



HAL
open science

Implication du gène core dans l'accumulation de l'ADN circulaire clos de façon covalente du virus de l'hépatite B

Maëlen Fournier

► To cite this version:

Maëlen Fournier. Implication du gène core dans l'accumulation de l'ADN circulaire clos de façon covalente du virus de l'hépatite B. Hépatologie et Gastroentérologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10058 . tel-01089483

HAL Id: tel-01089483

<https://theses.hal.science/tel-01089483>

Submitted on 1 Dec 2014

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.

THESE

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE BMIC

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT EN BIOLOGIE

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenance publique le 4 avril 2014 par

Maëlen Fournier

Implication du gène core dans l'accumulation de l'ADN circulaire clos de façon covalente du virus de l'hépatite B.

Directeur de thèse : Pr. Fabien ZOULIM

Composition du jury :

Pr. Paul DENY	Président du jury
Pr. Michaël KANN	Rapporteur
Dr. Camille SUREAU	Rapporteur
Dr. Patrick LOMONTE	Examineur
Dr. Patrice MARCHE	Examineur
Pr. Fabien ZOULIM	Directeur de thèse
Dr. Christophe COMBET	Invité

Préambule

I. Résumé

La particularité de ce virus de l'hépatite B est la synthèse d'un ADN circulaire clos covalent (ADNccc) qui est la forme de persistance du virus dans la cellule. Cet ADN est maintenu à une copie par cellule en moyenne chez l'homme grâce à un recyclage des nucléocapsides dans le noyau. En effet, durant le cycle viral, les nucléocapsides sont soit redirigés dans le noyau pour former de l'ADNccc, soit enveloppés puis sécrétés pour former de nouveaux virions. Du fait de son maintien au sein de l'hépatocyte, la formation et la régulation de l'ADNccc restent des éléments clés du traitement antiviral.

Il a été montré *in vitro* que l'accumulation de cet ADN était régulée par les protéines d'enveloppe.

Lors de l'étude du taux d'ADNccc dans des biopsies de foie de patients coinfectés HIV-HBV chronique, il a été découvert un patient présentant 300 fois plus d'ADNccc intrahépatique que la moyenne de la cohorte.

L'objectif de ma thèse a été de comprendre quel était le mécanisme conduisant à cette accumulation d'ADNccc *in vivo*. Cela nous a permis de mettre en évidence le rôle du gène core dans l'accumulation de l'ADNccc.

Mots clés : accumulation ADNccc, virus de l'hépatite B (HBV)

Implication of core gene in hepatitis B virus covalently closed circular DNA accumulation

The feature of hepatitis B virus is the synthesis of a covalently closed circular DNA (cccDNA) which is the persistence form of the virus in cell. cccDNA is maintained to 1 copy per human cell thanks to the recycling of capsids into the nucleus. Indeed, during the viral cycle, capsids are either transported into the nucleus to form cccDNA or enveloped and secreted to form new infectious virions. Because of its maintenance in the hepatocyte, cccDNA formation and regulation are still key elements of antiviral treatment.

It has been shown that, *in vitro*, cccDNA accumulation was regulated by envelope proteins.

Upon the study of cccDNA levels in liver biopsies of HIV-HBV co-infected patients, an individual with a cccDNA level 300 fold higher than the average of the cohort was identified.

My thesis objective was to understand which is the mechanism leading to the cccDNA accumulation observed *in vivo*. This allowed us to highlight the role of core gene in cccDNA accumulation.

Keywords: cccDNA accumulation, hepatitis B virus (HBV)

Thèse préparée à l'INSERM CRCL U1052-Equipe 15. Pathogénèse de l'hépatite B et C.
Adresse du laboratoire : 151 cours Albert Thomas 69003 Lyon.

II. Table des matières

Préambule.....	3
I. Résumé.....	3
II. Table des matières	4
IV. Abréviations	7
V. Remerciements	8
Données bibliographiques	11
Chapitre I-Le virus de l'hépatite B.....	11
I.1-Classification	11
I.2-Le génome HBV	11
I.2.1-L'ADN relâché circulaire : une particularité génomique	11
I.2.2-Les ARN messagers.....	12
I.2.3-La variabilité du virus de l'hépatite B	12
I.3-Les protéines virales	13
I.3.1-Les protéines S, M et L : les constituants de l'enveloppe virale	13
I.3.2-La protéine de capsid : core	14
I.3.3-La protéine precore ou antigène HBe	15
I.3.4-La polymérase virale.....	15
I.3.5-La protéine X.....	16
I.3.6- HBV splice-generated protein : HBsP	17
I.4-Les particules du virus de l'hépatite B	17
I.5-Le cycle de réplication.....	18
I.5.1-L'hépatocyte, la cellule de prédilection pour l'infection par le virus de l'hépatite B	18
I.5.2-L'entrée virale.....	18
I.5.3-Expression du génome et synthèse des protéines virales.....	19
I.5.4-Encapsidation et transcription inverse	19
I.5.5-Sécrétion des virions et particules subvirales	20
I.5.5.1-Formation et sécrétion des particules de Dane	21
I.5.5.2-Formation et sécrétion des particules subvirales et des nucléocapsides non enveloppées	22
Chapitre II- L'hépatite B.....	23
II.1-Epidémiologie	23
II.1.1-Prévalence	23
II.1.2-Modes de transmission	23
II.2-Architecture et fonctions du foie	24

II.3-Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B	26
II.3.1-Hépatite aiguë.....	26
II.3.2-Hépatite chronique	27
II.3.2.1-Immunotolérance.....	27
II.3.2.2-Clairance virale (phase immunoactive).....	27
II.3.2.3-Stade de porteur inactif AgHBs.....	28
II.3.2.4-Réactivation.....	28
II.3.3-Hépatite occulte.....	28
II.3.4-Fibrose / Cirrhose	29
II.3.5-Carcinome hépatocellulaire.....	29
II.4-Vaccins	30
II.5-Les traitements	31
II.5.1-Immunomodulateurs autorisés : l'Interféron- α et l'Interféron- α pégylé	31
II.5.2-Analogues de nucléos(t)ides et résistance	32
II.5.2.1-Analogues de nucléos(t)ides.....	32
II.5.2.2-Résistances aux analogues de nucléos(t)ides	32
II.5.3-Nouvelles cibles des antiviraux.....	33
II.5.3.1-L'entrée	33
II.5.3.2-L'ADNccc	33
II.5.3.3-Nucléocapsides.....	34
II.6-Rôle du système immunitaire dans le contrôle de l'infection et dans la pathogénèse ..	35
II.6.1-La réponse immunitaire innée et HBV	35
II.6.2-La réponse immunitaire adaptative	37
Chapitre III- L'ADN circulaire clos covalent : un « minichromosome viral » persistant.....	39
III.1-Quelques exemples de virus possédant un minichromosome viral	39
III.2-Les modèles d'étude de l'ADNccc	40
III.2.1-Les modèles cellulaires	40
III.2.1.1-Les lignées d'hépatome.....	40
III.2.1.2-Les hépatocytes primaires humains	40
III.2.1.3- Les cellules souches différenciées de cordon ombilical	41
III.2.2-Les modèles animaux.....	41
III.2.2.1- Le canard de Pékin et le DHBV	41
III.2.2.2-La marmotte et le WHV	41
III.2.2.3-Le chimpanzé et le HBV	42
III.2.2.4-Souris humanisées-exemple des souris uPA/SCID.....	42
III.2.2.5-Un modèle de foie humain reconstitué ex-vivo	42
III.3-La formation de l'ADNccc à partir des capsides intracellulaires	42

III.3.1-La réplication asymétrique de l'ADNccc.....	43
III.3.2-Transport de la capsid e dans le noyau	43
III.3.3-Désintégration de la capsid e	44
III.3.4-Le retrait de la polymérase et des séquences redondantes	44
III.3.4.1-Signaux déclenchant le retrait de la polymérase	44
III.3.4.2-Lieu du retrait de la polymérase.....	45
III.3.4.3-Possibilités pour le retrait de la polymérase et des séquences redondantes...	45
III.4-La régulation du recyclage de l'ADNccc.....	46
III.4.1-Protéines impliquées pour le DHBV et le HBV	46
III.4.2-Hypothèse de régulation.....	47
III.5-La régulation épigénétique.....	48
III.5.1-Structure du minichromosome	48
III.5.2-Modification des histones : méthylation et acétylation.....	48
III.5.3-Les protéines virales associées à l'ADNccc	49
III.5.4-Méthylation de l'ADNccc	49
III.6-La clairance naturelle de l'ADNccc par le système immunitaire de l'hôte	50
III.6.1-Intervention de la lyse hépatocytaire	51
III.6.2-Distribution de l'ADNccc lors de la mitose.....	52
III.7-La clairance thérapeutique	52
Objectifs des travaux de recherche.....	55
Etude 1.....	57
Objectifs de l'étude 1	58
Discussion de l'étude 1	83
Annexe de l'étude 1.....	88
Etude 2.....	91
Objectifs de l'étude 2	92
Discussion de l'étude 2	127
Etude 3.....	129
Objectifs de l'étude 3	130
Discussion de l'étude 3	145
Références bibliographiques	147

IV. Abréviations

aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNccc	ADN circulaire clos covalent
ADNrc	ADN relaxé circulaire
ADNrcDP	ADN relaxé circulaire déprotéiné
ADV	adéfovir dipivoxil
AgHBc	antigène de capsid du HBV
AgHBe	antigène e du HBV
AgHBs	antigène de surface du HBV
ALAT	alanine amino transaminases
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNpg	acide ribonucléique pré-génomique
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
Cter	carboxy-terminal
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
DHBV	virus de l'hépatite B du canard
DR1 et 2	régions répétées dans l'ADN du HBV
EPR	endogenous DNA polymerase reaction
ETV	entécavir
HBsP	HBV splice-generated protein
HBV	virus de l'hépatite B humain
HCC	carcinome hépatocellulaire
HDAC	histone déacétylases
HIV	virus de l'immunodéficience acquise
IFN	interferon
ISG	interferon-stimulated gene
kb	kilobases
kDa	kilodalton
LAM	lamivudine
LdT	telbivudine
LTc	lymphocytes T cytotoxiques
MVB	corps multivésiculaires
NK	natural killer
NLS	séquence de localisation dans le noyau
NTCP	sodium taurocholate cotransporting polypeptide
Nter	amino-terminal
ORF	cadre ouvert de lecture
pb	paire de bases
PHH	hépatocytes primaires humains
PKC	protéine kinase C
RT	rétrotranscriptase
SCID	severe combined immunodeficiency
TALNs	transcription activator like effectors nucléases
TDF	ténofovir
uPA	urokinase-type plasminogen activator
WHV	virus de l'hépatite B de la marmotte

V. Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté de lire, de juger mon travail et d'être présents parmi nous.

Un grand merci au **Dr Camille SUREAU** et au **Pr Michaël KANN** pour leurs lectures critiques du manuscrit ainsi qu'au **Dr Patrick LOMONTE**.

Un remerciement particulier au **Dr Patrice MARCHE** qui a accepté, un peu à la dernière minute, d'être examinateur de ma thèse.

Je souhaiterais aussi remercier le **Pr Paul DENY** qui me fait l'honneur de présider mon jury ainsi que le **Dr Christophe COMBET** qui m'a beaucoup aidée dans ma réflexion.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon Directeur de thèse le **Pr Fabien ZOULIM** pour son accueil, sa confiance et son soutien lors de ma deuxième année de master et durant mes trois années de Doctorat.

L'histoire de cette thèse a commencé il y a quelques années avec **Carole KRETZ** que je souhaite vraiment honorer. Tu as été la première à m'avoir donné ma chance et surtout m'avoir donné confiance en moi. Tu as repéré certaines aptitudes que je ne pensais pas avoir, tu m'as laissée m'orienter vers la virologie, domaine qui m'intéressait, et c'est aussi grâce à toi que je suis là aujourd'hui.

J'ai pu travailler pendant ces trois années de thèse avec des personnes vraiment formidables qui m'ont énormément aidée et qui ont toujours été là pour moi. Je tiens donc à toutes les remercier pour leur soutien et leur esprit d'équipe.

En premier lieu, merci à **Christian dit Pichoud** pour m'avoir appris toutes les méthodes historiques d'analyse du HBV ainsi que pour ses longues discussions autour de ses voyages et expériences passées.

Je souhaiterais maintenant remercier une personne qui compte énormément pour moi et qui est devenue plus qu'une collègue aujourd'hui. J'ai tellement appris avec toi **Judith** que je ne trouve pas de mots assez grands pour te dire MERCI. Tu es vraiment une fille géniale et travailler avec toi va me manquer.

Un immense merci aussi à toi **Barbara** pour ta gentillesse, ton aide pour ce manuscrit et toute la réflexion qui va autour. Tu as toujours été présente pour moi et « quand je serai plus grande, j'aimerais te ressembler ! ». Reste comme tu es, et surtout, ne perd pas ton charmant accent italien qui nous fait tant rire !

Pour finir avec ma petite équipe initiale, je remercie **Fanny** pour toute son aide, ses explications médicales et son soutien. Bientôt ce sera ton tour, pour la deuxième fois : bon courage.

Je souhaiterais faire une spéciale dédicace à ma petite **Maëlle**. Ta joie de vivre et ton sourire ont été tellement agréables pendant cette fin de thèse. Tu es toujours de bonne humeur et je suis fière d'être « ta cellule souche ».

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Merci à **Marie-Agnès**, toujours là pour les urgences. Merci **Noé** pour tes corrections, tous tes conseils pendant la rédaction et ton aide pour finir mes dernières extractions. Rendez-vous à NY avec tes gâteaux qui sont tellement bons !

Un très grand merci aux filles et quelques garçons de l'annexe. Travailler dans une ambiance si amicale est vraiment agréable. En particulier, merci à **Nath** (à qui j'ai promis un roman de remerciements), organisatrice officielle des événements de l'annexe et créatrice de nombreuses vidéos comiques de thésards. Tu travailles tellement que je ne sais pas comment tu trouves encore le temps de faire tout ça. Tu vas faire une thèse géniale et bien sûr que je serai au rendez-vous. Et merci pour ton « Madame Chance », je pense que ça a fonctionné ! Merci à **Dulce** qui m'a supportée pendant plus d'un an (et a bien voulu être ma testeuse de desserts). Merci **Julie**, ma voisine de bureau tellement déjantée ! Merci **Anaïs** pour ton soutien et pour être passée juste un mois avant moi ! Enfin, un grand merci à **Clem** pour son écoute et pour ses longues discussions aux pieds de nos immeubles ainsi qu'à tous ceux qui sont déjà partis (**Charlène, Baptiste...**).

Un merci particulier aux bébés master : vous êtes tellement généreuses et toujours là pour aider les gens. Gardez cette qualité ainsi que ce petit grain de folie en chacune de vous.

Pour finir, j'aimerais remercier tous mes amis qui se sont intéressés à cette thèse. Un merci particulier à ma meilleure amie **Julie** qui me manquera le jour de ma soutenance même si c'est pour une bonne cause. Je remercie également mes parents **Sandrine** et **Patrik** et ma Petite sœur **Aurore** ainsi que le reste de ma famille qui m'ont supportée et soutenue pendant toutes ces années. Et enfin, merci à **Soso** pour toutes les photos de ma petite princesse **Louna** qui m'ont boostée pour la dernière ligne droite.

Données bibliographiques

Chapitre I-Le virus de l'hépatite B

I.1-Classification

Le virus de l'hépatite B (HBV) a été découvert en 1964 par Baruch Samuel Blumberg (Blumberg, 1964). Il appartient à la famille des *Hepadnaviridae* qui regroupe deux genres : les *Orthohepadnavirus* et les *Avihepadnavirus*. Ces derniers diffèrent du point de vue de la structure de leur génome ainsi que de la pathogénèse qu'ils induisent.

Le genre *Orthohepadnavirus* comprend les virus infectant les mammifères tels que le virus de l'hépatite B humain ainsi que les virus de la marmotte (WHV), de l'écureuil (GSHBV) ou les virus des singes comme celui du chimpanzé ChHBV ou du singe laineux WMHBV. Le WHV est génétiquement proche du HBV avec lequel il présente une identité de 60 % (Schaefer, 2007).

Le genre *Avihepadnavirus* regroupe les virus des oiseaux comme les virus de l'hépatite B du canard de Pékin (DHBV), celui du héron (HHVB) ou de l'oie des neiges (Ross's Goose Hepatitis B virus). Les membres viraux appartenant à ce genre diffèrent des virus de mammifères par l'absence du gène X et par le fait de posséder seulement deux protéines d'enveloppe (la grande protéine preS/S et la petite protéine S). Le DHBV et HBV partagent 40 % d'identité (pour plus de détails voir la partie III.2.2-Les modèles animaux).

I.2-Le génome HBV

I.2.1-L'ADN relâché circulaire : une particularité génomique

Avec un génome de 3,2 kb, le HBV contient le plus petit ADN de tous les virus à ADN connus. De manière atypique, le génome de ce virus, nommé ADN relâché circulaire (ADNrc), se présente sous forme d'un ADN circulaire partiellement double brin constitué par un brin négatif complet et un brin positif incomplet.

Concernant l'organisation génomique de ce virus, la polymérase virale est liée de façon covalente à une séquence redondante de 9 nucléotides située à l'extrémité 5' du brin négatif, par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester entre une tyrosine et une désoxyguanosine monophosphate (Sohn et al., 2009; Zoulim and Seeger, 1994). De ce fait, un trou est présent dans le brin négatif ce qui explique que ce dernier ne soit pas clos.

Afin de maintenir cet ADN sous forme circulaire, une séquence de 200 nucléotides située en 5' du brin positif et chevauchant le trou est présente (Gao and Hu, 2007). Enfin, une amorce ARN de 18 nucléotides, localisée à l'extrémité 5' du brin positif permet l'initiation de la synthèse du brin positif de l'ADN viral (Sohn et al., 2009).

I.2.2-Les ARN messagers

L'ADNrc contient quatre phases ouvertes de lecture (ORF) : celle de l'enveloppe (S), de la capsid (C), de la polymérase (P) et celle d'HBx. A cause de la taille réduite de son génome, les ORF du HBV sont chevauchantes ; ainsi une mutation dans un gène a souvent une répercussion dans un autre gène du HBV.

A partir de ces quatre ORF, cinq ARN messagers (ARNm) vont être générés par l'ARN polymérase II cellulaire :

- L'ARN pré-génomique (ARNpg) de 3,5 kb est synthétisé à partir du promoteur preC/C et représente la totalité du génome. Il code pour la polymérase, la protéine HBc de la capsid et la protéine HBsP produite par épissage alternatif. La polymérase et HBc ne sont pas en phase et la détection de l'ORF de la polymérase est beaucoup moins efficace que celle d'HBc. En effet, on observe une synthèse de 240 protéines HBc pour une ou deux polymérases (Seeger 2000).
- Un ARNm de 3,5 kb qui code pour HBe soluble
- Deux ARNm subgénomiques de 2,4 et 2,1 kb sont produits à partir des promoteurs preS1 et preS2/S respectivement. L'ARN de 2,4 kb code pour la grande protéine d'enveloppe notée L et l'autre ARN code pour les protéines M et HBs.
- Un petit ARN de 0,7 kb code quant à lui la protéine HBx.

De façon caractéristique, tous ces ARNm ont le même site de polyadénylation.

Les promoteurs sont quant à eux régulés par deux enhancers situés en amont du promoteur core (Seeger 2000).

I.2.3-La variabilité du virus de l'hépatite B

Les erreurs induites par la polymérase d'HBV (10^{-4} substitutions par base et par cycle) créent une variabilité génétique du HBV qui mène à l'apparition de nouveaux génotypes, mutants ou quasiespèces.

Avant la classification génotypique des souches du HBV, neuf sérotypes différents notés ayw (1 à 4), ayr, adw2, adw4, adrq- et adrq+ avaient été définis à partir de séquences présentes dans des déterminants antigéniques localisés dans la protéine d'enveloppe HBs (Wagner et al., 2004).

Aujourd'hui, la classification du HBV est basée sur la comparaison de séquences nucléotidiques des souches du HBV. Cette classification prend en compte l'intégralité du

génomique du HBV et compte actuellement 8 génotypes non recombinants, notés A à H. La différence entre deux génotypes du HBV est définie par une variation de plus de 8 % de leur séquence nucléotidique entière et d'au moins 4,1 % dans le gène de surface (préS1, préS2, S). La corrélation entre sérotypes et génotypes est loin d'être parfaite (Wagner et al., 2004).

Les génomes de différents génotypes du HBV ne sont pas de même longueur. Ceci est dû aux insertions ou aux délétions dans les régions codant les protéines préS1 et core.

Les génotypes du HBV sont mondialement répartis avec des régions à plus forte prévalence. Selon les données du CDC, le génotype A est majoritairement présent en Amérique et en Europe du Nord ; le génotype B en Asie du Sud-Est et en Amérique du Nord ; le génotype C en Amérique du Nord, en Australie et en Asie du Sud-Est ; le génotype D en Australie, en Russie et en Europe du Nord ; le génotype E en Afrique ; le génotype F en Amérique du Sud ; le génotype G en Europe du Nord et en Amérique du Nord et le génotype H en Amérique du Sud.

De nombreux mutants sont sélectionnés en réponse à une pression de sélection. Cette pression peut être due à la réponse immunitaire contre le HBV, à des traitements ou vaccins. La majorité des mutants formés est déficient et ne se propagera pas dans l'organisme. Cependant, certains mutants persistent et forment une nouvelle population, une quasiespèce, coexistant avec la population de virus sauvages. Nous pouvons noter les mutants de résistance aux traitements anti-polymérase, les mutants precore et les mutants des protéines d'enveloppe (Wagner et al., 2004).

I.3-Les protéines virales

I.3.1-Les protéines S, M et L : les constituants de l'enveloppe virale

Les trois protéines de l'enveloppe virale (HBs, M et L) sont synthétisées à partir de deux ARNm différents issus de la même ORF. Le plus grand ARNm de 2,4 kb code pour la grande protéine d'enveloppe L. L'autre ARNm de 2,1 kb code pour les protéines M ou S selon le site d'initiation de la traduction utilisé. Notons le fait que le site d'initiation de l'ARNm codant pour la protéine HBs étant plus fréquemment reconnu par les ribosomes, quatre fois plus d'HBs est synthétisée par rapport à la protéine M (Sheu and Lo, 1992).

Les trois protéines d'enveloppe du HBV possèdent toutes le même domaine carboxy-terminal (Cter) codant pour HBs, les protéines M et L, quant à elles, possèdent le domaine préS2. Enfin la protéine L est la seule à avoir le domaine préS1.

Ces protéines de surface ont quatre domaines transmembranaires et sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique puis maturées dans l'appareil de Golgi. En effet, elles sont

toutes les trois modifiées par N- ou O-glycosylation et la protéine L est aussi myristylée sur son deuxième acide aminé.

Le domaine S possède aussi des résidus cystéine qui permettent de créer des ponts disulfures entre les protéines d'enveloppe pour former les particules virales (Wounderlich and Bruss, 1996). Ce domaine porte aussi le déterminant « a » (acides aminés 124-147) qui est la cible majeure des anticorps neutralisants.

La protéine M n'est pas nécessaire à la formation ni à l'infectivité des particules virales (Bruss and Ganem, 1991).

La protéine L a la particularité d'être présente à la membrane du réticulum endoplasmique sous deux topologies : la forme i-preS et e-preS. Lors de sa synthèse, la protéine L est insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique grâce aux signaux proximaux topogéniques du domaine S. D'une manière intéressante, le premier domaine transmembranaire de la protéine n'arrive pas à être transloqué et reste cytosolique. La protéine L présentant cette topologie est appelée i-preS et permet l'interaction avec les nucléocapsides lors de l'enveloppement. Des signaux de translocation inconnus permettent l'insertion d'un premier domaine transmembranaire dans la membrane formant ainsi la forme e-preS qui favorise l'interaction avec le récepteur du HBV (Prange, 2012).

I.3.2-La protéine de capsid : core

La protéine core, encore appelée protéine de capsid, est une protéine de 21 kDa qui forme la capsid icosaédrique virale du HBV. Cette protéine est composée de deux domaines séparés par un linker : le domaine « core » des acides aminés 1 à 140 et le domaine « protamine » (résidus 150-183).

Le domaine « core » à l'extrémité amino-terminale (Nter) permet l'auto-assemblage de la protéine core en capsid (Birnbaum and Nassal, 1990). Il contient aussi deux épitopes prédictifs pour la réponse immunitaire dont la boucle immunodominante comprenant les résidus 78 à 83 (Steven et al., 2005). En effet, HBc est reconnu par le système immunitaire de l'hôte lorsqu'elle est exprimée à la surface des hépatocytes ce qui induit une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T contre les cellules infectées (Lee, 1997).

Le domaine « protamine » a deux fonctions. Il contient un motif de localisation nucléaire (NLS) régulé par phosphorylation et des motifs NES (séquences d'export du noyau). Son exposition à la surface des nucléocapsides permet leurs transports vers le noyau de la cellule. De plus, ce domaine possède quatre clusters riches en arginine qui fixent les acides nucléiques et permet l'encapsidation de l'ARNpg (Nassal, 1992).

La protéine core possède une structure secondaire en hélices α et a la capacité de s'assembler en dimères. La présence de ponts disulfures entre chaque protéine permet de

stabiliser cette structure. L'association d'un dimère d'HBC résulte en la formation d'un pic composé par la réunion de quatre hélices α .

L'oligomérisation des dimères d'HBC mène ensuite à la formation de la capsid virale de symétrie T3 ou T4 selon le nombre de dimères d'HBC engagés (90 ou 120 respectivement). La capsid virale de symétrie T4 de 36 nanomètres de diamètre est majoritairement retrouvée dans les virions (Steven et al., 2005). Des pores sont présents dans la capsid probablement pour l'entrée et la sortie de nucléotides.

La protéine HBC est très peu variable *in vivo* (Chain and Myers, 2005). La mutation individuelle *in vitro* de 52 acides aminés du domaine « core » d'HBC a permis de déterminer lesquels étaient importants dans la formation des capsides ou des virions (Ponsel and Bruss, 2003). Il ressort de cette étude que les acides aminés en position 17, 18, 60, 95, 96, 122, 127, 136, 137 et 139 sont importants pour l'enveloppement des capsides formées.

I.3.3-La protéine precore ou antigène HBe

La protéine HBe est un peptide circulant dérivé de la protéine core. Il est traduit à partir de l'ARNm de 3,5 kb. Le codon initiateur de la traduction utilisé est situé 87 nucléotides en amont de celui utilisé pour la synthèse de la protéine HBC.

Après deux clivages successifs, la forme mature de cette protéine est générée. Tout d'abord, la protéine HBe est synthétisée sous forme d'un précurseur de 25 kDa. Ce dernier, grâce à la présence d'une séquence hydrophobe de 19 acides aminés, est dirigé vers le réticulum endoplasmique. Par la suite, cette séquence hydrophobe présente en Nter est clivée par une furine produisant une protéine de 22 kDa (Messageot et al., 2003). Cette protéine est ensuite à nouveau clivée en Cter dans son domaine riche en arginine pour former la protéine HBe sécrétée de 15 à 18 kDa (Ito et al., 2009).

Sa présence chez tous les *Hepadnaviridae* suggère un rôle prépondérant de cette protéine pour le virus. En effet, l'antigène HBe est un tolérogène qui, du fait de sa ressemblance avec la protéine de capsid, atténue la réponse immunitaire de l'hôte contre HBC en se fixant sur les récepteurs CMH de classe I des lymphocytes T (Walsh and Locarnini, 2012). HBe contribue donc à la persistance du HBV *in vivo*.

En revanche, cette protéine ne semble pas essentielle à la réplication virale (Dandri and Locarnini, 2012).

I.3.4-La polymérase virale

La polymérase, de 845 acides aminés, contient quatre domaines possédant différentes fonctions enzymatiques :

- un premier domaine (aa 1 à 180) correspondant à la protéine terminale qui lie la polymérase à l'extrémité 5' du brin négatif par la tyrosine Y63 via un lien phosphodiester (Lanford et al.,

1997; Zoulim and Seeger, 1994) et possède une activité primase. Ainsi, cette primase permet l'initiation de la transcription inverse en synthétisant une amorce de 3 à 4 nucléotides.

- un deuxième domaine (aa 181 à 349) appelé « spacer » qui est génétiquement variable et dont le rôle n'a pas encore été clarifié. Cette région chevauche le domaine preS de l'enveloppe et pourrait permettre la flexibilité de la séquence des protéines d'enveloppe sans provoquer de conséquence sur les fonctions de la polymérase (Chen et al., 2013).

- le troisième domaine (aa 350 à 693) noté « pol/RT » (polymérase/rétrotranscriptase) comprend deux fonctions. Il porte d'une part l'activité polymérase ARN dépendante permettant la rétrotranscription de l'ARNpg en ADN de polarité négative et porte d'autre part l'activité polymérase ADN dépendante qui génère le brin de polarité positive. Ce domaine est divisé en sous domaines dont le domaine C qui contient le site catalytique YMDD. Ce domaine catalytique est le site des résistances aux analogues de nucléoside.

- Un quatrième et dernier domaine (aa 694 à 845) correspondant au domaine RNaseH. Ce domaine permet à la polymérase virale de détruire l'ARNpg hybridé à l'ADN de polarité négative après la rétrotranscription (Seeger and Mason, 2000).

I.3.5-La protéine X

La protéine HBx, seulement présente chez les *Orthohepadnaviridae*, est une protéine non structurale. Cependant, elle est essentielle pour établir et maintenir l'infection virale *in vitro* et *in vivo*. En effet, un WHV mutant ne codant pas la protéine X échouera dans l'initiation d'une infection chez les marmottes (Zoulim et al., 1994). De plus, un mutant HBV dépourvu de la protéine HBx montre une baisse de la quantité de transcrits produits à partir de l'ADNccc (ADN circulaire clos covalent) lors de l'initiation de l'infection et ne réussit pas à maintenir l'infection (Lucifora et al., 2011). Il s'avère que la protéine HBx joue un rôle d'activateur transcriptionnel de l'ADNccc en recrutant des histones acétylases aboutissant à une augmentation de la réplication (Belloni et al., 2009).

La protéine HBx possède de nombreuses activités. *In vitro*, cette protéine est un transactivateur transcriptionnel de nombreux gènes cellulaires et viraux. Ainsi, cette protéine est impliquée dans de nombreuses voies cellulaires comme le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la réparation de l'ADN. De plus, elle interagit avec différents partenaires comme le protéasome, p53 (protéine 53) et DDB1 (DNA damage-binding protein 1) (Benhenda et al., 2009).

Tous ces rôles sont en faveur d'une possible implication de la protéine HBx dans la carcinogénèse. En effet, HBx modifie non seulement la transcription de certains gènes en interagissant avec des protéines comme des facteurs de transcription mais aussi l'épigénétique de ces gènes cibles. De plus, la partie de l'ADN codant pour cette protéine est fréquemment retrouvée intégrée dans le génome de l'hôte ayant développé un carcinome hépatocellulaire (Tian et al., 2013).

I.3.6- HBV splice-generated protein : HBsP

La protéine HBsP (HBV splice-generated protein) est produite par un ARN de 2,2 kb épissé provenant de l'ARN pré-génomique de 3,5 kb et possédant une délétion entre le gène C et le milieu du gène S. Cette protéine est donc une protéine de fusion entre la partie N terminale de la polymérase et une nouvelle ORF produite par l'épissage (Terré et al., 1991).

Sa présence *in vivo* est associée à l'infection chronique et à la sévérité de la fibrose. Elle pourrait jouer un rôle dans l'histoire naturelle de l'infection par HBV et pourrait être impliquée dans la pathogénèse et/ou la persistance virale (Soussan et al., 2000).

Jusqu'à maintenant onze ARN épissés du HBV ont été identifiés. Leurs fonctions ne sont pas claires et le blocage de la fonction d'épissage ne semble pas avoir de conséquence sur la réplication du virus (Soussan et al., 2003).

I.4-Les particules du virus de l'hépatite B

Trois types de particules sont présentes dans le sérum des patients : des particules de Dane correspondant aux particules infectieuses et deux types de particules subvirales non infectieuses. Ces particules ne sont pas sécrétées par la même voie.

De plus, *in vitro*, des capsides non enveloppées sont retrouvées. Cependant leur existence *in vivo* n'a pas encore été formellement démontrée.

Le HBV, dans sa forme infectieuse, est un virus enveloppé de 42 nanomètres de diamètre (Marion and Robinson, 1983). Il est composé d'une capside virale simple formée par l'assemblage dimérique de la protéine core (HBc). Cette capside entourée d'une enveloppe complexe exclusivement constituée par les trois protéines virales d'enveloppe (S, M et L) renferme le génome viral de 3,2 kb constitué d'un ADN double brin relâché circulaire (ADNrc).

Les particules non infectieuses (encore appelées particules subvirales), également retrouvées dans le sérum des patients, sont uniquement composées de protéines d'enveloppe. Elles sont sécrétées en excès par la cellule infectée (100 à 1000 fois plus que les virions) (Seeger and Mason, 2000).

Deux types de particules sont formées : les sphériques de 22 nanomètres de diamètre composées en majorité de la protéine S et les filaments composés des protéines S et L (Heermann et al., 1984). La protéine M est présente dans les deux types. Les filaments contiennent des protéines L, M et S en ratio 1:1:4 (Prange, 2012).

La formation des particules subvirales est liée à la capacité d'autoassemblage de la protéine HBs (Huovila et al., 1992). Ces particules servent de leurre pour le système immunitaire.

I.5-Le cycle de réplication

I.5.1-L'hépatocyte, la cellule de prédilection pour l'infection par le virus de l'hépatite B

L'hépatocyte est le principal site de réplication du HBV.

Bien que de l'ADN et de l'ARN du HBV aient été détectés *in vivo* dans des cellules sanguines mononucléaires périphériques, dans le rein et dans le pancréas, aucune preuve formelle n'a été apportée quant à la réplication du virus dans ces cellules (Halpern et al., 1983; Lu et al., 2009). Cependant il semblerait que le HBV puisse établir une infection dans des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (Ma et al., 2011).

Il pourrait donc exister d'autres réservoirs du virus mises à part les cellules hépatiques qui induiraient la réactivation de l'infection lors d'une transplantation d'un foie sain chez une personne présentant des signes de résolution par exemple (Brind et al., 1997).

I.5.2-L'entrée virale

Jusqu'en 2012, le récepteur du HBV était inconnu.

Cependant, grâce à une approche de purification par affinité des protéines, l'équipe de Yan et al a découvert que le NTCP (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) interagissait avec la partie preS1 des protéines d'enveloppe. Ce récepteur permet la circulation des acides biliaires. De plus, l'extinction de cette protéine inhibe l'infection par le HBV et son expression suffit à rendre des cellules permissives à ce dernier (Yan et al., 2012). Trois résidus semblent porter la spécificité de l'espèce. Si les trois acides aminés du NTCP de la souris sont échangés avec ceux de l'humain, les cellules deviennent infectables par le HBV (Yan et al., 2013).

Suite à l'attachement du virus sur son récepteur, le virus entre dans la cellule par une voie dépendante de l'endocytose. En effet, en utilisant des drogues inhibant la synthèse d'ATP nécessaire à la formation des vésicules d'endocytose il a été montré que le virus n'infectait plus les hépatocytes.

Chez de nombreux virus, suite à une internalisation de la particule virale via la voie de l'endocytose, l'endosome s'acidifie induisant une délocalisation du peptide de fusion des protéines d'enveloppe et à la fusion de ce dernier avec la membrane de l'endosome, libérant ainsi la capsid virale dans le cytoplasme. Toutefois, cela n'est pas le cas chez le DHBV car en utilisant un agent lysosomotropique inhibant l'acidification des endosomes, les hépatocytes sont tout de même infectés par le DHBV. L'endosome ne subit donc pas d'acidification pour que le virus s'en échappe (Funk et al., 2006; Köck et al., 1996).

Le HBV semble entrer de la même façon que le DHBV, par endocytose médiée par la clathrine (Huang et al., 2012).

Par la suite, les nucléocapsides libérées dans le cytoplasme sont transportées à la membrane nucléaire et libèrent leur génome dans le noyau à travers les pores nucléaires (voir Chapitre III- L'ADN circulaire clos covalent : un « minichromosome viral » persistant).

I.5.3-Expression du génome et synthèse des protéines virales

Dans les 24 heures suivant l'infection, l'ADN_{rc} est converti en ADN_{ccc} (cf Chapitre III- L'ADN circulaire clos covalent : un « minichromosome viral » persistant) (Tuttleman et al., 1986). L'ADN_{ccc} ainsi formé sert de matrice pour la transcription de cinq ARN messagers viraux par l'ARN polymérase II cellulaire. L'ARN pré-génomique sert d'ARN messager pour la synthèse de la protéine core et de la polymérase.

Les protéines virales sont synthétisées dans le cytoplasme puis les protéines de l'enveloppe subissent une maturation dans l'appareil de Golgi.

I.5.4-Encapsidation et transcription inverse

Une fois synthétisée, la polymérase s'accroche à l'extrémité 5' de sa propre matrice ARN sur une structure en épingle à cheveux nommée ϵ ce qui entraîne le recrutement de dimères de protéines core et l'encapsidation de ce complexe polymérase-ADN dans la capsid. Des protéines chaperonnes telles que Hsp90 (heat shock protein 90 kDa) ainsi que la partie Cter de la protéine core riche en arginines sont nécessaires afin d'interagir avec le complexe polymérase- ϵ et permettre cette étape (Hu et al., 2004; Nassal, 1992).

Suite à son encapsidation, l'ARN pré-génomique est ensuite rétrotranscrit en ADNrc à l'intérieur de la capsid grâce à la transcriptase inverse.

L'initiation de la transcription inverse se fait grâce à une amorce de 4 nucléotides synthétisée par la protéine terminale de la polymérase au niveau de la structure ϵ en 5' de l'ARNpg.

L'élongation d'un brin d'ADN se faisant à partir d'une extrémité 3'-OH, cette amorce doit être déplacée en 3' de la matrice ARNpg pour que la synthèse continue. Pour cela, il est admis que l'ARNpg se retrouve dans une conformation de boucle avec le rapprochement des extrémités 3' et 5' par des facteurs cellulaires comme le facteur d'initiation de l'élongation eIF-4G. Cette structure permet le « saut » de l'amorce sur une séquence complémentaire présente dans le DR1 (région répétée) en 3' (Beck and Nassal, 2007) (Figure 32).

Le brin négatif de l'ADN est ainsi synthétisé. Ensuite, l'activité RNaseH de la polymérase induit la destruction de l'ARNpg mis à part 15 à 18 nucléotides en 5' de l'ARNpg (étape A).

Cette amorce est transloquée en 5' du brin négatif grâce à la complémentarité entre DR1 et DR2 et initie l'élongation du brin ADN positif (étape B). L'explication de cette translocation est encore inconnue. Dans certains cas, l'amorce n'est pas transloquée ce qui mène à la formation d'un ADN linéaire double brin (étape E).

Pour finir la synthèse du brin positif, l'ADN doit être circularisé. Cette circularisation de l'ADNrc s'effectue grâce à l'appariement des séquences redondantes r en 3' et 5' de l'ADN (étape C et D) (Beck and Nassal, 2007).

I.5.5-Sécrétion des virions et particules subvirales

Après formation, les nucléocapsides virales ont deux devenir : soit elles sont enveloppées puis sécrétées sous forme de virions, soit elles sont recyclées dans le noyau pour former le pool d'ADNccc.

Deux autres types de particules sont sécrétés ; les particules subvirales composées uniquement de protéines d'enveloppe et les capsides non enveloppées.

1.5.5.1-Formation et sécrétion des particules de Dane

L'initiation de la formation des virions nécessite l'interaction, directe ou non, entre les protéines d'enveloppe et la nucléocapside.

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine d'enveloppe L a deux topologies : i-preS et e-preS. La topologie « i-preS » est nécessaire pour le recrutement des nucléocapsides et donc pour l'assemblage du virus alors que la topologie « e-preS » permet la fixation du virus sur son récepteur d'entrée (Prange, 2012).

Si le ratio entre cette protéine et les nucléocapsides n'est pas optimal, alors l'ADNrc est recyclé pour amplifier le stock d'ADNccc. Quand il y a assez de protéines d'enveloppe, les nucléocapsides sont enveloppées (Pantier et al., 2009).

Seules les capsides matures, c'est-à-dire contenant un ADN double brin, sont enveloppées. En effet, les nucléocapsides ne sont pas enveloppées s'il n'y a pas de maturation du génome. C'est par exemple le cas si la mutation YMHD est présente dans la polymérase virale puisque cette dernière empêche la transcription inverse de l'ARNpg (Gerelsaikhon et al., 1996).

Il s'avère que la capsid n'a pas la même conformation lorsqu'elle contient de l'ARN simple brin ou de l'ADN double brin. En effet, en présence d'ADN double brin, la poche présente à la base du pic de la capsid est plus ouverte, du fait de la force plus grande exercée par les deux brins d'ADN, que lorsqu'il y a de l'ARN. Certains acides aminés deviennent donc accessibles pour les protéines d'enveloppe (Prange, 2012). Ceci est confirmé par le fait que des mutations d'acides aminés dans cette poche empêchent l'enveloppement (Ponsel and Bruss, 2003).

On pourrait donc penser que ce changement de configuration de la protéine core induit sa fixation aux protéines d'enveloppe. Mais une équipe a montré qu'il n'y avait pas d'interaction directe entre les protéines L et HBc lors de l'initiation de l'enveloppement. La vérification de la maturité du génome ne se fait donc pas par interaction L-HBc mais plutôt par l'association des capsides à la membrane des corps multivésiculaires (MVB) (Bruss, 2007; Rost et al., 2006). Les capsides migrent ensuite le long de la membrane jusqu'aux sites d'enveloppement. La phosphorylation de l'extrémité C terminale de la protéine HBc pendant la maturation du génome dans les capsides est sûrement ce signal qui est vérifié lors de l'association capsides-membranes (Prange, 2012).

Grâce à ce contrôle de la maturation du génome avant enveloppement, les particules sécrétées sont toutes infectieuses.

Une fois la vérification de la maturité du génome effectuée, les capsides sont dirigées vers les corps multivésiculaires ou MVB pour être enveloppées.

Pour se diriger vers les MVB, le virus utiliserait une ubiquitine ligase endosomale nommée Nedd4 et la γ 2-adaptine, une ubiquitine binding (Figure 35). La γ 2-adaptine est un membre de la famille des adaptateurs de clathrine qui guide les processus de transport vésiculaire.

Nedd4 serait ubiquitinée et fixerait d'un côté un motif PPAY (résidus 129–132) de core et de l'autre la γ 2-adaptine transportant ce complexe vers les MVB (Prange, 2012; Rost et al., 2006). La γ 2-adaptine interagit avec la forme i-preS de L (Hartmann-Stühler and Prange, 2001; Jürgens et al., 2013). L'inhibition de cette interaction empêche la production de virions (Rost et al., 2006).

Lors de l'étape même de l'enveloppement, une partie de la protéine L fixe HBc (Bruss, 2007).

Deux régions dans les protéines L et S (103-124 de preS1 et 35-46 de HBs) et onze résidus dans la protéine HBc ont été identifiés comme bloquant l'enveloppement des capsides mais permettant la sécrétion de particules subvirales (Ponsel and Bruss, 2003).

Il semblerait que la sécrétion des virions se fasse par la voie exosomale mais le mécanisme reste inconnu (Patient et al., 2009).

1.5.5.2-Formation et sécrétion des particules subvirales et des nucléocapsides non enveloppées

La protéine HBs s'autoassemble en filaments dans l'espace périnucléaire qui fait partie du réticulum endoplasmique. Des structures se forment autour de ces filaments et vont fusionner avec l'appareil de Golgi. Les filaments sont ensuite scindés pour former des sphères qui sont sécrétées de manière indépendante des MVB et de la sécrétion des virions (Patient et al., 2007, 2009). L'efficacité de la production de virions ne dépend pas de la quantité de particules subvirales produite (Prange, 2012).

La sortie des nucléocapsides immatures non enveloppées produites *in vitro* est dépendante de la protéine Alix présente à la membrane cellulaire mais pas du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) présent sur les MVB. Les nucléocapsides se fixent à la membrane plasmique et sortent de façon non lytique (Prange, 2012).

Chapitre II- L'hépatite B

L'infection par le virus de l'hépatite B (HBV) demeure un problème majeur de santé publique. En effet, plus de deux milliards d'individus, soit près d'un tiers de la population mondiale, a déjà été en contact avec ce virus (de Franchis et al., 2003; Purcell, 1993). De nos jours, le HBV est responsable d'environ 600 000 décès par an (OMS Hépatite B, 2013). De plus, en 2013, l'OMS a estimé que plus de 240 millions de personnes étaient porteurs chroniques du HBV au niveau mondial.

II.1-Epidémiologie

II.1.1-Prévalence

Il existe une répartition géographique de l'infection par le HBV avec des zones de prévalence variable. On peut ainsi définir trois zones :

- Des zones de faible prévalence (inférieure à 2 %) comme l'Amérique du Nord, l'Europe du Nord et de l'Ouest, l'Australie et une partie de l'Amérique du Sud.
- Des zones de prévalence intermédiaire (entre 2 % et 7 %) comme l'Asie du Sud-Ouest, le Maghreb, le Japon, la Russie, l'Europe du Sud et de l'Est, le Nord de l'Alaska ainsi que les zones autour du bassin amazonien.
- Des pays où la prévalence de l'infection du HBV est supérieure à 8 % tels que le continent africain, l'Asie du Sud, les Philippines et l'intérieur du bassin amazonien. Dans ces pays, plus de la moitié des individus est infectée à un moment donné de leur vie.

II.1.2-Modes de transmission

Le virus de l'hépatite B peut-être présent dans le sang en large quantité (10^8 à 10^{10} particules infectieuses par millilitre) mais est aussi détecté dans le sperme, la salive et les fluides (Lee, 1997).

Ce pathogène se transmet principalement via quatre modes de transmission : la transmission parentérale, la transmission périnatale (materno-fœtale), la transmission sexuelle et la transmission horizontale.

La transmission parentérale peut être due au partage des seringues chez les usagers de drogues, à une transfusion sanguine réalisée sans dépistage préalable, à de mauvaises pratiques dans les hôpitaux ou au non-respect des règles d'hygiène pendant la réalisation d'un piercing ou d'un tatouage.

Le mode de transmission périnatale est prépondérant dans les pays de forte endémie comme l'Asie mais est aussi la cause d'un tiers des infections chroniques dans les pays de

faible endémie (OMS, 2013). Pour ce mode de transmission, la contamination peut se faire de la mère à l'enfant principalement pendant l'accouchement ou exceptionnellement lors de la grossesse ou lors de l'allaitement. De plus, il est important de noter que plus l'individu est infecté tôt, plus le risque de développer une infection chronique est élevé (90 %).

L'immunoprophylaxie des enfants nés de mères infectées par le HBV, incluant le vaccin et les immunoglobulines HBV, permet le contrôle de cette voie de contamination par le HBV.

La transmission sexuelle représente le mode de contamination prépondérant dans les pays de faible endémie (de Franchis et al., 2003).

De manière moins fréquente, la transmission du virus peut avoir lieu entre les membres d'une famille via les mœurs de la vie quotidienne (Petersen et al., 1976). En effet, le HBV peut survivre plus d'une semaine hors du corps, sur une lame de rasoir par exemple, sans perdre de son infectiosité (OMS, 2002).

Néanmoins, le mode de transmission horizontale n'est pas élucidé dans au moins 30 % des cas d'infection. Ceci pourrait s'expliquer par une réticence des personnes à avouer un comportement à risque mais aussi par l'emprunt d'autres routes d'infection par le virus (Shapiro, 1993).

II.2-Architecture et fonctions du foie

Le virus de l'hépatite B est un des principaux pathogènes infectant le foie qui est un organe vital situé au niveau thoraco-abdominal. Il est l'organe le plus volumineux de l'organisme humain et est divisé en deux lobes droit et gauche puis en huit segments.

Il possède la capacité de se régénérer après destruction partielle et assure plusieurs fonctions (Seeger and Mason, 2000). Son rôle dans le métabolisme de l'organisme est central. En effet, il est impliqué dans la régulation glycémique, le métabolisme lipidique ainsi que la synthèse de protéines essentielles comme l'albumine ou certains facteurs de la coagulation et de l'inflammation. De plus, il permet la détoxification du sang veineux en provenance du système digestif (catabolisme protéique, élimination biliaire des métabolites lipophiles, métabolisation des toxiques et des médicaments).

L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique. Le centre du lobule hépatique est une veine centrolobulaire, entourée de travées d'hépatocytes sous forme radiaires. A l'autre extrémité de ces dernières et en périphérie des lobules hépatiques se situent les espaces portes. L'espace porte comprend une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte ainsi qu'un ou deux canaux biliaires.

Le foie est un organe constitué de tissu épithélial qui contient deux types cellulaires : les hépatocytes qui forment le parenchyme hépatique et les cellules biliaires qui bordent les canaux biliaires.

Les hépatocytes sont organisés en travées. Le contact intercellulaire entre les pôles apicaux des hépatocytes forment les canalicules biliaires. Le pôle basolatéral de ces cellules est au contact des sinusoides sanguins bordés de cellules endothéliales. Les hépatocytes sont séparés des cellules endothéliales sinusoidales uniquement par une matrice extracellulaire (MEC). Cet espace entre les deux types cellulaires est appelé espace de Disse.

L'hépatocyte est la cellule responsable des fonctions hépatiques précédemment décrites. L'interface avec les sinusoides au niveau du pôle basolatéral permet une modification de la composition sanguine en fonction des besoins (rôle métabolique, nutritionnel et endocrinien).

L'épithélium hépatique est aussi constitué de cellules biliaires ou cholangiocytes dont le rôle fonctionnel est moindre. Ces cellules forment une monocouche cellulaire entourant les canaux biliaires. Le pôle apical de ces cellules est dirigé vers la lumière du canal biliaire au contact de la bile alors que le pôle basolatéral repose sur une lame basale séparant les cellules du tissu conjonctif. De manière importante, les cellules biliaires sont impliquées dans la modification de la constitution de la bile via l'exportation de l'eau, des électrolytes et des macromolécules (Maurice et al., 1998).

Le foie contient aussi une population cellulaire non épithéliale. Ce sont les cellules sinusoidales, les cellules stellaires et les cellules immunitaires.

Les cellules endothéliales sinusoidales bordent les sinusoides de façon discontinue et présentent de pores intracytoplasmiques permettant les échanges entre le sang et les hépatocytes. Elles jouent un rôle de filtre de ces échanges. Elles contribuent également de façon active à certaines fonctions hépatocytaires en assurant par exemple la transformation de protéines circulantes, comme la transferrine, pour permettre sa captation par l'hépatocyte (Scoazec, 1999).

Les cellules stellaires sont des péricytes très spécialisés, assurant plusieurs fonctions importantes : la régulation du flux sanguin sinusoidal grâce à leurs propriétés contractiles, la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire occupant l'espace périsinusoidal et le stockage des rétinoïdes dérivés de la vitamine A.

Le foie, qui appartient au système réticulo-endothélial, est un organe essentiel pour l'immunité de l'organisme. Ainsi, l'importance du débit sanguin intrahépatique et l'origine veineuse de sa vascularisation (drainant le système veineux splanchnique, en provenance du tube digestif) exposent le foie à de nombreux pathogènes. C'est pourquoi le foie est doté d'une population de cellules immunitaires. Cette population représente 45 % de la population cellulaire non épithéliale du foie parmi lesquelles des cellules de Kupffer, des cellules natural killer (cellules NK) ou encore des lymphocytes B et T (Dong et al., 2007).

Les cellules de Kupffer sont les cellules macrophagiques des sinusoides hépatiques et sont en contact avec les hépatocytes via leurs extensions cytoplasmiques. Leur rôle est de

phagocyter les particules étrangères circulant dans le sang. Elles participent aussi au recrutement d'autres cellules immunitaires de la réponse innée et sécrètent des cytokines.

Les cellules NK font aussi partie de la réponse immunitaire innée et sont capables de produire des cytokines pro et anti-inflammatoires en grande quantité pour réguler la réponse cellulaire et contrôler une infection.

Les lymphocytes font quant à eux partie de la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes B après activation par des cellules présentatrices d'antigènes engagent une réponse humorale contre un pathogène en produisant des anticorps spécifiques tandis que les lymphocytes T ont un rôle régulateur ou cytolytique (Ishibashi et al., 2009).

II.3-Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B

Par définition, une hépatite virale est un processus inflammatoire du foie en réponse à un virus. Lorsqu'ils sont présents, les symptômes d'une hépatite que sont l'asthénie, les nausées, l'hyperthermie et l'ictère, n'étant pas spécifiques de cette maladie, sa prise en charge est retardée. Le HBV étant 50 à 100 fois plus contagieux que le virus de l'immunodéficience acquise (HIV), ce délai entre l'infection et sa détection entraîne la propagation du virus à travers la population.

L'hépatite B est une maladie à long terme. Son évolution est lente et progressive. Dans 5 % des cas chez l'adulte et 90 % des cas chez l'enfant, l'hépatite aiguë évolue vers la chronicité. En absence de traitement, cette chronicité peut ensuite évoluer en cirrhose hépatique voire en carcinome hépatocellulaire.

Le fait que les enfants infectés par le HBV avant 5 ans développent dans 90 % des cas une infection chronique mais que ce chiffre est de seulement 5 % chez les adultes reflète le statut immunologique de l'hôte. Une expérience montre en effet qu'une exposition prénatale de souris au HBV entraîne une tolérance des lymphocytes T vis-à-vis de l'antigène de capsidite HBc chez les nourrissons (Roh and Kim, 2003). Dans ce cas, l'antigène HBe traverse la barrière placentaire et joue un rôle tolérogène. Enfin l'évolution vers la chronicité est plus fréquente chez les sujets immunodéprimés (infection HIV, transplantés ou hémodialysés) que chez les sujets immunocompétents.

II.3.1-Hépatite aiguë

L'hépatite B aiguë est une maladie généralement asymptomatique sauf chez les adolescents ou jeunes adultes pour lesquels l'apparition de symptômes est fréquente. De manière intéressante, l'hépatite aiguë est caractérisée par la présence des antigènes HBs (AgHBs) et HBe (AgHBe).

L'hépatite B aiguë peut aboutir à la guérison spontanée (90 % des cas d'infection à l'âge adulte). La première séroconversion apparaît dans le système HBe avec la disparition de l'AgHBe et la production d'anticorps anti-HBe. Cette séroconversion est concomitante à une diminution puis une négativation de la charge virale (ou quantité d'ADN sérique). La séroconversion HBs est plus tardive et l'apparition d'anticorps anti-HBs signe la guérison. Seules des traces d'ADN circulaire clos covalent (ADNccc), minichromosome viral, persisteront dans les cellules infectées (Wieland et al., 2004b).

Dans 0,1 à 1 % des cas, l'hépatite virale aiguë conduit au développement d'une hépatite fulminante. L'issue de cette forme d'hépatite est souvent fatale en l'absence de transplantation hépatique (de Franchis et al., 2003).

II.3.2-Hépatite chronique

L'infection chronique est définie par le maintien des antigènes HBs plus de 6 mois dans le sérum sans apparition d'anticorps anti-HBs (Lok et al., 2001).

Il existe quatre phases non systématiques de l'infection chronique par HBV : la phase d'immunotolérance, celle de clairance virale immunomédiée encore appelée phase immunoactive, celle de porteur inactif et enfin la phase de réactivation virale (Lok et al., 2001).

II.3.2.1-Immunotolérance

Cette phase survient le plus souvent suite à une transmission verticale du virus. Elle est caractérisée par l'absence de réaction immunitaire efficace de l'organisme contre le HBV. Pendant cette phase, la présence des antigènes HBe et HBs reflète une forte réplication virale. Le taux d'ADN sérique est très élevé car la majorité des hépatocytes est infectée et produit des virions infectieux et aucune inflammation du foie n'est cliniquement visible. De plus, le risque de développer une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (HCC) est faible à court terme.

II.3.2.2-Clairance virale (phase immunoactive)

Au cours de cette phase, le système immunitaire développe une réponse antivirale adaptée contre le HBV. Les conséquences de l'activation de la réponse immunitaire sont une destruction des hépatocytes infectés et une diminution de la réplication virale. Cette dernière a pour conséquence le développement d'une hépatite active avec des lésions histologiques nécrotiques et inflammatoires, puis l'apparition d'une fibrose cicatricielle. Sur le plan biologique, la quantité d'ADN viral sérique diminue et les enzymes hépatiques (ALAT) augmentent traduisant l'activité inflammatoire hépatique.

A l'issue de cette phase, on observe chez certains patients une séroconversion AgHBe. L'antigène HBe devient négatif et les anticorps anti-HBe deviennent détectables. Cette séroconversion est une étape importante de l'histoire naturelle de l'infection chronique par le HBV. En effet la séroconversion AgHBe est généralement associée à une issue favorable de la maladie (Lin and Kao, 2011).

II.3.2.3-Stade de porteur inactif AgHBs

Après la séroconversion HBe, la réplication virale est efficacement contrôlée par le système immunitaire de l'hôte. Le taux sérique d'ADN HBV devient très faible voire indétectable et le taux des enzymes hépatiques est normal traduisant une absence d'activité inflammatoire hépatique. Le risque de développer une cirrhose ou un HCC est moindre pendant cette phase. De plus, la phase de porteur inactif peut conduire à la résolution de l'infection avec l'apparition d'une séroconversion HBs à long terme qui est caractérisée par la détection d'anticorps anti-HBs (indiquant un signe de guérison clinique).

II.3.2.4-Réactivation

Une réactivation spontanée de l'hépatite B peut être observée chez les porteurs inactifs (Davis et al., 1984). Cette phase est généralement asymptomatique avec la réapparition d'une nécroinflammation du foie.

La réactivation virale peut survenir suite à des modifications de la balance immunitaire entre le virus et l'hôte (notamment en cas de prise de médicaments immunosuppresseurs) ou suite à l'émergence de variants viraux. En effet, chez certains patients, des mutants ,égatifs pour l'antigène HBe apparaissent. Ces virus présentent une mutation dans la région du promoteur core ou en N terminale de l'antigène HBe (région preC) conduisant à une faible expression voire une absence de sécrétion de l'antigène HBe dans le sérum. Ainsi, ces variants viraux échappent à la réponse immunitaire anti-HBe de l'organisme et peuvent se répliquer. De manière intéressante, le profil des marqueurs sériques peut être identique à un « vrai » porteur inactif dans les phases de rémission spontanée. Cependant, la réplication virale est plus élevée dans le cas des mutants négatifs pour l'AgHBe. La reprise de la réplication virale peut avoir comme conséquence le développement d'une hépatite chronique « AgHBe négative », ainsi que le développement de lésions hépatiques. Il est donc important de surveiller le taux intracellulaire d'ADN du HBV et les taux d'enzymes hépatiques sériques pendant le portage inactif pour s'assurer de l'inactivité du virus et de l'absence de réactivation virale (Dény and Zoulim, 2010).

II.3.3-Hépatite occulte

Une hépatite occulte est définie par la présence d'ADN d'HBV dans le foie avec un taux d'AgHBs indétectable dans le sérum. Cette absence d'antigène HBs n'est pas due à l'apparition d'un mutant d'échappement mais est plutôt la conséquence de modifications

épigénétiques et immunitaires bloquant la transcription du génome du HBV (Raimondo et al., 2013).

II.3.4-Fibrose / Cirrhose

La chronicité de l'infection favorise le développement de maladies sévères du foie comme la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (McMahon, 2005).

Les lésions hépatiques sont en partie dues à la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (LTc) et les cellules NK. En effet, la plupart du temps, HBV n'est pas cytopathique. Une réponse cellulaire dirigée contre les antigènes du HBV se met en place et les lymphocytes T vont éliminer les hépatocytes infectés entraînant ainsi une inflammation puis une nécrose des tissus.

Cependant, dans certains cas, HBV est cytopathique par le biais de ces protéines et les hépatocytes peuvent entrer en apoptose directement à cause du virus. Il a été montré que les protéines HBx et HBsP ont un rôle pro-apoptotique dans des cellules HepG2 (Lu and Chen, 2005; Lu et al., 2006). De plus, le HBV peut aussi causer directement la mort des hépatocytes si sa réplication est trop élevée (voir II.6-Rôle du système immunitaire dans le contrôle de l'infection et dans la pathogénèse pour plus de détails).

Les activités inflammatoire et nécrotique hépatiques prolongées évoluent ensuite vers le développement d'un tissu cicatriciel ou fibrose. La fibrose est un dépôt intraparenchymateux de matrice extracellulaire, se développant initialement au niveau des espaces portes puis des veines centrolobulaires, jusqu'à réaliser des ponts fibreux. L'évolution terminale est le développement d'une cirrhose délimitant des nodules hépatocytaires de régénération. Annuellement, 2 à 10 % des patients infectés chroniquement par HBV développent une cirrhose.

II.3.5-Carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire est un cancer hépatique qui provoque mondialement le décès de près d'un million de personnes par an dont près de 4000 en France. Le cancer hépatocellulaire est le sixième cancer le plus fréquent dans le monde dont 50 % des cas sont causés par le HBV (de Franchis et al., 2003).

Il se classe au troisième rang des cancers les plus mortels (9,2 %) après celui du poumon (18,2 %) et celui de l'estomac (9,7 %). Ce cancer est la première cause de mortalité en Chine et en Afrique et constitue la première cause de transplantation hépatique en Europe (OMS, 2013).

L'émergence de ce cancer est plus fréquent chez les patients ayant développé une cirrhose. Néanmoins dans 30 à 50 % des cas le HCC peut survenir sans développement préalable de cirrhose (Lok et al., 2001).

Il existe des facteurs de co-morbidité qui surexposent le patient au risque de HCC comme la co-infection par le virus de l'hépatite C, la consommation excessive d'alcool ou encore l'exposition à l'aflatoxine B1 (Wu and Santella, 2012).

Le risque de HCC diminue après résolution de l'infection HBV.

Les mécanismes d'oncogenèse du HBV ne sont pas totalement élucidés.

Tout d'abord, les HCC, quelques soient leurs origines, sont souvent associés à des mutations dans des gènes somatiques comme ceux remodelant la chromatine. Cependant l'altération de certains gènes comme IRF2 dans les HCC semble associée à l'infection par HBV. IRF2 est une protéine partenaire de MDM2, l'inhibiteur de p53. Elle joue un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire et son action suppressive de tumeur vient d'être démontrée dans les HCC (Guichard et al., 2012).

Ensuite, l'insertion aléatoire du génome viral dans le génome de l'hôte pourrait conduire à une instabilité du génome avec l'activation potentielle de gènes pro-carcinogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Récemment il a été démontré que HBV s'intégrait préférentiellement dans le gène TERT (telomerase reverse transcriptase) suggérant une possible dérégulation du cycle cellulaire (Fujimoto et al., 2012).

De plus, les propriétés transactivatrices de la protéine HBx et de la grande protéine d'enveloppe L pourraient permettre l'activation d'oncogènes et déréguler le cycle cellulaire (Guerrieri et al., 2013). La protéine virale HBx serait aussi impliquée dans la modulation épigénétique de l'ADN cellulaire (Tian et al., 2013).

II.4-Vaccins

Des vaccins contre le HBV sont disponibles depuis les années 80. Ils sont constitués soit de l'antigène HBs inactivé extrait du sérum de patient, soit de l'antigène HBs recombinant.

Ce sont les premiers vaccins à protéger contre un cancer. En effet, ils permettent de diminuer de 75 % l'incidence du HCC dans les zones à forte endémie. De manière intéressante, l'efficacité du vaccin chez les enfants est supérieure à 90 % (CDC, 2013). De plus, les enfants étant plus sujets au passage à la chronicité, il est essentiel de les vacciner.

Au niveau mondial, une grande partie des pays ont inclus la vaccination contre le HBV dans leur programme national de vaccination. Cependant, certains problèmes subsistent dans certains pays endémiques comme : la conservation du vaccin (2 à 8°C), le coût (qui peut paraître élevé mais qui devient dérisoire si le coût des traitements des patients chroniques est pris en compte) et la délivrance du vaccin en trois doses (qui obligent les personnes à se rendre plusieurs fois dans leur centre de soin).

Il est toutefois important de noter que le vaccin n'est pas efficace contre une infection déjà établie, ni contre des mutants d'échappement à la vaccination. En effet, ces virus d'échappement possèdent des mutations rares, dont la mutation G145R est la plus commune, dans le déterminant « a » de l'AgHBs qui empêchent la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps (Zuckerman, 2000).

De plus, depuis quelques années, diverses études mettant en évidence l'apparition de scléroses en plaque suite à une vaccination contre le HBV ont fait diminuer la fréquence de vaccination dans le monde, et ce, malgré de nombreuses études prouvant le contraire (Mikaeloff et al., 2009; Zipp et al., 1999).

Ainsi, en addition de ce vaccin, le développement de traitements efficaces contre le HBV est nécessaire afin d'éradiquer ce pathogène.

II.5-Les traitements

Actuellement, les thérapies disponibles pour la prise en charge des patients infectés de manière chronique par le HBV consistent en l'administration d'immunomodulateurs qui stimulent le système immunitaire de l'hôte pour aider l'organisme à éliminer le virus (avec des cytokines comme l'interféron) et d'antiviraux qui bloquent la réplication virale afin d'éviter les lésions du foie et l'éventuelle apparition de cirrhose voire d'un HCC (Zoulim, 2012).

L'interféron- α (pégylé ou non) et cinq analogues de nucléosides que sont la lamivudine (LAM), l'adéfovir dipivoxil (ADV), l'entecavir (ETV), la telbivudine (LdT) et le ténofovir (TDF) sont autorisés pour traiter l'hépatite B chronique (Zoulim and Locarnini, 2009).

II.5.1-Immunomodulateurs autorisés : l'Interféron- α et l'Interféron- α pégylé

L'interféron est une cytokine naturellement produite par les cellules en réponse à différents stimuli comme l'infection d'une cellule par un virus.

Dans le cadre d'une thérapie anti-HBV, l'interféron- α (IFN- α) module la réponse immunitaire. Généralement, l'IFN- α est administré sous forme pégylée afin de favoriser sa stabilité et sa délivrance. Toutefois, cette cytokine provoque de nombreux effets secondaires (symptômes grippaux, maux de tête, fatigue, dysfonctionnements thyroïdiens ou problèmes psychiatriques) et induit une réponse antivirale chez seulement 25 % des patients.

Cependant, l'IFN- α présente l'avantage d'être administré sur une courte période, de ne pas provoquer de résistance et d'induire une séroconversion HBe prolongée chez environ 30 % des patients (Viganò and Lampertico, 2011).

II.5.2-Analogues de nucléos(t)ides et résistance

II.5.2.1-Analogues de nucléos(t)ides

Afin de bloquer la réplication virale, des antiviraux sont utilisés dans le cadre d'une hépatite chronique. Ces derniers ciblent principalement la polymérase.

Ainsi, on distingue deux catégories d'analogues de nucléos(t)ides : les analogues de pyrimidine comme la lamivudine ou la telbivudine et les analogues de purine comme l'entécavir, l'adéfovir et le ténofovir. Ces deux catégories d'analogues de nucléos(t)ides agissent en bloquant l'activité de la polymérase virale (réplication et transcription inverse) ou en empêchant l'initiation de la transcription inverse. En effet, les analogues de nucléos(t)ides, qui ne possèdent pas de groupe hydroxyle en 3', s'incorporent lors de la synthèse de l'ADN viral à la place des nucléotides et empêche la liaison d'un autre nucléotide, induisant la fin de la synthèse de l'ADN (Lucifora and Zoulim, 2007).

De manière importante, la suppression virale (correspondant à l'absence de détection de l'ADN du HBV) a lieu chez 70 à 90 % des patients traités pendant un an à l'aide des nouveaux analogues de nucléos(t)ides (Dienstag, 2008; EASL, 2012). Malheureusement, la durée du traitement étant très longue, voire se faisant à vie, un grand nombre de virus résistants aux analogues de nucléos(t)ides (principalement à la lamivudine, la telbivudine et à l'adéfovir) sont sélectionnés au cours du temps, limitant l'efficacité de ces derniers dans la lutte contre le HBV.

II.5.2.2-Résistances aux analogues de nucléos(t)ides

Du fait de la faible fidélité de la polymérase du HBV qui induit 10^{-4} substitutions par base et par cycle, l'utilisation d'analogues de nucléos(t)ides entraîne la sélection de mutations de résistances (Girones and Miller, 1989). Ainsi, le taux de résistance peut atteindre 80 % au bout de 5 ans pour les patients traités avec la lamivudine. Toutefois, cet analogue est encore beaucoup utilisé en première ligne thérapeutique contre l'hépatite B chronique dans certains pays comme la Chine où le ténofovir n'est pas encore cliniquement approuvé.

En revanche, l'utilisation de l'entécavir, un autre analogue de nucléos(t)ides, induit un faible taux de résistance. Malheureusement, du fait des résistances croisées, cet analogue est moins efficace chez les patients ayant préalablement été traités à la lamivudine. Ainsi, en présence de deux mutations de résistance à la lamivudine (M204I, V173L ou L180M), une seule mutation (T184I/S ou S202G) est nécessaire pour obtenir un phénotype de résistance à l'entécavir (Dény and Zoulim, 2010).

Cependant, en raison du coût des traitements dans un grand nombre de pays des zones d'hyperendémie, le traitement débute par une monothérapie avec un analogue de nucléos(t)ide ayant une faible barrière de résistance entraînant une moindre efficacité des autres analogues. Les recommandations de traitement sont donc de débiter le traitement par un analogue à forte barrière de résistance puis de combiner deux analogues dès l'augmentation de la charge virale marquant le développement d'une résistance (Gish et al., 2012).

II.5.3-Nouvelles cibles des antiviraux

L'efficacité de la bithérapie combinant soit deux analogues de nucléos(t)ides soit un analogue avec un immunomodulateur est limitée comparativement à la monothérapie (Zoulim, 2012).

Ainsi, il est nécessaire de développer des antiviraux ciblant d'autres étapes du cycle viral comme l'entrée, la formation de l'ADNccc, sa régulation épigénétique ou encore l'assemblage de la nucléocapside.

II.5.3.1-L'entrée

Actuellement, les inhibiteurs en cours de développement ciblent préférentiellement l'étape de réplication virale. Néanmoins, afin de limiter la propagation du HBV, l'entrée virale représente une cible de choix. Ainsi, un peptide preS1 mimant la grande protéine d'enveloppe est en cours de développement. De manière intéressante, il a été montré que ce peptide inhibait l'entrée virale chez des souris uPA/SCID qu'il soit administré avant ou après infection (Petersen et al., 2008; Volz et al., 2013). En théorie, cet antiviral, combiné à un analogue de nucléos(t)ide, devrait permettre de diminuer la réplication, tout en empêchant la réinfection de nouvelles cellules.

II.5.3.2-L'ADNccc

L'ADNccc est une cible thérapeutique majeure. En effet, cet ADN n'est jamais éliminé des cellules infectées et peut causer une réactivation virale lors d'une défaillance du système immunitaire (Lau et al., 1997). C'est pourquoi de nombreuses méthodes sont mises en place pour essayer de le détruire.

Lors d'un screening de molécules, deux composés sulfonamides bisubstitués réduisant la quantité d'ADNccc sans affecter la réplication ont été découverts. Il semblerait que ces composés inhiberaient une molécule impliquée dans la conversion de l'ADNrc en ADNccc (Cai et al., 2012).

Une autre technique consiste à détruire le génome viral grâce à des nucléases zinc-finger qui ciblent des séquences de trois ou quatre fois neuf nucléotides. Un test effectué sur un plasmide HBV transfecté s'est révélé concluant. Une partie de l'ADN viral est néanmoins

réparé par le système de réparation cellulaire souvent avec des délétions ou des insertions (Cradick et al., 2010). Le problème de cette approche reste le moyen de délivrance de la molécule chez l'homme.

Sur le même principe que les nucléases zinc-finger, les TALENs (pour transcription activator like effector nuclease) ont été développés comme thérapie contre le HBV. Ces nucléases sont aussi capables de couper des séquences d'ADN spécifiques mais avec une efficacité *in vitro* et *in vivo* plus grande que les nucléases zinc-finger (Bloom et al., 2013).

Très récemment, il a été montré que l'activation du récepteur de la lymphotoxine- β induisait une diminution du pool d'ADNccc sans aucune toxicité pour le foie. L'activation de ce récepteur augmente la quantité d'Apobec 3A et 3B qui induisent une déamination de l'ADNccc en s'y fixant via la protéine core (Lucifora et al., 2014).

Une autre approche serait de rendre l'ADNccc silencieux en interférant avec sa régulation épigénétique. Il a été montré que l'IFN- α diminuait la transcription de l'ADNccc en recrutant des déacétylases et en réduisant la fixation des facteurs de transcription STAT-1 et 2 (Belloni et al., 2012).

II.5.3.3-Nucléocapsides

Afin de cibler des étapes plus tardives du cycle viral, et ainsi empêcher le relargage des virions néoformés et donc limiter la propagation du HBV, des inhibiteurs de capsides ont été développés. Ainsi, l'inhibiteur de capside AT-130 empêche l'encapsidation de l'ARN alors que l'inhibiteur BAY41-4109 déstabilise les capsides (Delaney et al., 2002). De manière intéressante, il a été montré que ces molécules ont la capacité d'inhiber *in vitro* la réplication virale de mutants résistants aux analogues de nucléos(t)ides (Billioud et al., 2011). De plus, du fait de son efficacité *in vivo* chez le modèle murin uPA/SCID (Brezillon et al., 2011), l'inhibiteur BAY41-4109 paraît très prometteur. Enfin, ces deux molécules, en empêchant le recyclage des nucléocapsides dans le noyau, pourraient permettre la diminution du pool d'ADNccc.

Par ailleurs, les protéines de capsides pourraient avoir une fonction nucléaire en réprimant l'expression de certains ISGs (gènes stimulés par la voie interféron). Des molécules ciblant leur trafic nucléaire pourraient ainsi restaurer les réponses innées hépatocytaires (Gruffaz et al., submitted).

Enfin la stimulation du système immunitaire serait aussi un moyen d'accélérer l'élimination du HBV.

II.6-Rôle du système immunitaire dans le contrôle de l'infection et dans la pathogénèse

La balance entre la réplication virale et la réponse immunitaire de l'hôte est le déterminant principal de la pathogénèse des maladies du foie (Shi and Shi, 2009). En effet, certaines personnes développent des hépatites aiguës et guérissent spontanément tandis que d'autres développent une infection chronique. Par ailleurs, la capacité du système immunitaire à éliminer le virus dans les phases précoces de l'infection déterminera le devenir clinique de l'infection.

Le HBV n'est pas directement cytopathique. C'est le système immunitaire qui en s'attaquant au HBV est la cause des blessures hépatiques. Une forte réplication virale est associée à de grands dommages hépatiques, c'est pourquoi le but premier des traitements est de diminuer cette réplication.

II.6.1-La réponse immunitaire innée et HBV

La réponse immunitaire innée est la première à intervenir lors de la présence d'un pathogène et est primordiale pour contrôler la réplication du pathogène et activer la réponse immunitaire adaptative.

Elle fait intervenir des récepteurs reconnaissant des motifs (PRR) comme les Toll-like récepteurs. Suite à la détection d'un motif pathogène par au moins un de ces récepteurs, des voies de signalisation sont mises en place et les facteurs de transcription comme NF- κ B, IRF3 et 7 sont activés. Ces facteurs serviront à la transcription des interférons de type I (IFN- α et IFN- β) et des cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-1 et IL-6). Les cytokines proinflammatoires serviront à recruter les cellules inflammatoires comme les cellules NK ou encore les macrophages. Les interférons de type I vont quant à eux agir sur la cellule infectée via leurs récepteurs et la voie Jak/STAT pour activer les interféron-stimulated genes (ISGs), acteurs majoritaires de l'inhibition de la réplication d'un pathogène.

Les études sur la réponse innée anti-HBV se heurtent souvent au problème du modèle cellulaire ou animal à utiliser. En effet, l'hépatite B étant asymptomatique dans les premières phases de l'infection, il est très rare de trouver des patients en phase aiguë. Il est donc nécessaire de faire un compromis entre l'utilisation d'un modèle cellulaire plus pratique mais moins physiologique et l'utilisation d'un modèle animal.

Pendant longtemps, le HBV a été considéré comme un virus silencieux ne déclenchant pas de réponse immunitaire innée. En effet, l'analyse chez le chimpanzé de l'expression des ISGs par microarray après 2 semaines d'infection suggère l'absence de cette réponse (Wieland et al., 2004a). Il est vrai que le virus, de par sa stratégie de réplication, semble invisible pour le système immunitaire. L'ADNccc est retenu dans le noyau, les ARN sont coiffés et polyadénylés comme les ARN de l'hôte et l'ADNrc est caché dans une capsid.

Cependant, plusieurs équipes ont réussi à montrer qu'HBV pouvait être détecté par les senseurs de la réponse innée. De manière intéressante, la transduction de la lignée HepaRG par un baculovirus HBV mène à l'activation de la réponse IFN- β et à un contrôle de la réplication virale (Lucifora et al., 2010). Les senseurs cytoplasmiques ou membranaires impliqués dans la détection du virus sont encore inconnus. De plus, la réplication du HBV est inhibée via la sécrétion d'IFN- α et β , suite à l'activation des TLR (toll-like receptor) par leurs ligands chez la souris (Isogawa et al., 2005).

Les cellules de Kupffer, bien que non infectées, pourraient aussi détecter le HBV. En effet, lors de l'infection d'hépatocytes primaires par le HBV, les cellules de Kupffer présentes dans la culture reconnaissent le virus et sécrètent des cytokines proinflammatoires comme TNF- α , IL-6 et IL1- β via NF- κ B. L'IL-6 a ensuite une action antivirale directe en inhibant l'expression d'HNF-1 et 4, des facteurs de transcription spécifiques du foie essentiels pour la réplication du HBV (Hösel et al., 2009).

Enfin des données montrant l'activation précoce des cellules NK et la sécrétion d'IFN- γ dans des patients en phase aiguë d'infection HBV sont aussi publiées (Fisicaro et al., 2009).

Ces données suggèrent que, bien que HBV n'induit qu'une faible production de cytokines (IFN- α , TNF- α , IL-15, IL-10, IL-6 et IL1- β) comparé au HIV ou au HCV, une réponse immunitaire innée est tout de même mise en place (Stacey et al., 2009).

Comment expliquer que le HBV soit détecté par l'immunité innée mais que la réponse en découlant, c'est-à-dire la production d'IFN de type I et de cytokines proinflammatoires, soit si faible ?

Il s'avère qu'HBV semble invisible pour le système immunitaire inné car il est capable de l'inhiber très rapidement après le début de l'infection (dès 2 heures d'infection (Luangsay et al.)). Après 2 semaines d'infection, plus aucune trace ne peut laisser penser à l'activation de cette réponse.

En effet, de nombreuses protéines du HBV semblent moduler des acteurs de l'immunité. Ainsi, il a été montré que la polymérase d'HBV inhibait l'induction d'IFN- β en interagissant avec DDX3, le facteur transcriptionnel de l'IFN- β . La polymérase inhibe donc la réponse induite via les TLR3 et RIG-I reconnaissant les ADN double brin (Wang and Ryu, 2010).

De plus, il a été montré qu'HBV était capable d'inhiber la transcription du gène IFN- β et qu'HBc était responsable de cette inhibition (Gruffaz et al.; Whitten et al., 1991).

Enfin, la protéine HBx semble aussi activement inhiber la réponse innée. En effet, HBx interagirait avec IPS-1, un adaptateur de la réponse IFN, inhibant ainsi la production d'IFN de type I (Kumar et al., 2011).

En plus d'empêcher l'expression des interférons de type I, le HBV inhiberait aussi l'effet antiviral médié par la réponse IFN. Ainsi, la polymérase pourrait aussi avoir un effet plus tardif en inhibant la translocation du facteur de transcription STAT dans le noyau et donc l'expression des ISGs (Wu et al., 2007a).

Ces résultats étant obtenus dans des modèles de transfection ou de surexpression nécessitent d'être reproduits dans un modèle plus physiologique.

II.6.2-La réponse immunitaire adaptative

Deux réponses immunitaires adaptatives se mettent en place lors de l'infection. La réponse humorale par les anticorps contribue à éliminer les virions circulants et empêche l'infection de nouvelles cellules. Quant à la réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T, elle élimine les cellules infectées et les cytokines produites éliminent les intermédiaires de réplication (Chisari et al., 2010).

Les lymphocytes CD4⁺ reconnaissent les épitopes HBV présentés par des macrophages sur des CMH de classe II. Ces lymphocytes sont alors activés, sécrètent des cytokines, activent les lymphocytes B producteurs d'antigènes et régulent l'activité des cellules CD8⁺. Les lymphocytes CD8⁺ reconnaissent un épitope d'HBV présenté par un CMH de classe I à la surface des hépatocytes infectés, sont activés et détruisent la cellule infectée grâce à la perforine et au granzyme. Des cytokines, comme l'IFN- γ et le TNF- α , agissant directement au niveau des intermédiaires de réplication sont aussi produites par ces cellules (Ganem and Prince, 2004; Lee, 1997). Les protéines virales induisant principalement le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative sont HBc et HBs.

Comme nous avons pu le voir, le passage à la chronicité de l'hépatite B est contrôlé par le système immunitaire de l'hôte. En effet, une infection HBV persistante est caractérisée par une faible réponse adaptative due à une réponse inefficace des lymphocytes T contrairement aux patients ne développant qu'une hépatite aiguë (Chisari et al., 2010). Le développement d'une réponse immunitaire adaptative efficace est donc important pour éliminer le virus. En effet, il a été montré que des patients chroniquement infectés ayant reçu de la moelle osseuse de patients ayant résolu l'infection résolvent à leur tour l'infection HBV (Bertoletti et al., 2009).

Il s'avère que les principaux effecteurs responsables de l'élimination du virus sont les lymphocytes CD8⁺. En effet, la déplétion des cellules CD4⁺ n'altère pas la durée et le devenir de l'infection tandis que la déplétion des lymphocytes CD8⁺ entraîne un délai dans l'élimination dans des cellules infectées (Thimme et al., 2003). Les cellules CD4⁺ contribuent probablement indirectement au contrôle de l'infection en activant les cellules CD8⁺.

Les raisons expliquant la réponse inefficace des cellules CD8⁺ ne sont pas claires. Une étude a montré que le polymorphisme des CMH et les différences de répertoire de lymphocytes T de chaque individu conduisent à une affinité variable des épitopes HBV ce qui déterminerait le développement ou non d'une hépatite chronique (Thursz et al., 1995). En effet, les personnes possédant le variant HLA-DP semblent avoir un risque accru de développer une infection chronique (Guo et al., 2010b).

Le virus contribue aussi à cette réponse inefficace des lymphocytes chez les patients chroniquement infectés. Comme expliqué précédemment, l'antigène HBe est connu pour induire une immunotolérance néonatale à HBV en traversant la barrière placentaire. Ceci

mène à la non induction d'une réponse adaptative chez les nourrissons infectés par transmission verticale. L'antigène HBs aurait un rôle similaire de tolérogène lorsqu'il est présent à haute dose dans le sérum des patients. Enfin, la taille de l'inoculum joue aussi un rôle dans le devenir de l'infection. Des études sur des chimpanzés infectés avec différentes doses de virus ont permis de démontrer que plus la taille de l'inoculum est petite, plus le risque de développer une hépatite chronique est accru (Chisari et al., 2010).

Chapitre III- L'ADN circulaire clos covalent : un « minichromosome viral » persistant

L'ADNccc demeure la principale cible thérapeutique dans une perspective d'élimination virale. En effet, il est responsable de la persistance du HBV dans les cellules ainsi que de la réactivation de l'hépatite B après l'arrêt des traitements. L'élimination de cet ADN des cellules infectées combinée à des traitements bloquant la réplication du virus et/ou empêchant la réinfection des cellules mènerait à la guérison des patients chroniquement infectés. Pour cela, la compréhension de la formation et de l'élimination de cet ADNccc est essentielle.

III.1-Quelques exemples de virus possédant un minichromosome viral

Plusieurs familles de virus possèdent un minichromosome viral, sous forme épisomale, organisé en structure nucléosomale comme par exemple la famille des *Polyomaviridae*, celle des *Papillomaviridae* et la famille des *Pararetrovirus* avec les *Hepadnaviridae* (dont fait partie le HBV) et celle des *Caulimoviridae* (comprenant le virus de la mosaïque du chou-fleur) (Bock et al., 2001).

Il existe plusieurs façons de répliquer ce minichromosome viral afin de le maintenir dans les cellules filles au cours des divisions cellulaires. Par exemple chez le SV40 (simian virus 40), le maintien du minichromosome est indépendant du génome de la cellule hôte grâce à une origine de réplication se trouvant sur le minichromosome (Hassell and Brinton, 1996).

La réplication de ce dernier peut aussi être couplée à la réplication cellulaire grâce à une protéine virale. C'est notamment le cas pour le HPV (human papilloma virus) (Doorbar, 2005; McBride, 2008).

En revanche pour le HBV et le virus de la mosaïque du chou-fleur, ce minichromosome (correspondant à l'ADNccc) est maintenu grâce au recyclage des capsides dans le noyau. Il existerait aussi pour le virus de la mosaïque du chou-fleur une régulation de cette amplification soit par la protéine de capsidite soit par une protéine virale qui forme une structure autour de la capsidite dans la cellule (Covey and Turner, 1991, 1993; Karsies et al., 2002).

III.2-Les modèles d'étude de l'ADNccc

III.2.1-Les modèles cellulaires

III.2.1.1-Les lignées d'hépatome

Différentes lignées d'hépatome sont utilisées pour étudier la réplication du HBV comme les cellules Huh7 ou HepG2 (Galle et al., 1988; Nakabayashi et al., 1982). Les cellules Huh7 et HepG2 ont été isolées de deux carcinomes hépatocellulaires.

Cependant, ces cellules ne sont pas permissives à une infection naturelle par HBV. Ainsi, afin de passer outre l'étape d'entrée, qui limite l'infection de ces cellules par le HBV, des techniques de transfection transitoire ou stable mais également de transduction par des baculovirus avec un génome codant pour le HBV ont été mises en place. Une de ces techniques développées au laboratoire consiste à transfecter ces cellules avec un plasmide pTriEx codant pour 1,1 fois l'unité du génome permettant ainsi la synthèse de l'ARNpg et l'induction d'un cycle de réplication complet. Cette stratégie a permis d'évaluer l'effet de différentes drogues sur le cycle viral du HBV (Durantel et al., 2004).

L'isolement d'une lignée d'hépatome non transformée, la lignée HepaRG, a permis de s'affranchir de ce problème (Gripon et al., 2002). Après deux semaines de culture à confluence puis deux semaines de différenciation grâce à du DMSO, ces cellules se polarisent et deviennent des cellules biliaires ainsi que des hépatocytes infectables par le HBV. Ces cellules sont capables de produire un cycle de réplication complet (Hantz et al., 2009). La disponibilité et l'infectabilité de cette lignée en fait un modèle de choix pour l'étude de l'ADNccc.

Suite à la découverte du récepteur pour HBV, une nouvelle lignée HepG2 transduite avec un lentivirus exprimant le récepteur hNTCP et infectable par HBV vient d'être créée. Lorsque ces cellules sont cultivées avec 2,5 % de DMSO, environ 70 % d'entre elles sont infectées par le HBV (Ni et al., 2013).

III.2.1.2-Les hépatocytes primaires humains

Le modèle le plus pertinent reste les hépatocytes primaires humains (PHH) (Guguen-Guillouzo et al., 1988). Ces cellules, directement isolées d'un morceau de foie, sont en théorie 100 % infectables par le HBV (Schulze et al., 2012). Cependant, la disponibilité de ce matériel est un facteur limitant et ces cellules ne sont infectables que pendant un très court laps de temps (entre 3 et 5 jours après ensemencement). Enfin, le maintien de ces cellules non immortalisées en culture est de quelques semaines au plus.

III.2.1.3- Les cellules souches différenciées de cordon ombilical

Une nouvelle approche d'étude du HBV est en cours de développement. Il a été récemment montré que des cellules souches de cordon ombilical pouvaient être différenciées en hépatocytes. Ces cellules sont infectables par le HBV bien que le taux de répllication est moins élevé que dans les PHH. La disponibilité de ces cellules non transformées en font un avantage non négligeable (Paganelli et al., 2013).

III.2.2-Les modèles animaux

Pour étudier l'ADNccc, différents modèles animaux sont utilisés : le canard de Pékin qui est infecté par le virus de l'hépatite B du canard (DHBV), la marmotte qui est infectée par le virus de l'hépatite B de la marmotte (WHV), le chimpanzé qui est le seul modèle animal infectable par le HBV. Les études menées avec ces modèles seront décrites dans la partie suivante.

III.2.2.1- Le canard de Pékin et le DHBV

Le canard de Pékin est l'hôte du DHBV, un *Avihepadnaviridae*. Ce modèle est utilisé pour étudier la répllication des *Hepadnaviridae*. L'avantage du canard est son accessibilité en laboratoire. Cependant, il ne permet pas d'étudier la maladie car l'infection n'engendre pas d'hépatite chronique ni de HCC peut-être à cause de l'absence de protéine HBx (Lucifora et al., 2011; Seeger and Mason, 2000).

Néanmoins, des différences flagrantes existent entre le HBV et le DHBV. En effet, si la carboxypeptidase D semble être un des récepteurs du DHBV, ce n'est pas le cas pour le HBV (Breiner et al., 1998; Yan et al., 2012).

De plus, la formation de l'ADNccc varie entre les deux espèces. La conversion de l'ADN relâché circulaire déprotéiné (ADNrcDP) en ADNccc est rapide alors que c'est l'étape limitante concernant le cycle du HBV. Les proportions des différentes formes d'ADN sont aussi variables entre le DHBV et le HBV. La moitié de l'ADN nucléaire du DHBV est encapsidé alors que l'autre moitié correspond à de l'ADNccc. En revanche, le HBV produit moins de 5 % d'ADNccc. Ce phénomène est dépendant du virus et non de la cellule infectée (Köck et al., 2010).

III.2.2.2-La marmotte et le WHV

Génotypiquement proche du HBV, le WHV appartient au même genre que ce dernier. Contrairement au DHBV, il permet l'étude de l'immunopathogénèse et l'hépatocarcinogénèse viro-induite (Seeger and Mason, 2000). Ce modèle sert donc à l'évaluation préclinique des antiviraux (Menne et al., 2005). La fréquente intégration du génome WHV dans l'ADN de la cellule hôte a permis le développement d'étude sur le turnover des hépatocytes. En effet, chaque intégration étant unique, celle-ci devient un marqueur permettant de suivre le devenir de chaque cellule (Summers et al., 2003).

III.2.2.3-Le chimpanzé et le HBV

Le chimpanzé est le seul hôte immunocompétent capable d'être infecté par le HBV. C'est un modèle pour l'étude des infections aiguës car le développement de maladies chroniques y est rare (Dandri et al., 2013). La présence d'une réponse immunitaire anti-HBV dans ce modèle a permis d'avancer sur la compréhension des mécanismes de la clairance du HBV et de l'ADNccc (Thimme et al., 2003; Wieland et al., 2004b).

L'utilisation de ce modèle étant grandement encadrée et très coûteuse, il est peu employé.

III.2.2.4-Souris humanisées-exemple des souris uPA/SCID

Les souris humanisées sont de bons modèles *in vivo* pour étudier le cycle de réplication du HBV. Dans le cas des souris uPA/SCID, ces souris contiennent un transgène uPA (urokinase-type plasminogen activator) sous le contrôle d'un promoteur albumine qui détruit spécifiquement les hépatocytes. Des hépatocytes humains sont ensuite utilisés pour repeupler le foie. La xéno greffe n'est pas rejetée grâce à l'absence de réponse immunitaire adaptative (Dandri et al., 2001).

Ces souris peuvent ensuite être infectées par le HBV avec une très grande efficacité (entre 10 et 70 %) (Dandri and Petersen, 2012). Elles développent une maladie chronique semblable à celle des humains. L'avantage de ce modèle est aussi de pouvoir étudier le comportement des intermédiaires de réplication comme l'ADNccc lors de l'établissement de l'infection et lors de la repopulation du foie (Lutgehetmann et al., 2010).

Ces souris sont très fragiles car elles n'ont pas de système immunitaire. Elles ne peuvent donc pas être utilisées dans des études du système immunitaire adaptatif.

III.2.2.5-Un modèle de foie humain reconstitué ex-vivo

La solution pourrait venir d'une nouvelle avancée. En effet, une équipe a créé, à partir de cellules souches adultes, un foie humain "fonctionnel". Des cellules souches humaines adultes ont été reprogrammées pour retourner à un état embryonnaire et ont ensuite été redifférenciées en hépatocytes. L'organe formé a ensuite été implanté dans une souris, s'est vascularisé et a développé des fonctions hépatiques (Takebe et al., 2013).

III.3-La formation de l'ADNccc à partir des capsides intracellulaires

L'ADNccc est formé à partir de l'ADNrc soit depuis des virions infectant les cellules soit par recyclage des nucléocapsides. Nous présenterons l'exemple du recyclage des capsides.

III.3.1-La réplication asymétrique de l'ADNccc

L'ADNccc est le premier intermédiaire de réplication à apparaître avant même la production de particule virale. En effet, un pool d'ADNccc apparaît entre 8 et 12 jours après une infection par le DHBV (Tuttleman et al., 1986). De manière intéressante, suite à une infection par le DHBV puis l'ajout de suramine, une drogue qui empêche la réinfection des cellules, de l'ADNccc est tout de même produit (Wu et al., 1990). Tous ces indices laissent penser que l'ADNccc est amplifié via une voie intracellulaire plutôt que par une réinfection des cellules.

Deux possibilités existent pour la réplication de l'ADNccc. Soit il est répliqué de façon semi-conservative, soit de manière asymétrique via la rétrotranscription de l'ARNpg. Ces deux méthodes de réplication se distinguent par l'incorporation de bromodeoxyuridine (BUdR), un analogue de la thymine, dans les molécules formées. Dans le cas de la réplication semi-conservative, les brins négatif et positif de l'ADN vont incorporés du BUdR alors que seulement le brin positif incorporera cette molécule si l'ADNccc est formé par la rétrotranscription de l'ARNpg. C'est cette dernière méthode de réplication qui semble, d'après les résultats, être utilisée par le HBV. Cette amplification asymétrique permet ainsi le maintien d'un pool d'ADNccc sans avoir recours à la réplication semi-conservative (Summers et al., 1990; Tuttleman et al., 1986).

Il faut aussi noter que l'ADNccc peut provenir de la conversion de l'ADN double brin linéaire via la recombinaison non homologue (NHEJ). Néanmoins, cet ADNccc est déficient et contient des délétions au niveau du trou dues à la réparation.

III.3.2-Transport de la capsid dans le noyau

Pour former le pool d'ADNccc, la nucléocapside, contenant de l'ADNrc, doit être transportée dans le noyau.

Lors de l'encapsulation, les extrémités C terminales des protéines HBc formant la capsid sont liées à l'ARNpg par leurs domaines riches en arginine. Une protéine kinase C (PKC) est aussi présente dans la capsid (Kann and Gerlich, 1994).

La synthèse du brin négatif d'ADN par transcription inverse conduit à la libération de ces extrémités. Elles deviennent donc accessibles à la phosphorylation par la PKC (Kann and Gerlich, 1994). Il existe donc une compétition entre la phosphorylation et la fixation core-ARNpg qui s'effectuent sur le même site.

Les Cter se retrouvent ainsi exposées à la surface de la capsid. En effet, à cette étape, un anticorps dirigé contre cette extrémité peut s'y fixer (Bruss, 2004). A l'extrémité C terminale d'HBc se trouvent des NLS. Une karyophérine, l'importine α , s'y fixe et transporte la capsid dans le noyau (Rabe et al., 2003).

III.3.3-Désintégration de la capsid

Une question se pose concernant le retrait de la capsid pour libérer le génome d'HBV : est-ce que la capsid est retirée dans le cytoplasme, dans le noyau ou au pore nucléaire ?

Visiblement les capsides seraient transportées intactes au pore nucléaire (Köck et al., 2010; Rabe et al., 2003). Les capsides immatures ne contenant pas un ADN partiellement double brin sont bloquées au pore nucléaire pour être maturées car il n'y a probablement pas assez d'extrémités C terminales d'Hbc phosphorylées, exposées et détectées à l'extérieur de la capsid (Rabe et al., 2003).

La conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin entraînerait ensuite la déstabilisation de la capsid dans le pore nucléaire (Dhason et al., 2012; Rabe et al., 2003). Puis, l'ADN est libéré de façon active dans le noyau grâce à de l'ATP (Kann et al., 1997). Par contre, des protéines Hbc sous forme de mono- ou dimères sont encore fixées à l'ADN HBV dans le noyau (Köck et al., 2010).

III.3.4-Le retrait de la polymérase et des séquences redondantes

La transformation de l'ADNrc en ADNccc implique la complétion du brin positif, le retrait de la polymérase, des séquences redondantes et de l'amorce ARN ainsi que la ligation des deux brins d'ADN. Il est admis que le retrait de l'amorce ARN ainsi que la ligation des deux brins sont probablement médiés par des facteurs cellulaires.

Suite au retrait de la polymérase virale, un intermédiaire de réplication est formé : l'ADNrcDP pour ADNrc déprotéiné c'est-à-dire sans polymérase attachée au brin négatif de l'ADNrc.

III.3.4.1-Signaux déclenchant le retrait de la polymérase

Le déclenchement du retrait de la polymérase est inconnu. Il semblerait que les brins d'ADN ne soient pas ligués avant le retrait de cette protéine (Guo et al., 2007, 2010a). De plus, plusieurs équipes ont montré qu'il est nécessaire mais pas suffisant d'avoir un brin positif complet. En effet, si une EPR (une réaction *in vitro* avec la polymérase endogène) est réalisée sur des virions extraits (contenant de l'ADNrc), seulement 1 % d'ADNrcDP est obtenu. Il existe donc un autre facteur fondamental pour le retrait de la polymérase autre que la complétion du brin positif (Guo et al., 2010a). Ce facteur n'est peut-être pas présent dans la capsid mais son entrée pourrait se faire lors de sa déstabilisation (Guo et al., 2010a; Köck et al., 2010)

III.3.4.2-Lieu du retrait de la polymérase

La question du lieu de retrait de la polymérase fait grandement débat. Pour certains, le retrait de la polymérase a lieu dans le cytoplasme dans une capsid intacte car de l'ADNrcDP est détecté dans le cytoplasme (Gao and Hu, 2007; Guo et al., 2007).

Or d'après Köck et al., peu d'ADNrcDP est détecté dans le cytoplasme et 10 % de l'ADN nucléaire (ou au pore nucléaire) est de l'ADNrc encore lié à la polymérase dans des capsides intactes (Köck et al., 2010).

La façon de séparer le noyau et le cytoplasme est différente dans les études et pourrait entraîner une contamination entre le noyau et le cytoplasme dans les deux premiers articles de 2007. En effet, la séparation des deux compartiments par traitement avec le détergent NP40 puis centrifugation mène à une détection d'ADNccc nucléaire dans le cytoplasme tandis qu'une séparation par ultracentrifugation sur gradient de sucrose est plus fiable (Köck et al., 2010).

Il semblerait donc que le retrait de la polymérase s'effectue dans le noyau ou au moins au pore nucléaire.

III.3.4.3-Possibilités pour le retrait de la polymérase et des séquences redondantes

Différentes possibilités existent pour retirer la polymérase ainsi qu'une des deux séquences redondantes :

- un clivage endonucléique de l'extrémité 5' du brin négatif sur laquelle est fixée la polymérase
- une hydrolyse du pont phosphodiester entre la tyrosine de la polymérase (domaine protéine terminale) et l'extrémité 5' du brin négatif
- un clivage protéolytique de la polymérase.

Les deux dernières hypothèses mènent à une extrémité 5' authentique c'est-à-dire que la séquence redondante conservée est celle en 5' et que seule la polymérase est retirée de cette extrémité (Guo et al., 2010a).

Les expériences pour déterminer le moyen de retrait de la polymérase ont été effectuées avec le DHBV. Grâce à des expériences d'EPR, il a été montré que le retrait de la polymérase créait une extrémité 5' authentique éliminant ainsi l'implication d'une endonucléase (première hypothèse) (Guo et al., 2007).

De manière intéressante, la formation de l'ADNrcDP est inhibée lorsque la polymérase virale est bloquée ou lors de la présence d'un inhibiteur de sérine protéases montrant l'implication de la polymérase et d'une sérine protéase dans le retrait de la polymérase virale (Guo et al., 2010a). La troisième hypothèse impliquant le retrait de la polymérase par clivage protéolytique semblerait être la bonne. Néanmoins, ce clivage protéolytique n'enlève que la polymérase, et donc une des deux séquences redondantes devra aussi être retirée pour que l'ADNccc soit clos.

Une autre équipe a montré qu'une endonucléase cellulaire clivait la séquence redondante en 5' du brin négatif et le brin était ensuite complété par une polymérase cellulaire. Cette observation n'est pas incompatible avec le retrait de la polymérase par une sérine protéase. En effet, l'expérience montrant l'implication de la protéase a été effectuée *in vitro* hors de la cellule alors que le rôle de l'endonucléase n'a été découvert qu'*in cellulo*. On pourrait donc émettre l'hypothèse que la polymérase est préalablement retirée par une sérine protéase puis qu'une endonucléase interviendrait pour cliver la séquence redondante en 5' du brin négatif permettant ainsi la ligature des deux brins d'ADN (Sohn et al., 2009).

III.4-La régulation du recyclage de l'ADNccc

Le faible nombre de copies d'ADNccc présentes dans le noyau des hépatocytes, en moyenne une copie pour le HBV et jusqu'à 50 copies pour le DHBV, suggère que l'amplification de l'ADNccc est régulée par des mécanismes spécifiques. En effet, il est nécessaire pour le virus de contrôler le nombre de molécules d'ADNccc produites pour qu'il soit suffisant pour produire des virions mais que ce nombre ne soit pas excessif pour ne pas être toxique pour la cellule (Tuttleman et al., 1986).

Le gène non requis pour la synthèse d'ADN et donc pouvant réguler la formation d'ADNccc est celui codant pour les protéines d'enveloppe. Des virus DHBV répliquants mais déletés pour les protéines de l'enveloppe ont été étudiés. Après infection d'hépatocytes primaires de canard avec des particules infectieuses contenant l'ADN muté et une enveloppe apportée *in trans*, ces cellules accumulent un plus grand nombre de molécules d'ADNccc et sur une durée plus longue que celles infectées avec le virus sauvage. De plus, le taux d'intermédiaires de réplication est à peu près similaire entre les virus. Les protéines d'enveloppe régulent donc négativement la formation du pool d'ADNccc chez le DHBV (Summers et al., 1990).

III.4.1-Protéines impliquées pour le DHBV et le HBV

Seules deux protéines d'enveloppe existent chez le DHBV : preS/S (équivalent de la protéine L chez HBV) et S.

Après la création de différents mutants pour les deux domaines des protéines d'enveloppe du DHBV, la partie preS semble être celle impliquée dans la régulation de l'ADNccc. Cependant, la myristylation de ce domaine ne semble pas impliquée (Summers et al., 1991). Dans ce domaine preS, la région des acides aminés 127 à 136 apparaît contrôler l'amplification de l'ADNccc ainsi que la production de virions. Par contre, l'infectiosité des virions est contrôlée par une région différente (Lenhoff and Summers, 1994a).

De manière intéressante, parmi ces mutants créés *in vitro*, le mutant DHBV G133E accumule beaucoup d'ADNccc avec un taux d'intermédiaires de réplication et une sécrétion de virions supérieurs au virus sauvage après infection (Lenhoff and Summers, 1994b).

Cependant, après une infection d'hépatocytes primaires, on observe une diminution de la réplication du virus mutant G133E au bout de 3 semaines (Lenhoff and Summers, 1994b). Il semblerait donc que les virus défectifs pour les protéines d'enveloppe ne puissent pas établir d'infection persistante *in vitro* contrairement à une infection par un virus sauvage (Summers et al., 1990). En effet, cette dernière engendre un maintien des intermédiaires de réplication, qui n'est pas dû à une réinfection des cellules, même 20 jours post infection (Summers et al., 1990).

Il semblerait donc que les souches cytopathiques ne soient pas sélectionnées au cours de l'infection et soient remplacées par la souche sauvage *in vitro* et *in vivo* (Lenhoff et al., 1998, 1999).

La grande protéine d'enveloppe L semble aussi réguler l'accumulation de l'ADNccc du HBV (Köck et al., 2010). Par contre l'implication des protéines d'enveloppe M et S dans cette régulation n'est pas claire. En effet, la non expression des trois protéines d'enveloppe mène à une augmentation de six fois du taux d'ADNccc par rapport au virus sauvage et le niveau d'ADNccc est corrélé au niveau d'expression de ces protéines. De plus la surexpression des trois protéines d'enveloppe bloque la complétion du brin positif suggérant que la synthèse du brin positif est arrêtée lors de l'enveloppement (Lentz and Loeb, 2011).

III.4.2-Hypothèse de régulation

Il a été montré que la protéine L altérait la localisation de la protéine core. En effet, lorsqu'HBc est exprimée seule, elle se localise dans le noyau. Mais lorsque la protéine L est exprimée avec HBc, HBc devient indétectable dans le noyau. Donc la protéine L inhibe le transport nucléaire d'HBc (Yeh et al., 1994).

De manière intéressante, lorsque les protéines de l'enveloppe du HBV sont mutées, aucune hyperaccumulation de l'ADNccc n'est observée dans les noyaux mais on observe une hyperaccumulation de l'ADNrcDP. Cela suggère donc que les protéines de l'enveloppe régulent une étape avant la déprotéination de l'ADNrc, probablement le trafic intracellulaire des nucléocapsides matures. De plus, puisqu'aucune hyperaccumulation d'ADNccc n'est observée, le pool d'ADNrcDP formé n'est ensuite pas entièrement converti en ADNccc dans les cellules infectées par un HBV déficient pour les protéines de l'enveloppe probablement à cause d'une saturation des systèmes de réparation de l'ADN *in vitro* (Gao and Hu, 2007).

L'hypothèse de régulation serait donc que l'interaction de la nucléocapside avec une ou plusieurs protéines d'enveloppe conduirait à la formation de virions. Ceci serait dépendant de la quantité de protéines d'enveloppe présentes. Si aucune interaction n'a lieu, la capsid serait redirigée vers le noyau (Summers et al., 1990).

III.5-La régulation épigénétique

III.5.1-Structure du minichromosome

L'ADNccc est organisé en structure nucléosomale avec des histones H3 et H2B en majorité et quelques histones H4, H2A et H1 (Bock et al., 1994, 2001).

Dans l'ADN cellulaire, le nucléosome est composé de 146 pb d'ADN entouré autour d'un octamère d'histones formé de deux molécules de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4. Les nucléosomes sont séparés par 50 pb associées à H1 et H5 (Newbold et al., 1995).

Lors de la digestion de l'ADNccc du DHBV par la nucléase micrococcale, qui permet de couper l'ADN liant deux nucléosomes, une échelle d'ADN de 150 pb se forme au lieu de 200 pb pour une chromatine « classique ». L'espacement entre deux nucléosomes est donc plus court chez le virus que dans la cellule (5 pb contre 50 pb) (Newbold et al., 1995).

Dans des cellules exprimant constitutivement HBV, le nombre moyen de nucléosomes est de 18 entraînant un espacement des nucléosomes de 180 pb (Bock et al., 1994).

Le nombre de nucléosomes présents sur le minichromosome varie au cours du temps selon l'état transcriptionnellement actif ou non de l'ADNccc.

Grâce à une électrophorèse en deux dimensions, une équipe a montré que 80 % de l'ADNccc était regroupé en deux populations ; une première population avec la majorité de l'ADN compacté en 18 à 20 nucléosomes et la deuxième avec deux fois moins de nucléosomes (Newbold et al., 1995). Cette dernière est considérée comme active.

La position des nucléosomes sur l'ADNccc n'est pas aléatoire. En effet, la région contenant les éléments régulateurs de la transcription du DHBV (nucléotides 2000-2700) est toujours protégée par des nucléosomes d'un canard infecté à un autre. Néanmoins, les autres sites protégés par les nucléosomes sont plus ou moins variables entre canards mais transmis d'un canard à sa descendance.

III.5.2-Modification des histones : méthylation et acétylation

La variation du nombre de nucléosomes suggère une régulation transcriptionnelle de l'ADNccc par le biais de modifications épigénétiques. En effet, les queues amino-terminales des histones peuvent être modifiées par acétylation ou méthylation.

Il a été montré dans un modèle de transfection avec un HBV linéaire que lorsque les histones H3 et H4 sont acétylées cela entraîne une régulation positive de la réplication du virus. De plus lorsque l'acétylation est maintenue artificiellement par des inhibiteurs d'histones déacétylases, le taux d'intermédiaires de réplication est augmenté ainsi que la quantité de virions sécrétés (Pollicino et al., 2006).

La déacétylation des histones est corrélée *in vivo* avec la présence de HDAC (histones déacétylases) sur l'ADNccc et mène à une répression de la transcription induisant une diminution de la réplication du virus et une faible charge virale (Pollicino et al., 2006).

La réduction du taux d'acétylation des histones est un signal pour le recrutement de marqueurs répresseurs de la réplication comme les ADN et histones méthylases.

III.5.3-Les protéines virales associées à l'ADNccc

Certaines protéines virales ont un rôle épigénétique et sont retrouvées sur l'ADNccc.

En effet, l'ADNccc est immunoprécipité par un anticorps anti-HBc montrant la présence de core sur cet ADN. Cette protéine core influe sur la structure nucléosomale de l'ADNccc. Elle entraîne la compaction de l'ADNccc de 10 % en plus, diminuant l'espace entre les nucléosomes de 200 à 180 pb (Bock et al., 2001).

Il semblerait qu'HBc se fixe préférentiellement sur l'îlot CpG2 en amont du promoteur core qui contrôle la régulation transcriptionnelle de l'ADNccc. Sa fixation est associée à des marques positives de régulation de la transcription comme l'hypométhylation de l'ADN ou encore la faible quantité de HDAC. Elle permet aussi le recrutement du facteur CREB binding protein, une acétyltransférase (Guo et al., 2011).

La protéine X est aussi recrutée sur l'ADNccc lorsque ce dernier est transcriptionnellement actif. Un mutant HBV délété pour HBx a une réplication plus faible suggérant l'implication d'HBx dans la régulation épigénétique de l'ADNccc. Dans ce cas, les histones sont hypoacétylés car le recrutement de l'acétyltransférase p300 est diminué et le recrutement des déacétylases hSirtI et HDACI augmenté (Belloni et al., 2009)). Une interaction directe entre HBx et p300 a été démontrée (Cougot et al., 2007).

III.5.4-Méthylation de l'ADNccc

En plus de la modification des histones, la molécule d'ADNccc peut être directement modifiée.

Lors de l'infection de cellules avec le HBV, un mécanisme de défense de l'hôte se met en place : la méthylation de l'ADN. Cette méthylation induite par le recrutement d'ADN méthyltransférases comme DNMT3 est une marque répressive de la réplication du HBV. Lorsque de l'ADN HBV méthylé est transféré dans des cellules HepG2, la transcription d'HBV est diminuée. De plus, l'ADNccc est retrouvé méthylé dans les tissus de patients infectés (Vivekanandan et al., 2010).

Trois sites CpG potentiellement modifiables par méthylation existent sur l'ADN du HBV : position 55-286 (près de l'ATG du gène S), 1224-1667 (sur les enhancers 1 et 2) et 2257-2443 (sur le codon start de pol) (Vivekanandan et al., 2009).

De manière intéressante, la méthylation du HBV n'est pas spécifique. En effet, lorsque HBV est présent dans les cellules de façon transitoire ou chronique, l'ADN du HBV est méthylé ainsi que celui de la cellule hôte entraînant une régulation négative de l'expression des gènes cellulaires. Cette méthylation des gènes cellulaires peut toucher des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur, entraînant ainsi le risque de développer un HCC, ou des gènes de l'immunité innée comme IL4 (Vivekanandan and Torbenson, 2008).

III.6-La clairance naturelle de l'ADNccc par le système immunitaire de l'hôte

Deux mécanismes peuvent permettre l'élimination de l'ADNccc : un mécanisme cytolytique faisant intervenir une destruction des hépatocytes ou un mécanisme non cytolytique induisant l'élimination de l'ADNccc grâce à des cytokines (Levrero et al., 2009; Zoulim, 2005). Ces deux systèmes ne sont pas exclusifs.

Trois modèles sont proposés dans la littérature pour la clairance de l'ADNccc (Mason et al., 2009) :

- les cytokines produites pendant la réponse immunitaire à l'infection inhibent la réplication du virus, empêchent la synthèse de l'ADNccc et éliminent les intermédiaires de réplication ainsi que l'ADNccc. Dans cette hypothèse, les hépatocytes infectés sont éliminés par mort cellulaire, permettant le relargage de cytokines, mais la mort et la prolifération hépatocytaires en résultant n'ont pas de rôle essentiel dans la production d'hépatocytes non infectés.
- les cytokines agissent sur les intermédiaires de réplication et la synthèse d'ADNccc mais n'éliminent pas l'ADNccc préexistant. Les hépatocytes infectés sont éliminés provoquant la prolifération des cellules infectées et non infectées restantes. L'ADNccc est dilué pendant la mitose et est donc distribué de façon aléatoire dans les hépatocytes induisant sa perte. Dans ce modèle, la clairance virale peut être complète avec un turnover équivalent au remplacement de 0,7 foie ; c'est-à-dire lorsque 70 % des hépatocytes du foie auront été remplacés une fois.
- le troisième modèle est identique au modèle 2 à une différence près : l'ADNccc est distribué de façon équivalente dans les cellules pendant la mitose. La répétition de mitose peut conduire à l'apparition de cellules non infectées. En commençant avec une moyenne de 30 copies d'ADNccc par cellule, ce modèle nécessite le renouvellement de l'équivalent de 2,6 foies pour l'élimination complète de HBV.

Deux questions se posent donc : 1) Est-ce que la lyse hépatocytaire intervient dans le processus de clairance de l'ADNccc, 2) Est-ce que l'ADNccc est distribué de façon symétrique ou pas lors de la mitose ?

III.6.1-Intervention de la lyse hépatocytaire

Peu de doutes existent quant à l'intervention d'une réponse non cytolytique médiée par les cytokines dans l'élimination du HBV. En effet, la réponse cytolytique ne pourrait mathématiquement pas suffire pour éliminer une infection par HBV car elle nécessite un contact entre la cellule infectée et le lymphocyte. Or, la quantité de cellules infectées est trop importante par rapport au nombre de lymphocytes CD8+ présents (Chisari et al., 2010). De plus, la clairance du virus chez un patient est associée à un rétablissement clinique suggérant que la lyse hépatocytaire n'est pas intense (Guidotti et al., 1996). Il est donc clair que l'élimination du HBV et donc de l'ADNccc nécessite l'intervention de cytokines.

Chez la souris transgénique (Guidotti et al., 1996), c'est-à-dire contenant un génome HBV intégré dans l'ADN des hépatocytes de souris, les intermédiaires de réplication du HBV sont uniquement éliminés de façon non cytolytique. En effet, si on injecte des lymphocytes CD8+ (LTc) ne pouvant pas former de perforine et donc ne provoquant pas de mort cellulaire, aucune élévation des ALT (enzyme hépatocellulaire relâchée dans la circulation par les hépatocytes nécrotiques) n'est observée. Par contre, les intermédiaires de réplication sont éliminés par les cytokines IFN- γ et TNF- α sécrétés par les LTc.

Néanmoins ce modèle possède quelques limites. En effet, les cellules de souris ne sont pas infectées par le virus et aucun ADNccc n'est produit. On ne sait donc pas si cette élimination des intermédiaires de réplication de façon non cytolytique est aussi suffisante pour éliminer l'ADNccc.

Lors de la résolution d'une infection WHV, un marquage PCNA (proliferating cell nuclear antigen) montre l'existence d'une prolifération hépatocytaire lors de la clairance (Summers et al., 2003). Pour mesurer la quantité de cellules renouvelées, l'ADN viral intégré est utilisé comme un marqueur de chaque population d'hépatocytes. Comme les intégrations se font aléatoirement, les séquences obtenues sont uniques. Si deux séquences intégrées sont identiques, on peut donc en conclure que les cellules proviennent de la division de la même cellule.

La fréquence d'intégration ne semblant pas diminuer au cours de la résolution de l'infection et de l'élimination de l'ADNccc, les cellules permettant donc la régénération du foie sont infectées. D'après un calcul complexe à partir des données expérimentales obtenues, l'élimination de l'infection nécessiterait un turnover équivalent au remplacement de 0,7 à 1 foie. Le modèle 2 serait donc le plus proche de la réalité avec l'intervention d'une lyse hépatocytaire et une prolifération de cellules infectées coïncidant avec la diminution de l'ADNccc. Ceci n'exclut pas l'intervention de cytokines.

Chez le chimpanzé, modèle pertinent d'infection par HBV, la clairance virale est médiée de façon cytolytique et non cytolytique (Thimme et al., 2003). Si on traite un chimpanzé infecté par HBV avec des anticorps bloquant les lymphocytes CD8+, lors du retour à la normale du taux de CD8+, on observe un plateau des CD8 qui coïncide avec une

stabilisation du taux d'ADN HBV. Pendant cette stabilisation, une lyse cellulaire est observée pour l'élimination du HBV.

La clairance de l'ADNccc se ferait donc en deux temps. Dans un premier temps l'ADNccc serait éliminé de façon non cytotytique entraînant une baisse de 8,6 fois son taux. Ensuite une lyse hépatocytaire est observée, entraînant l'élimination des cellules infectées positives pour l'antigène Hbc ainsi que la diminution de 11 fois du taux d'ADNccc. Néanmoins, même après la clairance virale, des traces d'ADNccc sont toujours présentes dans les cellules (Wieland et al., 2004b).

III.6.2-Distribution de l'ADNccc lors de la mitose

Le devenir de l'ADNccc lors de la mitose induite par la lyse hépatocytaire vient d'être élucidé. Récemment, une équipe a montré grâce à des canetons infectés par DHBV et traités par entécavir que l'ADNccc n'était pas perdu lors de la mitose des cellules. Toutes les molécules d'ADNccc sont distribuées dans les cellules filles et aucune n'est perdue lors de la réformation de la membrane nucléaire (Reaiche-Miller et al., 2013).

D'après un modèle informatique développé dans le papier de Mason, le modèle n°3 où l'ADNccc serait distribué de façon équivalente dans les cellules filles lors de la mitose nécessiterait un renouvellement de 2,6 fois pour éliminer complètement l'ADNccc ce qui est trop élevé par rapport aux données expérimentales obtenues, et ce, même avec une faible efficacité expérimentale. Il semblerait donc que l'ADNccc soit éliminé en partie par une distribution inégale dans les cellules filles lors de la prolifération des hépatocytes (Mason et al., 2009).

De plus, certaines cellules infectées contiennent moins d'une copie d'ADNccc par cellule entraînant une perte probable de l'ADNccc par mitose (Zhang et al., 2003).

En conclusion, l'ADNccc peut être éliminé des cellules par des moyens cytotytiques et non cytotytiques. Néanmoins, la cinétique de clairance de l'ADNccc est lente car il est présent dans la cellule sous forme d'un minichromosome épigénétiquement modifié, que la nature asymétrique du cycle viral protège l'ADNccc des inhibiteurs de polymérase et que la formation d'ADNccc est possible à partir des virions circulants et des capsides intracellulaires (Zoulim, 2005).

III.7-La clairance thérapeutique

Comme nous avons pu le voir, l'ADNccc est très stable même lors de la clairance du HBV par le système immunitaire. Sa demi-vie varie de 3 à 30 jours selon le type de cellules utilisées pour sa mesure (Zoulim, 2005).

On pourrait penser que l'utilisation d'antiviraux permettrait l'élimination complète de cet intermédiaire de réplication. Malheureusement tout n'est pas si simple. En effet, les antiviraux n'empêchent pas la formation initiale d'ADNccc à partir de virions circulants

même lorsque le traitement est débuté avant l'infection (Delmas et al., 2002; Köck et al., 2003). Néanmoins, l'amplification de l'ADNccc par le recyclage des capsides dans le noyau est inhibée mais l'ADNccc préexistant n'est pas éliminé (Delmas et al., 2002). Avec un traitement adéfovir, il faudrait, d'après un modèle informatique, environ 14,5 ans pour éliminer complètement l'ADNccc d'une infection chronique (Tsiang and Gibbs, 2004).

La déplétion de l'ADNccc grâce aux analogues de nucléosides est due à un manque de capsides pouvant être recyclées dans le noyau. Ceci suggère donc un traitement de longue durée pouvant mener au développement de résistances (Zoulim, 2006).

En ce qui concerne les nouveaux traitements comme les TALENs, trop de paramètres comme la délivrance du vecteur ou l'efficacité de reconnaissance des cibles sont encore inconnus pour évaluer la durée nécessaire du traitement pour éliminer l'infection HBV (Schiffer et al., 2013).

Cependant, la découverte du récepteur du HBV pourra permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques alliant un inhibiteur de l'entrée virale avec un analogue de nucléoside. De plus, la découverte récente de l'induction de la dégradation de l'ADNccc via la protéine Apobec 3A et 3B après l'activation du récepteur de la lymphotoxine- β est prometteuse (Lucifora et al., 2014).

Malgré la disparition des marqueurs viraux, il reste toujours des traces d'ADNccc, entre 0,01 et 0,1 copie par cellule, chez les chimpanzés deux ans après l'infection (Wieland et al., 2004b). Ce faible taux d'ADNccc est visible malgré le maintien d'une réponse immunitaire anti-HBV (Rehermann et al., 1996). L'ADNccc est donc responsable de la persistance du HBV dans les cellules infectées.

La réactivation de ces molécules est liée à leurs contrôles par le système immunitaire. En effet, lorsque le système immunitaire est diminué comme lors d'une greffe de moelle osseuse par exemple, le virus peut se réactiver à partir du stock d'ADNccc présent dans les cellules (Lau et al., 1997). Il semble donc important de comprendre la formation, la régulation et l'élimination de cet ADNccc afin de développer des traitements adaptés contre cette molécule. Combinés à des analogues de nucléos(t)ides ou à un inhibiteur de l'entrée virale, la stabilisation de l'infection chez des patients chroniques semble possible.

Objectifs des travaux de recherche

Malgré l'existence d'un vaccin efficace contre le virus de l'hépatite B, ce dernier demeure un problème majeur de santé publique avec plus de 240 millions de personnes chroniquement infectées dans le monde.

La chronicité de cette maladie et le risque de développer des cirrhoses et HCC sont dus à plusieurs paramètres.

Premièrement, l'ADNccc, du fait de son maintien au sein de l'hépatocyte, est responsable de la persistance du virus au cours du temps. En effet, des traces de cet ADN, à partir duquel le cycle viral peut s'initier, sont encore retrouvées deux ans après une infection chez le chimpanzé (Wieland et al., 2004b). La persistance de cette molécule est due à sa non élimination par les analogues de nucléos(t)ides. En effet, les antiviraux ne ciblent ni sa formation initiale à partir de virions circulants, ni la molécule préexistante au sein des cellules infectées (Delmas et al., 2002).

La variation de la réponse immunitaire chez les patients ainsi que la sélection de variants peuvent aussi provoquer des rebonds de charge virale contribuant à la chronicité de la maladie et au risque de développer une cirrhose (Chan et al., 2011; Dény and Zoulim, 2010).

Enfin, l'intégration du génome d'HBV dans le génome de la cellule hôte, un facteur aggravant de l'hépatite B chronique, possède un caractère oncogénique.

Les objectifs de ces trois études sont donc de :

- comprendre l'accumulation de l'ADNccc ainsi que sa régulation afin de trouver de nouvelles cibles antivirales pour son élimination.

- améliorer le suivi des patients en utilisant des marqueurs sériques adaptés et corrélés aux différentes phases de la maladie. Ainsi les traitements pourraient être adaptés à chaque étape de la maladie et une réactivation antivirale pourrait être détectée.

- améliorer les traitements antiviraux (analogues de nucléos(t)ides) en modifiant leurs structures chimiques pour augmenter leurs efficacités antivirales et pour éviter le développement de résistances virales. Cela permettra de diminuer la charge virale et donc par conséquent le risque de dommages hépatiques et d'intégration de l'ADN viral.

Etude 1

Implication of core gene in HBV covalently closed circular DNA accumulation

Maëlen Fournier, Judith Fresquet, Barbara Testoni, Christophe Combet,
Fanny Lebossé, Patrick Mialhes and Fabien Zoulim

En cours de préparation

Objectifs de l'étude 1

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, la particularité du HBV est la synthèse de l'ADNccc qui est responsable de la persistance du virus dans la cellule. Du fait de son maintien au sein de l'hépatocyte, la formation et la régulation de l'ADNccc restent des éléments clés du traitement antiviral. En effet, les antiviraux actuels ciblent seulement l'étape de rétrotranscription et l'ADNccc préexistant n'est pas éliminé des cellules infectées. De plus les antiviraux n'empêchent pas la formation *de novo* d'ADNccc à partir de virions circulants (Delmas et al., 2002).

Cet ADN est maintenu à une copie par cellule en moyenne chez l'homme grâce à un recyclage des nucléocapsides dans le noyau. Pour contrecarrer la faible quantité d'ADNccc produite par HBV, des équipes ont décidé de construire des virus déficients pour les protéines d'enveloppe (Köck et al., 2010). En effet, il a été montré chez le DHBV que le recyclage de l'ADNccc était régulé négativement par les protéines L de l'enveloppe (Summers et al., 1991). Il semblerait que le recyclage de l'ADNccc du HBV soit aussi régulé par les protéines de l'enveloppe *in vitro*.

Lors de l'étude d'une cohorte de patients coinfectés HIV-HBV chronique, un patient présentant de grandes quantités d'ADNccc intrahépatique (plus de 330 copies par cellule) a été identifié. L'objectif de notre étude a donc été de comprendre quels étaient les mécanismes menant à l'accumulation d'ADNccc observé *in vivo*, afin d'élargir nos connaissances sur la régulation de l'ADNccc et de développer de nouveaux modèles d'étude plus puissants.

Implication of core gene in HBV covalently closed circular DNA accumulation

Short title:

Maëlen Fournier¹, Judith Fresquet¹, Barbara Testoni¹, Christophe Combet³, Fanny Lebossé^{1,2}, Patrick Mialhes², Fabien Zoulim^{1,2,§}.

1- INSERM U1052- Cancer Research Center of Lyon (CRCL), University of Lyon 1 (UCBL), Lyon, France

2- Department of Hepatology, Croix Rousse hospital, Hospices Civils de Lyon, France

3- Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, UMR 5086, CNRS, University of Lyon 1, Lyon, France

§ Corresponding author:

Prof. Fabien Zoulim

INSERM U1052- CRCL

151 cours Albert Thomas,

69424 Lyon CEDEX 03

France

fabien.zoulim@inserm.fr

Phone number: (+33) 4 72 68 19 70

Fax number: (+33) 4 72 68 19 71

Grant support:

Institut universitaire de France (IUF) - grant from ANRS

Abbreviations:

cccDNA: covalently closed circular DNA

HBV: hepatitis B virus

HBcAg: HBc antigen-core protein

ABSTRACT

Background and aims:

Persistence of HBV cccDNA in infected hepatocytes represents the main mechanism responsible for the chronicity of infection. Upon the study of cccDNA levels in liver biopsies derived from a cohort of 60 HIV-HBV co-infected patients, an individual with a cccDNA level 300 fold higher than the average of cohort was identified.

Our objective was to characterize possible mutations in the viral genome responsible for the cccDNA accumulation observed *in vivo*.

Methods and results:

Following intrahepatic DNA extraction, the viral genome originated from the cccDNA-accumulating patient has been cloned. The characterization analysis highlighted one clone accumulating a higher amount of cccDNA than the wild-type virus. Sequence analysis and alignment allowed us to identify a pattern of scattered missense mutations all along the viral genome.

To determine which of them were functionally relevant, we performed fragment substitutions experiments involving the envelope/polymerase, precore/core and HBx regions of the HBV genome between three clones accumulating or not cccDNA and wild-type virus. Interestingly, substitution of the mutated region encoding the core protein, with a wild-type envelope, seemed to be sufficient to convert a wild-type virus into a cccDNA accumulating variant. A site-mutagenesis experiment allowed us to highlight the role of three mutations leading to a cccDNA levels more than 3.5-fold the wild-type virus. On contrary, mutation at position 45 in core protein seemed to abolish cccDNA accumulation.

Conclusion:

Our results underline the important role of the interaction between core and envelope proteins in cccDNA accumulation. These new findings may open new insight in the mechanism of cccDNA persistence.

Keywords: cccDNA; cccDNA accumulation; HBV; core protein

INTRODUCTION

Hepatitis B infection remains a major health problem causing cirrhosis, hepatocellular carcinoma (HCC) and approximately 600.000 deaths per year in the world (OMS Hepatite B, 2013). Hepatitis B virus (HBV), belonging to the *Hepadnaviridae* family, is an enveloped virus containing a relaxed circular DNA (rcDNA). This 3.2 kb genome has four open reading frames (ORFs) coding for seven proteins: core and hepatitis B e antigen (HBeAg), polymerase, HBx and small (S), middle (M) and large (L) envelope proteins (Seeger and Mason, 2000). During the viral life cycle, rcDNA is converted into a minichromosome, called cccDNA (covalently closed circular DNA), by recruiting host histones H3 and H2B (Bock et al., 1994, 2001). cccDNA is responsible for the persistence of HBV in infected hepatocytes, since currently available antiviral therapies are not able to eliminate existing cccDNA, nor to prevent its *de novo* formation. cccDNA persistence is thought to be the major cause of viral reactivation after treatment withdrawal (Delmas et al., 2002; Köck et al., 2003).

cccDNA can be produced from rcDNA provided by incoming virions or by recycling of nucleocapsids into the nucleus (Summers et al., 1990; Tuttleman et al., 1986). Indeed, after their assembly, nucleocapsids can be either enveloped to form Dane particles and secreted or redirected to the nucleus to maintain the pool of cccDNA. The hepatitis B core protein (HBc) is the major component of the nucleocapsid shell and contains a nuclear location signal (NLS) at its C-terminus. During HBV genome packaging, the C-terminal extremities are found inside the nucleocapsid, linked to pgRNA but during the minus strand DNA synthesis by retrotranscription, they become accessible for phosphorylation. In this condition, NLS are exposed and can fix to karyopherin, a nuclear transporter, thus promoting nucleocapsids shuttling to the nucleus (Bruss, 2004; Kann and Gerlich, 1994; Rabe et al., 2003). This recycling mechanism seems to be tightly regulated, since the number of cccDNA molecules found in chronically infected patients is between 0.01 and 10 copies per cell (Bourne et al., 2007; Werle-Lapostolle et al., 2004). This low number of cccDNA copies per cell has represented the limiting step to study HBV cccDNA formation and regulation *in vivo*. To overcome this limitation, Duck hepatitis B virus (DHBV) was used as a surrogate to study cccDNA dynamics, due to the fact that, contrary to HBV, DHBV accumulates up to 50 cccDNA copies per cell (Tuttleman et al., 1986). Thanks to this model, Summers et al demonstrated that cccDNA nuclear pool was regulated by envelope proteins, in particular the large one (Summers et al., 1990). Their model relies on a balance between the amount of

envelope proteins and nucleocapsids. If the number of envelope proteins is sufficient, nucleocapsids are transferred into the pre-Golgi compartment to be enveloped; otherwise, they are recycled to the nucleus through HBc NLS. Indeed, it was demonstrated that when large envelope protein is expressed at sufficient levels, core protein is delocalized from the nucleus to the cytosol (Yeh et al., 1994). Nevertheless, the DHBV model presents significant differences from HBV. Firstly, it does not possess the HBx protein and, consequently, is not able to establish chronic hepatitis or HCC (Lucifora et al., 2011; Seeger and Mason, 2000). Moreover, host factors involved in viral entry are also not shared between HBV and DHBV. It was recently shown that HBV enters the cell through the NTCP protein, whereas DHBV is known to use carboxypeptidase D for this step (Breiner et al., 1998; Yan et al., 2012). Finally, cccDNA formation kinetics vary between both viruses, in particular the deproteinization of rcDNA is faster in DHBV than in HBV and this leads to a different balance between cccDNA and replicative intermediates content. Indeed, cccDNA represents half of total DHBV nuclear DNA, while it accounts only for 5% of total HBV DNA *in vivo*.

The construction of envelope deficient viruses represented an alternative model to overcome the low abundance of cccDNA in human infected cells (Köck et al., 2010; Lentz and Loeb, 2011). Indeed, when envelope proteins are not present, complete virions are not secreted and capsids are recycled to the nucleus to produce cccDNA. Thanks to this approach it was found that ablation of the expression of the three envelope proteins led to a cccDNA accumulation of 6-fold over the level of the wild-type virus, suggesting that cccDNA accumulation is regulated by envelope proteins *in vitro* (Lentz and Loeb, 2011).

Furthermore, very little is known about regulation of cccDNA accumulation *in vivo*. The implication of DHBV preS envelope protein in negative cccDNA regulation was also proved in ducks and it was discovered that the same region of this protein (aa 127-136) controlled the amplification of cccDNA and virions production (Lenhoff and Summers, 1994a, 1994b).

During the study of a French cohort of HIV-HBV coinfecting patients (Lacombe et al., 2013), a subject with a significant high level of intrahepatic cccDNA was identified (300 fold higher than the average of the cohort). The objective of this study is to dissect the possible mechanisms leading to the cccDNA accumulation rate observed in this patient. To address this point, total intrahepatic HBV DNAs were extracted, cloned and characterized for sequence heterogeneity. The discovery of a cccDNA accumulating clone allowed us to identify the implication of the interaction between core and envelope proteins in the regulation of cccDNA accumulation.

MATERIALS AND METHODS

Patient clinical characteristics

A 35-year-old man with a chronic HBV infection diagnosed three years ago with HBsAg and HBeAg positivity was first addressed in our hospital in February 1997. Initial laboratory evaluation revealed: alanine aminotransferase (ALT) 76 UI/ml greater than the upper limit of normal (ULN) and high plasma HBV DNA with $3.9 \cdot 10^{12}$ copies/ml which defined a chronic active HBV hepatitis. A first liver biopsy (LB) was performed and showed mild portal necroinflammatory activity and moderate fibrosis (Scoring as METAVIR A1F2). He was first treated by standard interferon- α then by lamivudine monotherapy inducing a sustained response. Unexpectedly, he was admitted in April 1999 in our hospital for a pneumocystosis revealing HIV infection, whose the date of contamination will be determined in December 1997 retrospectively from stored plasma. Antiretroviral therapy with didanosine, nelfinavir and stavudine was started without stopping lamivudine for HBV leading to prolonged HIV suppression (< 50 copies) although absolute CD4 cell count was decreasing to $166/\text{mm}^3$ in November 2001. However, several months after, a fibrosing cholestatic hepatitis (FCH) was induced by a virological breakthrough due to HBV resistance mutations to lamivudine. So, an add-on adefovir therapy with lamivudine was started and ARV were modified including zidovudine, lamivudine (300 mg/day), efavirenz and didanosine. In November 2002, while HBV DNA was 1160 copies/ml, ALT normal, HIV RNA < 50 copies/ml and CD4 cell count $331/\text{mm}^3$, a new LB was performed. Histological examinations revealed worsening lesions with an evolution towards cirrhosis (METAVIR F3-F4 score). After this, adefovir was discontinued and a combination of tenofovir, lamivudine and pegylated interferon- $\alpha 2b$ (1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$) was started. A complete HBV suppression occurred and transaminases were normalized over subsequent months. In the same time, a HBeAg loss was obtained without HBe seroconversion. On tenofovir and lamivudine, there was a prolonged HBV suppression (< 10 IU/ml, Abbott real-time HBV PCR) with ALT normalization.

Plasmid constructs

Total intrahepatic HBV DNA was extracted from patient's liver biopsy performed in november 2002. HBV DNA was cloned in a pCH9-3091-GFP plasmid containing a CMV-early-promoter thanks to the fragment substitution technique developed by Hu et al (Hu et al., 2012; Nassal, 1992).

The principle consisted in replacing the HBV genome present in pCH9-3091 by the HBV genome isolated from the patient. Firstly, a 2.3 kb fragment was amplified, using primers Fc-p-e-1,818 and R803, and gel purified. This fragment was then used as mega-primers in FSR reaction. The product is then digested with DpnI (Takara) and transformed into competent TOP10 bacteria. A second PCR was performed with F599 and R1,825 primers and 1.2 kb resultant fragment was introduced in the previously obtained plasmid.

Fc-p-e-1,818	GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGAACTTTTTTCACCTCTGCCTAATC
R803	GTAACAGCGGCATAAAGGGA
F599	TGTATTCCCATCCCATC
R1,825	AAAAAGTTGCATGGTGCTGG

Fragment substitution reaction (FSR) and site-specific mutagenesis experiments

A technique based on that published by Hu et al was used to substitute mutated HBV genome fragments into the HBV wild-type genome (genotype A) and to perform mutagenesis experiments (Hu et al., 2012).

PreC/C fragment (position 1817-2440), polymerase/HBs fragment (position 2267-1197) and HBx fragment (position 1164-1825) were PCR-amplified from each of the mutants. After gel purification with the NucleoSpin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel), 320 ng of each fragment was used as mega-primers in a 20 μ L FSR reaction. The product was digested 1 hour with 10 U DpnI (Takara) to eliminate the original plasmid and then transformed into competent bacteria. For site-specific mutagenesis, primers containing specific mutated positions were used. Final constructs were checked by sequencing.

Cell culture and transfection

HepG2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo scientific), 2 mM glutaMAX, 1mM sodium pyruvate and 50 U/ μ L penicillin/streptomycin (Gibco) in 5% CO₂ at 37°C. For transfection experiments, HepG2 cells were seeded at 60-80% confluency and transfected with pCH9 clones using TransIT-2020 reagent as recommended by the manufacturer (Mirus). Green fluorescent protein was assayed by FACS analysis 3 days post transfection to normalize transfection efficiency. Cells were harvested 7 days post transfection for DNA extraction and 9 days post transfection for proteins extraction.

Extraction and quantification of cccDNA by real-time PCR

Total cell extracts were obtained by lysis in Tissue and Cell Lysis Solution (Epicentre®, by Illumina, Madison, United States). After proteinase K digestion, viral DNAs were isolated using MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre®, by Illumina, Madison, United States). Before cccDNA detection, DNA was digested with Dpn I (Takara) and Plasmid-Safe DNase (Epicentre Biotechnologies) 8 h at 37°C to eliminate original plasmid and not double-stranded HBV replication intermediates (Yan et al., 2012).

Quantification of HBV cccDNA was performed in a Light-Cycler 480 Real Time PCR System (Roche) with specific cccDNA primers and fluorescence hybridization probes (Werle-Lapostolle et al., 2004).

To normalize the number of viral copies per cell content, the number of cellular genomes was determined by using the β -globin gene kit (Roche Diagnostics). Serial dilutions of a plasmid containing a HBV monomer (pHBV-EcoRI) were used as quantification standards. The range of cccDNA molecules quantification was comprised between $2.10E-2$ and $2.10E5$ copies/cell.

Extraction and detection of encapsidated DNA

As described by Horwich et al, cells were harvested and lysed in 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% NP-40, pH 8 (Horwich et al., 1990). Nuclei were pelleted by centrifugation and the supernatant was treated with a DNase/RNase mix supplemented with 20 mM magnesium acetate for 3 hours at 37°C and then supplemented with 12.5 mM EDTA, 0.6% SDS, 100 mM NaCl, 0.3 mg/ml proteinase K and incubated overnight at 42°C. Viral DNA was then extracted with phenol-chloroform and ethanol precipitated.

Viral DNA was quantified by qPCR using Sybr Green. The qPCR was performed on a Light Cycler 480 machine (Roche) in a reaction volume of 20 μ L using the Light Cycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) with forward primer (5'-GCTGACGCAACCCCCACT-3'; final concentration: 500 nM) and reverse primer (5'-AGGAGTTCCGCAGTATGG-3'; final concentration: 500 nM) (Santantonio et al., 2009). A plasmid containing the full-length HBV genome was used to prepare the standard curve.

The range of detection was between $2.10E-2$ to $2.10E5$ copies/cell.

Detection of HBsAg in culture supernatants

HBsAg in supernatant was detected by Elisa using a chemiluminescence immunoassay (Autobio) according to manufacturer's instructions.

Viral particles detection

The secreted viral particles were analyzed as previously described (Lenhoff and Summers, 1994). Briefly, after clarification of supernatants, particles were precipitated by 10% PEG 8000 and incubated 1 hour at 4°C. Particles were concentrated by centrifugation and diluted in culture medium and then resolved on a 1% agarose gel buffered with TAE and transferred to a HybondN+ membrane (Amersham) in TNE buffer. Viral DNAs were visualized by Southern Blotting using ³²P labelled full-length genome DNA probe.

Bioinformatics

Constructions of sequences were performed with VectorNTI Advance 11.0 software and analyses were performed with the website NPS@ (Combet et al., 2000).

RESULTS

1- Characterization of isolated clones

After cloning, HepG2 cells were transfected and the replicative capacity of forty-eight clones was assessed by Southern-blot after rcDNA extraction (data not shown). Sixteen replicative competent clones were selected and sequenced (a map of the annotated mutations is displayed in Supplementary Fig 1). The analysis allowed us to divide the replicative competent clones into 12 genetically different groups, named A-P. One group, the L, contained five clones presenting the same DNA sequence. These 12 variants were selected for the subsequent analysis. As shown in Fig.1a, after transfection in HepG2 cells, all the clones were analyzed for their replication level, measured by qPCR of total HBV DNA after rcDNA extraction. In agreement with the preliminary screening by Southern Blot, all the clones were able to replicate and three of them, D, J and L, showed the same replication level of the wild-type virus (genotype A). However, for clones A, B, C, H, O and P, the replicative capacity was reduced by 30 to 50% compared to wild-type. This reduction reached more than 60% for clone I (Fig 1a).

The cccDNA level associated to each clone was assessed by specific qPCR after total HBV DNA extraction and enzymatic digestion with PlasmidSafe and DpnI to eliminate replicative intermediates and transfected plasmid. Only one clone, the L one, produced 3-fold more cccDNA than the wild-type virus in HepG2 cells (Fig 1b). Constructs B, D, F and I produced less cccDNA than the wild-type, while all the other variants did not show significant differences in cccDNA amount compared to wild-type.

Clones were then analyzed for HBV pregenomic RNA levels by qPCR (Fig 1c). Half of them (D, F and J to P) presented a similar level of pgRNA respect to the wild-type virus, while the rest of the clones presented a pgRNA reduction of more than 50% (Fig 1c).

To go further, we investigated the transcriptional activity of cccDNA by calculating the ratio between pgRNA and cccDNA levels (Fig 1d). For clones D, F, J, O and P, the transcriptional activity is similar or higher than that of wild-type. The six other clones presented a reduced transcriptional activity, and, interestingly, the cccDNA accumulating clone (L) was included in this group (Fig 1d).

All the clones presented an impaired secretion of HBsAg, as measured by chemiluminescence immunoassay. In particular, the HBsAg levels of clones B, L and O were between 25 to 45% compared to wild-type virus, whereas all the other constructs had secretion levels lower than

12% compared to wild-type (Fig 2a). Moreover, Dane particles secretion was defected for all clones apart for G clone (Fig 2b).

2- Core gene is implicated in cccDNA accumulation

According to the results obtained during the characterization of the clones and data found in literature (Köck et al., 2010), we hypothesized that mutations in the HBV genome could be, at least in part, responsible for cccDNA accumulation. HBV variants sequence analysis and alignment identified a pattern of scattered missense mutations all along the viral genome (Supplementary Fig 1). Therefore, to determine which of them were functionally relevant, we performed fragment substitutions experiments involving the envelope/polymerase, precore/core and HBx regions of the HBV genome. For a first screening, clones exhibiting different cccDNA accumulation patterns were chosen: clones B and F, with a lower cccDNA level than wild-type and clone L, which produced more cccDNA than the wild-type virus. It is worth mentioning that the mutation pattern of the precore-core fragment was identical for the three clones, HBx fragments coming from F and L were identical, while polymerase/envelope fragments were all different (Fig 3a).

HepG2 cells were then transfected with the swapped constructs and cccDNA, replication capacity and HBsAg secretion were evaluated. The introduction of polymerase/envelope fragment belonging to the B and L variants into the wild-type backbone led to a drastic decrease of cccDNA levels whereas construct for polymerase/envelope F clone induced a cccDNA level near to the wild-type virus. Concerning construct with X fragments, they led to the same cccDNA level as the wild-type virus. On the contrary, an augmentation of 3-fold of cccDNA production with respect to wild-type virus was observed when the substitution involved precore/core fragments (Fig 3b).

Concerning rcDNA quantification, construct harboring the B variant of polymerase/envelope fragment showed a higher replication compared to those with B variant of X and precore/core fragments. The replication capacity was drastically diminished by the introduction of the F and L variant of polymerase/envelope fragment into the wild-type virus, whereas constructs containing X and precore/core fragments had a replication capacity of 140% and 70%, respectively, compared to wild-type (Fig 3c).

Secreted HBsAg level was lower for polymerase/envelope fragments of the three clones. X fragment harboring the B variant had the same behavior as the wild-type virus. HBsAg secretion was higher than wild-type for X and preC/C portions coming from L clone (Fig 3d).

3- Several core mutations lead to an accumulation of cccDNA whereas P45S diminishes it.

Since the substitution of the mutated region encoding the core protein seemed to be sufficient to convert a wild-type virus into a cccDNA accumulating variant, we decided to investigate in more details the single mutations present in the precore/core fragments of all our clones. Figure 4a shows the four mutations' patterns that were found: groups 1 and 2 differed only for the substitution P45S. Group 3 was composed by a single clone presenting two mutations shared with groups 1 and 2 (T13S and P5T). Group 4, comprised of variants D and J, differed completely from the others and was characterized by the presence of the mutation V13G (Fig 4a). Again, the precore/core fragments of each group were introduced into a wild-type HBV genome backbone and HepG2 cells were transfected to quantify cccDNA, rcDNA and HBsAg secretion.

Only two mutations patterns in precore/core led to cccDNA accumulation: group 1 and 4 (Fig. 4b). All groups showed an impaired replicative capacity except group 4 (Fig. 4c). Groups 1 and 2 displayed higher HBsAg secretion than the wild-type virus and for groups 3 and 4, HBsAg secretion was rather lower than the wild-type virus (Fig 4d).

To further understand which single mutation(s) could be involved in cccDNA accumulation, we performed site-directed mutagenesis of the preC/C region of the wild-type virus. HepG2 cells were transfected to quantify viral parameters. Regarding cccDNA quantification, three mutations at positions 5, 60 and 67 led to a moderate augmentation of cccDNA levels (between 1.5 and 2-fold). Interestingly, mutations V13G, L31I and Y38H produced significantly more cccDNA than the wild-type. Only P45S seemed to diminish cccDNA levels while all the other mutations did not show significant different cccDNA amounts compared to wild-type (Fig 5a). The same constructs were then tested for their replication capacity and HBsAg secretion. Half of them showed a replication capacity similar or higher than the wild-type virus (Fig 5b). Most of the constructs had an HBsAg secretion similar or lower than the wild-type virus. The HBsAg levels produced by constructs with mutations V13G, P45S, L60V and L31I were between 25 and 70%. Only the mutation at position 40 showed a higher HBsAg secretion reaching 250% of the wild-type (Fig 5c).

DISCUSSION

Understanding cccDNA formation and regulation is a primary objective in the current HBV research field. Indeed, the HBV minichromosome is known to persist in infected cells even after that viral clearance is reached, hampering the complete eradication of the infection. Forty-eight weeks of adefovir treatment leads to a 0.8 log decrease in cccDNA copies per cell but not to a complete elimination of infected cells (Werle-Lapostolle et al., 2004; Wong et al., 2013). As a consequence, reactivation of hepatitis B virus may occur in patients experiencing an immunodepressive state. Current knowledge about cccDNA formation is still limited, due to the lack of adequate *in vitro* models mimicking the human *in vivo* situation.

In our study, a cccDNA accumulating patient was isolated from a cohort of HBV/HIV co-infected individuals and a liver specimen was used as source of intrahepatic HBV DNA. We cloned the different HBV sequences present in the patient's liver and characterized the resulting clones for their replication and cccDNA production rate after transfection in HepG2 cells. Analysis of rcDNA levels showed that replication capacity was different between clones. This is probably due to a mutation in basal core promoter or in polymerase gene that could lead to a decrease in replication abilities. This could be the case of clone I, which harbors the mutation T1776A in basal core promoter, which has been demonstrated to be linked to an impaired replication. Indeed, this mutation, associated with HBeAg negativity, was located in the binding site for FXR α , a transcription activator of the HBV core promoter (Ramière et al., 2008; Zhang et al., 2010). Regarding the results of viral DNA and RNA quantifications, a specific clone accumulating cccDNA, but presenting a replication rate and a pgRNA level similar to the wild-type virus, was identified, the L clone. The transcriptional activity of the cccDNA produced by the variant was lower than the wild-type but could not be explained by mutations in the basal core promoter. Indeed, the only mutation present in the core promoter of L clone, known to affect the binding site in precore mRNA of RNA polymerase, is present in four other clones which present a transcriptional activity comparable to wild-type (Okamoto et al., 1994). Moreover, HBsAg secretion is defective in this clone and few Dane particles are detected. Since the higher cccDNA amount present after clone L transfection could not rely on an increased replicative capacity, we could speculate that some mutations in the HBV proteins might interfere with the nucleocapsid recycling process and, thus, augment the reservoir of cccDNA molecules. In particular, we could speculate that mutations in core protein could inhibit the interaction with envelope proteins during virion formation and mutations in envelope proteins could, for instance, block the

secretion. Both hypotheses would lead to a recycling of capsids into the nucleus and, therefore, to an accumulation of cccDNA in the nucleus. Since our sequencing analysis demonstrated a scattered profiling of point mutations all along the HBV genome of the clones, we decided to study different HBV regions separately by fragment substitution into the wild-type virus. We observed that substitution of the mutated region encoding the core protein, with the presence of the wild-type (precore/core BFL) or L envelope (L clone), seemed to be sufficient to recapitulate the cccDNA accumulating phenotype. This observation could suggest a loss of interaction between envelope and mutated core protein that could lead to a recycling of capsids into the nucleus to form cccDNA. Interestingly, clones B and F bear the same core mutation pattern as L, but they do not accumulate cccDNA, suggesting that some compensatory mutations could be present in B and F envelopes. Based on these data, we could imagine two scenarios: either a mutation in envelope protein of these B and F clones re-establishes the capsid envelopment and the secretion phenotype, or their mutated envelope protein is able to retain capsids into the cytoplasm preventing their recycling and cccDNA accumulation. Same conclusions could be made for constructs of wild-type core and envelope proteins coming from B, F or L clones (pol BFL). Concerning HBsAg secretion, we could hypothesize that the defective HBsAg secretion observed for the full clones might be due to a mutation in polymerase/envelope genes. Indeed, when modified clones had a wild-type polymerase (when X or precore/core fragments were inserted in the wt), HBsAg secretion was similar, or even higher, than the wild-type virus. Strikingly, secreted HBsAg is detected for each separated fragment coming from the F clone but not for the full F construct. This strongly suggests an interplay of different HBV genome fragments on HBsAg secretion capacity of the virus.

A more detailed analysis of the mutations found in the preC/C portion of all our clones identified four different mutations patterns. Two groups (1 and 4) of mutations in precore/core led to an accumulation of cccDNA. As previously shown, mutations in precore/core fragment of group 1, containing B, F and L clones, lead to a higher rate of cccDNA. However, among five clones belonging to this group 1, only one accumulates cccDNA. Interestingly, group 2, which differs from group 1 only for the addition of P45S did not show any cccDNA accumulation, suggesting a dominant negative role of P45S mutation on the other modifications. Moreover, mutation V13G, present in D and J clones (group 4), increased the number of cccDNA molecules. This effect is probably inhibited by other mutations in polymerase or X genes when the full clones are transfected. Site-mutagenesis analysis allowed us to highlight the potential role of several mutations in core protein in cccDNA

accumulation. Indeed, three of them at position 5, 60 and 67 led to a moderate accumulation of cccDNA whereas mutations V13G, L31I and Y38H produced higher numbers of cccDNA molecules respect to wild-type virus. We could speculate that these mutations may impact on the direct interaction with envelope proteins. However, their position in core protein structure does not seem to corroborate this hypothesis, with the exception of mutation T67N (Fig 6). On the contrary, these mutations could have an impact on the formation and stability of core dimers that could induce a destabilization of the envelopment process. Finally, P45S was shown to abolish the cccDNA accumulation induced by other mutations. The substitution of a proline into serine in this region induces a flexibility which could re-establish interactions between core dimers or with envelope proteins abolished by other mutations.

In summary, our work allowed to identify a specific cccDNA accumulating clone, even if the extent of cccDNA accumulation resulted significantly lower compared to the levels observed in the patient (4 vs 300 copies per cell). Several hypotheses could explain this difference. Firstly, the patient's liver microenvironment may have an influence on HBV lifecycle. Indeed, this patient was co-infected with HIV, which could be responsible for an impairment of the immune responses against HBV. The appearance of unselected strains might be a consequence of this low environmental pressure. Moreover, our experiments were performed in HepG2 cells which are known to produce very few cccDNA molecules per cell (Guo et al., 2007; Köck et al., 2010). Indeed, the extraction of HBV DNAs which are not linked to protein, like polymerase, shows that DNA is more present under the form of deproteinized-rcDNA (DP-rcDNA), the precursor form of cccDNA, than cccDNA. The depletion of envelope proteins leads to DP-rcDNA accumulation and, at a lower level, cccDNA. Nevertheless, the identification of this accumulating clone and the analysis of its mutation pattern, allowed us to highlight the importance of specific positions in the core protein in the enveloping process and in the regulation of cccDNA production. Perspectives of this project were to study cccDNA kinetics and epigenetic in our model.

REFERENCES

- Bock, C.T., Schranz, P., Schröder, C.H., and Zentgraf, H. (1994). Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* 8, 215–229.
- Bock, C.T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M.P., Trautwein, C., and Zentgraf, H. (2001). Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* 307, 183–196.
- Bourne, E.J., Dienstag, J.L., Lopez, V.A., Sander, T.J., Longlet, J.M., Hall, J.G., Kwiatkowski, R.W., Wright, T., Lai, C.L., and Condreay, L.D. (2007). Quantitative analysis of HBV cccDNA from clinical specimens: correlation with clinical and virological response during antiviral therapy. *J. Viral Hepat.* 14, 55–63.
- Breiner, K.M., Urban, S., and Schaller, H. (1998). Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J. Virol.* 72, 8098–8104.
- Bruss, V. (2004). Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res.* 106, 199–209.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deléage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* 25, 147–150.
- Delmas, J., Schorr, O., Jamard, C., Gibbs, C., Trépo, C., Hantz, O., and Zoulim, F. (2002). Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus-infected hepatocytes in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 425–433.
- Guo, H., Jiang, D., Zhou, T., Cuconati, A., Block, T.M., and Guo, J.-T. (2007). Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. *J. Virol.* 81, 12472–12484.
- Horwich, A.L., Furtak, K., Pugh, J., and Summers, J. (1990). Synthesis of hepadnavirus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HuH7 cells. *J. Virol.* 64, 642–650.
- Hu, J., Cui, J., Guo, J., Zhang, W., Cai, X., Yuan, Z., Li, Q., Deng, X., Zeng, A., Hu, Y., et al. (2012). Phenotypic assay of a hepatitis B virus strain carrying an rtS246T variant using a new strategy. *J. Med. Virol.* 84, 34–43.
- Kann, M., and Gerlich, W.H. (1994). Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J. Virol.* 68, 7993–8000.
- Köck, J., Baumert, T.F., Delaney, W.E., 4th, Blum, H.E., and von Weizsäcker, F. (2003). Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes. *Hepatology* 38, 1410–1418.
- Köck, J., Rösler, C., Zhang, J.-J., Blum, H.E., Nassal, M., and Thoma, C. (2010). Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS Pathog.* 6, e1001082.
- Lacombe, K., Boyd, A., Lavocat, F., Pichoud, C., Gozlan, J., Mialhes, P., Lascoux-Combe, C., Vernet, G., Girard, P.-M., and Zoulim, F. (2013). High incidence of treatment-induced and vaccine-escape hepatitis B virus mutants among human immunodeficiency virus/hepatitis B-infected patients. *Hepatology* 57, 1410–1418.
- Lenhoff, R.J., and Summers, J. (1994a). Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J. Virol.* 68, 4565–4571.
- Lenhoff, R.J., and Summers, J. (1994b). Construction of avian hepadnavirus variants with enhanced replication and cytopathicity in primary hepatocytes. *J. Virol.* 68, 5706–5713.
- Lentz, T.B., and Loeb, D.D. (2011). Roles of the envelope proteins in the amplification of covalently closed circular DNA and completion of synthesis of the plus-strand DNA in hepatitis B virus. *J. Virol.* 85, 11916–11927.
- Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., and Protzer, U. (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatology* 55, 996–1003.
- Nassal, M. (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J. Virol.* 66, 4107–4116.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Akahane, Y., Sugai, Y., Yoshida, M., Moriyama, K., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1994). Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J. Virol.* 68, 8102–8110.
- OMS Hepatite B (2013). Fact sheet n°204.
- Rabe, B., Vlachou, A., Panté, N., Helenius, A., and Kann, M. (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9849–9854.
- Ramière, C., Scholtès, C., Diaz, O., Icard, V., Perrin-Cocon, L., Trabaud, M.-A., Lotteau, V., and André, P. (2008). Transactivation of the Hepatitis B Virus Core Promoter by the Nuclear Receptor FXR α . *J. Virol.* 82, 10832–10840.

- Santantonio, T., Fasano, M., Durantel, S., Barraud, L., Heichen, M., Guastadisegni, A., Pastore, G., and Zoulim, F. (2009). Adefovir dipivoxil resistance patterns in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Antivir. Ther.* *14*, 557–565.
- Seeger, C., and Mason, W.S. (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *64*, 51–68.
- Summers, J., Smith, P.M., and Horwich, A.L. (1990). Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J. Virol.* *64*, 2819–2824.
- Tuttleman, J.S., Pourcel, C., and Summers, J. (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* *47*, 451–460.
- Werle-Lapostolle, B., Bowden, S., Locarnini, S., Wursthorn, K., Petersen, J., Lau, G., Trepo, C., Marcellin, P., Goodman, Z., Delaney, W.E., 4th, et al. (2004). Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* *126*, 1750–1758.
- Wong, D.K.-H., Seto, W.-K., Fung, J., Ip, P., Huang, F.-Y., Lai, C.-L., and Yuen, M.-F. (2013). Reduction of hepatitis B surface antigen and covalently closed circular DNA by nucleos(t)ide analogues of different potency. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *11*, 1004–1010.e1.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., et al. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* *1*, e00049.
- Yeh, C.T., Ou, J.H., Chu, C.M., and Liaw, Y.F. (1994). Alteration of the subcellular localization of hepatitis B virus core protein by large but not small surface proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *203*, 1348–1354.
- Zhang, D., Ma, S., Zhang, X., Zhao, H., Ding, H., and Zeng, C. (2010). Prevalent HBV point mutations and mutation combinations at BCP/preC region and their association with liver disease progression. *BMC Infect. Dis.* *10*, 271.

Figure 1

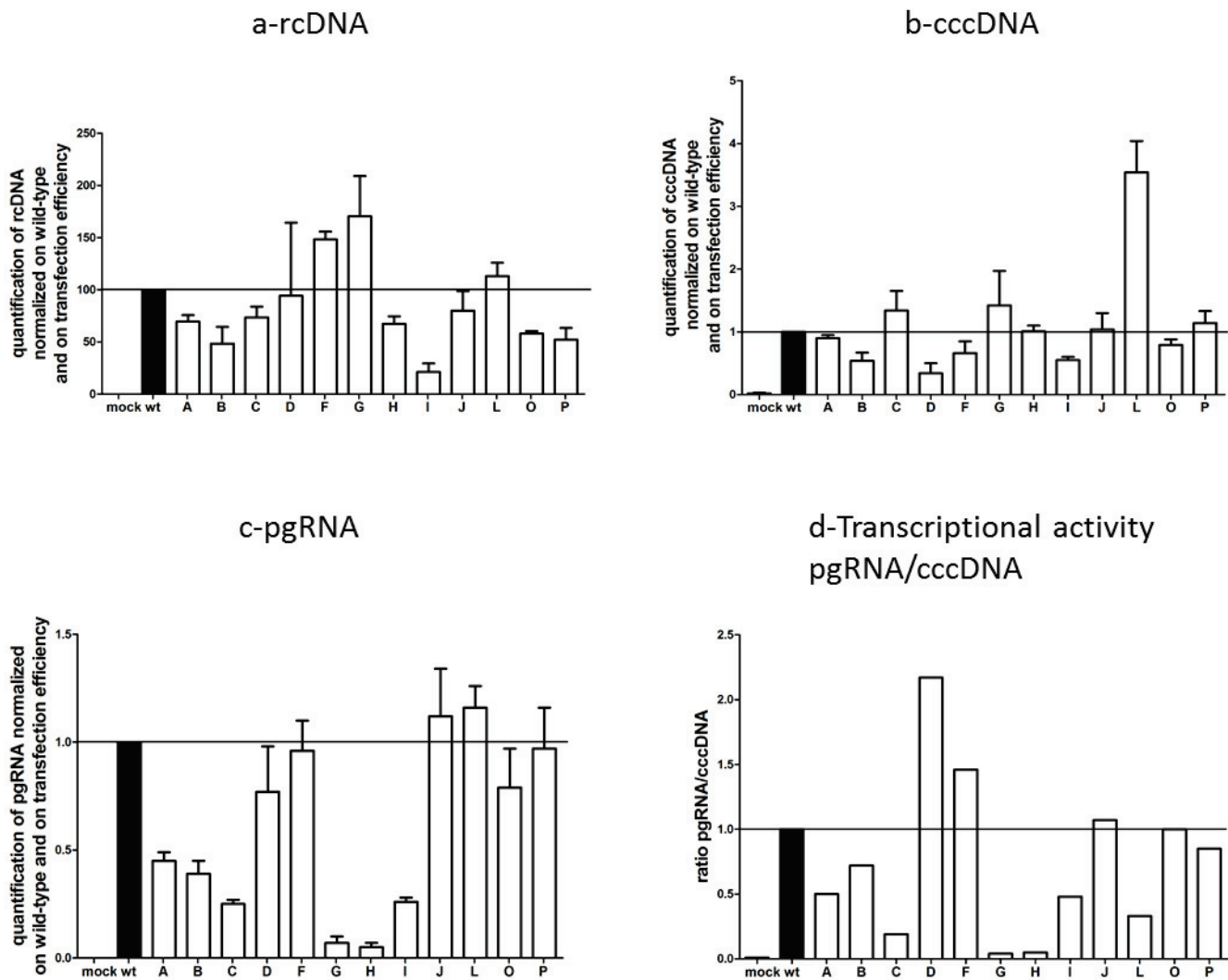


Figure 1: Intracellular characterization of isolated clones.

(a-d) HepG2 cells were transfected with each isolated clone. Seven days post transfection, encapsidated DNA was isolated and analyzed by qPCR (a), cccDNA was evaluated by qPCR (b) and viral RNA was isolated and analyzed by qPCR (c). Transcriptional activity of cccDNA (ratio pgRNA/cccDNA) was calculated (d). Each value was normalized on wild-type value and on transfection efficiency.

Figure 2

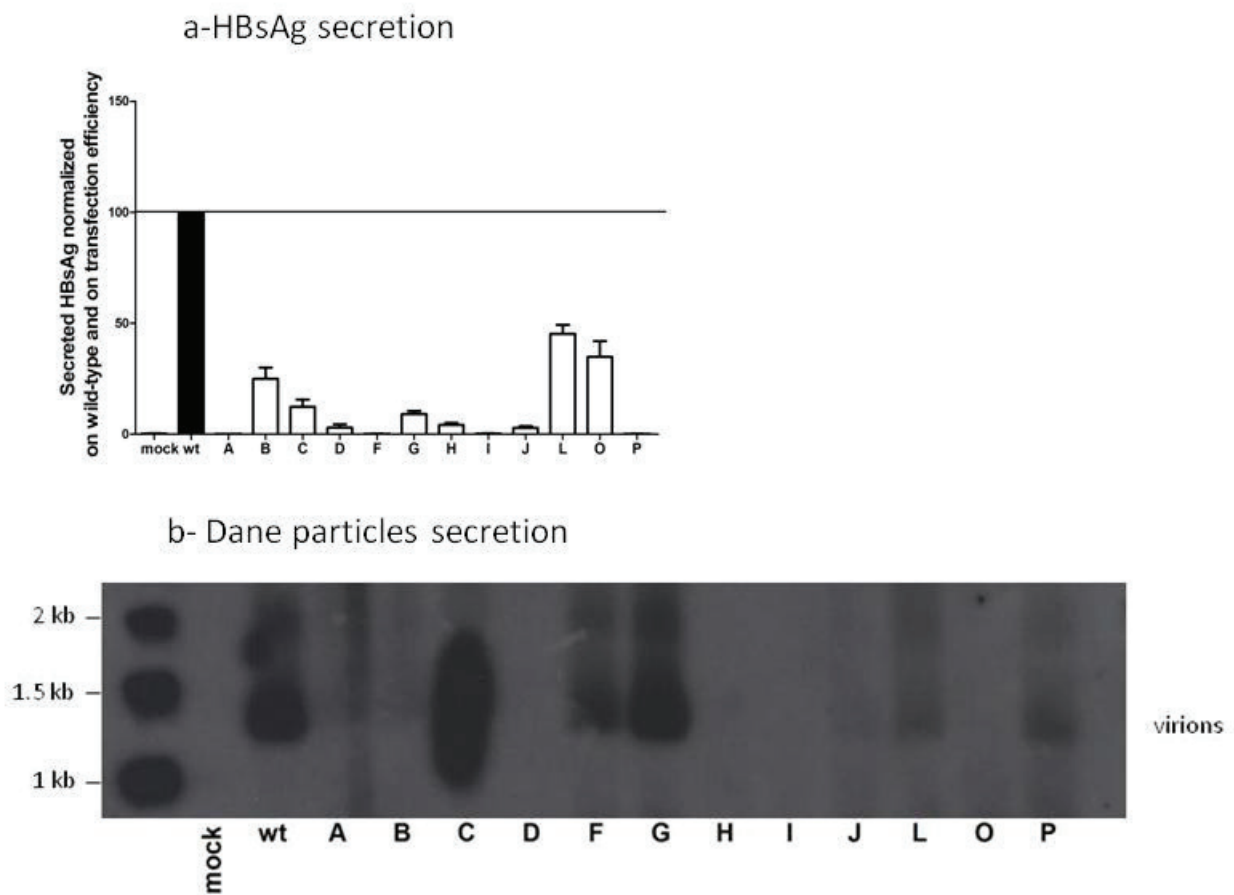


Figure 2: Extracellular characterization of isolated clones.

(a-b) HepG2 cells were transfected with each isolated clone. Medium was collected 5, 7 and 9 days post transfection and was submitted to HBsAg detection by ELISA (a). Supernatants were PEG concentrated before secretion analysis on native agarose gel (b).

Figure 3

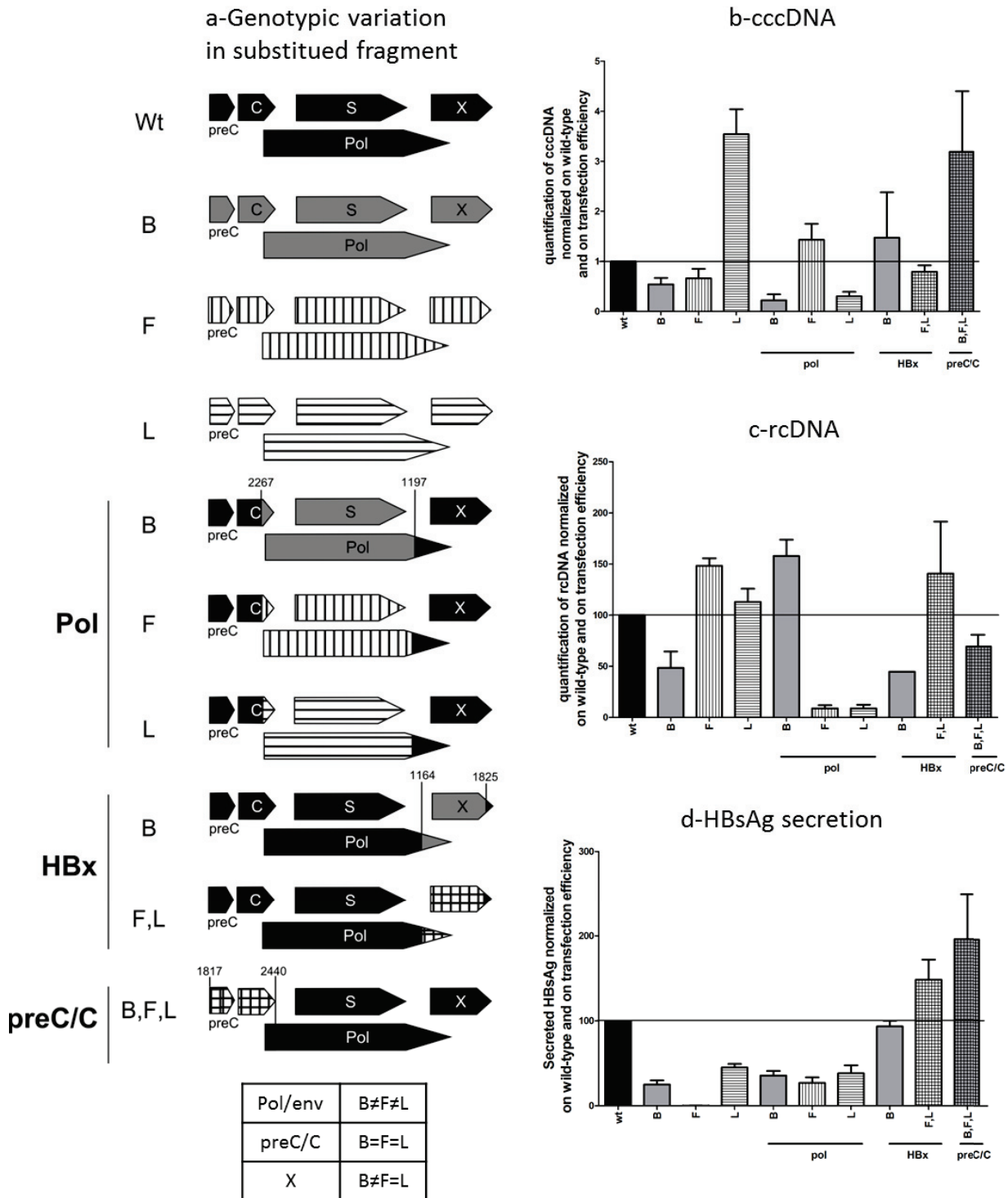


Figure 3: Fragment substitution between 3 isolated clones and wt virus.

Genotypic variation in substituted fragment (a). Precore/core, polymerase or HBx fragments of B, F and L clones were substituted in the wild-type virus and resulting constructs were transfected in HepG2 cells. Seven days post transfection, cccDNA was evaluated by qPCR (b), encapsidated DNA was isolated and analyzed by qPCR (c). Medium was collected 5, 7 and 9 days post transfection and was submitted to HBsAg detection by ELISA (d). Each value was normalized on wild-type value and on transfection efficiency.

Figure 4

a-Mutations in precore/core proteins of isolated clones:

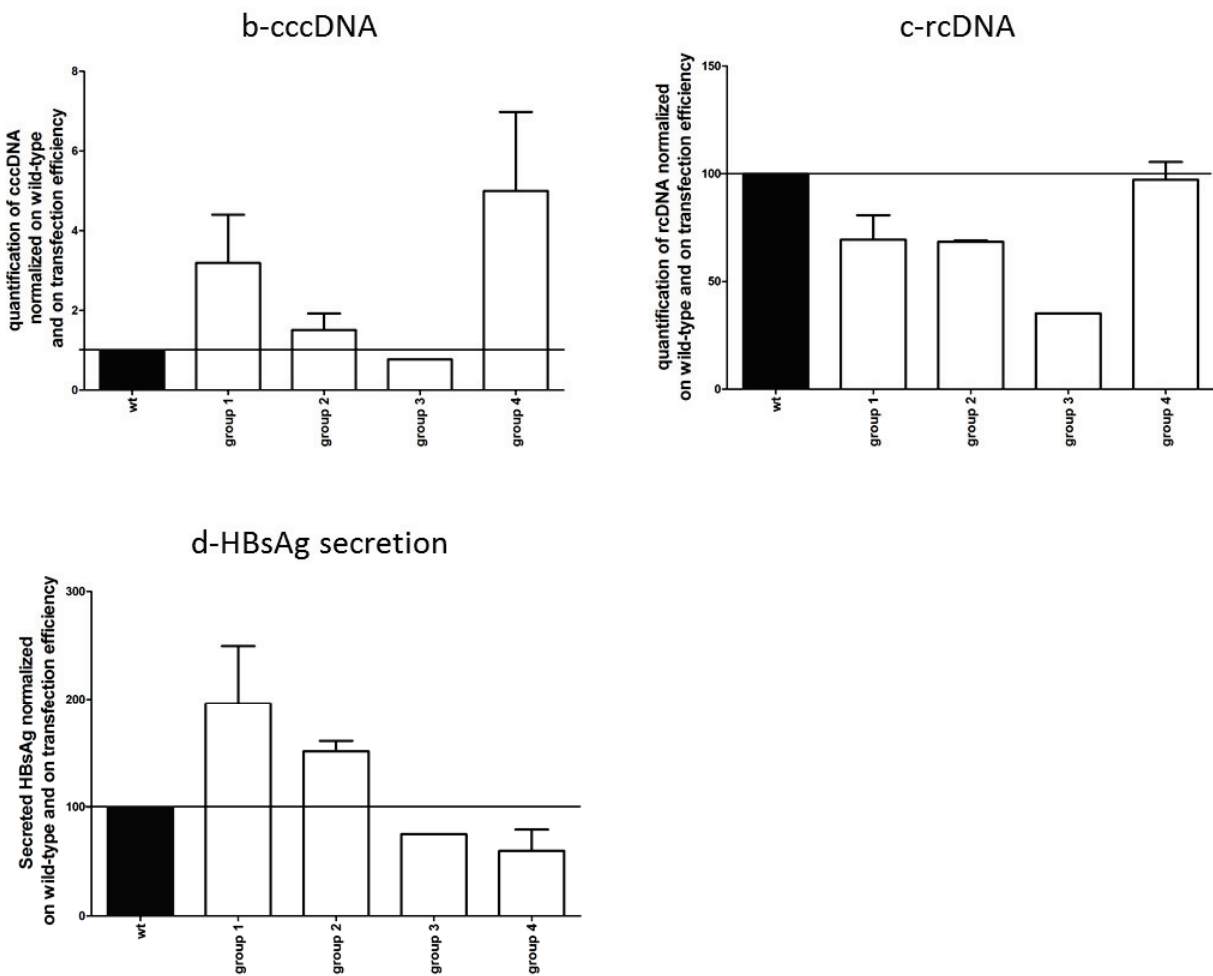
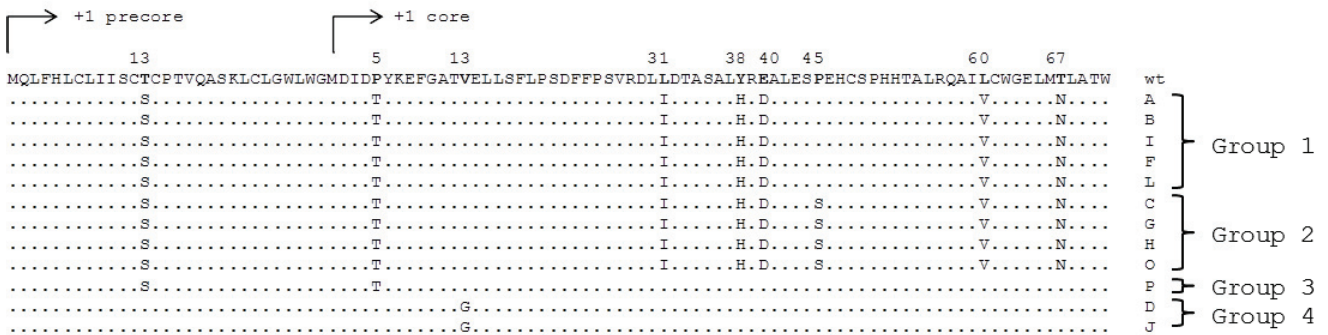


Figure 4: Precore/core substitution between clones and the wild-type virus.

(a) Detailed map of precore/core mutations of all clones. PreC/C fragments of all clones were substituted in the wild-type virus and transfected in HepG2 cells.

Seven days post transfection, cccDNA was evaluated by qPCR (b), encapsidated DNA was isolated and analyzed by qPCR (c). Medium was collected 5, 7 and 9 days post transfection and was submitted to HBsAg detection by ELISA (d). Each value was normalized on wild-type value and on transfection efficiency.

Figure 5

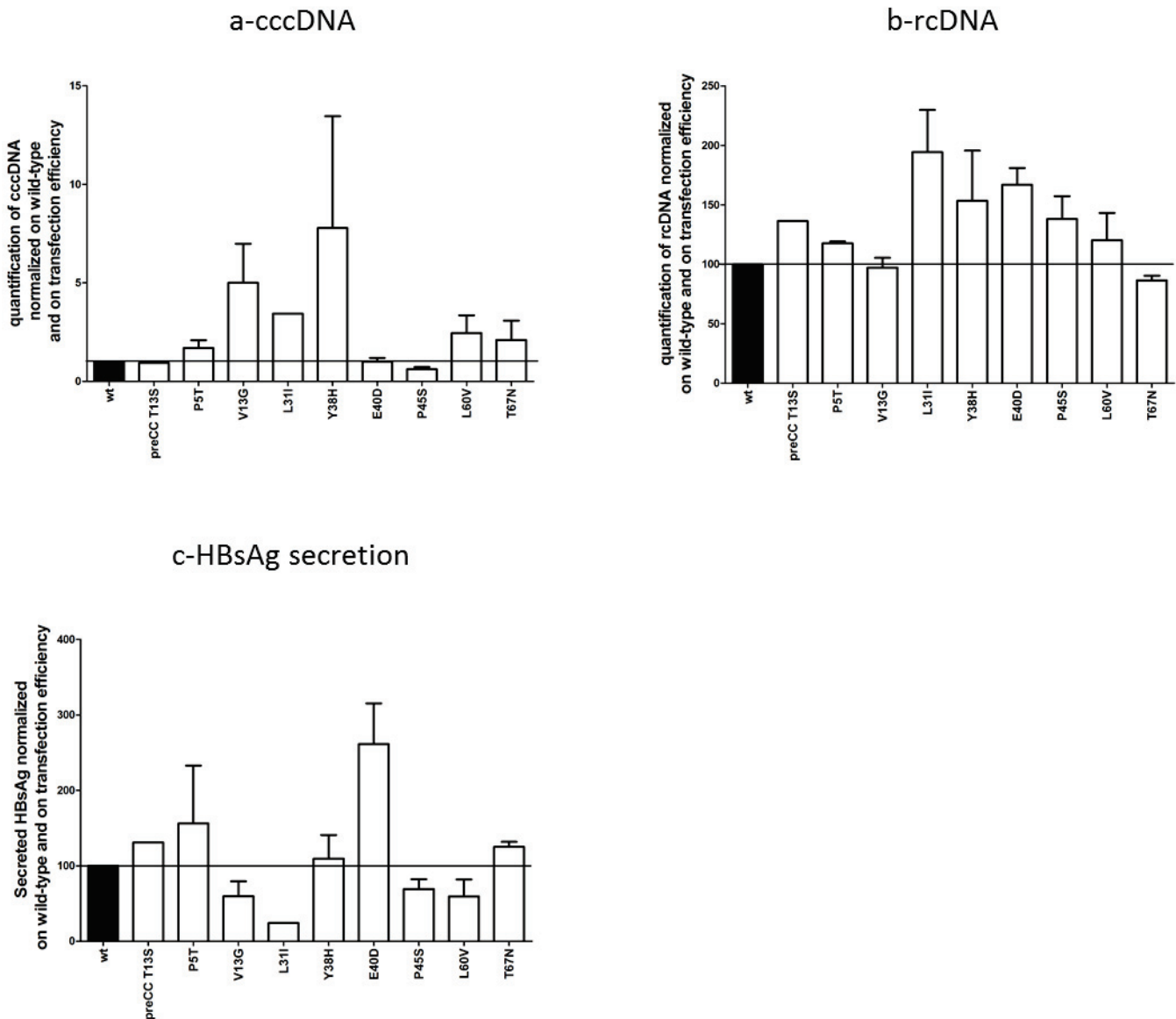


Figure 5: Evaluation of each precore/core mutation found in clones.

Mutations were introduced in the wild-type virus by site-mutagenesis technique and resulting constructs were transfected in HepG2 cells. Seven days post transfection, cccDNA was evaluated by qPCR (a), encapsidated DNA was isolated and analyzed by qPCR (b). Medium was collected 5, 7 and 9 days post transfection and was submitted to HBsAg detection by ELISA (c). Each value was normalized on wild-type value and on transfection efficiency.

Figure 6

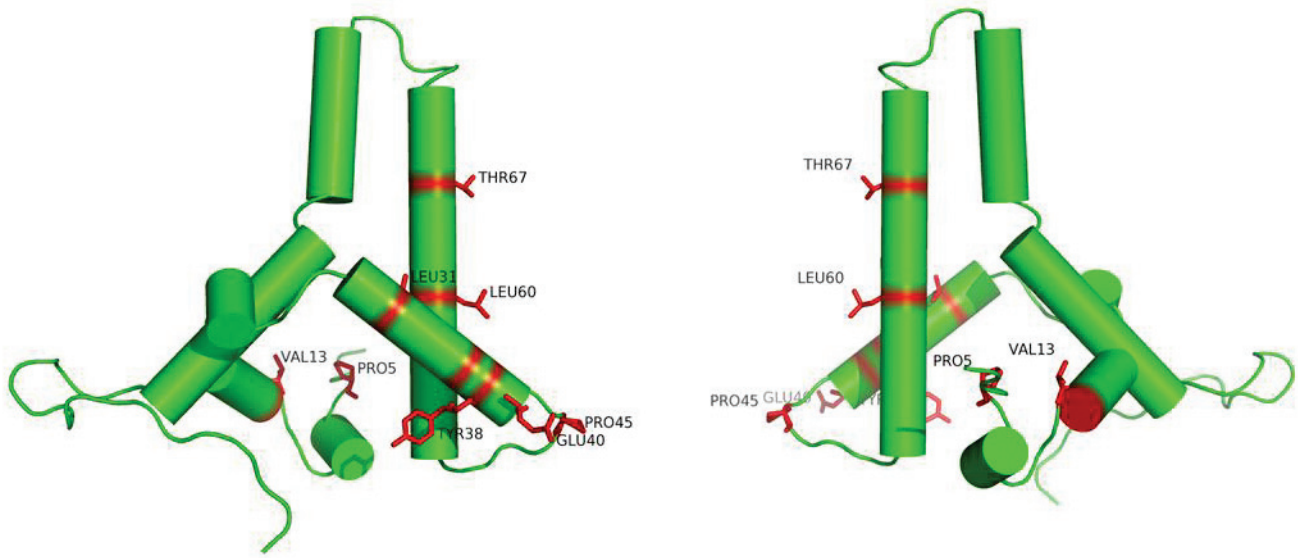


Figure 6: Mapping of positions showing mutation in clones A to P.

The positions are displayed in red sticks and labelled with residue name and number. The image was generated with Pymol software from HBV core structure PDB:1QGT.

Discussion de l'étude 1

La compréhension de la formation et de la régulation de l'ADNccc est devenue un objectif majeur de la recherche sur le virus de l'hépatite B. En effet, cet ADN n'étant pas détruit par les analogues de nucléos(t)ides, seuls traitements approuvés contre le HBV, il persiste dans les cellules infectées provoquant des réactivations de la maladie lors par exemple d'immunosuppression (Delmas et al., 2002; Lau et al., 1997). De nouvelles molécules ciblant la molécule d'ADNccc sont développées et testées *in vitro* depuis quelques années. Parmi elles, nous trouvons les nucléases zinc-finger ou les TALENs qui coupent une séquence spécifique d'ADN ou encore les activateurs du récepteur de la lymphotoxine- β . Leurs efficacités ont été prouvées *in vitro* et *in vivo* mais certains problèmes persistent. En effet, suite à cette coupure par les nucléases, une partie de l'ADN est réparé par le système de réparation cellulaire (Lucifora et al., 2014). De plus, la question de la délivrance de ces molécules dans le corps humain reste ouverte (Bloom et al., 2013; Cradick et al., 2010).

En revanche, cibler une étape plus précoce dans le cycle viral, comme l'étape de formation de l'ADNccc, semble plus évidente à mettre en place. C'est pourquoi, l'étude de la formation et de la régulation de l'ADNccc afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques est devenue importante. De nombreuses études sur l'ADNccc ont été menées grâce au virus de l'hépatite B du canard (DHBV), modèle d'étude du HBV. En effet, ce virus accumule 50 fois plus d'ADNccc par cellule que le HBV, rendant son étude plus facile (Summers et al., 1990; Tuttleman et al., 1986). En revanche, il a été démontré que ces deux virus ne se comportaient pas de la même façon en ce qui concernait la formation de l'ADNccc (Köck et al., 2010). La construction de virus HBV déficients pour les protéines d'enveloppe a représenté un modèle alternatif pour contrecarrer le faible taux d'ADNccc produit par le HBV. Grâce à cette approche, il a été montré que l'ablation des protéines d'enveloppe menait à un recyclage des nucléocapsides conduisant à une accumulation d'ADNccc *in vitro* dans les cellules (Lentz and Loeb, 2011). Cependant, rien n'est connu sur la régulation de l'ADNccc *in vivo*.

Dans notre étude, un patient coinfecté HIV-HBV, présentant un fort taux d'ADNccc intrahépatique, a été identifié. L'ADN du HBV intrahépatique a été extrait puis cloné. La réplication des clones obtenus a été vérifiée par Southern-blot après transfection et les seize clones répliquants ont été séquencés. Douze clones se sont avérés génétiquement différents et cinq clones (E, K, L, M, N) sont identiques. Ces clones ont ensuite été caractérisés après transfection de cellules HepG2. Un seul clone isolé du patient, le clone L, semble produire plus d'ADNccc que le virus sauvage. L'hypothèse la plus raisonnable pouvant expliquer le taux d'ADNccc produit par le clone L est une plus forte réplication de ce clone. C'est par exemple le cas du DHBV muté en position G133E de l'enveloppe. Ce mutant accumule de l'ADNccc et présente une forte réplication ainsi qu'une forte sécrétion de particules de Dane (Lenhoff and Summers, 1994b). En revanche, cela n'est pas le cas dans notre étude, le clone L

présentant un taux de réplication similaire au virus sauvage ainsi qu'une faible sécrétion virale.

Au regard de cette faible sécrétion virale ainsi que des données de la littérature, nous avons pensé que des mutations dans les protéines du HBV, et en particulier dans les protéines de la capsid et de l'enveloppe, pourraient être impliquées dans l'accumulation de l'ADNccc observée chez le patient. En effet, à titre d'exemple, des mutations dans la protéine core pourraient inhiber l'interaction avec les protéines de l'enveloppe et des mutations dans les protéines de l'enveloppe pourraient bloquer la sécrétion des virions. Ces deux hypothèses mèneraient au recyclage des nucléocapsides dans le noyau des cellules infectées. La quantité des mutations présentes dans les clones étant trop grande pour être étudiées isolément, nous avons décidé d'étudier les différentes régions de HBV séparément en les substituant dans un virus sauvage.

La substitution des fragments HBx, polymérase/enveloppe ou precore/core du virus sauvage par les fragments de clones accumulant ou non de l'ADNccc nous ont permis de mettre en évidence le rôle de l'interaction entre la protéine core et l'enveloppe dans l'accumulation de l'ADNccc. En effet, la substitution de la région codant pour la protéine core du clone L induit, en présence d'une enveloppe sauvage ou de l'enveloppe du clone L, une accumulation de l'ADNccc. L'explication de ce phénomène pourrait être une perte de l'interaction entre la protéine core mutée et les protéines de l'enveloppe menant à un recyclage des nucléocapsides dans le noyau de la cellule et donc à une accumulation de l'ADNccc. Cependant, il semblerait y avoir des mutations compensatoires dans les enveloppes des clones B et F. Effectivement, ces clones ont la même protéine core que le clone L mais n'accumulent pas d'ADNccc. Deux mécanismes peuvent être imaginés : soit une mutation dans les enveloppes des clones B et F établit de nouveau l'interaction entre core et l'enveloppe permettant l'enveloppement des nucléocapsides, soit les protéines d'enveloppe mutées retiennent les nucléocapsides dans le cytoplasme empêchant le recyclage des capsides dans le noyau (Melegari et al., 1997; Yuan et al., 1999). Les mêmes conclusions peuvent être appliquées aux constructions contenant une protéine core sauvage et les enveloppes des clones B, F et L.

En ce qui concerne la sécrétion de l'antigène HBs, il semblerait que le défaut de sécrétion d'AgHBs observé dans les clones entiers soit dû à des mutations présentes dans le fragment polymérase/enveloppe. En effet, lorsque les constructions possèdent un fragment polymérase/enveloppe sauvage, c'est-à-dire lorsque les fragments precore/core ou X sont insérés, la sécrétion de l'AgHBs est égale ou supérieure au virus sauvage.

Cette évidence du lien entre le gène precore/core et l'accumulation de l'ADNccc nous a poussé à étudier plus en détail les mutations trouvées dans ce fragment dans les 12 clones isolés du patient. Cette analyse a mis en évidence 4 groupes de mutations. Le groupe 1, auquel appartiennent les clones B, F et L, contient sept mutations. Lorsque ces mutations sont introduites dans un génome sauvage, la construction, une fois transfectée, produit une grande quantité d'ADNccc. Cependant, il est à noter que seul un clone dans ce groupe en comportant cinq, le clone L, accumule de l'ADNccc lorsqu'il est entier.

Le deuxième groupe de mutations comporte les mêmes mutations que le groupe 1 en sus de la mutation P45S. En revanche, contrairement au groupe 1, ce groupe ne semble pas induire une accumulation d'ADNccc. On pourrait donc penser que la mutation P45S a un effet dominant négatif sur l'accumulation de l'ADNccc induite par les autres mutations.

Les deux mutations du groupe 3, une dans la partie precore et une dans la core, ne semblent pas induire une augmentation du taux d'ADNccc. Ces deux mutations combinées, HBe T13S et HBc P5T, ne semblent donc pas impliquées dans l'accumulation de l'ADNccc.

Enfin, le groupe 4 constitué des constructions precore/core des clones D et J semble aussi induire une accumulation de l'ADNccc. Une seule mutation, V13G, est présente dans ce fragment precore/core. Puisque les deux clones entiers n'accumulent pas de l'ADNccc, l'effet de cette mutation semble aussi être inhibé par des mutations présentes dans d'autres fragments du génome.

L'analyse fine des mutations par mutagenèse dirigée nous a permis de mettre en évidence la possible implication de plusieurs mutations du gène core à divers degrés. Il semblerait que les mutations en position 5, 60 et 67 induiraient une accumulation modérée d'ADNccc tandis que les mutations V13G, L31I et Y38H provoqueraient une forte accumulation. Selon l'analyse des positions de ces mutations effectuée sur la structure de la protéine core enveloppée, l'impact de ces mutations, à part T67N, sur l'interaction directe avec les protéines d'enveloppe reste peu probable (Wynne et al., 1999). En effet, ces mutations ne sont pas présentes sur le bord des pores de la nucléocapside. En revanche, les mutations P5T et L60V, présentes dans la poche hydrophobe de la capsid, pourraient interférer avec le signal de maturation de la nucléocapside. En effet, seules les capsides matures, c'est-à-dire contenant de l'ADN double brin sont enveloppées (Gerelsaikhon et al., 1996). Lorsque l'ADN est synthétisé à l'intérieur de la nucléocapside, cela induirait un changement de conformation de la poche hydrophobe, rendant ainsi des acides aminés accessibles. La présence de certains acides aminés à la surface de la nucléocapside pourrait ainsi servir de signal de maturation et donc diriger ces nucléocapsides vers le réticulum endoplasmique pour être enveloppées. On pourrait donc penser que la mutation de ces acides aminés empêcherait la détection de ce signal. Enfin, les mutations pourraient avoir un effet sur la stabilité et la formation des dimères de core. On pourrait imaginer qu'une capsid déstabilisée ne puisse pas être enveloppée correctement ou bloquerait cet enveloppement. La mutation P45S a été montrée comme abolissant l'accumulation de l'ADNccc induite par les autres mutations. La substitution d'une proline en sérine induirait une flexibilité dans cette région qui pourrait ré-établir les interactions perdues entre les dimères de core ou avec les protéines de l'enveloppe. Toute cette analyse est à remettre dans le contexte d'une dynamique temporelle de la capsid qui n'est pas figée dans le temps et dans une conformation.

La caractérisation de ces clones a permis de mettre en évidence un mutant accumulant de l'ADNccc. Cependant, le taux d'ADNccc produit par ce clone est loin d'atteindre celui trouvé chez le patient (plus de 300 copies par cellule). Plusieurs explications peuvent être avancées. Tout d'abord, on pourrait penser que le microenvironnement du patient pourrait influencer sur le HBV. En effet, le patient étant coinfected avec le HIV, ce dernier module les réponses immunitaires de l'hôte. Ainsi, le virus n'étant plus soumis à une forte pression de

sélection, des souches cytopathiques habituellement éliminées, par exemple celles accumulant de l'ADNccc, pourraient voir le jour. De plus, il a été montré que des cellules transfectées avec du HBV n'accumulaient que peu d'ADNccc. Inversement, son intermédiaire de formation, l'ADNrc déprotéiné (ADNrc-DP) est fortement augmenté lors de la déplétion des protéines d'enveloppe (Guo et al., 2007). Contrairement à ce que l'on pourrait croire, les cellules HepG2 sont compétentes pour la formation d'ADNccc car lorsqu'elles sont transfectées avec un DHBV déplété pour les protéines de l'enveloppe virale, une accumulation d'ADNccc est observée. Il s'avère que la formation de l'ADNccc à partir de l'ADNrc-DP est très lente chez le HBV comparé au DHBV expliquant sa faible augmentation lors de la non expression des protéines d'enveloppe (Köck et al., 2010). Enfin, la lignée HepG2 est proliférative contrairement aux hépatocytes humains. Les cellules HepG2 se comportent donc plus comme des hépatocytes se divisant lors de la repopulation du foie. Il se pourrait donc que l'amplification de l'ADNccc se déroule d'une façon différente dans les deux types cellulaires.

Une question que l'on pourrait se poser est de savoir comment ce virus mutant peut se propager. En effet, l'accumulation de cette quantité d'intermédiaires de réplication ne peut pas être anodine pour la cellule et a un effet cytopathique. La conséquence chez le patient de ce fort taux d'ADNccc est l'évolution de l'hépatite B vers une forme d'hépatite cholestatique fibrosante. De plus, le patient présentait une cytolysse majeure. Or, il a été montré que la réplication d'un virus DHBV portant la mutation G133E dans l'enveloppe diminuait au bout de trois semaines d'infection contrairement au virus sauvage qui engendre un maintien des intermédiaires de réplication, qui n'est pas dû à une réinfection des cellules (Lenhoff and Summers, 1994b; Summers et al., 1990). Il semblerait donc que les souches cytopathiques ne soient pas sélectionnées au cours de l'infection et soient remplacées par la souche sauvage *in vitro* et *in vivo* (Lenhoff et al., 1998, 1999). De plus, le clone accumulant de l'ADNccc isolé du patient produit peu de particules de Dane détectables en Southern-blot. D'autres variants possédant une mutation induisant une faible sécrétion sont présents dans le sera des patients (Asahina et al., 1996). Quelques hypothèses pourraient expliquer la propagation de ce clone dans le foie. Il se pourrait que ce variant soit un mutant d'échappement au système immunitaire et donc que sa faible sécrétion soit compensée par son échappement au système immunitaire. Cela ne semble pas être le cas dans notre étude car aucune des mutations présentes dans les clones ne semblent se trouver dans un CMH de classe II (Steven et al., 2005). De plus, la mutation L60V semble au contraire générer un nouvel épitope CMH de classe I (Zhang et al., 2013).

L'autre hypothèse serait l'utilisation d'une enveloppe sauvage par le virus mutant pour être sécrété. En effet, il a été montré que la sécrétion virale du mutant L60V pouvait être restaurée par la protéine core sauvage apportée en trans (Le Pogam et al., 2000).

Les perspectives de ce projet seraient d'identifier les mutations présentes dans les protéines d'enveloppe permettant le rétablissement de la sécrétion virale abolie par des mutations dans la protéine core. Pour cela, une analyse fine par mutagenèse dirigée des protéines d'enveloppe pourrait être menée. Il serait aussi intéressant de déterminer la structure cristallographique capsid-eveloppe de certains clones mutants afin d'étudier en détail les

interactions protéiques mises en jeu. Enfin, la protéine core se fixant aussi sur la molécule d'ADNccc, il serait intéressant de vérifier si les mutations de la protéine core n'ont pas un effet sur l'épigénétique de la molécule d'ADNccc ce qui pourrait expliquer la faible activité transcriptionnelle mise en évidence pour le clone accumulant de l'ADNccc.

Cette étude a donc mis en évidence le rôle de plusieurs mutations dans le gène core menant à une régulation de l'accumulation de l'ADNccc *in vivo*.

Annexe de l'étude 1

Annexe 1 : Exemple d'alignements protéiques entre le virus sauvage (wt gA) et des clones isolés du patient.

Les alignements ont été effectués avec le programme ClustalW sur le site internet NPS@ (Combet et al., 2000).

Légende : la couleur rouge (*) signifie que les acides aminés sont identiques dans toutes les séquences, le vert (:) que la similarité est forte entre les acides aminés et le bleu (.) qu'elle est faible. La couleur noire signifie que les acides aminés sont différents.

- Protéine HBs de l'enveloppe

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
HBswtgA    MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTI PQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLFI
HBscloneG  MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTI PQSLDSWWTSLNFLGESPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLFI
HBscloneL  MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTI PQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLFI
Prim.cons. MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTI PQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLFI
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
HBswtgA    QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQNSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWNASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSA
HBscloneG  QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQNSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWNASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSA
HBscloneL  QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQNSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWNASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSA
Prim.cons. QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQNSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWNASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSA
      210     220
HBswtgA    WGPSLYSIVSFPFIPLLPIFFCLWVYI
HBscloneG  WGPSLYSIVRPFIPLLLIFFCLWVYI
HBscloneL  WGPSLYSIVRPFIPLLLIFFCLWVYI
Prim.cons. WGPSLYSIVRPFIPLLLIFFCLWVYI
  
```

- Protéine L de l'enveloppe

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
HBLwtgA    MGGWSSKPRKMGMTNLSVFNPLGFFPDHQLDPAFGANSNPNDFNPIKDHWPAAQVGVGAFGPGGLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQ
HBLcloneG  MGGWSSKPRKMGMTNLSVFNPLGFFPDHQLDPAFGANSNPNDFNPIKDHWPAAQVGVGAFGPGGLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQ
HBLcloneL  MGGWSSKPRKMGMTNLSVFNPLGFFPDHQLDPAFGANSNPNDFNPIKDHWPAAQVGVGAFGPGGLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQ
Prim.cons. MGGWSSKPRKMGMTNLSVFNPLGFFPDHQLDPAFGANSNPNDFNPIKDHWPAAQVGVGAFGPGGLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQ
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
HBLwtgA    SGRQPTPI SPPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPA PNIASHISSISARTGDPVTNMENTITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRIL
HBLcloneG  SGRQPTPI SPPLRDSHPQAVRWNPPAFHQALQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPA PNIASHISSISARTGDPVTNMENTITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRIL
HBLcloneL  SGRQPTPI SPPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPTVRGLYLPAGGSSSGTVNPA PNIASHISSISARTGDPVTNMENTITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRIL
Prim.cons. SGRQPTPI SPPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPA PNIASHISSISARTGDPVTNMENTITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRIL
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
HBLwtgA    TIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLFI
HBLcloneG  TIPQSLDSWWTSLNFLGESPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLFI
HBLcloneL  TIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLFI
Prim.cons. TIPQSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLFI
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
HBLwtgA    PAQNSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWNASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSA
HBLcloneG  PAQNSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWNASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSA
HBLcloneL  PAQNSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWNASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSA
Prim.cons. PAQNSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWNASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSA
  
```

- Protéine HBx

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
HBxwtgA  MAARLYCQLDPSRDVLCRLPVGAE SRGRPLSGPLGTLSSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARCMTTVAHQILPKVLHKRTLGL
HBxcloneH MAARLYCQLDPSRDVLCRLPVGAE SRGRPLSGPLGTPSSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARCMTTVAHQILPKVLHKRTLGL
HBxcloneI MAARLYCQLDPSRDVLCRLPVGAE SRGRPLSGPLGTLSSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARCMTTVAHQILPKVLHKRTLGL
HBxcloneJ MAARLCQQLDPSRDVLCRLPVGAE SRGRPLSGPLGTLSSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCTLRFTSARCMTTVAHQILPKVLHKRTLGL
HBxcloneO MAARLYCQLDPSRGVLCRLPVGAE SRGRPLSGPLGTLSSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARCMTTVAHQILPKVLHKRTLGL
*****
Prim.cons. MAARLYCQLDPSRDVLCRLPVGAE SRGRPLSGPLGTLSSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARCMTTVAHQILPKVLHKRTLGL

      110     120     130     140     150
      |      |      |      |      |
HBxwtgA  PAMSTTDLEAYFKDCVFKDWEELGEEIRSKV-FVLGGCRHKLVCA PAPCNFF TSA
HBxcloneH PAMSTTDLEAYFKDCVFKDWEELGEEIRLKV-FVLGGCRHKLVCA PAPCNFF TSA
HBxcloneI PAMSTTDLEAYFKDCVFKDWEELGEEIRSKLVFVGGCRHKLVCA PAPCNFF TSA
HBxcloneJ PAMSTTDLEAYFKDCVFKDWEELGEEIRLKV-FVLGGCRHKLVCA PAPCNFF TSA
HBxcloneO PAMSTTDLEAYFKDCVFKDWEELGEEIRLKV-FVLGGCRHKLVCA PAPCNFF TSA
*****
Prim.cons. PAMSTTDLEAYFKDCVFKDWEELGEEIRLKVLFVLGGCRHKLVCA PAPCNFF TSA

```

- Protéine precore

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
preCCwtgA  MQLFHLCLIIISCTCPTVQASKLCLGWLWGMIDIDYKEFGATVELLSFLPSDFPFSVRDLDTASALYREALESEHCSPHHTALRQAILCWGELMTLATW
preCCcloneC MQLFHLCLIIISCSCTVQASKLCLGWLWGMIDIDYKEFGATVELLSFLPSDFPFSVRDLDTASALHRDALESEHCSPHHTALRQAIVCWGELMNLATW
*****
Prim.cons.  MQLFHLCLIIISCTCPTVQASKLCLGWLWGMIDIDYKEFGATVELLSFLPSDFPFSVRDLDTASALR2ALESEHCSPHHTALRQAI2CWGELM2LATW

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
preCCwtgA  VGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRDRGRSPRRRTPSPRRRSQ
preCCcloneC VGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRDRGRSPRRRTPSPRRRSQ
*****
Prim.cons.  VGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRDRGRSPRRRTPSPRRRSQ

      210
      |
preCCwtgA  SPRRRRSQSRESQC
preCCcloneC SPRRRRSQSRESQC
*****
Prim.cons.  SPRRRRSQSRESQC

```

- Protéine core

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
corewtgA  MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFPFSVRDLDTASALYREALESEHCSPHHTALRQAILCWGELMTLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQL
corecloneC MDIDTYKEFGATVELLSFLPSDFPFSVRDLDTASALHRDALESEHCSPHHTALRQAIVCWGELMNLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQL
corecloneD MDIDPYKEFGATGELLSFLPSDFPFSVRDLDTASALYREALESEHCSPHHTALRQAILCWGELMTLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQL
*****
Prim.cons.  MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFPFSVRDLDTASALYREALESEHCSPHHTALRQAILCWGELMTLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQL

      110     120     130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |      |      |
corewtgA  LWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRDRGRSPRRRTPSPRRRSQSRESQC
corecloneC LWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRDRGRSPRRRTPSPRRRSQSRESQC
corecloneD LWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRDRGRSPRRRTPSPRRRSQSRESQC
*****
Prim.cons.  LWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRDRGRSPRRRTPSPRRRSQSRESQC

```

- Protéine polymérase

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
polwtgA    MPLSYQHFRKLLLLLDDDEIEAGPLEEELPRLADADLNRRVAEDNLNGLNLSVIPWTHKVGNFGLYSSTVPIFNPEWQTPSPFKIHLQEDIINRCQQFVGP
polcloneB  MPLSYQHFRKLLLLLDDGTEAGPLEEELPRLADADLNRRVAEDNLNGLNLSVIPWTHKVGNFGLYSSTVPIFNPEWQTPSPFKIHLQEDIINRCQQFVGP
polcloneI  MPLSYQHFRKLLLLLDDGTEAGPLEEELPRLADADLNRRVAEDNLNGLNLSVIPWTHKVGNFGLYSSTVPIFNPEWQTPSPFKIHLQEDIINRCQQFVGP
polcloneL  MPLSYQHFRKLLLLLDDGTEAGPLEEELPRLADADLNRRVAEDNLNGLNLSVIPWTHKVGNFGLYSSTVPIFNPEWQTPSPFKIHLQEDIINRCQQFVGP
*****
Prim. cons. MPLSYQHFRKLLLLLDDGTEAGPLEEELPRLADADLNRRVAEDNLNGLNLSVIPWTHKVGNFGLYSSTVPIFNPEWQTPSPFKIHLQEDIINRCQQFVGP

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
polwtgA    LTVNEKRRLKLI MPARFYPTHTKYLPLDKGIKPYYPDQVNNHYFQTRHYLHTLWKAGILYKRETTTSASFCGSPYSWEQELQHGRRLVIKTSQRHGDESFC
polcloneB  LTVNEKRRLKLI MPARFYPTHTKYLPLDKGIKPYYPDQVNNHYFQTRHYLHTLWKAGILYKRETTTSASFCGSPYSWEQELQHGRRLVIKTSQRHGDEFVG
polcloneI  LTVNEKRRLKLI MPARFYPTHTKYLPLDKGIKPYYPDQVNNHYFQTRHYLHTLWKAGILYKRETTTSASFCGSPYSWEQELQHGRRLVIKTSQRHGDEFVG
polcloneL  LTVNEKRRLKLI MPARFYPTHTKYLPLDKGIKPYYPDQVNNHYFQTRHYLHTLWKAGILYKRETTTSASFCGSPYSWEQELQHGRRLVIKTSQRHGDEFVG
*****
Prim. cons.  LTVNEKRRLKLI MPARFYPTHTKYLPLDKGIKPYYPDQVNNHYFQTRHYLHTLWKAGILYKRETTTSASFCGSPYSWEQELQHGRRLVIKTSQRHGDEFVG

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
polwtgA    SQPSGILSRSSVSGPCIRSQLKQSRGLQPHQGGLASSQPGRSISRARAHPTRRYFGVEPSGSGHIDHSVNNSSSCLHQSAVRKAAYSHLSTSKRQSSS
polcloneB  SQPSGILSRSSVSGPCIRSQLKQSRGLQPHQGGLASSQPGRSISRARAHPTRRYFGVEPSGSGHIDHSVNNSSSCLHQSAVRKAAYSHLSTSKRQSSS
polcloneI  SQPSGILSRSSVSGPCIRSQLKQSRGLQPHQGGLASSQPGRSISRARAHPTRRYFGVEPSGSGHIDHSVNNSSSCLHQSAVRKAAYSHLSTSKRQSSS
polcloneL  SQPSGILSRSSVSGPCIRSQLKQSRGLQPHQGGLASSQPGRSISRARAHPTRRYFGVEPSGSGHIDHSVNNSSSCLHQSAVRKAAYSHLSTSKRQSSS
*****
Prim. cons.  SQPSGILSRSSVSGPCIRSQLKQSRGLQPHQGGLASSQPGRSISRARAHPTRRYFGVEPSGSGHIDHSVNNSSSCLHQSAVRKAAYSHLSTSKRQSSS

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
polwtgA    GHAVEFHCLPPSSAGSQSGSVFSCWWLQFRNSKPCSEYCLSHLVNLRDWDGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDVDFSQFSRG
polcloneB  GRAVESPCLPSSAGSQSGSVFSCWWLQFRNSKPCSEYCLSHLVNLRDWDGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDVDFSQFSRG
polcloneI  GHAVEFHCLPPSSAGSQSGSVFSCWWLQFRNSKPCSEYCLSHLVNLRDWDGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDVDFSQFSRG
polcloneL  GHAVEFHCLPPSSAGSHSQSGSVFSCWWLQFRNSKPCSEYCLSHLVNLRDWDGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDVDFSQFSRG
*:*:*
Prim. cons.  GHAVEFHCLPPSSAGSQSGSV2SCWWLQFRNSKPCSEYCLSHLVNLRDWDGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDVDFSQFSRG

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
polwtgA    ITRVSWPKFAVFNQLSITNLLSSNLSWLSLDVSAAFYHILPHPAAMPHELLIGSSGLSRVVARLSSNSRINNNQYGTMQNLHSDCSRQLYVSLMLLYKTYG
polcloneB  ITRVSWPKFAVFNQLSITNLLSSNLSWLSLDVSAAFYHILPHPAAMPHELLIGSSGLSRVVARLSSNSRINNNQYGTMQNLHSDCSRQLYVSLMLLYKTYG
polcloneI  ITRVSWPKFAVFNQLSITNLLSSNLSWLSLDVSAAFYHILPHPAAMPHELLIGSSGLSRVVARLSSNSRINNNQYGTMQNLHSDCSRQLYVSLMLLYKTYG
polcloneL  ITRVSWPKFAVFNQLSITNLLSSNLSWLSLDVSAAFYHILPHPAAMPHELLIGSSGLSRVVARLSSNSRINNNQYGTMQNLHSDCSRQLYVSLMLLYKTYG
*****
Prim. cons.  ITRVSWPKFAVFNQLSITNLLSSNLSWLSLDVSAAFYHILPHPAAMPHELLIGSSGLSRVVARLSSNSRINNNQYGTMQNLHSDCSRQLYVSLMLLYKTYG

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
polwtgA    WKLHLYSHPIVIGFRKIPMGVGLSPFLMAQFTSAICSVVRRAFPCHLAFSYVDDVVLGAKSVQHREALYTAVTNFFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGY
polcloneB  WKLHLYSHPIVIGFRKIPMGVGLSPFLMAQFTSAICSVVRRAFPCHLAFSYVDDVVLGAKSVQHREALYTAVTNFFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGY
polcloneI  WKLHLYSHPIVIGFRKIPMGVGLSPFLMAQFTSAICSVVRRAFPCHLAFSYVDDVVLGAKSVQHREALYTAVTNFFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGY
polcloneL  WKLHLYSHPIVIGFRKIPMGVGLSPFLMAQFTSAICSVVRRAFPCHLAFSYVDDVVLGAKSVQHREALYTAVTNFFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGY
*****
Prim. cons.  WKLHLYSHPIVIGFRKIPMGVGLSPFLMAQFTSAICSVVRRAFPCHLAFSYVDDVVLGAKSVQHREALYTAVTNFFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGY

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
polwtgA    IIGSWGTLPQDHIQKIKHCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQAKQAFTFSPPTYKAFLSKQYMNLYPVARQRPGLCQVF
polcloneB  IIGSWGTLPQDHIQKIKHCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQAKQAFTFSPPTYKAFLSKQYMNLYPVARQRPGLCQVF
polcloneI  IIGSWGTLPQDHIQKIKHCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQAKQAFTFSPPTYKAFLSKQYMNLYPVARQRPGLCQVF
polcloneL  IIGSWGTLPQDHIQKIKHCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQAKQAFTFSPPTYKAFLSKQYMNLYPVARQRPGLCQVF
*****
Prim. cons.  IIGSWGTLPQDHIQKIKHCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQAKQAFTFSPPTYKAFLSKQYMNLYPVARQRPGLCQVF

      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
polwtgA    ADATPTGWGLAIGHQRMRTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSAGKLGTDNSVLSRKYTSFPWLLGCTANWILRGTSFVYVPSALNPADDPSRGLGLS
polcloneB  ADATPTGWGLAIGHQRMRTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSAGKLGTDNSVLSRKYTSFPWLLGCTANWILRGTSFVYVPSALNPADDPSRGLGLS
polcloneI  ADATPTGWGLAIGHQRMRTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSAGKLGTDNSVLSRKYTSFPWLLGCTANWILRGTSFVYVPSALNPADDPSRGLGLS
polcloneL  ADATPTGWGLAIGHQRMRTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSAGKLGTDNSVLSRKYTSFPWLLGCTANWILRGTSFVYVPSALNPADDPSRGLGLS
*****
Prim. cons.  ADATPTGWGLAIGHQRMRTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSAGKLGTDNSVLSRKYTSFPWLLGCTANWILRGTSFVYVPSALNPADDPSRGLGLS

      810     820     830     840
polwtgA    RPLRLRPFQPTTGRTSLYAVSPVSHLPVVRVHFASPLHVAVRPP
polcloneB  RPLRLRPFQPTTGRTSLYAVSPVSHLPVVRVHFASPLHVAVRPP
polcloneI  RPLRLRPFQPTTGRTSLYAVSPVSHLPVVRVHFASPLHVAVRPP
polcloneL  RPLRLRPFQPTTGRTSLYAVSPVSHLPVVRVHFASPLHVAVRPP
*****
Prim. cons.  RPLRLRPFQPTTGRTSLYAVSPVSHLPVVRVHFASPLHVAVRPP

```

Etude 2

In vivo interplays between hepatitis B virus replication and intrahepatic host innate immune response

Fanny Lebossé, Barbara Testoni, Judith Fresquet, Floriana Fachetti, Enrico Galmozzi, **Maëlen Fournier**, Pascale Berthillon, David Durantel, Pietro Lampertico and Fabien Zoulim

En préparation

Objectifs de l'étude 2

Dans le monde, plus de 240 millions d'individus présentent une infection chronique à HBV et sont ainsi exposés à des risques de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire.

Les traitements actuels contre l'hépatite B chronique sont essentiellement des analogues de nucléos(t)ides qui agissent sur la polymérase virale. Cependant, lors de l'arrêt du traitement, un rebond viral peut apparaître à cause de la persistance de l'ADNccc dans les cellules infectées. HBV est par ailleurs capable de s'intégrer dans le génome de l'hôte, renforçant ainsi le réservoir viral intracellulaire.

Les différents stades de l'hépatite B chronique sont dépendants de l'interaction entre la réplication virale et la réponse immunitaire antivirale de l'hôte (Lok and McMahon, 2007). Ces stades se caractérisent par des risques évolutifs différents, rendant nécessaire l'identification de marqueurs sériques pour les différencier et adapter les stratégies thérapeutiques.

Actuellement, la charge virale et le taux sérique de l'antigène HBs ont montré leur utilité pour prédire la réactivation du HBV chez les patients négatifs pour l'antigène HBe (Chan et al., 2011; Martinot-Peignoux et al., 2013). Ces marqueurs sont aussi préconisés pour le suivi de la réponse au traitement antiviral chez l'ensemble des patients (Moucari and Marcellin, 2010). Le lien entre charge virale, taux d'antigène HBs sériques et marqueurs de réplication intrahépatique est controversé. L'influence de la réponse immunitaire innée intrahépatique de l'hôte sur ces mêmes marqueurs *in vivo* n'a pas été étudiée.

Le but de cette étude était de déterminer les liens entre la réplication virale et la réponse immunitaire de l'hôte chez des patients non traités avec une infection chronique à HBV afin de définir des marqueurs adaptés pour le suivi des patients et de leurs traitements.

***In vivo* interplays between hepatitis B virus replication and intrahepatic host innate immune response**

Short title: HBsAg, HBV replication and innate immunity

Fanny Lebossé^{1,2,3*}, Barbara Testoni^{1,3*}, Judith Fresquet^{1,3}, Floriana Fachetti⁴, Enrico Galmozzi⁴, Maëlenn Fournier^{1,3}, Pascale Berthillon¹, David Durantel^{1,3}, Pietro Lampertico⁴ and Fabien Zoulim^{1,2,3§}.

¹ INSERM U1052- Cancer Research Center of Lyon (CRCL), 69008 Lyon, France

² Department of Hepatology, Croix Rousse hospital, Hospices Civils de Lyon, France

³ University of Lyon, UMR_S1052, CRCL, 69008 Lyon, France

⁴ 1st Division of Gastroenterology, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

*these authors contributed equally to the work

§ **Corresponding author:**

Prof. Fabien Zoulim

INSERM U1052- CRCL

151 cours Albert Thomas,

69424 Lyon CEDEX 03

France

fabien.zoulim@inserm.fr

Phone number: (+33) 4 72 68 19 70

Fax number: (+33) 4 72 68 19 71

Grant support

IHU Opera – LabEx DevWeCan – IUF – Unrestricted grant from Roche

Abbreviations:

cccDNA: covalently closed circular DNA

CHB: chronic hepatitis B

DNMT3A: DNA methyltransferase 3A

HBV: hepatitis B virus

HBeAg: HBe antigen

HBsAg: HBs antigen

HCC: hepatocellular carcinoma

IFN: interferon

NUC: nucleos(t)ides analogues

PPP2R1A: protein phosphatase 2A

TLR: toll like receptor

Authors' contributions:

FL, BT: study concept and design; acquisition of data; analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; statistical analysis

JF, MF: acquisition of data

FF, EG, PB: technical and material support

DD, PL: critical revision of the manuscript for important intellectual content

FZ: study concept and design; study supervision; critical revision of the manuscript for important intellectual content; obtained funding

ABSTRACT

Background and Aims: Viral persistence is thought to be the result of the mechanism developed by HBV to evade host immune responses. A better understanding of the dynamic interplay between serum and intrahepatic viral replication markers and intrahepatic host immune responses is needed for a better definition of the pathobiology of chronic HBV (CHB) infections.

Patients and methods: A cohort of 144 untreated CHB patients (40 HBeAg-positive and 104 HBeAg-negative patients) was analyzed for serological and intrahepatic viral markers, histological scores and for intrahepatic expression profile of 23 genes including Interferon Stimulated Genes, Toll-Like Receptors and inflammatory cytokines.

Results: HBeAg-positive patients showed significantly higher viral markers compared to HBeAg-negative ones with respect to median values of HBsAg, VL, intrahepatic cccDNA and replicative activity. Quantification of HBV DNA S-fragment integrated into the host genome showed a significant correlation with HBsAg levels in HBeAg-negative patients ($R=0.50$; $p<0.0001$), suggesting that it might represent a non-negligible alternative source of HBsAg over cccDNA in these subjects. Intrahepatic gene expression profile revealed a strong impairment of innate immune response pathways in CHB patients compared to non-infected controls, independently from IL28B and IFNL4 polymorphisms. Multifactorial analysis followed by hierarchical clustering combining viral and immunological profiles clearly differentiated HBeAg-positive from HBeAg-negative individuals. Interestingly, the highest down regulation of innate response genes was associated with HBeAg-negative patients carrying high levels of HBsAg, HBV integration and replicative activity and upregulation of DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha (DNMT3A) expression.

Conclusions: Our results highlight a prominent role of HBsAg vs VL at the crossroad between intrahepatic viral activity and host innate immune responses *in vivo*, providing new insights in the understanding of HBV pathogenesis during CHB.

Keywords: cccDNA; HBsAg; HBV; HBV DNA integration; Innate Immune Response

INTRODUCTION

Three hundred and fifty million people are chronically infected with hepatitis B virus (HBV) worldwide¹. Chronic hepatitis B (CHB) is susceptible to evolve towards liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) and remains a major health problem, being responsible for over 0.5-1 million deaths per year². Viral persistence and relapse of viral activity after treatment cessation are mostly ascribed to the intrahepatic contingent of covalently closed circular DNA (cccDNA) which harnesses the cellular transcriptional machinery to produce viral RNAs³⁻⁵ and cannot be eradicated from infected cells by means of the currently available therapies⁶⁻⁸. Furthermore, recent evidences indicate that HBV genome is able to integrate into the host genome, possibly favoring oncogenesis by perturbing host cell mechanisms of surveillance⁹⁻¹¹. Emerging evidence is putting forward the concept that HBV may actively inhibit host immune responses to favor long-lasting infection. Indeed, there are several lines of evidence that HBV dampens immune responses by multiple mechanisms, among which the impairment of IFN α signaling^{12, 13}, HBx-dependent down-regulation of innate signaling proteins¹⁴ and induction of immune tolerance by neutralizing toll-like receptors (TLRs) activity or inducing immunosuppressive cytokines¹⁵. Depending on the interplay between viral replication and antiviral host immune response, CHB patients experience different stages of disease, marked by the turning point of HBeAg seroconversion, leading to a phase characterized by variable clinical conditions, ranging from inactive carrier (IC) status, to active chronic HBV infection condition, associated to cirrhosis development and worse long-term prognosis¹⁶.

Currently, there is an increasing research interest to identify surrogate markers to identify these clinical conditions and help managing available therapies. In this respect, quantification of serum HBs antigen (HBsAg) and viral load (VL) have been recently proposed to define inactive carriers and to predict viral reactivation^{17, 18, 19} and their levels mark the guidelines to manage the current antiviral therapies^{20, 21}. Nevertheless, the role of HBsAg and VL as surrogate markers of intrahepatic cccDNA activity is debated, especially for HBeAg-negative patients²²⁻²⁴. Indeed, different *in vivo* studies indicates that VL is strongly correlated to intrahepatic cccDNA and total HBV DNA content and viral replication in both HBeAg-positive and -negative patients, while HBsAg is correlated to liver HBV replication markers only in HBeAg-positive individuals²²⁻²⁴. These data suggest that the relationship between HBeAg and HBsAg titers and intrahepatic HBV replicative status is complicated and it is probably affected by host factors. Due to the lack of specific animal models and the poor

availability of human samples, no exhaustive information is available about the interaction between HBV and host immune response modulation *in vivo* during different phases of disease. Few studies of acute infection in transgenic mouse models^{25, 26}, chimpanzees²⁷ and woodchucks²⁸ have contributed to uncover immunological mechanisms involved in infection establishment and clearance, but the host-virus interaction during persistent infection are still ill defined. Indeed, only one study addressed this subject taking advantage of a woodchuck model of chronic infection²⁹ and no information is available from human CHB samples.

The aim of this study was to investigate the interplay between viral replication and innate immune response occurring in the liver of CHB patients, in order to gain insight into the pathogenesis of CHB and to identify key factors that could improve the management of patients. To this purpose, a well characterized cohort of 145 CHB not-treated patients has been analyzed for serum and intrahepatic viral markers, histological scores and intrahepatic host innate immune response, as well as for HBV integration into the host genome.

MATERIALS AND METHODS

Patients' Characteristics

144 patients (40 women and 104 men) chronically HBV infected and untreated patients with concomitant liver biopsy and serum samples, followed at the Hepatology Unit of the “Hospices Civils de Lyon” and at the Gastroenterology Unit of the “Ospedale Maggiore Policlinico” in Milan, were selected for the study.. Patients underwent needle liver biopsy for routine histology and a part of the sample was stored at -80°C. These samples were collected for research purposes after patient consent. All patients were negative for serological markers of hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis D virus (HDV) infections. Age ranged from 17 to 66 years (median 40.3 years) (Table 1). Non-infected controls were chosen among liver samples showing no signs of liver histological alteration stored at the Hepatology Unit of the “Hospices Civils de Lyon”.

Serological Analysis

Biochemical tests and serological tests for HBV, HCV and HDV were available in the hospital database and were performed with commercial immunoassays.

HBeAg status was determined by using Abbott Architect® HBeAg assay (Abbott Diagnostic, Chicago, IL, United States). Serum HBV DNA quantification was performed by quantitative PCR using Cobas® Ampliprep/Cobas® Taqman® HBV test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The detection limits were 20 IU/mL and $1.7 \cdot 10^8$ IU/mL. Serum HBsAg was quantified with Elecsys® HBsAg II kit / Cobas e411® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to manufacturer's instructions. The detection limits were between 0.05 UI/mL and 130 UI/mL.

Histological Analysis

Histological analyses were performed in the pathology laboratories of Hospices Civils de Lyon. Histological fibrosis and necroinflammatory activity were scored with the METAVIR classification³⁰. According to practice guidelines for HBV treatment², patients were divided into two groups for both activity and fibrosis : scores from 0 to 1 and scores above 1.

DNA and RNA Extraction from Liver Biopsies

DNA and RNA were extracted from human liver needle biopsies as described by Volz *et al.* (2007)²² and Pollicino *et al.* (2011)³¹: liver samples were first homogenized on ice using a TissueRuptor (Qiagen®, Hilden, Germany) in homogenization buffer (Tris HCl pH 8 50mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM), then divided in two pieces and processed for DNA and RNA

purification, respectively. After proteinase K digestion, DNA was isolated using MasterPure DNA Purification Kit (Epicentre®, by Illumina, Madison, United States). RNA was isolated according to the manufacturer's protocol (Nucleospin® Total RNA and Protein Isolation Kit, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Complementary DNA synthesis was performed using the SuperScript™ III first-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen by Life Technologies®, Carlsbad, United States). Quantity and integrity of the extracted DNA and RNA and synthesized cDNA was assessed by NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Quantification of HBV DNA in Liver Samples

Quantification was performed using the Light Cycler® 480 Real Time PCR System (Roche diagnostics, Mannheim, Germany) with primers and fluorescence hybridization probes specific for total HBV DNA or cccDNA (adapted from Werle-Lapostolle *et al.* (2004)⁸). Before cccDNA amplification, DNA was treated with Plasmid-safe DNase (Epicentre® by Illumina) to get rid of contaminating rcDNA. Serial dilutions of a plasmid containing an HBV monomer (pHBV-*EcoR1*) served as quantification standard. To normalize the number of viral copies per cell content, the number of cellular genomes was determined by using the β -globin gene kit (Roche Diagnostics). The range of quantification was comprised between $2 \cdot 10^{-2}$ and $2 \cdot 10^5$ copies/cell for both cccDNA and total HBV DNA assays. Patients' samples were independently analyzed in duplicate.

Quantification of Integrated HBV DNA

A method to assess integrated viral HBV DNA in human cells was developed and performed on 126 biopsies. The technique was adapted from the two-step PCR used in the quantification of foamy virus (HFV) integration by Delelis *et al.* (2005)³². Detailed procedure is described in Supplementary Material and Methods.

Gene Expression Analysis

A cDNA volume corresponding to 100ng of initial RNA was loaded in double on the Taqman® Low Density Arrays (TLDA, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) customized with 24 probes directed to 23 target genes and 18s probe as control. The TLDA were run on an AB 7900HT machine, according to manufacturer's instructions and real time PCR data were collected and analyzed through the SDS 2.3 and RQ Manager softwares (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The complete gene panel with amplification primers is described in Supplementary Table 1.

IL28B and IFN λ 4 SNPs genotyping

Genomic DNA was extracted from sera of patients using the MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Illumina) according to manufacturer's instructions and then analyzed for IL28B rs12979860 polymorphisms using the LightMix®Kit IL28B (40-0588-32, Roche) following manufacturers' recommendations.

Statistical Analysis

Comparison of HBeAg-positive and negative groups of patients was performed using SPSS Statistics 17.0 and the non-parametric Mann-Whitney U Test. Correlations were calculated with the Spearman's statistic, using R (R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>). Two-tailed P value was calculated for a risk threshold=0.05 and FDR corrected with the Holm's method. Multiple comparisons of TLDA gene expression between different groups of patients were calculated with R using the Two/K sample permutation test with Monte Carlo resampling approximation (FDR correction: Benjamini & Hochberg with a risk threshold=0.05). Principal Component and Multi Factorial Analysis are described in Supplementary Materials and Methods.

RESULTS

Patients' Characteristics

The study comprised 144 patients with CHB, 40 HBeAg-positive and 104 HBeAg-negative, not treated at the time of the liver biopsy (Table 1). HBeAg-positive patients were significantly younger and had higher viral load and HBsAg levels. Similarly, intrahepatic viral markers were significantly more elevated in HBeAg positive patients by comparison with the HBeAg-negative group (median of 4.6 copies of cccDNA/cell vs 0.15 copies/cell; 1.7×10^3 copies/cell of intrahepatic total HBV DNA vs 4.2 copies/cell). This was also true for cccDNA replicative activity, calculated as the amount of HBV replicative intermediates divided for the amount of cccDNA per cell. ALT levels were also significantly higher in HBeAg-positive group (Table 1). Most of the patients presented fibrosis and necroinflammatory activity scores between 0 and 1 (79/144 and 96/144, respectively), and only Activity score distribution was significantly different between HBeAg-positive and -negative groups (Table 1). Individuals with histological fibrosis and necroinflammatory activity scores between 0 and 1 were younger than patients with scores above 1 and presented overall lower levels of both serum and intrahepatic viral markers except for HBsAg levels, which did not show any significant differences according to fibrosis or necroinflammatory histological scores (Supplementary Table 1).

Correlation between Serological and Intrahepatic HBV Replication Markers according to HBeAg status

In accordance with previous publications (Thompson et al., 2010a; Volz et al., 2007a), we found a strong correlation between serum viral load and total intrahepatic HBV DNA content in the overall cohort ($R=0.80$; $p<0.0001$), and both in the HBeAg-positive ($R=0.54$; $p<0.0001$) and HBeAg-negative ($R=0.62$; $p<0.0001$) subgroups (Figure 1 A). cccDNA amount and its replicative activity were also positively correlated to serum HBV DNA in the entire cohort ($R=0.62$; $p<0.0001$ and $R=0.52$; $p<0.0001$, respectively). the positive correlation between cccDNA replicative activity and serum viral load was maintained, though at lower levels, in both HBeAg subgroups ($R=0.34$; $p=0.03$ for HBeAg-positive patients and $R=0.31$; $p=0.004$ for HBeAg-negative ones). By contrast, only HBeAg-negative patients showed a mild correlation between serum viral load and cccDNA amount (Figure 1B and C).

Correlation between HBsAg and HBV replication markers

Serum HBsAg levels were significantly correlated to serum viral load in the overall cohort ($R=0.51$; $p<0.0001$), HBeAg-positive patients contributing substantially to this relationship ($R=0.59$; $p=0.0001$). Conversely, this correlation was much weaker in the HBeAg-negative group ($R=0.23$; $p=0.02$) (Figure 2 A). Among intrahepatic viral markers, only the levels of total intrahepatic HBV DNA showed a significant correlation to serum HBsAg in the overall cohort ($R=0.46$; $p<0.0001$) (Figure 2 B). Regarding HBeAg subgroups, we failed to find any meaningful correlations between any of the intrahepatic viral markers and HBsAg serum levels (Figure 2 B - D).

Analysis of HBV genome Integration

The observation that high HBsAg levels can be maintained despite low HBV-replication markers was compatible with the possibility of an alternative source of HBsAg production in addition to cccDNA. To investigate if the occurrence of HBV genome integration in the host genome could contribute to HBsAg serum levels, we developed a method for measuring the number of S-open reading frame (ORF) integration events/cell in our liver samples. The technique was based on a two-step PCR described in Material and Methods. Samples from 125 patients (37 HBeAg-positive and 88 HBeAg-negative patients) were suitable to be analyzed for HBV genome integration. The frequency of patients presenting viral genome integration did not differ significantly between HBeAg-positive (87%) and HBeAg-negative (78%) but HBeAg-positive subjects showed a higher number of copies of integrated HBV DNA/cell than HBeAg-negative ones (median value of 0.41 (0.01-1.28) and 0.01 (0.001-0.08), respectively, $p<0.0001$) (Figure 3 A). Nevertheless, the number of copies integrated HBV DNA showed a positive correlation with HBsAg levels only in the HBeAg-negative subgroup ($R=0.50$; $p<0.0001$) (Figure 3 B). The correlation between serum viral load and integrated HBV DNA was statistically significant in the overall cohort ($R=0.44$; $p<0.0001$) but it was not conserved in HBeAg subgroups (Figure 3 C).

Intrahepatic Gene Expression Analysis

To investigate the impact of chronic HBV infection on the host response, we analyzed the expression of 23 selected genes in 111 CHB patients (34 HBeAg-positive and 77 HBeAg-negative) and in 9 non-infected controls. The choice of the targets' panel comprised genes involved in the regulation of innate/adaptive immunity and inflammation (TAP1, DDX58, MYD88, TLR2, 3, 4, 7 and 9, IL1B, IL6, IL10, CXCL10), in type-I IFN pathway (IRF7,

IRF9, ISG15, ISG20, MX1, OAS1, PIAS1, USP18, PPP2R1A) and in the regulation of HBV replication (DNMT3A, NR1H4). The Heat Map in Figure 4 depicts the log values of gene expression in CHB patients and non-infected controls. The large majority of the analyzed genes were down-regulated in CHB patients with respect to controls. Two/K Permutation test results are summarized in Supplementary Table 2: only TLR9 did not show any significant differences in its expression between the two groups. Interestingly, two genes, DNMT3A and PPP2R1A displayed an opposite behavior, being up-regulated in CHB patients with respect to controls (Figure 4 and Supplementary Table 2). The analysis of the extent of gene repression in HBeAg subgroups showed a stronger down regulation of CXCL10, IL10, IL6, ISG15, OAS1 and TLR3 for HBeAg-negative patients in comparison to HBeAg-positive ones (Supplementary Table 3). No individual gene expression variation showed any significant correlation with HBV intrahepatic and serological replication markers, histological scores of fibrosis and inflammation or ALT values (data not shown). As a consequence of the homogeneity of gene repression, the attempt to discriminate CHB patients according to the modulation of intrahepatic gene expression was unsuccessful. Indeed, as shown in Supplementary Figure 2, Principal Component Analysis (PCA) well distinguished non-infected controls from CHB patients, confirming the overall gene expression alteration triggered by chronic infection, but failed to identify any subgroups among infected patients.

Influence of HBV and host IFNL3 and IFNL4 genotypes on viral markers and intrahepatic gene expression

Viral genotypes were available for only 67/144 patients. As expected from the epidemiological background of our cohort, most of the patients were infected with HBV genotype A or D (respectively 17 and 37 patients), 11 were infected with genotype C and E, and only a few were infected with genotype B or F (4 and 2 cases, respectively). Viral genotype is not influencing any of the HBV replication markers, with the exception of cccDNA and HBsAg. cccDNA amount is higher for genotype A, B, C and F in opposition to D and E ($p=0.043$). HBsAg levels were significantly higher for genotype A and D (respectively median value of $2 \cdot 10^4$ and $1.5 \cdot 10^4$ IU/mL, $p=0.015$) versus the other genotypes. IL28B rs12979860 polymorphism was available for 133 patients: 56 were CC, 61 were CT and 16 were TT. Data for IFNL4 rs469415590 SNPs were obtained for 115 patients: 17 were $\Delta G/\Delta G$, 50 were $\Delta G/TT$ and 48 were TT/TT . No significant association was found between IL28B or IFNL4 polymorphisms and both serum and intrahepatic viral markers; the same was

true for intrahepatic immune gene expression. Gene expression profiling did not differ according to neither HBV, nor host IL28B and IFNL4 genotypes (data not shown).

Integration of Gene Expression, Virological and Histological Data

In an attempt to better understand the interplay between viral replication and host immune responses in our cohort of patients, a Multifactorial analysis (MFA) was performed to integrate viral markers and host immune system regulation. To this purpose, all virological and serological variables were taken into account together with histological scores and gene expression data derived from the TLDAAs (Supplementary Figure 3A). A subsequent Hierarchical Clustering based on the first 5 factors of the MFA (see Supplementary Materials and Methods for details) allowed us to divide our cohort into 4 different groups (Supplementary Figure 3B). The patients belonging to each cluster are gathered together by a specific combination of the analyzed variables. Each group is described by variables that show values significantly different from their respective median values in the overall cohort. Supplementary Figure 4 summarizes the virological and histological characteristics of each cluster.

Three groups were composed of a large majority of HBeAg-negative patients (Cluster#1, 2, 3) and one included mainly HBeAg-positive ones (Cluster#4; Supplementary Figure 4).

Among the clusters built of HBeAg-negative patients, cluster #1 and cluster #2 comprised a majority of individuals with mild histological scores of necroinflammatory activity and fibrosis (Supplementary Figure 4). Regarding the virological characteristics, the first group showed overall lower values of HBsAg, viral load, cccDNA, intrahepatic total HBV DNA and replicative activity with respect to the median of the entire cohort. The second group showed a specific increase only in HBsAg levels and integrated HBV DNA copies. The third cluster of HBeAg-negative patients (Cluster#3) was enriched in patients presenting more severe inflammatory activity and fibrosis. In this group, the HBV replicative activity was significantly higher with respect to the median of the entire cohort. As expected, the last cluster, which was composed of a majority of HBeAg-positive patients, showed the highest levels of viral markers (Supplementary Figure 4).

To evaluate the gene expression profile associated at each cluster, we built a Heat Map depicting the median values of gene expression for each cluster (Figure 5A). Interestingly, Cluster#2 appeared to be characterized by the highest inhibition of gene expression. At the same time, it presented the highest levels of DNMT3A expression induction. This cluster distinguished itself from the similar Cluster#1 for significant higher values of HBsAg

($p < 0.001$), integrated HBV ($p < 0.001$), replicative activity ($p < 0.001$) and intrahepatic total HBV DNA ($p = 0.02$). Figure 5B describes genes belonging to Cluster#2 showing statistically significant different expression values from the median of the cohort. In addition to DNMT3A, genes significantly modulated in Cluster#2 belong to type I IFN (IRF7, IRF9, ISG15, ISG20, OAS1), immunity/inflammation (CXCL10, IL6, IL10, TLR3, TLR7, TAP1) and HBV replication (NR1H4) pathways.

DISCUSSION

In the recent years, there was a regain of interest in the quantification of serum HBsAg as diagnostic marker or as a predictive tool of treatment response. In the perspective of developing new antiviral treatments for CHB, the ideal end-point is HBsAg loss, because it is associated with a functional cure of the disease³³. Quantification of HBsAg has revealed its crucial role in distinguishing CHB stages and managing antiviral therapies, especially in HBeAg-negative patients^{17, 18, 20, 21}. Indeed, single-point HBsAg quantification significantly distinguishes ICs from “active carriers” (i.e. prone to virus reactivation) and, if combined to serum HBV DNA quantification, represents the most accurate tool to predict ICs^{17, 18}. Nevertheless, how HBsAg relates to intrahepatic viral markers, and especially viral cccDNA, and host factors is still a matter of debate.

In this study we combined virological and immunological analysis on a large cohort of CHB untreated patients to investigate the relationships between serum viral markers, viral intrahepatic replication and host innate immune modulation. In agreement with previous works, our results confirm that HBeAg-positive patients present overall higher levels of viral replicative markers, both in the serum and the liver compartment^{22, 23, 34} and that HBsAg levels are not correlated with markers of HBV replication in HBeAg-negative patients^{23, 24, 34}, suggesting a disconnection between HBsAg production and HBV replication in HBeAg-negative patients. The lack of powerful correlation between HBsAg and viral replication in HBeAg-negative patients suggests that other factors influencing HBsAg production/secretion could be involved. The occurrence of HBV DNA integration in the host genome could partially account for the maintenance of HBsAg production in the absence of high HBV replication. The multi-step qPCR method we developed to quantify the number of HBV S-ORF integration events/cell provides evidence that the extent of HBV DNA integration, while not influencing viral replication levels, is correlated to HBsAg levels, but only in the HBeAg-negative patients group. This result was not due to a difference in the integration frequency between HBeAg subgroups, which was not significant. In addition, the number of integration events/cell was, unexpectedly, higher in HBeAg-positive patients respect to HBeAg-negative ones. At least two hypotheses could contribute to explain the HBeAg-negative specificity of the correlation between integrated HBV DNA and HBsAg: i) cccDNA transcriptional activity is high in HBeAg-positive patients and masks the contribution of integrated HBV DNA; ii) epigenetic regulation involving both cccDNA and the host genome, including integrated S-ORF, could differ between HBeAg-positive and –negative patients and between cccDNA and

integrated sequences. Further investigation is required to determine if viral components, cytokines or intracellular factors, notably belonging to innate immunity pathway, may affect the transcriptional regulation of whole HBV genome vs HBsAg transcripts.

The host immune response regulation *in vivo*, during CHB remains an understudied issue. Growing body of evidence suggests that HBV may inhibit innate immune responses by affecting several sensors/effectors pathways both *in vitro* and *ex vivo*, probably dampening the onset of an efficacious adaptive immune response, required for infection long-lasting control and clearance (reviewed in Revill et al.¹², Bertoletti et al.¹⁵). The poor availability of CHB patients' samples and the lack of suitable animal models mimicking chronic infection limit the investigation of HBV/host immune response interactions *in vivo*. Using an HBV transgenic model, Wu et al. demonstrated that HBV is able to suppress TLR3 and TLR4-triggered immune response³⁶, and a couple of studies on CHB patients confirmed the HBV-associated down-regulation of TLRs in liver cells^{37, 38}. Conversely, recent findings in a model of persistent woodchuck hepatitis virus (WHV) infection show a general up-regulation of TypeI/II IFN responses²⁹. This difference could be likely explained by the complexity of HBV-induced modulation of host immune responses, which makes the experimental model, timing and type of analysis major variables in results interpretations.

Interestingly, our expression analysis showed a global impairment of genes implicated in type-1 IFN pathway, innate/adaptive immune response and inflammation in CHB patients vs non-infected controls, irrespectively of HBeAg status, suggesting that the persistence of HBV infection strongly affects the host immune response. Different groups reported the capacity of different HBV components to inhibit some of the genes involved in immune regulation included in our analysis: DDX58¹⁴, TLR2³⁹, TAP1 and OAS1⁴⁰ and MYD88⁴¹ and several evidences exist showing that the expression and function of several TLRs is impaired in the peripheral blood cells of CHB patients compared to non-infected controls^{39, 42}. Interestingly, two genes appear to be up-regulated in our cohort of CHB patients, the protein phosphatase 2A (PPP2R1A or PP2A) and the DNA methyl-transferase 3A (DNMT3A). PPP2R1A has been demonstrated to be involved in the impairment of type-1 IFN response pathway by down-regulating protein arginine methyl-transferase 1 (PRMT1), which is required for the full activation of STAT1¹³ and to be linked to HCC risk⁴³. DNMT3A is specifically responsible for DNA *de novo* methylation and its expression has been previously shown to be increased in hepatoma cell lines transfected with HBx expressing plasmids or infected with HBV, and in specimens derived from HBV-associated HCCs⁴⁴⁻⁴⁶. DNMT3A is able to methylate, and thus silence, both host and viral DNA, playing a dual role: a host protecting one, diminishing viral

gene, but also a potentially harmful effect by down-regulating host CpG islands associated to tumor suppressor genes and/or immune-regulatory genes⁴⁴.

The gene expression profiling we obtained for CHB patients clearly indicated that host immune modulation was not dependent on a predominant viral marker/component, therefore we performed an extensive analysis of the relationships between gene expression and viral and biochemical markers. The MFA coupled to HC allowed for integrating these distinct factors in a comprehensive manner to finally identify 4 groups of patients according to their viral, biochemical and expression profiling features. This analysis showed a complex interplay between HBV infection and innate immunity, in particular concerning HBeAg-negative patients, which scattered into 3 different clusters. In Cluster#2, corresponding to HBeAg-negative individuals with high values of HBsAg, integrated HBV events, replicative activity and intrahepatic total HBV DNA, the transcriptional levels of cytokines and interleukins (CXCL10, IL6, IL10), and genes belonging to type I-IFN response (IRF7/9, ISG15/20 and OAS1) and Toll-like receptors (TLR3 and 7) were repressed with a higher magnitude respect to the median of the overall cohort of patients. Conversely, DNMT3A reaches its highest expression levels in this cluster, probably suggesting that HBV could hijack its activity to maintain low levels of both viral gene and host immune genes expression. Notably, we demonstrated a completely different immune gene scenario between HBeAg-positive and HBeAg-negative patients. Interestingly, we showed that the strongest impairment of host immune response is not associated to highest viral replication, i.e. HBeAg-positive individuals, but to HBeAg-negative patients showing a combination of high HBsAg levels, cccDNA replicative activity and S-ORF HBV DNA integration in the host genome. These observations suggest that HBsAg levels are more associated to cccDNA replicative activity rather than to cccDNA amount/cell, that HBV DNA integration plays a significant role in determining HBsAg production and that inhibition of selected immune genes is associated to elevated levels of serum HBsAg but not serum viral load. Our results are further supported by scattered information about the role of isolated host immune genes in the outcome of CHB. Indeed, CXCL10 has been recently shown to be inversely correlated to HBsAg decrease during Entecavir treatment⁴⁷; low levels of IL6 are associated to viral reactivation⁴⁸ and down-regulation of TAP1 has been associated to HBV-immune tolerant status⁴⁹. TLR3 expression is found to be down-regulated in CHB patients and its restoration seems to be associated to favorable IFN therapy outcomes⁵⁰. TLR7 impairment suggests an additional mechanism triggered by HBV to impair type-I IFN production⁵⁰ and innate immunity and favor cccDNA transcription⁵¹. Despite the fact that high IL10 serum levels are correlated with

early, spontaneous HBeAg seroconversion⁵¹, recently, CHB has been associated to suppression of IL10+ regulatory T-cell responses (Park et al, AASLD 2013, abstract n°191). Interestingly, our data do not support a role for IFNL3 rs12979860 and/or IFNL4 rs469415590 SNPs in the relationship between viral replication and host innate immune response. At the light of recent data suggests that IL28B rs12979860 is correlated to HBsAg seroclearance following IFN therapy in HBeAg-negative, genotype D-infected CHB patients⁵², it would be extremely interesting to comprehensively investigate the HBV-host immune response during treatment follow-up.

Taken together, our results provide new insights into the interplay between HBsAg production, viral activity and host innate immune responses. Further and longitudinal analysis are required to assess if suppression of innate immunity in CHB patients is a reversible event and to confirm envisaged therapeutic targets for the development of sought immune modulating therapies.

Figure Legends

Figure 1: Correlation between viral load and intrahepatic viral markers according to HBeAg status. Correlation between viral load (IU/mL) and (A) intrahepatic total HBV DNA (copies/cell), (B) intrahepatic cccDNA (copies/cell), (C) intrahepatic replicative activity. Data were log transformed. Empty circles represent HBeAg-positive patients and full circles represent HBeAg-negative ones. Values in bold indicate Spearman's correlation for entire cohort, while dotted line refers to HBeAg-positive subgroup and full line refers to HBeAg-negative one, flanked by respective Spearman's statistic.

Figure 2: Correlation between HBsAg levels and intrahepatic viral markers according to HBeAg status. Correlation between HBsAg level (IU/mL) and (A) viral load (IU/mL), (B) intrahepatic total HBV DNA (copies/cell), (C) intrahepatic cccDNA (copies/cell) and (D) intrahepatic replicative activity. Data were log transformed. Empty circles represent HBeAg-positive patients and full circles represent HBeAg-negative ones. Values in bold indicate Spearman's correlation for entire cohort, while dotted line refers to HBeAg-positive subgroup and full line refers to HBeAg-negative one, flanked by respective Spearman's statistic.

Figure 3: Quantification of HBV S-ORF integration into the host genome and its correlation to VL and HBsAg. (A) Box plot representing the amount of HBV DNA integration into host genome (copies/cell). Correlation between integrated HBV S-ORF (copies/cell) and (B) HBsAg (IU/mL) and (C) viral load (IU/mL). Empty circles represent HBeAg-positive patients and full circles represent HBeAg-negative ones. Values in bold indicate Spearman's correlation for entire cohort, while dotted line refers to HBeAg-positive subgroup and full line refers to HBeAg-negative one, flanked by respective Spearman's statistic.

Figure 4: Heat map representing the intrahepatic expression of immunity genes CHB patients and non-infected controls. Each line represents one gene and each column represents one patient. Green color represents down-regulation, and red color represents up-regulation. Data are expressed in log scale. Arrows indicate the 2 genes up-regulated in CHB patients respect to non-infected controls (DNMT3A and PPP2R1A).

Figure 5: Gene expression profiling according to Hierarchical Clustering of patients. (A) Heat map representing intrahepatic median gene expression values (log scale) in the overall cohort (first column) and in each cluster determined by Hierarchical Clustering (cluster #1, #2, #3 and #4). (B) Relative expression of genes belonging to Cluster#2 showing statistically significant different expression values from the median of the cohort (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$).

Figure 1: Correlation between viral load and intrahepatic viral markers according to HBeAg status.

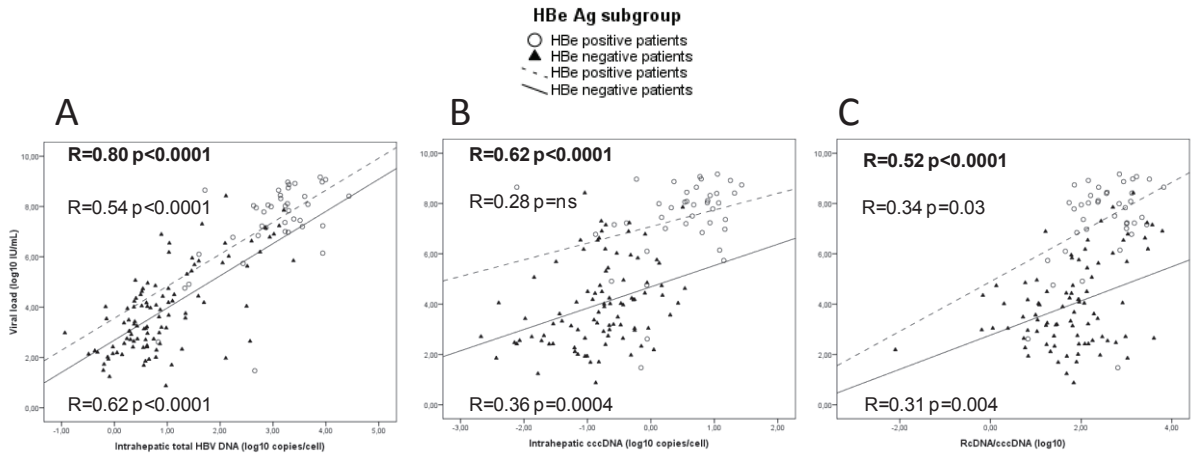


Figure 2: Correlation between HBsAg levels and intrahepatic viral markers according to HBeAg status.

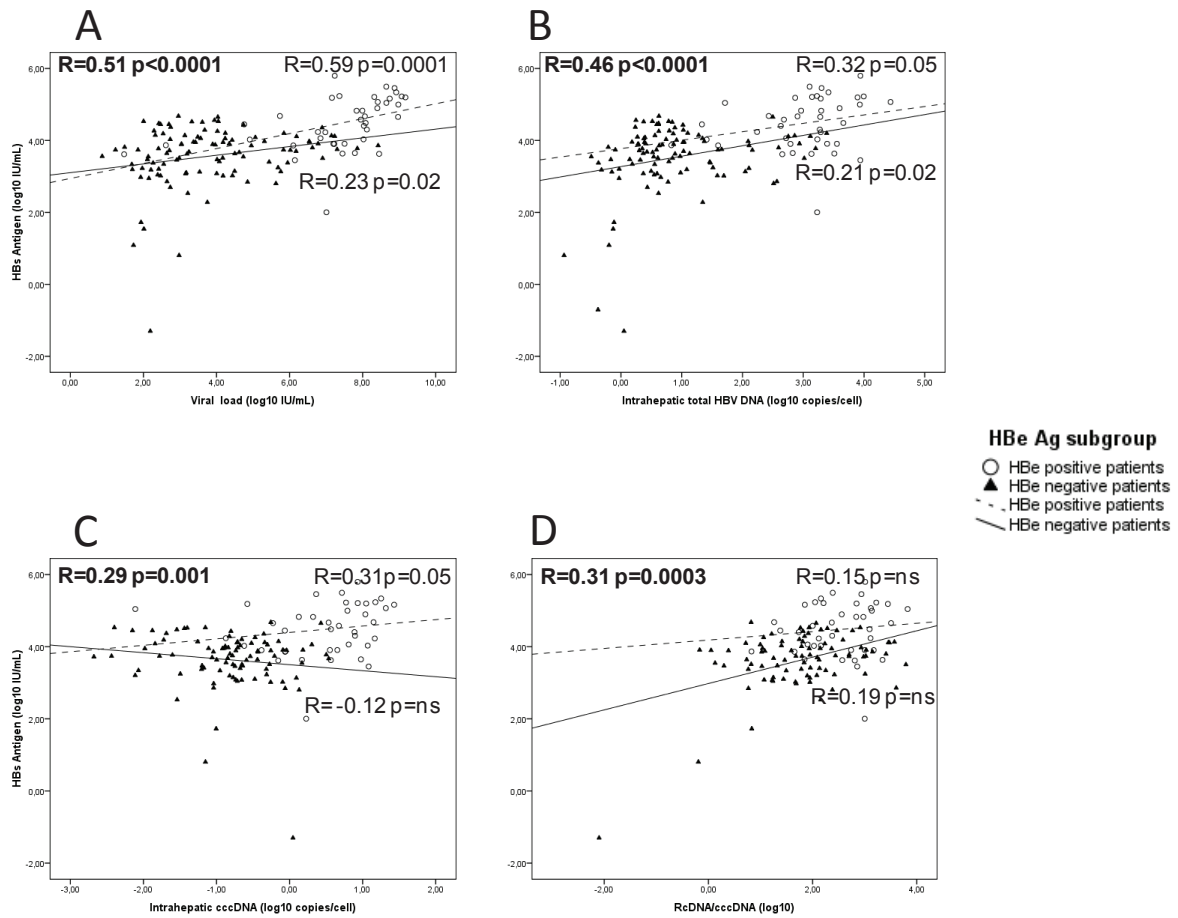


Figure 3: Quantification of HBV S-ORF integration into the host genome and its correlation to VL and HBsAg.

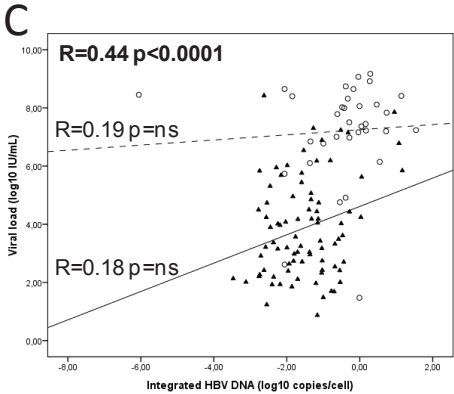
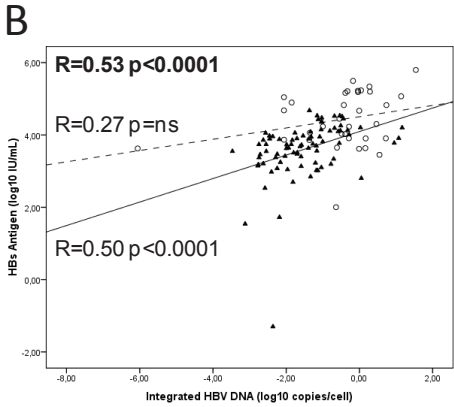
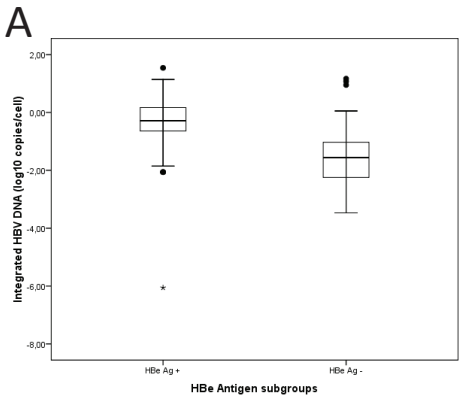


Figure 4: Heat map representing the intrahepatic expression of immunity genes CHB patients and non-infected controls.

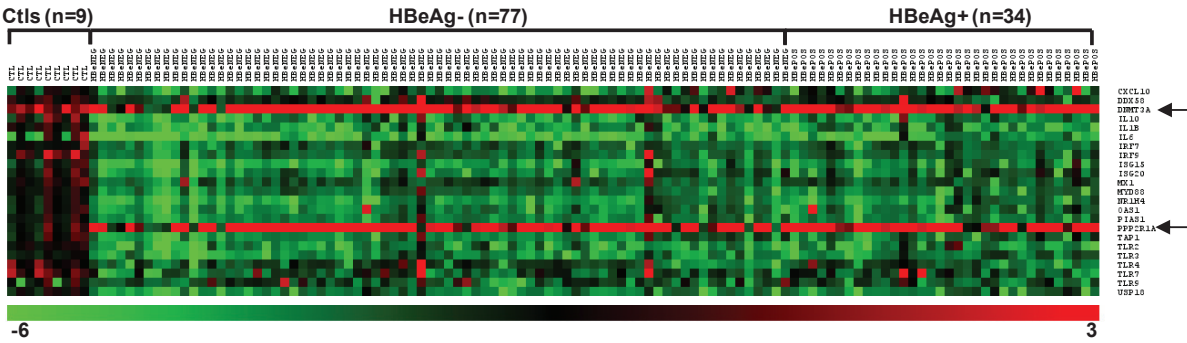
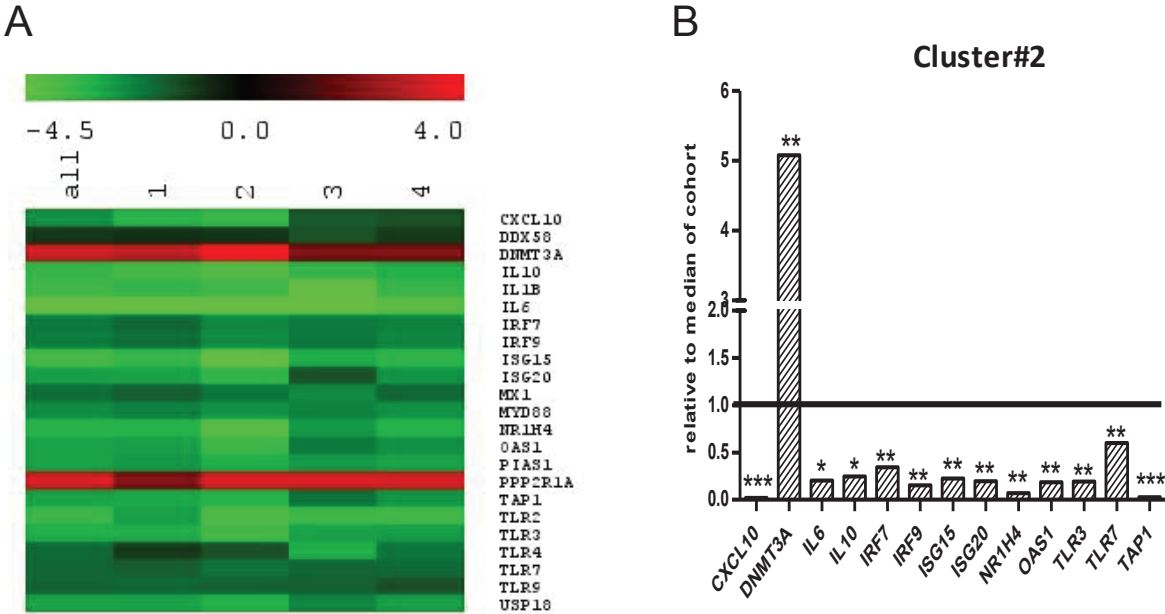
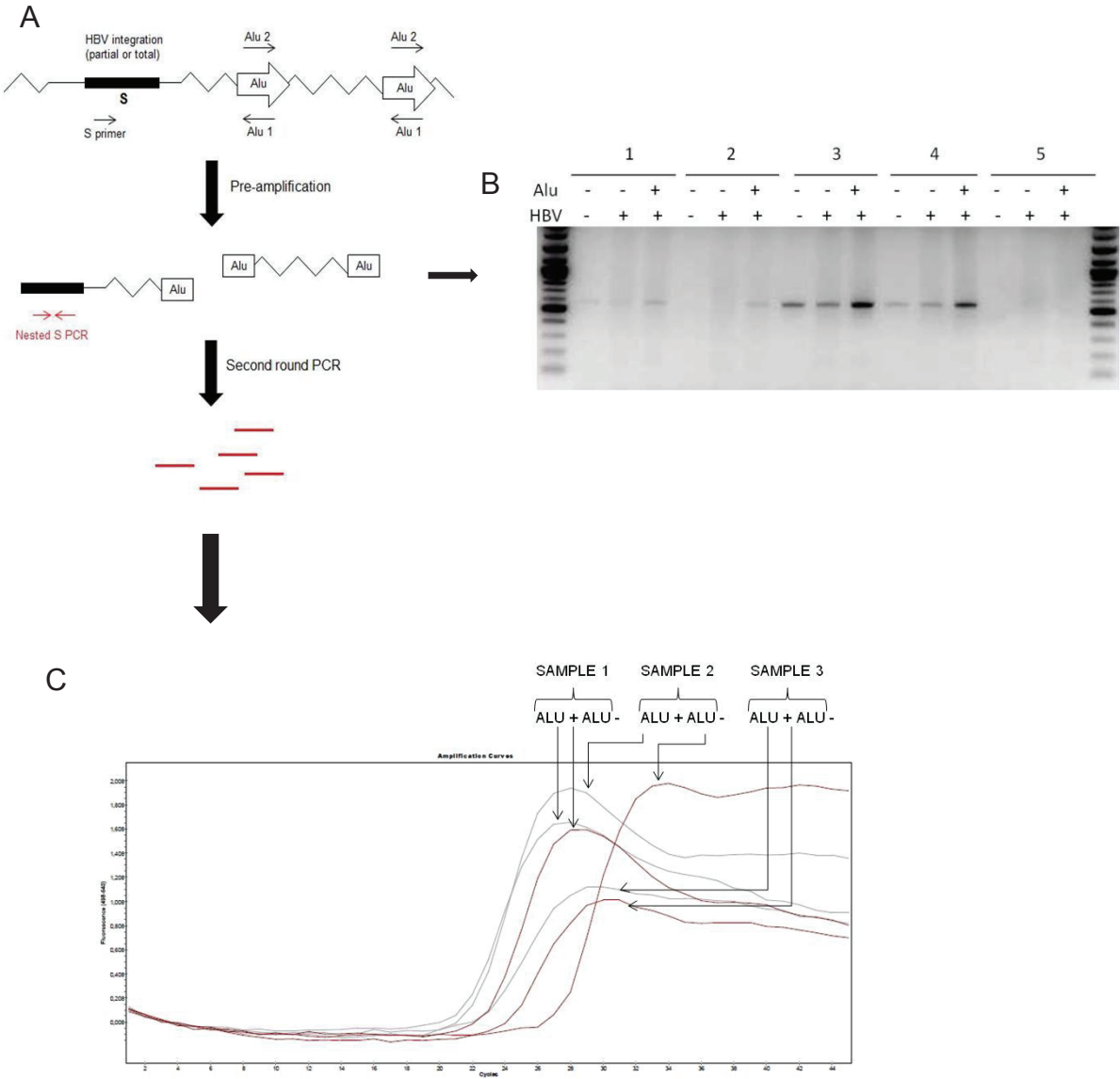


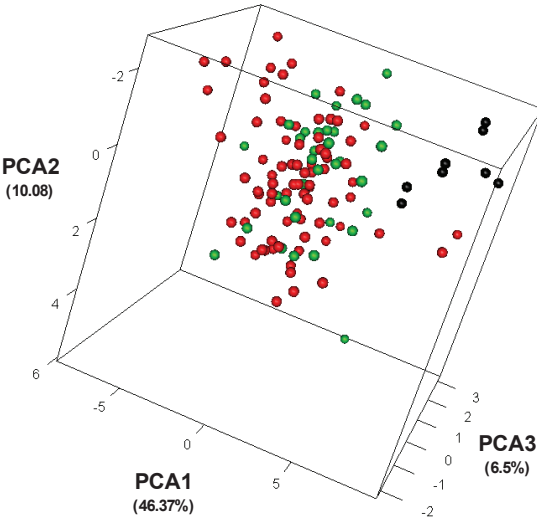
Figure 5: Gene expression profiling according to Hierarchical Clustering of patients.



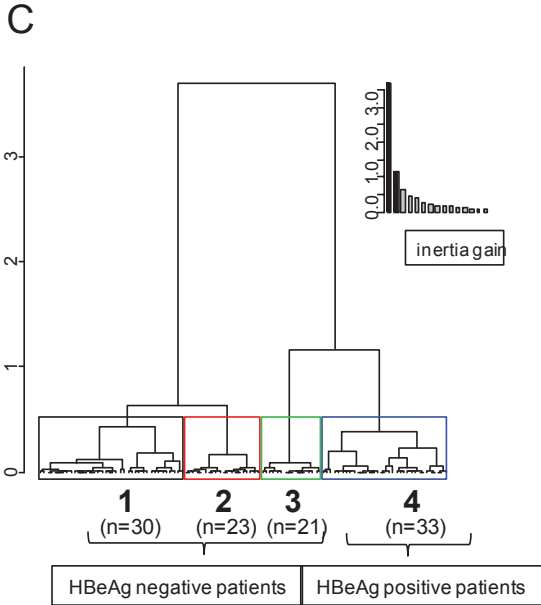
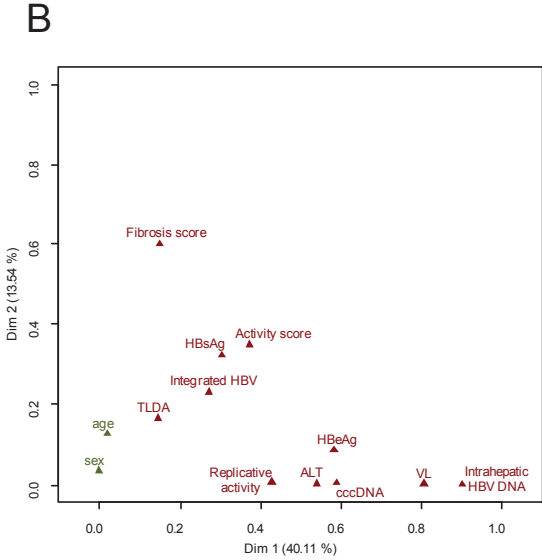
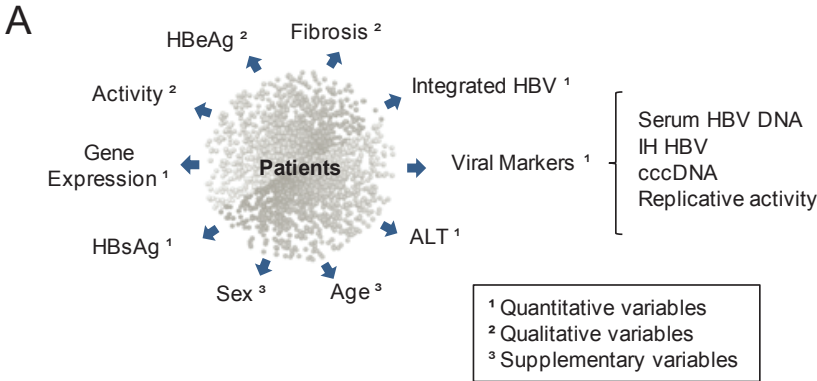
Supplementary figure 1: Method for quantification of HBV DNA integration into the host genome



Supplementary figure 2: Principal component analysis



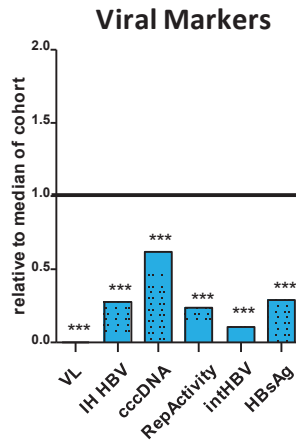
Supplementary figure 3: Multifactorial analysis



Supplementary figure 4: Virological and histological characteristics of patients belonging to each cluster

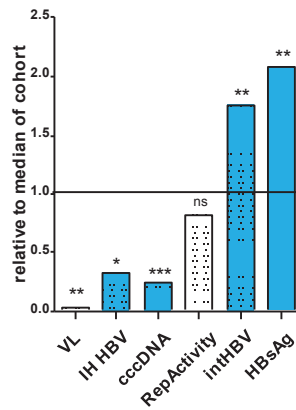
Cluster#1

HBeAg-neg	97%
Activity score <1	100%
Fibrosis score <1	77%
ALT<N	93%



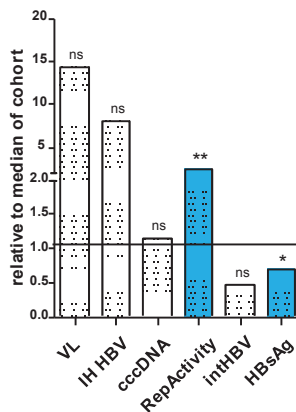
Cluster#2

HBeAg-neg	100%
Activity score <1	86%
Fibrosis score <1	81%
ALT<N	86%



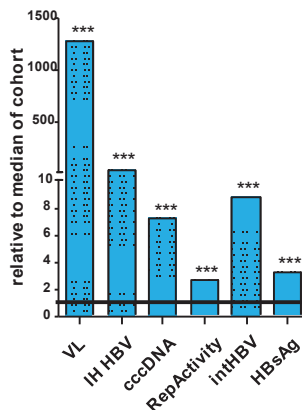
Cluster#3

HBeAg-neg	95%
Activity score <1	25%
Fibrosis score <1	0%
ALT<N	70%



Cluster#4

HBeAg-neg	14%
Activity score <1	50%
Fibrosis score <1	42%
ALT<N	47%



Supplementary table 1: Patients' demographics and clinical data according to fibrosis and activity scores

	Fibrosis 0-1	Fibrosis > 1	P-value¹	Activity 0-1	Activity > 1	P-value²
Age³ (years)	37 (28.7 - 45.6)	44 (30.3 - 52.3)	0.02	37 (29.1 - 46.2)	44.2 (34.9 - 52.3)	0.04
Serum markers						
ALT³ (IU/mL)	43 (28 - 67.5)	60 (43 - 108)	0.002	42 (28 - 66)	79 (47 - 194)	<0.0001
Viral load³ (IU/mL)	2.7x10 ³ (2.9x10 ² - 4.8x10 ⁵)	6.9x10 ⁵ (1.x10 ⁴ - 2.0x10 ⁷)	0.001	3.5x10 ³ (3.6x10 ² - 5.4x10 ⁵)	1.6x10 ⁶ (2.2x10 ⁴ - 7.1x10 ⁷)	<0.0001
HBs Ag³ (IU/mL)	8.9x10 ³ (1.8x10 ³ - 2.8x10 ⁴)	7.2x10 ³ (2.9x10 ³ - 1.4x10 ⁴)	ns	7.8x10 ³ (2.2x10 ³ - 2.3x10 ⁴)	9.4x10 ³ (4.1x10 ³ - 2.0x10 ⁴)	ns
Intrahepatic markers						
Total HBV DNA³ (copies/cell)	4.4 (1.9 - 32.6)	125.8 (7 - 1270.4)	<0.0001	5.2 (2.03 - 39.1)	451.7 (23.5 - 1677.8)	<0.0001
CccDNA³ (copies/cell)	0.15 (0.01 - 0.86)	0.52 (0.17 - 2.68)	0.0004	0.15 (0.02 - 0.84)	0.62 (0.2 - 3.68)	<0.0001
Replicative activity³ = replicatives intermediates/cccDNA	74.5 (18 - 372.4)	140.1 (49.5 - 786.2)	ns	78.9 (17.3 - 292.2)	161.9 (70.9 - 1000.6)	0.005

¹Mann-Whitney test between Fibrosis groups, alpha=0.05

²Mann-Whitney test between Activity groups, alpha=0.05

³Data are expressed as: Median (1st quartile-3rd quartile)

Supplementary table 2: TLDA gene expression values in CHB patients vs non-infected controls

	Non-infected		CHB		<i>P-Value</i> ²
	Median ¹	25th/75th centile ¹	Median ¹	25th/75th centile ¹	
CXCL10	-0.04	-0.48/0.21	-2.58	-3.94/-1.20	0.003
DDX58	0.36	-0.23/0.51	-1.02	-1.57/-0.52	<0.0001
DNMT3A	0.92	0.90/1.55	3.28	1.54/4.75	0.004
IL10	-0.42	-0.49/0.61	-3.47	-4.42/-2.60	<0.0001
IL1B	0.138	-0.06/0.33	-3.65	-5.13/-2.71	<0.0001
IL6	-0.15	-4.07/0.64	-5.12	-6.21/-3.71	0.001
IRF7	-0.16	-0.25/0.11	-2.15	-2.82/-1.60	<0.0001
IRF9	0.51	0.51/0.96	-2.02	-2.75/-1.78	<0.0001
ISG15	-0.21	-0.77/0.60	-3.77	-4.77/-2.73	<0.0001
ISG20	0.07	-0.42/0.36	-2.80	-3.71/-1.74	<0.0001
MX1	0.24	-0.14/0.69	-1.88	-2.59/-1.32	<0.0001
MYD88	-0.13	-0.43/0.2	-2.49	-3.3/-2.07	<0.0001
NR1H4	-0.25	-0.35/0.03	-3.35	-4.51/-2.65	<0.0001
OAS1	-0.019	-0.28/0.49	-2.90	-3.65/-1.98	<0.0001
PIAS1	-0.24	-0.57/0.09	-2.85	-3.58/-2.38	<0.0001
PPP2R1A	-0.05	-0.50/0.32	3.28	1.54/4.58	<0.0001
TAP1	0.00	-0.25/0.60	-2.92	-3.62/-2.06	<0.0001
TLR2	0.18	0.07/0.23	-3.49	-4.74/-2.32	<0.0001
TLR3	-0.38	-0.61/0.09	-3.24	-3.99/-2.43	<0.0001
TLR4	0.10	0.01/0.40	-1.83	-2.92/-0.97	<0.0001
TLR7	0.49	0.45/0.95	-1.77	-2.9/-0.76	<0.0001
TLR9	-0.57	-0.77/-0.15	-1.76	-2.62/-0.91	0.067
USP18	-0.13	-0.35/0.17	-2.92	-3.63/-2.22	<0.0001

¹Values are in Ln scale

²Mann-Whitney test with Monte Carlo approximation between CHB patients and Non-Infected controls, alpha=0.05

Supplementary table 3: TLDA gene expression values according to HBeAg status

	HBeAg-		HBeAg+		<i>P-Value</i> ²
	Median ¹	25th/75th centile ¹	Median ¹	25th/75th centile ¹	
CXCL10	-2.84	-4.07/-1.86	-1.28	-3.50/0.01	0.004
DDX58	-1.03	-1.56/0.48	-1.02	-1.64/-0.80	0.574
DNMT3A	3.27	1.21/4.83	3.35	1.76/4.34	0.740
IL10	-3.73	-4.60/-2.73	-3.10	-3.77/-2.08	0.016
IL1B	-3.70	-5.23/-2.80	-3.37	-4.99/-2.39	0.426
IL6	-5.52	-6.21/4.13	-4.20	-5.38/-2.96	0.005
IRF7	-2.17	-2.80/-1.57	-2.11	-2.82/-1.62	0.760
IRF9	-2.19	-2.83/-1.79	-2.30	-2.58/-1.74	0.718
ISG15	-4.02	-4.96/-3.15	-2.98	-4.18/-1.92	0.014
ISG20	-2.85	-3.91/-2.08	-2.21	-3.36/-1.09	0.076
MX1	-1.92	-2.67/-1.35	-1.80	-2.27/-1.25	0.406
MYD88	-2.51	-3.30/-2.07	-2.45	-3.36/-2.23	0.881
NR1H4	-3.58	-4.60/-2.90	-2.86	-3.99/-2.37	0.051
OAS1	-3.08	-3.65/-2.26	-2.40	-3.32/-1.63	0.044
PIAS1	-2.85	-3.58/-2.44	-2.68	-3.59/-2.35	0.718
PPP2R1A	3.28	1.46/4.70	3.34	1.63/4.09	0.882
TAP1	-3.02	-3.65/-2.63	-2.39	-3.41/-1.82	0.115
TLR2	-3.56	-4.77/-2.59	-3.13	-4.47/-2.28	0.465
TLR3	-3.54	-4.33/-2.49	-2.66	-3.38/-1.86	0.002
TLR4	-1.73	-2.92/-0.95	-1.94	-2.88/-1.39	0.490
TLR7	-1.77	-3.03/-0.88	-1.76	-2.55/-0.51	0.343
TLR9	-1.74	-2.54/-0.79	-1.90	-2.64/-1.09	0.473
USP18	-2.98	-3.70/-2.36	-2.53	-3.36/-1.99	0.155

¹Values are in Ln scale

²Mann-Whitney test with Monte Carlo approximation HBeAg groups, alpha=0.05

REFERENCES

1. Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiologic reviews* 2006;28:112-25.
2. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology* 2012;57:167-85.
3. Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *Journal of virology* 1995;69:3350-7.
4. Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, Levrero M. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* 2006;130:823-37.
5. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology* 2009;51:581-92.
6. Delmas J, Schorr O, Jamard C, Gibbs C, Trepo C, Hantz O, Zoulim F. Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus-infected hepatocytes in vivo and in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2002;46:425-33.
7. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009;137:1593-608 e1-2.
8. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WEt, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004;126:1750-8.
9. Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 2004;127:S56-61.
10. Bonilla Guerrero R, Roberts LR. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 2005;42:760-77.
11. Pollicino T, Saitta C, Raimondo G. Hepatocellular carcinoma: the point of view of the hepatitis B virus. *Carcinogenesis* 2011;32:1122-32.
12. Revill P, Yuan Z. New insights into how HBV manipulates the innate immune response to establish acute and persistent infection. *Antiviral therapy* 2013;18:1-15.
13. Christen V, Duong F, Bernsmeier C, Sun D, Nassal M, Heim MH. Inhibition of alpha interferon signaling by hepatitis B virus. *Journal of virology* 2007;81:159-65.
14. Wei C, Ni C, Song T, Liu Y, Yang X, Zheng Z, Jia Y, Yuan Y, Guan K, Xu Y, Cheng X, Zhang Y, Wang Y, Wen C, Wu Q, Shi W, Zhong H. The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. *Journal of immunology* 2010;185:1158-68.
15. Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut* 2012;61:1754-64.
16. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507-39.
17. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Moriconi F, Ciccorossi P, Coco B, Romagnoli V, Cherubini B, Moscato G, Maina AM, Cavallone D, Bonino F. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 2010;139:483-90.
18. Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Laouenan C, Lada O, Netto-Cardoso AC, Boyer N, Ripault MP, Carvalho-Filho R, Asselah T, Marcellin P. Prediction of disease reactivation in asymptomatic hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients using baseline serum measurements of HBsAg and HBV-DNA. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2013;58:401-7.
19. Iloeje UH, Yang HI, Chen CJ. Natural history of chronic hepatitis B: what exactly has REVEAL revealed? *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2012;32:1333-41.
20. Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M, Piratvisuth T, Cornberg M, Brunetto MR, Tillmann HL, Kao JH, Jia JD, Wedemeyer H, Locarnini S, Janssen HL, Marcellin P. Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report. *Journal of hepatology* 2011;55:1121-31.
21. Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, Ripault MP, Castelnau C, Martinot-Peignoux M, Dauvergne A, Asselah T, Boyer N, Bedossa P, Valla D, Vidaud M, Nicolas-Chanoine MH, Marcellin P. Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology* 2009;49:1151-7.

22. Volz T, Lutgehetmann M, Wachtler P, Jacob A, Quaas A, Murray JM, Dandri M, Petersen J. Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* 2007;133:843-52.
23. Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, Ayres A, Jackson K, Littlejohn M, Slavin J, Bowden S, Gane EJ, Abbott W, Lau GK, Lewin SR, Visvanathan K, Desmond PV, Locarnini SA. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. *Hepatology* 2010;51:1933-44.
24. Lin LY, Wong VW, Zhou HJ, Chan HY, Gui HL, Guo SM, Wang H, Huang L, Bao SS, Xie Q, Chan HL. Relationship between serum hepatitis B virus DNA and surface antigen with covalently closed circular DNA in HBeAg-negative patients. *Journal of medical virology* 2010;82:1494-500.
25. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:25-36.
26. McClary H, Koch R, Chisari FV, Guidotti LG. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *Journal of virology* 2000;74:2255-64.
27. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:6669-74.
28. Guy CS, Mulrooney-Cousins PM, Churchill ND, Michalak TI. Intrahepatic expression of genes affiliated with innate and adaptive immune responses immediately after invasion and during acute infection with woodchuck hepadnavirus. *Journal of virology* 2008;82:8579-91.
29. Fletcher SP, Chin DJ, Ji Y, Iniguez AL, Taillon B, Swinney DC, Ravindran P, Cheng DT, Bitter H, Lopatin U, Ma H, Klumpp K, Menne S. Transcriptomic analysis of the woodchuck model of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2012;56:820-30.
30. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-93.
31. Pollicino T, Raffa G, Santantonio T, Gaeta GB, Iannello G, Alibrandi A, Squadrito G, Cacciola I, Calvi C, Colucci G, Levrero M, Raimondo G. Replicative and transcriptional activities of hepatitis B virus in patients coinfecting with hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Journal of virology* 2011;85:432-9.
32. Delelis O, Brussel A, Sonigo P. Quantification of HFV-integrated DNA in human cells by Alu-LTR real-time PCR. *Methods in molecular biology* 2005;304:155-70.
33. Chen YC, Sheen IS, Chu CM, Liaw YF. Prognosis following spontaneous HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients with or without concurrent infection. *Gastroenterology* 2002;123:1084-9.
34. Manesis EK, Papatheodoridis GV, Tiniakos DG, Hadziyannis ES, Agelopoulos OP, Syminelaki T, Papaioannou C, Nastos T, Karayiannis P. Hepatitis B surface antigen: relation to hepatitis B replication parameters in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Journal of hepatology* 2011;55:61-8.
35. Bertoletti A, Maini MK, Ferrari C. The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antiviral therapy* 2010;15 Suppl 3:15-24.
36. Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Sowa JP, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 2009;49:1132-40.
37. Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, Rodgers S, Kurtovic J, Chang J, Lewin S, Desmond P, Locarnini S. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 2007;45:102-10.
38. Xie Q, Shen HC, Jia NN, Wang H, Lin LY, An BY, Gui HL, Guo SM, Cai W, Yu H, Guo Q, Bao S. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2009;11:515-23.
39. Chen Z, Cheng Y, Xu Y, Liao J, Zhang X, Hu Y, Zhang Q, Wang J, Zhang Z, Shen F, Yuan Z. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clinical immunology* 2008;128:400-8.
40. Lutgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, Allweiss L, Bockmann JH, Pollok JM, Lohse AW, Petersen J, Dandri M. Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon-alpha in chimeric mice. *Gastroenterology* 2011;140:2074-83, 2083 e1-2.
41. Wu M, Xu Y, Lin S, Zhang X, Xiang L, Yuan Z. Hepatitis B virus polymerase inhibits the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1. *The Journal of general virology* 2007;88:3260-9.
42. Xu N, Yao HP, Sun Z, Chen Z. Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma. *Acta pharmacologica Sinica* 2008;29:239-44.

43. Chen HF, Mai JR, Wan JX, Gao YF, Lin LN, Wang SZ, Chen YX, Zhang CZ, Zhang YJ, Xia B, Liao K, Lin YC, Lin ZN. Role of a novel functional variant in the PPP2R1A promoter on the regulation of PP2A-A α and the risk of hepatocellular carcinoma. *PloS one* 2013;8:e59574.
44. Vivekanandan P, Daniel HD, Kannangai R, Martinez-Murillo F, Torbenson M. Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA. *Journal of virology* 2010;84:4321-9.
45. Zhu YZ, Zhu R, Fan J, Pan Q, Li H, Chen Q, Zhu HG. Hepatitis B virus X protein induces hypermethylation of p16(INK4A) promoter via DNA methyltransferases in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Journal of viral hepatitis* 2010;17:98-107.
46. Park IY, Sohn BH, Yu E, Suh DJ, Chung YH, Lee JH, Surzycki SJ, Lee YI. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. *Gastroenterology* 2007;132:1476-94.
47. Papatheodoridis G, Goulis J, Manolakopoulos S, Margariti A, Exarchos X, Kokkonis G, Hadziyiannis E, Papaioannou C, Manesis E, Pectasides D, Akriviadis E. Changes of HBsAg and interferon-inducible protein 10 serum levels in naive HBeAg-negative chronic hepatitis B patients under 4-year entecavir therapy. *Journal of hepatology* 2013.
48. Pan CJ, Wu HL, Kuo SF, Kao JH, Tseng TC, Liu CH, Chen PJ, Liu CJ, Chen DS. Serum interleukin 6 level correlates with outcomes of acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Hepatology international* 2011.
49. Sukriti S, Pati NT, Bose S, Hissar SS, Sarin SK. Impaired antigen processing and presentation machinery is associated with immunotolerant state in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of clinical immunology* 2010;30:419-25.
50. Huang YW, Lin SC, Wei SC, Hu JT, Chang HY, Huang SH, Chen DS, Chen PJ, Hsu PN, Yang SS, Kao JH. Reduced Toll-like receptor 3 expression in chronic hepatitis B patients and its restoration by interferon therapy. *Antiviral therapy* 2013.
51. Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, Petersen J, Raimondo G, Dandri M, Levrero M. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:529-37.
52. Lampertico P, Vigano M, Cheroni C, Facchetti F, Invernizzi F, Valveri V, Soffredini R, Abrignani S, De Francesco R, Colombo M. IL28B polymorphisms predict interferon-related hepatitis B surface antigen seroclearance in genotype D hepatitis B e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2013;57:890-6.

Discussion de l'étude 2

L'hépatite B chronique est une maladie complexe composée de différentes phases. Le but idéal à atteindre lors d'un traitement contre le HBV est la disparition de l'antigène HBe (phase de clairance virale), et finalement la phase de portage inactif (phase inactive) ce qui implique un contrôle de la réplication du HBV par le système immunitaire de l'hôte. Selon les recommandations européennes et américaines, la différenciation entre les phases actives et inactives chez les patients négatifs pour l'antigène HBe (AgHBe-) est basée sur une mesure du taux sérique de l'ADN du HBV (charge virale) et des ALT. Néanmoins, la valeur de la charge virale permettant le classement de l'hépatite B en tant qu'inactive est controversée et dépend de la méthode utilisée pour la quantifier. De plus, à cause des variations observées chez un patient au cours du temps, ces mesures devraient être effectuées en séquentielles (Chan et al., 2011).

En outre, la charge virale et le taux d'antigène HBs sérique sont aussi utilisés pour décider le déclenchement d'un traitement antiviral (Chan et al., 2011; Moucari et al., 2009). Néanmoins leurs liens avec les marqueurs de réplication comme l'ADNccc sont encore débattus surtout chez les patients AgHBe- (Lin et al., 2010; Thompson et al., 2010b; Volz et al., 2007b).

Il est donc nécessaire de déterminer des marqueurs sériques reflétant la réplication virale intrahépatique pour le suivi de la maladie et l'adaptation des thérapies.

Cette étude effectuée sur une large cohorte de patients chroniquement infectés par HBV et non traités a mis en lumière les liens entre les marqueurs de la réplication du HBV et la réponse immunitaire innée de l'hôte.

Comme précédemment montré dans la littérature, le taux des marqueurs viraux est globalement plus élevé chez les patients AgHBe- que chez les patients positifs pour l'antigène HBe (AgHBe+) (Lin et al., 2010; Thompson et al., 2010b; Volz et al., 2007b).

Cependant aucune corrélation entre les marqueurs de réplication et le taux sérique d'AgHBs chez les patients AgHBe- n'a été établie. La production de l'antigène HBs ne semble donc pas liée à la réplication du virus suggérant la présence d'une autre source d'AgHBs. Or, l'ADN du HBV est connu pour s'intégrer dans le génome de l'hôte (Li et al., 2013).

Une méthode basée sur une qPCR en plusieurs étapes a mis en évidence que le nombre d'événements d'intégration par cellule de l'AgHBs était corrélé avec AgHBs sécrété chez les patients AgHBe- uniquement expliquant ainsi l'absence de lien entre AgHBs sécrété et les marqueurs de réplication du virus.

Etonnamment, les patients AgHBe+ possèdent plus de copies d'AgHBs intégré que les patients AgHBe-. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Il se peut que l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc qui est forte chez les patients AgHBe+ masque la contribution de l'AgHBs intégré ou bien que la régulation épigénétique de l'ADN de l'hôte et de l'ADNccc soit différente entre les patients AgHBe- et AgHBe+.

De plus, ce travail a permis de mettre en évidence le lien entre la réplication du virus et la réponse immunitaire de l'hôte.

La régulation de la réponse immunitaire de l'hôte *in vivo* durant une hépatite B chronique a peu été étudiée. En effet, il existe un manque de modèles animaux mimant une hépatite B chronique et peu de cohortes de patients infectés chroniquement par HBV sont disponibles.

L'analyse de l'expression des gènes a montré une diminution de la réponse immunitaire innée, adaptative, de l'inflammation et de la voie de l'interféron de type I indépendamment du statut de l'AgHBe suggérant que la persistance du HBV dans les cellules affecte la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, il est connu qu'HBV inhibe certains gènes de l'immunité. Cependant une étude sur le WHV a montré une augmentation globale des réponses interféron de type I/II. Cette différence peut être expliquée par la complexité des modulations des réponses immunitaires de l'hôte induite par HBV faisant du modèle expérimental utilisé, du temps et du type d'analyse, des variables pour l'interprétation des résultats.

Dans cette étude, deux gènes sont cependant surexprimés dans les patients chroniquement infectés par rapport aux contrôles non infectés : PPP2R1A et DNMT3A. PPP2R1A affecte la voie de l'IFN de type I en diminuant une méthyltransférase qui permet l'activité complète de STAT1. DNMT3A est responsable de la méthylation de novo de l'ADN de l'hôte et viral et est connu pour être augmenté par HBV. La méthylation est un mécanisme de défense de l'hôte. Lorsqu'une cellule est infectée par HBV, une méthylation de l'ADN viral ainsi que de l'ADN de l'hôte se met en place. Ceci a un effet protecteur en diminuant l'expression du virus mais peut aussi avoir un effet négatif en bloquant l'expression de gènes suppresseurs de tumeur (2010 Vivekanandan).

Le profil d'expression des gènes obtenus dans les patients CHB montre clairement que la modulation de l'immunité de l'hôte n'est pas dépendante d'un marqueur viral prédominant, c'est pourquoi une analyse multifactorielle a été réalisée.

Cette analyse permet de clairement distinguer les patients AgHBe+, des patients AgHBe-. De façon intéressante, un lien complexe entre les gènes de l'immunité innée et l'infection par HBV a été mis en évidence chez les patients AgHBe- se divisant en 3 clusters. Dans le cluster 2 correspondant aux patients AgHBe- avec de forts taux d'AgHBs, d'intégration, d'activité répliquative et d'ADN HBV intrahépatique, les gènes de l'immunité sont fortement réprimés. De manière intéressante, la plus forte répression des gènes de l'immunité de l'hôte n'est pas associée avec la plus forte répliquative virale, c'est-à-dire les patients AgHBe+, mais avec des patients AgHBe- présentant un fort taux d'AgHBs, une forte activité répliquative de l'ADNccc et du AgHBs intégré.

Cela suggère que l'inhibition de ces gènes de l'immunité est associée à des niveaux élevés d'AgHBs plutôt qu'à une forte charge virale.

Ces résultats montrent que la séparation des patients est plus complexe lorsque l'on inclut dans les paramètres l'expression des gènes de l'immunité.

Etude 3

Ester prodrugs of acyclic nucleoside thiophosphonates compared to phosphonates: Synthesis, antiviral activity and decomposition study

Loïc Roux, Stéphane Priet, Nadine Payrot, Clément Weck, **Maëlen Fournier**, Fabien Zoulim, Jan Balzarini, Bruno Canard and Karine Alvarez

Publié dans European Journal of Medicinal Chemistry, mars 2013, volume 63, pages 869-881

Objectifs de l'étude 3

Au cours du temps, les traitements antiviraux se sont diversifiés. Cependant, la majorité d'entre eux ciblent la polymérase virale, élément clé de la réplication du virus. Les premiers inhibiteurs de la polymérase virale étaient basés sur des nucléosides modifiés ne possédant pas de groupement 3'-OH libre. Ces composés induisaient donc l'arrêt de la synthèse de l'ADN viral lors de leurs incorporations dans ce dernier. Néanmoins, deux problèmes subsistaient. En effet, ces composés se sont révélés toxiques probablement à cause de leur décomposition dans le corps du patient. De plus, la première phosphorylation permettant la transformation de ces composés en 5'-monophosphate était limitée à cause des nucléosides kinases peu actives dans les cellules.

Ces composés ont donc été améliorés pour aboutir, en 1986, à la description des premiers nucléosides phosphonates acycliques (ANP) ayant un rôle antiviral, dont l'adéfovir dipivoxil qui agit contre HIV et HBV (De Clercq et al., 1987; Yokota et al., 1990). Ces ANP, couramment nommés analogues de nucléos(t)ides, sont des inhibiteurs nucléotidiques de la rétrotranscriptase composés d'une base nucléotidique liée à un groupement phosphonate. Ces prodrogues, pharmacologiquement inactives, sont ensuite biotransformées en une forme active. Contrairement aux nucléosides modifiés, cette transformation ne nécessite plus que deux étapes de phosphorylation.

Ces modifications ont permis de rendre ces molécules biodisponibles et assimilables au niveau oral, d'augmenter le spectre d'activité antivirale et de grandement diminuer leur toxicité.

Cependant, les virus étant en constante évolution, l'amélioration des performances de ces composés antiviraux doit être permanente.

Pour cela, il existe deux stratégies :

- ajouter des chaînes au groupement phosphonate afin d'augmenter la biodisponibilité
- modifier le groupement phosphonate en lui-même.

Cette dernière stratégie, explorée dans cette étude, est utilisée pour essayer de pallier au problème de résistance des ANP. En effet, le groupement phosphonate étant le site de polymérisation lors de l'incorporation du composé dans l'ADN, sa modification peut entraîner un avantage sur son affinité de fixation ou sur son efficacité catalytique.

Dans cette étude, la modification d'un atome d'oxygène en atome soufre transformant le groupement phosphonate en groupement α -thiophosphonate du bis-POM-PMEA (adéfovir dipivoxil) et bis-POC-PMPA (ténofovir disoproxil fumarate) a été testée. L'activité antivirale de ces deux composés a ensuite été testée sur différents virus en comparaison avec les composés parents.



Original article

Ester prodrugs of acyclic nucleoside thiophosphonates compared to phosphonates: Synthesis, antiviral activity and decomposition study



Loïc Roux^a, Stéphane Priet^a, Nadine Payrot^a, Clément Weck^a, Maëlénn Fournier^b, Fabien Zoulim^b, Jan Balzarini^c, Bruno Canard^a, Karine Alvarez^{a,*}

^a Laboratoire d'Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR CNRS 7257, Equipe "Chimie Médicinale et Virologie Structurale", Université Aix-Marseille, Parc scientifique de Luminy, 163 av. de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France

^b INSERM, U871, Université de Lyon, Hospices Civils de Lyon, 69003 Lyon, France

^c Laboratory of Virology and Chemotherapy, Rega Institute for Medical Research, K.U. Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 December 2012

Received in revised form

30 January 2013

Accepted 26 February 2013

Available online 14 March 2013

Dedicated to the memory of Dr Antonin Holý.

Keywords:

Nucleotide analogue

Prodrug

Thiophosphonate

Antiviral activity

Metabolism

ABSTRACT

9-[2-(Thiophosphonomethoxy)ethyl]adenine [S-PMEA, **8**] and (R)-9-[2-(Thiophosphonomethoxy)propyl]adenine [S-PMPA, **9**] are acyclic nucleoside thiophosphonates we described recently that display the same antiviral spectrum (DNA viruses) as approved and potent phosphonates PMEAs and (R)-PMPAs. Here, we describe the synthesis, antiviral activities in infected cell cultures and decomposition study of bis(pivaloyloxymethoxy)-S-PMEA [Bis-POM-S-PMEA, **13**] and bis(isopropoxyloxymethylcarbonyl)-S-PMPA [Bis-POC-S-PMPA, **14**] as orally bioavailable prodrugs of the S-PMEA **8** and S-PMPA **9**, in comparison to the equivalent "non-thio" derivatives [Bis-POM-PMEA, **11**] and [Bis-POC-PMPA, **12**]. Compounds **11**, **12**, **13** and **14** were evaluated for their *in vitro* antiviral activity against HIV-1-, HIV-2-, HBV- and a broad panel of DNA viruses, and found to exhibit moderate to potent antiviral activity. In order to determine the decomposition pathway of the prodrugs **11**, **12**, **13** and **14** into parent compounds PMEAs, PMPAs, **8** and **9**, kinetic data and decomposition pathways in several media are presented. As expected, bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** behaved as prodrugs of S-PMEA **8** and S-PMPA **9**. However, thiophosphonates **8** and **9** were released very smoothly in cell extracts, in contrast to the release of PMEAs and PMPAs from "non-thio" prodrugs **11** and **12**.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Acyclic nucleoside phosphonates (ANPs) [1–3] are outstanding molecules in the fight against DNA virus and retrovirus infections. Three of those compounds have been formally licenced for the treatment of HCMV infections [4] in AIDS patients (HPMPC, cidofovir, Vistide®), chronic HBV infections [1,5,6] (PMEA, Adefovir dipivoxil, Hepsera®, (R)-PMPA, Tenofovir disoproxil fumarate,

Viread®) and HIV infections (Tenofovir disoproxil fumarate, Viread®). Tenofovir is also available in a combination formulation with emtricitabine (Truvada®), or emtricitabine and efavirenz (Atripla®) or emtricitabine and rilpivirine (Complera®/Eviplera®) for the treatment of AIDS. In addition to these indications, there are various other clinical conditions in which ANPs have proven to be active [1,7].

ANPs are nucleotide analogues, and thus a phosphonate group is attached to the nucleoside moiety. Hence ANPs: 1) should resist any attack by esterases, phosphatases or any catabolic enzymes, thus enhancing physiological stability and half-life in biological fluids and cells, and 2) require only two phosphorylation steps to be converted into their diphosphate active form [8], thus circumventing the often rate-limiting first phosphorylation step of nucleoside analogues.

With respect to their mode of action, these nucleoside phosphonate analogues are phosphorylated by cellular kinases into nucleoside phosphonate diphosphates after endocytosis-mediated penetration into the infected cells. While they are generally poor substrates for cellular polymerases, these nucleotide analogues are,

Abbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; HBV, hepatitis B virus; RT, reverse transcriptase; dNTP, deoxynucleotide; ANP, acyclic nucleoside phosphonate; PMEAs, 9-[2-phosphonomethoxyethyl]adenine; S-PMEAs, 9-[2-thiophosphonomethoxyethyl]adenine; (R)-PMPAs, (R)-9-[2-phosphonomethoxypropyl]adenine; (R)-S-PMPAs, (R)-9-[2-thiophosphonomethoxypropyl]adenine; bis-POC-PMPAs, (R)-9-[2-[O,O'-bis(isopropoxycarbonyloxymethyl)phosphonomethoxy]propyl]adenine; bis-POM-S-PMPAs, (R)-9-[2-[O,O'-bis(isopropoxycarbonyloxymethyl)thiophosphonomethoxy]propyl]adenine; bis-POM-PMEAs, 9-[2-[O,O'-bis(pivaloyloxymethyl)phosphonomethoxy]ethyl]adenine; bis-POM-S-PMEAs, 9-[2-[O,O'-bis(pivaloyloxymethyl)thiophosphonomethoxy]ethyl]adenine.

* Corresponding author. Tel.: +33 491 825 570; fax: +33 491 266 720.

E-mail address: Karine.Alvarez@afmb.univ-mrs.fr (K. Alvarez).

on the other hand, fairly well incorporated into the growing viral DNA chain by viral reverse transcriptase (RT) or polymerase. As these analogues do not possess a free 3'-OH group, their incorporation results in a termination of DNA synthesis that is eventually responsible for the antiviral effect [9–11].

Given the antiviral potency, activity spectrum and long-term safety of ANPs, could their performance still be improved? To address this question, various structural modifications have been attempted [1], including structural diversity at both the side chain [12–14], the heterocyclic moiety [15–20] and the phosphonate. Among phosphonate moiety modifications, two strategies have been explored. One consists of designing prodrug adducts [21–26], such as alkoxyalkyl ester or phosphoramidate or *cycloSaligenyl* derivatives to enhance bioavailability, and the other consists of modifying the environment of the phosphorus atom of the phosphonate moiety itself [27–30]. The latter strategy has been explored to target the resistance problem specifically, and to circumvent the loss of nucleotide analogue efficacy. Indeed, the phosphonate moiety represents the site of the polymerization reaction during nucleotide incorporation into the growing DNA chain and its modification may cause disturbances (electronic, steric effects) which could be advantageous in binding affinity and/or catalytic efficiency.

We previously reported [28,29] the synthesis of the α -thio-phosphonates S-PMEA **8** and S-PMPA **9**, bearing a sulphur atom at the α -position of acyclic nucleoside phosphonate (Fig. 1). Target compounds **8** and **9** exhibit robust antiretroviral activity in cells infected by HIV-1 (LAI strain, and viral isolates from subtypes A to G), HIV-2, HBV and a moderate activity against herpes simplex viruses and vaccinia virus. We showed that their diphosphate forms S-PMEApp and S-PMPApp are readily incorporated by wild-type (WT) HIV-1 RT into DNA and act as DNA chain terminators [28,29].

Because these novel acyclic nucleoside thiophosphonates display promising antiviral activities, we decided to improve their pharmacokinetic properties and related efficacy by the synthesis of prodrug forms to make them potential candidates for HIV and HBV therapy.

A prodrug is a pharmacologically inactive compound that is converted to the active form of the drug by endogenous enzymes or intracellular metabolism, to overcome problems associated with stability, toxicity, lack of specificity and/or limited bioavailability. To be clinically useful a prodrug should fulfil pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles which are mainly dependant on the kinetics of its conversion to the parent drug (sensitivity of the linkage between the prodrug moiety and the parent drug to hydrolysis) and on its membrane permeation properties (lipophilicity).

Prodrugs of ANPs have been largely described [31,32] and in particular, alkoxyalkyl ester prodrugs, which are the forms currently

employed in the licenced Adefovir dipivoxil (Hepsera®) and Tenofovir disoproxil fumarate (Viread®). Historically, Srinivas et al. [33] described the first anti-HIV evaluation of the 9-[2-[O,O'-bis(pivaloyloxymethyl)phosphonmethoxy]ethyl]adenine "bis-POM-PMEA" or Adefovir dipivoxil. Antiviral activity was increased 30-fold, but pivaloyl-containing compounds generated pivalic acid during release of the parent drug, which constituted a potential toxicity concern [34]. To overcome this issue, "bis-POC" prodrugs were developed [11]. The anti-HIV activity of (*R*)-9-[2-[O,O'-bis(isopropoxycarbonyloxymethyl)phosphonmethoxy]propyl]adenine "bis-POC-PMPA" or Tenofovir disoproxil was 100-fold higher than that of PMPA.

We describe here an efficient strategy to synthesize the alkoxyalkyl ester prodrugs: bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** via a thionation reaction of the corresponding "non-thio" derivatives bis-POM-PMEA **11** and bis-POC-PMPA **12** (Fig. 1). This thionation approach was also applied for the synthesis of the parent thiophosphonates S-PMEA **8** and S-PMPA **9**. In this study, we also evaluate the antiviral activity against a broad panel of viruses and the decomposition pathway in several media of the "thio"-prodrugs **13** and **14** in comparison with the "non-thio"-prodrugs **11** and **12**.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

We previously published [27,28] a synthetic pathway to obtain the thiophosphonates S-PMEA **8** and S-PMPA **9**. We developed an original method to synthesize a H-phosphinate intermediate [27] that can easily serve as a precursor to generate phosphorus-modified nucleotides. This key step was applied to synthesize α -boranophosphonates [27], α -selenophosphonates and α -thio-phosphonates [28] derived from PMEA and PMPA. However, this exploratory method was not feasible for large-scale synthesis, limited by the overall low yield. So, we decided to develop a new synthetic strategy allowing us to obtain target compounds and prodrugs derived thereof using a common strategy, thereby limiting the number of steps (Scheme 1).

The first step of the synthesis uses a methodology largely described [27,28,35–37] and consists of substituting adenine in order to obtain 9-(2-hydroxyethyl)adenine **1** for the S-PMEA series and (*R*)-9-(2-hydroxypropyl)adenine **2** for the S-PMPA series.

The following step, which consists of alkylating alcohols **1** and **2** with diethyl[[(*p*-toluenesulfonyl)oxy]methyl]phosphonate **3** [38] in DMF in the presence of alkoxide base, is the limiting step characterized by its low yield and side-product formation which makes purification difficult. Indeed, two side-products were identified following the reaction by HPLC/MS, the N7-regioisomer and the

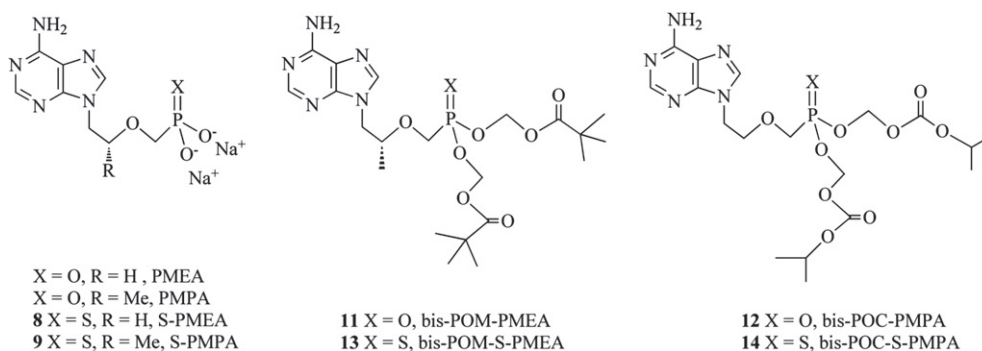
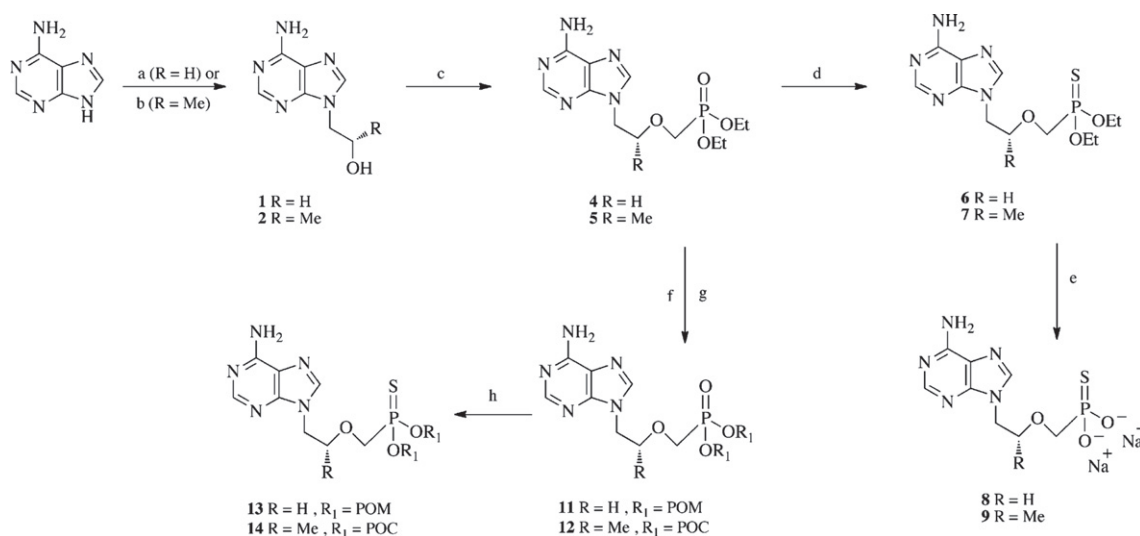


Fig. 1. Structure of PMEA, PMPA, S-PMEA **8** and S-PMPA **9**, bis-POM-PMEA **11**, bis-POM-S-PMEA **13**, bis-POC-PMPA **12** and bis-POC-S-PMPA **14**.



Scheme 1. Synthetic pathway for the synthesis of compounds **8**, **9**, **11**, **12**, **13** and **14**. Reagents and conditions : a) 2-bromoethylbenzoate, NaH, DMF, 60 °C, 16 h then NH₃/MeOH sat, 14 h; b) (R)-propylene carbonate, DMF, 140 °C, 16 h; c) Mg(tBuO)₂, **3**, DMF, 35 °C, 20 h; d) Davy Reagent, benzene, 80 °C, 2 h; e) TMSCl, NaBr, NMP, 90 °C, 12 h, then dowex Na⁺ exchange after purification; f) TMSCl, NaBr, NMP, 60 °C, 12 h then POMCl, TEA, 60 °C, 6 h; g) TMSCl, NaBr, NMP, 60 °C, 12 h, then **10**, TEA, 60 °C, 6 h; h) Davy Reagent, benzene, 80 °C, 30 min.

elimination product. The formation of the N7-regioisomer has been reported by Hakimelahi, G. H [35], and we also observed its formation using sodium *tert*-butoxide as alkoxide base. Indeed, The synthesis of compounds **4** and **5** with 1.1 eq of sodium *tert*-butoxide leads to a N-7/N-9 ratio 15/85 and 40/60 respectively. Regioisomers were not efficiently separated by purification on silica gel chromatography. We hypothesize that the elimination product results from a β -elimination reaction of the compound **5** which contains ether function. Under the action of strong bases such as organolithium or organosodium and to a lesser extent organomagnesium [39], hydrogen atom in beta position of the oxygen can be removed (Reformatsky reaction analogy). Elimination reaction leads to an alkene and an alcoholate.

In order to improve regioselectivity and efficiency, and to reduce side product formation, we tried several conditions of temperature (RT, 70 °C), solvent (DMF, NMP) and bases (tBuONa, tBuOK, NaH, LiH) [27,35,37,40]. The alkylation can be effected also with magnesium *tert*-butoxide [41–43] and demonstrated to be superior to the current manufacture production method. However, the strategy described is one-pot synthesis and diethylphosphonates **4** and **5** were not isolated. According to the recent literature [42,43], alkylation of compounds **1** and **2** was accomplished in dimethylformamide at 35 °C during 20 h in the presence of 1.5 equiv of magnesium *tert*-butoxide to lead to the corresponding diethylphosphonates **4** and **5** [17,27], with 52% and 53% yields, respectively.

The new approach we designed consists then to transfer a sulphur atom to diethylphosphonates **4** and **5** forming diethylthiophosphonates **6** and **7** using an efficacious thionation reagent (e.g., Belleau reagent, Lawesson reagent, Davy reagent) [44–47]. The Davy reagent in dry benzene at 90 °C lead to the corresponding diethylthiophosphonates **6** and **7** with 43% and 44% yields, respectively. Thionation of **4** and **5** proved to be fast and went to completion within 2 h. Inspection of the decoupling ³¹P NMR spectra showed that the signals from **4** (δ : 21.56 ppm) and **5** (δ : 22.11 ppm) were replaced by new resonances at 88.02 ppm for **6** and 88.41 ppm for **7**.

Methyl and ethyl are current protecting groups of phosphonate diesters. However, while they can be removed by treatment with trimethylsilyl iodide or bromide, this method fails or gives low

yields with thiophosphonate derivatives [48]. Deprotection of diethyl α,α -difluoromethylenephosphonothioic acid via a thiono–thiolo rearrangement followed by Pd-catalysed deallylation has been reported [49]. Our goal was to identify reaction conditions capable of generating thiophosphonic acids in a one step process. Since nucleophilic displacement is rate-determining for TMSBr-mediated hydrolysis, the use of TMSCl in conjugation with several exogenous nucleophiles (NaBr, NaI) was optimised for the hydrolysis of diethylthiophosphonates **6** and **7** [42]. Compounds **6** and **7** were treated with 40 equivalents of sodium bromide and trimethylsilyl chloride in *N*-methylpyrrolidone (NMP) at 90 °C, during 12 h, followed by hydrolysis with triethylammonium bicarbonate 0.05 M (TEAB). The deprotection reaction led to the formation of thiophosphonates **8** and **9** with 40% and 48% yields, respectively, after reverse phase chromatography purification.

In summary, a more efficient process has been developed to prepare thiophosphonates **8** and **9**. Even if the overall yield remains equivalent (10%), notable features include key alkylation using magnesium *tert*-butoxide, reduction of purification steps using reverse-phase chromatography, thionation of ANPs never described and efficient transsilylation of S-ANPs never reported.

To obtain the prodrug forms [29,30] bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** we used a similar synthesis pathway involving a thionation reagent to introduce the sulphur atom on the alkoxyalkyl ester phosphonate. The reaction involved the hydrolysis of the diethylphosphonates **4** and **5** followed by the conversion into the alkoxyalkyl phosphonate diesters **11** and **12** by base-promoted alkylation. After treatment of **4** and **5** with two equivalents of sodium bromide and four equivalents of trimethylsilyl chloride in NMP at 60 °C during 12 h, phosphonate diacids were obtained but not isolated. After ensuring the complete removal of excess of TMSCl by co-distillation with ethyl acetate, they were directly alkylated with triethylamine and the appropriate pivaloyloxymethyl chloride (POMCl) or chloromethylisopropyl carbonate **10** [50] (POCCI), in NMP at 60 °C during 6 h. Bis-POM-PMEA **11** and bis-POC-PMPA **12** were isolated by silica chromatography in 27% and 33% yield, respectively. The last step was the thionation reaction with the Davy Reagent in benzene at 80 °C during 30 min. The bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** were then obtained after silica gel chromatography with 29% and 32% yields, respectively.

2.2. Anti-HIV activity of thiophosphonate prodrugs **13** and **14** compared to phosphonate prodrugs **11** and **12** against wild-type (WT) HIV-1 (III_B) and HIV-2 (ROD) and cytotoxicity in CEM cell cultures

To evaluate the activity of the target compounds, a cell-based antiviral drug susceptibility assay was performed using WT HIV-1 (III_B) and HIV-2 (ROD) (Table 1). CEM cell cultures were treated with increasing concentrations of compounds **11**, **12**, **13** and **14**, and infected with 100 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious doses) of HIV-1 (III_B) and HIV-2 (ROD). On day 3 post infection, reverse transcriptase (RT) activity in cell culture medium was measured to determine the antiviral properties of the compounds expressed as 50% reduction of viral replication (half maximal effective concentration or EC₅₀) and virus-induced cytopathicity was microscopically recorded (Table 1). Concomitantly, the antimetabolic effect (50% cytotoxic concentration, CC₅₀) of each compound was evaluated in the drug-exposed CEM cell cultures.

Under the assay conditions, all compounds significantly inhibited the replication of HIV-1 and HIV-2 in CEM cell cultures (Table 1). The alkoxyalkyl ester prodrugs bis-POM-PMEA **11**, bis-POC-PMPA **12**, bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** exhibited markedly increased antiviral activity against HIV-1 and HIV-2 compared to PMEA (60- and 110-fold, respectively [28]), PMPA (300- and 540-fold, respectively [28]), S-PMEA **8** and S-PMPA **9** (170- to 60-fold, respectively [28]). The prodrug strategy leads to an important decrease of EC₅₀ compared to parent compounds [28]. Nevertheless the thiophosphonate prodrug **14** tends to display an increased EC₅₀ (5- to 10-fold lower antiviral activity) as compared to the phosphonate prodrug bis-POC-PMPA **12**.

As described in the literature [11,33,51], cytotoxicity of the POM prodrugs also markedly increased. Indeed, as shown in Table 1, bis-POM-PMEA **11** and bis-POM-S-PMEA **13** inhibited the CEM cell growth at an CC₅₀ of 1.6 and 2 μM, respectively. Consequently, the bis-POM prodrugs showed a substantially lower selectivity than the bis-POC prodrugs with selectivity ratios for the POM series of ≥10–35 and ≥270–1900 for the POC series. Both prodrug series are hydrolyzed to formaldehyde, carbon dioxide and the parent compound [11]. Bis-POM prodrugs also generate pivalic acid, whereas the bis-POC prodrugs release isopropyl alcohol. It is possible that the accumulation of pivalic acid contributes to the increased cytotoxicity.

The increased antiviral activity of alkoxyalkyl ester prodrugs of the thiophosphonates bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** and the phosphonate compounds bis-POM-PMEA **11** and bis-POC-PMPA **12**, can be attributed to increased cellular permeation of the prodrugs followed by effective intracellular conversion to the parent compounds, which undergo subsequent phosphorylation to their antivirally active diphosphate metabolite.

To conclude anti-HIV evaluation, thiophosphonates **13** and **14** are slightly less active (4–10 fold) than phosphonate compounds Adefovir Dipivoxil **11** and Tenofovir Disoproxil **12**.

Table 1

Antiviral activity and cytotoxicity of bis-POM-PMEA **11**, bis-POC-PMPA **12**, bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14**, in CEM cell cultures infected by 100 TCID₅₀ of HIV-1 (III_B) or HIV-2 (ROD).

Compounds	EC ₅₀ (μM) ^a 100 TCID ₅₀ HIV-1 (III _B)	EC ₅₀ (μM) ^a 100 TCID ₅₀ HIV-2 (ROD)	CC ₅₀ (μM) ^b (CEM)
Bis-POM-S-PMEA 13	≥0.2	≥0.2	2.0 ± 0.21
Bis-POM-PMEA 11	0.045 ± 0.038	0.062 ± 0.021	1.6 ± 0.28
Bis-POC-S-PMPA 14	0.092 ± 0.040	0.13 ± 0.0071	>25
Bis-POC-PMPA 12	0.016 ± 0.011	0.013 ± 0.009	>25

^a EC₅₀ or 50% effective concentration : compound concentration required to inhibit syncytia formation by 50%.

^b CC₅₀ or 50% cytostatic concentration : compound concentration required to inhibit CEM cell proliferation by 50% in mock-infected cell cultures. CEM: human T-lymphoblastoid cells.

2.3. Anti-HBV activity of thiophosphonate prodrugs **13** and **14** compared to phosphonate prodrugs **11** and **12** and cytotoxicity in Huh7 cell cultures

Since prodrug forms of PMEA (Adefovir Dipivoxil) and PMPA (Tenofovir Disoproxil) are clinically approved to inhibit HBV replication in infected patients, the compounds were tested in a cell-based antiviral drug susceptibility assay. The inhibition of WT HBV replication was assessed in Huh7 cell cultures treated with increasing concentrations of compounds **11**, **12**, **13** and **14**. The amount of viral DNA produced in the cells was quantified to evaluate the antiviral properties of the compounds as the 50% reduction of viral DNA (EC₅₀) (Table 2). Concomitantly, the cytotoxic effect of each compound was evaluated as well.

Under the assay conditions, all compounds significantly inhibited the multiplication of HBV in huh-7 cell cultures (Table 2). None of the tested compounds exhibited any cytotoxicity at a concentration as high as 25 μM. Surprisingly, the alkoxyalkyl ester prodrugs bis-POM-PMEA **11**, bis-POC-PMPA **12**, bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** exhibited only a small increase of efficacy against HBV compared to PMEA (4-fold [28]), PMPA (5-fold [28]), S-PMEA **8** (3-fold [28]) and S-PMPA **9** (3-fold [28]). The prodrug strategy leads to a moderate decrease of EC₅₀ compared to parent compounds [28].

To conclude anti-HBV evaluation, thiophosphonates **13** and **14** displayed the same activity (1.2–1.7 fold) than phosphonates **11** and **12**.

2.4. Evaluation of thiophosphonate prodrugs **13** and **14** compared to phosphonate prodrugs **11** and **12** against other DNA viruses in HEL cell culture

To further explore the antiviral selectivity of the compounds, the antiviral activity testing against a panel of DNA and RNA viruses was performed with herpes simplex virus type 1 and 2 (HSV-1 KOS, HSV-1 TK- KOS and HSV-2 G), and vaccinia virus. The inhibition of viral replication was assessed in HEL cell cultures treated with increasing concentrations of compounds **11**, **12**, **13** and **14**. The virus-induced cytopathic effect (CPE) was recorded microscopically at 3 days post infection and the antiviral activity (EC₅₀) was expressed as the percentage of inhibition of the CPE compared with the untreated controls (Table 3).

Under the assay conditions, except for bis-POC-S-PMPA **14** which is inactive up to 50 μM, all compounds inhibited the multiplication of HSV-1 and HSV-2 in HEL cell cultures (Table 3). None of the tested compounds exhibited any cytotoxicity at a concentration as high as 50 μM.

The alkoxyalkyl ester prodrugs bis-POM-S-PMEA **13**, bis-POM-PMEA **11** and bis-POC-PMPA **12** exhibited increased potency compared to S-PMEA **8** (6- to 10-fold [28]), PMEA (100- to 400-fold [28]) and PMPA (>20-fold [28]). However, the increase of antiviral

Table 2

Antiviral activity and cytotoxicity of bis-POM-PMEA **11**, bis-POC-PMPA **12**, bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14**, in Huh7 cell cultures transfected by HBV.

Compounds	EC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b (Huh7)
Bis-POM-S-PMEA 13	1.45 ± 0.53	>25
Bis-POM-PMEA 11	0.83 ± 0.21	>25
Bis-POC-S-PMPA 14	1.14 ± 0.92	>25
Bis-POC-PMPA 12	0.88 ± 0.61	>25

^a EC₅₀ or 50% effective concentration : concentration of compound required to afford a 50% reduction of the level of HBV viral DNA in the Huh7 cell cultures. EC₅₀ were determined from at least three independent experiments.

^b CC₅₀ or 50% cytotoxic concentration : concentration of compound required to afford a 50% reduction of the cell density.

Table 3Antiviral activity and cytotoxicity of bis-POM-PMEA **11**, bis-POC-PMPA **12**, bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14**, in HEL cell cultures infected by several DNA viruses.

Compounds	EC ₅₀ (μM) ^a				Minimum cytotoxic concentration (μM) ^b
	Herpes simplex virus-1 (KOS)	Herpes simplex virus-1 (TK- KOS)	Herpes simplex virus-2 (G)	Vaccinia virus	
Bis-POM-S-PMEA 13	3.9 ± 1.9	3.9 ± 0.0	3.9 ± 0.0	29 ± 20	>50
Bis-POM-PMEA 11	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	4.0 ± 6.0	>50
Bis-POC-S-PMPA 14	>50	>50	>50	>50	>50
Bis-POC-PMPA 12	5.8 ± 3.8	9.6 ± 7.7	5.8 ± 0.0	>50	>50
Cidofovir	0.9 ± 1.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 1.1	22 ± 7.0	>250
Acyclovir	0.08 ± 0.12	29 ± 21	0.08 ± 0.12	>250	>250

^a EC₅₀ or 50% effective concentration : concentration of compound required to reduce virus-induced cytopathicity by 50%.^b Minimum compound concentration required to cause a microscopically detectable alteration of normal cell morphology.

efficacy was less pronounced for thiophosphonate prodrugs than phosphonates prodrugs. The alkoxyalkyl ester prodrugs **11** and **13** exhibited an efficacy equivalent to that of cidofovir and showed a better activity than acyclovir against thymidine kinase-deficient HSV-1 (TK- KOS).

As described previously [28], S-PMPA **9** displayed a moderate activity against HSV-1 and HSV-2 (EC₅₀ 169 ± 13 μM and 48 ± 0.0 μM, respectively) in HEL cell cultures, while PMPA was inactive at 200 μM. Surprisingly, no antiviral activity up to 50 μM was observed against any of the DNA viruses tested with the alkoxyalkyl ester prodrug bis-POC-S-PMPA **14**, while the bis-POC-PMPA **12** displayed a good activity against HSV-1 and HSV-2 (EC₅₀ 5.8 μM) in HEL cell cultures.

While S-PMEA **8** showed modest inhibitory properties against vaccinia virus in contrast to the inactivity of PMEAs at 200 μM, surprisingly the alkoxyalkyl ester prodrug of PMEAs **11** was 7 times more active than S-PMEA **13**. It is also intriguing that the prodrug derivative of PMEAs was much more active than the corresponding prodrug of S-PMEAs.

2.5. Decomposition studies and metabolism

It has been previously [52] demonstrated that the mechanism by which the bis-POM-PMEA **11** and bis-POC-PMPA **12** are converted to the corresponding PMEAs and PMPA parent drugs involves, in a first step, a carboxyesterase-mediated decomposition process followed by a spontaneous C–O bond breakage and thus giving rise to the corresponding phosphonate monoesters “mono-POM-PMEA” and “mono-POC-PMPA”, respectively, with the release of formaldehyde and pivalic acid or isopropyl alcohol. In a second step, the corresponding phosphonate monoesters are converted to the expected parent compounds PMEAs and PMPA either following a decomposition process similar to that involved in the first step and/or by phosphodiesterase-mediated hydrolysis.

In order to determine whether bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** exert their biological effects via intracellular delivery of the corresponding S-PMEAs **8** and S-PMPAs **9**, we decided to establish the decomposition pathways of **13** and **14** in cell extracts and to determine their stability in various media.

The decomposition products, pathways and kinetics of thiophosphonates S-PMEAs **8**, S-PMPAs **9**, mono-POC-S-PMPAs **16**, bis-POM-S-PMEAs **13**, bis-POC-S-PMPAs **14** and phosphonates PMEAs, PMPAs, mono-POC-PMPAs **15**, bis-POM-PMEAs **11** and bis-POC-PMPAs **12** were determined upon incubation at 37 °C in culture medium (RPMI-1640 + 10% of heat-inactivated foetal calf serum; DMEM + 10% of heat-inactivated foetal calf serum), and in cell extracts (CEM; Huh7) in order to mimic their behaviour under the experimental conditions of the *in vitro* assays. All compounds were also incubated in water, in acidic buffer (pH 1.2), in RPMI-1640 and in DMEM medium to differentiate between chemical and enzyme-mediated hydrolysis. Additionally, compounds **8**, **9**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15**

and **16** were incubated in buffer with or without addition of purified pig liver carboxyesterases (PLE) and/or with snake venom phosphodiesterases (SVP). PLE is a widely accepted model of intracellular esterase activity [53–55].

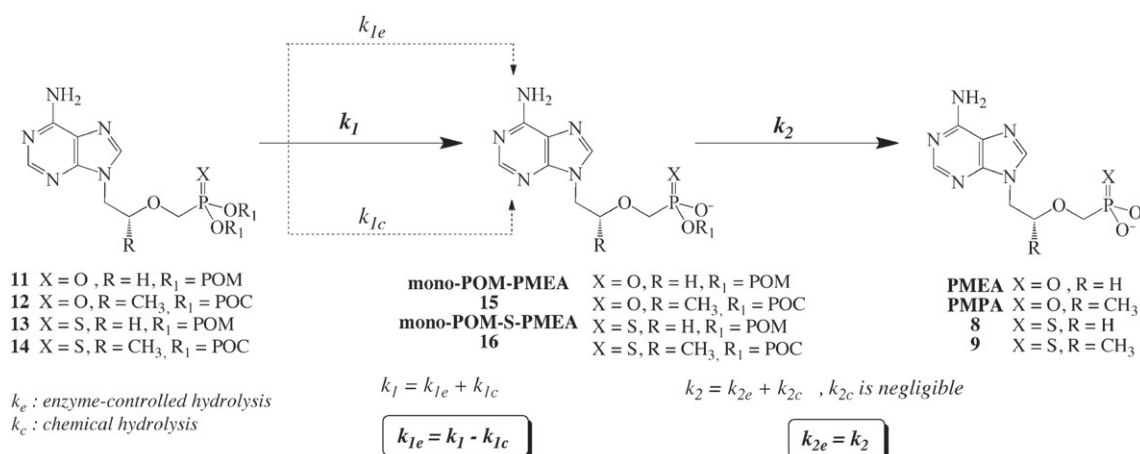
During incubation, samples were removed and analyzed using an “on-line cleaning” method [56] which allows the direct HPLC analysis of compounds and metabolites in biological media without any pre-treatment.

For each of the conditions studied, the whole sample was incubated at 37 °C and at each chosen time interval, 50 μL were sampled and directly injected onto an analytical HPLC column where the analytical conditions allowed visualising and properly separating the starting compound from the corresponding metabolites. All compounds could accurately be UV-detected (260 nm) and quantified. Identification of the metabolites was confirmed by comparative injection of authentic samples. For example, after incubation of compound **14** in the various investigated media, aliquots were HPLC-analyzed and several signals could be observed in resulting chromatograms: bis-POC-S-PMPA **14**, mono-POC-S-PMPA **16** (two diastereoisomers), S-PMPA **9** and PMPA. All signals were unambiguously assigned by co-injection with authentic samples (retention time, UV spectra).

Having assigned the various HPLC signal consecutive-competitives, the kinetic data could be treated according to a general “pseudo-first order” model. A proposed decomposition pattern is shown in Scheme 2, in which we established that the overall metabolic sequence implies two steps and the formation of an intermediate mono-POC or mono-POM during the conversion process. Each step of decomposition could be characterized by half-lives (*t*_{1/2}) and rate constants (*k*₁ and *k*₂). Moreover, the observed rate constant *k* is the sum of the rate constants of the chemical-mediated hydrolysis (*k*_{1c} and *k*_{2c}) and the enzyme-mediated hydrolysis (*k*_{1e} and *k*_{2e}) in the serum-containing media and cell extracts (Table 4).

In RPMI-1640 or DMEM, the rate constants obtained reflected the chemical hydrolysis kinetics. In both conditions, the rate constants *k*₁ for the first step of conversion of phosphonates diesters **11** and **12** were higher (5- to 9-fold) than the rate constants of the thiophosphonates diesters **13** and **14**, indicating that thiophosphonates were more resistant to chemical hydrolysis than the corresponding phosphonates (*t*_{1/2} ≈ 1–2 h). For all tested compounds, the second conversion (*k*₂) was very slow and half-lives were higher than 72 or 48 h.

When tested in FCS-containing culture medium (RPMI-1640 + 10% FCS), the rate of decomposition (*k*₁) resulted predominantly from the chemical degradation but slightly decomposition of compounds **11**, **12**, **13** and **14** occurred, due to enzymatic degradation. *k*_{1e} was slow and equivalent for thiophosphonates (1.34 and 1.06 × 10^{−3} min^{−1}) and phosphonates derivatives (1.58 and 1.1 × 10^{−3} min^{−1}). In contrast, in DMEM + 10% FCS, the rate constant *k*_{1e} expressing the enzymatic degradation was higher especially for



Scheme 2. Proposed mechanism of decomposition of prodrugs **11**, **12**, **13** and **14**. The half-lives were deduced from experimental data and the calculated rate constants of each decomposition step in the different media are reported in Table 5.

phosphonate derivatives (6.93 and $6.41 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$). Such behaviour was correlated to the presence of heat-inactivated serum in the medium and demonstrated a higher remaining enzymatic activity in DMEM + 10% FCS than in RPMI-1640 + 10% FCS. For both series, the k_2 values were very low and half-lives were higher than 72 h or 48 h for compounds **13** and **14** and were 55 h/31 h and 33 h/>48 h for compounds **11** and **12**.

In cell extracts (CEM and Huh7), we observed a difference of behaviour between the POM and POC prodrug series, in addition to the impact of the thio modification. Indeed, bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POM-PMEA **11** were rapidly deprotected in both cell extracts with equivalent k_{1e} values of $2.99 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $3.36 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ for compound **13** and $7.35 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $6.93 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ for compound **11**. As expected, thiophosphonate **13** was less efficiently deprotected than phosphonate **11**. However and unfortunately, the k_2 values for compound **13** were very low and half-lives were higher than 72 h or 48 h, meaning that the parent compound **8** was not efficiently released in cell extracts. In comparison, PMEAs were released in cell extracts with a half-life of 11 h, being more compatible with the experimental conditions of the *in vitro* assays.

The combination of POC protection and thio modification was worse in terms of parent compound release. Indeed, the removal of

the first POC protecting group in cell extracts (CEM and Huh7), was less efficient in comparison to the POM-protected (thio)phosphonates. Bis-POC-S-PMPA **14** was slowly hydrolysed in both cell extracts with k_{1e} values of $0.77 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $0.11 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Moreover, the k_2 values for compound **14** were very low and half-lives were higher than 72 h or 48 h, meaning that the parent compound **9** was not efficiently released in the cell extracts.

However, caution must be taken in extrapolating the kinetic findings to intact living cells: the concentration of protein in the cell lysate used in these experiments is certainly lower than that in intact cells; it is also possible that some of the enzymes responsible for metabolism in intact cells are bound to membranes or organelles and are removed during centrifugation or that enzyme activity is suboptimal when present in a crude extract compared to the (compartmentalized) intact cells.

Nevertheless, the foregoing studies demonstrated that bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** were prodrugs of S-PMEA **8** and S-PMPA **9**, but the kinetics of release was rather slow. The studies also revealed that mono-POM-S-PMEA and mono-POC-S-PMPA were intermediates in the conversion process and led to the establishment of a coherent kinetic scheme for the overall metabolic sequence.

We decided to investigate more carefully the metabolism of the thiophosphonate prodrugs to better understand the decomposition

Table 4
Pseudo-first-order rate constants ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) related to the decomposition kinetic models of the compounds **8–16** in non-enzymatic media (RPMI-1640; DMEM), culture media (RPMI-1640 + 10% FCS; DMEM + 10% FCS) and cell extract (CEM-SS; Huh7).

Compound	Bis-POM-S-PMEA 13		Bis-POM-PMEA 11		Bis-POC-S-PMPA 14		Bis-POC-PMPA 12	
Rate constant ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)								
RPMI-1640/DMEM								
k_{1c}	0.86	0.71	4.2	4.62	0.72	0.94	6.6	5.14
k_{2c}	<0.16 ^a	<0.24 ^b	<0.16 ^a	<0.24 ^b	<0.16 ^a	<0.24 ^b	<0.16 ^a	<0.24 ^b
RPMI-1640 + 10% FCS/DMEM + 10% FCS								
k_1	2.2	3.3	5.78	11.55	1.78	2.1	7.7	11.55
k_{1e}	1.34	2.59	1.58	6.93	1.06	1.16	1.1	6.41
k_2	<0.16 ^a	<0.24 ^b	0.21	0.37	<0.16 ^a	<0.24 ^b	0.34	<0.24 ^b
CEM/Huh7								
k_1	3.85	4.07	11.55	11.55	1.49	1.05	11.55	6.6
k_{1e}	2.99	3.36	7.35	6.93	0.77	0.11	4.95	1.46
k_2	0.16 ^a	<0.24 ^b	1.05	0.26	<0.16 ^a	<0.24 ^b	0.33	<0.24 ^b

^a $t_{1/2} > 72$ h.

^b $t_{1/2} > 48$ h. k_{1c} : rate constant of the first hydrolysis step chemically mediated. k_{2c} : rate constant of the second hydrolysis step chemically mediated. k_{1e} : rate constant of the first hydrolysis step enzymatically mediated. k_{2e} : rate constant of the second hydrolysis step enzymatically mediated. The observed rate constant k_1 is the sum of the rate constants of the chemical-mediated hydrolysis (k_{1c}) and the enzyme-mediated hydrolysis (k_{1e}). The observed rate constant k_2 is the sum of the rate constants of the chemical-mediated hydrolysis (k_{2c}) and the enzyme-mediated hydrolysis (k_{2e}).

pathway. Therefore, compounds **8**, **9**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15** and **16** were incubated in buffer with or without addition of purified pig liver carboxyesterases (PLE) and/or snake venom phosphodiesterases (SVP).

As described previously, each step of decomposition could be characterized by half-lives ($t_{1/2}$) and rate constants (k_1 and k_2). Moreover, the observed rate constant k is the sum of the rate constants of the chemical-mediated hydrolysis (k_{1c} and k_{2c}) and the enzyme-mediated hydrolysis (k_{1e} and k_{2e}).

The half-lives were deduced from the experimental data and the calculated rate constants of each decomposition step in the different media are reported in Table 5.

Pig liver carboxyesterase (PLE) was used as a model for hydrolysis of the bis-POC and bis-POM prodrugs by intracellular esterase(s) [53–55]. At a concentration of 0.5 U/mL of carboxyesterase, the formation of the mono-POC or mono-POM intermediates was fast at 37 °C, with k_{1e} values from 60 to $130 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ but at this enzyme concentration, none of the parent compound formation was observed after several hours of incubation. The decomposition of thiophosphonate diesters **13** and **14** into monoesters was PLE-catalyzed, hence k_1 and k_{1e} values were equivalent meaning that the chemical hydrolysis was negligible. On the contrary, the decomposition of phosphonate diesters **11** and **12** into monoesters was predominantly chemical-mediated with a k_1 value ($230 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) markedly higher than the k_{1e} value ($60 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$).

A relatively high concentration (5 U/mL) of enzyme was required to observe the release of parent thiophosphonates S-PMEA and S-PMPA, with k_2 values reaching 1.78 to $3.38 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Under these conditions, phosphonate monoesters were really poor substrates for carboxyesterase with a $t_{1/2}$ higher than 7 h ($k_2 < 1.44 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$).

These model experiments have indicated that conversion of thiophosphonate diesters **13** and **14** into monoesters catalyzed by intracellular esterase(s) was efficient and thiophosphonate diesters **13** and **14** were better substrates for intracellular esterase(s) than the corresponding phosphonate diesters **11** and **12**. Esterase-catalyzed hydrolysis of thiophosphonate monoesters into parental thiophosphonates S-PMEA **8** and S-PMPA **9** was plausible but unfavourable. It has been shown that a carboxyesterase partially purified from rat liver was able to hydrolyse only one of the two carbethoxy groups of malathion and could attack only non-ionized substrates [57].

Snake venom phosphodiesterase (SVP) was used as a model for hydrolysis of the bis-POC and bis-POM prodrugs by intracellular phosphodiesterase(s). The incubation of thiophosphonate diesters **13** and **14** with a concentration of 0.5 U/mL SVP, led to formation of monoesters with k_1 values of $4.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $4.62 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. In comparison, phosphonate diesters **11** and **12**

were very rapidly hydrolyzed with k_1 values of $170 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $140 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. However, this hydrolysis rate corresponded to a chemical degradation in the buffer employed and therefore, compounds **11–14** were found not to be significant substrates of SVP. On the contrary, the phosphonate monoesters were good substrates of SVP and were rapidly hydrolyzed into parent compounds PMEA and PMPA with k_2 values of $140 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $120 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Unfortunately, thiophosphonate monoesters were very poor substrates of SVP and k_2 values could not be accurately determined.

To confirm this difference of behaviour between phosphonate monoester and thiophosphonate monoester, mono-POC-PMPA **15** and mono-POC-S-PMPA **16** were incubated with 0.5 U/mL SVP. It should be noted that mono-POC-S-PMPA **16** was synthesized as a diastereoisomeric mixture. Diastereoisomers were separated by HPLC analysis, the more polar isomer was designated “fast” for fast-eluting (t_R 29.1 min in the S3 system analysis) and the more hydrophobic isomer was designated “Slow” for slow-eluting (t_R 29.3 min in the S3 system analysis).

Following the phosphodiesterase-catalyzed hydrolysis of thiophosphonate monoester **16** into parent compound S-PMPA **9** by HPLC, we observed that only the “Slow” diastereoisomer was smoothly hydrolyzed by SVP (k_2 value of $3.85 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$). Indeed, the observed signal area of the “Fast” isomer remained constant, meaning that this isomer was not substrate of SVP. In comparison, mono-POC-PMPA was a really good substrate of SVP (k_2 value of $230 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$). This result may indicate that thiophosphonate monoesters were still poor substrates of SVP and that the SVP showed clear stereopreference.

To propose a coherent decomposition scheme, compounds **11–14** were incubated with 0.5 U/mL of PLE and SVP as a mixture of enzymes. As we hypothesized, PLE should be involved in the first decomposition step and SVP should be involved in the second decomposition step.

As observed previously, the decomposition of thiophosphonate diesters **13** and **14** into monoesters was PLE-catalyzed and the decomposition of phosphonate diesters **11** and **12** into monoesters was predominantly chemical-mediated (k_1 and k_{1e} values). The phosphonate monoesters were good substrates of SVP and were rapidly hydrolyzed into the parent compounds PMEA and PMPA with k_2 values of $140 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $60 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. On the contrary, thiophosphonate monoesters were really poor substrates of SVP and k_2 values were low (k_2 values of $3.65 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $5.63 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$).

In summary, this study allowed to propose a reliable decomposition scheme for thiophosphonate prodrugs **12** and **14** in comparison to the phosphonate prodrugs **11** and **13**, as reported in Scheme 3.

Table 5

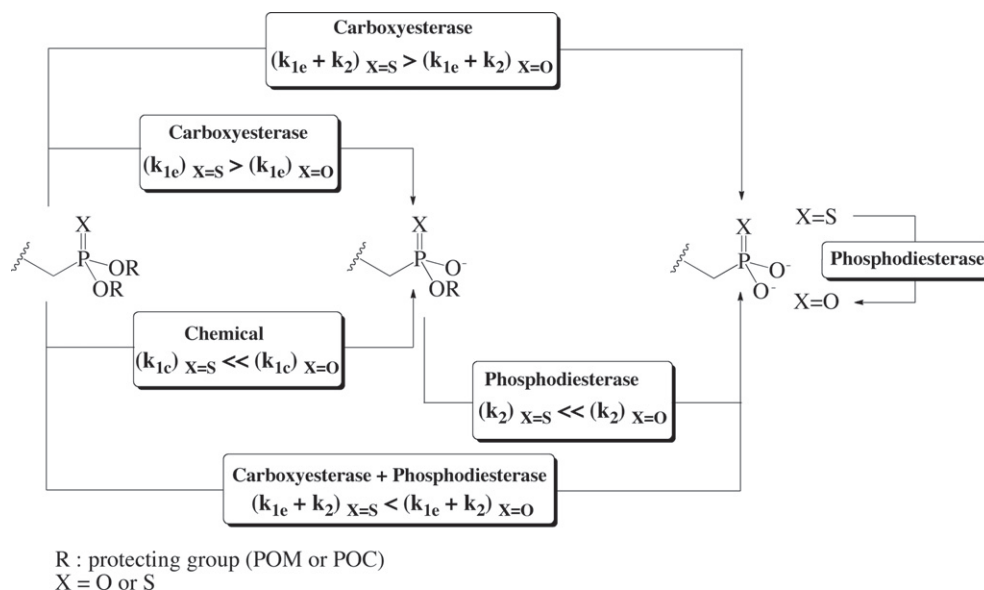
Pseudo-first-order rate constants ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) related to the enzymatic decomposition kinetic models of compounds **11–16** with purified enzymes: carboxyesterase (0.5 and 5 U/mL), phosphodiesterase (0.5 U/mL) and carboxyesterase + phosphodiesterase (0.5 U/mL).

Rate constant ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)	Carboxyesterase			Phosphodiesterase		Carboxyesterase + phosphodiesterase		
	0.5 U/mL		5 U/mL	0.5 U/mL		0.5 U/mL		
	k_1	k_{1e}	k_2	k_1^a	k_2	k_1	k_{1e}	k_2
13	140	130	1.78	4.80	NC ^b	120	110	3.65
11	230	60	<1.44	170	140	230	60	140
14	120	110	3.38	4.62	NC ^b	170	160	5.63
12	230	90	<1.44	140	120	150	10	60
16	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	3.85	ND ^c	ND ^c	ND ^c
15	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	230	ND ^c	ND ^c	ND ^c

^a $k_1 = k_{1c}$ with $k_{1e} = 0$, compounds **11–14** were not substrate of phosphodiesterase.

^b NC: k_2 could not be calculated.

^c ND: not determined.



Scheme 3. Possible pathways of enzymatic decomposition of the compounds **11–16** and comparison of decomposition kinetic rates between thiophosphonate compounds **13, 14** and **16** and phosphonate compounds **11, 12** and **15**.

In cell extracts, bis-POM and bis-POC-thiophosphonates were readily transformed to mono-POM and mono-POC-thiophosphonates. Very likely, this transformation occurred upon carboxyesterase activation of the thiophosphonate diester to the corresponding thiophosphonate monoester, which proved stable and was easily detected. The intermediate monoester was a poor substrate for cellular carboxyesterase(s) and for cellular phosphodiesterase(s). However, the parent compounds S-PMEA and S-PMPA were still efficiently released in cell extracts. In comparison, phosphonate diesters were hydrolyzed chemically predominantly into monoesters, which were then good substrates for intracellular phosphodiesterase(s).

In culture media, the same degradation pathway was observed, but the carboxyesterase-controlled step was significantly slower.

We observed also a minor degradation of parent compound S-PMEA and S-PMPA into PMEA and PMPA. This desulfuration may be mediated by phosphodiesterases [58]. It has been shown that phosphoramidases were also able to transform nucleoside 5'-O-phosphorothioates to nucleoside 5'-O-phosphates [59]. Additional studies concerning the elucidation of the mechanism of the enzyme-catalyzed desulfuration process should be performed.

3. Conclusion

In conclusion, we have investigated a novel practical synthetic procedure to efficiently obtain thiophosphonates S-PMEA **8** and S-PMPA **9** and their prodrug forms bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** using a common strategy, thereby limiting the number of synthetic steps. Compound **13** bis-POM-S-PMEA displayed interesting activity against HIV, HBV, HSV-1 and HSV-2 and compound **14** bis-POC-S-PMPA displayed potent activity against HIV-1, HIV-2 and HBV, but not HSV. Generally, the prodrug strategy led to an important increase of antiviral efficacy, especially against HIV for **13** and **14** and HSV for **13**. Sometimes (in case of PMEA) the increased antiviral activity was accompanied by an increase of the cytotoxicity. The thiophosphonate prodrugs **13** and **14** displayed the same antiviral specificity as the corresponding phosphonate prodrugs **11** and **12**.

Bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** behaved as prodrugs of S-PMEA and S-PMPA. Mono-POM-S-PMEA and

mono-POC-S-PMPA **16** were intermediates in the conversion process and permitted the proposition of a coherent kinetic scheme for the overall metabolic conversion sequence. Thiophosphonate diesters were good substrates of carboxyesterase(s) leading to the formation of thiophosphonate monoesters, which were then rather poor substrates of phosphodiesterase(s). Consequently, the parent compounds S-PMEA **8** and S-PMPA **9** were released smoothly in the cell extracts. Furthermore, the release of S-PMEA or S-PMPA in the cell extracts may explain the unexpected antiviral activity of this kind of bis-POC/bis-POM prodrugs in infected cell cultures. Moreover, the metabolism in cells of prodrug forms to release parent compounds is sufficiently different between thiophosphonate and phosphonate series to induce important differences in antiviral efficacy. Because, thiophosphonate prodrugs possess very long half-life in cell extracts, parent compounds are not effectively released and accumulated in cells and this is the limiting factor for antiviral efficacy. On the contrary, phosphonate prodrugs are quickly deprotected in cells, parent compounds are released efficiently, phosphorylated and could act effectively as chain terminators.

Finally, with this understanding of the conversion pathway and kinetic degradation of bis-POM-S-PMEA **13** and bis-POC-S-PMPA **14** in various biological media, it should be possible to rationally design other prodrugs to identify compounds with better metabolic and pharmacological characteristics for clinical use. In particular, the slow removal of the two protecting groups represents a first target for improvement. Optimizing the delivery of these active nucleoside thiophosphonates remains our major goal for the successful treatment of viral infections with these type of agents.

4. Experimental

4.1. Chemistry

The ^1H NMR, ^{13}C NMR and ^{31}P NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spectra were determined with a BRUKER AMX 250 MHz, a BRUKER Avance DPX 200 MHz and a BRUKER Avance III 600 MHz. Chemical shifts were expressed in ppm and coupling constants (J) are in hertz (s = singlet, d = doublet, dd = double doublet, ddd = double-double doublet, t = triplet, dt = double triplet,

m = multiplet). FAB High Resolution Mass Spectra (HRMS) were recorded in positive-ion mode on a JEOL SX 102 mass spectrometer using a caesium ion source and a glycerol/thioglycerol matrix; ESI High Resolution Mass Spectra were recorded in the negative-ion mode on a Micromass Q-TOF Waters (Laboratoire de Mesures Physiques RMN, USTL, Montpellier, France). Flash column chromatographies were performed on an MPLC SP4 system (Biotage®) with Biotage® SNAP cartridge HP-Sil columns. Analytical thin layer chromatographies (TLC) were performed on silica gel 60F 254 aluminium plates (Merck) of 0.2 mm thickness. The spots were examined with a UV light and Molybdenum blue spray. HPLC was performed on a Waters 600E controller system equipped with a 2998 photodiode array detector (detection 260 nm), auto-injector 717 and on-line degazer. HPLC-MS Coupling analyses were performed on a Thermofisher Accela 600 HPLC system (detection 260 nm) and a Finnigan surveyor MSQ (MS) with electrospray ionization mode (ESI +/-). The UV-detector was connected to the mass spectrometer, and the whole eluting flow was both UV and mass analyzed. Analyses were performed on a column Hypersil Gold C18 (2.1 × 50 mm, 1.9 μm) and samples were eluted at a flow of 550 μL/min and detection at 260 nm. Eluent A: 0.1% of Formic acid (Sigma Aldrich) in water; eluent B: 0.1% of Formic acid in acetonitrile. The gradient starts at 98% eluent A with an increase to 10% eluent B after 5 min, to 50% eluent B after 9 min and continues at 50% eluent B until 10 min, to 100% eluent B after 11 min and continues at 100% eluent B until 12 min.

Buffer solutions: HPLC, MPLC and HPLC-MS buffers are prepared daily. TEAB buffer: A 1 M triethylamine solution in water was prepared mixing 140 mL of a triethylamine solution with 860 mL of deionized water. A stock solution of triethylammonium bicarbonate buffer TEAB (pH 7.5) 1 M was prepared by addition of dry-ice in a 1 M triethylamine solution in water to reach pH 7.5 and filtered with membrane 0.22 μm GV-type (Millipore).

Analytical reverse phase (RP) chromatography was carried out on a column X-Bridge (3.5 μm, 4.6 × 150 mm) + precolumn X-Bridge C18 (5 μm, 100 Å, 10 × 10 mm) and samples were eluted at a flow rate of 1 mL/min and detection at 260 nm. Eluent A: 0.05 M triethylammonium bicarbonate buffer (pH 7.5); eluent B: solution A containing 50% of acetonitrile. S1: the gradient starts at 100% eluent A with an increase to 10% eluent B after 10 min, to 20% eluent B after 25 min, to 100% eluent B after 35 min and continues at 100% eluent B until 50 min.

Preparative purifications were achieved on HPLC system on a preparative column X-Bridge (5 μm, 10 × 250 mm) + precolumn X-Bridge C18 (5 μm, 100 Å, 10 × 10 mm) and the samples were eluted at a flow rate of 4.5 mL/min and detection at 260 nm. Eluent A: 0.05 M triethylammonium bicarbonate buffer (pH 7.5); eluent B: solution A containing 50% of acetonitrile. (S2: the gradient starts after 5 min at 100% eluent A with an increase to 20% eluent B after 35 min, to 100% eluent B after 40 min continues at 100% eluent B until 50 min).

4.1.1. General procedure for the synthesis of 9-[2-(diethylphosphonomethoxy)ethyl]adenine (4) and (R)-9-[2-(diethylphosphonomethoxy)propyl]adenine (5)

A solution of **1** or **2** (1 equiv, 50 mmol) and magnesium di-*tert*-butoxide (1 equiv, 50 mmol) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (440 mL) was stirred at room temperature under argon for 1 h. A solution of diethyl *p*-toluenesulfonyloxymethanephosphonate **3** (1 equiv, 50 mmol) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (33 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 14 h at 35 °C. Analytical samples (1 μL) were collected, quenched with 250 μL of triethylammonium bicarbonate 0.05 M and analysed by HPLC (S1). Solution of **3** (0.5 equiv, 25 mmol) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (100 mL) and magnesium di-*tert*-butoxide (0.5 equiv,

25 mmol) were added under argon and stirred for another 6 h. The reaction was quenched then with acetic acid 80% (10 mL) and concentrated under reduced pressure and co-evaporated with toluene. The residue dissolved in brine (500 mL) was extracted twice with hot chloroform (500 mL). The organic extracts were dried over magnesium sulphate, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel flash chromatography [eluent, stepwise gradient of methanol (0–10%) in dichloromethane] to give pure compound as a white solid.

4.1.1.1. 9-[2-(diethylphosphonomethoxy)ethyl]adenine (4)

Chemical formula : C₁₂H₂₀N₅O₄P, MW = 329.29 g/mol. Yield = 52%. According to the literature [17,27], *R_f* value 0.37 (DCM/MeOH, 9:1). HPLC ^tR = 36.4 min (S1), purity > 95%. ¹H NMR (CD₃OD) δ: 8.10 (s, 1H, H-2), 8.03 (s, 1H, H-8), 4.35 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂N), 3.93 (dq, *J* = 8.0 and *J* = 7.0 Hz, 4H, OCH₂CH₃), 3.86 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂O), 3.76 (d, *J_{PH}* = 8.5 Hz, 2H, CH₂P), 1.11 (t, *J* = 7.0, 6H, OCH₂CH₃). ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 157.29, 153.71, 150.67, 143.34, 119.34, 72.15 (d, *J* = 11.9 Hz), 66.63 (d, *J_{CP}* = 166 Hz), 63.99 (d, *J* = 6.6 Hz), 44.54, 16.62 (d, *J* = 5.8 Hz). ³¹P NMR (CD₃OD) δ: 21.56. MS (GT, FAB⁺): 136 (Adenine + 1H)⁺, 330 (M + 1H)⁺, 352 (M + Na)⁺.

4.1.1.2. (R)-9-[2-(diethylphosphonomethoxy)propyl]adenine (5)

Chemical formula : C₁₃H₂₂N₅O₄P, MW = 343.32 g/mol. Yield = 53%. According to the literature [17,27], *R_f* value 0.44 (DCM/MeOH, 9:1). HPLC ^tR = 37.2 min (S1), purity > 97%. ¹H NMR: (CD₃OD) δ: 8.23 (s, 1H, H-2), 8.15 (s, 1H, H-8), 4.41 (dd, *J* = 14.5 Hz and *J* = 3.2 Hz, 1H, CH₂N), 4.22 (dd, *J* = 14.5 Hz and *J* = 7.7 Hz, 1H, CH₂N), 4.10 (m, 1H, CHO), 4.03–3.69 (m, 6H, OCH₂CH₃ and CH₂P), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, OCH₂CH₃), 1.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃). ¹³C RMN (CD₃OD) δ: 157.30, 153.70, 150.89, 143.63, 119.70, 77.65 (d, *J* = 12.3 Hz), 64.32 (d, *J_{CP}* = 167 Hz), 64.08 (d, *J* = 6.6 Hz), 63.95 (d, *J* = 6.6 Hz), 49.18, 16.73 (d, *J* = 5.8 Hz), 16.71, 16.70 (d, *J* = 5.8 Hz). ³¹P RMN (CD₃OD) δ: 21.56. MS (GT, FAB⁺) : 136 (Adenine+1H)⁺, 344 (M+1H)⁺, 366 (M + Na)⁺, 687 (2M+1H)⁺.

4.1.2. General procedure for the synthesis of 9-[2-(diethylthiophosphonomethoxy)ethyl]adenine (6) and (R)-9-[2-(diethylthiophosphonomethoxy)propyl]adenine (7)

A solution of **4** or **5** (1 equiv, 10 mmol) and 2,4-Bis(methylthio)-1,3,2,4-dithiadiphosphetane-2,4-disulfide (1 equiv, 10 mmol) in anhydrous benzene (450 mL) was stirred at 80 °C for 2 h. The mixture was then stirred at 0 °C for 2 h. After a filtration through a celite pad, benzene was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel flash chromatography [eluent, stepwise gradient of methanol (0–5%) in dichloromethane] to afford the desired product as a white powder.

4.1.2.1. 9-[2-(diethylthiophosphonomethoxy)ethyl]adenine (6)

Chemical formula : C₁₂H₂₀N₅O₃PS, MW = 345.36 g/mol. Yield = 43%. *R_f* value 0.42 (DCM/MeOH, 9:1). HPLC ^tR 40.9 min (S1), purity > 85%. ¹H NMR: (CD₃OD) δ: 8.11 (s, 1H, H-2), 8.06 (s, 1H, H-8), 4.32 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H, CH₂N), 3.98–3.83 (m, 6H, OCH₂CH₃ and CH₂O), 3.76 (d, *J_{PH}* = 4.2 Hz, 2H, CH₂P), 1.09 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, OCH₂CH₃). ¹³C NMR: (CD₃OD) δ: 157.27, 153.63, 150.69, 143.55, 119.88, 72.37 (d, *J_{CP}* = 132.9 Hz), 71.87 (d, *J* = 8.6 Hz), 63.74 (d, *J* = 6.9 Hz), 44.68, 16.49 (d, *J* = 6.5 Hz). ³¹P NMR: (CD₃OD) δ: 88.02. MS (TOF, ESI⁺) : 346 (M+1H)⁺. HRMS (TOF, ESI⁺) calcd for C₁₂H₂₁N₅O₃PS (M + H)⁺ 346.1103, found 346.1105.

4.1.2.2. (R)-9-[2-(diethylthiophosphonomethoxy)propyl]adenine (7)

Chemical formula : C₁₃H₂₂N₅O₃PS, MW = 359.38 g/mol. Yield = 44%. *R_f* value 0.49 (DCM/MeOH, 9:1). HPLC ^tR 41.7 min (S1), purity > 85%. ¹H NMR: (CD₃OD) δ: 8.11 (s, 1H, H-2), 8.05 (s, 1H, H-8), 4.26 (dd, *J* = 14.3 Hz and *J* = 2.8 Hz, 1H, CH₂N), 4.08 (dd, *J* = 14.3 Hz

and $J = 8.1$ Hz, 1H, CH_2N), 4.00–3.73 (m, 6H, OCH_2CH_3 and CH_2P), 4.03–3.69 (m, 6H, CHO), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, OCH_2CH_3), 1.27 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 157.60, 153.60, 150.91, 143.89, 119.72, 77.35 (d, $J = 9.1$ Hz), 70.06 (d, $J_{\text{CP}} = 134.6$ Hz), 63.73 (d, $J = 7.3$ Hz), 63.62 (d, $J = 7.3$ Hz), 16.81, 16.55 (d, $J = 1.3$ Hz), 16.45 (d, $J = 1.1$ Hz). ^{31}P NMR: (CD_3OD) δ : 88.407. MS (TOF, ESI^+): 360 ($\text{M}+1\text{H}$) $^+$. HRMS (TOF, ESI^+) calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_3\text{PS}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 360.1260, found 360.1254.

4.1.3. General procedure for the synthesis of 9-[2-(thiophosphonomethoxy)ethyl]adenine (**8**) and (R)-9-[2-(thiophosphonomethoxy)propyl]adenine (**9**)

A solution of **6** or **7** (1 equiv, 3 mmol) and sodium bromide (40 equiv, 160 mmol) in anhydrous *N*-methylpyrrolidinone (20 mL) was stirred vigorously under argon. Trimethylsilyl chloride (40 equiv, 160 mmol) was added dropwise and the mixture was heated at 90 °C for 12 h. The reaction was quenched with 5 mL of triethylammonium bicarbonate 0.05 M and stirred for 1 h. After solvents were concentrated *in vacuo* and freeze-drying, the residue was purified by reversed-phase column chromatography (S2). Product fractions were collected, evaporated to dryness and lyophilized. Excess of triethylammonium bicarbonate was removed by repeated freeze-drying with deionized water. The residue was dissolved in water and eluted on a Dowex 50WX2 column (Na^+ exchange) to give the pure compound as disodium salt as a white powder after freeze-drying.

4.1.3.1. 9-[2-(thiophosphonomethoxy)ethyl]adenine (**8**)

Chemical formula : $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_3\text{PS}$, MW = 333.22 g/mol. Yield = 40%. HPLC ^1R 19.5 min (S1), purity > 98%. ^1H NMR : (D_2O) δ 8.13 (s, 1H, *H*-8), 8.01 (s, 1H, *H*-2), 4.28 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, CH_2N), 3.90 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, CH_2O), 3.62 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2P). ^{13}C NMR: (D_2O) δ 152.23, 149.12, 146.98, 141.98, 116.38, 73.01 (d, $J_{\text{CP}} = 120$ Hz), 68.57 (d, $J_{\text{CP}} = 10.6$ Hz), 42.27. ^{31}P NMR : (D_2O) δ 61.76 (t, $J = 5.2$ Hz). MS (TOF, ESI^+) : 290 ($\text{M}+1\text{H}$) $^+$. HRMS (TOF, ESI^+) calcd for $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3\text{PS}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 290.0477, found 290.0576.

4.1.3.2. (R)-9-[2-(thiophosphonomethoxy)propyl]adenine (**9**)

Chemical formula : $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_3\text{PS}$, MW = 347.24 g/mol. Yield = 48%. HPLC ^1R 21.7 min (S1), purity > 99%. ^1H NMR (D_2O) δ 8.12 (s, 1H, *H*-8), 7.98 (s, 1H, *H*-2), 4.22 (dd, $J = 3.1$ Hz and $J = 14.6$ Hz, 1H, CH_aN), 4.05 (dd, $J = 6.7$ Hz and $J = 14.6$ Hz, 1H, CH_bN), 3.91 (m, 1H, CHO), 3.62 (dd, $J = 5.6$ Hz and $J = 12.7$ Hz, 1H, CH_aP), 3.46 (dd, $J = 6.1$ Hz and $J = 12.8$ Hz, 1H, CH_bP), 1.05 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (D_2O) δ 152.65, 149.12, 147.25, 142.25, 116.26, 74.46 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz), 70.89 (d, $J_{\text{CP}} = 121.1$ Hz), 46.39, 14.73. ^{31}P NMR (D_2O) δ 61.11 (t, $J = 5.6$ Hz). MS (TOF, ESI^+) : 304 ($\text{M}+1\text{H}$) $^+$. HRMS (TOF, ESI^+) calcd for $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3\text{PS}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 304.0633, found 304.0619 (M) $^-$.

4.1.4. General procedure for the synthesis of 9-[2-[*O,O'*-bis(pivaloyloxymethyl)phosphonomethoxy]ethyl]adenine (**11**) and (R)-9-[2-[*O,O'*-bis(isopropoxycarbonyloxymethyl)phosphonomethoxy]propyl]adenine (**12**)

A solution of **4** or **5** (1 equiv, 10 mmol) and sodium bromide (2.1 equiv, 21 mmol) in anhydrous *N*-methylpyrrolidinone (10 mL) was stirred vigorously under argon. Trimethylsilyl chloride (4 equiv, 40 mmol) was added dropwise and the mixture was heated at 60 °C for 12 h. The reaction was monitored by HPLC until complete disappearance of the starting material (S1). When completion was observed, the reaction mixture was diluted with anhydrous ethyl acetate (16 mL) and stirred for 5 min. The ethyl acetate and remaining trimethylsilyl chloride were then concentrated *in vacuo* at 60 °C. Anhydrous isopropyl alcohol (1.5 mL) was then added to the reaction mixture and stirred for 15 min. The mixture was

diluted with anhydrous ethyl acetate (16 mL) and solvents were evaporated under reduced pressure at 60 °C. Chloromethyl pivalate (POMCl, 5 equiv, 50 mmol) for the synthesis of **11** or chloromethyl isopropylcarbonate **10** [50] (POCCI, 5 equiv, 50 mmol) for the synthesis of **12** and triethylamine (3 equiv, 30 mmol) were added to the mixture and the reaction mixture was stirred at 60 °C for 6 h. The reaction was diluted in anhydrous ethyl acetate (16 mL), stirred for 5 min, and the ethyl acetate and remaining triethylamine were concentrated *in vacuo* at 60 °C. The reaction mixture was diluted in ethyl acetate (160 mL) and extracted with water (60 mL), dried over magnesium sulphate, filtered, and concentrated to dryness under reduced pressure. The resulting oil was purified by silica gel flash chromatography [eluent, stepwise gradient of methanol (0–5%) in dichloromethane] to afford the desired product as a white powder.

4.1.4.1. 9-[2-[*O,O'*-Bis(pivaloyloxymethyl)phosphonomethoxy]ethyl]adenine (**11**). Chemical formula : $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$, MW = 501.47 g/mol. Yield = 27%. According to the literature [33]. R_f value 0.32 (DCM/MeOH, 9.5:0.5). HPLC ^1R 42.5 min (S1), purity > 90%. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.30 (s, 1H, *H*-8), 7.90 (s, 1H, *H*-2), 6.16 (s, 2H, NH_2), 5.69–5.54 (m, 4H, OCH_2O), 4.37 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH_2N), 3.92 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH_2O), 3.83 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH_2P), 1.18 (s, 18H, CH_3 (*t*-Bu)). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 155.76, 153.00, 149.99, 141.43, 119.52, 81.76 (d, $J = 6.3$ Hz), 71.48, 65.63 (d, $J = 166.1$ Hz), 43.43, 38.79, 26.89. ^{31}P NMR: (CDCl_3) δ 20.56. MS (TOF, ESI^+): 502 ($\text{M}+1\text{H}$) $^+$. HRMS (TOF, ESI^+) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 502.2067, found 502.2057.

4.1.4.2. (R)-9-[2-[*O,O'*-Bis(isopropoxycarbonyloxymethyl)phosphonomethoxy]propyl]adenine (**12**). Chemical formula : $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}$, MW = 519.44 g/mol. Yield = 33%. According to the literature [51]. R_f value 0.32 (DCM/MeOH, 9.5:0.5). HPLC ^1R 42.6 min (S1), purity > 90%. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.31 (s, 1H, *H*-8), 8.02 (s, 1H, *H*-2), 6.49 (s, 2H, NH_2), 5.70–5.57 (m, 4H, OCH_2O), 4.96–4.87 (m, 2H, $\text{CH}(i\text{-Pr})$), 4.37 (dd, $J = 14.5$ and 3.1 Hz, 1H, CH_aN), 4.15 (dd, $J = 14.5$ and 7.3 Hz, 1H, CH_bN), 3.94 (m, 2H, OCH_2P), 3.72 (dd, $J = 13.9$ and 9.0 Hz, 1H, CHO), 1.32–1.29 (m, 12H, $\text{CH}_3(i\text{-Pr})$), 1.22 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR: (CDCl_3) δ 155.29, 153.24, 153.21, 142.29, 84.44, 77.37, 77.16, 76.94, 76.71, 73.59, 63.76, 62.64, 48.38, 32.07, 29.84, 22.83, 21.77, 16.53, 14.24, 1.15. ^{31}P NMR : (CDCl_3) δ 20.99. MS (TOF, ESI^+): 520 ($\text{M} + 1\text{H}$) $^+$. HRMS (TOF, ESI^+) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}$ (M) $^+$ 520.1809, found 520.1802.

4.1.5. General procedure for the synthesis of 9-[2-[*O,O'*-bis(pivaloyloxymethyl)thiophosphonomethoxy]ethyl]adenine (**13**) and (R)-9-[2-[*O,O'*-bis(isopropoxycarbonyloxymethyl)thiophosphonomethoxy]propyl]adenine (**14**)

A solution of **11** or **12** (1 equiv, 2.5 mmol) and 2,4-Bis(methylthio)-1,3,2,4-dithiadiphosphetane-2,4-disulfide (1 equiv, 2.5 mmol) in anhydrous benzene (40 mL) was stirred at 80 °C for 30 min. The mixture was then stirred at 0 °C for 2 h. After filtration through a celite pad, benzene was concentrated *in vacuo* and the residue purified by silica gel flash chromatography [eluent, stepwise gradient of methanol (0–5%) in dichloromethane] to afford the desired product as a white powder.

4.1.5.1. 9-[2-[*O,O'*-Bis(pivaloyloxymethyl)thiophosphonomethoxy]ethyl]adenine (**13**). Chemical formula : $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_7\text{PS}$, MW = 517.54 g/mol. Yield = 29%. R_f value 0.39 (DCM/MeOH, 9.5:0.5). HPLC ^1R 46.1 min (S1), purity > 97%. ^1H NMR : (CDCl_3) δ : 8.73 (s, 1H, *H*-8), 8.11 (s, 1H, *H*-2), 7.26 (s, 2H, NH_2), 5.69–5.60 (m, 4H, OCH_2O), 4.40 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH_2N), 3.84 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH_2O), 3.96 (d, $J = 5$ Hz, 2H, CH_2P), 1.21 (s, 18H, $\text{CH}_3(t\text{-Bu})$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 155.64, 152.68, 149.63, 143.84, 122.7, 81.83 (d, $J = 6.2$ Hz), 71.23, 65.17 (d, $J = 166.1$ Hz), 48.66, 38.86, 26.95. ^{31}P RMN (CDCl_3) δ 88.89.

MS (TOF, ESI⁺) : 518 (M+1H)⁺. HRMS (TOF, ESI⁺) calcd for C₂₀H₃₃N₅O₇PS (M + H)⁺ 518.1838, found 518.1851.

4.1.5.2. (*R*)-9-[2-[*O*-(*Bis*(isopropoxycarbonyloxymethyl)thiophosphonomethoxy)propyl]adenine (**14**). Chemical formula : C₁₉H₃₀N₅O₉PS, MW = 535.51 g/mol. Yield = 32%. *R_f* value 0.38 (DCM/MeOH, 9.5:0.5). HPLC *t_R* 46.3 min (S1), purity > 98%. ¹H NMR: (CDCl₃) δ 8.31 (s, 1H, *H*-8), 8.23 (s, 1H, *H*-2), 6.49 (s, 2H, NH₂), 5.72–5.54 (m, 4H, OCH₂O), 4.91 (tq, *J* = 12.3 and *J* = 6.2 Hz, 2H, CH(*i*-Pr)), 4.43 (d, *J* = 13.7, 1H, CHaN), 4.16 (dd, *J* = 14.3 and *J* = 7.6 Hz, 1H, CHbN), 4.09–3.95 (m, 2H, OCH₂P), 3.75 (dd, *J* = 13.6 and *J* = 4.3 Hz, 1H, CHO), 1.32–1.29 (m, 12H, CH₃ (*i*-Pr)) 1.31 (d, *J* = 6.1, 3H, CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 153.24, 153.21, 151.74, 144.66, 118.45, 76.30 (d, *J* = 8.5 Hz), 73.58, 69.27 (d, *J* = 137 Hz), 48.90, 46.02, 29.82, 16.56, 8.77. ³¹P NMR (CDCl₃) δ 88.82. MS (TOF, ESI⁺) : 536 (M + 1H)⁺. HRMS: (TOF, ESI⁺) calcd for C₁₉H₃₁N₅O₉PS (M + H)⁺ 536.1580, found 536.1572.

4.1.6. General procedure for the synthesis of (*R*)-9-[2-[*O*-mono(isopropoxycarbonyloxymethyl)phosphonomethoxy]propyl]adenine (**15**) (*R*)-9-[2-[*O*-mono(isopropoxycarbonyloxymethyl)thiophosphonomethoxy]propyl]adenine (**16**)

A solution of **12** or **14** (1 equiv, 0.05 mmol) in water (5 mL) was stirred vigorously at 60 °C. The reaction was maintained at 60 °C and monitored by HPLC-MS for complete conversion to **15** or **16**. Typical retention times: *t_R* = 0.49 min, PMPA, ESI-MS [M + H] *m/z* = 288.0; *t_R* = 0.48 min, **9**, ESI-MS [M + H] *m/z* = 304.10; *t_R* = 4.78 min, **15**, ESI-MS [M + H] *m/z* = 404.09; *t_R* = 6.36 and 6.50 min (2 diastereoisomers), **16**, ESI-MS [M + H] *m/z* = 420.09; *t_R* = 8.04 min, **12**, ESI-MS [M + H] *m/z* = 520.19; *t_R* = 8.92 min, **14**, ESI-MS [M + H] *m/z* = 536.10. When completion was observed, the reaction mixture was extracted with ethyl acetate (5 mL) and the aqueous layer concentrated *in vacuo* and lyophilized. The crude product was purified on reverse phase C18 (biotage[®] SNAP cartridge KP-C18-HS 33g, flow : 10 mL/min, UV-detector : 260 nm, Eluent A : TEAB 0.05 M, eluent B : solution A containing 50% of acetonitrile, gradient starts at 100% eluent A with an increase to 10% eluent B after 66 min, to 20% eluent B after 83 min and to 100% eluent B after 116 min). Each fraction was analysed by HPLC (S1), pure fractions were collected and eluted on a Dowex 50WX2 column (Na⁺ exchange) to give the pure compound as sodium salt as a white powder after freeze-drying.

4.1.6.1. (*R*)-9-[2-[*O*-Mono(isopropoxycarbonyloxymethyl)phosphonomethoxy]propyl]adenine (**15**). Chemical formula : C₁₄H₂₁N₅NaO₇P, MW = 425.31 g/mol. Yield = 38%. HPLC *t_R* 37.7 min (S1), purity > 98%. ¹H NMR: (D₂O) δ: 8.26 (s, 1H, *H*-8), 8.23 (s, 1H, *H*-2), 5.29 (m, 2H, OCH₂O), 4.70 (dd, *J* = 12.6 and *J* = 6.3 Hz, 1H, CH(*i*-Pr)), 4.40 (dd, *J* = 14.8 and *J* = 2.7 Hz, 1H, CHaN), 4.24 (dd, *J* = 14.8 and *J* = 7.7 Hz, 1H, CHbN), 3.78 (dd, *J* = 13.1 and *J* = 8.7 Hz, 2H, OCH₂P), 3.46 (dd, *J* = 13.2 and *J* = 10.5 Hz, 1H, CHO), 1.23 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃), 1.18 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H, CH₃ (*i*-Pr)). ³¹P RMN (D₂O) δ 17.10. MS (ESI⁺): 404.09 (M + H)⁺; 807.23 (2M + H)⁺.

4.1.6.2. (*R*)-9-[2-[*O*-Mono(isopropoxycarbonyloxymethyl)thiophosphonomethoxy]propyl]adenine (**16**). Chemical formula: C₁₄H₂₁N₅NaO₆PS, MW = 441.38 g/mol. Yield = 30%. HPLC *t_R* 38.7 (fast-eluting isomer) and 38.9 (slow-eluting isomer) min (S1), purity > 98%. ¹H NMR (peaks of both diastereoisomers A and B are described): (D₂O) δ 8.29 (s, 4H, *H*-8 of A and B and *H*-2 of A and B), 5.50 (ddd, *J* = 21.0, *J* = 14.9 and *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂O of A), 5.39–5.34 (m, 2H, OCH₂O of B), 4.83–4.79 (m, 2H, CH(*i*-Pr) of A and B), 4.46–4.41 (m, 2H, CHaN of A and B), 4.30–4.22 (m, 2H, CHbN of A and B), 4.09–4.03 (m, 2H, CHO of A and B), 3.91 (dd, *J* = 13.2 and *J* = 5.1 Hz, 1H, OCH₃P of A), 3.83 (dd, *J* = 13.0 and *J* = 3.1 Hz, 1H,

OCH₃P of B), 3.64 (dd, *J* = 13.0 and *J* = 8.0 Hz, 1H, OCH₃P of A), 3.57 (dd, *J* = 13.2 and *J* = 5.0 Hz, 1H, OCH₃P of B), 1.29–1.21 (m, 18H, CH₃(*i*-Pr) and CH₃ of A and B). ³¹P NMR (D₂O) δ 72.91, 72.26 (peaks of both diastereoisomers are described). MS (ESI⁺): 420.09 (M + H)⁺; 839.18 (2M + H)⁺.

4.2. Antiviral activity in cells

4.2.1. Cells

CEM cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with antibiotics, and 10% foetal calf serum (FCS). The human hepatoma cell line Huh7 was grown in DMEM culture medium supplemented with 10% (FCS), 100 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin. Human embryonic lung HEL cells were propagated in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, and 0.075% bicarbonate.

4.2.2. Anti-HIV assay in cell cultures

The methodology of the anti-HIV assays was as follows: human CEM (~3 × 10⁵ cells/cm³) cells were infected with 100 CCID₅₀ of HIV(II_B) or HIV-2(ROD)/ml and seeded in 200 µL wells of a microtiter plate containing appropriate dilutions of the tested compounds **11**, **12**, **13** and **14**. After 4 days of incubation at 37 °C, HIV-induced CEM giant cell formation was examined microscopically. The 50% effective concentration (EC₅₀) was defined as the compound concentration required to inhibit syncytia formation by 50%. The 50% cytostatic concentration (CC₅₀) was defined as the compound concentration required to inhibit CEM cell proliferation by 50% in mock-infected cell cultures.

4.2.3. Anti-HBV assay in cells

For the Anti-HBV assay in the Huh7 cell cultures, the plasmid pTriEXMod-HBV, which contains 1.1 U of the HBV genome, enabled after cell transfection the production of pregenomic RNA under the control of the chicken beta actin promoter and therefore triggers HBV DNA synthesis. Huh7 cells (2 × 10⁵) were seeded in 12-well plates and were transfected 1 day post plating with 1.5 µg/well of pTriEXMod-HBV plasmid containing wt HBV genome, using the TransIT[®]-2020 Transfection Reagent (Mirus) according to the manufacturer's instructions. Medium was changed daily, and compound administration of **11**, **12**, **13** and **14**, with increasing concentrations (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 25 µM) was performed from day 3 to day 7 post transfection. Cells were then lysed for analysis of intracellular viral DNA. HBV DNA was purified from intracellular core particles as described earlier [60] and the quantity of HBV DNA was quantified by qPCR using Sybr Green. The qPCR was performed in a reaction volume of 20 µL using the Light Cycler 480 SYBR Green I Master mix with forward primer (5'-GCTGACGCAACCCCACT-3'; final concentration: 500 nM) and reversed primer (5'-AGGAG-TTCCGAGTATGG-3'; final concentration: 500 nM). The reaction was analysed using a Light Cycler 480 apparatus (Roche). A plasmid containing the full-length insert of the HBV genome was used to prepare the standard curve. The amount of viral DNA produced in drug-treated cell cultures was expressed as a percentage of the untreated samples.

4.2.4. Antiviral assay against a panel of DNA viruses

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) (KOS and KOS ACV TK⁻), HSV-2 (G), and vaccinia virus were assayed in HEL cell cultures. Cells were grown to confluency in 96-well microtiter trays and were inoculated with 100 times the 50% cell culture infective dose. Compounds **11**, **12**, **13** and **14**, were added to the virus-infected cell cultures. The virus-induced cytopathic effect (CPE) was recorded microscopically at 3 days post infection and the inhibition was expressed as a percentage of inhibition of the CPE in the untreated

controls. The 50% effective concentrations (EC_{50}) were derived from graphical plots. The minimal cytotoxic concentration (MCC) was defined as the minimal drug concentration that resulted in a microscopically detectable alteration of cell morphology. The MCC was determined in uninfected confluent cell cultures that were incubated, akin to the cultures used for the antiviral assays, with serial dilutions of the compounds for the same time period. Cultures were inspected microscopically for alteration of cell morphology.

4.3. Decomposition studies and metabolism

4.3.1. Media and preparation of cell extracts

Acidic buffer (pH 1.2) was prepared from 0.1 N HCl and the pH measured at 25 °C. RPMI-1640 medium and DMEM were purchased from Invitrogen. Heat-inactivated foetal calf serum (FCS) was purchased from PAN biotech. Culture media were supplemented with 10% FCS, 100 IU/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. CEM and Huh7 cell extracts were prepared as previously described [27,56]. Briefly, exponentially growing CEM or Huh7 cells were pelleted by centrifugation (500 g), washed with PBS, and resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM KCl, at the concentration of 30×10^6 cells/mL. Cells were lysed by ultrasonic treatment and cellular debris were removed by centrifugation (10,000 g, 20 min). The supernatant containing soluble proteins (3 mg/mL) was stored at –80 °C. Kinetic data of metabolism of compounds **8**, **9**, **11**, **12**, **13** and **14** were studied at 37 °C: (a) in water, (b) in acidic buffer (pH 1.2) prepared from 0.1 N HCl, (c) in non-enzymatic medium (RPMI-1640), (d) in culture medium (RPMI-1640 containing 10% heat-inactivated foetal calf serum), (e) in total cell extract (CEM cell) to mimic anti-HIV assay conditions, (f) in non-enzymatic medium (DMEM), (g) in culture medium (DMEM containing 10% heat-inactivated foetal calf serum), (h) in total cell extract (Huh7) to mimic anti-HBV assay conditions.

4.3.2. HPLC analyses

We used a previously described on-line HPLC cleaning method [56]. Analyses were performed on a column Nova-pak C18 (4 mm, 3.9×150 mm) + precolumn Nova-pack C18 (100 Å) with an on-line filtration system. Samples were eluted using a linear gradient of 0.005 M PIC A buffer in 100% water (buffer A) to a 0.005 M PIC A buffer in 50% acetonitrile (buffer B), programmed over a 60 min period with a flow rate of 1 mL/min and detection at 260 nm. A 0.005 M solution of tetrabutylammonium hydrogen sulphate buffer (PIC A) was prepared by addition of a vial of PIC A Low UV Reagent (WATERS) in 1 L of deionized water and filtered with membrane 0.22 µm GV-type (Millipore).

For each kinetic study, the compound solution was diluted with a freshly thawed aliquot of the considered medium to obtain a final concentration of 0.1 mM and the mixture was incubated at 37 °C. At the desired time, samples were injected into an analytical HPLC column where the analytical conditions make it possible to visualise and properly separate the starting compound from the corresponding metabolites. The crude sample (50 µL) was injected into the precolumn and eluted with buffer A during 4 min. Then, the switching valve for connecting the precolumn to the column was activated and a gradient S3 was applied: the gradient started at 100% eluent A with an increase to 10% eluent B after 6 min, to 15% eluent B after 11 min, to 100% eluent B after 21 min and continued at 100% eluent B until 33 min. The retention times are listed in Table 6.

4.3.3. Constant rate determination

All compounds could be accurately UV-detected (260 nm) and quantified. The nature of the metabolites was confirmed by

Table 6

Retention times (gradient : S3) of PMEAs, S-PMEAs **8**, PMPAs, S-PMPAs **9**, bis-POM-PMEAs **11**, bis-POC-PMPAs **12**, bis-POM-S-PMEAs **13** and bis-POC-S-PMPAs **14**.

Compounds	Retention time ^a R (min)
S-PMEA 8	23.0
PMEA	20.7
S-PMPA 9	24.6
PMPA	22.2
Mono-POM-S-PMEA	29.4
Mono-POM-PMEA	27.5
Mono-POC-S-PMPA Fast-eluting isomer 16	29.1
Mono-POC-S-PMPA Slow-eluting isomer 16	29.3
Mono-POC-PMPA 15	27.4
Bis-POM-S-PMEA 13	36.8
Bis-POM-PMEA 11	32.0
Bis-POC-S-PMPA 14	34.7
Bis-POC-PMPA 12	31.0

injection of authentic samples. Having assigned the various HPLC signals, the kinetic data were treated according to a general “consecutive-competitive pseudo-first order” model. The relative concentration of each component was calculated from the areas at 260 nm of the corresponding signals. The half-lives were deduced from experimental data following the disappearance of the peak area of the desired compound and the calculated rate constant of each decomposition step in different media were calculated with the equation (1)

$$K = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}} \text{ (competitive – consecutive pseudo – first order)} \quad (1)$$

The amount of remaining compound at each time point was used to determine the half-life of the compound.

4.3.4. Purified enzyme incubation studies

Porcine liver esterase (E9019) and phosphodiesterase I from *Crotalus adamanteus* venom (P3134) were purchased from Sigma–Aldrich. Porcine liver esterase was solubilized in a water/glycerol solution (50:50) at a final concentration of 50 U/mL. Phosphodiesterase I from *C. adamanteus* venom was solubilized in a water/glycerol solution (50:50) at a final concentration of 20 U/mL.

Porcine liver esterase assay (0.5 U/mL enzyme/50 µM substrate) [61,62]. 8 µL of a solution of compound **11**, **12**, **13**, or **14** in MeOH (4 mM) in 792 µL of buffer containing 80 µL of Tris–HCl/KCl (pH 7.5) and 8 µL of Porcine liver esterase solution (50 U/mL) were incubated at 37 °C. At different time intervals (0, 15, 45, 90 min), 200 µL of the sample were withdrawn and analyzed.

Porcine liver esterase assay (5 U/mL enzyme/50 µM substrate) [61,62]. 4 µL of a solution of compound **11**, **12**, **13**, or **14** in MeOH (5 mM) in 676 µL of buffer containing 80 µL of Tris–HCl/KCl (pH 7.5) and 40 µL of Porcine liver esterase solution (50 U/mL) were incubated at 37 °C. At different time intervals (0, 60, 120, 240 min), 200 µL of the sample were drawn and analyzed.

Phosphodiesterase I from *C. adamanteus* venom assay (0.5 U/mL enzyme/50 µM substrate) [61,62]. 8 µL of a solution of compound **11**, **12**, **13**, or **14** in MeOH (5 mM) or 20 µL of a solution of compound **15** or **16** in deionized water (2 mM) in 1768 or 1756 µL of buffer containing 200 µL of CHES/KCl (pH 9), 4 µL of MgCl₂ (1 M) and 20 µL of phosphodiesterase I from *C. adamanteus* venom solution (20 U/mL) were incubated at 37 °C. At different time intervals (0, 20, 30, 40, 60, 120, 240, 480 min) 200 µL of the sample were withdrawn and analyzed.

Phosphodiesterase I from *C. adamanteus* venom and Porcine liver esterase assay (0.5 U/mL enzyme/50 µM substrate) [61,62]. 8 µL of a solution of compound **11**, **12**, **13**, or **14** in MeOH (5 mM) in

1760 μL of buffer containing 200 μL of CHES/KCl (pH 9), 4 μL of MgCl_2 (1 M), 20 μL of phosphodiesterase I solution (20 U/mL) and 8 μL of Porcine liver esterase solution (50 U/mL) were incubated at 37 °C. At different time intervals (0, 20, 30, 40, 60, 120, 240, 480 min) 200 μL of the sample were drawn and analyzed. Each aliquot was centrifuged on Vivacon500® (Sartorius Stedim Biotech, 2000 MWCO) for 45 min at 14000 G at 4 °C to remove protein materials. 300 μL of filtrate were collected and diluted with 300 μL of TEAB 0.1 M.

HPLC analyses were performed on a column Nova-pak C18 (4 mm, 3.9 \times 150 mm) + precolumn Nova-pack C18 (100 Å). Eluent A: 0.1 M triethylammonium bicarbonate buffer (pH 7.5); eluent B: solution A containing 50% of acetonitrile. Gradient S4 was applied: the gradient started at 100% eluent A with an increase to 10% eluent B after 20 min, to 20% eluent B after 25 min, to 100% eluent B after 35 min and continued at 100% eluent B until 45 min. All compounds were accurately UV-detected (260 nm) and quantified. The nature of the metabolites was confirmed by injection of authentic samples. Having assigned the various HPLC signals, the kinetic data were treated according to a general “consecutive-competitive pseudo-first order” model. The relative concentration of each component was calculated from the areas at 260 nm of the corresponding signals. The half-lives were deduced from experimental data following the disappearance of the peak area of the desired compound and the calculated rate constant of each decomposition step in different media were calculated with the equation (1).

Acknowledgements

This work was supported by grant from the French “Agence Nationale de Recherche Contre le Sida et les hépatites virales” (ANRS), by SIDACTION and KU Leuven (GOA no. 10/14). Loïc Roux is particularly grateful to SIDACTION for a his PhD fellowship. We wish to thank, A. Lebrun and Dr G. Valette (Université Montpellier II, Montpellier, France) for their expertise in conducting NMR experiments and mass spectrometry analysis, and L. Ingels, L. Persoons and F. De Meyer for excellent technical assistance in the antiviral assays.

Appendix A. Supporting information

Supporting information related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.039>.

References

- [1] E. De Clercq, A. Holy, *Nat. Rev. Drug Discovery* 4 (2005) 928–940.
- [2] E. De Clercq, *Antiviral. Res.* 75 (2007) 1–13.
- [3] A. Holy, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 2567–2592.
- [4] J. Lalezari, T. Schacker, J. Feinberg, J. Gathe, S. Lee, T. Cheung, F. Kramer, H. Kessler, L. Corey, W.L. Drew, *J. Infect. Dis.* 176 (1997) 892–898.
- [5] A. Duarte-Rojo, E.J. Heathcote, *Ther. Adv. Gastroenterol.* 3 (2010) 107–119.
- [6] A.M. Jenh, P.A. Pham, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 8 (2010) 1079–1092.
- [7] E. De Clercq, *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2003) 569–596.
- [8] P.L. Sharma, V. Nurpeisov, B. Hernandez-Santiago, T. Beltran, R.F. Schinazi, *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 895–919.
- [9] B.L. Robbins, M.C. Connelly, D.R. Marshall, R.V. Srinivas, A. Fridland, *Mol. Pharmacol.* 47 (1995) 391–397.
- [10] B.L. Robbins, J. Greenhaw, M.C. Connelly, A. Fridland, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 2304–2308.
- [11] B.L. Robbins, R.V. Srinivas, C. Kim, N. Bischofberger, A. Fridland, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (1998) 612–617.
- [12] A. Holy, *Collect. Symp. Ser.* 5 (2002) 24–35.
- [13] D. Hocková, A. Holy, M. Masojdková, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 5064–5073.
- [14] P. Dolakova, M. Dracinsky, M. Masojdkova, V. Solinova, V. Kasicka, A. Holy, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 2408–2424.
- [15] J. Balzarini, P.C.E. De Clercq, S. Aquaro, C.F. Perno, H. Egberink, A. Holy, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2185–2193.
- [16] A. Holy, I. Votruba, E. Tlustova, M. Masojdkova, *Collec. Czech. Chem. Commun.* 66 (2001) 1545–1592.
- [17] A. Holy, J. Günter, H. Dvoráková, M. Masojdková, G. Andrei, R. Snoeck, J. Balzarini, E. De Clercq, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 2064–2086.
- [18] A. Holy, H. Dvorakova, J. Jindrich, M. Masojdkova, M. Budesinsky, J. Balzarini, G. Andrei, E. De Clercq, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 4073–4088.
- [19] C. Ying, A. Holy, D. Hocková, Z. Havlas, E. De Clercq, J. Neyts, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 1177–1180.
- [20] E. De Clercq, G. Andrei, J. Balzarini, P. Leyssen, L. Naesens, J. Neyts, C. Pannecouque, R. Snoeck, C. Ying, D. Hocková, A. Holy, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* 24 (2005) 331–341.
- [21] T. Tichy, G. Andrei, M. Dracinsky, A. Holy, J. Balzarini, R. Snoeck, M. Krecmerova, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 3527–3539.
- [22] J. Ruiz, J.R. Beadle, M. Buller, J. Schreier, M.N. Prichard, K.A. Keith, K.C. Lewis, K.Y. Hostetler, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 2950–2958.
- [23] C. Meier, U. Görbig, C. Müller, J. Balzarini, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 8079–8086.
- [24] S.J. Hecker, M.D. Erion, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 2328–2345.
- [25] M.D. Erion, K.R. Reddy, S.H. Boyer, M.C. Matelich, J. Gomez-Galeno, R.H. Lemus, B.G. Ugarkar, T.J. Colby, J. Schanzer, P.D. Van Poelje, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5154–5163.
- [26] R.L. Mackman, L. Zhang, V. Prasad, C.G. Boojamra, J. Douglas, D. Grant, H. Hui, C.U. Kim, G. Laflamme, J. Parrish, A.D. Stoycheva, S. Swaminathan, K. Wang, T. Cihlar, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 5519–5528.
- [27] K. Barral, S. Priet, J. Sire, J. Neyts, J. Balzarini, B. Canard, K. Alvarez, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 7799–7806.
- [28] K. Barral, C. Weck, N. Payrot, L. Roux, C. Durafour, F. Zoulim, J. Neyts, J. Balzarini, B. Canard, S. Priet, K. Alvarez, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4281–4288.
- [29] B. Canard, K. Alvarez, K. Barral, J.L. Romette, J. Neyts, J. Balzarini, *PCT/IB2007/004233*, 2008.
- [30] X. Kui, W. Wei, L. Jingxing, 200910116015, 2009.
- [31] T. Calogeropoulou, A. Detsi, E. Lekkas, M. Koufaki, *Curr. Top. Med. Chem.* 3 (2003) 1467–1495.
- [32] A.S. Ray, K.Y. Hostetler, *Antiviral Res.* 92 (2011) 277–291.
- [33] R.V. Srinivas, B.L. Robbins, M.C. Connelly, Y.F. Gong, N. Bischofberger, A. Fridland, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 (1993) 2247–2250.
- [34] L. Nassens, J. Balzarini, E. De Clercq, *Med. Virol.* 4 (1994) 147–159.
- [35] G.H. Hakimelahi, T.W. Ly, A.A. Moosavi-Movahedi, M.L. Jain, M. Zakerinia, H. Davari, H.-C. Mei, T. Sambaiah, A.A. Moshfegh, S. Hakimelahi, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 3710–3720.
- [36] P. Pospisil, B.D. Pilger, S. Marveggio, P. Schelling, C. Wurth, L. Scapozza, G. Folkers, *Helv. Chim. Acta* 85 (2002) 3237–3250.
- [37] L.M. Schultze, H.H. Chapman, R.J.J. Dubree, K.M. Kent, T.T. Lee, M.S. Louie, M.J. Postich, E.J. Prisbe, J.C. Rohloff, R.H. Yu, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 1853–1856.
- [38] A. Holy, H. Dvorakova, M. Masojdkova, *Collec. Czech. Chem. Commun.* 60 (1995) 1390–1409.
- [39] P.R. Jenkins, *Organometallic Reagents in Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, 1994.
- [40] A.L. Jeffery, J.-H. Kim, D.F. Wiemer, *Tetrahedron* 56 (2000) 5077–5083.
- [41] M.W. Becker, H.H. Chapman, T. Cihlar, E.J. Eisenberg, G.-X. He, M.R. Kernan, W.A. Lee, E.J. Prisbe, J.C. Rohloff, M.L. Sparacino, *WO/0208241A32002*, 2002.
- [42] S.R. Houghton, J. Melton, J. Fortunak, B.R.D. H, C.N. Boddy, *Tetrahedron* 66 (2010) 8137–8144.
- [43] D.H.B. Ripin, D. Teager, J. Fortunak, K. Basha, N. Bivins, C.N. Boddy, S. Byrn, K. Catlin, S.R. Houghton, S.T. Jagadeesh, K.A. Kumar, J. Melton, K. Muneer, L.N. Rao, R.V. Rao, N.G. Reddy, R.M. Reddy, K.C. Shekar, T. Silverton, D.T. Smith, R. Stringham, F. Talley, A. Williams, *Org. Process. Res. Dev.* 14 (2010) 1194–1201.
- [44] S.R. Piettre, *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 4707–4710.
- [45] S.R. Piettre, P. Raboisson, *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 2229–2232.
- [46] H. Lu, C.E. Berkman, *Bioorg. Med. Chem.* 9 (2001) 395–402.
- [47] C. Lopin, G. Gouhier, S.R. Piettre, *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 8837–8840.
- [48] B. Boerecka, J. Chojnowski, M. Cyprvk, J. Michalski, J. Zielinska, *J. Organomet. Chem.* 171 (1979) 17–34.
- [49] T. Yokomatzu, H. Takechi, T. Murano, S. Shibuya, *J. Org. Chem.* 65 (2000) 5858–5861.
- [50] J.D. Thomas, K.B. Sloan, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 109–112.
- [51] M.N. Arimilli, C.U. Kim, J. Dougherty, A.S. Mulato, R. Oliyai, J.P. Shaw, K.C. Cundy, N. Bischofberger, *Antiviral Chem. Chemother.* 8 (1997) 557–564.
- [52] L.-C. Yuan, T.C. Dalh, R. Oliyai, *Pharm. Res.* 18 (2001) 234–237.
- [53] J. Zemlicka, *Biochim. Biophys. Acta* 1587 (2002) 276–286.
- [54] C. McGuigan, K.G. Devine, T.J. O'Connor, D. Kinchington, *Antiviral. Res.* 15 (1991) 255–263.
- [55] D. Farquhar, R. Chen, S. Khan, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 488–495.
- [56] F. Puech, G. Gosselin, I. Lefebvre, A. Pompon, A.-M. Aubertin, A. Kirn, J.-L. Imbac, *Antiviral. Res.* 22 (1993) 155–174.
- [57] R.S.H. Yang, E. Hodgson, W.C. Dauterman, *J. Agric. Food Chem.* 19 (1971) 10–13.
- [58] C.B. Reese, H. Yan, *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 2501–2504.
- [59] M. Ozga, R. Dolot, M. Janicka, R. Kaczmarek, A. Krakowiak, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 40809–40818.
- [60] A.L. Horwich, K. Furtak, J. Pugh, *J. Summers, J. Virol.* 62 (1990) 642–650.
- [61] I. Hynië, M. M, W.J. Poznanski, *Clin. Chem.* 21 (1975) 1383–1387.
- [62] W.E. Razzell, H.G. Khorana, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 2105–2113.

Discussion de l'étude 3

Chaque année, le nombre de personnes résistantes aux traitements antiviraux ne cesse d'augmenter, bien que, depuis 2005 et l'approbation du ténofovir disoproxil fumarate comme traitement contre le HBV, aucun cas de résistance à cet antiviral n'a été mis en évidence *in vivo*. Malgré tout, l'amélioration de ces traitements reste un axe majeur afin d'augmenter leur efficacité, biodisponibilité et diminuer la sélection potentielle de virus résistants.

Cette modification des antiviraux cible principalement le groupement phosphonate, site catalytique de la molécule, soit en y ajoutant des chaînes, soit en changeant des atomes (Barral et al., 2011; Ruiz et al., 2011; Tichý et al., 2011). Cette transformation du groupement phosphonate peut causer des perturbations qui pourraient créer un avantage dans l'efficacité catalytique ou la capacité de fixation de la molécule sur son substrat.

Une précédente étude a montré l'intérêt et la faisabilité de la modification d'un atome d'oxygène par un atome de soufre en position α du groupement phosphonate. En effet, le PMEAs, ou adéfovir, et le PMPA, ou ténofovir, ont une forte efficacité antivirale et sont stables *in vitro* lorsqu'ils sont administrés sous leurs formes thiophosphonates S-PMEAs ou S-PMPA dans lesquelles l'atome d'oxygène est remplacé par l'atome de soufre contre le HBV (Barral et al., 2011). Néanmoins, sous cette forme, les antiviraux ont une faible perméabilité à travers la membrane de l'intestin et donc une plus faible activité que les prodrogues (Lee and Martin, 2006).

C'est pourquoi, le remplacement de l'atome d'oxygène a ensuite été testé sur les prodrogues de l'adéfovir (Bis-POM-PMEAs) et du ténofovir (Bis-POC-PMPA) qui sont les formes biodisponibles administrées en clinique. Ces formes thiophosphonates diesters (bis-POC-S-PMPA et bis-POM-S-PMEAs) montrent une activité antivirale intéressante contre le HIV, HSV-1 et 2 ainsi qu'HBV. Cependant, concernant le HBV, les formes thiophosphonates ne sont pas plus efficaces que les formes non-thiophosphonates.

L'étude de décomposition des composés thiophosphonates diesters en thiophosphonates monoesters puis en composés actifs (S-PMEAs ou S-PMPA) a permis de mettre en évidence la raison pour laquelle les formes thiophosphonates sont moins efficaces comparées aux formes non-thiophosphonates. En effet, les formes thiophosphonates diesters sont facilement converties en thiophosphonates monoesters via l'action des carboxyestérases. En revanche, cette forme intermédiaire thiophosphonate monoester est un mauvais substrat pour les phosphodiesterases. De ce fait, peu de composés actifs sont relâchés dans le milieu expliquant l'efficacité plus faible des formes thiophosphonates.

L'optimisation de la conversion des formes thiophosphonates en composés actifs reste donc l'étape à améliorer.

Références bibliographiques

- Asahina, Y., Enomoto, N., Ogura, Y., Kurosaki, M., Sakuma, I., Izumi, N., Marumo, F., and Sato, C. (1996). Sequential changes in full-length genomes of hepatitis B virus accompanying acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* *25*, 787–794.
- Barral, K., Weck, C., Payrot, N., Roux, L., Durafour, C., Zoulim, F., Neyts, J., Balzarini, J., Canard, B., Priet, S., et al. (2011). Acyclic nucleoside thiophosphonates as potent inhibitors of HIV and HBV replication. *Eur. J. Med. Chem.* *46*, 4281–4288.
- Beck, J., and Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol. WJG* *13*, 48–64.
- Belloni, L., Pollicino, T., De Nicola, F., Guerrieri, F., Raffa, G., Fanciulli, M., Raimondo, G., and Levrero, M. (2009). Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 19975–19979.
- Belloni, L., Allweiss, L., Guerrieri, F., Pediconi, N., Volz, T., Pollicino, T., Petersen, J., Raimondo, G., Dandri, M., and Levrero, M. (2012). IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J. Clin. Invest.* *122*, 529–537.
- Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M.-A., and Neuveut, C. (2009). Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv. Cancer Res.* *103*, 75–109.
- Bertoletti, A., Tan, A.T., and Gehring, A.J. (2009). HBV-Specific Adaptive Immunity. *Viruses* *1*, 91–103.
- Billioud, G., Pichoud, C., Puerstinger, G., Neyts, J., and Zoulim, F. (2011). The main hepatitis B virus (HBV) mutants resistant to nucleoside analogs are susceptible in vitro to non-nucleoside inhibitors of HBV replication. *Antiviral Res.* *92*, 271–276.
- Birnbaum, F., and Nassal, M. (1990). Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J. Virol.* *64*, 3319–3330.
- Bloom, K., Ely, A., Mussolino, C., Cathomen, T., and Arbuthnot, P. (2013). Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered Transcription Activator-Like Effector Nucleases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*
- Blumberg, B.S. (1964). Polymorphisms of the serum proteins and the development of iso-precipitins in transfused patients. *Bull. N. Y. Acad. Med.* *40*, 377–386.
- Bock, C.T., Schranz, P., Schröder, C.H., and Zentgraf, H. (1994). Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* *8*, 215–229.
- Bock, C.T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M.P., Trautwein, C., and Zentgraf, H. (2001). Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* *307*, 183–196.
- Bourne, E.J., Dienstag, J.L., Lopez, V.A., Sander, T.J., Longlet, J.M., Hall, J.G., Kwiatkowski, R.W., Wright, T., Lai, C.L., and Condreay, L.D. (2007). Quantitative analysis of HBV cccDNA from clinical specimens: correlation with clinical and virological response during antiviral therapy. *J. Viral Hepat.* *14*, 55–63.
- Breiner, K.M., Urban, S., and Schaller, H. (1998). Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J. Virol.* *72*, 8098–8104.
- Brezillon, N., Brunelle, M.-N., Massinet, H., Giang, E., Lamant, C., DaSilva, L., Berissi, S., Belghiti, J., Hannoun, L., Puerstinger, G., et al. (2011). Antiviral activity of Bay 41-4109 on hepatitis B virus in humanized Alb-uPA/SCID mice. *PLoS One* *6*, e25096.
- Brind, A., Jiang, J., Samuel, D., Gigou, M., Feray, C., Bréchet, C., and Kremsdorf, D. (1997). Evidence for selection of hepatitis B mutants after liver transplantation through peripheral blood mononuclear cell infection. *J. Hepatol.* *26*, 228–235.
- Bruss, V. (2004). Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res.* *106*, 199–209.
- Bruss, V. (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol. WJG* *13*, 65–73.
- Bruss, V., and Ganem, D. (1991). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 1059–1063.
- Cai, D., Mills, C., Yu, W., Yan, R., Aldrich, C.E., Saputelli, J.R., Mason, W.S., Xu, X., Guo, J.-T., Block, T.M., et al. (2012). Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 4277–4288.
- CDC (2013). <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/VaccAdults.htm>.
- Chain, B.M., and Myers, R. (2005). Variability and conservation in hepatitis B virus core protein. *BMC Microbiol.* *5*, 33.
- Chan, H.L.-Y., Thompson, A., Martinot-Peignoux, M., Piratvisuth, T., Cornberg, M., Brunetto, M.R., Tillmann, H.L., Kao, J.-H., Jia, J.-D., Wedemeyer, H., et al. (2011). Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report. *J. Hepatol.* *55*, 1121–1131.

Chen, P., Gan, Y., Han, N., Fang, W., Li, J., Zhao, F., Hu, K., and Rayner, S. (2013). Computational evolutionary analysis of the overlapped surface (S) and polymerase (P) region in hepatitis B virus indicates the spacer domain in P is crucial for survival. *PloS One* *8*, e60098.

Chisari, F.V., Isogawa, M., and Wieland, S.F. (2010). Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol. Biol. (Paris)* *58*, 258–266.

De Clercq, E., Sakuma, T., Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Rosenberg, I., and Holý, A. (1987). Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antiviral Res.* *8*, 261–272.

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deléage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 147–150.

Cougot, D., Wu, Y., Cairo, S., Caramel, J., Renard, C.-A., Lévy, L., Buendia, M.A., and Neuveut, C. (2007). The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* *282*, 4277–4287.

Covey, S.N., and Turner, D.S. (1991). Comparison of viral nucleic acid intermediates at early and late stages of cauliflower mosaic virus infection suggests a feedback regulatory mechanism. *J. Gen. Virol.* *72 (Pt 10)*, 2603–2606.

Covey, S.N., and Turner, D.S. (1993). Changes in populations of cauliflower mosaic virus DNA and RNA forms during turnip callus proliferation. *J. Gen. Virol.* *74 (Pt 9)*, 1887–1893.

Cradick, T.J., Keck, K., Bradshaw, S., Jamieson, A.C., and McCaffrey, A.P. (2010). Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *18*, 947–954.

Dandri, M., and Locarnini, S. (2012). New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut* *61 Suppl 1*, i6–17.

Dandri, M., and Petersen, J. (2012). Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* *56*, 493–495.

Dandri, M., Burda, M.R., Török, E., Pollok, J.M., Iwanska, A., Sommer, G., Rogiers, X., Rogler, C.E., Gupta, S., Will, H., et al. (2001). Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatol. Baltim. Md* *33*, 981–988.

Dandri, M., Lütgehetmann, M., and Petersen, J. (2013). Experimental models and therapeutic approaches for HBV. *Semin. Immunopathol.* *35*, 7–21.

Davis, G.L., Hoofnagle, J.H., and Waggoner, J.G. (1984). Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* *86*, 230–235.

Delaney, W.E., 4th, Edwards, R., Colledge, D., Shaw, T., Furman, P., Painter, G., and Locarnini, S. (2002). Phenylpropenamide derivatives AT-61 and AT-130 inhibit replication of wild-type and lamivudine-resistant strains of hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 3057–3060.

Delmas, J., Schorr, O., Jamard, C., Gibbs, C., Trépo, C., Hantz, O., and Zoulim, F. (2002). Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus-infected hepatocytes in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 425–433.

Dény, P., and Zoulim, F. (2010). Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol. Biol. (Paris)* *58*, 245–253.

Dhason, M.S., Wang, J.C.-Y., Hagan, M.F., and Zlotnick, A. (2012). Differential assembly of Hepatitis B Virus core protein on single- and double-stranded nucleic acid suggest the dsDNA-filled core is spring-loaded. *Virology* *430*, 20–29.

Dienstag, J.L. (2008). Hepatitis B Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* *359*, 1486–1500.

Dong, Z., Wei, H., Sun, R., and Tian, Z. (2007). The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration. *Cell. Mol. Immunol.* *4*, 241–252.

Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *32 Suppl 1*, S7–15.

Durantel, D., Carrouée-Durantel, S., Werle-Lapostolle, B., Brunelle, M.-N., Pichoud, C., Trépo, C., and Zoulim, F. (2004). A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus. *Hepatol. Baltim. Md* *40*, 855–864.

EASL (2012). EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* *57*, 167–185.

Fisicaro, P., Valdatta, C., Boni, C., Massari, M., Mori, C., Zerbini, A., Orlandini, A., Sacchelli, L., Missale, G., and Ferrari, C. (2009). Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut* *58*, 974–982.

De Franchis, R., Hadengue, A., Lau, G., Lavanchy, D., Lok, A., McIntyre, N., Mele, A., Paumgartner, G., Pietrangelo, A., Rodés, J., et al. (2003). EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version). *J. Hepatol.* *39 Suppl 1*, S3–25.

Fujimoto, A., Totoki, Y., Abe, T., Boroevich, K.A., Hosoda, F., Nguyen, H.H., Aoki, M., Hosono, N., Kubo, M., Miya, F., et al. (2012). Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat. Genet.* *44*, 760–764.

Funk, A., Mhamdi, M., Hohenberg, H., Will, H., and Sirma, H. (2006). pH-independent entry and sequential endosomal sorting are major determinants of hepadnaviral infection in primary hepatocytes. *Hepatology*. Baltimore, Md 44, 685–693.

Galle, P.R., Schlicht, H.J., Fischer, M., and Schaller, H. (1988). Production of infectious duck hepatitis B virus in a human hepatoma cell line. *J. Virol.* 62, 1736–1740.

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

Gao, W., and Hu, J. (2007). Formation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: removal of genome-linked protein. *J. Virol.* 81, 6164–6174.

Gerelsaikhan, T., Tavis, J.E., and Bruss, V. (1996). Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J. Virol.* 70, 4269–4274.

Girones, R., and Miller, R.H. (1989). Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* 170, 595–597.

Gish, R., Jia, J.-D., Locarnini, S., and Zoulim, F. (2012). Selection of chronic hepatitis B therapy with high barrier to resistance. *Lancet Infect. Dis.* 12, 341–353.

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., and Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15655–15660.

Gruffaz, M., Testoni, B., Luangsay, S., Fusil, F., Ait-Goughoulte, M., Mancip, J., Petit, M.-A., Javanbakht, H., Klumpp, K., Cosset, F.-L., et al. Virion-associated Hepatitis B core (HBc) protein is a very early negative regulator of the IFN response. Submitted.

Guerrieri, F., Belloni, L., Pediconi, N., and Levvero, M. (2013). Molecular mechanisms of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Semin. Liver Dis.* 33, 147–156.

Guguen-Guillouzo, C., Gripon, P., Vandenbergh, Y., Lamballe, F., Ratanasavanh, D., and Guillouzo, A. (1988). Hepatotoxicity and molecular aspects of hepatocyte function in primary culture. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 18, 773–783.

Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I.B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., et al. (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 44, 694–698.

Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F.V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4, 25–36.

Guo, H., Jiang, D., Zhou, T., Cuconati, A., Block, T.M., and Guo, J.-T. (2007). Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. *J. Virol.* 81, 12472–12484.

Guo, H., Mao, R., Block, T.M., and Guo, J.-T. (2010a). Production and function of the cytoplasmic deproteinized relaxed circular DNA of hepadnaviruses. *J. Virol.* 84, 387–396.

Guo, X., Zhang, Y., Li, J., Ma, J., Wei, Z., Tan, W., and O'Brien, S.J. (2010b). Strong influence of human leukocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population. *Hepatology*. Baltimore, Md.

Guo, Y.-H., Li, Y.-N., Zhao, J.-R., Zhang, J., and Yan, Z. (2011). HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* 6, 720–726.

Halpern, M.S., England, J.M., Deery, D.T., Petcu, D.J., Mason, W.S., and Molnar-Kimber, K.L. (1983). Viral nucleic acid synthesis and antigen accumulation in pancreas and kidney of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 4865–4869.

Hantz, O., Parent, R., Durantel, D., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., and Zoulim, F. (2009). Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J. Gen. Virol.* 90, 127–135.

Hartmann-Stühler, C., and Prange, R. (2001). Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J. Virol.* 75, 5343–5351.

Hassell, J.A., and Brinton, B.T. (1996). SV40 and polyomavirus DNA replication. In *DNA Replication in Eukaryotic Cells*, pp. 639–677.

Hayer, J., Jadeau, F., Deléage, G., Kay, A., Zoulim, F., and Combet, C. (2013). HBVdb: a knowledge database for Hepatitis B Virus. *Nucleic Acids Res.* 41, D566–570.

Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., and Gerlich, W.H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J. Virol.* 52, 396–402.

Horwich, A.L., Furtak, K., Pugh, J., and Summers, J. (1990). Synthesis of hepadnavirus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HuH7 cells. *J. Virol.* 64, 642–650.

Hösel, M., Quasdorff, M., Wiegmann, K., Webb, D., Zedler, U., Broxtermann, M., Tedjokusumo, R., Esser, K., Arzberger, S., Kirschning, C.J., et al. (2009). Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. Baltimore, Md 50, 1773–1782.

- Hu, J., Flores, D., Toft, D., Wang, X., and Nguyen, D. (2004). Requirement of heat shock protein 90 for human hepatitis B virus reverse transcriptase function. *J. Virol.* *78*, 13122–13131.
- Hu, J., Cui, J., Guo, J., Zhang, W., Cai, X., Yuan, Z., Li, Q., Deng, X., Zeng, A., Hu, Y., et al. (2012). Phenotypic assay of a hepatitis B virus strain carrying an rtS246T variant using a new strategy. *J. Med. Virol.* *84*, 34–43.
- Huang, H.-C., Chen, C.-C., Chang, W.-C., Tao, M.-H., and Huang, C. (2012). Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J. Virol.* *86*, 9443–9453.
- Huovila, A.P., Eder, A.M., and Fuller, S.D. (1992). Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J. Cell Biol.* *118*, 1305–1320.
- Ishibashi, H., Nakamura, M., Komori, A., Migita, K., and Shimoda, S. (2009). Liver architecture, cell function, and disease. *Semin. Immunopathol.* *31*, 399–409.
- Isogawa, M., Robek, M.D., Furuichi, Y., and Chisari, F.V. (2005). Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J. Virol.* *79*, 7269–7272.
- Ito, K., Kim, K.-H., Lok, A.S.-F., and Tong, S. (2009). Characterization of genotype-specific carboxyl-terminal cleavage sites of hepatitis B virus e antigen precursor and identification of furin as the candidate enzyme. *J. Virol.* *83*, 3507–3517.
- Jürgens, M.C., Vörös, J., Rautureau, G.J.P., Shepherd, D.A., Pye, V.E., Muldoon, J., Johnson, C.M., Ashcroft, A.E., Freund, S.M.V., and Ferguson, N. (2013). The hepatitis B virus preS1 domain hijacks host trafficking proteins by motif mimicry. *Nat. Chem. Biol.*
- Kann, M., and Gerlich, W.H. (1994). Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J. Virol.* *68*, 7993–8000.
- Kann, M., Bischof, A., and Gerlich, W.H. (1997). In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J. Virol.* *71*, 1310–1316.
- Karsies, A., Merkle, T., Szurek, B., Bonas, U., Hohn, T., and Leclerc, D. (2002). Regulated nuclear targeting of cauliflower mosaic virus. *J. Gen. Virol.* *83*, 1783–1790.
- Köck, J., Borst, E.M., and Schlicht, H.J. (1996). Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J. Virol.* *70*, 5827–5831.
- Köck, J., Baumert, T.F., Delaney, W.E., 4th, Blum, H.E., and von Weizsäcker, F. (2003). Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *38*, 1410–1418.
- Köck, J., Rösler, C., Zhang, J.-J., Blum, H.E., Nassal, M., and Thoma, C. (2010). Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS Pathog.* *6*, e1001082.
- Kumar, M., Jung, S.Y., Hodgson, A.J., Madden, C.R., Qin, J., and Slagle, B.L. (2011). Hepatitis B virus regulatory HBx protein binds to adaptor protein IPS-1 and inhibits the activation of beta interferon. *J. Virol.* *85*, 987–995.
- Lacombe, K., Boyd, A., Lavocat, F., Pichoud, C., Gozlan, J., Mialhes, P., Lascoux-Combe, C., Vernet, G., Girard, P.-M., and Zoulim, F. (2013). High incidence of treatment-induced and vaccine-escape hepatitis B virus mutants among human immunodeficiency virus/hepatitis B-infected patients. *Hepatology*. *Baltimore, Md*.
- Lanford, R.E., Notvall, L., Lee, H., and Beames, B. (1997). Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse transcriptase. *J. Virol.* *71*, 2996–3004.
- Lang, T., Lo, C., Skinner, N., Locarnini, S., Visvanathan, K., and Mansell, A. (2011). The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. *J. Hepatology*. *55*, 762–769.
- Lau, G.K., Liang, R., Chiu, E.K., Lee, C.K., and Lam, S.K. (1997). Hepatic events after bone marrow transplantation in patients with hepatitis B infection: a case controlled study. *Bone Marrow Transplant.* *19*, 795–799.
- Lee, W.M. (1997). Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* *337*, 1733–1745.
- Lee, W.A., and Martin, J.C. (2006). Perspectives on the development of acyclic nucleotide analogs as antiviral drugs. *Antiviral Res.* *71*, 254–259.
- Lenhoff, R.J., and Summers, J. (1994a). Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J. Virol.* *68*, 4565–4571.
- Lenhoff, R.J., and Summers, J. (1994b). Construction of avian hepadnavirus variants with enhanced replication and cytopathicity in primary hepatocytes. *J. Virol.* *68*, 5706–5713.
- Lenhoff, R.J., Luscombe, C.A., and Summers, J. (1998). Competition in vivo between a cytopathic variant and a wild-type duck hepatitis B virus. *Virology* *251*, 85–95.
- Lenhoff, R.J., Luscombe, C.A., and Summers, J. (1999). Acute liver injury following infection with a cytopathic strain of duck hepatitis B virus. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *29*, 563–571.

- Lentz, T.B., and Loeb, D.D. (2011). Roles of the envelope proteins in the amplification of covalently closed circular DNA and completion of synthesis of the plus-strand DNA in hepatitis B virus. *J. Virol.* *85*, 11916–11927.
- Levero, M., Pollicino, T., Petersen, J., Belloni, L., Raimondo, G., and Dandri, M. (2009). Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* *51*, 581–592.
- Li, H.-C., Huang, E.-Y., Su, P.-Y., Wu, S.-Y., Yang, C.-C., Lin, Y.-S., Chang, W.-C., and Shih, C. (2010). Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog.* *6*, e1001162.
- Li, W., Zeng, X., Lee, N.P., Liu, X., Chen, S., Guo, B., Yi, S., Zhuang, X., Chen, F., Wang, G., et al. (2013). HIVID: an efficient method to detect HBV integration using low coverage sequencing. *Genomics* *102*, 338–344.
- Lin, C.-L., and Kao, J.-H. (2011). The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *26 Suppl 1*, 123–130.
- Lin, L.Y., Wong, V.W.S., Zhou, H.J., Chan, H.Y., Gui, H.L., Guo, S.M., Wang, H., Huang, L., Bao, S.S., Xie, Q., et al. (2010). Relationship between serum hepatitis B virus DNA and surface antigen with covalently closed circular DNA in HBsAg-negative patients. *J. Med. Virol.* *82*, 1494–1500.
- Lok, A.S.F., and McMahon, B.J. (2007). Chronic hepatitis B. *Hepatol. Baltim. Md* *45*, 507–539.
- Lok, A.S., McMahon, B.J., and Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases (2001). Chronic hepatitis B. *Hepatol. Baltim. Md* *34*, 1225–1241.
- Lu, Y.W., and Chen, W.N. (2005). Human hepatitis B virus X protein induces apoptosis in HepG2 cells: role of BH3 domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 1551–1556.
- Lu, L., Zhang, H.-Y., Yueng, Y.-H., Cheung, K.-F., Luk, J.M., Wang, F.-S., and Lau, G.K.K. (2009). Intracellular levels of hepatitis B virus DNA and pregenomic RNA in peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *J. Viral Hepat.* *16*, 104–112.
- Lu, Y.W., Tan, T.L., Chan, V., and Chen, W.N. (2006). The HBSP gene is expressed during HBV replication, and its coded BH3-containing spliced viral protein induces apoptosis in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *351*, 64–70.
- Luangsay, S., Gruffaz, M., Ait-Goughoulte, M., Isorce, N., Testoni, B., Michelet, M., Rivoire, M., Tommasino, M., Fletcher, S., Javanbakht, H., et al. Early inhibition of the hepatocyte innate responses by hepatitis B virus facilitates establishment of a persistent infection. Submitted.
- Lucifora, J., and Zoulim, F. (2007). Mechanism underlying resistance to antiviral therapy in chronic hepatitis B. *Hépatogastro* *14*, 29–39.
- Lucifora, J., Durantel, D., Testoni, B., Hantz, O., Levero, M., and Zoulim, F. (2010). Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. *Hepatol. Baltim. Md* *51*, 63–72.
- Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levero, M., Zoulim, F., Hantz, O., and Protzer, U. (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* *55*, 996–1003.
- Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., Sprinzl, M.F., Koppensteiner, H., Makowska, Z., Volz, T., et al. (2014). Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science*.
- Lutgehetmann, M., Volz, T., Köpke, A., Broja, T., Tigges, E., Lohse, A.W., Fuchs, E., Murray, J.M., Petersen, J., and Dandri, M. (2010). In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. *Hepatol. Baltim. Md* *52*, 16–24.
- Ma, R., Xing, Q., Shao, L., Wang, D., Hao, Q., Li, X., Sai, L., and Ma, L. (2011). Hepatitis B virus infection and replication in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Virol. J.* *8*, 486.
- Marion, P.L., and Robinson, W.S. (1983). Hepadna viruses: hepatitis B and related viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *105*, 99–121.
- Martinot-Peignoux, M., Lapalus, M., Laouénan, C., Lada, O., Netto-Cardoso, A.C.F., Boyer, N., Ripault, M.P., Carvalho-Filho, R., Asselah, T., and Marcellin, P. (2013). Prediction of disease reactivation in asymptomatic hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients using baseline serum measurements of HBsAg and HBV-DNA. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *58*, 401–407.
- Mason, W.S., Xu, C., Low, H.C., Saputelli, J., Aldrich, C.E., Scougall, C., Grosse, A., Colonno, R., Litwin, S., and Jilbert, A.R. (2009). The amount of hepatocyte turnover that occurred during resolution of transient hepadnavirus infections was lower when virus replication was inhibited with entecavir. *J. Virol.* *83*, 1778–1789.
- Maurice, M., Rajho Meerson, N., Durand-Schneider, A.-M., and Delautier, D. (1998). Polarité des cellules épithéliales du foie. Mécanismes cellulaires, moléculaires et altérations en pathologie. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *22*, 530.
- McBride, A.A. (2008). Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. *Adv. Virus Res.* *72*, 155–205.
- McMahon, B.J. (2005). Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin. Liver Dis.* *25 Suppl 1*, 3–8.
- Melegari, M., Scaglioni, P.P., and Wands, J.R. (1997). The small envelope protein is required for secretion of a naturally occurring hepatitis B virus mutant with pre-S1 deleted. *J. Virol.* *71*, 5449–5454.

Menne, S., Cote, P.J., Korba, B.E., Butler, S.D., George, A.L., Tochkov, I.A., Delaney, W.E., 4th, Xiong, S., Gerin, J.L., and Tennant, B.C. (2005). Antiviral effect of oral administration of tenofovir disoproxil fumarate in woodchucks with chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 2720–2728.

Messageot, F., Salhi, S., Eon, P., and Rossignol, J.-M. (2003). Proteolytic processing of the hepatitis B virus e antigen precursor. Cleavage at two furin consensus sequences. *J. Biol. Chem.* *278*, 891–895.

Mikaeloff, Y., Caridade, G., Suissa, S., and Tardieu, M. (2009). Hepatitis B vaccine and the risk of CNS inflammatory demyelination in childhood. *Neurology* *72*, 873–880.

Milich, D., and Liang, T.J. (2003). Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* *38*, 1075–1086.

Moucari, R., and Marcellin, P. (2010). [HBsAg seroclearance: prognostic value for the response to treatment and the long-term outcome]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *34 Suppl 2*, S119–125.

Moucari, R., Mackiewicz, V., Lada, O., Ripault, M.-P., Castelnau, C., Martinot-Peignoux, M., Dauvergne, A., Asselah, T., Boyer, N., Bedossa, P., et al. (2009). Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology* *49*, 1151–1157.

Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* *42*, 3858–3863.

Nassal, M. (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J. Virol.* *66*, 4107–4116.

Newbold, J.E., Xin, H., Tencza, M., Sherman, G., Dean, J., Bowden, S., and Locarnini, S. (1995). The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J. Virol.* *69*, 3350–3357.

Ni, Y., Lempp, F.A., Mehrle, S., Nkongolo, S., Kaufman, C., Fälth, M., Stindt, J., Königer, C., Nassal, M., Kubitz, R., et al. (2013). Hepatitis B and D Viruses Exploit Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide for Species-Specific Entry into Hepatocytes. *Gastroenterology*.

Okamoto, H., Tsuda, F., Akahane, Y., Sugai, Y., Yoshihara, M., Moriyama, K., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1994). Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J. Virol.* *68*, 8102–8110.

OMS (2002). Hepatitis B.

OMS (2013). <http://www.who.int/en/>.

OMS Hepatite B (2013). Fact sheet n°204.

Paganelli, M., Dallmeier, K., Nyabi, O., Scheers, I., Kabamba, B., Neyts, J., Goubau, P., Najimi, M., and Sokal, E.M. (2013). Differentiated umbilical cord matrix stem cells as a new in vitro model to study early events during hepatitis B virus infection. *Hepatology* *57*, 59–69.

Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.-Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P. (2007). Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J. Virol.* *81*, 3842–3851.

Patient, R., Hourieux, C., and Roingeard, P. (2009). Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol.* *11*, 1561–1570.

Perkins, J. (2002).

Petersen, J., Dandri, M., Mier, W., Lütgehetmann, M., Volz, T., von Weizsäcker, F., Haberkorn, U., Fischer, L., Pollok, J.-M., Erbes, B., et al. (2008). Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat. Biotechnol.* *26*, 335–341.

Petersen, N.J., Barrett, D.H., Bond, W.W., Berquist, K.R., Favero, M.S., Bender, T.R., and Maynard, J.E. (1976). Hepatitis B surface antigen in saliva, impetiginous lesions, and the environment in two remote Alaskan villages. *Appl. Environ. Microbiol.* *32*, 572–574.

Le Pogam, S., Yuan, T.T., Sahu, G.K., Chatterjee, S., and Shih, C. (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*, 9099–9105.

Pollicino, T., Belloni, L., Raffa, G., Pediconi, N., Squadrito, G., Raimondo, G., and Levrero, M. (2006). Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* *130*, 823–837.

Ponsel, D., and Bruss, V. (2003). Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J. Virol.* *77*, 416–422.

Prange, R. (2012). Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* *201*, 449–461.

Purcell, R.H. (1993). The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* *104*, 955–963.

Rabe, B., Vlachou, A., Panté, N., Helenius, A., and Kann, M. (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9849–9854.

- Raimondo, G., Caccamo, G., Filomia, R., and Pollicino, T. (2013). Occult HBV infection. *Semin. Immunopathol.* *35*, 39–52.
- Ramière, C., Scholtès, C., Diaz, O., Icard, V., Perrin-Cocon, L., Trabaud, M.-A., Lotteau, V., and André, P. (2008). Transactivation of the Hepatitis B Virus Core Promoter by the Nuclear Receptor FXR α . *J. Virol.* *82*, 10832–10840.
- Reaiche-Miller, G.Y., Thorpe, M., Low, H.C., Qiao, Q., Scougall, C.A., Mason, W.S., Litwin, S., and Jilbert, A.R. (2013). Duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA appears to survive hepatocyte mitosis in the growing liver. *Virology* *446*, 357–364.
- Rehermann, B., Ferrari, C., Pasquinelli, C., and Chisari, F.V. (1996). The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat. Med.* *2*, 1104–1108.
- Revell, P., Yuen, L., Walsh, R., Perrault, M., Locarnini, S., and Kramvis, A. (2010). Bioinformatic analysis of the hepadnavirus e-antigen and its precursor identifies remarkable sequence conservation in all orthohepadnaviruses. *J. Med. Virol.* *82*, 104–115.
- Roh, S., and Kim, K. (2003). Overcoming tolerance in hepatitis B virus transgenic mice: a possible involvement of regulatory T cells. *Microbiol. Immunol.* *47*, 453–460.
- Rost, M., Mann, S., Lambert, C., Döring, T., Thomé, N., and Prange, R. (2006). Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J. Biol. Chem.* *281*, 29297–29308.
- Ruiz, J., Beadle, J.R., Buller, R.M., Schreiwer, J., Prichard, M.N., Keith, K.A., Lewis, K.C., and Hostetler, K.Y. (2011). Synthesis, metabolic stability and antiviral evaluation of various alkoxyalkyl esters of cidofovir and 9-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine. *Bioorg. Med. Chem.* *19*, 2950–2958.
- Santantonio, T., Fasano, M., Durantel, S., Barraud, L., Heichen, M., Guastadisegni, A., Pastore, G., and Zoulim, F. (2009). Adefovir dipivoxil resistance patterns in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Antivir. Ther.* *14*, 557–565.
- Schaefer, S. (2007). Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol. WJG* *13*, 14–21.
- Schiffer, J.T., Swan, D.A., Stone, D., and Jerome, K.R. (2013). Predictors of hepatitis B cure using gene therapy to deliver DNA cleavage enzymes: a mathematical modeling approach. *PLoS Comput. Biol.* *9*, e1003131.
- Schulze, A., Mills, K., Weiss, T.S., and Urban, S. (2012). Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* *55*, 373–383.
- Scoazec, J.-Y. (1999). Les cellules endothéliales hépatiques : une diversité insoupçonnée et ses conséquences physiologiques et physiopathologiques. *Hépatogastro* *6*, 209–220.
- Seeger, C., and Mason, W.S. (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 51–68.
- Shapiro, C.N. (1993). Epidemiology of hepatitis B. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *12*, 433–437.
- Sheu, S.Y., and Lo, S.J. (1992). Preferential ribosomal scanning is involved in the differential synthesis of the hepatitis B viral surface antigens from subgenomic transcripts. *Virology* *188*, 353–357.
- Shi, Y.-H., and Shi, C.-H. (2009). Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol. WJG* *15*, 3099–3105.
- Sohn, J.A., Litwin, S., and Seeger, C. (2009). Mechanism for CCC DNA synthesis in hepadnaviruses. *PloS One* *4*, e8093.
- Soussan, P., Garreau, F., Zylberberg, H., Ferray, C., Brechot, C., and Kremsdorf, D. (2000). In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J. Clin. Invest.* *105*, 55–60.
- Soussan, P., Tuveri, R., Nalpas, B., Garreau, F., Zavala, F., Masson, A., Pol, S., Brechot, C., and Kremsdorf, D. (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*, 343–348.
- Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., et al. (2009). Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J. Virol.* *83*, 3719–3733.
- Steven, A.C., Conway, J.F., Cheng, N., Watts, N.R., Belnap, D.M., Harris, A., Stahl, S.J., and Wingfield, P.T. (2005). Structure, assembly, and antigenicity of hepatitis B virus capsid proteins. *Adv. Virus Res.* *64*, 125–164.
- Summers, J., Smith, P.M., and Horwich, A.L. (1990). Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J. Virol.* *64*, 2819–2824.
- Summers, J., Smith, P.M., Huang, M.J., and Yu, M.S. (1991). Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope proteins of an avian hepadnavirus. *J. Virol.* *65*, 1310–1317.
- Summers, J., Jilbert, A.R., Yang, W., Aldrich, C.E., Saputelli, J., Litwin, S., Toll, E., and Mason, W.S. (2003). Hepatocyte turnover during resolution of a transient hepadnaviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11652–11659.

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.-R., Ueno, Y., Zheng, Y.-W., Koike, N., et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* *499*, 481–484.

Terré, S., Petit, M.A., and Bréchet, C. (1991). Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. *J. Virol.* *65*, 5539–5543.

Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2003). CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J. Virol.* *77*, 68–76.

Thompson, A.J.V., Nguyen, T., Iser, D., Ayres, A., Jackson, K., Littlejohn, M., Slavin, J., Bowden, S., Gane, E.J., Abbott, W., et al. (2010a). Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. *Hepatology* *51*, 1933–1944.

Thompson, A.J.V., Nguyen, T., Iser, D., Ayres, A., Jackson, K., Littlejohn, M., Slavin, J., Bowden, S., Gane, E.J., Abbott, W., et al. (2010b). Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. *Hepatology* *51*, 1933–1944.

Thursz, M.R., Kwiatkowski, D., Allsopp, C.E., Greenwood, B.M., Thomas, H.C., and Hill, A.V. (1995). Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N. Engl. J. Med.* *332*, 1065–1069.

Tian, Y., Yang, W., Song, J., Wu, Y., and Ni, B. (2013). Hepatitis B virus x protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 2810–2816.

Tichý, T., Andrei, G., Dračinský, M., Holý, A., Balzarini, J., Snoeck, R., and Krečmerová, M. (2011). New prodrugs of Adefovir and Cidofovir. *Bioorg. Med. Chem.* *19*, 3527–3539.

Tsiang, M., and Gibbs, C.S. (2004). Analysis of hepatitis B virus dynamics and its impact on antiviral development. *Methods Mol. Med.* *96*, 361–377.

Tuttleman, J.S., Pourcel, C., and Summers, J. (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* *47*, 451–460.

Viganò, M., and Lampertico, P. (2011). Antiviral drugs for HBV liver disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* *11*, 285–300.

Vivekanandan, P., and Torbenson, M. (2008). Epigenetic instability is rare in fibrolamellar carcinomas but common in viral-associated hepatocellular carcinomas. *Mod. Pathol. Off. J. United States Can. Acad. Pathol. Inc* *21*, 670–675.

Vivekanandan, P., Thomas, D., and Torbenson, M. (2009). Methylation regulates hepatitis B viral protein expression. *J. Infect. Dis.* *199*, 1286–1291.

Vivekanandan, P., Daniel, H.D.-J., Kannangai, R., Martinez-Murillo, F., and Torbenson, M. (2010). Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA. *J. Virol.* *84*, 4321–4329.

Volz, T., Lutgehetmann, M., Wachtler, P., Jacob, A., Quaas, A., Murray, J.M., Dandri, M., and Petersen, J. (2007a). Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* *133*, 843–852.

Volz, T., Lutgehetmann, M., Wachtler, P., Jacob, A., Quaas, A., Murray, J.M., Dandri, M., and Petersen, J. (2007b). Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* *133*, 843–852.

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

Wagner, A., Denis, F., Ranger-Rogez, S., Loustaud-Ratti, V., and Alain, S. (2004). Hepatitis B virus genotypes. *Immuno-Anal. Biol. Spécialisée* *19*, 330–342.

Walsh, R., and Locarnini, S. (2012). Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise. *Yonsei Med. J.* *53*, 875–885.

Wang, H., and Ryu, W.-S. (2010). Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion. *PLoS Pathog.* *6*, e1000986.

Wei, C., Ni, C., Song, T., Liu, Y., Yang, X., Zheng, Z., Jia, Y., Yuan, Y., Guan, K., Xu, Y., et al. (2010). The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. *J. Immunol. Baltim. Md* *185*, 1158–1168.

Werle-Lapostolle, B., Bowden, S., Locarnini, S., Wursthorn, K., Petersen, J., Lau, G., Trepo, C., Marcellin, P., Goodman, Z., Delaney, W.E., 4th, et al. (2004). Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* *126*, 1750–1758.

Whitten, T.M., Quets, A.T., and Schloemer, R.H. (1991). Identification of the hepatitis B virus factor that inhibits expression of the beta interferon gene. *J. Virol.* *65*, 4699–4704.

Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2004a). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 6669–6674.

Wieland, S.F., Spangenberg, H.C., Thimme, R., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2004b). Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2129–2134.

Wong, D.K.-H., Seto, W.-K., Fung, J., Ip, P., Huang, F.-Y., Lai, C.-L., and Yuen, M.-F. (2013). Reduction of hepatitis B surface antigen and covalently closed circular DNA by nucleos(t)ide analogues of different potency. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pr. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *11*, 1004–1010.e1.

Wounderlich, G., and Bruss, V. (1996). Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. *Arch. Virol.* *141*, 1191–1205.

Wu, H.C., and Santella, R. (2012). The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. *Hepat. Mon.* *12*, e7238.

Wu, M., Xu, Y., Lin, S., Zhang, X., Xiang, L., and Yuan, Z. (2007a). Hepatitis B virus polymerase inhibits the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1. *J. Gen. Virol.* *88*, 3260–3269.

Wu, M., Xu, Y., Lin, S., Zhang, X., Xiang, L., and Yuan, Z. (2007b). Hepatitis B virus polymerase inhibits the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1. *J. Gen. Virol.* *88*, 3260–3269.

Wu, T.T., Coates, L., Aldrich, C.E., Summers, J., and Mason, W.S. (1990). In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* *175*, 255–261.

Wynne, S.A., Crowther, R.A., and Leslie, A.G. (1999). The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell* *3*, 771–780.

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

Yan, H., Peng, B., He, W., Zhong, G., Qi, Y., Ren, B., Gao, Z., Jing, Z., Song, M., Xu, G., et al. (2013). Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J. Virol.* *87*, 7977–7991.

Yeh, C.T., Ou, J.H., Chu, C.M., and Liaw, Y.F. (1994). Alteration of the subcellular localization of hepatitis B virus core protein by large but not small surface proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *203*, 1348–1354.

Yokota, T., Mochizuki, S., Konno, K., Mori, S., Shigeta, S., and De Clercq, E. (1990). Phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine as inhibitors of human hepatitis B virus DNA synthesis. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 17–18.

Yuan, T.T., Sahu, G.K., Whitehead, W.E., Greenberg, R., and Shih, C. (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*, 5731–5740.

Zhang, D., Ma, S., Zhang, X., Zhao, H., Ding, H., and Zeng, C. (2010). Prevalent HBV point mutations and mutation combinations at BCP/preC region and their association with liver disease progression. *BMC Infect. Dis.* *10*, 271.

Zhang, Y., Ren, Y., Wu, Y., Zhao, B., Qiu, L., Li, X., Xu, D., Liu, J., Gao, G.F., and Meng, S. (2013). The L60V variation in hepatitis B virus core protein elicits new epitope-specific cytotoxic T lymphocytes and enhances viral replication. *J. Virol.* *87*, 8075–8084.

Zhang, Y.-Y., Zhang, B.-H., Theele, D., Litwin, S., Toll, E., and Summers, J. (2003). Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12372–12377.

Zipp, F., Weil, J.G., and Einhäupl, K.M. (1999). No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination. *Nat. Med.* *5*, 964–965.

Zoulim, F. (2005). New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J. Hepatol.* *42*, 302–308.

Zoulim, F. (2006). Assessment of treatment efficacy in HBV infection and disease. *J. Hepatol.* *44*, S95–99.

Zoulim, F. (2007). Emerging drugs for hepatitis B. *Expert Opin. Emerg. Drugs* *12*, 199–217.

Zoulim, F. (2012). Are novel combination therapies needed for chronic hepatitis B? *Antiviral Res.* *96*, 256–259.

Zoulim, F., and Locarnini, S. (2009). Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* *137*, 1593–1608.e1–2.

Zoulim, F., and Seeger, C. (1994). Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J. Virol.* *68*, 6–13.

Zoulim, F., Saputelli, J., and Seeger, C. (1994). Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J. Virol.* *68*, 2026–2030.

Zuckerman, A.J. (2000). Effect of hepatitis B virus mutants on efficacy of vaccination. *The Lancet* *355*, 1382–1384.