positive control. Ten micrograms of total RNA were glyoxylated and separated on 1% agarose gels. Hybridization was with 32 P-labeled oligonucleotides situated in the S-gene [8]

E: Cumulated HBsAg secretion detected in the supernatant of HuH7 cells 5 days after transfection.

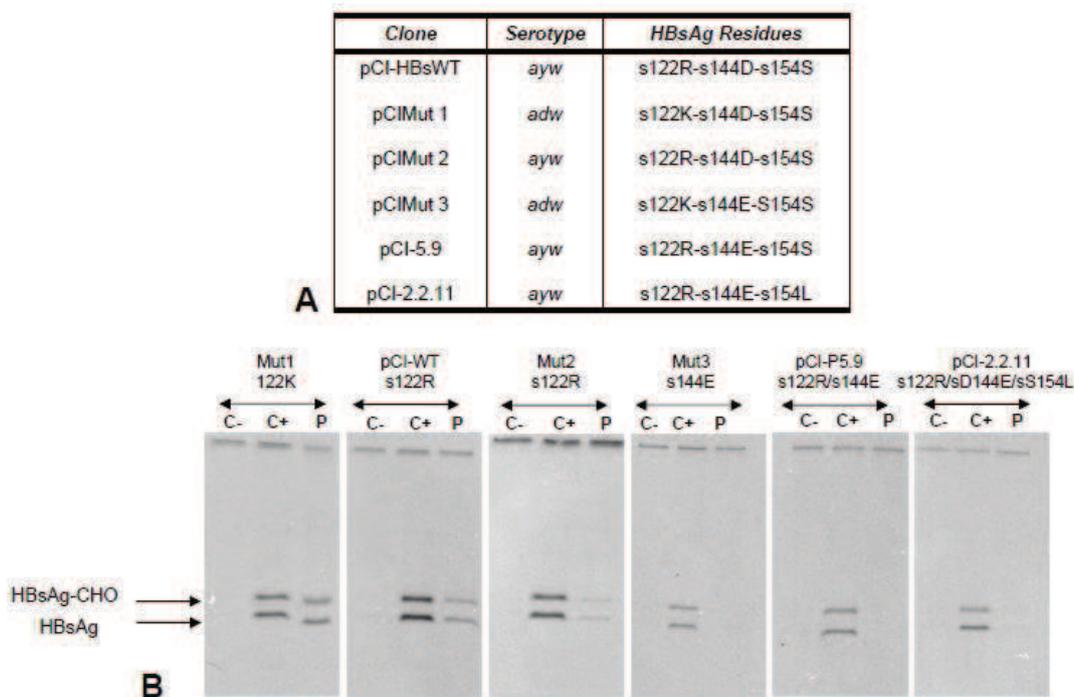


Figure2.

A: pCI-HBsAg constructs obtained after site-directed mutagenesis of the S gene of clone 5.9. The serotypes and the S gene residues at positions 122, 144 and 154 are indicated. The pCI-HBsWT used as a positive control is a genotype D serotype ayw S gene with an R residue at position 122 [6, 15].

B: Immunoprecipitation of ³⁵S-labeled HBsAg particles of different serotypes. Viral particles were ³⁵S-labeled after transfection of pCi-HBs constructs into HuH7 human hepatocyte cells. Monolisa HBsAg Ultra testing immediately prior to ³⁵S-labeling showed that all constructs were secreting similar amounts of HBsAg. Three sera were used for immunoprecipitation: an anti-HBs-negative human serum (C-), an anti-HBs-positive serum from a vaccinated individual (C+) and the Patient's serum P. The non-glycosylated and the monoglycosylated forms (HBsAg-CHO) of HBsAg are indicated

Discussion

Cette étude soulève deux interrogations majeures: Pourquoi la souche de HBV a-t-elle réactivée après tant d'années ? Comment la réactivation a-t-elle été possible alors que les anticorps anti-HBs étaient présents en quantité suffisante pour avoir un rôle protecteur ?

Répondre à la première interrogation est probablement le plus difficile car la réactivation virale est multifactorielle et il est donc très ardu de l'attribuer à un seul facteur. Chez les patients coinfectés par le HIV, la biologie de l'infection au HBV est un peu particulière. Les molécules utilisées dans le traitement HAART sont hépatotoxiques et des états immunodépresseurs peuvent mener à des phénomènes de réactivation de souches de HBV (Wit, Weverling et al. 2002). Par ailleurs dans de nombreux traitements anti-HIV, des inhibiteurs de protéases (lopinavir, ritonavir) sont utilisés. Ces inhibiteurs sont principalement métabolisés en métabolites inactifs par les cytochromes P450 3A (CYP3A) présents majoritairement au niveau du foie. En condition normale, les corticostéroïdes (fluticasone) sont aussi métabolisés par le CYP 3A (Josephson, 2010). Le ritonavir a dans le même temps un potentiel d'inhibition du CYP3A, ce qui indirectement prolonge le temps de demi-vie dans le sang des inhibiteurs de protéase et des corticostéroïdes. L'association du ritonavir et des corticostéroïdes potentialise leur activité respective. De telles interactions médicamenteuses ont été rapportées dans le passé comme étant à l'origine de syndromes de Cushing iatrogène (Chen, Kearney et al. 1999; Hillebrand-Haverkort, Prummel et al. 1999). Les génomes de HBV possèdent des éléments de réponse aux glucocorticostéroïdes (Tur-Kaspa, Shaul et al. 1988). L'activation de ceux-ci a pour conséquence de stimuler la réplication virale. Dans ce contexte, de nombreux cas de réactivation de HBV suite à des traitements aux glucocorticoïdes ont été rapportés. Nous suggérons que la réactivation virale a été favorisée par (1) un défaut de métabolisation des corticoïdes principalement due à l'interaction médicamenteuse entre les stéroïdes et le ritonavir, (2) ayant pour résultat d'augmenter considérablement la concentration de stéroïde dans le sang et de ce fait d'exercer indirectement une forte pression sur la réplication virale. Le second point a été de comprendre comment la réactivation a pu avoir lieu alors que les anticorps anti-HBs du patient étaient présents en quantité suffisante pour avoir un rôle protecteur (Jack, Hall et al. 1999). Bien que le traitement aux glucocorticoïdes ait stimulé la réplication du HBV, la réactivation virale n'a été possible que par la présence de quasi-espèces ayant incorporées des mutations d'échappement, ce qui permet d'expliquer la coexistence des anticorps anti-HBs et de l'AgHBs. L'analyse moléculaire de la souche nous a permis d'identifier quatre substitutions à proximité du déterminant 'a' qui pourraient jouer un rôle dans l'échappement viral: sK122R, sT143P, sD144E et sS154L.

Les résidus arginine et lysine à la position 122 déterminent les sérotypes *d* et *y* de l'AgHBs (*d* = K122, *y* = R122). C'est pourquoi il est plus juste de parler de polymorphisme que de mutation à cette position. La souche isolée porte le résidu Arginine à la position 122 conférant un sérotype *ayw*.

Ce polymorphisme est très rare chez le génotype A. Sur 236 génomes entiers représentants du génotype A2 présents dans la banque de données GenBank, seuls quatre isolats soit 1.7% codent un AgHBs portant le résidu arginine à la position 122. Trois de ces souches ont été identifiées dans la même étude chez des utilisateurs de drogues intraveineuses et proviennent très probablement du même isolat d'origine (Trinks, Cuestas et al. 2008). La seconde mutation retrouvée chez les deux isolats implique la substitution d'un acide aspartique en acide glutamique. Bien que cette modification semble être minime, la mutation sD144E a déjà été décrite et impliquée dans des cas d'échappement et il a été montré par ailleurs que cette mutation réduisait la reconnaissance de l'AgHBs par des anticorps monoclonaux (Protzer-Knolle, Naumann et al. 1998; Kim, Lee et al. 2003). Enfin les deux mutations aux positions 143 et 154 sont rares et impliquent des résidus très conservés pour lesquels leur rôle dans l'échappement n'a jamais été démontré. Par ingénierie génétique et mutagénèse dirigée, nous avons introduit les mutations simples ou en combinaison aux positions 122, 144 et 154 dans la construction pCI-P5.9. Nous avons pu montrer par immunoprécipitation que le sérum du patient reconnaissait parfaitement l'AgHBs quand le résidu à la position 122 est une lysine et le résidu est un acide aspartique à la position 144.

L'introduction de la mutation sK122R diminue la reconnaissance de l'AgHBs par le sérum du patient alors que la mutation sD144E l'abolit presque totalement. Enfin lorsque les deux mutations aux positions 122 et 144 sont combinées comme c'est le cas pour les clones P5.9 et P2.2.11, la reconnaissance des AgHBs par les anticorps du patient est totalement abolie. Il est à noter que le témoin positif qui provient d'une personne vaccinée reconnaît parfaitement les gènes S mutés. Ces résultats soulignent l'importance de la relation d'équilibre entre l'hôte et le pathogène. En conclusion, nous proposons un scénario qui explique comment le virus a pu se maintenir tant d'années tout en répliquant à bas bruit et comment la réactivation virale et l'échappement aux anticorps anti-HBs ont eu lieu. Il est très probable que la première mutation qui soit apparue fût celle à la position 122. Cette hypothèse est appuyée par deux arguments forts. Déjà cette substitution ne peut émerger que pendant la phase d'infection aiguë lors de l'apparition des anticorps anti-HBs. Les résidus aux positions 122 et 160 sont très importants car ils forment des couples mutuellement exclusifs qui déterminent le sérotype de l'AgHBs (*d* ou *y* et *r* ou *w*). Mais ils jouent aussi un rôle immunologique majeur. Il a été montré que la réponse immunitaire était aussi dirigée contre ces déterminants et que la modification de ceux-ci pouvait mener à un échappement du virus aux anticorps anti-HBs. Dès les années 70, il a été observé des cas pour lesquels coexistaient les anticorps anti-HBs dirigés contre un sérotype particulier et la circulation d'un virus d'un autre sérotype (Koziol, Alter et al. 1976; Le Bouvier, Capper et al. 1976; Okamoto, Imai et al. 1987). Plus récemment, notre équipe a étudié le cas d'un patient chez qui cocirculaient les anticorps et l'AgHBs (Margeridon, Lachaux et al. 2005). Dans ce cas, l'échappement viral était dû à une substitution à la position 122 du gène S. Il a été montré que la réponse anti-HBs était non seulement monoclonale mais dirigée contre un épitope (*y*) et que la souche virale présente était de sérotype (*d*) et donc non reconnue. Enfin, l'analyse dans la banque de données SwissProt de plus de sept mille séquences de l'AgHBs non redondantes a montré que seules quinze séquences portaient la substitution sD144E.

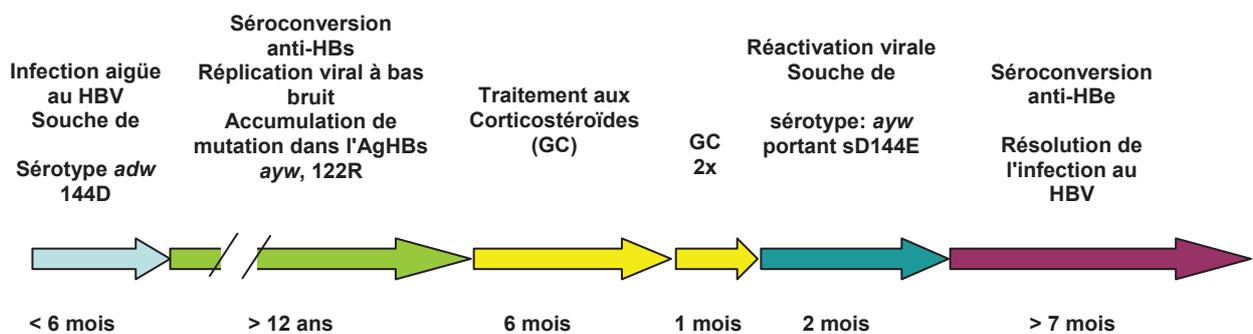


Figure 32: Scénario d'apparition du mutant d'échappement sK122R/sD144E

Nous proposons comme conclusion à cette étude: 1) une infection aiguë au HBV est passée inaperçue chez le patient P, la souche impliquée était de sérotype *adw* (122K) et 144D; 2) avant la résolution complète de l'infection une souche de sérotype *ayw* (122R) a émergée, permettant au virus d'échapper partiellement aux anticorps anti-HBs. 3) pendant plus de 12 ans le virus a répliqué à bas bruit, 4) le traitement aux glucocorticoïdes a stimulé la réplication virale et sélectionné l'émergence de souches portant la mutation sD144E permettant un échappement total aux anticorps anti-HBs du patient et la réactivation d'une infection latente au HBV. 5) la séroconversion anti-HBe signe très probablement la résolution de l'infection au HBV.

Aucune de ces séquences n'étaient de génotype A et seule une séquence avait le résidu sK122, ce qui laisse suggérer que la présence du résidu sR122 est un prérequis indispensable à l'apparition de la mutation d'échappement sD144E. Concernant la substitution sD144E nous ne pouvons pas exclure que cette mutation soit apparue durant la phase aiguë de l'infection mais c'est en réalité peu probable. En effet, nous pensons que lors de l'infection aiguë et de la mise en place des anticorps anti-HBs la première mutation sK122R est apparue. Cette mutation a permis au virus d'échapper partiellement à la réponse anti-HBs du patient, de ne pas être éliminé totalement et de se maintenir dans l'organisme pendant plus de 12 ans.

On ne sait pas si le virus a persisté pendant tout ce temps sous forme transcriptionnellement actif dans les hépatocytes ou si il a persisté à un état latent. Si comme nous le pensons la mutation sK122R est apparue avant la clairance virale, alors la réponse anti-HBs du patient dirigée contre l'épitope *d*. était capable d'inhiber la réplication virale. Cela n'exclut pas que le virus ait été transcriptionnellement actif et qu'il ait persisté tout en répliquant à bas bruit. Ainsi on peut supposer que la réponse anti-HBs a pu contrôler la réplication virale à un très faible taux. On ne peut aussi supposer que lors de la mise en place de la réponse anti-HBs le virus a été éliminé des hépatocytes infectés et seuls ont pu persister des virions à un état latent dans des réservoirs extra-hépatiques. On ne peut pas exclure que le virus ait persisté sous forme intégrée dans le noyau des hépatocytes infectés. Cette dernière hypothèse est la moins probable car il n'a jamais encore été démontré qu'un génome entier de HBV pouvait être intégré à l'ADN cellulaire. Seule l'intégration de fragments de génome a été rapportée. La réactivation virale a très probablement eu lieu dans les cellules hépatocytaires. Cet argument est principalement motivé par le fait qu'il n'a pas été montré que le HBV pouvait répliquer dans des compartiments extra-hépatiques, et que seuls les hépatocytes sont permissives à l'infection par le HBV. Cependant, cela n'exclut pas que le virus ait persisté à l'état latent dans un réservoir extra-hépatique et que le traitement aux glucocorticoïdes ait favorisé un changement de compartiment pour que le virus puisse se répliquer. Le traitement aux glucocorticoïdes a stimulé la réplication virale et la pression immunologique anti-HBs toujours présente a sélectionné l'émergence de la mutation D144E, ce qui a permis un échappement total aux anticorps anti-HBs (figure 32) Nous ne pouvons pas exclure que le patient n'ait été réinfecté par une souche portant la double substitution sK122R et sD144E. Cette possibilité est cependant très improbable. Il aurait fallu que le patient soit réinfecté par un virus de sous-génotype A2 portant les substitutions sK122R et sD144E qui permettent l'échappement aux anticorps anti-HBs.

De toute évidence, ce virus a été sculpté par les réponses anti-HBs de ce patient particulier. Cet exemple illustre la complexité des interactions hôte-pathogène. Notre témoin positif issu d'une personne vaccinée reconnaît parfaitement l'AgHBs muté y compris celui portant la triple mutation. Ceci démontre que la réponse anti-HBs n'est pas seulement une question de quantité mais aussi de qualité. Une véritable protection ne repose pas que sur le titre (UI/L) de la réponse anti-HBs mais dépend aussi de la qualité de la réponse épitopique et des épitopes qui seront reconnus. Enfin, la séroconversion anti-HBe observée signe très probablement la résolution de l'infection chez ce patient.

Conclusions générales et perspectives

L'ensemble de ces travaux présentés dans ce travail ont pour but d'améliorer la connaissance de la biologie de l'infection par le HBV. Ainsi une meilleure compréhension des phénomènes d'échappement viraux (résistance aux molécules antivirales, à la pression du système immunitaire) ont pour but d'améliorer la prise en charge et le traitement des patients.

La première partie de mon travail est axée sur les modifications moléculaires de l'AgHBs et de l'implication de ces mutations dans l'échappement non seulement aux tests de détection mais aussi aux anticorps anti-HBs. Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si la mutation sY100C, associée dans certains cas à des infections occultes était capable de mettre en défaut les tests de détection. Nous avons produit *in vitro* des protéines S portant la substitution Y100C et nous avons pu montrer que cette modification n'affectait pas la reconnaissance de l'AgHBs par un test de détection commercial. Les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure à l'absence d'effet de la mutation dans un contexte de génome entier. Par la suite, il serait intéressant d'étudier les propriétés fonctionnelles et l'expression des protéines S dans un contexte génome entier.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à un cas de réactivation atypique d'infection occulte HBV chez un patient HIV (+). Les analyses moléculaires réalisées ont montré que la réactivation virale était le résultat d'une subtile balance entre la variabilité virale et la pression immunitaire anti-HBs du patient. Nous avons montré que les substitutions s122K associées à la substitution sD144E abolissaient totalement la reconnaissance de l'AgHBs muté par les anticorps du patient. Nous pensons que le patient a été infecté plus de 12 années auparavant par une souche ne possédant aucune modification de l'AgHBs. Une réponse spécifique anti-HBs dirigée principalement contre l'épitope *d* (s122R) a permis de résoudre l'infection aiguë et explique pourquoi elle est passée inaperçue. Nous supposons qu'à ce moment aient émergés dans la sous-population virale des mutants d'épitope *y* (s122K) échappant alors aux anticorps anti-HBs. Ces mutants ont persisté durant toutes ces années en répliquant à bas bruit. Dans un second temps c'est l'introduction de glucocorticoïdes dans le cocktail médicamenteux du patient qui a conduit à un conflit entre la réplication virale et la pression immunologique. Ce conflit est à l'origine de l'apparition de la substitution sD144E permettant un échappement total du virus aux anticorps anti-HBs du patient. Ce travail illustre la complexité des interactions hôte-pathogènes et explique les mécanismes menant à l'échappement du virus au système immunitaire.

Ces résultats soulignent l'importance des positions 122 et 144 dans la reconnaissance des épitopes viraux. Dans notre cas, la modification du résidu 144 est plus importante dans l'échappement aux anticorps anti-HBs que la modification du résidu à la position 122. On ne connaît pas la structure tridimensionnelle exacte de la protéine S. D'après le modèle proposé (chapitre 1 partie 4.4.2) le résidu 122 est exprimé à la surface de la boucle antigénique majeure et le résidu 144 est porté par la boucle formée des résidus 139 à 147. La boucle antigénique formée par les résidus 139 à 147 et probablement plus exposée que ce qui est laissé suggérer sur la figure 11.

Pour obtenir ces résultats, nous avons analysé les propriétés fonctionnelles des souches P 5.9 et P2.2.11 dans un contexte de génome entier, sous le contrôle des promoteurs viraux endogènes.

L'analyse des transcrits PréS2/S chez les clones P5.9 et P2.2.11 a montré une perturbation transcriptionnelle chez les deux clones.

Les résultats obtenus au niveau transcriptionnel chez le clone P 5.9 sont pour l'instant inexplicables. L'analyse des propriétés fonctionnelles après transfection a montré en northern blot une surexpression des ARNm PréS2/S. Aucune modification moléculaire n'a été identifiée dans la région promotrice pour expliquer une telle surexpression.

Chez le clone P 2.2.11, l'analyse des transcrits pré-génomiques ne montre aucune anomalies au niveau transcriptionnel, une perturbation des ARNm PréS2/S est observée. Les expériences de transfection de génomes entiers ont été répétées et l'analyse a toujours montré que les ARNm PréS2/S étaient sous-exprimés. Cette perturbation est aussi reflétée par une faible quantité d'AgHBs dans le milieu des cellules transfectées sans que des phénomènes de rétention de la protéine S ne soient observés. Nous avons cloné le gène S du clone P 2.2.11 dans un vecteur d'expression eucaryote. Dans ce cas, c'est un promoteur exogène fort qui contrôle la transcription et aucune perturbation de la transcription n'est observée. Nous avons identifié chez le clone P 2. 2. 11 une mutation silencieuse à la position A457G. De manière intéressante, un phénotype similaire a été rapporté chez une souche HBV impliquée dans un cas d'infection occulte et qui portait une mutation silencieuse à la position G458A. Il a été montré que cette mutation était responsable de modification de l'épissage et/ou de l'export des ARN messagers S non épissé. Par la suite, il serait intéressant d'analyser plus en détail l'impact de la mutation A457G sur la transcription de ces ARN. Nous ne savons pas si l'absence de détection de l'AgHBs chez ce patient pendant plus de 12 ans n'a pas été en partie favorisée par la présence d'une quasi-espèce, peut être majoritaire qui aurait un défaut d'expression de l'AgHBs. Pour ce patient, nous ne disposons malheureusement pas d'échantillons avant la réactivation du virus.

L'amélioration de la compréhension de la biologie de l'infection par le HBV se fait aussi par le développement de nouveaux outils d'analyses. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une nouvelle méthode d'amplification de génome entier de HBV. Nous avons développé une méthode qui permet de compléter et circulariser le brin d'ADN (+) de l'ADN-RC en une étape afin qu'il serve de matrice à une amplification par cercle roulant. Nous avons pu montrer que l'amplification était non seulement fidèle mais aussi plus sensible que la PCR génomique P1P2 et était compatible avec l'étude des propriétés fonctionnelles des isolats viraux.

Le développement de cette nouvelle technique d'amplification passe par la circularisation d'un des deux brins d'ADN du HBV. Nous ne savons pas avec certitude lequel est circularisé. A l'avenir, il serait intéressant de travailler à la mise au point d'une réaction d'amplification par cercle roulant qui soit au moins semi-quantitative. Cependant, la réaction de RCA est isotherme, il n'y a donc pas de cycles successifs d'amplification, et utilise 8 amorces différentes. Ces deux conditions sont des obstacles majeurs pour la quantification de la réaction de polymérisation. L'absence de cycles d'amplification ne permet pas d'établir aisément de cinétique d'amplification. Il serait intéressant de savoir si la réaction de RCA est aussi efficace si l'on utilise seulement deux amorces une sur le brin (+) et une sur le brin (-).

Ceci nous permettrait peut être de suivre l'amplification de l'ADN double brin ciblé, mais cela ne résout pas le problème de l'amplification non spécifique. Il faudrait trouver un moyen de différencier efficacement les brins d'ADN HBV néo-amplifiés, cela pourrait peut-être se faire par l'utilisation de sondes 'Taqman' ou d'oligoribonucléotides de type 'molecular beacon'.

L'étude des infections occultes est délicate, et dépend très largement du matériel biologique disponible et des méthodes d'amplifications utilisées. Si l'on travaille à partir de sérum dans la plupart des cas, seuls des fragments sous génomiques sont amplifiés. La plupart des données moléculaires existantes ne sont donc que partielles.

Une des grandes interrogations associées aux infections occultes repose sur la molécule d'ADNccc. En effet, on ne sait pas si un mécanisme épigénétique vient inhiber la réplication virale, et si l'ADNccc est transcriptionnellement actif. L'étude des infections occultes par l'étude de la régulation génétique de l'ADNccc permettrait d'améliorer la compréhension de l'infection occulte.

Quelques soient les études moléculaires réalisées sur le HBV, la variabilité est principalement étudiée à partir de sérum. L'existence des quasi-espèces et la dynamique des quasi-espèces a été explorée par des analyses moléculaires de l'ADN-RC. En revanche, on ne sait pas si ces quasi-espèces sont archivées sous forme d'ADNccc dans le noyau des cellules infectées. L'analyse de la variabilité de la molécule d'ADNccc pourrait ouvrir de nouvelles perspectives sur la connaissance de l'infection par le HBV.

Annexe

Etude 4

Détection d'infections HBV occultes chez une cohorte Brésilienne HIV+/AgHBs- et analyse moléculaire.

Introduction

Les infections à HBV occultes sont caractérisées par la présence d'ADN viral sans que l'antigène de surface des particules du HBV (AgHBs) ne puisse être détecté. Le manque de détection de l'AgHBs dans ces cas peut être attribué à différents facteurs (i) des mutations de la polymérase virale responsables d'une faible réplication (ii) des mutations sur l'AgHBs qui altèrent la reconnaissance de celui-ci par les tests, (iii) des facteurs propres à la relation hôte pathogène qui permettent une réplication à bas bruit sans que les anticorps anti HBs ne puissent les détecter (Raimondo, Pollicino et al. 2007).

Ce type d'infection est plus fréquemment retrouvé chez les patients coinfectés par le HIV que chez les patients mono-infectés par le HBV. D'autre part, ces infections à faible charge virale ne sont généralement pas traitées dans le cas de mono-infection par le HBV. Leur comportement face à des traitements antiviraux est donc mal connu. Par contre, les patients co-infectés reçoivent dans les traitements anti-HIV (HAART) des molécules actives à la fois contre le HIV et le HBV (lamivudine, adéfovir, ténofovir). Déjà, sur le plan clinique, les coinfections avec une faible charge virale de HBV semblent se distinguer des coinfections où la charge virale est élevée. Des traitements anti-HBV à longue durée par des analogues de nucléos(t)ides conduisent souvent, surtout avec la lamivudine, à l'émergence de mutants de résistance et l'apparition des signes cliniques de cette résistance (élévation des transaminases et augmentation de l'ADN VHB sérique) (Costantini, Marinelli et al. 2011). Ceci est le cas pour des coinfections où la charge virale initiale du HBV est élevée mais est rare pour les coinfections à faible charge virale HBV. Soit les HBV qui se répliquent peu n'acquièrent pas des mutations de résistance, soit des facteurs de l'hôte ou d'autres mutations déjà présentes dans le génome du HBV contrôlent l'infection malgré l'introduction de mutations de résistance et empêchent la manifestation des signes cliniques. Les résultats antérieurs obtenus dans ce domaine par l'équipe Brésilienne ont montré que déjà la prévalence d'infections occultes chez les patients HIV (+) était élevée comprise entre 16% et 14% (Santos, Yoshida et al. 2003; Sucupira, Mello et al. 2006; Araujo, Branco-Vieira et al. 2008). Et par ailleurs les études moléculaires réalisées en 2003 et 2008 sur les deux cohortes ont montré que seule une souche de HBV parmi les 6 souches séquencées portait des mutations de résistance à la lamivudine. C'est dans ce contexte que nous aurions voulu étudier : l'infection occulte par le HBV chez des patients coinfectés par le HIV (+) et traités contre le HIV avec au moins une molécule active contre le HBV. La cohorte de patients HIV (+) représente une cohorte unique pour l'étude des résistances du HBV lors d'infection à faible charge virale. Nous aurions voulu étudier le comportement des souches HBV face aux traitements antiviraux.

Matériels et méthodes

Composition de la cohorte

Nous travaillons sur une cohorte composée de 67 patients suivis à l'hôpital Evandro Chagas, institut Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro pour une infection par le HIV. Le critère d'inclusion des patients dans cette étude est la négativité de l'AghBs quelque soit le statut des anticorps anti-HBs et anti-HBc. L'étude a été approuvée par comité d'éthique local (IPEC/ FIOCRUZ) et tous les patients ont donné leur consentement.

Tableau 19: Amorces utilisées pour la détection d'infection occulte

Région ciblée par l'amplification	Nom de l'amorce	Séquences des amorces	Position	Taille du fragment
Région S Déterminant 'a'	s56-F (sens)	5'CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC3'	56-75	741pb 704pb
	s797-R1 (anti-sens)	5'-GCGGYAWAAAGGGACTCAAG-3'	797-778	
	s760-R2 (anti-sens)	5'-CCCCCAATACCASATCATCC-3'	760-741	
Région RT du gène de la pol	PorV2 (anti-sens)	3'AACACCCAGAAAACCCGAAA5'	1017-997	562pb 420pb
	Pol2 (sens)	5'CCTGTATTCCCATCCATC3'	597-615	
	Pol3 (sens)	5'CAAGGTATGTTGCCGTTTGTC3'	455-476	
Gène C	C1-plus (sens)	5'TTCACCTCTGCCTAATCATC3'	1824-1843	643pb 549pb
	C1-moins (anti-sens)	3'CAATCATARGGAACCTGWGT5'	2467-2448	
	C2-plus (sens)	5'TCAAGCCTCCAAGCTGTGCC3'	1864-1883	
	C2-moins (anti-sens)	3'CTGCTTCYAGAGTTAGCGGC5'	2413-2394	
Région TP du gène de la Pol (oligo de Taormina)	P9-F (sens)	5'CGTGCAGAAAGATCTCAATC3'	2414-2433	425pb 376pb
	P11-R (anti-sens)	3'TGGTATAAGAACCCTTGTTCT5'	2845-2825	
	P10-F (sens)	5'CCTTGACWCATAAGGTG3'	2457-2474	
	P12-R (anti-sens)	3'CCCAGTGGTATAAGAACCCT5'	2839-2820	

Tableau 20: Températures d'hybridation utilisées selon les couples d'amorces utilisés

Couple d'amorce utilisé	Température d'hybridation	Couple d'amorce utilisé	Température d'hybridation
s56F-s797-R1 (1 round)	55°C	PorV2/Pol2 (1 round)	50°C
s56F- s790-R2 (2nd round)	55°C	PorV2/Pol3 (2nd round)	50°C
C1+/C1- (1 round)	45°C	P9-F/P11-R (1 round)	50°C
C2+/C2- (2nd round)	55°C	P10-F/P12-R (2nd round)	50°C

Tests sérologiques, extraction d'ADN et amplification virale

La recherche des anticorps anti-HBs, anti-HBc et de l'AgHBs a été réalisée de novo au laboratoire sur les sérums en utilisant le test de détection Bioelisa anti-HBs, anti-HBc et HBsAg assay (Biokit, Espagne). Avant extraction et afin d'écarter toute suspicion de contamination par un produit PCR ou plasmidique 200µl de sérum sont traités par 2.5U de RQ1 DNase et 1X du tampon de réaction de la RQ1DNase (Proméga) pendant 2h à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 20µl de RQ1 DNase inhibitor suivi de 10 minutes à 65°C. Pour chaque série de traitement par la DNase suivit de l'étape d'extraction un témoin positif pour le HBV et un témoin négatif sont ajoutés. L'ADN viral a ensuite été extrait en utilisant le kit d'extraction Kit High Pure Viral (Roche) dans un laboratoire voisin chez lequel aucune souche de HBV n'avait été amplifiée par PCR ou manipulée pour la construction de plasmide HBV. Nous avons recherché la présence de l'ADN du HBV par l'utilisation de PCR sensibles ciblant les régions des gènes Core, de Surface et les régions RT et TP du gène de la polymérase virale (tableau 19). La sensibilité des PCR utilisées permet l'amplification de faibles charges virales. Les réactions d'amplifications sont menées dans les conditions suivantes: Tampon Herculase 1X, dNTPs (250µM chaque), amorces 0.25µM chaque (si l'amorce est dégénérée la concentration de celle-ci est doublée). Pour le premier round ce sont 5µl du produit d'extraction qui sont utilisés et 40 cycles d'amplification se succèdent. Le second round d'amplification est composé de 35 cycles d'amplification et utilise comme input 5µl du produit d'amplification du premier round. Les températures d'hybridation utilisées selon les couples d'amorces sont indiquées dans le tableau 20. Pour chaque série d'amplification sont ajoutés: les témoins (positif et négatif) d'extraction et un témoin négatif de la réaction PCR est ajouté pour chaque round d'amplification. Un échantillon est considéré positif lorsque nous avons pu amplifier l'ADN viral par au moins 2 nested PCR différentes sur 3 et que le séquençage des différents fragments obtenus est concordant.

Résultats

Caractéristique de la cohorte

La cohorte est composée à 54% (36) de femmes et 46% (31) d'hommes, l'âge moyen est de 41 ans. Dans cette cohorte 88% des patients sont traités contre le HIV par un traitement HAART. Parmi ceux-ci, 98% ont au moins la lamivudine dans leur traitement et 37% sont cotraités avec du ténofovir.

Au sein de la cohorte plus de 55% des patients n'ont *a priori* jamais été en contact avec le virus et sont négatifs pour les anticorps anti-HBs et les anticorps anti-HBc (tableau 21). Près d'un quart de la cohorte (24%) présentent un profil vaccinal anti-HBV où seuls les anticorps anti-HBs sont présents. Dix patients (15%) sont positifs pour les anticorps anti-HBs et les anticorps anti-HBc. Bien que ces marqueurs traduisent une infection aiguë passée et résolue, aucun des patients n'a le souvenir d'avoir eu une infection aiguë par le HBV.

Tableau 21: Profil sérologique des marqueurs d'expositions au HBV chez la cohorte de patients HIV (+)/AgHBs (-)

Profil sérologique des marqueurs d'exposition au HBV	
Statut anti-HBs-/ anti-HBc –	55% (37/67)
Statut anti-HBs isolés	24% (16/67)
Statut anti-HBs+/ anti-HBc +	15% (10/67)
Anti-HBc isolés	6% (4/67)

	Sexe	α -HBs	α -HBc	Nested C 600pb	Nested S 700pb	Nested RT 400pb	Nested TP 400pb	Mutation	Traitement
Rio56	M	Neg	Pos	Pos- A1	Pos- A1	Pos-A1	ND	sQ101H	Non
Rio79	M	Neg	Neg	Pos- A2	Pos- A2	Pos-A2	Pos-A2		Non
Rio112	F	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos-D1	Pos- D1		FTC/TDF

Tableau 22: Caractéristiques sérologiques associées à la détection de l'infection occulte.

Le tableau 22 présente les données sérologiques et cliniques des 3 patients chez lesquels nous avons identifiés une infection occulte par le HBV (les isolats HBV sont nommés Rio 56, Rio 79, Rio112). Le genre du patient est indiqué F: femme, M: mâle, la présence dans anticorps anti-HBs (α -HB) et des anticorps anti-HBc (α -HBc) est indiquée par Pos: positif, Neg: négatif. Si le patient suit un traitement antiviral pour son infection au HIV celui-ci est indiqué, FTC: emtricitabine, TDF: ténofovir.

Quatre nested PCR ont été utilisée pour la détection de l'infection occulte. Elles sont nommées en fonction des régions ciblées: Nested C cible la région C et amplifie au second round un fragment de 600 pb, Nested S cible la région S et amplifie au second round un fragment de 700 pb, Nested RT cible la sous-région RT de la polymérase et amplifie au second round un fragment de 400 pb, Nested TP cible la sous-région TP et amplifie au second round un fragment de 400 pb. Si un fragment de PCR a été obtenu cela est indiqué par Pos: positif, l'analyse moléculaire et la détermination du génotype est indiquée. Si des mutations ont été identifiées elles sont indiquées.

Parmi ces 10 patients 9 sont traités contre le HIV avec de la lamuvidine au moins. Enfin, quatre (6%) patients ont un profil anti-HBc isolé. Pour ces 4 patients on ne peut pas savoir si la présence des anticorps anti-HBc est le résultat d'une infection aiguë passée ou une infection par le HBV pour laquelle la réplication virale est très faible. Par ailleurs, trois patients parmi les 4 sont traités avec de la lamuvidine dans leur traitement HAART contre le HIV.

La cohorte est caractérisée par un faible taux des marqueurs d'exposition au HBV (anticorps anti-HBs et/ou anti-HBc), une proportion élevée de femmes et une très bonne prise en charge médicamenteuse des patients contre l'infection au HIV.

Détection de souches occultes de HBV

Nous avons identifié et confirmé 3 cas d'infections au HBV parmi les 67 patients, reflétant une prévalence d'infection occulte de 4.5% (tableau 21). Tous les fragments de PCR obtenus ont été séquencés. L'analyse moléculaire n'a montré aucune mutation majeure ni dans le domaine catalytique de la polymérase virale ni dans le déterminant 'a'. La PCR quantitative implantée actuellement au laboratoire n'est pas adaptée à la quantification d'extraits dont la charge virale est très faible. Nous ne savons donc pas avec précision quelle est la charge virale pour chaque échantillon. Mais il est évident que les charges virales sont faibles car nous n'avons pas pu amplifier des fragments PCR supérieurs à 700pb et la présence de l'ADN virale est toujours constatée lors du second round d'amplification de la nested PCR. L'analyse des molécules des fragments sous-génomiques obtenus pour les isolats Rio 112 et Rio 79 n'a montré aucune anomalie de la séquence nucléique. Le patient chez lequel la souche Rio 112 a été identifiée est traité pour le HIV avec des molécules actives aussi contre le HBV (ténofovir et lamuvidine). L'isolat ne montre aucune mutation caractéristique de résistance aux molécules antivirales. Nous n'avons aucune information concernant le début ni la durée du traitement.

L'isolat Rio 56 de génotype A1 porte la mutation sQ101H. Cette mutation n'est pas dans le déterminant 'a' et n'a jamais été décrite ni impliquée dans des phénomènes d'échappement notoires. Si la représentation de la protéine S acceptée est celle présentée dans la figure 10 alors la position 101 se trouve à la base extérieure de la boucle antigénique majeure. On ne sait pas si la modification d'un résidu glutamine en résidu histidine est un changement qui pourrait affecter la structure tridimensionnelle de la protéine et altérer la reconnaissance de la protéine S par les tests de détection enzymatique.

Discussion

Il n'existe pas de méthode standardisée pour la détection des infections occultes. Ainsi, selon la méthode utilisée, la sensibilité ne sera pas la même et les résultats obtenus d'une étude à l'autre sont alors difficilement comparables au moins en terme de prévalence (Torbenson and Thomas 2002). Lors de la conférence de Taormina, il a été proposé que les méthodes de détection de l'infection occulte soient harmonisées de façon à pouvoir analyser plus facilement les différents résultats obtenus (Raimondo, Allain et al. 2008).

Il a été proposé pour éviter les résultats faux positifs que l'ADN de HBV soit détecté par des nested PCR sensibles. Le choix des amorces est alors très important car il doit permettre: (i) l'amplification de tous les génotypes, (ii) de cibler des régions ni trop grandes ni trop courtes qui peuvent être amplifiées même si les charges virales sont faibles et enfin la séquence amplifiée doit être suffisamment diversifiée pour permettre la distinction entre sous-génotypes. Des couples d'amorces ont été proposés lors de cette conférence pour harmoniser les PCR ciblant les régions S, PréC, RT et X.

Cependant le choix des amorces ciblant les régions S et C n'est pas optimal. En effet, les températures d'hybridation sont faibles et favorisent les amplifications non spécifiques. De plus, la région ciblée par les amorces S n'est pas optimale non plus pour l'analyse moléculaire des amplifiats car elle cible une région très conservée. L'analyse moléculaire de cette séquence ne permet pas de discriminer clairement les amplifiats d'un point de vue génotypique et sous-génotypique. C'est pourquoi nous avons utilisé des PCR maisons pour amplifier les régions S, C et RT. Au préalable, nous avons vérifié que nous pouvions amplifier de l'ADN HBV à partir de charges virales faibles équivalentes à 10^2 copies/ml.

Dans cette étude nous avons identifié 3 cas d'infection occulte ce qui reflète une prévalence de 4,5%. Ce résultat est très différents des études réalisées précédemment par l'équipe brésilienne pour lesquelles les prévalences d'infection occulte chez des cohortes de patients HIV +/-anticorps anti-HBc + était entre 14 et 16% (Santos, Yoshida et al. 2003; Sucupira, Mello et al. 2006; Araujo, Branco-Vieira et al. 2008). Il est cependant très difficile de comparer le résultat obtenu dans cette étude avec ceux trouvés précédemment, et ce principalement car les méthodes de détection utilisées ne sont pas les mêmes. Mais aussi les caractéristiques des cohortes sont différentes et les profils sérologiques, cliniques (démocratisation de l'accès au traitement anti-HIV) et démographiques (augmentation du nombre de femmes infectées par le HIV) ont beaucoup changé entre 1998 et 2010.

La faible prévalence trouvée dans cette étude s'explique principalement d'après le profil sérologique des marqueurs d'exposition au HBV de la cohorte. Déjà plus de la moitié des patients de la cohorte ne présentent aucun marqueurs d'exposition au HBV (négativité des anticorps anti-HBs et anti-HBc). A cela il faut rajouter que près d'un quart des patients présentent un profil vaccinal caractérisé par la présence des anticorps anti-HBs seulement. Enfin, 21% des patients sont positifs pour les anticorps anti-HBc (+) seuls ou en associations avec les anticorps anti-HBs. L'anticorps anti-HBc est considéré comme étant un marqueur 'sentinelle' de détection de l'infection occulte par le HBV chez les patients HCV + (Vitale, Tramuto et al. 2008). Il a été montré que chez les groupes à risques comme les patients HIV + la présence des anticorps anti-HBc isolés corrélait avec le statut occulte de l'infection occulte (Ramezani, Banifazl et al. 2010). Plus récemment une étude réalisée sur une cohorte de patients HIV + ayant comme caractéristique un pourcentage similaire d'exposition aux anticorps anti-HBc (27%, 144/520) a trouvé une prévalence d'infection occulte de 0.7% (Di Lello, Macias et al. 2011).

On peut supposer que la forte proportion de femmes dans cette cohorte contribue aussi à expliquer la faible prévalence de l'infection occulte. On sait que dans la population générale, le pourcentage d'hommes infectés par le HBV (infection aiguë ou chronique) est supérieur au nombre de femmes. Ceci n'a pas été étudié sur le plan des infections occultes mais il est très probable que la tendance soit la même.

L'analyse moléculaire des fragments sous-génomiques isolés n'a pas montré de modifications majeures des séquences nucléiques. Seul l'échantillon Ri56 porte une substitution dans le gène S (sQ101H). Une telle mutation n'a jamais été rapportée comme étant une mutation d'échappement notoire aux tests de détections et/ou aux anticorps anti-HBs. Cependant, dans une étude menée par *Scheiblaue et al* qui compare la sensibilité des tests de reconnaissance enzymatique de l'AgHBs en fonction de mutations d'échappement, il a été montré chez un isolat de génotype E que la mutation

sQ101H affectait la reconnaissance de certains tests. L'influence des génotypes et sous génotypes sur la sensibilité des tests immunoenzymatiques a été explorée avec des résultats divergents (Scheiblauer, El-Nageh et al. 2010). Cependant, si les tests enzymatiques ont été optimisés pour reconnaître tous les génotypes, il semble qu'ils soient particulièrement adaptés aux génotypes A et D. Dans notre cas, la souche impliquée est de génotype A1. Nous ne savons pas quel est l'impact de cette mutation sur la structure de l'AgHBs et si elle est responsable d'une absence de reconnaissance par les tests de détection. Nous aurions pu cloner l'AgHBs dans un vecteur d'expression et produire des antigènes en système cellulaire en vue d'analyser la reconnaissance de celui-ci par les tests de détection enzymatique. Le peu de matériel disponible et la faible charge virale ne nous a pas permis d'amplifier le gène S dans sa totalité et de réaliser une telle expérience. Nous ne savons donc pas si c'est la seule modification présente dans le gène S. Il manque la séquence entre 1) les nucléotides nt 741 à nt 760 (séquence imposée par l'amorce s760-R2) ; 2) les nucléotides entre l'amorce s760-R2 et le codon stop S (nt 760 et 833). L'absence de données complètes sur la séquence du gène S a été un frein pour l'étude de la mutation sQ101H. Nous aurions pu introduire par mutagenèse dirigée la mutation Q101H dans un vecteur d'expression contenant un gène S de sous-génotype A1. Dans ce cas nous aurions considéré que la séquence entre les nt 741 et 833 aurait été 'sauvage' sans aucune mutation additionnelle.

Au regard des données sérologiques des patients composant la cohorte et de la méthodologie utilisée les résultats obtenus sont cohérents. Par ces résultats nous pouvons conclure que nous avons trouvé une prévalence d'infection occulte de 4.5% chez une cohorte de patients HIV (+). Cependant nous ne pouvons pas comparer des résultats à une cohorte contrôle qui aurait été composée de patients HIV (-). Bien que nous trouvions 2 cas d'infection occulte sur 3 chez des patients non traités au regard de l'échantillonnage nous ne pouvons pas conclure qu'il y a une plus grande proportion d'infection occulte chez les patients HIV non traités que chez des patients traités. Enfin, nous n'avons pas pu réaliser d'étude longitudinale sur les 3 patients chez lesquels nous avons identifié les infections occultes. Nous ne savons pas quel a été et quel est le comportement des souches virales face aux traitements antiviraux.

3. Présentation des travaux

Ouvrage

HCC: a global challenge

Chapitre V: Challenges in Risks Evaluation for Hepatocellularcarcinoma: Example of Hepatitis B Virus Infection

Myriam Lereau, Doriane Gouas, Nora Martel, Tatiana Dupinay and Isabelle Chemin

Participation à des congrès: Communication orale

Probable corticosteroid-induced reactivation of a latent HBV infection in an HIV-positive patient involving immune-escape

Nora Martel^{1,5}, Laurent Cotte^{1,2}, Mary-Anne Trabaud³, Christian Trepo^{1,4}, Fabien Zoulim^{1,4},
Selma A. Gomes⁵, Alan Kay¹

¹Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL); INSERM, U1052; CNRS, UMR 5286; UCBL1, S_1052, 69003
Lyon, France

²Infectious Diseases Unit, Hôpital de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France

³Virology Laboratory, Hôpital de la Croix Rousse, 69004 Lyon, France

⁴Hepato-Gastroenterology Unit, Hôpital de la Croix Rousse, 69004 Lyon, France

⁵Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil

- Réunion du Réseau Hépatites de l'ANRS le 23 janvier 2009 présenté par le Dr Alan KAY,
- XX congrès de Virologie de Brasilia le 3 Novembre 2009

Communication écrite

Probable corticosteroid-induced reactivation of a latent HBV infection in an HIV-positive patient involving immune-escape

- congrès des doctorants de la FIOCRUZ Rio de Janeiro le 16 décembre 2009 à Angra dos Reis
- congrès de la fondation Mérieux 'New trends in Tumor Virology' du 17 et 19 Janvier 2010 à Annecy.

Bibliographie

- (1) http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_who.cdscr.lyo2002_2.pdf
 - (2) <http://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/hbvfaq.htm>
 - (3) (Virologie, 2011, 15 (2): 100-14 Ducancelle A)
- Abdou Chekaraou, M., S. Bricler, W. Mansour, F. Le Gal, A. Garba, P. Deny and E. Gordien (2010) "A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains." *J Gen Virol* **91**(Pt 6): 1609-20.
- Ahn, S. H., A. Kramvis, S. Kawai, H. C. Spangenberg, J. Li, G. Kimbi, M. Kew, J. Wands and S. Tong (2003). "Sequence variation upstream of precore translation initiation codon reduces hepatitis B virus e antigen production." *Gastroenterology* **125**(5): 1370-8.
- Alter, M. J. (2006). "Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection." *J Hepatol* **44**(1 Suppl): S6-9.
- Andernach, I. E., J. M. Hubschen and C. P. Muller (2009). "Hepatitis B virus: the genotype E puzzle." *Rev Med Virol* **19**(4): 231-40.
- Araujo, N. M., M. Branco-Vieira, A. C. Silva, J. H. Pilotto, B. Grinsztejn, A. J. de Almeida, C. Trepo and S. A. Gomes (2008). "Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients: Evaluation of biochemical, virological and molecular parameters." *Hepatol Res* **38**(12): 1194-203.
- Araujo, N. M., R. Waizbort and A. Kay (2011) "Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: how viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes." *Infect Genet Evol* **11**(6): 1199-207.
- Asabe, S., S. F. Wieland, P. K. Chattopadhyay, M. Roederer, R. E. Engle, R. H. Purcell and F. V. Chisari (2009). "The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection." *J Virol* **83**(19): 9652-62.
- Basagoudanavar, S. H., D. H. Perlman and J. Hu (2007). "Regulation of hepadnavirus reverse transcription by dynamic nucleocapsid phosphorylation." *J Virol* **81**(4): 1641-9.
- Bauer, T., M. Sprinzl and U. Protzer (2011) "Immune control of hepatitis B virus." *Dig Dis* **29**(4): 423-33.
- Beck, J. and M. Nassal (2011) "A Tyr residue in the reverse transcriptase domain can mimic the protein-priming Tyr residue in the terminal protein domain of a hepadnavirus P protein." *J Virol* **85**(15): 7742-53.
- Beck, J. and M. Nassal (2007). "Hepatitis B virus replication." *World J Gastroenterol* **13**(1): 48-64.
- Bellecave, P., J. Gouttenoire, M. Gajer, V. Brass, G. Koutsoudakis, H. E. Blum, R. Bartenschlager, M. Nassal and D. Moradpour (2009). "Hepatitis B and C virus coinfection: a novel model system reveals the absence of direct viral interference." *Hepatology* **50**(1): 46-55.
- Belnap, D. M., N. R. Watts, J. F. Conway, N. Cheng, S. J. Stahl, P. T. Wingfield and A. C. Steven (2003). "Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10884-9.
- Bessesen, M., D. Ives, L. Condreay, S. Lawrence and K. E. Sherman (1999). "Chronic active hepatitis B exacerbations in human immunodeficiency virus-infected patients following development of resistance to or withdrawal of lamivudine." *Clin Infect Dis* **28**(5): 1032-5.
- Bhat, R. A., P. P. Ulrich and G. N. Vyas (1990). "Molecular characterization of a new variant of hepatitis B virus in a persistently infected homosexual man." *Hepatology* **11**(2): 271-6.
- Block, T. M., H. Guo and J. T. Guo (2007). "Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians." *Clin Liver Dis* **11**(4): 685-706, vii.
- Bonacini, M. (1997). "Interaction between HIV and hepatitis B." *Aids* **11**(14): 1789-90.
- Bouchard, M. J. and R. J. Schneider (2004). "The enigmatic X gene of hepatitis B virus." *J Virol* **78**(23): 12725-34.
- Brechot, C., D. Kremsdorf, P. Soussan, P. Pineau, A. Dejean, P. Paterlini-Brechot and P. Tiollais (2010) "Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms." *Pathol Biol (Paris)* **58**(4): 278-87.

- Brechot, C., C. Pourcel, A. Louise, B. Rain and P. Tiollais (1981). "Detection of hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinoma in an integrated form." Prog Med Virol **27**: 99-102.
- Brechot, C., V. Thiers, D. Kremsdorf, B. Nalpas, S. Pol and P. Paterlini-Brechot (2001). "Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"?" Hepatology **34**(1): 194-203.
- Brunetto, M. R., F. Oliveri, G. Rocca, D. Criscuolo, E. Chiaberge, M. Capalbo, E. David, G. Verme and F. Bonino (1989). "Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen." Hepatology **10**(2): 198-202.
- Bruni, R., M. Prosperi, C. Marcantonio, A. Amadori, U. Villano, E. Tritarelli, A. Lo Presti, M. Ciccozzi and A. R. Ciccaglione (2011) "A computational approach to identify point mutations associated with occult hepatitis B: significant mutations affect coding regions but not regulative elements of HBV." Virology **438**: 394.
- Bruss, V. (2007). "Hepatitis B virus morphogenesis." World J Gastroenterol **13**(1): 65-73.
- Cacciola, I., T. Pollicino, G. Squadrito, G. Cerenzia, M. E. Orlando and G. Raimondo (1999). "Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease." N Engl J Med **341**(1): 22-6.
- Candotti, D. and J. P. Allain (2009). "Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection." J Hepatol **51**(4): 798-809.
- Carman, W. F. (1997). "The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus." J Viral Hepat **4 Suppl 1**: 11-20.
- Carman, W. F., M. R. Jacyna, S. Hadziyannis, P. Karayiannis, M. J. McGarvey, A. Makris and H. C. Thomas (1989). "Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection." Lancet **2**(8663): 588-91.
- Carman, W. F., J. Korula, L. Wallace, R. MacPhee, L. Mimms and R. Decker (1995). "Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA." Lancet **345**(8962): 1406-7.
- Carman, W. F., A. Owsianka, L. A. Wallace, B. C. Dow and D. J. Mutimer (1999). "Antigenic characterization of pre- and post-liver transplant hepatitis B surface antigen sequences from patients treated with hepatitis B immune globulin." J Hepatol **31**(2): 195-201.
- Carman, W. F., A. R. Zanetti, P. Karayiannis, J. Waters, G. Manzillo, E. Tanzi, A. J. Zuckerman and H. C. Thomas (1990). "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus." Lancet **336**(8711): 325-9.
- Ceneli, O., Z. N. Ozkurt, K. Acar, S. Rota, S. Z. Aki, Z. A. Yegin, M. Yagci, S. Ozenirler and G. T. Sucak (2010) "Hepatitis B-related events in autologous hematopoietic stem cell transplantation recipients." World J Gastroenterol **16**(14): 1765-71.
- Chakravarty, R., M. Neogi, S. Roychowdhury and C. K. Panda (2002). "Presence of hepatitis B surface antigen mutant G145R DNA in the peripheral blood leukocytes of the family members of an asymptomatic carrier and evidence of its horizontal transmission." Virus Res **90**(1-2): 133-41.
- Chan, H. L., C. H. Tse, F. Mo, J. Koh, V. W. Wong, G. L. Wong, S. Lam Chan, W. Yeo, J. J. Sung and T. S. Mok (2008). "High viral load and hepatitis B virus subgenotype ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma." J Clin Oncol **26**(2): 177-82.
- Chemin, I., O. Guillaud, P. C. Queyron and C. Trepo (2009). "Close monitoring of serum HBV DNA levels and liver enzymes levels is most useful in the management of patients with occult HBV infection." J Hepatol **51**(4): 824-5.
- Chemin, I. and C. Trepo (2005). "Clinical impact of occult HBV infections." J Clin Virol **34 Suppl 1**: S15-21.
- Chemin, I., F. Zoulim, P. Merle, A. Arkhis, M. Chevallier, A. Kay, L. Cova, P. Chevallier, B. Mandrand and C. Trepo (2001). "High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology." J Hepatol **34**(3): 447-54.
- Chen, B. F., J. H. Kao, C. J. Liu, D. S. Chen and P. J. Chen (2004). "Genotypic dominance and novel recombinations in HBV genotype B and C co-infected intravenous drug users." J Med Virol **73**(1): 13-22.

- Chen, C. Y., C. Crowther, M. C. Kew and A. Kramvis (2008). "A valine to phenylalanine mutation in the precore region of hepatitis B virus causes intracellular retention and impaired secretion of HBe-antigen." *Hepatology* **38**(6): 580-92.
- Chen, F., T. Kearney, S. Robinson, P. T. Daley-Yates, S. Waldron and D. R. Churchill (1999). "Cushing's syndrome and severe adrenal suppression in patients treated with ritonavir and inhaled nasal fluticasone." *Sex Transm Infect* **75**(4): 274.
- Chen, H. S., S. Kaneko, R. Girones, R. W. Anderson, W. E. Hornbuckle, B. C. Tennant, P. J. Cote, J. L. Gerin, R. H. Purcell and R. H. Miller (1993). "The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks." *J Virol* **67**(3): 1218-26.
- Cherrington, J., R. Russnak and D. Ganem (1992). "Upstream sequences and cap proximity in the regulation of polyadenylation in ground squirrel hepatitis virus." *J Virol* **66**(12): 7589-96.
- Chudy, M., M. Schmidt, V. Czudai, H. Scheiblauer, S. Nick, M. Mosebach, M. K. Hourfar, E. Seifried, W. K. Roth, E. Grunelt and C. M. Nubling (2006). "Hepatitis B virus genotype G mono-infection and its transmission by blood components." *Hepatology* **44**(1): 99-107.
- Costantini, A., K. Marinelli, G. Biagioni, A. Monchetti, M. L. Ferreri, L. Butini, M. Montroni, A. Manzin and P. Bagnarelli (2011). "Molecular analysis of hepatitis B virus (HBV) in an HIV co-infected patient with reactivation of occult HBV infection following discontinuation of lamivudine-including antiretroviral therapy." *BMC Infect Dis* **11**: 310.
- Coursaget, P., B. Yvonnet, C. Bourdil, M. N. Mevelec, P. Adamowicz, J. L. Barres, J. Chotard, R. N'Doye, I. Diop Mar and J. P. Chiron (1987). "HBsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus." *Lancet* **2**(8572): 1354-8.
- Crowther, R. A., N. A. Kiselev, B. Bottcher, J. A. Berriman, G. P. Borisova, V. Ose and P. Pumpens (1994). "Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy." *Cell* **77**(6): 943-50.
- Cuestas, M. L., V. L. Mathet, V. Ruiz, M. L. Minassian, C. Rivero, A. Sala, D. Corach, A. Alessio, M. Pozzati, B. Frider and J. R. Oubina (2006). "Unusual naturally occurring humoral and cellular mutated epitopes of hepatitis B virus in a chronically infected argentine patient with anti-HBs antibodies." *J Clin Microbiol* **44**(6): 2191-8.
- Cuestas, M. L., C. W. Rivero, M. L. Minassian, A. I. Castillo, E. A. Gentile, J. Trinks, L. Leon, G. Daleoso, B. Frider, C. Lezama, M. Galoppo, G. Giacove, V. L. Mathet and J. R. Oubina (2010). "Naturally occurring hepatitis B virus (HBV) variants with primary resistance to antiviral therapy and S-mutants with potential primary resistance to adefovir in Argentina." *Antiviral Res* **87**(1): 74-7.
- Cui, C., J. Shi, L. Hui, H. Xi, Zhuoma, Quni, Tsedan and G. Hu (2002). "The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid." *J Gen Virol* **83**(Pt 11): 2773-7.
- Dane, D. S., C. H. Cameron and M. Briggs (1970). "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis." *Lancet* **1**(7649): 695-8.
- De Mitri, M. S., R. Cassini and M. Bernardi (2010). "Hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis: molecular oncogenic potential of clear or occult infections." *Eur J Cancer* **46**(12): 2178-86.
- Delaney, W. E. t., S. Locarnini and T. Shaw (2001). "Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation." *Antivir Chem Chemother* **12**(1): 1-35.
- Delaney, W. E. t., H. Yang, C. E. Westland, K. Das, E. Arnold, C. S. Gibbs, M. D. Miller and S. Xiong (2003). "The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro." *J Virol* **77**(21): 11833-41.
- Devesa, M. and F. H. Pujol (2007). "Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America." *Virus Res* **127**(2): 177-84.
- Di Lello, F. A., J. Macias, C. C. Cifuentes, J. Vargas, J. C. Palomares and J. A. Pineda (2011). "Low prevalence of occult HBV infection among HIV-infected patients in southern Spain." *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- Dienes, H. P., R. H. Purcell, H. Popper and A. Ponzetto (1990). "The significance of infections with two types of viral hepatitis demonstrated by histologic features in chimpanzees." *J Hepatol* **10**(1): 77-84.
- Doerr, H. W. and W. H. Gerlich (2002). *Medizinische Virologie*. Stuttgart, Allemagne, Thieme.

- Eble, B. E., D. R. MacRae, V. R. Lingappa and D. Ganem (1987). "Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen." *Mol Cell Biol* **7**(10): 3591-601.
- Eyre, N. S., R. J. Phillips, S. Bowden, E. Yip, B. Dewar, S. A. Locarnini and M. R. Beard (2009). "Hepatitis B virus and hepatitis C virus interaction in Huh-7 cells." *J Hepatol* **51**(3): 446-57.
- Fares, M. A. and E. C. Holmes (2002). "A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV)." *J Mol Evol* **54**(6): 807-14.
- Fernholz, D., M. Stemler, M. Brunetto, F. Bonino and H. Will (1991). "Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein." *J Hepatol* **13 Suppl 4**: S102-4.
- Ganem, D. and A. M. Prince (2004). "Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences." *N Engl J Med* **350**(11): 1118-29.
- Garmiri, P., A. Loua, N. Haba, D. Candotti and J. P. Allain (2009). "Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa." *J Gen Virol* **90**(Pt 10): 2442-51.
- Garmiri, P., H. Rezvan, H. Abolghasemi and J. P. Allain (2011). "Full genome characterization of hepatitis B virus strains from blood donors in Iran." *J Med Virol* **83**(6): 948-52.
- Gerken, G., D. Kremsdorf, F. Capel, M. A. Petit, C. Dauguet, M. P. Manns, K. H. Meyer zum Buschenfelde and C. Brechot (1991). "Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection." *Virology* **183**(2): 555-65.
- Gerlich, W. H., A. Uy, F. Lambrecht and R. Thomssen (1986). "Cutoff levels of immunoglobulin M antibody against viral core antigen for differentiation of acute, chronic, and past hepatitis B virus infections." *J Clin Microbiol* **24**(2): 288-93.
- Ghany, M. G., B. Ayola, F. G. Villamil, R. G. Gish, S. Rojter, J. M. Vierling and A. S. Lok (1998). "Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis." *Hepatology* **27**(1): 213-22.
- Glebe, D. and S. Urban (2007). "Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry." *World J Gastroenterol* **13**(1): 22-38.
- Grabarczyk, P., P. Garmiri, G. Liszewski, D. Doucet, E. Sulkowska, E. Brojer and J. P. Allain (2010). "Molecular and serological characterization of hepatitis B virus genotype A and D infected blood donors in Poland." *J Viral Hepat* **17**(6): 444-52.
- Grandjacques, C., P. Pradat, L. Stuyver, M. Chevallier, P. Chevallier, C. Pichoud, M. Maisonnas, C. Trepo and F. Zoulim (2000). "Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity." *J Hepatol* **33**(3): 430-9.
- Grethe, S., J. O. Heckel, W. Rietschel and F. T. Hufert (2000). "Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates." *J Virol* **74**(11): 5377-81.
- Grob, P., W. Jilg, H. Bornhak, G. Gerken, W. Gerlich, S. Gunther, G. Hess, H. Hudig, A. Kitchen, H. Margolis, G. Michel, C. Trepo, H. Will, A. Zanetti and I. Mushahwar (2000). "Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop." *J Med Virol* **62**(4): 450-5.
- Gunther, S. (2006). "Genetic variation in HBV infection: genotypes and mutants." *J Clin Virol* **36 Suppl 1**: S3-S11.
- Gunther, S., B. C. Li, S. Miska, D. H. Kruger, H. Meisel and H. Will (1995). "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* **69**(9): 5437-44.
- Gunther, S., N. Piwon, A. Iwanska, R. Schilling, H. Meisel and H. Will (1996). "Type, prevalence, and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease." *J Virol* **70**(12): 8318-31.
- Gunther, S., N. Piwon, A. Jung, A. Iwanska, H. Schmitz and H. Will (2000). "Enhanced replication contributes to enrichment of hepatitis B virus with a deletion in the core gene." *Virology* **273**(2): 286-99.
- Gunther, S., G. Sommer, A. Iwanska and H. Will (1997). "Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA." *Virology* **238**(2): 363-71.

- Gutierrez, C., M. Devesa, C. L. Loureiro, G. Leon, F. Liprandi and F. H. Pujol (2004). "Molecular and serological evaluation of surface antigen negative hepatitis B virus infection in blood donors from Venezuela." *J Med Virol* **73**(2): 200-7.
- Hadziyannis, S. J. and D. Vassilopoulos (2001). "Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B." *Hepatology* **34**(4 Pt 1): 617-24.
- Hannoun, C., K. Krogsgaard, P. Horal and M. Lindh (2002). "Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon." *J Infect Dis* **186**(6): 752-9.
- Hannoun, C., H. Norder and M. Lindh (2000). "An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam." *J Gen Virol* **81**(Pt 9): 2267-72.
- Hannoun, C., A. Soderstrom, G. Norkrans and M. Lindh (2005). "Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences." *J Gen Virol* **86**(Pt 8): 2163-7.
- Hass, M., C. Hannoun, T. Kalinina, G. Sommer, C. Manegold and S. Gunther (2005). "Functional analysis of hepatitis B virus reactivating in hepatitis B surface antigen-negative individuals." *Hepatology* **42**(1): 93-103.
- Heermann, K. H., U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten and W. H. Gerlich (1984). "Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence." *J Virol* **52**(2): 396-402.
- Heise, T., G. Sommer, K. Reumann, I. Meyer, H. Will and H. Schaal (2006). "The hepatitis B virus PRE contains a splicing regulatory element." *Nucleic Acids Res* **34**(1): 353-63.
- Henke-Gendo, C., S. Amini-Bavil-Olyae, D. Challapalli, C. Trautwein, H. Deppe, T. F. Schulz, A. Heim and F. Tacke (2008). "Symptomatic hepatitis B virus (HBV) reactivation despite reduced viral fitness is associated with HBV test and immune escape mutations in an HIV-coinfected patient." *J Infect Dis* **198**(11): 1620-4.
- Hillebrand-Haverkort, M. E., M. F. Prummel and J. H. ten Veen (1999). "Ritonavir-induced Cushing's syndrome in a patient treated with nasal fluticasone." *AIDS* **13**(13): 1803.
- Hollinger, F. B. and G. Sood (2010) "Occult hepatitis B virus infection: a covert operation." *J Viral Hepat* **17**(1): 1-15.
- Hu, K. Q. (2002). "Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications." *J Viral Hepat* **9**(4): 243-57.
- Hubschen, J. M., P. O. Mbah, J. C. Forbi, J. A. Otegbayo, C. M. Olinger, E. Charpentier and C. P. Muller (2011) "Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria." *Clin Microbiol Infect* **17**(1): 88-94.
- Hubschen, J. M., J. Mugabo, C. A. Peltier, J. C. Karasi, A. Sausy, P. Kirpach, V. Arendt and C. P. Muller (2009). "Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide." *J Med Virol* **81**(3): 435-40.
- Huovila, A. P., A. M. Eder and S. D. Fuller (1992). "Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment." *J Cell Biol* **118**(6): 1305-20.
- Ijaz, S., F. Torre, R. S. Tedder, R. Williams and N. V. Naoumov (2001). "Novel immunoassay for the detection of hepatitis B surface 'escape' mutants and its application in liver transplant recipients." *J Med Virol* **63**(3): 210-6.
- Ikeda, K., M. Kobayashi, T. Someya, S. Saitoh, T. Hosaka, N. Akuta, F. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Arase and H. Kumada (2009). "Occult hepatitis B virus infection increases hepatocellular carcinogenesis by eight times in patients with non-B, non-C liver cirrhosis: a cohort study." *J Viral Hepat* **16**(6): 437-43.
- Ireland, J. H., B. O'Donnell, A. A. Basuni, J. D. Kean, L. A. Wallace, G. K. Lau and W. F. Carman (2000). "Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays." *Hepatology* **31**(5): 1176-82.
- Jack, A. D., A. J. Hall, N. Maine, M. Mendy and H. C. Whittle (1999). "What level of hepatitis B antibody is protective?" *J Infect Dis* **179**(2): 489-92.
- Jammeh, S., F. Tavner, R. Watson, H. C. Thomas and P. Karayiannis (2008). "Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication." *J Gen Virol* **89**(Pt 4): 901-9.
- Jazayeri, S. M., S. M. Alavian and W. F. Carman (2010) "Hepatitis B virus: origin and evolution." *J Viral Hepat* **17**(4): 229-35.

- Jeantet, D., I. Chemin, B. Mandrand, A. Tran, F. Zoulim, P. Merle, C. Trepo and A. Kay (2004). "Cloning and expression of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays." J Med Virol **73**(4): 508-15.
- Jeantet, D., I. Chemin, B. Mandrand, F. Zoulim, C. Trepo and A. Kay (2002). "Characterization of two hepatitis B virus populations isolated from a hepatitis B surface antigen-negative patient." Hepatology **35**(5): 1215-24.
- Josephson, F. (2010) "Drug-drug interactions in the treatment of HIV infection: focus on pharmacokinetic enhancement through CYP3A inhibition." J Intern Med **268**(6): 530-9.
- Josephson, F. (2010). "Drug-drug interactions in the treatment of HIV infection: focus on pharmacokinetic enhancement through CYP3A inhibition." J Intern Med **268**(6): 530-9.
- Kao, J. H., P. J. Chen, M. Y. Lai and D. S. Chen (2002). "Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C." J Clin Microbiol **40**(11): 4068-71.
- Karthigesu, V. D., L. M. Allison, M. Fortuin, M. Mendy, H. C. Whittle and C. R. Howard (1994). "A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children." J Gen Virol **75** (Pt 2): 443-8.
- Kato, H., E. Orito, R. G. Gish, N. Bzowej, M. Newsom, F. Sugauchi, S. Suzuki, R. Ueda, Y. Miyakawa and M. Mizokami (2002). "Hepatitis B e antigen in sera from individuals infected with hepatitis B virus of genotype G." Hepatology **35**(4): 922-9.
- Kay, A. (2006). Le virus, sa structure, son cycle. Hépatites virales B et C. C. Trépo, P. Merle and F. Zoulim. Paris, John Libby Eurotext.
- Kay, A., E. Mandart, C. Trepo and F. Galibert (1985). "The HBV HBX gene expressed in E. coli is recognised by sera from hepatitis patients." EMBO J **4**(5): 1287-92.
- Kay, A. and F. Zoulim (2007). "Hepatitis B virus genetic variability and evolution." Virus Res **127**(2): 164-76.
- Kidd-Ljunggren, K., A. Holmberg, J. Blackberg and B. Lindqvist (2006). "High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers." J Hosp Infect **64**(4): 352-7.
- Kidd-Ljunggren, K., Y. Miyakawa and A. H. Kidd (2002). "Genetic variability in hepatitis B viruses." J Gen Virol **83**(Pt 6): 1267-80.
- Kim, K. H., K. H. Lee, H. Y. Chang, S. H. Ahn, S. Tong, Y. J. Yoon, B. L. Seong, S. I. Kim and K. H. Han (2003). "Evolution of hepatitis B virus sequence from a liver transplant recipient with rapid breakthrough despite hepatitis B immune globulin prophylaxis and lamivudine therapy." J Med Virol **71**(3): 367-75.
- Kimbi, G. C., A. Kramvis and M. C. Kew (2005). "Integration of hepatitis B virus DNA into chromosomal DNA during acute hepatitis B." World J Gastroenterol **11**(41): 6416-21.
- Kobayashi, M., F. Suzuki, N. Akuta, A. Tsubota, K. Ikeda, Y. Arase, Y. Suzuki, S. Saitoh, T. Hosaka, T. Someya, M. Matsuda, J. Sato, Y. Miyakawa and H. Kumada (2005). "Virological differences between patients infected with subtypes Ba and Bj of hepatitis B virus genotype B." J Gastroenterol Hepatol **20**(4): 570-6.
- Koblin, B. A., P. E. Taylor, P. Rubinstein and C. E. Stevens (1992). "Effect of duration of hepatitis B virus infection on the association between human immunodeficiency virus type-1 and hepatitis B viral replication." Hepatology **15**(4): 590-2.
- Kock, J., M. Nassal, K. Deres, H. E. Blum and F. von Weizsacker (2004). "Hepatitis B virus nucleocapsids formed by carboxy-terminally mutated core proteins contain spliced viral genomes but lack full-size DNA." J Virol **78**(24): 13812-8.
- Kock, J., C. Rosler, J. J. Zhang, H. E. Blum, M. Nassal and C. Thoma (2010) "Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner." PLoS Pathog **6**(9): e1001082.
- Kock, J. and H. J. Schlicht (1993). "Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity." J Virol **67**(8): 4867-74.
- Koff, R. S. (1987). "Fulminant hepatitis due to HBV/HDV coinfection." Hosp Pract (Off Ed) **22**(11): 123-30, 139-40, 145-50 passim.
- Koike, K., M. Kobayashi, M. Gondo, I. Hayashi, T. Osuga and S. Takada (1998). "Hepatitis B virus DNA is frequently found in liver biopsy samples from hepatitis C virus-infected chronic hepatitis patients." J Med Virol **54**(4): 249-55.

- Koike, K., K. Yasuda, H. Yotsuyanagi, K. Moriya, K. Hino, K. Kurokawa and S. Iino (1995). "Dominant replication of either virus in dual infection with hepatitis viruses B and C." *J Med Virol* **45**(2): 236-9.
- Korba, B. E., P. J. Cote and J. L. Gerin (1988). "Mitogen-induced replication of woodchuck hepatitis virus in cultured peripheral blood lymphocytes." *Science* **241**(4870): 1213-6.
- Kozak, M. (1999). "Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes." *Gene* **234**(2): 187-208.
- Koziol, D. E., H. J. Alter, J. P. Kirchner and P. V. Holland (1976). "The development of HBsAg-positive hepatitis despite the previous existence of antibody to HBsAg." *J Immunol* **117**(6): 2260-2.
- Kramvis, A., K. Arakawa, M. C. Yu, R. Nogueira, D. O. Stram and M. C. Kew (2008). "Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus." *J Med Virol* **80**(1): 27-46.
- Kramvis, A. and M. C. Kew (1998). "Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae." *J Viral Hepat* **5**(6): 357-67.
- Kremsdorf, D., F. Garreau, F. Capel, M. A. Petit and C. Brechot (1996). "In vivo selection of a hepatitis B virus mutant with abnormal viral protein expression." *J Gen Virol* **77** (Pt 5): 929-39.
- Kurbanov, F., Y. Tanaka, K. Fujiwara, F. Suguchi, D. Mbanya, L. Zekeng, N. Ndembi, C. Ngansop, L. Kaptue, T. Miura, E. Ido, M. Hayami, H. Ichimura and M. Mizokami (2005). "A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon." *J Gen Virol* **86**(Pt 7): 2047-56.
- Kurbanov, F., Y. Tanaka, A. Kramvis, P. Simmonds and M. Mizokami (2008). "When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype?" *J Virol* **82**(16): 8241-2.
- Lai, C. L., J. Dienstag, E. Schiff, N. W. Leung, M. Atkins, C. Hunt, N. Brown, M. Woessner, R. Boehme and L. Condreay (2003). "Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B." *Clin Infect Dis* **36**(6): 687-96.
- Lam, K. C., C. L. Lai, R. P. Ng, C. Treppe and P. C. Wu (1981). "Deleterious Effect of Prednisolone in HBsAg-positive Chronic Active Hepatitis." *New England Journal of Medicine* **304**(7): 380-386.
- Lambert, C. and R. Prange (2001). "Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation." *J Biol Chem* **276**(25): 22265-72.
- Lambert, V., L. Cova, P. Chevallier, R. Mehrotra and C. Treppe (1991). "Natural and experimental infection of wild mallard ducks with duck hepatitis B virus." *J Gen Virol* **72** (Pt 2): 417-20.
- Lanford, R. E., D. Chavez, R. Rico-Hesse and A. Mootnick (2000). "Hepadnavirus infection in captive gibbons." *J Virol* **74**(6): 2955-9.
- Le Bouvier, G. L., R. A. Capper, A. E. Williams, M. Pelletier and A. J. Katz (1976). "Concurrently circulating hepatitis B surface antigen and heterotypic anti-HBs antibody." *J Immunol* **117**(6): 2262-4.
- Le Duff, Y., M. Blanchet and C. Sureau (2009). "The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent." *J Virol* **83**(23): 12443-51.
- Le Pogam, S., P. K. Chua, M. Newman and C. Shih (2005). "Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165-173)." *J Virol* **79**(3): 1871-87.
- Le Pogam, S., T. T. Yuan, G. K. Sahu, S. Chatterjee and C. Shih (2000). "Low-level secretion of human hepatitis B virus virions caused by two independent, naturally occurring mutations (P5T and L60V) in the capsid protein." *J Virol* **74**(19): 9099-105.
- Lee, C. M., C. H. Chen, S. N. Lu, H. D. Tung, W. J. Chou, J. H. Wang, T. M. Chen, C. H. Hung, C. C. Huang and W. J. Chen (2003). "Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan." *Scand J Gastroenterol* **38**(1): 95-101.
- Lee, W. M. (1997). "Hepatitis B virus infection." *N Engl J Med* **337**(24): 1733-45.
- Lepere, C., M. Regard, J. Le Seyec and P. Gripon (2007). "The translocation motif of hepatitis B virus envelope proteins is dispensable for infectivity." *J Virol* **81**(14): 7816-8.
- Li, H. C., E. Y. Huang, P. Y. Su, S. Y. Wu, C. C. Yang, Y. S. Lin, W. C. Chang and C. Shih (2010). "Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles." *PLoS Pathog* **6**(10): e1001162.
- Liaw, Y. F., M. R. Brunetto and S. Hadziyannis (2010). "The natural history of chronic HBV infection and geographical differences." *Antivir Ther* **15** Suppl 3: 25-33.

- Lien, J. M., C. E. Aldrich and W. S. Mason (1986). "Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis." *J Virol* **57**(1): 229-36.
- Lin, X., Z. M. Ma, X. Yao, Y. P. Zhang and Y. M. Wen (2002). "Replication efficiency and sequence analysis of full-length hepatitis B virus isolates from hepatocellular carcinoma tissues." *Int J Cancer* **102**(5): 487-91.
- Livingston, S. E., J. P. Simonetti, B. J. McMahon, L. R. Bulkow, K. J. Hurlburt, C. E. Homan, M. M. Snowball, H. H. Cagle, J. L. Williams and V. P. Chulanov (2007). "Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F." *J Infect Dis* **195**(1): 5-11.
- Lu, C. C., M. Chen, J. H. Ou and T. S. Yen (1995). "Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression." *Virology* **206**(2): 1155-8.
- Lu, X. and T. Block (2004). "Study of the early steps of the Hepatitis B Virus life cycle." *Int J Med Sci* **1**(1): 21-33.
- Lu, X., A. Mehta, R. Dwek, T. Butters and T. Block (1995). "Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion." *Virology* **213**(2): 660-5.
- Manegold, C., C. Hannoun, A. Wywiol, M. Dietrich, S. Polywka, C. B. Chiwakata and S. Gunther (2001). "Reactivation of hepatitis B virus replication accompanied by acute hepatitis in patients receiving highly active antiretroviral therapy." *Clin Infect Dis* **32**(1): 144-8.
- Mangold, C. M., F. Unckell, M. Werr and R. E. Streeck (1997). "Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles." *Arch Virol* **142**(11): 2257-67.
- Margeridon, S., S. Carrouee-Durantal, I. Chemin, L. Barraud, F. Zoulim, C. Trepo and A. Kay (2008). "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* **52**(9): 3068-73.
- Margeridon, S., A. Lachaux, C. Trepo, F. Zoulim and A. Kay (2005). "A quasi-monoclonal anti-HBs response can lead to immune escape of 'wild-type' hepatitis B virus." *J Gen Virol* **86**(Pt 6): 1687-93.
- Marschenz, S., A. Brinckmann, P. Nurnberg, D. H. Kruger, S. Gunther and H. Meisel (2008). "Co-replication analyses of naturally occurring defective hepatitis B virus variants with wild-type." *Virology* **372**(2): 247-59.
- Marschenz, S., A. S. Endres, A. Brinckmann, T. Heise, G. Kristiansen, P. Nurnberg, D. H. Kruger, S. Gunther and H. Meisel (2006). "Functional analysis of complex hepatitis B virus variants associated with development of liver cirrhosis." *Gastroenterology* **131**(3): 765-80.
- Mason, W. S., G. Seal and J. Summers (1980). "Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus." *J Virol* **36**(3): 829-36.
- Mazet-Wagner, A. A., M. C. Baclet, V. Loustaud-Ratti, F. Denis and S. Alain (2006). "Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus total DNA and covalently closed circular DNA in peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B virus-infected patients." *J Virol Methods* **138**(1-2): 70-9.
- McMahon, B. J. (2009). "The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B." *Hepatol Int* **3**(2): 334-42.
- McMahon, B. J. (2009). "The natural history of chronic hepatitis B virus infection." *Hepatology* **49**(5 Suppl): S45-55.
- Meldal, B. H., A. H. Bon, D. Prati, Y. Ayob and J. P. Allain (2011) "Diversity of hepatitis B virus infecting Malaysian candidate blood donors is driven by viral and host factors." *J Viral Hepat* **18**(2): 91-101.
- Meldal, B. H., N. M. Moula, I. H. Barnes, K. Boukef and J. P. Allain (2009). "A novel hepatitis B virus subgenotype, D7, in Tunisian blood donors." *J Gen Virol* **90**(Pt 7): 1622-8.
- Michalak, T. I. (2000). "Occult persistence and lymphotropism of hepadnaviral infection: insights from the woodchuck viral hepatitis model." *Immunol Rev* **174**: 98-111.
- Michel, M. L., H. L. Davis, M. Schleef, M. Mancini, P. Tiollais and R. G. Whalen (1995). "DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5307-11.

- Milich, D. and T. J. Liang (2003). "Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection." *Hepatology* **38**(5): 1075-86.
- Milich, D. R., M. K. Chen, J. L. Hughes and J. E. Jones (1998). "The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence." *J Immunol* **160**(4): 2013-21.
- Minami, M., Y. Daimon, K. Mori, H. Takashima, T. Nakajima, Y. Itoh and T. Okanoue (2005). "Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis." *Oncogene* **24**(27): 4340-8.
- Molnar-Kimber, K. L., J. Summers, J. M. Taylor and W. S. Mason (1983). "Protein covalently bound to minus-strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus." *J Virol* **45**(1): 165-72.
- Moolla, N., M. Kew and P. Arbuthnot (2002). "Regulatory elements of hepatitis B virus transcription." *J Viral Hepat* **9**(5): 323-31.
- Motta-Castro, A. R., R. M. Martins, N. M. Araujo, C. Niel, G. B. Facholi, B. V. Lago, F. C. Mello and S. A. Gomes (2008). "Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community." *Arch Virol* **153**(12): 2197-205.
- Motta, J. S., F. C. Mello, B. V. Lago, R. M. Perez, S. A. Gomes and F. F. Figueiredo (2010) "Occult hepatitis B virus infection and lamivudine-resistant mutations in isolates from renal patients undergoing hemodialysis." *J Gastroenterol Hepatol* **25**(1): 101-6.
- Mrani, S., I. Chemin, K. Menouar, O. Guillaud, P. Pradat, G. Borghi, M. A. Trabaud, P. Chevallier, M. Chevallier, F. Zoulim and C. Trepo (2007). "Occult HBV infection may represent a major risk factor of non-response to antiviral therapy of chronic hepatitis C." *J Med Virol* **79**(8): 1075-81.
- Mulyanto, S. N. Depamede, A. Wahyono, Jirintai, S. Nagashima, M. Takahashi and H. Okamoto (2011) "Analysis of the full-length genomes of novel hepatitis B virus subgenotypes C11 and C12 in Papua, Indonesia." *J Med Virol* **83**(1): 54-64.
- Mulyanto, P. Pancawardani, S. N. Depamede, A. Wahyono, S. Jirintai, S. Nagashima, M. Takahashi, T. Nishizawa and H. Okamoto (2012) "Identification of four novel subgenotypes (C13-C16) and two inter-genotypic recombinants (C12/G and C13/B3) of hepatitis B virus in Papua Province, Indonesia." *Virus Res* **163**(1): 129-40.
- Murakami, Y., M. Minami, Y. Daimon and T. Okanoue (2004). "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* **72**(2): 203-14.
- Nassal, M. (2008). "Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way." *Virus Res* **134**(1-2): 235-49.
- Nguyen, D. H., L. Ludgate and J. Hu (2008). "Hepatitis B virus-cell interactions and pathogenesis." *J Cell Physiol* **216**(2): 289-94.
- Norder, H., A. M. Courouce, P. Coursaget, J. M. Echevarria, S. D. Lee, I. K. Mushahwar, B. H. Robertson, S. Locarnini and L. O. Magnius (2004). "Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes." *Intervirology* **47**(6): 289-309.
- Norder, H., A. M. Courouce and L. O. Magnius (1994). "Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes." *Virology* **198**(2): 489-503.
- Nowicki, M. J., M. J. Tong, P. V. Nair and D. Stevenson (1984). "Detection of anti-HBc IgM following prednisone treatment in patients with chronic active hepatitis B virus infection." *Hepatology* **4**(6): 1129-33.
- Nurainy, N., D. H. Muljono, H. Sudoyo and S. Marzuki (2008). "Genetic study of hepatitis B virus in Indonesia reveals a new subgenotype of genotype B in east Nusa Tenggara." *Arch Virol* **153**(6): 1057-65.
- Okamoto, H., M. Imai, F. Tsuda, T. Tanaka, Y. Miyakawa and M. Mayumi (1987). "Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr." *J Virol* **61**(10): 3030-4.
- Okamoto, H., F. Tsuda, H. Sakugawa, R. I. Sastrosoewignjo, M. Imai, Y. Miyakawa and M. Mayumi (1988). "Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes." *J Gen Virol* **69** (Pt 10): 2575-83.

- Olinger, C. M., P. Jutavijittum, J. M. Hubschen, A. Yousukh, B. Samounry, T. Thammavong, K. Toriyama and C. P. Muller (2008). "Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia." Emerg Infect Dis **14**(11): 1777-80.
- Olinger, C. M., V. Venard, M. Njayou, A. O. Oyefolu, I. Maiga, A. J. Kemp, S. A. Omilabu, A. le Faou and C. P. Muller (2006). "Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations." J Gen Virol **87**(Pt 5): 1163-73.
- Oon, C. J., W. N. Chen, K. S. Goo and K. T. Goh (2000). "Intra-familial evidence of horizontal transmission of hepatitis B virus surface antigen mutant G145R." J Infect **41**(3): 260-4.
- Parekh, S., F. Zoulim, S. H. Ahn, A. Tsai, J. Li, S. Kawai, N. Khan, C. Trepo, J. Wands and S. Tong (2003). "Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants." J Virol **77**(12): 6601-12.
- Park, G. S., H. Y. Kim, H. S. Shin, S. Park, H. J. Shin and K. Kim (2008). "Modulation of hepatitis B virus replication by expression of polymerase-surface fusion protein through splicing: implications for viral persistence." Virus Res **136**(1-2): 166-74.
- Park, S. G., Y. Kim, E. Park, H. M. Ryu and G. Jung (2003). "Fidelity of hepatitis B virus polymerase." Eur J Biochem **270**(14): 2929-36.
- Parvez, M. K., V. Thakur, S. N. Kazim, R. C. Guptan, S. E. Hasnain and S. K. Sarin (2001). "Base-pair alterations in the epsilon-lower stem due to a novel double substitution in the precore gene of HBV-e negative variant were recovered by secondary mutations." Virus Genes **23**(3): 315-20.
- Patzel, V. and G. Sczakiel (1997). "The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element contains a highly stable RNA secondary structure." Biochem Biophys Res Commun **231**(3): 864-7.
- Pawlotsky, J. M. (2005). "The concept of hepatitis B virus mutant escape." J Clin Virol **34 Suppl 1**: S125-9.
- Perronne, C. (2006). "Antiviral hepatitis and antiretroviral drug interactions." J Hepatol **44**(1 Suppl): S119-25.
- Persson, B. and P. Argos (1994). "Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments." J Mol Biol **237**(2): 182-92.
- Peterson, D. L., N. Nath and F. Gavilanes (1982). "Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety." J Biol Chem **257**(17): 10414-20.
- Pollicino, T., L. Belloni, G. Raffa, N. Pediconi, G. Squadrito, G. Raimondo and M. Levrero (2006). "Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones." Gastroenterology **130**(3): 823-37.
- Pollicino, T., G. Squadrito, G. Cerenzia, I. Cacciola, G. Raffa, A. Craxi, F. Farinati, G. Missale, A. Smedile, C. Tiribelli, E. Villa and G. Raimondo (2004). "Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection." Gastroenterology **126**(1): 102-10.
- Pontisso, P., M. G. Ruvoletto, G. Fattovich, L. Chemello, A. Gallorini, A. Ruol and A. Alberti (1993). "Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis virus infections." Gastroenterology **105**(5): 1529-33.
- Pontisso, P., L. Vidalino, S. Quarta and A. Gatta (2008). "Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells." Autoimmun Rev **8**(1): 13-7.
- Pothoff, A., M. P. Manns and H. Wedemeyer (2010) "Treatment of HBV/HCV coinfection." Expert Opin Pharmacother **11**(6): 919-28.
- Preikschat, P., S. Gunther, S. Reinhold, H. Will, K. Budde, H. H. Neumayer, D. H. Kruger and H. Meisel (2002). "Complex HBV populations with mutations in core promoter, C gene, and pre-S region are associated with development of cirrhosis in long-term renal transplant recipients." Hepatology **35**(2): 466-77.
- Protzer-Knolle, U., U. Naumann, R. Bartenschlager, T. Berg, U. Hopf, K. H. Meyer zum Buschenfelde, P. Neuhaus and G. Gerken (1998). "Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation." Hepatology **27**(1): 254-63.
- Protzer, U. and H. Schaller (2000). "Immune escape by hepatitis B viruses." Virus Genes **21**(1-2): 27-37.

- Pumpens, P. and E. Grens (2001). "HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes." *Intervirology* **44**(2-3): 98-114.
- Radziwill, G., W. Tucker and H. Schaller (1990). "Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity." *J Virol* **64**(2): 613-20.
- Raimondo, G., J. P. Allain, M. R. Brunetto, M. A. Buendia, D. S. Chen, M. Colombo, A. Craxi, F. Donato, C. Ferrari, G. B. Gaeta, W. H. Gerlich, M. Levrero, S. Locarnini, T. Michalak, M. U. Mondelli, J. M. Pawlotsky, T. Pollicino, D. Prati, M. Puoti, D. Samuel, D. Shouval, A. Smedile, G. Squadrito, C. Trepo, E. Villa, H. Will, A. R. Zanetti and F. Zoulim (2008). "Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection." *J Hepatol* **49**(4): 652-7.
- Raimondo, G., L. Costantino, G. Caccamo, T. Pollicino, G. Squadrito, I. Cacciola and S. Brancatelli (2004). "Non-sequencing molecular approaches to identify preS2-defective hepatitis B virus variants proved to be associated with severe liver diseases." *J Hepatol* **40**(3): 515-9.
- Raimondo, G., G. Navarra, S. Mondello, L. Costantino, G. Colloredo, E. Cucinotta, G. Di Vita, C. Scisca, G. Squadrito and T. Pollicino (2008). "Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease." *J Hepatol* **48**(5): 743-6.
- Raimondo, G., T. Pollicino, I. Cacciola and G. Squadrito (2007). "Occult hepatitis B virus infection." *J Hepatol* **46**(1): 160-70.
- Ramezani, A., M. Banifazl, A. Eslamifar and A. Aghakhani (2010) "Serological pattern of anti-HBc alone infers occult hepatitis B virus infection in high-risk individuals in Iran." *J Infect Dev Ctries* **4**(10): 658-61.
- Ramezani, A., M. Banifazl, M. Mohraz, M. Rasoolinejad and A. Aghakhani (2011) "Occult hepatitis B virus infection: A major concern in HIV-infected patients: Occult HBV in HIV." *Hepat Mon* **11**(1): 7-10.
- Robertson, B. H. and H. S. Margolis (2002). "Primate hepatitis B viruses - genetic diversity, geography and evolution." *Rev Med Virol* **12**(3): 133-41.
- Rodella, A., C. Galli, L. Terlenghi, F. Perandin, C. Bonfanti and N. Manca (2006). "Quantitative analysis of HBsAg, IgM anti-HBc and anti-HBc avidity in acute and chronic hepatitis B." *J Clin Virol* **37**(3): 206-12.
- Rosmorduc, O., M. A. Petit, S. Pol, F. Capel, F. Bortolotti, P. Berthelot, C. Brechot and D. Kremsdorf (1995). "In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA." *Hepatology* **22**(1): 10-9.
- Sa-Nguanmoo, P., Y. Tanaka, P. Ratanakorn, M. Sugiyama, S. Murakami, S. Payungporn, A. Sommanustweechai, M. Mizokami and Y. Poovorawan (2011) "Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes." *Virus Res* **158**(1-2): 209-15.
- Sagnelli, E., G. Manzillo, G. Maio, G. Pasquale, F. M. Felaco, P. Filippini, C. M. Izzo and F. Piccinino (1980). "Serum levels of hepatitis B surface and core antigens during immunosuppressive treatment of HBsAg-positive chronic active hepatitis." *Lancet* **2**(8191): 395-7.
- Sakamoto, T., Y. Tanaka, J. Simonetti, C. Osioy, M. L. Borresen, A. Koch, F. Kurbanov, M. Sugiyama, G. Y. Minuk, B. J. McMahon, T. Joh and M. Mizokami (2007). "Classification of hepatitis B virus genotype B into 2 major types based on characterization of a novel subgenotype in Arctic indigenous populations." *J Infect Dis* **196**(10): 1487-92.
- Salisse, J. and C. Sureau (2009). "A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus "a" determinant." *J Virol* **83**(18): 9321-8.
- Santos, E. A., C. F. Yoshida, V. C. Rolla, J. M. Mendes, I. F. Vieira, J. Arabe and S. A. Gomes (2003). "Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**(2): 92-8.
- Sasaki, T., Y. Ohkubo, Y. Yamashita, M. Imai and Y. Miyakawa (1976). "Co-occurrence of hepatitis B surface antigen of a particular subtype and antibody to a heterologous subtypic specificity in the same serum." *J Immunol* **117**(6): 2258-9.
- Sayiner, A. A., H. Agca, A. Sengonul, A. Celik and M. Akarsu (2007). "A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient." *J Clin Virol* **38**(2): 157-60.

- Scaglioni, P. P., M. Melegari and J. R. Wands (1997). "Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame." *Virology* **233**(2): 374-81.
- Schaefer, S. (2007). "Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes." *World J Gastroenterol* **13**(1): 14-21.
- Scheiblaue, H., M. El-Nageh, S. Diaz, S. Nick, H. Zeichhardt, H. P. Grunert and A. Prince (2010) "Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes." *Vox Sang* **98**(3 Pt 2): 403-14.
- Schieck, A., T. Muller, A. Schulze, U. Haberkorn, S. Urban and W. Mier (2010) "Solid-phase synthesis of the lipopeptide Myr-HBVpreS/2-78, a hepatitis B virus entry inhibitor." *Molecules* **15**(7): 4773-83.
- Schirmer, P., M. Winters and M. Holodniy (2011) "HIV-HBV vaccine escape mutant infection with loss of HBV surface antibody and persistent HBV viremia on tenofovir/emtricitabine without antiviral resistance." *J Clin Virol* **52**(3): 261-4.
- Schuttler, C. G., N. Fiedler, K. Schmidt, R. Repp, W. H. Gerlich and S. Schaefer (2002). "Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein." *J Hepatol* **37**(6): 855-62.
- Seeger, C. and W. S. Mason (2000). "Hepatitis B virus biology." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(1): 51-68.
- Seo, D. H., D. H. Whang, E. Y. Song, H. S. Kim and Q. Park (2011) "Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen and occult hepatitis B virus infections in Korean blood donors." *Transfusion* **51**(8): 1840-6.
- Sheldon, J., N. Camino, B. Rodes, A. Bartholomeusz, M. Kuiper, F. Tacke, M. Nunez, S. Mauss, T. Lutz, G. Klausen, S. Locarnini and V. Soriano (2005). "Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir." *Antivir Ther* **10**(6): 727-34.
- Sheldon, J. and V. Soriano (2008). "Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy." *J Antimicrob Chemother* **61**(4): 766-8.
- Shetty, K., M. Hussain, L. Nei, K. R. Reddy and A. S. Lok (2008). "Prevalence and significance of occult hepatitis B in a liver transplant population with chronic hepatitis C." *Liver Transpl* **14**(4): 534-40.
- Shih, C. M., S. J. Lo, T. Miyamura, S. Y. Chen and Y. H. Lee (1993). "Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells." *J Virol* **67**(10): 5823-32.
- Shiraki, K., H. Ochiai, S. Matsui, N. Aiba, Y. Yoshida, T. Okuno, K. Yamanishi and M. Takahashi (1992). "Processing of hepatitis B virus surface antigen expressed by recombinant Oka varicella vaccine virus." *J Gen Virol* **73** (Pt 6): 1401-7.
- Siddiqui, A., S. Jameel and J. Mapoles (1986). "Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(3): 566-70.
- Simmonds, P. (2001). "The origin and evolution of hepatitis viruses in humans." *J Gen Virol* **82**(Pt 4): 693-712.
- Simmonds, P. and S. Midgley (2005). "Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes." *J Virol* **79**(24): 15467-76.
- Sommer, G. and T. Heise (2008). "Posttranscriptional control of HBV gene expression." *Front Biosci* **13**: 5533-47.
- Song, E. Y., Y. M. Yun, M. H. Park and D. H. Seo (2009). "Prevalence of occult hepatitis B virus infection in a general adult population in Korea." *Intervirology* **52**(2): 57-62.
- Soussan, P., F. Garreau, H. Zylberberg, C. Ferray, C. Brechot and D. Kremsdorf (2000). "In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA." *J Clin Invest* **105**(1): 55-60.
- Soussan, P., R. Tiveri, B. Nalpas, F. Garreau, F. Zavala, A. Masson, S. Pol, C. Brechot and D. Kremsdorf (2003). "The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis." *J Hepatol* **38**(3): 343-8.
- Stahl, M., J. Beck and M. Nassal (2007). "Chaperones activate hepadnavirus reverse transcriptase by transiently exposing a C-proximal region in the terminal protein domain that contributes to epsilon RNA binding." *J Virol* **81**(24): 13354-64.

- Stibbe, W. and W. H. Gerlich (1983). "Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen." J Virol **46**(2): 626-8.
- Sturmer, M., H. W. Doerr and L. Gurtler (2009). "Human immunodeficiency virus: 25 years of diagnostic and therapeutic strategies and their impact on hepatitis B and C virus." Med Microbiol Immunol **198**(3): 147-55.
- Stuyver, L., S. De Gendt, C. Van Geyt, F. Zoulim, M. Fried, R. F. Schinazi and R. Rossau (2000). "A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness." J Gen Virol **81**(Pt 1): 67-74.
- Stuyver, L. J., S. A. Locarnini, A. Lok, D. D. Richman, W. F. Carman, J. L. Dienstag and R. F. Schinazi (2001). "Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region." Hepatology **33**(3): 751-7.
- Sucupira, M. V., F. C. Mello, E. A. Santos, C. Niel, V. C. Rolla, J. Arabe and S. A. Gomes (2006). "Patterns of hepatitis B virus infection in Brazilian human immunodeficiency virus infected patients: high prevalence of occult infection and low frequency of lamivudine resistant mutations." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(6): 655-60.
- Sugauchi, F., E. Orito, T. Ichida, H. Kato, H. Sakugawa, S. Kakumu, T. Ishida, A. Chutaputti, C. L. Lai, R. Ueda, Y. Miyakawa and M. Mizokami (2002). "Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene." J Virol **76**(12): 5985-92.
- Sugauchi, F., E. Orito, T. Ohno, Y. Tanaka, A. Ozasa, J. H. Kang, J. Toyoda, T. Kuramitsu, K. Suzuki, E. Tanaka, Y. Akahane, T. Ichida, N. Izumi, K. Inoue, H. Hoshino, S. Iino, H. Yotsuyanagi, S. Kakumu, E. Tomita, T. Okanoue, S. Nishiguchi, Y. Murawaki, K. Hino, M. Onji, H. Yatsuhashi, M. Sata, Y. Miyakawa, R. Ueda and M. Mizokami (2006). "Spatial and chronological differences in hepatitis B virus genotypes from patients with acute hepatitis B in Japan." Hepatol Res **36**(2): 107-114.
- Summers, J., J. M. Smolec and R. Snyder (1978). "A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(9): 4533-7.
- Swenson, P. D., M. R. Escobar, R. L. Carithers, Jr. and T. J. Sobieski, 3rd (1983). "Failure of preexisting antibody against hepatitis B surface antigen to prevent subsequent hepatitis B infection." J Clin Microbiol **18**(2): 305-9.
- Tatematsu, K., Y. Tanaka, F. Kurbanov, F. Sugauchi, S. Mano, T. Maeshiro, T. Nakayoshi, M. Wakuta, Y. Miyakawa and M. Mizokami (2009). "A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J." J Virol **83**(20): 10538-47.
- Thedja, M. D., D. H. Muljono, N. Nurainy, C. H. Sukowati, J. Verhoef and S. Marzuki (2011). "Ethnogeographical structure of hepatitis B virus genotype distribution in Indonesia and discovery of a new subgenotype, B9." Arch Virol **156**(5): 855-68.
- Torbenson, M. and D. L. Thomas (2002). "Occult hepatitis B." Lancet Infect Dis **2**(8): 479-86.
- Torresi, J. (2002). "The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus." J Clin Virol **25**(2): 97-106.
- Toyoda, H., K. Hayashi, Y. Murakami, T. Honda, Y. Katano, I. Nakano, H. Goto, T. Kumada and J. Takamatsu (2004). "Prevalence and clinical implications of occult hepatitis B viral infection in hemophilia patients in Japan." J Med Virol **73**(2): 195-9.
- Tran, A., D. Kremsdorf, F. Capel, C. Housset, C. Dauguet, M. A. Petit and C. Brechot (1991). "Emergence of and takeover by hepatitis B virus (HBV) with rearrangements in the pre-S/S and pre-C/C genes during chronic HBV infection." J Virol **65**(7): 3566-74.
- Tran, T. T., T. N. Trinh and K. Abe (2008). "New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam." J Virol **82**(11): 5657-63.
- Trinks, J., M. L. Cuestas, Y. Tanaka, V. L. Mathet, M. L. Minassian, C. W. Rivero, J. A. Benetucci, E. D. Gimenez, M. Segura, M. C. Bobillo, D. Corach, P. D. Ghiringhelli, D. O. Sanchez, M. M. Avila, L. A. Peralta, F. Kurbanov, M. C. Weissenbacher, P. Simmonds, M. Mizokami and J. R. Oubina (2008). "Two simultaneous hepatitis B virus epidemics among injecting drug users and men who have sex with men in Buenos Aires, Argentina: characterization of the first D/A recombinant from the American continent." J Viral Hepat **15**(11): 827-38.

- Triyatni, M., A. R. Jilbert, M. Qiao, D. S. Miller and C. J. Burrell (1998). "Protective efficacy of DNA vaccines against duck hepatitis B virus infection." *J Virol* **72**(1): 84-94.
- Tur-Kaspa, R., Y. Shaul, D. D. Moore, R. D. Burk, S. Okret, L. Poellinger and D. A. Shafritz (1988). "The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer." *Virology* **167**(2): 630-3.
- Urban, S. and P. Gripon (2002). "Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein." *J Virol* **76**(4): 1986-90.
- Villet, S., C. Pichoud, J. P. Villeneuve, C. Trepo and F. Zoulim (2006). "Selection of a multiple drug-resistant hepatitis B virus strain in a liver-transplanted patient." *Gastroenterology* **131**(4): 1253-61.
- Vincent, I. E., C. Zannetti, J. Lucifora, H. Norder, U. Protzer, P. Hainaut, F. Zoulim, M. Tommasino, C. Trepo, U. Hasan and I. Chemin (2011) "Hepatitis B Virus Impairs TLR9 Expression and Function in Plasmacytoid Dendritic Cells." *PLoS One* **6**(10): e26315.
- Vitale, F., F. Tramuto, A. Orlando, G. Vizzini, V. Meli, G. Cerame, W. Mazzucco, R. Virdone, U. Palazzo, M. R. Villafrate, A. Tagger and N. Romano (2008). "Can the serological status of anti-HBc alone be considered a sentinel marker for detection of occult HBV infection?" *J Med Virol* **80**(4): 577-82.
- Wang, G. H. and C. Seeger (1992). "The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis." *Cell* **71**(4): 663-70.
- Warner, N. and S. Locarnini (2008). "The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound." *Hepatology* **48**(1): 88-98.
- Waters, J. A., M. Kennedy, P. Voet, P. Hauser, J. Petre, W. Carman and H. C. Thomas (1992). "Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant." *J Clin Invest* **90**(6): 2543-7.
- Weber, B. (2005). "Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact." *J Clin Virol* **32**(2): 102-12.
- Weinberger, K. M., G. Zoulek, T. Bauer, S. Bohm and W. Jilg (1999). "A novel deletion mutant of hepatitis B virus surface antigen." *J Med Virol* **58**(2): 105-10.
- Werle-Lapostolle, B., S. Bowden, S. Locarnini, K. Wursthorn, J. Petersen, G. Lau, C. Trepo, P. Marcellin, Z. Goodman, W. E. t. Delaney, S. Xiong, C. L. Brosgart, S. S. Chen, C. S. Gibbs and F. Zoulim (2004). "Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy." *Gastroenterology* **126**(7): 1750-8.
- Werr, M. and R. Prange (1998). "Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles." *J Virol* **72**(1): 778-82.
- Wieland, S. F. and F. V. Chisari (2005). "Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses." *J Virol* **79**(15): 9369-80.
- Wilson, J. N., D. J. Nokes and W. F. Carman (1999). "The predicted pattern of emergence of vaccine-resistant hepatitis B: a cause for concern?" *Vaccine* **17**(7-8): 973-8.
- Wit, F. W., G. J. Weverling, J. Weel, S. Jurriaans and J. M. Lange (2002). "Incidence of and risk factors for severe hepatotoxicity associated with antiretroviral combination therapy." *J Infect Dis* **186**(1): 23-31.
- Wong, D. K., M. F. Yuen, H. Yuan, S. S. Sum, C. K. Hui, J. Hall and C. L. Lai (2004). "Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients." *Hepatology* **40**(3): 727-37.
- Wounderlich, G. and V. Bruss (1996). "Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers." *Arch Virol* **141**(7): 1191-205.
- Wu, H. L., P. J. Chen, S. J. Tu, M. H. Lin, M. Y. Lai and D. S. Chen (1991). "Characterization and genetic analysis of alternatively spliced transcripts of hepatitis B virus in infected human liver tissues and transfected HepG2 cells." *J Virol* **65**(4): 1680-6.
- Yang, J., K. Xing, R. Deng, J. Wang and X. Wang (2006). "Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing." *J Gen Virol* **87**(Pt 8): 2203-15.
- Yatsuji, H., C. Noguchi, N. Hiraga, N. Mori, M. Tsuge, M. Imamura, S. Takahashi, E. Iwao, Y. Fujimoto, H. Ochi, H. Abe, T. Maekawa, C. Tateno, K. Yoshizato, F. Suzuki, H. Kumada and K. Chayama

- (2006). "Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(11): 3867-74.
- Yeo, W., T. C. Chan, N. W. Leung, W. Y. Lam, F. K. Mo, M. T. Chu, H. L. Chan, E. P. Hui, K. I. Lei, T. S. Mok and P. K. Chan (2008). "Hepatitis B Virus Reactivation in Lymphoma Patients With Prior Resolved Hepatitis B Undergoing Anticancer Therapy With or Without Rituximab." *J Clin Oncol*.
- Yim, H. J. and A. S. Lok (2006). "Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005." *Hepatology* **43**(2 Suppl 1): S173-81.
- Yu, H., Q. Yuan, S. X. Ge, H. Y. Wang, Y. L. Zhang, Q. R. Chen, J. Zhang, P. J. Chen and N. S. Xia (2010) "Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I"." *PLoS One* **5**(2): e9297.
- Yuan, T. T., M. H. Lin, S. M. Qiu and C. Shih (1998). "Functional characterization of naturally occurring variants of human hepatitis B virus containing the core internal deletion mutation." *J Virol* **72**(3): 2168-76.
- Yuan, T. T., G. K. Sahu, W. E. Whitehead, R. Greenberg and C. Shih (1999). "The mechanism of an immature secretion phenotype of a highly frequent naturally occurring missense mutation at codon 97 of human hepatitis B virus core antigen." *J Virol* **73**(7): 5731-40.
- Zaaijer, H. L., H. J. Boot, P. van Swieten, M. H. Koppelman and H. T. Cuypers (2011) "HBsAg-negative mono-infection with hepatitis B virus genotype G." *J Viral Hepat* **18**(11): 815-9.
- Zaaijer, H. L., P. Torres, A. Ontanon, L. G. Ponte, M. H. Koppelman, P. N. Lelie, F. J. Hemert and H. J. Boot (2008). "Multiple surface antigen mutations in five blood donors with occult hepatitis B virus infection." *J Med Virol* **80**(8): 1344-9.
- Zhang, Z. H., L. Li, X. P. Zhao, D. Glebe, C. M. Bremer, Z. M. Zhang, Y. J. Tian, B. J. Wang, Y. Yang, W. Gerlich, M. Roggendorf, X. Li, M. Lu and D. L. Yang (2011) "Elimination of hepatitis B virus surface antigen and appearance of neutralizing antibodies in chronically infected patients without viral clearance." *J Viral Hepat* **18**(6): 424-33.
- Zollner, B., J. Petersen, E. Puchhammer-Stockl, J. Kletzmayer, M. Sterneck, L. Fischer, M. Schroter, R. Laufs and H. H. Feucht (2004). "Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D." *Hepatology* **39**(1): 42-50.
- Zollner, B., J. Petersen, M. Schroter, R. Laufs, V. Schoder and H. H. Feucht (2001). "20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw." *Lancet* **357**(9260): 934-5.
- Zoulim, F. (2011) "Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going?" *Liver Int* **31 Suppl 1**: 111-6.
- Zoulim, F. (2005). "New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA." *J Hepatol* **42**(3): 302-8.
- Zoulim, F., J. Saputelli and C. Seeger (1994). "Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo." *J Virol* **68**(3): 2026-30.

RESUME/ RESUMO

L'infection chronique ou occulte par le virus de l'hépatite B (HBV) est l'un des facteurs de risque les plus importants pour le développement de carcinome hépatocellulaire viro-induit. Malgré la petite taille du génome et les contraintes imposées par l'organisation de ce génome, le HBV présente une grande variabilité génétique qui est le résultat des erreurs générées lors de l'étape de reverse transcription mais aussi, lors des processus de sélection et d'adaptation. Durant l'infection, une relation étroite hôte-virus s'établit. La population virale est caractérisée par la présence de quasi-espèces pouvant influencer l'évolution de la maladie hépatique et favoriser les phénomènes d'échappement. Le but de notre travail a été 1) d'étudier la variabilité virale associée aux infections occultes et l'impact de certaines modifications de l'AgHBs (sY100C) sur la reconnaissance des tests de détection enzymatiques, et l'impact des mutations (sK122R, sD144E) sur la reconnaissance des anticorps anti-HBs d'un patient 2) de développer un nouvel outil d'amplification de génomes entiers de HBV que nous avons appliqué à l'étude préliminaire de quasi-espèces d'un mutant Core. Cet outil d'amplification est plus sensible que les techniques existantes, et il permet l'étude des propriétés moléculaires et fonctionnelles des isolats viraux. En conclusion, nous avons pu montrer que les processus d'échappement sont complexes, et font intervenir des facteurs du virus et de l'hôte. Ce travail contribue à l'amélioration de la compréhension de la biologie de l'infection par le HBV, et illustre la complexité des interactions hôte-virus.

Mots-clés: Virus de l'hépatite B, infection occulte, coinfection HIV/HBV, mutant d'échappement, amplification virale.

A infecção crônica e a infecção oculta pelo vírus da hepatite B (HBV) representam fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Apesar do pequeno tamanho do genoma e as restrições impostas pela organização do genoma, o HBV tem uma alta variabilidade genética que é o resultado dos erros gerados durante a etapa de transcrição reversa e também durante o processo de seleção e adaptação do vírus. Durante a infecção uma relação de proximidade se estabelece entre o vírus e o hospedeiro. A população viral é caracterizada pela presença de *quasispecies* que poderiam influenciar a evolução da doença hepática, e também promover a seleção de variantes de escape imunológico. Os objetivos do nosso estudo foram 1) estudar a variabilidade do HBV associada às infecções ocultas e o impacto de certas modificações do HBsAg (sY100C) no reconhecimento de testes de detecção enzimáticos. Estudar também o impacto das mutações (sK122R, sD144E) sobre o reconhecimento de anticorpos anti-HBs de um paciente, 2) desenvolver um novo método para amplificar o genoma completo do HBV que foi aplicado a um estudo para identificação de *quasispecies* de um mutante da região do core viral. Este método de amplificação é mais sensível do que as técnicas existentes e permite o estudo de propriedades moleculares e funcionais dos vírus. Em conclusão, mostramos que os processos de escape viral são complexos e envolvem fatores relacionados tanto com o vírus como com o hospedeiro. Este trabalho contribui de maneira significativa para a compreensão da biologia da infecção pelo HBV e ilustra a complexidade das interações vírus-hospedeiro.

Palabras claves: Virus da hepatitis B, infecção oculta, co-infecção HIV/HBV, variante de escape, amplificação do vírus.

Discipline: Virologie/ Virologia

Laboratoires/ Laboratorios:

Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM U1052, 151 cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03

Laboratorio de Virologia Molecular, Pavilhao Helio e Peggy Pereira, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCUZ Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro - RJ – BRASIL