



**HAL**  
open science

# De la détection de l'ADNccc par de nouvelles technologies à la preuve de concept de sa dégradation à visée thérapeutique dans des modèles d'infection par le virus de l'hépatite B

Aurore Inchauspé

## ► To cite this version:

Aurore Inchauspé. De la détection de l'ADNccc par de nouvelles technologies à la preuve de concept de sa dégradation à visée thérapeutique dans des modèles d'infection par le virus de l'hépatite B. *Virologie*. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1218 . tel-02021137

**HAL Id: tel-02021137**

**<https://theses.hal.science/tel-02021137>**

Submitted on 15 Feb 2019

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

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



N°d'ordre NNT : xxx

# THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale ED BMIC 340**

**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat :**

**Discipline :** Virologie et Biologie Cellulaire

Soutenue publiquement le 19/10/2018, par :

**Aurore INCHAUSPE**

## **De la détection de l'ADNccc par de nouvelles technologies à la preuve de concept de sa dégradation à visée thérapeutique dans des modèles d'infection par le virus de l'hépatite B**

Directeur de thèse : Professeur Fabien Zoulim, Docteur Barbara Testoni et Docteur Gregory Neveu

Devant le jury composé de :

M. Pr LEVRERO Massimo / PU-PH/ CRCL LYON

Président du jury

Mme. Dr KREMSDORF Dina / DR INSERM / CIMI PARIS

Rapporteur

M. Pr THIBAULT Vincent / PU-PH/ CHU Rennes

Rapporteur

Mme. Dr CHALLIER Cécile / CEVA

Examinatrice

M. Pr ZOULIM Fabien / PU-PH/ CRCL LYON

Directeur de Thèse

M. Dr NEVEU Grégory / Sanofi

Co-directeur de Thèse

Mme. Dr. TESTONI Barbara / CR INSERM / CRCL LYON

Co-directrice de Thèse



*« On m'a appris à compter les secondes, les minutes, les heures, les jours, les années. Mais personne ne m'avait appris la valeur d'un instant. »*

*Inspirée de Donato Carrisi*

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLOI

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

# Résumé

## **De la détection de l'ADNccc par de nouvelles technologies à la preuve de concept de sa dégradation à visée thérapeutique dans des modèles d'infection par le virus de l'hépatite B (VHB).**

L'infection par le virus de l'hépatite B est un problème de santé publique avec 250 millions de porteurs chroniques et cela malgré l'existence d'un vaccin préventif. Les traitements actuellement utilisés sont les analogues de nucléos(t)ide et/ou l'interféron  $\alpha$ . Bien qu'ils permettent une diminution de la charge virale, ils ne permettent pas d'éradiquer la maladie du fait de la persistance de l'ADNccc, le minichromosome de l'hépatite B. Cet ADN sert de matrice à la transcription virale, et la présence d'une seule copie permet la réactivation de l'infection.

En prenant en compte la longue demi-vie des hépatocytes et de la stabilité de l'ADNccc dans leur noyau, un modèle mathématique suggère que de nombreuses années de traitement seraient nécessaires pour éliminer complètement cet ADN du foie des patients infectés chroniquement.

Les techniques utilisées en routine pour la quantification de l'ADNccc ne sont pas assez sensibles pour pouvoir détecter des faibles concentrations de cet ADN, notamment dans des biopsies de patients infectés chroniquement et traités à long terme. Il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies permettant de cibler directement l'ADNccc afin d'éliminer le virus.

Ainsi les travaux de cette thèse reposent sur le développement d'une nouvelle technologie : la Droplet Digital PCR (ddPCR) pour permettre la quantification de l'ADNccc dans les biopsies de patient. Cette technique permet un gain de 2 log au niveau de la sensibilité par rapport à la qPCR, technique utilisée actuellement en routine. Elle nous a ainsi permis de constater la présence de cet ADN chez des patients traités à long terme par des analogues de nucléos(t)ides et même en présence d'interféron. La présence d'ARNpg et les expériences de ChIP ont également confirmé que l'ADNccc était encore transcriptionnellement actif.

Ces résultats confirment d'autant plus la nécessité d'élaborer de nouvelles thérapeutiques pour permettre l'inactivation voire l'élimination de l'ADNccc. L'une des stratégies envisagées est le système CRISPR/Cas 9. Ainsi le dernier axe de cette thèse a été de développer ce système dans des modèles d'infection du virus de l'hépatite B. Pour vérifier l'efficacité de ce système sur le VHB, nous avons testé 8 ARN guide différents incorporer *via* des ribonucléoprotéines dans des cellules HepG2-NTCP. Les résultats préliminaires ont ainsi démontré que ce système pouvait réduire le pool d'ADNccc dans ces cellules et ouvre des perspectives intéressantes pour le développement de nouveaux traitements.

**Mots clés :**

Hépatite B, ADNccc, ddPCR, Biopsies, CRISPR/Cas 9



# Abstract

## **From the detection of cccDNA by new technologies to the proof of concept of its therapeutic degradation in models of infection with the hepatitis B virus.**

Hepatitis B virus (HBV) is a major health problem with 250 million chronic carriers, despite the existence of a preventive vaccine. Currently the treatments used are nucleos(t)ide analogues and / or interferon  $\alpha$ . Although they efficiently reach a decrease of the viral load, they do not allow the eradication the disease due to the persistence of the cccDNA, the minichromosome of the hepatitis B. This DNA serves as a template for the viral transcription and only a single copy suffice for the infection rebound. However, the techniques used routinely for the quantification of the cccDNA are not sensitive enough to be able to detect low concentrations of this DNA, in particular in biopsies of patients chronically infected and long term treated. In addition, it is necessary to develop new strategies to target the cccDNA in order to clear the infection.

Thus, my thesis work is based on the development of a new technology: the Droplet Digital PCR (ddPCR) to allow the quantification of cccDNA in patient biopsies. This technique allows a gain of 2 log in sensitivity compared to the qPCR technique currently used in routine. It allowed us to see the presence of this DNA in long-term treated patients even in the presence of interferon. The presence of pgRNA and ChIP experiments also confirmed that the cccDNA was still transcriptionally active. These results confirm the requirement to develop new therapeutics to allow the inactivation or even the elimination of the cccDNA. One of the strategies envisaged is the CRISPR / Case 9 system. Thus, the following part of this thesis was to develop this system in hepatitis B virus infection models. To reduce off-target effect we tested 8 different guide RNAs incorporated via ribonucleoproteins into HepG2-NTCP cells. Preliminary results have shown that this system can reduce the pool of cccDNA in these cells and open up the possibilities to test this model on PHH and opens interesting perspectives for the development of new treatments.

### Keywords :

Hepatitis B, ADNccc, ddPCR, Biopsies, CRISPR/Cas9

# Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu mon jury de thèse, **Pr. Massimo Levrero, Dr. Vincent Thibault, Dr. Dina Kremsdorf** et **Dr. Cécile Challier**, pour leur présence et leur participation lors de ma soutenance. Je remercie particulièrement mes rapporteurs pour le temps consacré à la relecture de mon manuscrit.

Je remercie **Dr. Laurent Fraysse** pour m'avoir accueillie au sein de l'unité anti-infectieuse de Sanofi et **Pr. Fabien Zoulim**, mon directeur de thèse pour son aide et les conseils qu'il a pu m'apporter. Je les remercie de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse.

I would like to thank **Dr.Kara Carter** for her kindness and for the time she was able to dedicate to me.

Je remercie **Dr. Barbara Testoni** et **Dr. Grégory Neveu** pour leur encadrement pendant ma thèse. Ils ont contribué à l'épanouissement de mon travail.

Je remercie **Dr. Cécile Challier**, pour toute l'aide qu'elle m'a apportée, pour sa patience, sa gentillesse et sa confiance à mon égard. Ton départ a fait un grand vide et je te remercie d'avoir accepté de venir à ma soutenance pour qu'on puisse finir ensemble ce que nous avons commencé.

Merci à toutes les personnes de Sanofi qui ont pu partager mon quotidien durant le début de cette thèse. Je remercie l'équipe de Virologie : **Antoine, Julie, Odile, Christelle, Juliette, Marie** pour leur accueil chaleureux et de m'avoir transmis une partie de leur savoir.

**Florine**, merci pour les nombreux fous rires que nous avons partagés ! Y'a pas de doute qu'ils resteront gravés à tout jamais dans ma mémoire ! Je suis sûre qu'il y en aura plein d'autres vu notre niveau de catastrophes.

Je remercie aussi l'équipe du Xnord3 : **Marion A, Elisabeth, Jeremy, Alix et Marion G.** Merci à **Elisabeth** pour tes encouragements sans faille et ta motivation pour aller courir même sous la neige ! Merci à **Alix**, pour toutes les sessions papotages dans ton bureau ! Je suis très contente d'avoir pu être dans ton équipe lors du fameux team building.

Cela nous a permis de nous rencontrer et par la suite de partager de bons moments au boulot, et même en dehors et de créer une nouvelle amitié.

**Marion G**, ma colocataire de bureau qui a su être de bon conseil tant dans la vie professionnelle que privée. Merci pour ton enthousiasme, ta bonne humeur, nos sessions papotages, ton aide au quotidien et tous ces moments qu'on a vécus ensemble.

**Amandine**, j'ai tellement de choses pour lesquelles je dois te remercier. Tout d'abord merci de m'avoir accueillie comme tu l'as fait. Tu as su me mettre à l'aise, me donner confiance, me transmettre ton savoir. Côté vie privée, tu as su également énormément m'apporter et me conseiller, merci d'avoir été là pour moi comme tu l'as fait !

Merci les annexiens qui ont enrichi mon quotidien : **Laura, Océane, Alexia, Moms, Thomas, Adrien, Claire**, que je ne remercierai jamais assez pour son excellente mousse au chocolat, **Rayan** pour m'avoir protégée contre des personnes imaginaires, **Emma** que je remercie particulièrement pour ta présence dans les moments difficiles, tu as su être très réconfortante et je t'en remercie vraiment !

**Héloïse et Hélène**, mes coachs INSERM. Merci pour votre motivation et ces moments partagés. Merci à toi **Hélène** qui a réussi à me faire franchir des limites ! Grâce à toi, je peux fièrement dire que j'ai fait fourvière en courant haha !

**Guada**, para todas las pequeñas palabras españolas del día! Gracias también por tu ayuda, tu amabilidad y tu consejo. Fue un placer trabajar con usted y espero que tengamos otras oportunidades para trabajar juntos.

**Jennifer et Anaëlle** même si vous ne faites pas partie de l'annexe vous avez contribué à égayer mon quotient et un merci particulier à Anaëlle pour avoir amélioré mon espagnol ! Grâce à toi je suis devenue pratiquement bilingue.....ou pas !!

**Ludo**, merci pour le Temaki j'en garde un excellent souvenir ! Merci pour toutes nos idées farfelues et nos expressions sortie de nulle part ! Parce qu'on se le dise, il ne faut pas confondre la loutre et le léopard et que si tu n'enlèves pas tes lunettes je ne suis pas prête de t'entendre !

**Brieux**, même si ça n'a pas été facile tout le long, je sais que tu fais partie des gens autour de moi sur qui je peux compter ! Toi et moi on arrive facilement à divaguer sur les

mêmes sujets et c'est toujours très drôle de discuter avec toi ! Et puis comme tu le dis si bien..... Tu fais partie de mes créateurs....

Ma petite **Audrey**, la ddPCR n'aurait pas été la même sans toi ! Merci pour tous ces fous rires qu'on a pu partager, les moments à Sanofi avec toi je ne suis pas prête de les oublier ! Merci d'avoir été une oreille attentive quand j'en avais besoin, merci d'avoir participé à l'élaboration de ce manuscrit et merci pour Céline, je suis prête à chanter à tue-tête dans la voiture quand tu veux !

Le bureau du bonheur **Manon, Laetitia, ma petite Léa**, malgré l'immense barrière qui nous sépare, notre passion différente pour le chocolat, nous avons partagé d'excellents moments et j'espère que ce n'est que le début! Ce fut un grand plaisir de vous avoir à mes côtés au quotidien !

**Susu**, ma sestra de cœur, ma presque jumelle, en plus de nos 24h45min d'écart nous avons partagé tellement de choses et nous nous sommes découvert tellement de passions communes, les sushis, le chocolat et le Pinot Gris ! Merci pour tes conseils et ton soutien tant du côté professionnel que personnel ! Il me tarde de refaire le monde avec toi comme on a pu tant le faire lors de nos petites soirées !

Merci à ma petite **Maëlle**, tu as été la première rencontre annexienne et tu m'as intégrée comme si on se connaissait depuis toujours. Tu fais partie des personnes qui m'ont aidé à avancer au niveau scientifique et qui m'ont partagé leur savoir ! Je te remercie également pour toutes les soirées papotages, les sessions rigolades, ta bonne humeur et ton amitié en général. Par contre je ne te remercie pas pour toutes les crises cardiaques que tu m'as donné en me faisant peur.

Merci à ma **Fleurette** qui est bien plus que ma voisine de bureau ! Merci pour avoir partagé tous ces pots de nutella avec moi, de m'avoir aidé à agrandir ma garde-robe et surtout pour tous les moments de partage, les soirées films même si je m'endors devant la plupart ! Merci d'avoir été là à tout moment, dans les bons comme dans les mauvais, d'avoir été aux petits soins avec moi, de m'avoir écoutée, réconfortée et de m'avoir transmis une nouvelle passion : le Fromage !

Merci à **Marion**, mon Dj préféré. Notre amitié est née plus tardivement, mais elle est tout aussi solide ! Je suis ravie d'avoir pu partager le bureau avec toi cette dernière année de

thèse ! On partage le même humour de merde ce qui a donné lieu à de nombreux fous rires, même si, quand on y réfléchit... ce n'est pas drôle ! Tu resteras toujours ma coéquipière de choc pour les mots fléchés et les faire sans toi ça ne sera pas du tout la même chose. Merci pour ta bonne humeur communicative et pour tout ce que tu m'auras fait découvrir cette dernière année que ce soit d'un point de vue scientifique, que musical ou bien cinématographique....

Merci à **Rominou**, pour tout le temps que tu m'as consacré et surtout pour tous ces conseils que tu m'as donnés. Tu as été d'un soutien immense et je ne pourrais jamais oublier ta présence, ta patience et ton aide pendant ces dernières années. Même si ce n'était pas évident pour toi tous les jours, j'ai pu compter sur toi dans les moments de doute. Et un énorme merci pour les week-end au Loiret qui resteront gravés ! Et qui ont contribué à tous nous unir !

**Mathieu**, mon Mat Mat, un coup de cœur au détour d'une soirée ! Tu ne fais pas partie du laboratoire mais tu fais partie des personnes qui ont su m'entourer pendant ces années de thèse et qui comptent énormément pour moi ! Alors je te remercie pour ton soutien, ton réconfort et tes conseils plus personnels que professionnels et tous ces moments partagés ensemble qui ont permis de m'évader un peu du laboratoire.

**Damien**, mon petit Dam Dam, je suis bien contente d'avoir appris à te connaître car ça en valait le détour. Merci pour ton humour décalé, ton comportement déjanté, les cafés parfois beaucoup trop matinaux, nos conversions scientifiques ou non, les soirées mouvementées, les musiques partagées, les sushis dévorés, les bières et les gins to' consommés....même si pour les gins to' je peux aussi remercier Melany, mon binôme de festoch. Tu as su m'accorder ta confiance, me faire vivre des moments improbables, me faire rire et me redonner le sourire dans n'importe quelle situation...et ça n'a pas de prix ! Je ne doute pas qu'il nous reste encore plein de choses à partager ici ou ailleurs, car tout ça ce n'était que le début.

**Mon Loulouuuuu**, depuis le temps qu'on se connaît notre amitié n'est que plus belle ! Merci pour ton soutien continu et inconditionnel ! Tu as été d'un très grand secours un nombre incalculable de fois et tu as su répondre présent dès que j'en avais besoin. Toujours disponible pour une soirée improvisée, toujours partant pour me suivre aux 4 coins

de la France, toujours prêt à me suivre dans mes folies et a m'entraîner dans tes délires ! Merci mon Loulou ces années de thèse, sans toi et tous les granolas que je t'ai piqué dans ton bureau, n'auraient pas été les mêmes.

Merci aux copains de Lyon : **Cécile et Alex**, ma team Erasmus, toujours fidèles au poste, **Inès**, même si ça fait peu de temps que l'on se connaît, tu réponds toujours présente pour m'écouter et pour partager des instants au Hopper, **Iseu** pour avoir été mon binôme de soirée plus folle les unes que les autres ! Merci aussi pour les 50% du Yacht que je vais partager avec François ! Et surtout Iseu, je t'attends à Fourvière pour une nouvelle partie de Molki ! Under pressure !

Merci aux copines de Montpellier : **Lorie, Eva, Capucine**, et plus particulièrement aux sœurs **Frély** ! Merci pour votre hospitalité sans faille et pour vos soirées déguisées. Je remercie particulièrement mon **Amélie** toujours partante, toujours souriante, toujours réconfortante ! Sans toi, ma vie aurait été bien fade et mes années universitaires auraient été beaucoup moins belles ! Je peux compter sur toi pour m'écouter, me conseiller et m'accompagner dans ma vie de tous les jours ! Tu es ma confidente à qui je peux tout dire sans crainte de vexer, ennuyer ou être jugée. Tu m'as ouvert la voie dans de nombreux domaines, tu m'as permis d'avancer, tu m'as emmenée aux 4 coins du monde et tu as contribué à faire ce que je suis aujourd'hui ! Merci pour tous ces moments partagés qui ne cessent d'augmenter et pour notre amitié sans faille et à laquelle je tiens énormément !

Merci aux Marseillais, **Sofiène, Marie, Alexia, Natacha et David**. Ma **GluGlu** d'amour merci pour toutes ces soirées, ces moments de folies, ces fous rires incalculables ! Merci pour New York, merci pour tes conseils, merci pour ton soutien et merci d'avoir été là quand il le fallait ! Ma **Natala** d'amour, tant de choses aussi à te remercier ! Merci de m'écouter comme tu le fais, merci pour ces heures à skyper, merci pour me faire rire et me donner le sourire, merci pour les séances coiffure et détente et merci d'être rassurante. Les filles, merci tout simplement de faire partie de ma vie, je vous aime énormément !

Evidement, je remercie ma famille pour leur présence ! Merci à **Martine et Jean-Louis**, pour votre aide à toute épreuve, pour votre soutien inconditionnel. Pour toutes les heures passées ensemble à relire ce manuscrit. Je n'aurais jamais assez de mots pour vous

remercier comme il se doit. Je suis heureuse d'avoir découvert, bien que tardivement, mon oncle et ma tante !

Merci à mes frères et ma sœur : **Stéphane**, Mon grand frère, merci pour ton amour et ton soutien ! Tu es toujours présent quand j'en ai besoin et ce malgré notre écart d'âge ! J'ai l'impression que l'on est de plus en plus proche et tu ne peux savoir à quel point j'en suis heureuse ! Merci d'être toujours partant pour faire plein de choses avec moi, merci de faire découvrir plein de choses au quotidien et merci de me protéger et de veiller sur moi comme tu le fais !

Merci à mon **Cedrou** ! Mon grand petit frère, mon protecteur, qui sait être rassurant, qui a su m'accompagner dans les bons et les mauvais moments ! Je n'ai jamais douté sur la faite que je pouvais compter sur toi ! Même si on partage pas au quotidien, tu sais être là quand il le faut et jamais ne m'abandonner !

**Ma doudou**, ma sestra, bien de choses à dire. On ne se voit pas souvent, mais on se parle tous les jours et heureusement !! Merci tout simplement d'être ma sœur. Tu es ma confidente, mon modèle, et depuis toujours, tu me laisses te coller au baskets malgré les 6 ans qui nous séparent. Merci pour toutes ces discussions, même celles pour ne rien dire, merci d'être toujours présente et de veiller sur moi comme tu le fais ! Je peux compter sur toi à n'importe quel moment et dans n'importe quelle situation! Tu es toujours à mon écoute et tu es LA personne à qui je peux confier tous mes secrets, mes doutes, mes peines mais aussi mes joies, mes moments de folies et tout ça sans jamais me juger ! Tu es LA personne qui me connaît le plus, LA personne qui enrichit mon quotidien, LA personnes avec qui j'ai tout partagé, LA personne qui me pousse, LA personne qui me redonne confiance, LA personne qui sait me réconforter et LA personne avec qui j'ai vécu mes moments les plus forts ! Bref je t'aime ma doudou.

Je suis tellement fière d'être votre petite sœur, je vous aime énormément ! Et merci à vous pour avoir fait rentrer dans ma vie, **Jennifer, Alexis, Eloan, Tonya, Louena et Mila** !

Ma petite **Maman**, merci à toi pour tout ce que tu as pu m'apporter au cours de ma vie. Tu m'as appris à ne jamais baisser les bras et tu as tout fait pour que je puisse réussir ma vie, mes désirs et mes envies. Tu as contribué à la réalisation et à la réussite de cette thèse. Merci de m'avoir soutenue dans chacune de mes épreuves. Même si je ne te le montre pas

au quotidien, je t'aime de tout mon cœur. Tu m'as poussée hors de mes limites et je te remercie tout simplement d'être là et d'être telle que tu es car sinon je ne serai pas celle que je suis.

Enfin je remercie, **Mon papounet**, dont la présence me manque énormément. Tu as fait de moi celle que je suis devenue aujourd'hui et je sais très bien que sans toi je n'en serais pas là. Je te remercie de m'avoir poussée, guidée, épaulée et soutenue dans tous les choix que je faisais. Et surtout pour ton amour inconditionnel et sans limites ! Tu m'as fait grandir et être une personnes forte et épanouie. Tu as toujours veillé à ce que je ne manque de rien et fait en sorte que je puisse réailser tous mes rêves. Alors c'est un peu notre thèse à tout les deux et je me reconforte en me disant que de là-haut tu continueras à veiller sur moi indéfiniment.



# Table des matières

Résumé .....	6
Abstract.....	8
Remerciements.....	9
Table des figures .....	23
Table des tableaux .....	27
Abréviation .....	28
Chapitre 1 : INTRODUCTION .....	34
Partie 1 : L'Hépatite B.....	34
1 Histoire naturelle de la maladie .....	34
1.1 Epidémiologie .....	34
1.2 Mode de transmission .....	34
1.3 Les symptômes .....	36
1.4 Prévention .....	40
2 Les caractéristiques du virus de l'hépatite B .....	40
2.1 Classification du virus .....	40
2.2 Les particules virales.....	41
2.3 Les formes génomiques du VHB .....	44
2.3.1 L'ADN relâché circulaire (ADNrc) .....	44
2.3.2 L'ADN circulaire clos de façon covalente (ADNccc).....	44
2.4 Les ARN viraux .....	44
2.5 Les protéines virales .....	46
2.5.1 HBs .....	46
2.5.2 Protéine core (HBc), preCore et HBe.....	47
2.5.3 La polymérase .....	48

2.5.4	HBx .....	50
2.5.5	Les protéines épissées : HBSP .....	52
3	Le cycle viral .....	52
4	Les modèles d'études pour le VHB : .....	54
4.1	Les modèles cellulaires : .....	54
4.1.1	Les lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire .....	54
4.1.2	Les cellules HepaRG : .....	55
4.1.3	Les PHH .....	55
4.2	Les modèles animaux : .....	56
4.2.1	Les chimpanzés et les macaques .....	56
4.2.2	Les modèles de souris : .....	56
4.2.2.1	Les souris transgéniques : .....	56
4.2.2.2	Les souris AAV-HBV : .....	56
4.2.2.3	Injection hydrodynamique dans les souris : .....	58
4.2.2.4	Les souris humanisées : .....	58
Partie 2 : L'ADNccc, le minichromosome viral .....		61
1	Biologie de l'ADNccc .....	61
1.1	Structure du minichromosome .....	61
1.2	La formation de l'ADNccc .....	64
1.3	Le rôle de l'ADNccc .....	64
1.4	Régulation de l'ADNccc .....	66
1.4.1	Les facteurs épigénétiques .....	66
1.4.2	Les facteurs viraux .....	67
1.4.2.1	La protéine HBc .....	67
1.4.2.2	La protéine HBx .....	68
1.4.3	Les facteurs immunitaires .....	70

2	Les techniques de détection de l'ADNccc.....	72
2.1	Les méthodes actuelles.....	74
2.1.1	Les méthodes de détection et de quantification .....	74
2.1.1.1	Le Southern Blot .....	74
2.1.1.2	La PCR quantitative (qPCR).....	75
2.1.1.3	RCA .....	77
2.1.2	Méthodes de localisation .....	78
2.1.2.1	FISH.....	78
2.2	La Digital PCR .....	80
2.2.1	Le principe.....	80
2.2.2	ddPCR pour la quantification de l'ADNccc .....	86
Partie 3 : Traitements actuels .....		90
1	Les différents médicaments utilisés .....	90
1.1	Les Interférons (IFN) .....	91
1.2	Les analogues de nucléos(t)ides .....	92
1.2.1	La Lamivudine .....	94
1.2.2	L'Adéfovir .....	94
1.2.3	La Telbivudine .....	95
1.2.4	L'Entécavir .....	95
1.2.5	Le Tenofovir .....	96
2	Les stratégies thérapeutiques actuelles .....	97
2.1	Les objectifs du traitement.....	98
2.2	Les indications thérapeutiques.....	98
2.3	Traitement par les analogues nucléos(t)ides.....	99
2.4	Traitement par PEG-IFN.....	99
2.5	Combinaison de traitement.....	99

2.6	Limite des stratégies actuelles.....	100
Partie 4 : Les nouvelles stratégies thérapeutiques pour cibler l'hépatite B.....		102
1	Ciblage indirect de l'ADNccc.....	104
1.1	Diminution de l'infection virale .....	104
1.1.1	Les inhibiteurs d'entrée du VHB.....	104
1.1.2	Les inhibiteurs de la sécrétion virale.....	105
1.2	Diminution du recyclage des virions.....	106
1.2.1	Les inhibiteurs de la polymérase.....	106
1.2.2	Les inhibiteurs de la nucléocapside.....	108
1.2.3	Les inhibiteurs de la traduction du VHB.....	109
1.3	Les immunothérapies .....	112
1.3.1	Réponses immunitaires innées .....	112
1.3.2	Réponses immunitaires adaptatives .....	112
2	Ciblage direct de l'ADNccc.....	116
2.1	La formation de l'ADNccc .....	116
2.2	Dérégulation épigénétique .....	116
2.3	Dégradation de l'ADNccc .....	117
2.3.1	Rôle de l'IFN et APOBEC.....	117
2.3.2	Action des nucléases.....	118
2.3.2.1	Zinc Finger (ZFN).....	120
2.3.2.2	TALEN .....	122
2.3.2.3	CRISPR/cas9.....	124
Les origines du système .....	124	
Utilisation du système pour le génome editing .....	125	
Le système CRISPR/Cas 9 et le virus de l'Hépatite B .....	130	
Chapitre 2 : PROJET DE THESE .....		133

Les objectifs:.....	133
Axe I :.....	135
1 Objectifs .....	136
2 Matériel et Méthodes .....	137
Cultures cellulaires et infections virales.....	137
Production du plasmide pBR 322VHB .....	137
Quantification des antigènes HBe et HBs .....	138
Extraction ADN et ARN.....	138
Quantification de l'ADN et l'ARN du VHB par qPCR Taqman .....	138
Quantification de l'ADN et de l'ARN du VHB par la ddPCR .....	140
3 Résultats .....	143
Validation des amorces pour la quantification des gènes viraux.....	143
Validation de la quantification en duplex .....	145
Validation de la sensibilité de la ddPCR par rapport à la qPCR .....	147
Validation de la détection des évènements rares.....	149
4 Discussion .....	152
Axe II :.....	154
1 Objectifs .....	155
2 Matériels et Méthodes.....	157
Données sur les cohortes .....	157
Extraction d'ADN et ARN des échantillons de biopsie .....	158
Quantification ADN et ARN par qPCR .....	159
Quantification ADN et ARN par ddPCR .....	159
Chromatine immunoprécipitation ( $\mu$ ChIP).....	160
3 Résultats .....	162

Evaluation de l'ADNccc et de son activité transcriptionnelle dans la cohorte PEGAN : .....	162
Evaluation de l'ADNccc et de son activité transcriptionnelle dans la cohorte de patients traités par la Telbivudine .....	162
Evaluation sur l'ADNccc et de son activité transcriptionnelle dans la cohorte de transplantés hépatique de l'hôpital de Beaujon .....	166
4 Discussion .....	167
5 Article .....	169
Axe III.....	197
1 Objectifs .....	198
2 Matériels et Méthodes.....	200
Optimisation des conditions d'incorporation du système CRISPR/Cas 9 par des ribonucléoprotéines.....	200
Optimisation des conditions d'infection .....	201
Système CRISPR/Cas9 ciblant le génome du VHB .....	202
Extraction ADN et ARN.....	203
Quantification de l'ADN et l'ARN de VHB par qPCR Taqman .....	203
3 Résultats .....	206
Optimisation des conditions d'incorporation du système CRISPR/Cas 9 par l'utilisation des ribonucléoprotéines (RNP) .....	206
Optimisation des conditions d'infection .....	210
Système CRISPR/Cas9 ciblant le génome du VHB .....	212
4 Discussion .....	216
Chapitre 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	220
<u>La ddPCR : nouvelle technologie pour la quantification de l'ADNccc.</u> ....	221
<u>Détection de l'ADNccc dans des cohortes de patients traités.</u> ....	222
<u>CRISPR/Cas9 : nouvelle stratégie pour cibler l'ADNccc :</u> .....	228

Bibliographie : .....	235
Annexes .....	260
Article .....	260
Présentations en Congrès .....	267

## Table des figures

<b>Figure 1 :</b> Carte de la répartition du virus de l'hépatite B en fonction du marqueur HBs. ....	33
<b>Figure 2:</b> Modes de transmission du virus de l'hépatite B .....	33
<b>Figure 3:</b> Evolution naturelle de la maladie .....	35
<b>Figure 4:</b> Evolution naturelle de la maladie .....	35
<b>Figure 5 :</b> Evolution naturelle de la maladie .....	39
<b>Figure 6:</b> Répartition mondiale des différents géotypes du VHB (Figure de Valsamakis s. d.) .....	39
<b>Figure 7 :</b> Les différentes particules virales du VHB .....	43
<b>Figure 8:</b> Génome du virus de l'hépatite B .....	43
<b>Figure 9 :</b> Organisation des ARN du VHB. ....	45
<b>Figure 10 :</b> Structure des ORF des protéines d'enveloppe du VHB .....	45
<b>Figure 11 :</b> Structure de l'ORF des protéines Core, preCore et HBe .....	49
<b>Figure 12 :</b> Structure de l'ORF de la polymérase du VHB. ....	49
<b>Figure 13 :</b> Structure de l'ORF de la protéine HBx.....	49
<b>Figure 14 :</b> Epissage et formation de la protéine HBSP.....	51
<b>Figure 15 :</b> Cycle de réplication du virus de l'hépatite B .....	51
<b>Figure 16 :</b> Culture cellulaire des différents modèles d'étude du VHB .....	57
<b>Figure 17 :</b> Caractéristiques des modèles cellulaires humains utilisés pour l'infection par le VHB .....	57
<b>Figure 18:</b> Modèles de souris pour l'étude du VHB .....	59
<b>Figure 19:</b> Organisation de l'ADNccc .....	63
<b>Figure 20:</b> Conversion de l'ADNrc en ADNccc.....	63
<b>Figure 21 :</b> Identification des protéines Histones sur l'ADNccc par immunoprécipitation .....	65
<b>Figure 22:</b> Chromatine Immuno-précipitation( ChIP).....	65
<b>Figure 23 :</b> Identification de la protéine HBc sur l'ADNccc par immunoprécipitation .....	69
<b>Figure 24 :</b> Schéma représentant la conformation de l'ADNccc et son état transcriptionnel en fonction de la mutation de la protéine HBx du VHB. ....	69
<b>Figure 25:</b> Effet de l'IFN sur l'état répliatif de l'ADNccc.....	71



<b>Figure 26</b> : Principe du Southern blot pour la détection de l'ADNccc.....	73
<b>Figure 27</b> : Schéma représentant les différentes méthodes de détection en qPCR.....	73
<b>Figure 28</b> : Rolling Circle amplification .....	79
<b>Figure 29</b> : Principe de la Fluorescence in situ hybridation (FISH).....	79
<b>Figure 30</b> : Images des Digital PCR avec partitionnement de l'échantillon dans des puces.....	81
<b>Figure 31</b> : Principe de la droplet digital PCR (ddPCR) .....	81
<b>Figure 32</b> : Analyse unidimensionnelle par la ddPCR .....	83
<b>Figure 33</b> : Analyse multidimensionnelle par la ddPCR.....	83
<b>Figure 34</b> : Quantification absolue par la ddPCR. ....	85
<b>Figure 35</b> : Action des traitements actuels sur le cycle d'infection du VHB.....	89
<b>Figure 36</b> : Structure des différents analogues nucléos(t)ides .....	93
<b>Figure 37</b> : Cycle viral du VHB et nouvelles cibles thérapeutiques. ....	101
<b>Figure 38</b> : Structure du Myrcludex B.....	103
<b>Figure 39</b> : Structure de la Cyclosporine A. ....	103
<b>Figure 40</b> : Mode d'action du Myrcludex B et de la Cyclosporine A sur le cycle viral du VHB	103
<b>Figure 41</b> : Structure des nouveaux inhibiteurs de la polymérase. ....	107
<b>Figure 42</b> : Structure et principales fonctions de la protéine Core du VHB. ....	107
<b>Figure 43</b> : Mécanismes d'action des ARN interférents.....	111
<b>Figure 44</b> : Stratégies envisagées pour l'immunomodulation des cellules T par stimulation ou par modification. ....	115
<b>Figure 45</b> : Mécanismes de réparation de l'ADN après cassure double brin.....	119
<b>Figure 46</b> : Les principales nucléases utilisées pour le génome éditng .....	119
<b>Figure 47</b> : Mode d'action des nucléases en doigt de zinc (ZFN).....	121
<b>Figure 48</b> : Mode d'action des nucléases TALEN .....	121
<b>Figure 49</b> : Organisation du système CRISPR/Cas dans la bactérie.....	123
<b>Figure 50</b> : Adaptation du système CRISPR/Cas comme outil génétique. ....	123
<b>Figure 51</b> : Les différentes formes d'incorporation du système CRISPR/Cas 9. ....	127
<b>Figure 52</b> : Mécanisme d'action du système CRISPR/Cas 9 pour la suppression du VHB. ....	132
<b>Figure 53</b> : Validation des amorces pour la quantification de l'ADNccc par ddPCR.....	142
<b>Figure 54</b> : Effet de la circularisation sur la quantification de l'ADNccc .....	142
<b>Figure 55</b> : Comparaison du nombre de cycles de PCR sur la quantification de l'ADNccc .....	142
<b>Figure 56</b> : Validation des amorces pour la quantification de l'ADN total par ddPCR .....	144

<b>Figure 57</b> : Validation des amorces pour la quantification de l'ARNpg du VHB.....	144
<b>Figure 58</b> : Analyse de la quantification de l'ADN viral et de l'ADN cellulaire en simplex et en duplex.....	146
<b>Figure 59</b> : Analyse de la quantification de l'ADN viral de VHB et de l'ADN cellulaire en simplex et en duplex.....	146
<b>Figure 60</b> : Comparaison de la sensibilité de la ddPCR et de la qPCR dans la quantification du plasmide d'ADN du VHB.....	148
<b>Figure 61</b> : Comparaison de la sensibilité de la ddPCR et de la qPCR pour la détection de l'ADNccc dans des cellules HepG2-NTCP infectées. Analyse a été effectuée avec différents ratios cellulaires de cellules HepG2-NTCP infectées et non infectées. a) Schema de la procédure expérimentale. b) Quantification en copies/ $\mu$ L de l'ADNccc par ddPCR et qPCR.	148
<b>Figure 62</b> : Comparaison de la sensibilité de la ddPCR et de la qPCR pour la détection l'ADNccc dans les souris humanisées. ....	150
<b>Figure 63</b> : Validation de la technique de détection par évènement rare.....	150
<b>Figure 64</b> : Procédure expérimentale suivie par les patients inclus dans la cohorte PEGAN	156
<b>Figure 65</b> : Procédure expérimentale suivie par les patients inclus dans la cohorte de patients traités par la Telbivudine .....	156
<b>Figure 66</b> : Procédure expérimentale suivie par les patients inclus dans la cohorte de transplantés hépatiques de l'hôpital de Beaujon .....	156
<b>Figure 67</b> : Quantification par ddPCR et qPCR de l'ADNccc et l'ARNpg dans des biopsies hépatiques .....	161
<b>Figure 68</b> : Quantification par ddPCR de l'ADNccc et de l'ARNpg dans les biopsies hépatiques de chaque patient analysé. ....	161
<b>Figure 69</b> : Comparaison de la détection de l'ADNccc par la technique de qPCR, de RCA et de ddPCR dans le groupe de patients traités par la Telbivudine et le groupe contrôle. Analyse de Bland Altman validant la concordance de la ddPCR et qPCR pour la quantification de l'ADNccc. ....	163
<b>Figure 70</b> : Quantification par ddPCR de l'ADNccc et par qPCR de l'ARNpg dans les biopsies hépatiques. ....	163
<b>Figure 71</b> : Evaluation de l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc par CHIP .....	165
<b>Figure 72</b> : Quantification par ddPCR et qPCR de l'ADNccc et l'ARNpg dans les biopsies hépatiques. ....	165

<b>Figure 73</b> : Comparaison de 2 transfectants pour la lipofection des RNP-CRISPR/Cas9 .....	205
<b>Figure 74</b> : Comparaison de 3 concentrations (10nM, 30nM et 50nM) pour la lipofection des RNP-CRISPR/Cas9.....	205
<b>Figure 75</b> : Cinétique de transfection des RNP CRISPR/Cas9 HPRT .....	207
<b>Figure 76</b> : Digestion par la T7E1 .....	209
<b>Figure 77</b> : Analyse des paramètres viraux des cellules HepG2-NTCP infectées en suspension. ....	211
<b>Figure 78</b> : Analyse des paramètres viraux sur les cellules HepG2-NTCP infectées et réensemencées à une MOI de 1000. ....	213
<b>Figure 79</b> : Clivage du plasmide VHB par le système CRISPR/Cas 9. ....	213
<b>Figure 80</b> : Effet des RNP CRISPR/Cas9 sur l'infection des cellules par VHB.....	215

# Table des tableaux

<b>Tableau 1:</b> <i>Modification post-traductionnelle des Histones</i> .....	62
<b>Tableau 2:</b> <i>Tableau regroupant les différentes caractéristiques du traitement PEG-IFN et des traitements par analogues nucléos(t)idiques (Figure adaptée de Lampertico et al. 2017).</i> ...	90
<b>Tableau 3:</b> <i>Mutations générées par les différents analogues de nucléos(t)ides.</i> .....	97
<b>Tableau 4:</b> <i>Amorces pour la quantification de l'ADNccc du VHB et l'ARN pg du VHB.</i> .....	139
<b>Tableau 5 :</b> <i>Cycle de PCR pour la quantification de l'ADNrc , la <math>\beta</math> globine, l'ARNpg et GusB par qPCR</i> .....	139
<b>Tableau 6 :</b> <i>Cycle de PCR pour la quantification de l'ADNccc par qPCR</i> .....	140
<b>Tableau 7:</b> <i>Cycle de PCR pour la quantification de l'ADNccc par ddPCR</i> .....	141
<b>Tableau 8 :</b> <i>Séquences des 8 ARN guides sélectionnés pour tester leur efficacité contre le génome de VHB dans un plasmide et dans les cellules HepG2-NTCP infectées par le VHB.</i> .	204
<b>Tableau 9 :</b> <i>ARN guide possibles pour la combinaison avec la protéine CpF1</i> .....	233

# Abréviation

**aa** :Acide aminé

**AAV** : Adeno-associated virus

**ADNccc** : ADN clos de façon covalent

**ADNrc** : ADN relaxé circulaire

**ADV** : Adéfovir Dipivoxil

**ALAT** : Alanine transférase

**APOBEC** : Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide

**ARNm** : ARN messenger

**ARNpg** : ARN pré-génomique

**ATF** : Activating transcription factor

**Cas 9** : CRISPR associated protein 9

**CBP**: CREB Binding Protein

**CHB** : Hépatite B chronique

**CHC** : Carcinome Hépatocellulaire

**ChHBV** : Virus de l'hépatite B du chimpanzé

**ChiP** : Chromatine Immuno-Précipitation

**CpAM** : Modulateurs Allostériques de la protéine Core

**Cpf1** : CRISPR-associated endonuclease in Prevotella and Francisella 1

**CREB** : C-AMP Response Element-binding protein

**CRISPR** : Clustered regulary interspaced short palindromic repeats

**CRISPRa** : Clustered regulary interspaced short palindromic repeats activateur

**CRISPRi** : Clustered regulary interspaced short palindromic repeats inhibiteur

**CsA** : Cyclosporine A

**dCas9** : Cas9 muté pour ses deux sous unité protéique

**DDB1** : DNA damage-binding

**ddPCR** : Droplet digital PCR

**DHBV** : Virus de l'hépatite B du canard

**DIG** : digoxigenin

**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DNA-PK** : protéinase K dépendante de l'ADN

**DPC** : Dynamic Polyconjugate

**DSB** : Cassure double brin

**DSS** : Sulfonamide

**Enh I** : Enhancer I

**Enh II** : Enhancer II

**ETV** : Entécavir

**FISH** : Fluorescence *in situ* hybridation

**FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfert

**GSHBV** : Virus de l'hépatite de l'écureuil

**HAP** : Hétéroaryldihydropyrimidines

**HBc** : Protéine de la capsid du virus de l'hépatite B

**HBe** : Protéine e du virus de l'hépatite B

**HBs** : Protéine de surface du virus de l'hépatite B

**HBSP** : HBV splice-generated protein

**HBx** : Protéine X du Virus de l'hépatite B

**HDAC**: Histone Deacetylase

**HDR** : Homology direct repair

**HNF1** : Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A

**HNF4** : Hepatocyte nuclear factor 4 homeobox A

**HSPG** : Heparan Sulfate Proteoglycan

**IFN** : Interféron

**ISG** : Interferon stimulated gene

**ISRE** : Interferon stimulated response element

**KRAB** : Krüppel associated box

**LAM** : Lamivudine

**LTBR** : Lymphotoxin beta receptor

**MDA5** : Melanoma Differentiation-Associated protein 5

**miRNA** : Micro ARN

**MOI** : Multiplicité d'infection

**NAP** : Nucleic Acid Polymers

**nCas9** : Cas9 muté pour une de ses deux sous unité protéique

**NHEJ** : Non Homologous End-Joining

**NK**: Natural Killer

**NLS** : Séquence de localisation membranaire

**NTCP** : Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide

**ORF** : Open reading frame

**ORI** : Origine de répliation

**PAM** : Protospacer adjacent motif

**PBMC** : peripheral blood mononuclear cell

**PBS** : phosphate buffered saline

**PCp** : Promoteur Core

**PD-1** : Programmed cell death 1

**PEG** : polyéthylène glycol

**PEG-IFN** : Interféron Pegylé

**PF RC DNA** : ADN relâché circulaire déprotéinisé

**PHH** : Primary Humain Hepatocytes

**PPA** : Phenylpropenamides

**PS1p** : Promoteur PreS1

**PSAD** : Plasmide Safe ATP-dependent DNase

**PTM**: Post-Translational Modification

**qPCR** : PCR quantitative

**RCA** : Rolling Circle Amplification

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RH** : Domaine protéique de la polymérase ayant une activité RNase H

**RIG-I** : retinoic acid-inducible gene I

**RISC** : RNA-induced silencing complex

**RNP** : Ribonucléoprotéine

**RT** : Domaine protéique de la polymérase ayant une activité de transcription inverse



**siRNA** : small interfering RNA

**SmC5/6** : Structural maintenance of chromosome

**Sp** : Promoteur S

**STING** : Stimulator of interferon genes

**T5** : enzyme T5 exonucléase

**TAF** : Ténofovir alafenamide

**TALEN** : Transcription Activator-Like Effector Nuclease

**TAP** : Tandem Affinity Purification

**TBV** : Telbivudine

**TDF** : Ténofovir

**TLM** : Motif de translocation membranaire

**TLR** : Toll Like Receptor

**TP** : Domaine terminal de la polymérase

**VHB** : Virus de l'hépatite B

**VHC** : Virus de l'hépatite C

**VHD** : Virus de l'hépatite D

**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

**WHV** : Virus de l'hépatite de la marmotte

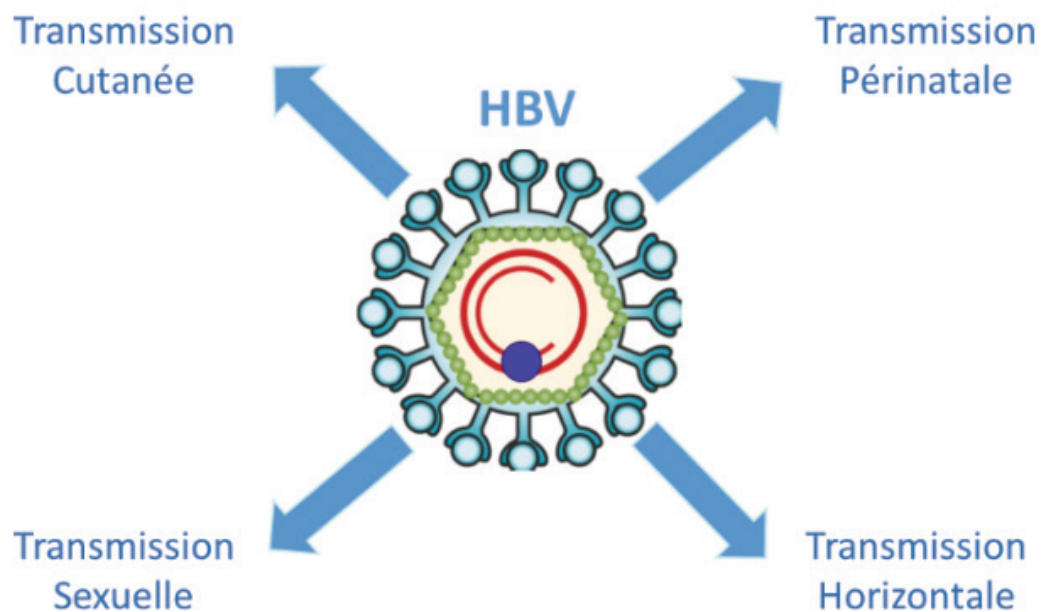
**Xp** : Promoteur X

**ZFN** : Zinc Finger



**Figure 1 :** Carte de la répartition du virus de l'hépatite B en fonction du marqueur HBs.

On retrouve quatre grandes répartitions selon la prévalence du portage de l'antigène HBs : les pays à faible prévalence inférieure à 2%, les pays à prévalence intermédiaire entre 2% et 4%, les pays à prévalence intermédiaire haute entre 5% et 7% et les hautes prévalences supérieure ou égal à 8%. (« Hepatitis B Statistics - MHAHS » s. d.)



**Figure 2:** Modes de transmission du virus de l'hépatite B

# Chapitre 1 : INTRODUCTION

## Partie 1 : L'Hépatite B

L'hépatite B est une infection virale hépatotrope causée par le virus de l'hépatite B (VHB). Cette infection reste un problème de santé publique majeur dû au grand nombre de personnes infectées dans le monde et à la mise en place d'une forme chronique pouvant évoluer en cirrhose et en carcinome hépatocellulaire (CHC).

### 1 Histoire naturelle de la maladie

#### 1.1 Epidémiologie

On estime actuellement que deux milliards de personnes sont infectées au cours de leur vie et que 250 millions sont des porteurs chroniques de ce virus. Le pourcentage de la population infectée varie selon les zones géographiques. On définit différentes zones d'endémie en fonction du niveau de prévalence du portage de l'antigène HBs (**Figure 1**), un marqueur de l'infection virale par le VHB. C'est dans la région de l'Afrique de l'ouest que la prévalence de l'hépatite B chronique est la plus forte avec un pourcentage supérieur à 8%, puis dans la région du Pacifique occidental et l'Afrique de l'est, avec respectivement 6,2% et 6,1% de la population adulte infectée. En Méditerranée orientale, en Asie du Sud-est ainsi qu'en Europe, on estime que, respectivement, 3,3%, 2% et 1,6% de la population est chroniquement infectée (« Hepatitis B Statistics - MHAHS » s. d.).

#### 1.2 Mode de transmission

Il existe quatre principaux modes de transmission (**Figure 2**) :

- La transmission sexuelle est le principal mode de transmission dans les régions à faible endémie pouvant s'expliquer par des rapports multi partenariats.
- La transmission percutanée ou sanguine est particulièrement fréquente chez les toxicomanes, due au partage de seringues. De plus, des mauvaises pratiques dans les hôpitaux ou le non-respect des normes d'hygiène lors des tatouages et des piercings peuvent être également une des causes.

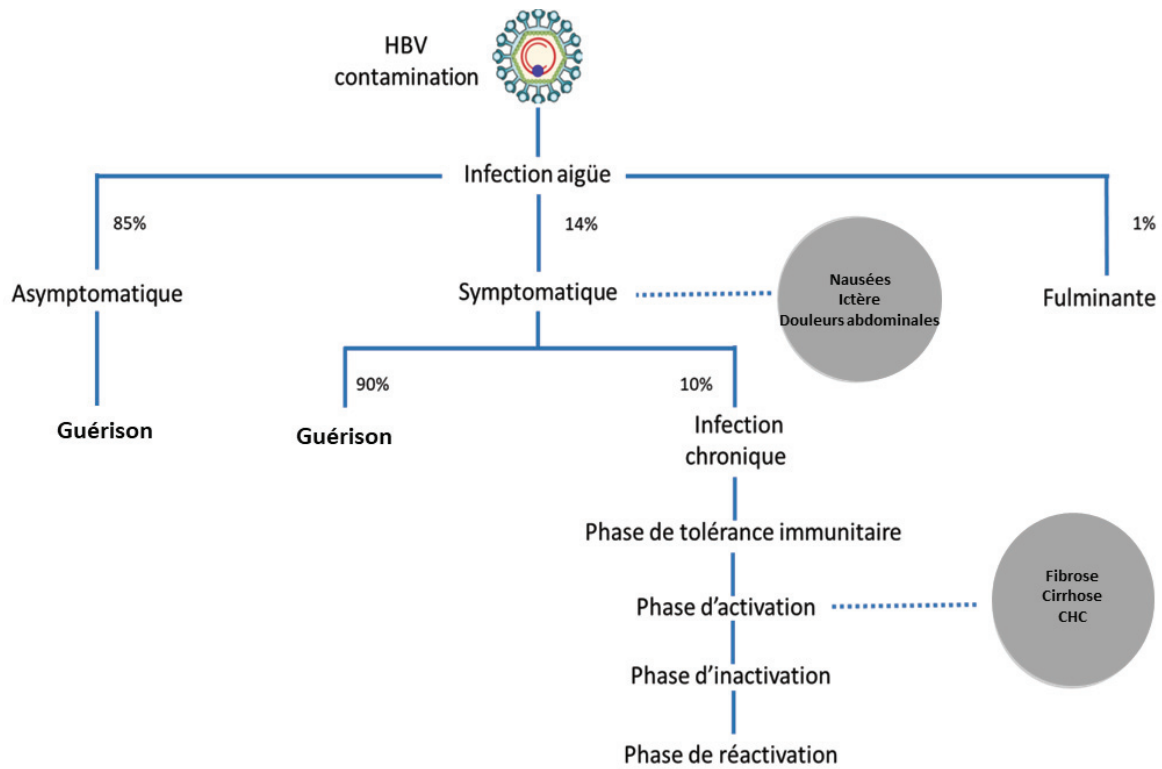


Figure 3: Evolution naturelle de la maladie

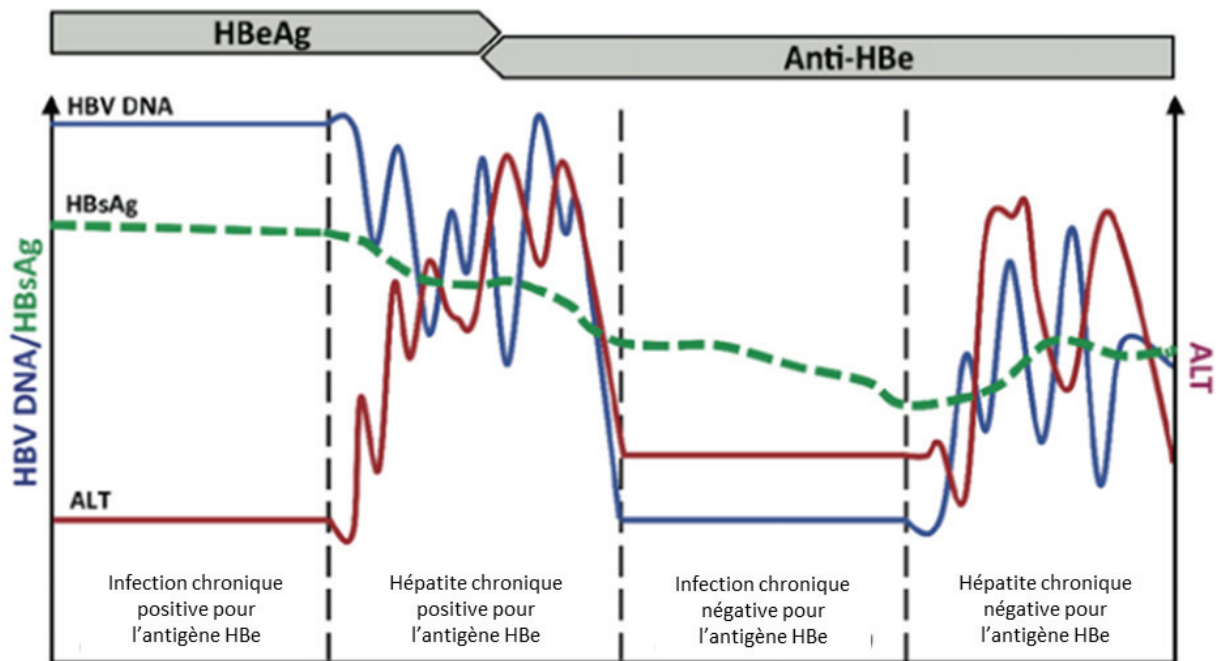


Figure 4: Evolution naturelle de la maladie

Schéma représentant la sérologie et la virologie au cours des différentes phases de l'infection chronique par le VHB (Figure d'adaptée de European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu ET European Association for the Study of the Liver 2017).

- La transmission périnatale est le mode de propagation le plus courant dans les zones de forte endémie. La contamination de la mère à l'enfant se fait essentiellement durant l'accouchement. Il est important de noter que plus l'individu est infecté tôt plus le risque de développer une infection chronique est élevée.
- La transmission horizontale est le mode de transmission le moins fréquent et se fait par contact proche non-sexuel. Ce mode de transmission est souvent observé chez les membres d'une même famille *via* le biais de rasoir ou d'une brosse à dents par exemple. Le virus de l'hépatite B peut survivre en dehors du corps humain pendant au moins 7 jours. Au cours de ce laps de temps, le virus est encore susceptible de provoquer une infection s'il pénètre dans l'organisme d'une personne non protégée par la vaccination.

Le taux de transmission du VHB peut s'expliquer par sa concentration élevée dans la plupart des fluides biologiques des personnes infectées. On détecte environ  $10^8$  à  $10^9$  virions/mL dans le sang,  $10^6$  à  $10^7$ /mL dans le sperme et les sécrétions vaginales,  $10^5$  à  $10^7$ /mL dans la salive. (Antona et Larsen 2010)

### 1.3 Les symptômes

Le VHB peut amener à des infections aiguës qui sont dans 85% des cas asymptomatiques. La fréquence des formes symptomatiques est corrélée positivement avec l'âge des patients lors de leur contamination. Les infections aiguës peuvent entraîner un ictère cutané, des nausées, de la fièvre et des douleurs abdominales. Dans 1% des cas, les infections aiguës peuvent amener à des hépatites fulminantes qui se caractérisent par une destruction massive des cellules hépatiques. Ces dernières sont souvent associées à une co-infection par le virus de l'hépatite delta. L'absence de transplantation hépatique, en cas d'hépatite fulminante, entraîne une mortalité dans plus 80% des cas.

Le VHB peut également amener à des infections chroniques qui surviennent dans environ 5% des cas chez l'adulte immunocompétent, mais dans 90% des cas chez le nouveau-né. Elles se définissent par la persistance de l'antigène HBs. La persistance des infections chroniques conduit à l'évolution de la pathologie avec l'apparition d'une fibrose du tissu hépatique puis d'une cirrhose pouvant conduire au stade terminal de la maladie : le CHC (**Figure 3**).

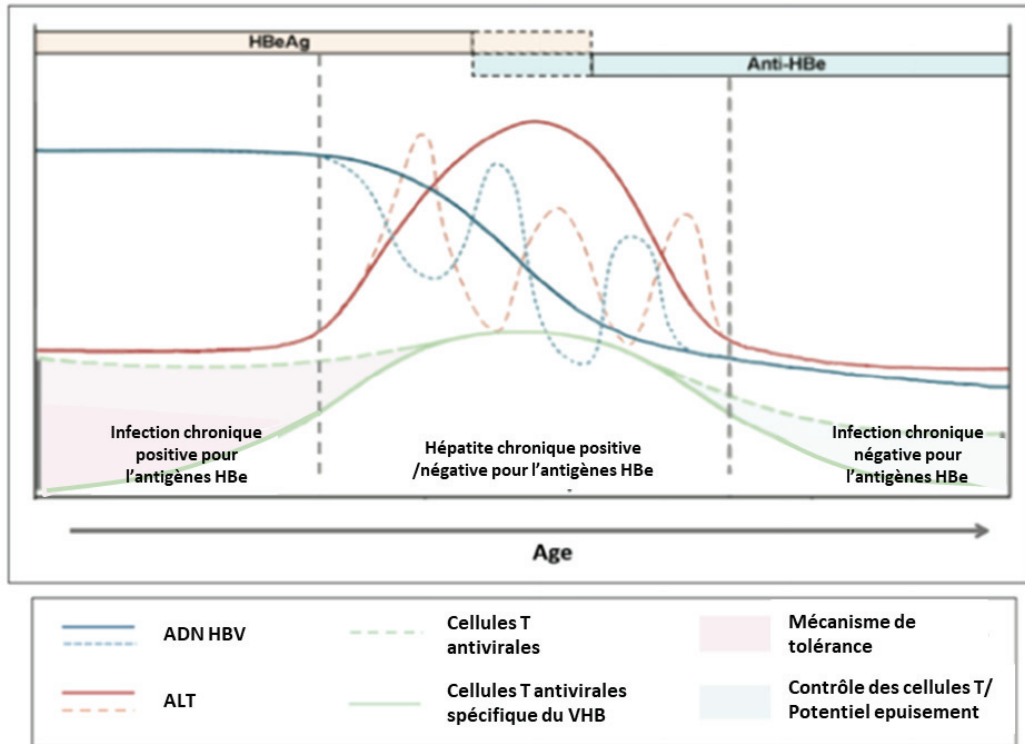
L'infection chronique présente plusieurs phases, récemment redéfini en 2017 par l'EASL (Lampertico et al. 2017) (**Figure 4**) :

- La phase 1 « Infection chronique par le VHB, positive pour l'antigène HBe », précédemment appelée « Phase de tolérance du système immunitaire » : elle est caractérisée par la présence d'antigène HBe dans le sérum, un haut niveau d'ADN du VHB et un taux d'alanine transférase (ALAT) normal situé dans les valeurs limites standard. Au niveau du foie, la nécrose, inflammation ou la fibrose sont minimales, voire inexistantes, mais une intégration de l'ADN du VHB est possible dans cette phase. Cette phase est plus fréquente et longue chez les patients infectés de manière périnatale et est associée à la présence de lymphocytes T spécifiques du VHB qui peuvent être conservés jusqu'à l'âge adulte. Ces patients présentent un taux élevé de contamination dû à la présence de grande quantité d'ADN du VHB.
- La phase 2 « Hépatite chronique, positive pour l'antigène HBe » : précédemment appelée « Phase immunitaire active » : elle est caractérisée par la présence de l'antigène HBe dans le sérum, de grande quantité d'ADN du VHB et un taux élevé d'ALAT. Au niveau du foie, la nécrose et l'inflammation passent à un état modéré ou sévère avec une accélération de la progression de la fibrose. Cette phase peut se développer plusieurs années après la phase 1. Elle est plus fréquente et plus longue chez les patients infectés à l'âge adulte. La résolution de cette phase est variable. La plupart des patients ont une séroconversion de l'antigène HBe vers les anticorps HBe et une élimination de l'ADN de VHB dans le sérum. D'autres peuvent échapper dans le contrôle de l'infection et progresser vers une phase d'infection chronique pendant de nombreuses années.
- La phase 3 « Infection chronique par le VHB, négative pour l'antigène HBe » précédemment appelée « Phase de contrôle immunitaire » : elle est caractérisée par la présence d'anticorps anti-HBe dans le sérum, par une faible virémie et un taux normal d'ALAT. Certains patients dans cette phase ont un taux d'ADN supérieur à 2000 UI/ml avec un taux normal d'ALAT et une activité nécrotique et inflammatoire minimale et une fibrose modérée. Ces patients ont de faible risque d'évoluer vers la cirrhose ou bien le CHC s'ils restent dans cette phase, mais une progression vers une hépatite chronique peut avoir lieu. La perte de l'antigène HBs ou bien la

séroconversion de l'antigène HBs vers les anticorps anti-HBs peut avoir lieu dans environ 1% des cas cliniques.

- La phase 4 « Hépatite chronique négative pour l'antigène HBe » : elle est caractérisée par un taux détectable d'anticorps anti-HBe, la persistance ou la fluctuation de grande quantité d'ADN du VHB dans le sérum et la persistance ou la fluctuation d'un taux d'ALAT. Le foie présente des aspects nécrotiques et inflammatoire associé à de la fibrose. La plupart des patients présente des variants du VHB dans la région preCore et la région promotrice Core ce qui abolit l'expression de l'antigène HBe. Cette phase est associée à des faibles taux de rémission.
- La phase 5 « Antigène HBs négatif » : elle est caractérisée par l'absence d'antigène HBs dans le sérum et la présence d'anticorps anti-HBs. Cette phase est aussi appelée « Infection occulte ». L'absence d'antigène HBs peut être due à la faible sensibilité des techniques de détection. Les patients de cette phase ont un taux normal d'ALAT et une concentration indétectable d'ADN du VHB dans le sérum. Par contre, dans cette phase, l'ADNccc est détectable dans le foie. La perte de l'antigène HBs est associée à une diminution du risque d'évolution vers la cirrhose, de décompensation et de CHC. Cependant, si la cirrhose est développée avant la perte de l'antigènes HBs, les patients ont un plus haut risque de CHC. L'immunosuppression thérapeutique peut amener à une réactivation virale chez ces patients.

Des auteurs ont proposé récemment une nouvelle représentation de la progression naturelle de l'hépatite B chronique (**Figure 5**). Cette modélisation décrit l'évolution de la maladie en trois phases au lieu de cinq en regroupant les deux phases d'hépatite chronique quel que soit le statut de l'antigène HBe. Elle distingue également l'évolution des cellules T spécifiques du VHB des autres cellules T non-spécifiques qui contrôlent la réplication virale. Pendant la première phase, malgré l'existence d'une virémie élevée, l'absence d'activation des cellules T spécifiques du VHB caractérise un état de tolérance immunitaire. La seconde phase correspond à l'activation du système immunitaire spécifique du VHB entraînant une réaction inflammatoire du foie avec fluctuation du taux d'ALAT et de la virémie. La troisième phase associe une diminution globale des capacités d'activation immunitaire mais plus importante pour les cellules T spécifiques du VHB par un phénomène d'épuisement probable. Durant cette phase la virémie et le taux d'ALAT restent normaux ou peu élevés.



**Figure 5 :** Evolution naturelle de la maladie

Une représentation alternative, en trois phases, de la sérologie et de la virologie au cours de l'infection chronique par le VHB. Le schéma montre également le contrôle du système immunitaire durant ces phases (Figure adaptée de Velazquez et Grakoui 2012; Gill et Kennedy 2014).



**Figure 6 :** Répartition mondiale des différents génotypes du VHB (Figure de Valsamakis s. d.)



Cependant, il est important de noter que la progression naturelle de l'hépatite B chronique varie en fonction des individus et que la propension d'un individu à développer une réponse immunitaire spécifique du VHB dépend largement de l'âge. Chez les individus développant une CHB tardive, l'activation du système immunitaire peut se produire immédiatement sans passer par une étape de phase de tolérance contrairement à une CHB précoce qui peut se caractériser par une longue phase de dominance du virus avec un système immunitaire ne répondant pas à la présence d'une infection. De plus, le potentiel d'épuisement des cellules T semble augmenter également avec l'âge. (Velazquez et Grakoui 2012; Gill et Kennedy 2014)

## 1.4 Prévention

La prévention contre le VHB est possible grâce à une vaccination depuis 1980. Le premier vaccin développé était dérivé de plasma et composé de protéine HBs purifiée afin de produire des anticorps contre l'infection au VHB. Actuellement, les vaccins disponibles contre le VHB sont produits *via* des technologies d'ADN recombinant. L'OMS recommande d'administrer ce vaccin à tous les enfants dès que possible après leur naissance et se compose de trois doses. L'administration de ces trois doses résulte en une protection contre le VHB dans 90% des cas chez les nourrissons, les enfants et les jeunes adultes. Les adultes de plus de 40 ans et les immunodéprimés sont quant à eux moins susceptibles de répondre à la vaccination. (Chang et Chen 2015)

# 2 Les caractéristiques du virus de l'hépatite B

## 2.1 Classification du virus

Le VHB est un virus à ADN circulaire partiellement double brin de 3,2 kb qui appartient à la famille des Hepadnavirus (Summers, O'Connell, et Millman 1975). Bien que ce soit un virus à ADN, le génome du VHB ne possède pas d'origine de réplication. Cela nécessite donc la synthèse d'un intermédiaire de réplication à ARN (ARNpg) qui sera rétrotranscrit en ADN viral. Cette caractéristique l'inclut également dans la catégorie des para-rétrovirus, proche des rétrovirus. Les hepadnavirus se répartissent en deux groupes qui diffèrent par leur génome et par leur pathogénèse :

- Les Avihepadnavirus infectent principalement les oiseaux tels que le canard (DHBV). Les virus appartenant à ce groupe diffèrent des virus de mammifères par l'absence

du gène X et du fait qu'ils ne possèdent que deux protéines d'enveloppe (la grande protéine preS/S et la petite protéine S). DHBV et le VHB partagent 40 % d'homologie.

- Les Orthohepadnavirus infectent principalement les mammifères, dont le VHB est le prototype. On retrouve également dans ce groupe le virus de la marmotte (WHV) qui présente 60% d'homologie avec le VHB, le virus de l'écureuil (GSHBV) ainsi que le virus du chimpanzé (ChHBV). (Rasche, Souza, et Drexler 2016)

Grâce à une comparaison de leurs génomes, dix génotypes différents de VHB ont pu être identifiés (A à J) en se basant sur une variation de 8% de leurs séquences nucléotidiques. La distribution mondiale de ces génotypes diffère selon les souches, avec des régions à plus forte prévalence (Tong et Revill 2016; Yuen et al. 2018). Les génotypes influent sur la charge virale, le pronostic, la survenue du CHC et la réponse au traitement (**Figure 6**).

## 2.2 Les particules virales

Plusieurs types de particules virales ont été visualisés dans des sérums infectés grâce à la microscopie électronique (**Figure 7**) :

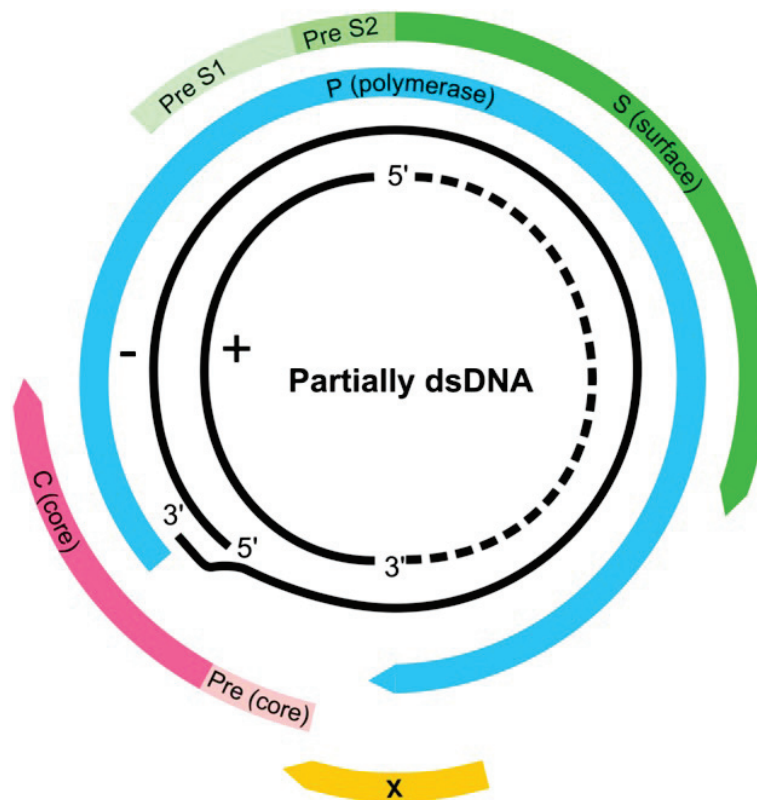
- La particule de Dane représentant la forme infectieuse : ce sont des sphères de 42 nm de diamètre. On les retrouve dans le sérum de patient à une concentration de  $10^9$ /mL. Elles sont constituées d'une enveloppe lipidique contenant des protéines de surface du VHB. Cette enveloppe entoure la nucléocapside interne qui est elle-même composée de la protéine core (HBcAg) et qui contient la polymérase virale ainsi que le génome d'ADN viral. (Heermann et al. 1984)
- Des particules subvirales ou incomplètes non-infectieuses. : il existe deux grands types de particules caractérisées soit par l'absence du génome et de la capsidite soit par l'absence du génome uniquement.
  - Le premier type correspond à des formes sphériques et des formes filamenteuses de HBsAg de 20nm de diamètre. Elles sont uniquement composées de la protéine virale de surface avec une prédominance de la protéine S pour la forme sphérique et une prédominance de la protéine L pour la forme filamenteuse. Ces particules sont trouvées en excès (100 000 fois) par rapport au virion dans le sang des personnes infectées.

- Le second type comporte des virions sans génome, qui contiennent des protéines de surface enfermant la capsid virale dont le nombre est 100 fois supérieur au nombre de particules de Dane dans le sang des personnes infectées. Ces particules ont été découvertes, il y a une quarantaine d'années, comme étant des particules « légères », sans génome contrairement aux particules dites « Lourdes » contenant le génome de HBV avec la polymérase virale. Cependant, aucune de ces études ont déterminé si ces particules pouvaient contenir de l'ARN ou bien du génome de l'hôte. Récemment, des études ont suggéré que celle-ci pouvait contenir une protéine HBc anormale. Cette dernière viendrait d'un processus anormal de la protéine PreCore. Il a été montré la présence de ces particules dans le surnageant de culture même lors d'inhibition de la synthèse d'ADN du VHB. Une estimation de la quantité d'ADN par rapport à celle de la capsid indique une supériorité de la capsid par rapport à l'ADN viral suggérant que 99% des virions ne contiendraient pas d'ADN. Ces particules pourraient donc devenir un potentiel biomarqueur pour contrôler l'élimination virale (Ning et al. 2011; Luckenbaugh et al. 2015).
- Des particules contenant uniquement de l'ARN du VHB en plus faible quantité (1 à 2 log de moins) dans le sang ont été récemment décrites. La composition de ces particules reste encore à être caractérisée. Selon la technique d'immunoprécipitation avec des anti-HBc, il semblerait qu'elles soient constituées de la capsid virale. L'action de détergent sur ces particules améliore l'immunoprécipitation et suggère la présence de l'enveloppe virale (Jansen et al. 2016). La nature de l'ARN reste aussi à clarifier. Certaines études suggèrent qu'il pourrait s'agir de l'ARNpg et qu'il serait intéressant de tester l'infectivité de ces particules (Jie Wang et al. 2016). Il pourrait également s'agir d'ARNpg résiduel retrouvé dans le sang sous l'action d'inhibiteur de la transcription inverse. Le rôle de ces particules subvirales reste encore à éclaircir. (odeckmyn 13:02:26 UTC; Hu et Liu 2017)



**Figure 7 :** Les différentes particules virales du VHB

a) Schéma des différentes particules virales que l'on peut retrouver lors de l'infection par le virus de l'hépatite B.  
 b) Image au microscope électronique des différentes particules virales. La flèche jaune montre les particules de Dane, la flèche bleue les sphères et la flèche orange les bâtonnets (Figure adaptée de Urban et al. 2014).



**Figure 8:** Génome du virus de l'hépatite B

Schéma représentant le génome du virus de l'hépatite B avec les ORF codant pour les différentes protéines (Figure de Kramvis 2016)

## 2.3 Les formes génomiques du VHB

### 2.3.1 *L'ADN relâché circulaire (ADNrc)*

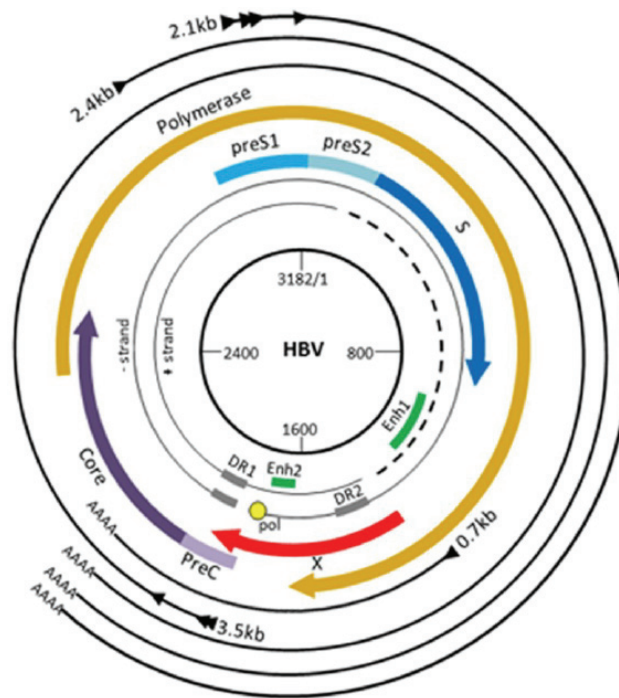
Le virus de l'hépatite B est un virus partiellement double brin d'ADN de 3,2 kb constitué d'un brin de polarité négatif et d'un brin de polarité positif (**Figure 8**). Le brin négatif n'est pas clos. Il présente un « gap » qui permet un chevauchement des deux extrémités 5' des deux brins de 200 nucléotides. Ce brin est lié à la polymérase virale de façon covalente par l'intermédiaire de liaison phosphodiester et *via* une séquence redondante de 9 nucléotides située à l'extrémité 5' du brin. Celui-ci servira également de matrice à la transcription. Le brin positif dont sa longueur peut varier selon les molécules d'ADN, est incomplet et possède une amorce d'ARN de 18 nucléotides en 5' à l'origine de l'initiation de la synthèse du brin positif de l'ADN viral par une polymérase cellulaire. (Beck et Nassal 2007; Summers, O'Connell, et Millman 1975)

### 2.3.2 *L'ADN circulaire clos de façon covalente (ADNccc)*

L'ADNccc est un intermédiaire de réplication provenant de l'ADNrc après suppression des différentes particularités décrites précédemment. Il s'agit d'un ADN double brin super-enroulé qui sert de matrice à la transcription virale. Il se présente sous la forme d'un minichromosome ayant une chromatine compactée et associée à plusieurs types de protéines cellulaires comme les histones, des facteurs de transcription et des protéines virales comme HBc et HBx. Comme les chromosomes cellulaires, ce minichromosome viral est sujet à des phénomènes de régulation épigénétique. (La structure et les différentes caractéristiques de cet ADN seront décrites plus longuement dans la partie 2)

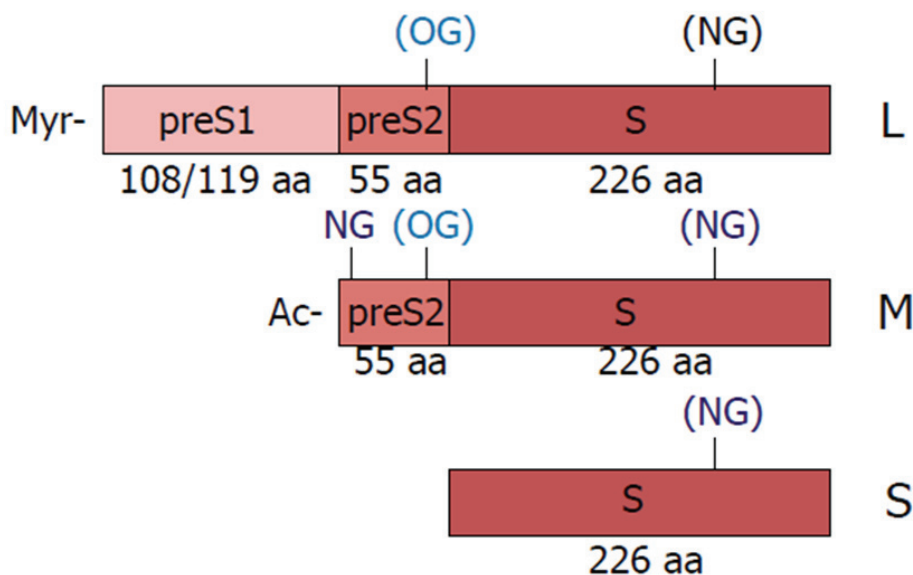
## 2.4 Les ARN viraux

Le génome du VHB est constitué de 4 gènes chevauchants localisés sur le brin de polarité négatif (ORF S ; C ; P et X) qui permettront la formation de 5 ARN messagers (ARNm) et de 8 protéines (**Figure 9**). Ces ARNm présentent plusieurs codons d'initiation qui permettront la synthèse de ces protéines. Ils sont régulés par 4 promoteurs différents : promoteurs Cp (Core promoteur), PS1p (PreS1 promoteur), Sp (S promoteur) et Xp (HBx promoteur)) et par 2 « enhancers » (Enh I et Enh II) situés en amont du promoteur Core. Tous les ARNm viraux partagent un signal commun de polyadénylation à l'extrémité 3'



**Figure 9 :** Organisation des ARN du VHB.

Schéma représentant l'organisation du génome du virus de l'hépatite B. Les transcrits du VHB sont représentés en noirs. Les différents ORF codant pour les protéines sont représentés par différentes couleurs (en jaune l'ORF codant pour la polymérase, en bleu, l'ORF codant pour les 3 protéines d'enveloppes, en rouge, l'ORF codant pour la protéine X et en violet, l'ORF codant pour la protéine de la capside et l'antigène HBe) (Figure de Minor et Slagle 2014).



**Figure 10 :** Structure des ORF des protéines d'enveloppe du VHB

La grande protéine (L) de 389 à 400 acides aminés (aa) contenant 3 domaines : S, préS2 et préS1 qui est myristylé. La moyenne protéine (M) de 281 aa contenant 2 domaines : S et préS2 qui est acétylé. La petite protéine (S) de 226 aa contenant uniquement le domaine S.(Figure adapté de la publication de Glebe et Urban 2007).

(Billioud, Ait-Goughoulte, et Zoulim 2010). Parmi les ARN viraux, on distingue deux types : les ARN génomiques et les ARN subgénomiques.

- Il existe deux ARN génomiques de 3.5 kb sous le contrôle du promoteur Cp et dont leurs séquences diffèrent seulement de quelques nucléotides. Le premier ARN est à l'origine de la protéine préC qui est le précurseur de l'antigène HBe. Le second ARN, plus abondant, constitue l'ARN dit prégénomique (ARNpg). Il code la protéine Core, la polymérase virale et constitue la matrice pour la retro-transcription en ADNrc dans le virion néo-synthétisés.
- Il existe 3 ARN subgénomiques de taille variable : 0.7 kb, 2.1 kb, et 2.4kb. Le transcrite de 0.7 kb correspond à l'ARN issu du gène X et sera à l'origine de la protéine X (HBx). Le transcrite de 2.1 kb est issu de l'ORF S et code la petite et le moyenne protéine de surface (protéine S et protéine M) sous le contrôle du promoteur S. Le transcrite de 2.4 kb est à l'origine de la grande protéine de Surface (Protéine L) sous le contrôle du promoteur preS1.

De plus, 2 formes majeures d'ARN épissés du VHB provenant de l'ARNpg et de l'ARNm preS2/S ont été identifiées. Ces ARN représentent jusqu'à 30% des ARNpg totaux. Ces ARN épissés conduiraient à la formation de particules défectives qui joueraient un rôle dans la persistance virale. (Wu et al. 1991; Günther et al. 1997; Su et al. 1989)

## 2.5 Les protéines virales

### 2.5.1 HBs

Les protéines HBs sont des glycoprotéines de surface. On en distingue trois types : la glycoprotéine L (pour « Large ») (LHBs), la M (pour « Middle ») (MHBs) et la S (pour « Small ») (SHBs) (**Figure 10**). Ces protéines sont codées à partir d'un seul et même ORF mais *via* 2 promoteurs indépendants, un en amont de l'ORF et un second promoteur interne à l'ORF situé en amont du second site d'initiation de la traduction.

La protéine SHBs est la protéine majeure de l'enveloppe du virion et des sous particules HBsAg. La formation des particules virales se fait par la présence de ponts disulfures présents sur SHBs. Cette protéine contient le « déterminant a » qui est reconnue par les anticorps neutralisants. C'est une protéine de 226 acides aminés qui possède un seul

domaine : S (commun aux trois protéines d'enveloppe). L'analyse de sa structure secondaire montre la présence de trois sites hydrophobiques séparés par une boucle hydrophile. La protéine S serait la seule protéine nécessaire à la formation et l'assemblage des particules subvirales du VHB même en absence d'autres facteurs viraux. (Patient, Hourieux, et Roingard 2009)

La protéine MHBs est une protéine de 281 acides aminés, très similaire à la protéine S. La différence avec la protéine S est la présence d'un domaine supplémentaire de 55 acides aminés en N-terminal nommé PreS2. Le rôle exact de cette protéine dans le cycle viral reste encore à éclaircir (Schmitt et al. 2004). En effet cette protéine, absente chez les Avihepadnavirus, n'empêche pas la bonne formation, la fonctionnalité et la diffusion des particules virales. (Patient, Hourieux, et Roingard 2009)

La protéine LHBs est caractérisée par une séquence de 108 à 119 acides aminés (selon les géotypes) supplémentaires par rapport à la protéine MHBs en N-terminal nommée PreS1. Cette protéine constituerait le composant principal des formes filamenteuses des particules subvirales. La particularité de cette protéine est qu'elle possède un site myristylé qui est essentiel à l'infectivité du virus. En effet la myristilation de la glycine 2 du domaine preS1 de la protéine L par les N-myristoyltransferase cellulaire permet l'entrée du virus *via* le récepteur NTCP au niveau du site de fixation des acides biliaires. (Persing, Varmus, et Ganem 1987; Philippe Gripon, Cannie, et Urban 2005; H. Yan et al. 2014).

### 2.5.2 Protéine core (HBc), preCore et HBe

La protéine Core ou protéine de la capsid (HBc) est une protéine cytoplasmique de 21 KDa (p21) qui est impliquée dans la formation de la nucléocapsid (**Figure 11**). Elle est également connue pour jouer un rôle dans la réplication virale notamment au niveau du transport cellulaire, la libération du génome, la transcription inverse et de la régulation épigénétique de l'ADNccc et de l'ADN génomique (Beck et Nassal 2007). Une fois synthétisée, elle s'assemble en 180 sous-unités permettant la formation de la structure icosaédrique du VHB *via* une structure en épingle à cheveux et des ponts disulfures qui permettent de stabiliser l'association. La séquence primaire de la protéine est constituée de 183 acides aminés ayant deux domaines bien distincts en N- et C- terminal reliés par une région charnière. Le domaine N-terminal contient les domaines nécessaires à l'auto-



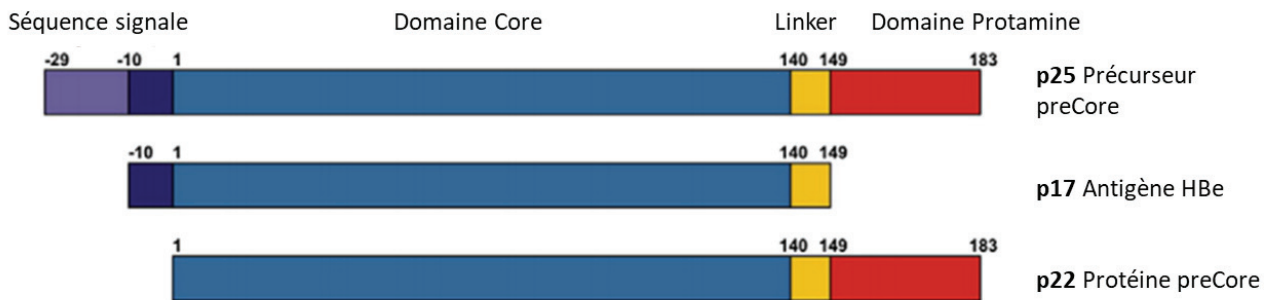
assemblage de la capsid alors que le domaine C-terminal joue un rôle dans la réplication et permettrait le transport jusqu'au noyau. (Schödel et al. 1993)

La protéine preCore ou HBeAg est synthétisée à partir de l'ARN preCore-Core. Il s'agit d'une protéine sécrétée qui ne semble pas nécessaire à la réplication. Néanmoins, il a été montré que cette protéine serait capable de réduire la réponse immunitaire de l'hôte et de contribuer à la persistance du VHB. La traduction de preCore-Core conduit à la formation d'un précurseur p25 contenant en N-terminal une séquence signal à destination du réticulum endoplasmique (RE) pour la maturation de la protéine. Dans le RE, une partie de la séquence en N-terminal est clivée pour produire la protéine preCore intracellulaire (p22) qui subit alors un clivage en C-terminal pour donner la protéine HBeAg de 159 acides aminés et de 17kDa. Le domaine hydrophobe en N-terminal de la protéine lui confère des caractéristiques structurales, sérologiques et immunologiques spécifiques en comparaison avec la protéine Core. (Schödel et al. 1993)

### 2.5.3 *La polymérase*

La polymérase virale est codée à partir du gène pol qui recouvre presque l'intégralité du génome viral et permet la synthèse de l'ADN viral après s'être fixée de manière stable sur la structure secondaire de l'ARN<sub>pg</sub>, appelée aussi Epsilon. C'est une protéine de 90 kDa et de 845 acides aminés constituée de quatre domaines fonctionnels (**Figure 12**):

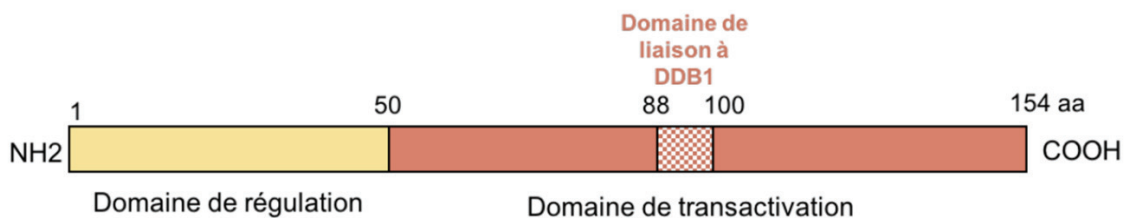
- Un premier domaine est situé en N-terminal, celui-ci code le domaine protéique terminal (TP) qui lie la polymérase à l'extrémité 5' du brin négatif par l'intermédiaire d'une tyrosine et d'un lien phosphodiester. Ceci va agir comme une amorce pour la synthèse du brin négatif en synthétisant une amorce de quelques nucléotides permettant l'initiation de la retro-transcription. (M. Weber et al. 1994; F. Zoulim et Seeger 1994)
- Un second domaine correspond à la région charnière qui permet de relier les domaines entre eux. Il chevauche le domaine preS de l'enveloppe, mais son rôle n'est pas clairement défini.
- Un domaine (RT) en C-terminal nécessaire à la transcription inverse (Nassal 2008)
- Un domaine RNase H (RH) permettant la digestion de l'ARN<sub>pg</sub> après la synthèse d'ADN. (Wei et Peterson 1996)



**Figure 11** : Structure de l'ORF des protéines Core, preCore et HBe  
Le précurseur preCore de 183 aa sera clivée en N-terminal pour donner la protéine preCore (p22) et en C terminal pour donner l'antigène HBe. (Figure adaptée de Walsh et al. 2011).



**Figure 12** : Structure de l'ORF de la polymérase du VHB.  
La polymérase contient 4 domaines. Le domaine terminal (TP), le domaine « spacer », le domaine Pol/RT et le domaine Rnase H. (Figure adaptée de Nassal 2008).



**Figure 13** : Structure de l'ORF de la protéine HBx  
La protéine de 154 aa contient deux domaines : un domaine de transactivation qui possède le site de liaison à la protéine DDB1 et un domaine de régulation (Figure adaptée de Minor et Slagle 2014).

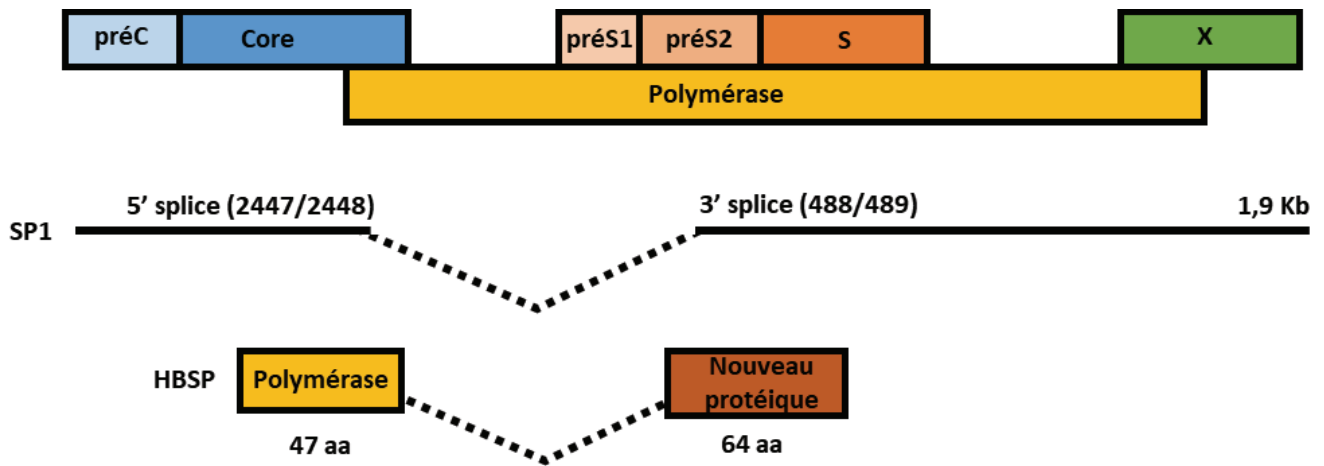
Cette protéine est la cible de nombreux traitements notamment des analogues de nucléos(t)ides afin d'empêcher la réplication virale (Fabien Zoulim et Locarnini 2009).

#### 2.5.4 *HBx*

La protéine HBx est une protéine non-structurelle, codée par le plus petit gène du virus, qui possède une activité trans-activatrice de promoteur et se retrouve uniquement dans les hepadnavirus mammaliens (Bouchard et Schneider 2004). Il s'agit d'une protéine de 17KDa et 154 acides aminés (**Figure 13**). Cette protéine est la plus conservée entre les différents génotypes du VHB. Des anticorps anti-HBx ont été retrouvés chez certains patients infectés par le VHB (Kay et Zoulim 2007; M. Levrero et al. 1990). Elle est localisée dans le cytoplasme et jusqu'à un certain point dans le noyau des cellules hépatiques (Bouchard et Schneider 2004). Elle est constituée de deux domaines fonctionnels :

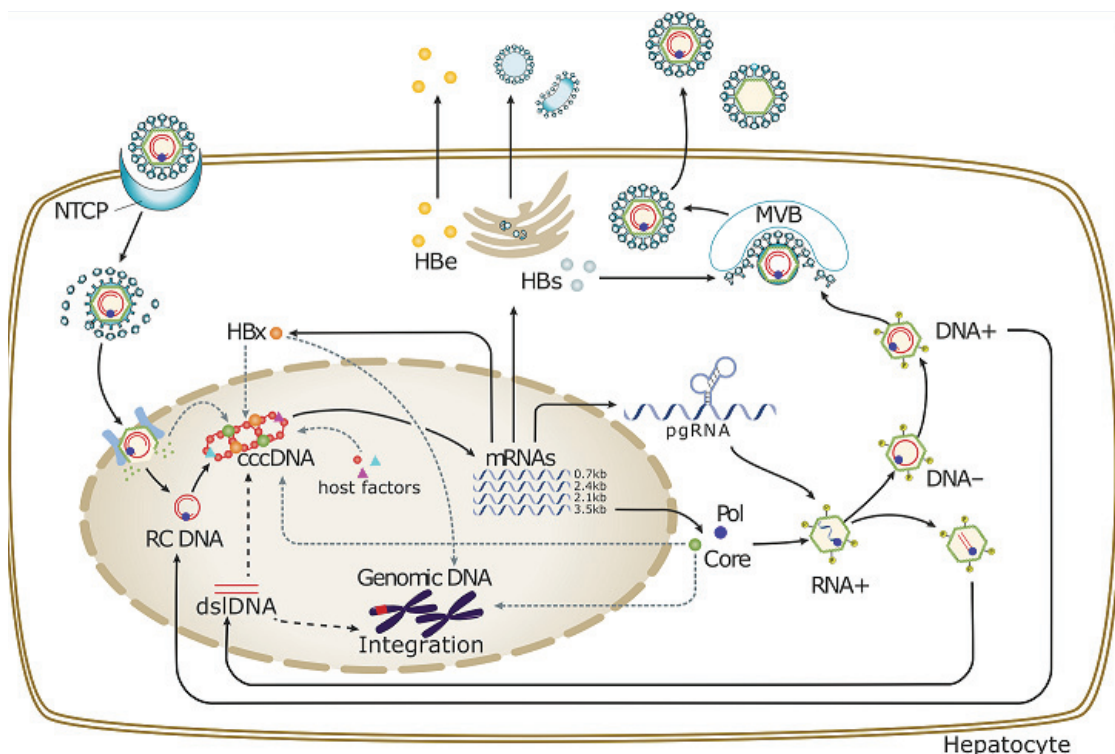
- Un domaine amino-terminal situé au niveau des 50 premiers acides aminés qui permet l'activité de dimérisation.
- Un domaine C-terminal qui est situé entre les acides aminés 53 et 142 et qui permet la transactivation de gènes viraux et cellulaires.

La nécessité de cette protéine pour l'établissement de l'infection a été mise en évidence lors d'une infection par WHV chez la marmotte (F. Zoulim, Saputelli, et Seeger 1994). Elle joue un rôle majeur dans la régulation de la réplication virale et de l'infection (Cougot et al. 2007). Elle interagit avec des promoteurs viraux et cellulaires, des protéines de réparation de l'ADN, des facteurs de transcription et elle affecterait les processus d'apoptose ainsi que le cycle cellulaire. En effet, il a été montré par la méthode de TAP (Tandem Affinity Purification) que la protéine HBx interagissait avec la protéine DDB1 (DNA damage-binding protein 1) et la ligase E3. L'association de la protéine HBx avec ce complexe DDB1-E3 entraîne l'ubiquitylation et donc la dégradation de la protéine SmC5/6 connue pour inhiber la transcription de l'ADNccc. Cette étude montre donc le rôle de la protéine HBx dans la régulation de la transcription de l'ADNccc (Decorsière et al. 2016). Enfin, elle serait également impliquée dans l'oncogenèse induite par le VHB (Bouchard et Schneider 2004).



**Figure 14 :** Epissage et formation de la protéine HBSP

L'épissage donne lieu à la formation d'un nouveau transcript SP1 de 1.9 kb. Ce transcript est traduit en protéine HBSP qui contient 47 aa de la polymérase et 64 aa qui donne lieu à un nouveau domaine protéique (Figure adaptée de Chaar, Jisr, et Allain s. d.).



**Figure 15 :** Cycle de réplication du virus de l'hépatite B

Le virus pénètre dans la cellule via le récepteur NTCP. La nucléocapside est ensuite transférée dans le noyau pour libérer l'ADNrc qui sera converti en ADNccc. L'ADN est transcrit en ARN dont l'ARNpg qui sera encapsidé et rétrotranscrit en ADN. La nucléocapside pourra alors être soit réimportée dans le noyau pour former un pool d'ADNccc soit enveloppée pour permettre la formation de nouveaux virions (Figure adaptée de Testoni, Durantel, et Zoulim 2017).

### 2.5.5 Les protéines épissées : HBSP

« HBV splice-generated protein » (HBSP) est une protéine de 93 acides aminés issue de l'épissage des ARNm du VHB. Elle est formée à partir de la fusion de la partie N-terminal de la polymérase et d'un nouvel ORF créé par l'épissage (**Figure 14**). *In vivo*, elle a été identifiée dans des foies infectés. On détecte également la présence d'anticorps anti-HBSP dans le sérum. Il a été montré que cette protéine n'a pas d'effet sur la réplication d'ADN viral ni sur la transcription mais jouerait un rôle sur l'apoptose des cellules et sur la régulation immunitaire intrahépatique lors de la carcinogenèse (P. Soussan et al. 2000; Patrick Soussan et al. 2003; Duriez et al. 2017).

## 3 Le cycle viral

Le cycle de réplication du virus se fait en plusieurs étapes (**Figure 15**):

- Le VHB s'attache aux hépatocytes *via* les chaînes carbohydrates des sulfates d'héparanine de protéoglycanes, ou HSPG (pour « Heparan Sulfate Proteoglycan ») et la glycoprotéine HBs au niveau de la région (a). Il s'agit d'une réaction ayant une faible affinité facilement réversible. L'entrée du virus se fait *via* l'interaction entre le récepteur NTCP (Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide) et la protéine L de surface *via* son domaine preS1 en N-terminal qui est myristylé (Churin, Roderfeld, et Roeb 2015). Il s'agit d'une forte affinité et spécificité. Le récepteur NTCP est une protéine multi-transmembranaire qui est exprimé au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes. Le rôle primaire du NTCP est de permettre le transport des sels biliaires du sang dans hépatocytes. Il s'agit d'un processus connu ayant une importance vitale pour l'homéostasie des acides biliaires (Stieger 2011). Il a également été montré que des modifications des acides aminés 84 à 87 et de 157 à 165 sur le récepteur NTCP peut empêcher l'établissement de l'infection. (H. Yan et al. 2014)
- Le virus pénètre ensuite dans la cellule par endocytose de manière pH-dépendante, ce qui entraîne un changement de conformation des protéines de surface et leur clivage permettant l'exposition des motifs peptidiques : les TLM (membrane translocation motif) (Köck, Borst, et Schlicht 1996). Cette exposition permet ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome (Stoeckl et al. 2006).

- La nucléocapside est ensuite transférée dans le cytoplasme puis dans le noyau grâce à la séquence NLS (Nuclear localization sequence) en C-terminal de la protéine core (Mabit et al. 2001).
- Au niveau des pores nucléaires, un désassemblage de la nucléocapside se produit, ce qui permet la libération de l'ADN viral sous forme d'ADNrc. Cet ADN engendrera la formation de l'ADNccc *via* des mécanismes viraux et cellulaire (Kann et al. 1999; Beck et Nassal 2007; Nassal 2015b).
- Les ARN viraux sont ensuite synthétisés par l'ARN polymérase cellulaire II (enzyme responsable de la synthèse des ARNm dans la cellule) et l'ARNpg servira aussi d'ARNm 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.
- Une fois synthétisée, la polymérase s'accroche à l'ARNpg sur une structure en épingle nommée epsilon présente en 5' de l'ARNpg, ce qui permet le recrutement des protéines core et donc l'encapsidation de ce complexe avec des protéines chaperonnes comme Hsp90 (Beck et Nassal 2007; Nassal 2008)
- Après l'encapsidation, l'ARNpg peut être rétrotranscrit *via* la polymérase qui va d'abord permettre la synthèse du brin négatif en utilisant la boucle comme matrice. Après la synthèse de quelques nucléotides, la polymérase change de matrice en utilisant un point situé à l'extrémité 3' de l'ARNpg et continue ainsi l'élongation de l'ADN tout en digérant l'ARNpg par son activité RNase H. Après la synthèse du brin de polarité négatif, un petit segment d'ARNpg en extrémité 5' permet un second saut de la polymérase et sert d'initiateur pour la synthèse du brin positif pour permettre la formation d'une nouvelle molécule d'ADNrc.
- Une fois la transcription inverse terminée, la nucléocapside peut soit être réimportée au niveau du noyau pour former un pool d'ADNccc, soit être enveloppée avec les protéines de surface au niveau du RE qui conduit à l'exocytose du virion (Summers, Smith, et Horwich 1990)

## 4 Les modèles d'études pour le VHB :

### 4.1 Les modèles cellulaires :

#### 4.1.1 *Les lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire*

Ce sont des lignées de cellules humaines de carcinome hépatocellulaire qui sont transfectées par des constructions recombinantes du VHB. Elles sont faciles d'entretien, mais elles ne peuvent pas s'infecter naturellement dû à l'absence du récepteur NTCP. Ces modèles tels que les HepG2 et les Huh7 ont été longtemps utilisés pour étudier la morphogénèse (Sureau et al. 1986), la réplication du VHB, la production virale (Sells, Chen, et Acs 1987) et pour évaluer l'efficacité de traitement contre le VHB.

L'utilisation de vecteurs de type baculovirus ou adénovirus comportant le génome du VHB dans ces types cellulaires ont permis la formation et l'étude de l'ADNccc *in vitro* (J. Lucifora et al. 2008; Ren et Nassal 2001).

Parmi elles, on distingue aussi les HepG2.2.15 qui ont été utilisées pour étudier l'intégration du VHB dans le génome cellulaire montrant que les lésions de l'ADN favorisent l'intégration (Dandri et al. 2002) (**Figure 16**).

On distingue également les cellules HepAD38, (**Figure 16**), dont l'expression du VHB est sous le contrôle d'un promoteur inductible par tétracycline (Ladner et al. 1997).

Après la découverte du récepteur NTCP comme récepteur d'entrée au VHB (H. Yan et al. 2012), il a été possible de créer des lignées constitutives permettant d'exprimer le gène humain NTCP, les HepG2-NTCP, et ainsi de permettre l'établissement de l'infection par le VHB dans ces cellules (H. Yan et al. 2013) (**Figure 16**). La mise au point de ce nouveau modèle a permis l'étude des étapes précoces de l'infection telles que l'entrée du virus et la transcription de l'ADNccc, mais également d'accélérer l'identification de nouvelles stratégies antivirales (Ko et al. 2014; Nkongolo et al. 2014).

Cependant, ces lignées cellulaires restent dérivées de lignées cancéreuses, elles présentent donc des modifications génétiques entraînant des réponses différentes à l'infection et aux autres stimuli par rapport à des cellules provenant directement d'un organe vivant (Jaeschke, s. d.).

### 4.1.2 *Les cellules HepaRG :*

Découverte en 2002, ces cellules proviennent de lignées cellulaires progénitrices hépatiques (**Figure 16**). Ce sont des cellules bipotentes, capables de se différencier en cellules hépatiques et en cellules biliaires, les cholangiocytes (Philippe Gripon, Cannie, et Urban 2005). Les HepaRG sont capables de maintenir un grand nombre de fonctions hépatiques physiologiques. Pour cela, une phase de prolifération (15 jours) est nécessaire pour l'acquisition du phénotype différencié permettant ainsi la permissivité au VHB, et par conséquent la production d'ADNccc. Elle est suivie par une phase de différenciation de ces cellules en cellules hépatiques qui nécessite 15 jours de différenciation avec du DMSO et d'hydrocortisones. Un des avantages de ce type cellulaire, est qu'en réponse à une infection par le VHB, les HepaRG peuvent établir une réponse immunitaire antivirale ce qui les rend utiles pour étudier les différents facteurs impliqués dans la réponse du système immunitaire inné durant une infection par le VHB (Luangsay, Ait-Goughoulte, et al. 2015; Julie Lucifora et al. 2010; Luangsay, Gruffaz, et al. 2015). Cependant, malgré la permissivité au VHB, le taux d'infection reste faible.

### 4.1.3 *Les PHH*

Les hépatocytes primaires humains (PHH, pour « Primary Human Hepatocytes ») sont permissifs au VHB et ont été longtemps la seule possibilité pour étudier le VHB *in vitro* (**Figure 16**). Ces cellules ont permis l'étude de l'induction de l'apoptose, l'entrée du virus, la réplication du virus, la formation et la transcription de l'ADNccc, l'expression des protéines virales et la sortie du virus. Il s'agit également d'un outil très utile pour étudier le métabolisme ainsi que la toxicité des drogues (Godoy et al. 2013). Ce modèle a permis l'identification du récepteur au VHB. Ces cellules nécessitent des conditions de culture particulières et ne peuvent pas être maintenues plus d'une vingtaine de jours. L'ajout de DMSO dans le milieu de culture maintient le caractère différencié des cellules et d'augmenter ainsi la permissivité au VHB (P. Gripon et al. 1988).

Les PHH sont des cellules isolées à partir des résections de foie et peuvent vite perdre leur statut de différenciation et donc leur susceptibilité à l'infection après l'ensemencement. D'autre part, une grande variabilité à l'infection est observée dans les PHH qui est due à une variation génétique au niveau des différents donneurs, mais également à la qualité de l'isolation des cellules (Galle et al. 1994). Cette variabilité génétique permet d'augmenter la



fiabilité des résultats lorsque ces derniers sont confirmés et reproduits sur différents lots de PHH.

## 4.2 Les modèles animaux :

### 4.2.1 *Les chimpanzés et les macaques*

Les chimpanzés constituent le seul animal immunocompétent capable d'être infecté par le VHB. Il est capable de développer des infections aiguës et chroniques avec un profil immunitaire qui est similaire à celui observé chez des patients infectés par le VHB (Maynard et al. 1972; Wieland 2015). Ce modèle a été majoritairement utilisé pour le développement du vaccin du VHB et pour de potentiels traitements contre les infections chroniques (McAuliffe, Purcell, et Gerin 1980). Bien qu'il représente le modèle qui mime le mieux l'infection par le VHB, the National Institute of Health a largement réduit son utilisation pour des raisons éthiques depuis 2013.

Les macaques sont quant à eux les seuls petits primates non-humains capables de supporter une réplication du VHB après une inoculation intrahépatique de construction d'ADN du VHB (Gheit et al. 2002).

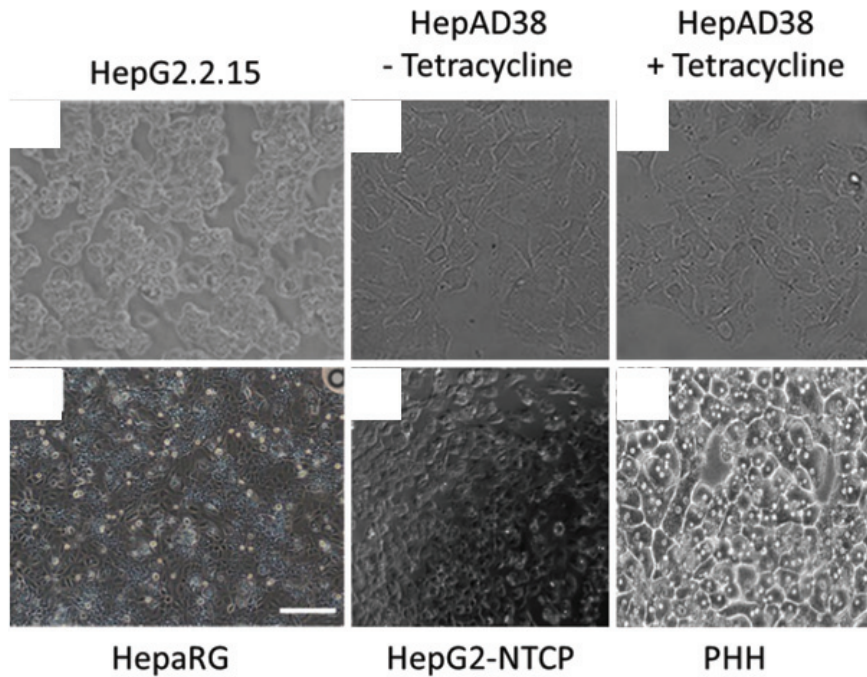
### 4.2.2 *Les modèles de souris :*

#### 4.2.2.1 *Les souris transgéniques :*

Les souris ne sont pas permissives au VHB. Pour passer outre cet inconvénient, les souris ont été modifiées génétiquement pour permettre l'expression des protéines virales, et même l'intégralité du génome du VHB. Ce sont des souris immunologiques tolérantes, capables de produire des virions du VHB infectieux. Elles sont souvent utilisées pour tester les inhibiteurs de la polymérase tels que l'entécavir ou la lamivudine (O. Weber et al. 2002; Julander et al. 2003). Cependant, ce modèle ne permet pas la formation l'ADNccc dû à l'absence du recyclage de cet ADN et à l'absence de nouvelle infection. Ainsi, d'autres modèles murins ont été mis en place pour pouvoir étudier les différents mécanismes de la pathogenèse du VHB et l'élimination virale.

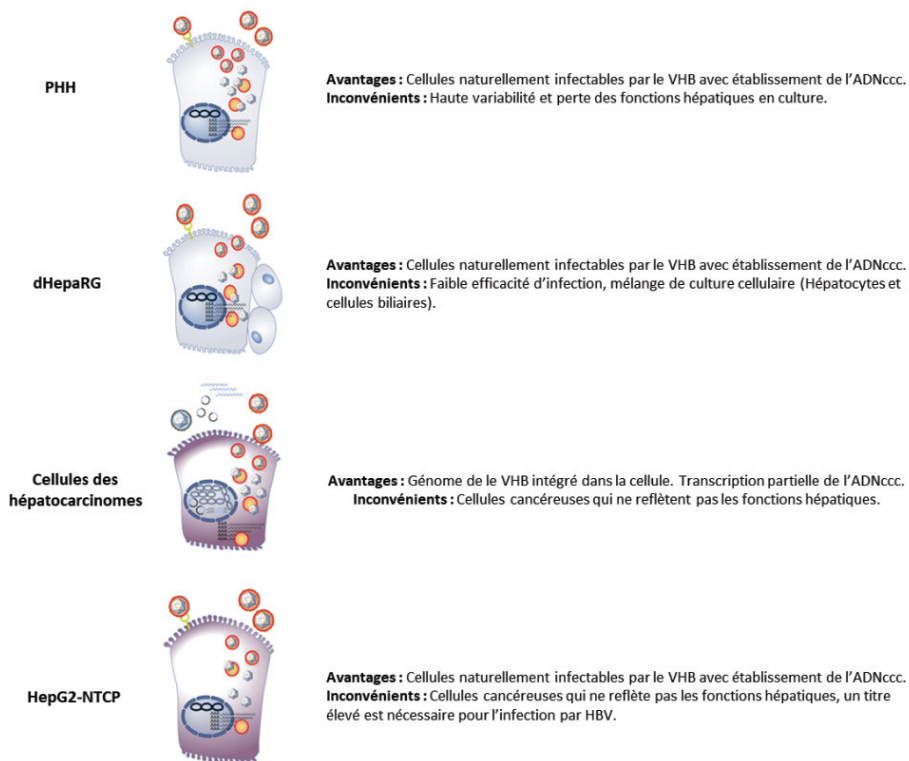
#### 4.2.2.2 *Les souris AAV-HBV :*

Ce sont des souris immunocompétentes transduites avec un vecteur viral, l'adenovirus, qui contient le génome du VHB. Après injection par voie intraveineuse du vecteur, les protéines du VHB sont produites sous le contrôle d'un promoteur endogène



**Figure 16 :** Culture cellulaire des différents modèles d'étude du VHB

Image au microscope électronique des différents modèles cellulaires utilisés pour les infections du VHB. Les images des PHH, HepG2-NTCP et HepAD38 sont des photographies faites dans le laboratoire. Les images des HepG2.2.15 et HepaRG sont adaptées respectivement de (T. Wang et al. 2011; Philippe Gripon et al. 2002).



**Figure 17 :** Caractéristiques des modèles cellulaires humains utilisés pour l'infection par le VHB

Chaque modèle est présenté avec ses avantages et ses inconvénients (Figure adaptée de Allweiss et Dandri 2016).

du VHB (Mingozzi et al. 2003). Ce modèle a permis l'étude de l'élimination virale modulée par le système immunitaire et notamment le rôle des Natural Killer ainsi que la persistance de l'infection (Yang et al. 2014).

Ce modèle présente quelques inconvénients. Il ne s'agit pas d'une infection naturelle et certains paramètres ne peuvent donc pas être étudiés. De plus, la présence du vecteur viral peut induire des interférences au niveau du système immunitaire et la formation de l'ADNccc du VHB est souvent restreinte. Cependant, dans le laboratoire, nous avons réussi à démontrer l'établissement d'un pool d'ADNccc par Southern Blot, dans des souris C57BL6 transduites avec le vecteur AAV8-HBV (Julie Lucifora et al. 2017)

#### 4.2.2.3 Injection hydrodynamique dans les souris :


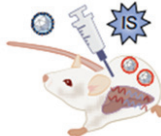


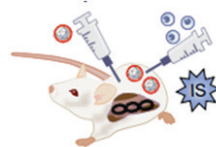
Il s'agit d'une méthode permettant d'injecter le VHB dans la souris. C'est une technique efficace permettant de transférer le matériel génétique dans le foie de la souris. Cela consiste en une rapide injection d'une grande quantité de liquide contenant l'ADN dans la veine de la queue de la souris permettant une absorption de l'ADN dans les hépatocytes et l'expression transitoire de l'ADN du VHB (F. Liu, Song, et Liu 1999).

Ce modèle a permis de délivrer le génome du VHB dans une souris immunocompétente et ainsi d'étudier l'évaluation de composés antiviraux, l'effet antiviral des ARN interférents ainsi que celui du système CRISPR/Cas9 (S.-R. Lin et al. 2014).

Cependant, il s'agit d'une technique stressante pour la souris, pouvant provoquer des dommages au niveau du foie. Une courte élévation de l'alanine transaminase après l'injection est observée pouvant possiblement interférer avec les fonctions cellulaires, l'expression des gènes et les voies de signalisation.

#### 4.2.2.4 Les souris humanisées :

Il s'agit d'un modèle où le foie murin est remplacé par des cellules hépatiques humaines entraînant la permissivité des souris au VHB. Pour cela, il est nécessaire que la réponse immunitaire adaptative de la souris soit abolie pour permettre la survie des hépatocytes humains transplantés. La régénération du foie peut prendre quelque temps et peut être contrôlée en mesurant la concentration dans le sérum de l'albumine humaine.

<b>Souris transgénique HBV</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕ Etude de la réplication du VHB et de l'immunopathogénèse (une fois les cellules immunitaires transférées)</li> <li>⊖ Pas d'infection par le VHB, pas d'ADNccc, tolérance immunologique à HBV, pas d'élimination virale possible</li> </ul>
<b>Transduction de HBV</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕ Etude de l'immunopathogénèse et de l'élimination virale, la persistance de l'infection peut être étudiée dans des circonstances spécifiques</li> <li>⊖ Pas d'infection par le VHB, pas d'ADNccc, réplication transitoire, la réponse immunitaire peut être gênée par des interférences due au vecteur</li> </ul>
<b>Injection hydrodynamique</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕ Etude de l'immunopathogénèse, de l'élimination virale et des souches mutantes</li> <li>⊖ Pas d'infection par le VHB, pas d'ADNccc, réplication transitoire, les analyses peuvent être gênées par les lésions du foie liées à l'injection</li> </ul>
<b>Souris foie humanisé</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕ Etude de l'infection du VHB incluant l'entrée, la dissémination, la régulation de l'ADNccc et la réponse immunitaire innée intra-hépatocytaire</li> <li>⊖ Système complexe, nécessite un haut niveau de PHH viables, perte de la réponse immunitaire adaptative</li> </ul>
<b>Souris immunocompétente avec foie humanisé</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕ Etude de l'infection du VHB incluant l'entrée, la dissémination, la régulation de l'ADNccc et analyse de la réponse immunitaire de l'hôte</li> <li>⊖ Système complexe, nécessite un haut niveau de PHH viables, nécessité de cellules immunitaires ou de cellules embryonnaires, caractérisation du modèle qui reste à définir</li> </ul>

**Figure 18:** Modèles de souris pour l'étude du VHB

Chaque modèle est présenté avec ses avantages et ses inconvénients (Figure adaptée de Allweiss et Dandri 2016).

Il existe différents types de souris humanisées dont voici quelques exemples :

- Les souris uPA : c'est le premier modèle de souris mis au point dans lequel l'uPA (urokinase type plasminogen activator) est surexprimée et est sous le contrôle du promoteur de l'albumine murine. La surexpression de l'uPA entraîne des hémorragies au niveau de l'intestin ainsi qu'une insuffisance hépatique chronique favorisant ainsi la transplantation des hépatocytes humains. Ces souris sont croisées avec des souris immunodéficientes (Rag2<sup>-/-</sup> ou SCID) pour permettre la bonne implantation des cellules hépatiques et donc d'éviter le rejet de la greffe (Rhim et al. 1995; Petersen et al. 1998).
- Les souris FRG : il s'agit d'un modèle de souris immunodéficientes qui sont KO pour le gène Rag2, le gène Il2rg (gène du récepteur à Il2), et le gène Fah (Fumaryl acetoacetate hydrolase). Fah est une enzyme, qui lorsqu'elle est déficiente, entraîne une accumulation de tyrosine toxique et des dommages au foie. Pour éviter une accumulation trop importante de catabolites, les souris sont traitées avec du NTBC jusqu'à l'implantation des hépatocytes humains. L'injection des cellules se fait dans la rate. Une injection du vecteur adénoviral qui exprime l'urokinase humaine est nécessaire avant la greffe pour permettre un meilleur établissement de la cellule initiale (Bissig et al. 2007; Azuma et al. 2007). La permissivité de ces modèles au VHB permet ainsi l'étude des différents mécanismes de la pathogénèse, l'étude des traitements antiviraux et l'étude de l'établissement de l'ADNccc formé et présent dans ces modèles.

Afin de pallier l'absence de la réponse immunitaire adaptative, de nouveaux modèles de souris, les modèles HIS-HUHEP, sont mis en place avec une double reconstitution des cellules immunitaires et hépatocytaires d'origine humaine. Ces souris doublement humanisées ont été générées à partir de souris immunodéficientes favorisant l'injection intrahépatique des hépatocytes humains et des cellules souches hématopoïétiques humaines permettant la greffe plusieurs lignées cellulaires immunitaires. Ces injections de cellules humaines donnent lieu à un repeuplement robuste du système immunitaire ainsi qu'à un repeuplement du foie de la souris (Strick-Marchand et al. 2015; Dusséaux et al. 2017).

## Partie 2 : L'ADNccc, le minichromosome viral

### 1 Biologie de l'ADNccc

L'ADNccc est un intermédiaire de réplication de l'ADN viral du VHB. Les infections chroniques du VHB sont caractérisées par la persistance de ce génome viral sous forme épisomale qui constitue un minichromosome stable dans les noyaux des hépatocytes. Cet ADN ne comporte pas d'origine de réplication (ORI), il n'est donc pas répliqué par les polymérases cellulaires lors de la mitose. Lors de la division cellulaire, il est transmis aux cellules filles par diffusion passive.

La longévité de cet ADN et l'incapacité du système immunitaire à générer une réponse immunitaire contre ce virus entraîne un échec dans l'élimination virale et permet un rebond de l'infection après l'arrêt des traitements actuels. Ainsi comprendre la biologie, la formation, le rôle et la régulation de ce minichromosome sont essentiels pour le développement de nouveaux traitements et être capable d'éradiquer la maladie

#### 1.1 Structure du minichromosome

L'ADNccc ou minichromosome viral est organisé comme la structure de la chromatine cellulaire. Au microscope électronique, il est caractérisé par un arrangement typique des nucléosomes en collier de perles (**Figure 19**). Cette architecture spécifique permet la compaction de l'ADN qui se traduit par une transcription inactive et agit comme un régulateur de la transcription (C.-T. Bock et al. 1994; Newbold et al. 1995).

Ainsi, on peut mettre en évidence la présence de protéines histones. Ces protéines entrent dans la composition d'un nucléosome et peuvent subir des modifications post traductionnelles qui jouent un rôle actif ou répressif dans les événements de transcription. Parmi elles, on détecte majoritairement la présence des protéines histones H3 et H2B et en plus faible quantité la présence des histones H4, H2A et H1 qui sont détectables par Western Blot.

Deux conformations, compactées ou non, de l'ADNccc ont été identifiées reflétant les phénomènes de régulation de la transcription (**Figure 19**).

Des protéines non-histones sont aussi observées. Parmi ces protéines, on détecte la protéine virale Core (HBc) comme composant structural, qui permet une réduction de l'espace nucléosomal de 10% par rapport à la chromatine cellulaire. Ces espaces ont été décrits comme variant selon l'individu, le type cellulaire et les étapes de développement, mais aussi de l'état de transcription de l'ADN génomique. L'action de HBc sur ces espaces nucléosomaux suggère un rôle de HBc dans la régulation de la transcription de l'ADNccc (C. T. Bock et al. 2001).

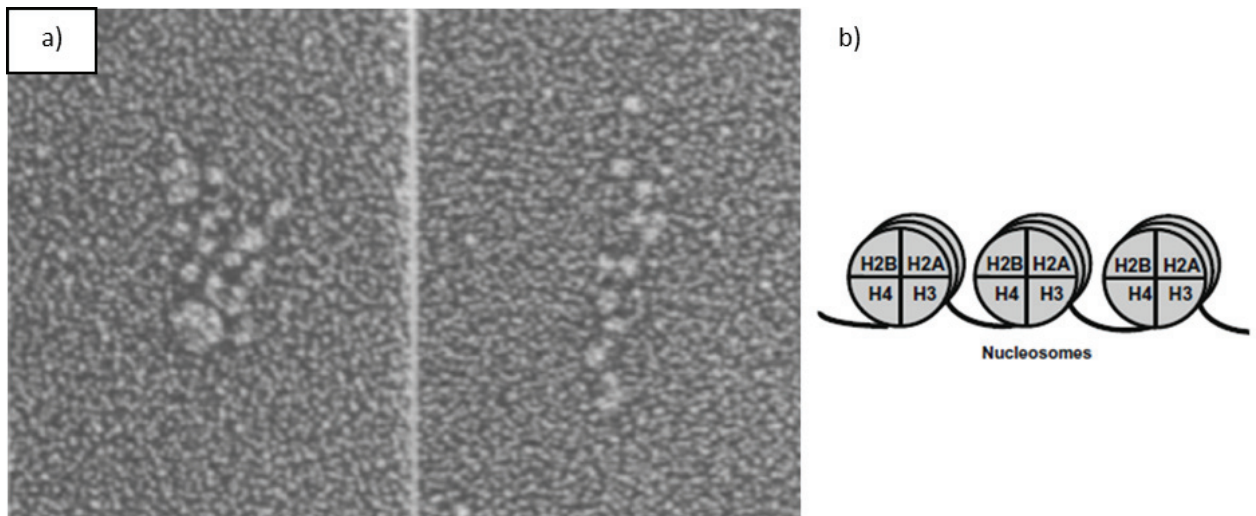
Des études plus récentes ont montré que la protéine HBx était recrutée sur l'ADNccc et qu'elle était nécessaire pour réguler la transcription. (Keasler et al. 2009; Julie Lucifora et al. 2011).

Des expérimentations *in vitro* ont mis en évidence la présence de facteurs de transcription cellulaire tels que CREB, ATF, STAT1 et STAT2 sur les Enhancer 1 et 2 qui permettent de réguler la transcription (Massimo Levrero et al. 2009a).

Marques épigénétiques	Sites	Fonction
Méthylation des cytosines	Ilots CpG	Répressive
Acétylation des lysines	H3 (9,14,18,56) H4 (5,8,13,16) H2A, H2B	Activatrice
Phosphorylation sérine/thréonine	H3 (3,10,28) H2A, H2B	Activatrice
Méthylation des Arginines	H3 (17,23), H4 (3)	Activatrice
Méthylation des lysines	H3 (4,36,79) H3 (9,27), H4 (20)	Activatrice Répressive
Ubiquitination des lysines	H2B (120) H2A (119)	Activatrice Répressive
Sumoylation des lysines	H2B (6/7), H2A (126)	Répressive

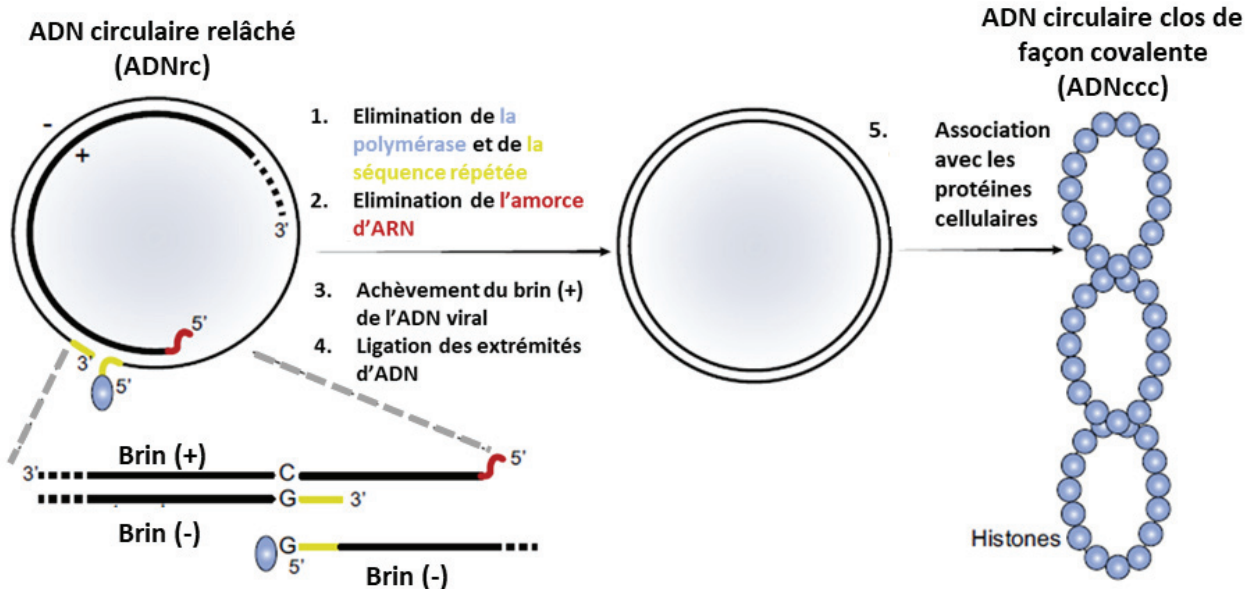
**Tableau 1:** Modification post-traductionnelle des Histones

Tableau regroupant les marques épigénétiques que l'on peut retrouver sur l'ADNccc. Pour chaque modification de l'ADN ou des histones, le tableau indique le site de modification et l'action répressive ou activatrice que ces modifications peuvent générer pour la transcription de l'ADNccc. (Figure adaptée de Massimo Levrero et al. 2009)



**Figure 19:** Organisation de l'ADNccc

a) Image au microscope de la structure en minichromosome de l'ADNccc. b) Schéma représentant l'organisation des nucléosomes de l'ADNccc (Figures adaptées de (C.-T. Bock et al. 1994; Massimo Levrero et al. 2009a).



**Figure 20:** Conversion de l'ADNrc en ADNccc

Après élimination des différentes caractéristiques de l'ADNrc, les brins d'ADN sont ligés et les protéines cellulaires telles que les histones viennent se lier sur l'ADNccc pour former une structure en minichromosome (Figure adaptée de Julie Lucifora et Protzer 2016).



## 1.2 La formation de l'ADNccc

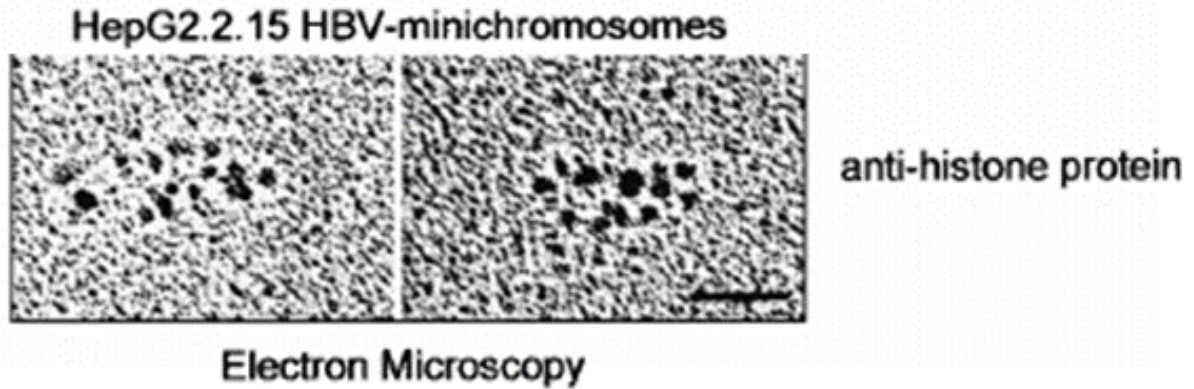
L'étude de la formation de l'ADNccc reste assez complexe du fait de la présence en excès de l'ADNrc et des méthodes peu sensibles existantes à ce jour pour la quantification de l'ADNccc. Cependant, plusieurs étapes clés ont été décrites (Tuttleman, Pourcel, et Summers 1986; Beck et Nassal 2007; Nassal 2015b; Schreiner et Nassal 2017).

De manière générale, la formation de l'ADNccc provenant de l'ADNrc nécessite **(Figure 20)** :

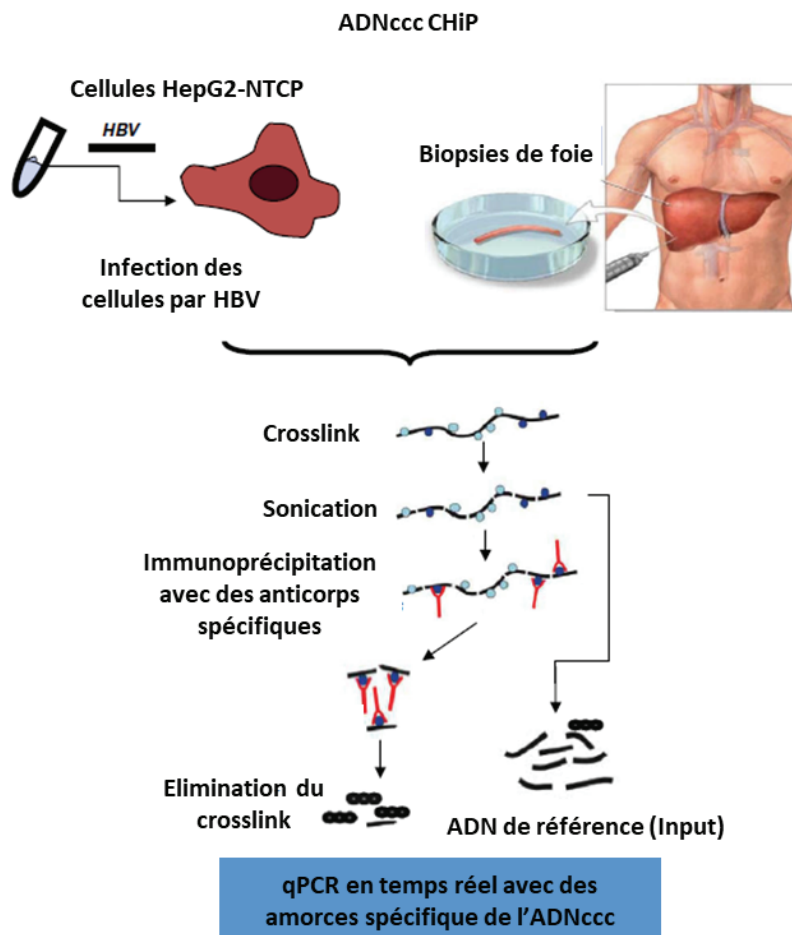
- Le détachement de la polymérase virale qui est fixée de façon covalente sur l'extrémité 5' du brin de polarité négatif. Cette étape permet la formation d'un intermédiaire de réplication : l'ADNrc déprotéinisé (PF RC DNA).
- L'élimination du court oligomère d'ARN situé à l'extrémité 5' du brin de polarité positif qui est utilisé comme amorce pour la synthèse de celui-ci.
- L'élimination de la séquence terminale redondante du brin négatif.
- L'achèvement du brin positif par la machinerie cellulaire qui est de longueur variable selon les molécules d'ADNrc.
- La ligation des deux brins d'ADN.
- Le super enroulement de l'ADNccc pour former un minichromosome. L'intervention des topoisomérases restent encore à élucider.

## 1.3 Le rôle de l'ADNccc

Le rôle principal de l'ADNccc est de servir de matrice à la transcription des gènes viraux et à la réplication virale. De la même manière que la transcription d'un gène cellulaire, la transcription de l'ADNccc est sous le contrôle de deux « enhancers », de quatre promoteurs distincts et repose sur l'activité dynamique de nombreux facteurs de transcription, d'enzymes co-activatrices ou co-repressives et d'enzymes modifiant la chromatine. Il permet la transcription des quatre ARN viraux qui sont nécessaires pour la production des antigènes viraux et de l'ARNpg qui permet notamment de mesurer l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc (Beck et Nassal 2007), (Figure 9, p30). En l'absence de biopsies, cette activité peut être aussi déterminée par le dosage des antigènes circulants dans le sérum et plus récemment par la présence d'ARN circulants (Hu et al.2017).



**Figure 21 :** Identification des protéines Histones sur l'ADNccc par immunoprécipitation  
Image au microscope de l'ADNccc des cellules HepG2.2.15. Les histones sur l'ADNccc sont marquées via un anticorps spécifiques (Figure adaptée de C. T. Bock et al. 2001).



**Figure 22:** Chromatine Immuno-précipitation(ChIP)  
Schéma représentant le principe de la ChIP sur l'ADNccc. Après extraction de l'ADN des cellules, l'ADN est crosslinké. Une étape de sonication est nécessaire avant l'immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques. L'ADN est ensuite passé en qPCR avec des amorces spécifiques (Figure adaptée Massimo Levrero et al. 2009).

Une fois constitué, l'ARNpg est encapsidé pour former des nouveaux virions ou retourne vers le noyau pour constituer un pool d'ADNccc. Ce pool d'ADNccc joue un rôle essentiel dans le redémarrage de l'infection après l'arrêt des traitements chez des patients infectés chroniquement. L'amplification de ce pool serait dépendante du virus lui-même qui en fonction de son environnement favoriserait l'amplification du pool plutôt que la formation de virion. Il a été démontré qu'en présence d'un inhibiteur d'entrée tels que le Myrcludex, il y aurait une augmentation de ce pool d'ADNccc pour favoriser la présence d'ADN viral intracellulaire même en absence d'une nouvelle infection (Allweiss et Dandri 2017).

De plus, la demi-vie de l'ADNccc n'est pas clairement définie et ce pool d'ADNccc est stable dans les cellules hépatiques qui ne se divisent pas rendant son élimination difficile.

## 1.4 Régulation de l'ADNccc

Du fait du manque de modèle permettant la production de grande quantité d'ADNccc, l'étude de la régulation de celui-ci est encore limitée. Cependant, plusieurs facteurs cellulaires et viraux semblent intervenir pour réguler sa transcription.

### 1.4.1 *Les facteurs épigénétiques*

La régulation de la transcription par des facteurs épigénétiques repose principalement sur les modifications enzymatiques des protéines histones fixées sur l'ADNccc (Pollicino et al. 2006). Les histones présentes à la surface des nucléosomes sont sujettes à des modifications post traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation ou la phosphorylation (Koumbi et Karayiannis 2016). Dans les lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire, la transcription de l'ADNccc semble être régulée par le statut d'acétylation des histones H3 et H4 fixées sur l'ADNccc (**Figure 21**). L'hypoacétylation des histones et le recrutement d'histone déacétylase sont corrélés avec une faible virémie (Allweiss et Dandri 2017; Pollicino et al. 2006).

La ChIP (Chromatin immuno-Precipitation) est une technique puissante qui permet l'identification, à quelques paires de bases, des sites de fixation sur l'ADN des différents composants de la chromatine (**Figure 22**). Cette technique repose sur l'interaction protéine-ADN et protéines-protéines après cross link par l'utilisation de formaldéhyde. Ces interactions sont ensuite identifiées à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les

protéines d'intérêt que l'on cherche à identifier. Les séquences immuno-précipitées sont ensuite utilisées comme matrice pour être amplifiées par PCR et ainsi, déterminer les régions fixées par ces protéines. Grâce à cette technique, les protéines histones (H3, H4) et non histones ainsi que leurs modifications post traductionnelles sur l'ADNccc ont été déterminées (Massimo Levrero et al. 2009a).

Il a été montré que des protéines acetyltransferases telle que p300 et CBP et des protéines cellulaires déacetylases telle que HDAC1, étaient présentes sur l'ADNccc. Ces enzymes permettent respectivement l'acétylation ou la déacétylation des histones et les statuts d'acétylation sont corrélés à la réplication du VHB. La présence de HDAC1 sur l'ADNccc correspond ainsi à un déclin de la réplication virale *in vitro* et à une faible réplication *in vivo*. Ces observations ont été confirmées en utilisant des inhibiteurs de déacetylases comme le trichostatin qui induisent une augmentation de l'acétylation des histones sur l'ADNccc et donc la réplication virale (Massimo Levrero et al. 2009a).

Cette technique de CHIP couplée avec une approche de séquençage a permis de faire une cartographie des modifications post-traductionnelles des histones dans les cellules infectées HepG2-NTCP, les PHH et dans des résections hépatiques. Ils ont ainsi montré que ces modifications post traductionnelles se trouvaient sur des régions spécifiques de l'ADNccc et notamment au niveau des promoteurs viraux montrent un enrichissement des marques activatrices tels que H3K4me3 et H3K27ac. (Tropberger et al. 2015a).

## 1.4.2 *Les facteurs viraux*

### 1.4.2.1 *La protéine HBc*

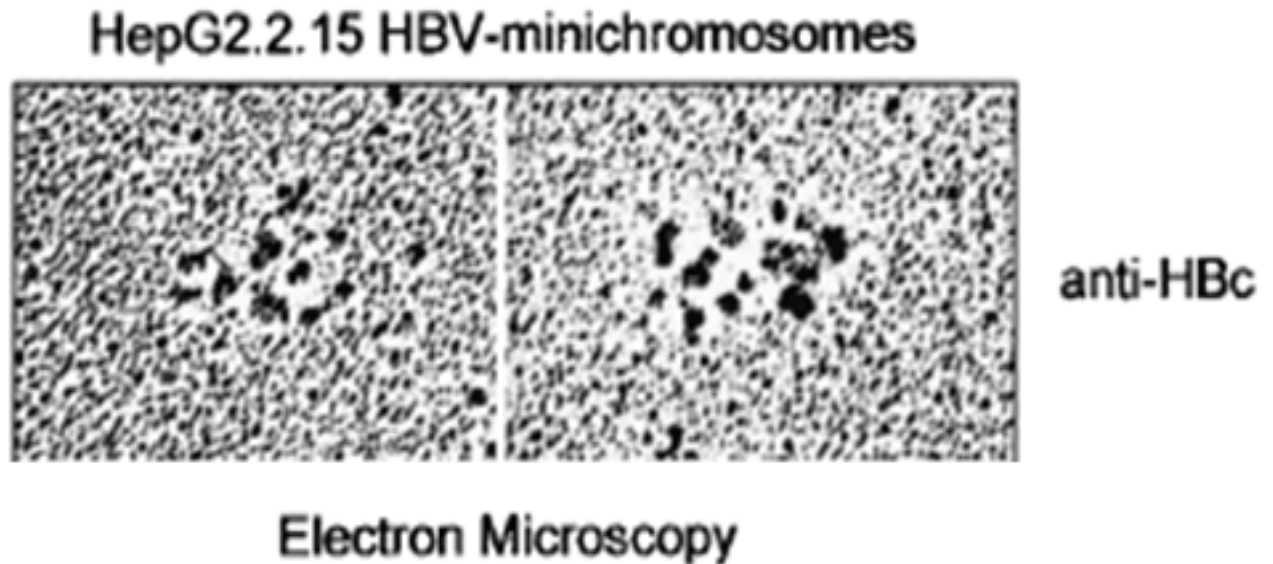
HBc est une protéine virale qui joue un rôle important dans la modulation de l'ADNccc bien que sa fonction soit encore très controversée. Cette protéine est présente aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules infectées. Au cours de l'histoire naturelle de la maladie, la présence de HBcAg dans le noyau est associée avec une virémie élevée alors que la présence de HBcAg dans le cytoplasme est reliée à la phase active de la maladie et à une virémie plus faible. Des analyses de Western blot, immunoprécipitation et microscopie électronique ont montré la présence de cette protéine au niveau des complexes nucléoprotéiques viraux (**Figure 23**). La protéine HBc serait étroitement liée aux protéines histones, à la molécule d'ADNccc et réduirait l'espace nucléosomal (C. T. Bock et al. 2001).

Il a été rapporté que la protéine HBc pouvait être aussi impliquée dans l'altération de la structure chromatinienne du minichromosome viral en se fixant sur des îlots CpG. Le génome du VHB possède trois sites majeurs d'îlots CpG : un situé au niveau du gène de la protéine de surface S, un second situé au niveau de l'enhancer I/II à proximité du promoteur core et le dernier au niveau du gène de la polymérase et de la région promoteur SP1. Il est reconnu que la méthylation de ces îlots CpG favorise le recrutement des histones désacetylases entraînant un remodelage de la chromatine et donc une transcription répressive. Des études réalisées sur des biopsies hépatiques de patients infectés chroniquement par le VHB ont montré que la protéine HBc se fixait préférentiellement sur les seconds îlots CpG correspondant à une région régulatrice importante pour la transcription. La protéine HBc entraînerait le recrutement de facteurs de transcription. En effet, la fixation de celle-ci sur ces îlots CpG est corrélée avec une réduction de la quantité de HDAC1, l'hypométhylation de l'ADNccc et une augmentation de la fixation de CBP ce qui favorise l'acétylation des histones sur l'ADN et donc la transcription de l'ADN. De plus, l'abondance de la protéine HBc sur ces régions est corrélée avec une augmentation la virémie, ce qui correspond bien à une régulation positive de la protéine HBc sur l'ADNccc (Guo et al. 2011). Cependant, l'infection des lignées cellulaires avec un virus muté pour la protéine HBc ne semble pas avoir d'effet sur le niveau de transcription de l'ADNccc (Rivière et al. 2015).

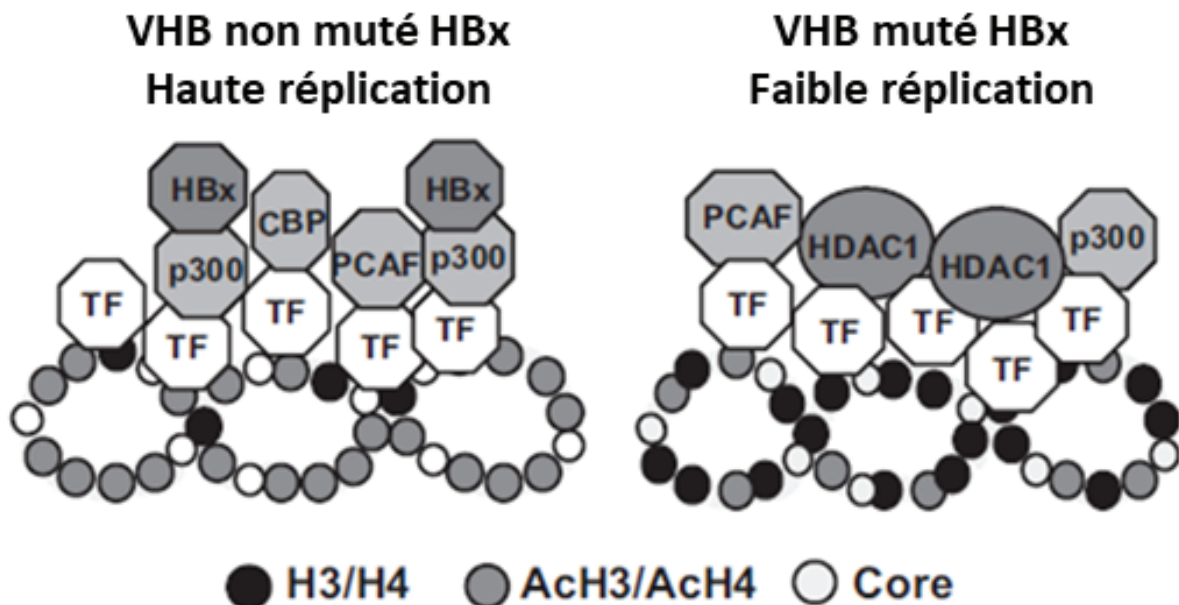
#### 1.4.2.2 La protéine HBx

HBx est une protéine non-structurale et multifonctionnelle du VHB. Elle serait « trans-activatrice » de la transcription de plusieurs gènes cellulaires et viraux et interagirait avec de nombreuses protéines cellulaires (p300 ; CBP ; TF ; HDAC1...).

En effet, la protéine HBx peut directement perturber les fonctions cellulaires telles que la transduction du signal cellulaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Son interaction avec certaines protéines et gènes cellulaires a permis de lui donner un rôle potentiel dans l'oncogenèse. Dans les modèles *in vivo*, il a été démontré que la protéine HBx pouvait accélérer le processus d'hépatocarcinogénèse et induire le cancer du foie en agissant comme co-facteur de la transcription de CREB/ATF et en amplifiant le recrutement de CBP/p3000 sur les promoteurs cellulaires (Laura Belloni et al. 2009a).



**Figure 23 :** Identification de la protéine HBc sur l'ADNccc par immunoprécipitation  
Image au microscope de l'ADNccc des cellules HepG2.2.15. L'antigène HBc sur l'ADNccc est marqué via un anticorps spécifique (Figure adaptée de C. T. Bock et al. 2001).



**Figure 24 :** Schéma représentant la conformation de l'ADNccc et son état transcriptionnel en fonction de la mutation de la protéine HBx du VHB.

Chaque état conformationnel est associé à des protéines cellulaires spécifiques qui favorisent l'activation ou la répression de la transcription (Figure adaptée Belloni et al. 2009).

Le rôle de la protéine HBx dans la réplication virale a été démontré pour la première fois en 1992 dans le modèle de la marmotte. Dans ce travail, il a été démontré que la troncation de la protéine HBx dans sa partie C-terminale empêche l'infectiosité de l'ADN de WHV. De plus, la protéine HBx est décrite comme un composant nécessaire pour l'initiation de la réplication virale (F. Zoulim, Saputelli, et Seeger 1994).

Le rôle de la protéine HBx dans l'initiation et le maintien de la réplication virale a également été démontré dans des modèles cellulaires (PHH et HepaRG) trans complémentés avec un virus déficient pour la protéines HBx montrant une inhibition de la production des antigènes et de la sécrétion des particules virales (Julie Lucifora et al. 2011) . De plus une autre étude a permis de montrer que le retour de la protéine HBx dans des modèles *in vitro* de cellules HepG2 transfectées avec un plasmide du VHB déficient pour la protéine HBx, et *in vivo* dans des souris injectées hydronamiquement par ce même plasmide, permettait de restaurer la réplication du VHB muté (Keasler et al. 2009) (**Figure 24**).

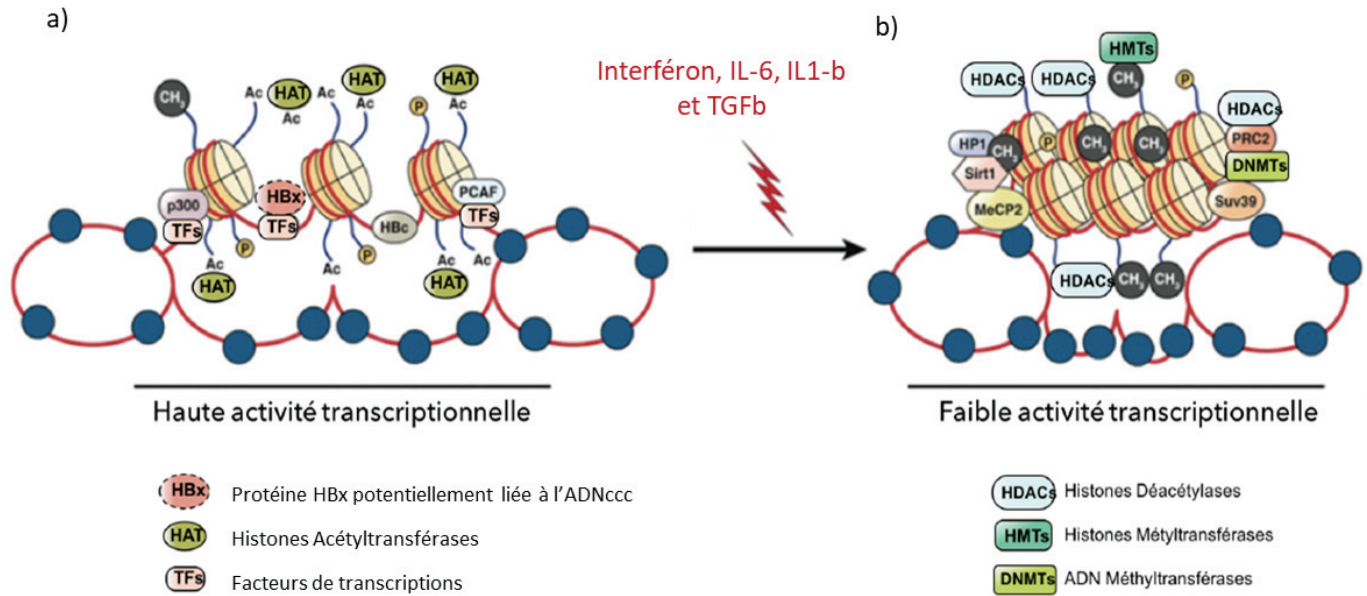
Le développement de la CHIP quantitative sur l'ADNccc a permis l'identification de protéines pouvant interagir avec ce minichromosome. Il a pu être démontré que la protéine HBx produite dans des cellules était recrutée sur l'ADNccc. La mutation de la protéine HBx entraînerait une hypoacétylation des histones fixées sur l'ADNccc suggérant une diminution de la transcription bien le pool d'ADNccc dans le noyau n'est modifié. La protéine HBx influence donc la régulation épigénétique de l'ADNccc en modulant le recrutement des enzymes et en modifiant les histones fixées sur celui-ci.

L'impact de la protéine HBx sur la régulation de la transcription de l'ADNccc a également été montré par la méthodes de TAP montrant la fixation de la protéine HBx sur le complexe DDB1-E3 entraînant la dégradation d'un second complexe le Smc5/6 empêchant ainsi son effet repressif sur l'ADNccc (Decorsière et al. 2016).

### 1.4.3 *Les facteurs immunitaires*

Le rôle de certains facteurs de l'immunité dans la régulation de la transcription de l'ADNccc a été montré dans plusieurs publications. Parmi ces facteurs, on distingue l'interféron  $\alpha$ , Interféron de type I, (IFN) qui inhiberait la transcription de l'ADNccc.

L'IFN  $\alpha$  engage son récepteur déclenchant l'activation de la voie de signalisation JACK/STAT permettant ainsi la modulation de la transcription de divers gène nommé ISGs



**Figure 25:** Effet de l'IFN sur l'état répliatif de l'ADNccc

L'IFN entraîne un changement de conformation de l'ADNccc qui passe d'un état relâché (a) à un état compacté (b) qui diminue de la transcription (Figure adaptée de Fabien Zoulim, Testoni, et Lebossé 2013; Testoni, Levrero, et Zoulim 2017; Palumbo et al. 2015).



(Interferon stimulated gene). La modulation de ces gènes entraîne une réponse antivirale et limite la réplication virale. Dans le génome du VHB, il existe une séquence ISRE (Interferon stimulated response element) au niveau de la région promotrice du gène X/enhancer 1 qui pourrait moduler la régulation des gènes transcrits par l'IFN (Lu et al. 2012).

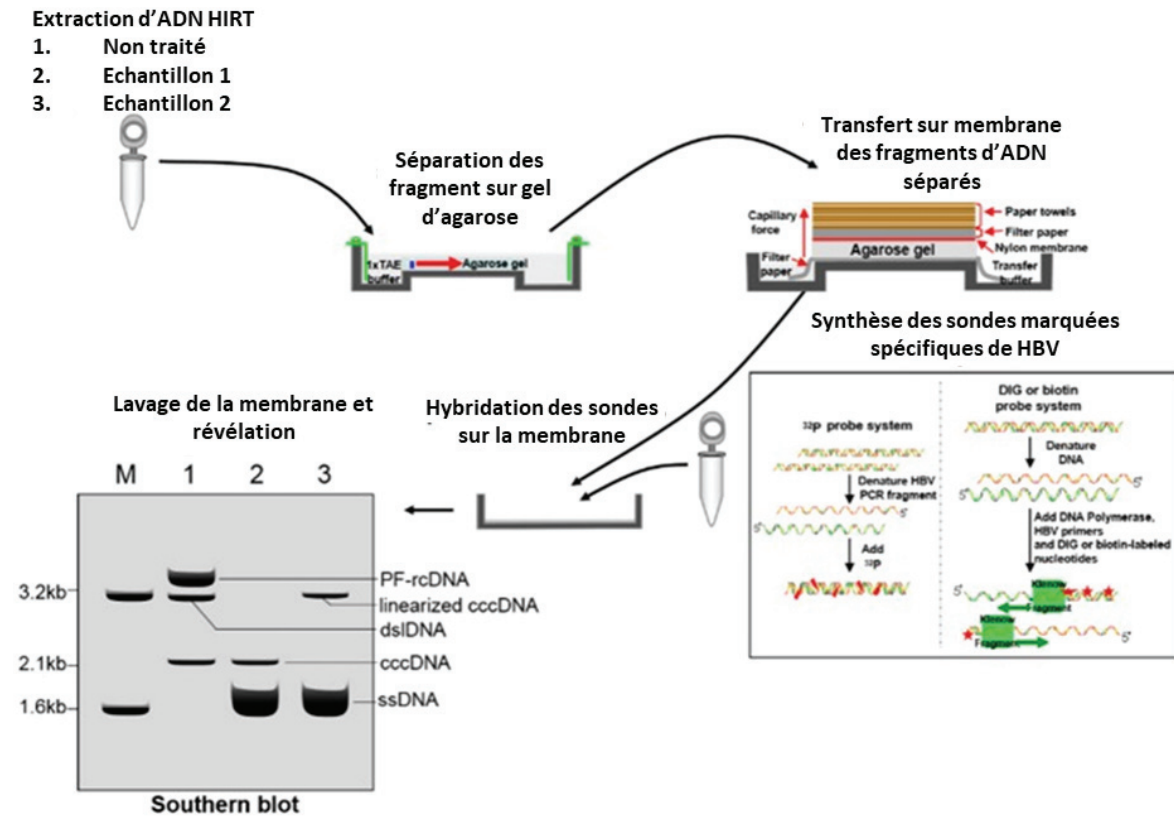
Des études sur des cellules HepG2-NTCP infectées et sur des souris humanisées uPA/SCID ont montré l'effet de l'IFN  $\alpha$  sur la régulation de l'ADNccc. Celui-ci agit sur la réplication en augmentant le recrutement de facteurs répressifs sur l'ADNccc et en favorisant l'hypoacétylation des histones (Laura Belloni et al. 2012a) (**Figure 25**).

## 2 Les techniques de détection de l'ADNccc

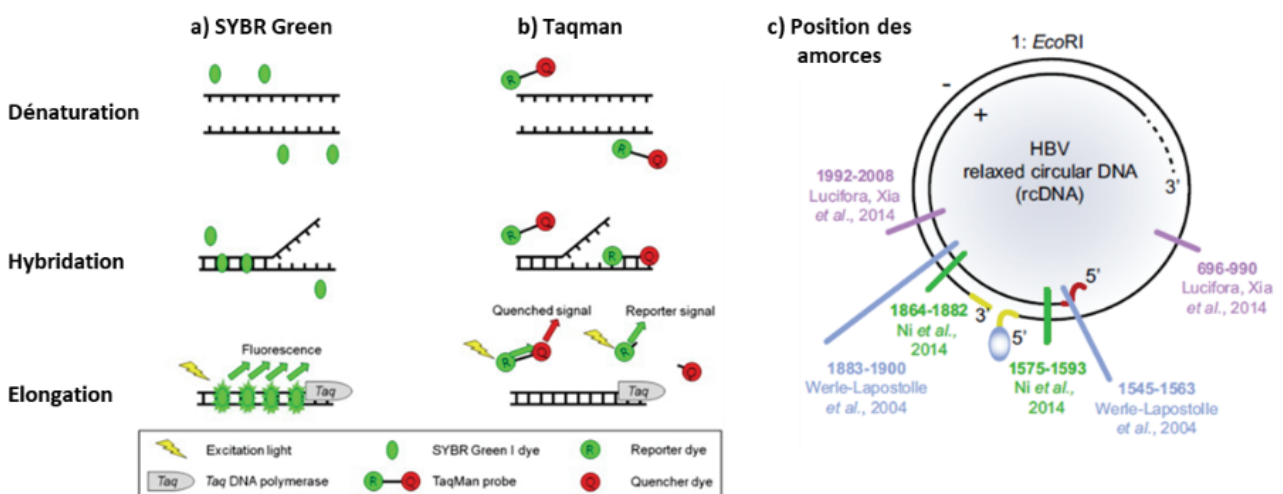
Du fait du rôle crucial de l'ADNccc dans la persistance de la maladie, il est indispensable de mettre au point des techniques permettant de le détecter et de le quantifier. Sachant qu'une seule copie d'ADNccc est suffisante pour permettre la réactivation d'un cycle viral, des techniques sensibles et spécifiques sont nécessaires pour comprendre le mécanisme de persistance de ce minichromosome.

Actuellement, il existe différentes techniques de détection et de quantification. Le gold standard pour la détection de ce minichromosome est le Southern Blot qui permet de visualiser spécifiquement l'ADNccc. Bien qu'il s'agisse de la meilleure méthode de détection pour cet ADN, elle ne permet pas de le quantifier. Pour pallier ce problème des techniques de quantification ont été mises au point. Cependant, ces dernières sont limitées à un seuil de sensibilité de 100 copies par cellules et sont dépendantes d'une digestion enzymatique, la T5 ou la « Plasmide Safe » (PSAD) pour s'assurer de la spécificité de nos amorces.

Ainsi du fait d'un seuil de détection limité, il est parfois difficile de pouvoir évaluer l'efficacité de traitement. De nouvelles technologies sont en cours de développement pour augmenter le niveau de détection. Parmi ces nouvelles technologies, on distingue la droplet digital PCR (ddPCR), qui permet le partitionnement de l'ADN dans des milliers de gouttelettes. L'avènement de cette technologie donne des nouvelles perspectives pour l'étude de l'ADNccc. De plus en plus d'études l'ont utilisées montrant un gain de sensibilité pouvant aller jusqu'à 2 log par rapport à la qPCR.



**Figure 26 :** Principe du Southern blot pour la détection de l'ADNccc. L'ADN extrait migre sur un gel d'agarose. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane et hybridé avec des amorces marquées qui viennent reconnaître spécifiquement le fragment d'ADN. (Figure adaptée de X. Li et al. 2017).



**Figure 27 :** Schéma représentant les différentes méthodes de détection en qPCR. a) Le SyberGreen est un agent intercalant qui vient s'interposer lors de l'amplification des gènes. b) Les amorces Taqman sont marquées avec un fluorochrome et un « quencher ». L'émission de la fluorescence se fait lors de la digestion de l'amorce par la polymérase. c) Position des différentes amorces utilisées en qPCR pour la détection de l'ADNccc du VHB (Figure adaptée de Julie Lucifora et Protzer 2016).

## 2.1 Les méthodes actuelles

### 2.1.1 *Les méthodes de détection et de quantification*

#### 2.1.1.1 Le Southern Blot

C'est le « Gold standard » pour la détection qualitative de l'ADNccc, mais aussi pour distinguer l'ADNccc des autres formes d'ADN viral du VHB (**Figure 26**). Cette technique implique plusieurs processus : la préparation des sondes, l'électrophorèse, l'hybridation sur des membranes et la détection. Pour permettre la réalisation de la technique, l'ADN extrait de cellules infectées par le VHB doit subir en préalable une dénaturation et/ou une digestion enzymatique (Cai et al. 2013; X. Li et al. 2017).

Plusieurs méthodes d'extractions peuvent être envisagées. Il est possible de faire une extraction totale de l'ADN cellulaire. Cependant, le ratio important de l'ADNrc par rapport à l'ADNccc peut être source de contamination. Pour favoriser la détection de l'ADNccc et la pureté de la technique, il est préférable d'effectuer une extraction de HIRT qui permet d'isoler des ADN extrachromosomiaux tels que l'ADNccc. En principe, les membranes lipidiques et les capsides virales sont décomposées afin de libérer les acides nucléiques viraux. La chromatine est ensuite précipitée par une solution concentrée en sel permettant de séparer la chromatine cellulaire et l'ADN lié de façon covalente à des protéines (l'ADNrc) de l'ADN exempté de protéines (l'ADNccc) qui se retrouve dans le surnageant. Le surnageant est ensuite purifié par du phénol organique.

La détection de l'ADN, se fait *via* des sondes qui vont reconnaître spécifiquement la séquence d'intérêt. Ces sondes peuvent être marquées préalablement par des techniques radioactives ou non.

Parmi les méthodes radioactives, on distingue les sondes marquées avec un phosphore 32. Ces sondes sont de forte énergie et l'incorporation du groupe phosphate dans les nucléotides est facile. Cependant cette technique présente des inconvénients. Le phosphore 32 possède une faible demi-vie (de deux semaines) ce qui nécessite une utilisation rapide. De plus, à cause de ses fortes radiations, il est nécessaire d'utiliser des matériaux spécialisés.

Parmi les méthodes non-radioactives, on distingue la détection par fluorescence. Celle-ci nécessite l'utilisation de sondes marquées avec un fluorochrome (détection directe)

ou couplées à une molécule fluorescente (détection indirecte) comme par exemple le système streptavidine-biotine. La détection indirecte permet une meilleure amplification du signal.

La méthode la plus utilisée pour détecter l'ADNccc par Southern blot est l'utilisation de sondes marquées par la digoxigenin (DIG). Il s'agit d'une méthode beaucoup plus sensible, plus reproductible et plus sûre dans la manipulation (Allefs et al. 1990).

Malgré le fait que le Southern Blot reste une méthode de référence pour la détection de l'ADNccc, elle reste une technique non-applicable pour un usage clinique à cause de la petite taille des biopsies et de sa faible sensibilité. De plus, il s'agit d'une méthode lourde qui est coûteuse en temps.

### 2.1.1.2 La PCR quantitative (qPCR)

La Polymérase chain reaction (PCR) est une méthode largement utilisée pour la quantification virale. Cette technique a énormément évolué depuis sa découverte et elle est aujourd'hui utilisée en routine pour la détection et le dépistage.

Il existe principalement deux méthodes de PCR en temps réel (**Figure 27**):

- La première repose sur l'incorporation d'agents intercalant comme le Sybergreen. Cette méthode est basée sur l'utilisation de marqueurs fluorescents qui vont se fixer sur l'ADN pendant la phase d'élongation. De plus l'excitation de ces fluorochromes permet d'émettre un signal qui augmente en fonction de la quantité d'ADN amplifié.
- La deuxième repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes qui vont venir reconnaître spécifiquement l'ADN cible et qui vont servir d'amorce pour l'amplification du brin. On distingue ainsi la technique de « Fluorescence Resonance Energy Transfert » (FRET) et la technique Taqman.
  - La technique FRET repose sur le principe du « quenching ». Il s'agit de deux sondes fluorogéniques qui s'hybrident de façon spécifique de l'ADN à amplifier. Une des sondes contient un donneur tandis que l'autre sonde contient un accepteur. Les deux fluorochromes sont choisis de façon à ce que leur spectre d'émission chevauche le spectre d'excitation. La sonde avec donneur est marquée en 3' alors que la sonde accepteur est marquée en 5'. Lors de la PCR, les deux sondes vont hybrider des régions adjacentes de l'ADN

cible mettant le donneur et l'accepteur à proximité. Le donneur va être excité et transmet son énergie à l'accepteur qui va donc émettre la lumière qui va être détectée et quantifiée.

- La technique de Taqman repose sur un principe similaire. Cependant dans ce cas, les deux fluochromes se retrouvent sur une seule sonde et lors de l'étape de l'élongation, la séparation du donneur et de l'accepteur permet la libération de lumière.

Plusieurs méthodes de PCR ont été mises en place pour pouvoir quantifier l'ADN du VHB et pour essayer d'augmenter la sensibilité et la spécificité de cette technique.

La première méthode pour la détection de l'ADNccc a été développée en 1993 avec des amorces spécifiques de l'ADNccc qui ont été mises en place. Elles sont situées au niveau du « gap » présent sur les deux brins d'ADN du génome du VHB. A cause d'une région homologue entre l'ADNccc et l'ADNrc, la spécificité de ses amorces est compromise en présence de grande quantité d'ADNrc (Köck et Schlicht 1993). Pour la réduire, une digestion préalable avec une DNase spécifique (PSAD ou T5) est souvent utilisée. Pour diminuer les contaminations, une des techniques envisagée est de générer des amorces qui vont se fixer spécifiquement sur un côté du « gap » du brin négatif de l'ADNrc tandis que les sondes seront fixées de l'autre côté. Ainsi la Taq DNA polymérase ne sera pas capable d'atteindre la sonde s'il n'y a pas d'ADN viral comme matrice. Cette technique permet donc l'amplification de l'ADNccc du VHB avec une bonne linéarité dans la tranche de 100 à  $10^7$  copies (He et al. 2002). Cette méthode de quantification a été également adapté pour permettre la détection de l'ADNccc dans les biopsies hépatiques durant les différentes phases de l'infection chronique. Celle-ci consiste à digérer l'ADN extrait par de la PSAD permettant l'élimination de l'ADNrc et que quantifier l'ADNccc avec des amorces spécifiques du « gap » (Werle-Lapostolle et al. 2004; Fabien Zoulim 2005) . La méthode de qPCR dite « conventionnelle » continue à être utilisée pour la détection en routine de l'ADNccc, mais les risques de contamination avec l'ADNrc et le manque de sensibilité de la technique pour des échantillons faiblement concentrés comme les biopsies restent encore des problèmes à résoudre (X. Li et al. 2017).

Une autre méthode de PCR a été mise en place dans les années 2000 : la PCR compétitive qui implique deux matrices :

- Une matrice « compétitive » de quantité connue
- Une matrice cible de quantité inconnue.

La longueur des produits de PCR du compétiteur et de la cible est différente et peut donc être quantifiée et distinguée. Par rapport à une PCR plus conventionnelle, cette méthode de détection est un peu plus précise et sensible mais les risques de contamination avec une amplification non-spécifique de l'ADNrc sont encore possibles lorsque que ce dernier est en grande quantité (X. Li et al. 2017).

Enfin, une autre méthode décrite pour quantifier l'ADNccc est la « Nested PCR ». Cette technique a été souvent proposée pour réduire les amplifications non-spécifiques d'une PCR classique. Elle consiste à utiliser deux paires d'amorces impliquées successivement au cours d'une réaction de PCR. Le second jeu d'amorces amplifie une seconde cible (la séquence cible initiale) qui est située au sein du produit de la première PCR. Ainsi la seconde réaction de PCR amplifiera seulement la séquence spécifique et n'amplifiera pas les séquences non-spécifiques que l'on aurait pu obtenir lors de la première réaction (A. L. Mason et al. 1998). Cependant, l'inconvénient de cette méthode est que les deux réactions de PCR augmentent le risque de contamination.

Bien que la PCR en temps réel soit une méthode de choix pour la quantification d'ADN viral, cette technique manque de sensibilité pour la détection de très faible quantité d'ADN. En effet, des traces d'ADNccc persistent dans le noyau de cellules infectées après les différents traitements antiviraux et il est donc nécessaire de développer une technique plus sensible telle que la Digital PCR (X. Li et al. 2017).

### 2.1.1.3 RCA

La « Rolling Circle amplification » ou ramification amplification (RCA). Il s'agit d'une technique simple, fiable et fondée, sur une amplification isothermique qui ne nécessite pas d'équipement spécifique ni une expertise spécifique (**Figure 28**). Cette méthode est basée sur les propriétés de la polymérase phi 29 DNA qui est une enzyme d'un bactériophage utilisée pour sa propre réplication. Cette polymérase possède plusieurs caractéristiques qui lui permettent d'être utilisés *in vitro* pour l'amplification de l'ADN. Cette protéine unique de 68 KDa peut réaliser deux réactions de synthèse et trois réactions de dégradation. Elle possède ainsi une forte activité exonucléase en 3' et est capable de polymériser 70 000

nucléotides sans se détacher de la matrice. Elle détient une activité de déplacement de brin, ce qui lui permet de pouvoir se déplacer sur le brin complémentaire de la matrice durant la synthèse d'ADN.

Sur les matrices circulaires, cette polymérase peut soit réaliser une amplification linéaire soit une amplification avec ramification puisque les brins néo formés constituent un nouveau site de liaison pour les amorces d'amplification. Le poids moléculaire du produit final est supérieur au poids initial, car il contient plusieurs copies de la cible.

Comparée à la PCR, cette technique est plus résistante aux inhibiteurs que l'on peut trouver dans des échantillons cliniques et requiert moins d'optimisation. Cette technique donne moins de biais d'amplification et un meilleur rendement que la PCR classique.

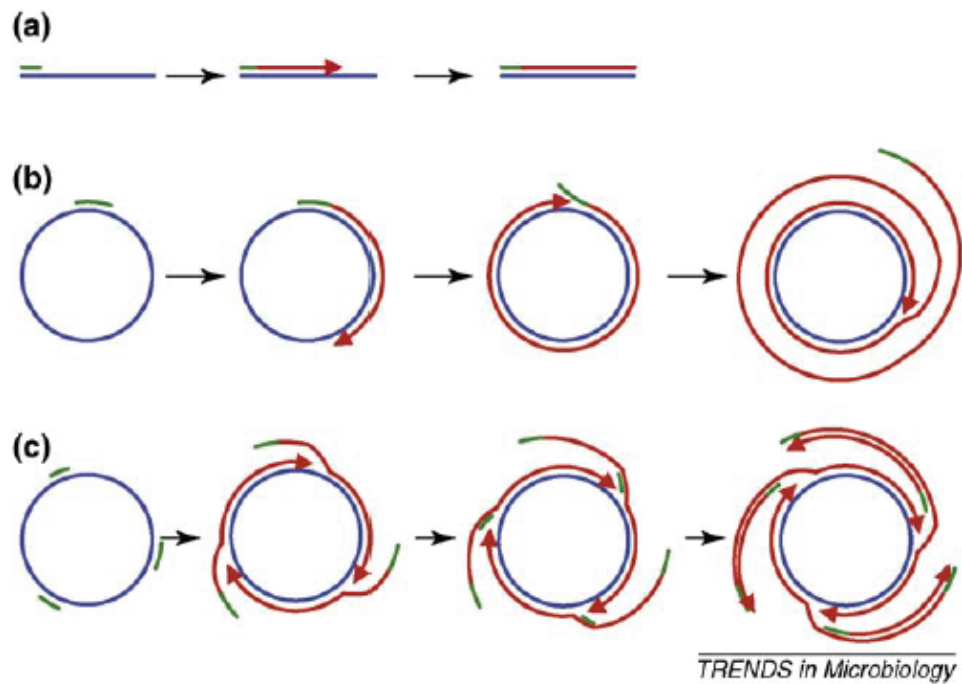
Cette méthode a été adaptée pour permettre l'amplification de l'ADNccc. Couplée avec la PCR, la RCA est une technique aussi sensible que la qPCR avec l'avantage d'amplifier le génome complet du VHB plutôt qu'une partie du génome et avec une plus grande fiabilité que la PCR (Margeridon et al. 2008a). Elle a pu être utilisée pour permettre l'amplification de l'ADN du VHB dans le sérum. Cette amplification a été possible grâce à la mise au point d'une seule étape permettant l'achèvement du brin positif et la ligation du brin *in vitro*. (Martel et al. 2013a).

## 2.1.2 Méthodes de localisation

### 2.1.2.1 FISH

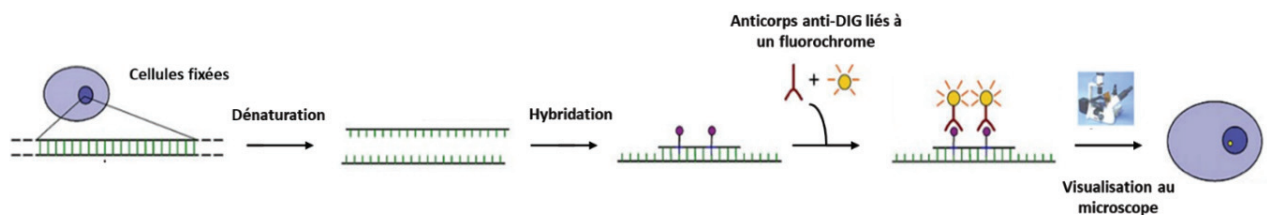
La « Fluorescence *in situ* hybridation » (FISH) est une méthode permettant de visualiser l'ADN à l'aide de sondes qui viennent se fixer spécifiquement sur la séquence cible. Cette technique permet ainsi la visualisation du génome dans une cellule individuelle. Elle nécessite plusieurs étapes de préparation de l'ADN.

Cette technique a été adaptée aux différentes formes d'acides nucléiques du VHB dans des cellules HepAD38 et HepG2-NTCP infectées (X. Zhang et al. 2017). Une première étude a été réalisée en 1998 en utilisant des sondes marquées avec la DIG pour mettre en évidence l'ADN du VHB dans des cellules HepG2.2.15 (Yeh et al. 1998) (**Figure 29**). Pour visualiser l'ADNccc, la technique a été optimisée avec des sondes qui viennent se fixer au niveau du « gap » de l'ADNrc (X. Zhang et al. 2016). Cette technique peut être associée avec une immunofluorescence afin de marquer dans la même cellule les antigènes du VHB.



**Figure 28 :** Rolling Circle amplification

a) Amplification sur un ADN simple brin linéaire. b) Amplification d'un brin d'ADN simple brin circulaire. c) Amplification d'un brin d'ADN simple brin circulaire par ramification (Figure adaptée de Johne et al. 2009).



**Figure 29 :** Principe de la Fluorescence in situ hybridation (FISH)

Les cellules sont fixées, puis l'ADN est dénaturé pour permettre l'hybridation de sondes spécifiques marquées pour la détection de l'ADN cible (Figure adaptée de Feng et al. 2018).



Pour augmenter la sensibilité de la technique, elle peut être couplée à la technique de branche DNA qui permet l'hybridation spécifique de sondes adjacentes avec des nouveaux oligonucléotides qui viennent amplifier le signal (X. Zhang et al. 2017).

L'utilisation de cette technique dans des lignées cellulaires exprimant le DHBV ou le VHB a permis de déterminer la distribution de l'ADNccc dans des conditions mimant une infection *de novo* et mimant une thérapie antivirale montrant la stabilité de l'ADNccc en présence d'inhibiteur de la transcription virale. Cette technique a permis d'analyser l'ADNccc au cours de la division cellulaire. Ainsi, la perte de l'ADNccc au cours de la division cellulaire semble suivre une distribution symétrique dans les cellules Dstet contenant le DHBV alors que les signaux observés en FISH dans les cellules HepaD38 contenant le VHB ne semblent pas suivre la même distribution. Cependant, il est important de noter que l'interprétation de ces résultats est basé sur l'hypothèse que les cellules se divisent à la même vitesse. Il est concevable de penser que certaines cellules se divisent plus rapidement que d'autres (M. Li, Sohn, et Seeger 2018).

Ainsi, cette méthode de détection présente l'avantage de déterminer la localisation de l'ADNccc. Il peut être intéressant de préciser la position de cet ADN dans les hépatocytes évaluant ainsi les espaces nucléaires qui peuvent rentrer en jeu au cours des différentes phases de la maladie.

## 2.2 La Digital PCR

C'est la dernière génération de PCR qui permet d'augmenter la détection et la quantification en valeur absolue et sans gamme standard grâce aux partitionnements de l'échantillon. Elle est plus reproductible et moins sensible aux inhibiteurs de PCR qu'une PCR conventionnelle.

### 2.2.1 *Le principe*

La PCR digital permet de réaliser une réaction de PCR classique dans des compartiments différents appelés chambres réactionnelles. Ce partitionnement de la réaction dans ces chambres est créé à partir de l'échantillon. Certaines chambres ne contiennent pas de copies du gène étudié alors que d'autres oui. On obtient alors un résultat numérique binaire en comptant :



Figure 30: Images des Digital PCR avec partitionnement de l'échantillon dans des puces.  
a) Le Biomark. b) L'openArray

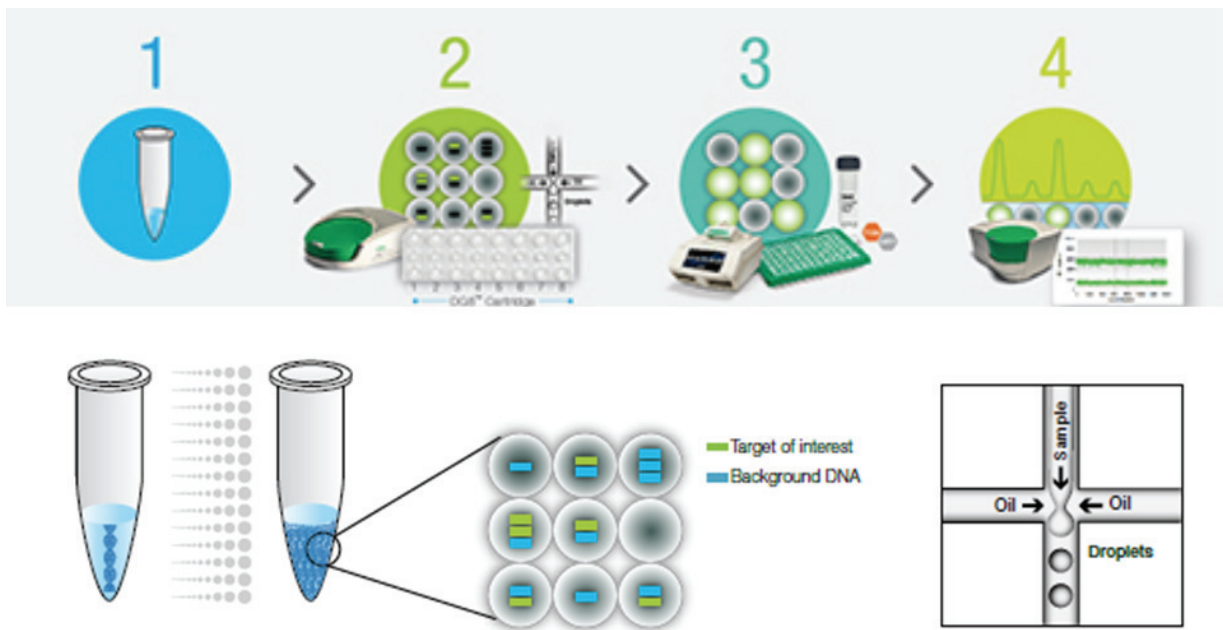


Figure 31: Principe de la droplet digital PCR (ddPCR)  
L'ADN est partitionné dans des gouttelettes créées par émulsion entre l'eau et l'huile. La réaction de PCR est réalisée dans chaque gouttelette à l'aide d'un thermocycleur. L'amplification est détectée dans chaque gouttelette à l'aide d'un détecteur de fluorescence (Figure adaptée de Biorad).

- Le nombre de chambres réactionnelles dans lequel l'amplification a eu lieu (1)
- Le nombre de chambres réactionnelles dans lequel il n'y a pas eu d'amplification (0).

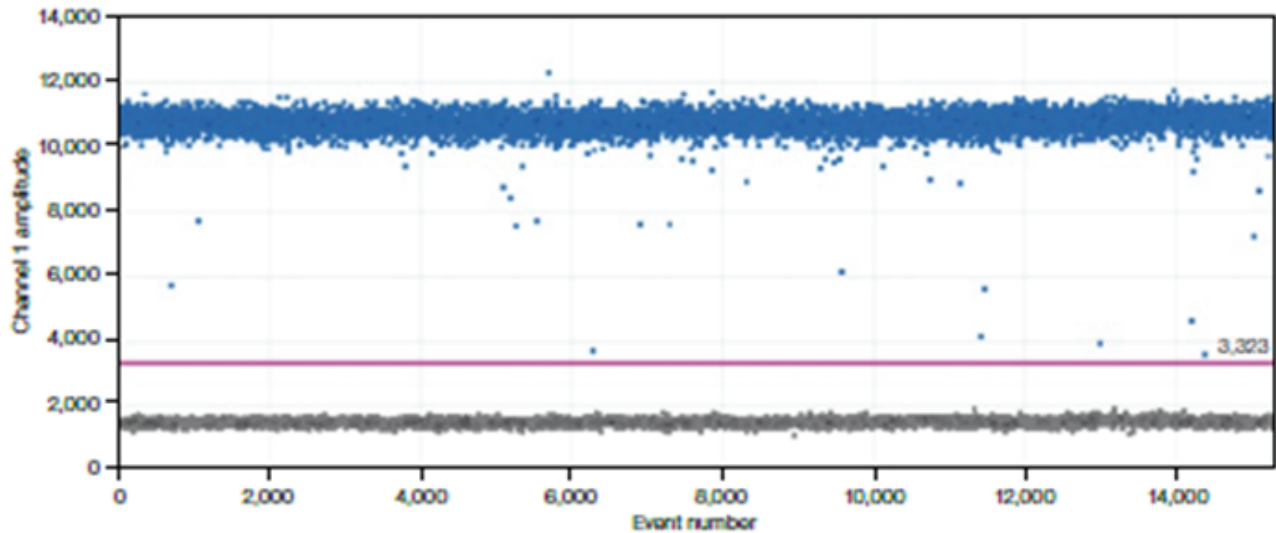
Le fractionnement de l'échantillon dans les différentes chambres permet de réduire le bruit de fond et offre une sensibilité accrue au test. La quantification de la séquence cible par chambres réactionnelles est obtenu grâce à la loi de Poisson. Il s'agit d'une loi statistique discrète qui décrit la probabilité qu'un évènement se produise durant un intervalle de temps.

Ces chambres réactionnelles peuvent être soit des puces soit des gouttelettes créées à partir d'une émulsion entre l'eau et l'huile.

La digital PCR par puce est effectuée sur un petit volume et sur une répartition solide qui permet de faire une quantification en temps réel ou en point final. Cette technique peut être utilisée pour quantifier plusieurs échantillons en parallèle. Ce type de technologie est utilisé par le Biomark et l'OpenArray (**Figure 30**).

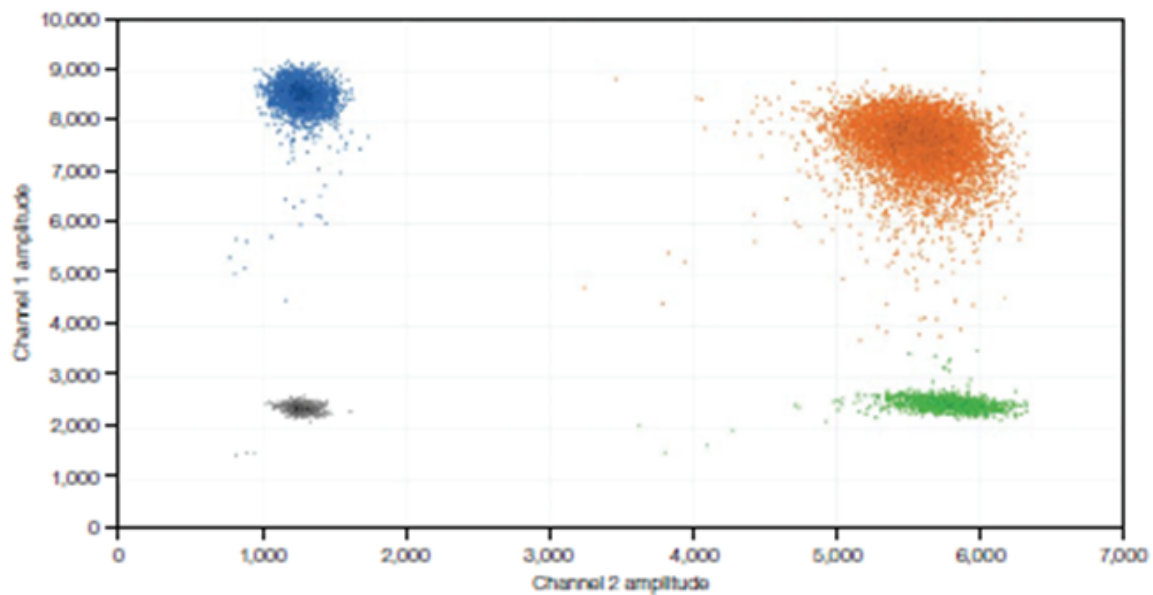
Le Biomark est constitué de puces microfluidiques, d'un réseau de canaux capillaires et de nano valves flexibles. Cette technologie est compatible avec aussi bien des amorces que des intercalants d'ADN pour la quantification (Devonshire et al. 2013). L'OpenArray est constitué quant à lui de lames de taille microscopique qui forment les chambres réactionnelles. Cependant la digital PCR par puce présente un nombre de chambres réactionnelles inférieures à celui généré par l'émulsion.

La digital PCR par émulsion est aussi appelée « Droplet Digital PCR » (ddPCR) (**Figure 31**). Le fractionnement de l'échantillon se fait par émulsion entre de l'eau et de l'huile. Il s'agit d'une quantification en point final ce qui rend la technique moins sensible aux inhibiteurs de PCR et ne dépend pas de l'efficacité d'amplification. Cette technique, que nous avons développée au laboratoire, est proposée par BIORAD. Avant la génération de gouttelettes, la réaction est préparée de manière similaire qu'une qPCR conventionnelle en utilisant des sondes TaqMan qui sont marquées avec des fluorochromes FAM ou VIC. Cette technique peut également se faire en utilisant un agent intercalant de l'ADN : EvaGreen. La réaction se fait à l'aide de réactifs spécialisés qui ont été développés par BIORAD. La génération des gouttelettes nécessite le système QX100 ou QX200 générateur qui permettent la séparation de l'échantillon dans 20 000 nano gouttelettes de tailles uniformes.



**Figure 32 :** Analyse unidimensionnelle par la ddPCR

Le nombre de gouttelettes est représenté en fonction de la fluorescence. Les gouttelettes bleues ont une fluorescence positive alors que les gouttelettes en grises ont une fluorescence négative. La ligne rose représente le seuil de séparation (Figure adaptée de Biorad).



**Figure 33 :** Analyse multidimensionnelle par la ddPCR

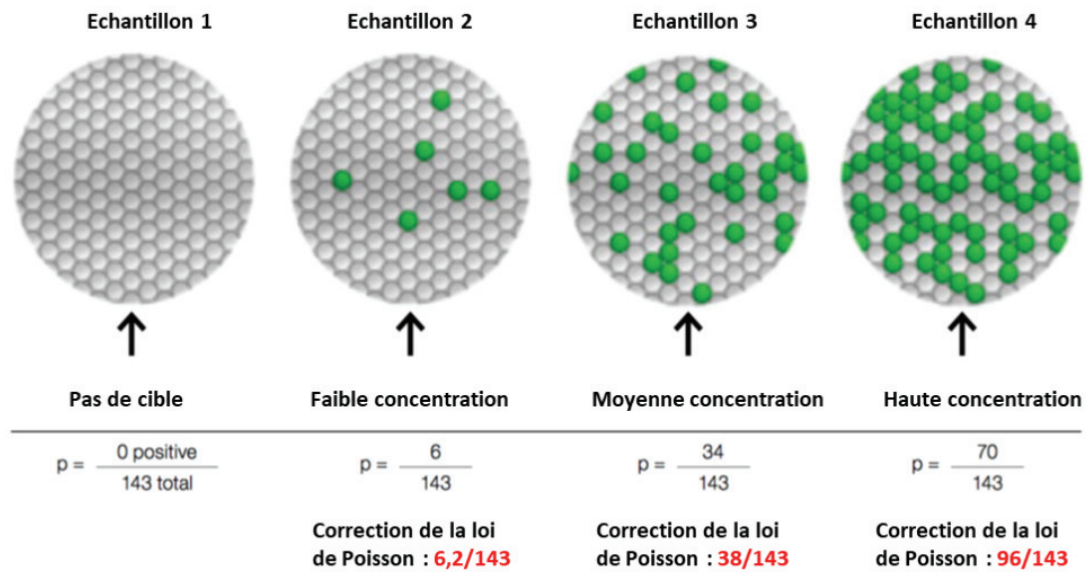
Les gouttelettes sont représentées en fonction de la fluorescence du canal 1 et du canal 2. Les gouttelettes oranges ont une fluorescence positive pour les deux canaux, Les gouttelettes bleues ont une fluorescence positive pour le canal 1 et négative pour le canal 2, les gouttelettes vertes ont une fluorescence positive pour le canal 2 et négative pour le canal 1 alors que les gouttelettes en grises ont une fluorescence négative pour les deux canaux (Figure adaptée de Biorad).

L'ADN se distribue de manière aléatoire dans les gouttelettes. Une fois le fractionnement effectué, la réaction de PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur classique pour permettre l'amplification du gène d'intérêt dans chaque goutte. Les échantillons sont ensuite mis dans le Reader qui analyse chaque gouttelette individuellement en utilisant deux canaux de détection. La loi de Poisson permet de corriger l'éventualité d'avoir plusieurs copies par gouttes. Les gouttes positives ont une fluorescence plus élevée qu'aux gouttes négatives. La présence de gouttes négatives est importante pour la bonne quantification des échantillons. Il est recommandé d'avoir au minimum 100 gouttelettes négatives pour permettre l'application correcte de la loi de Poisson. Il est également nécessaire de quantifier des échantillons négatifs pour contrôler la spécificité de nos amorces et de pouvoir générer le seuil de positivité.

L'analyse des résultats peut se faire soit en 1 dimension ou chaque goutte est représentée sur un graphe montrant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de gouttes totales générées (**Figure 32**). La positivité et la négativité des échantillons sont déterminées en fonction de l'intensité de fluorescence ce qui permet de déterminer un seuil.

L'analyse peut également se faire en deux dimensions (**Figure 33**). Cette analyse est réalisée lors de l'amplification plusieurs cibles différentes dans le même échantillon (quantification en duplex). Dans ce cas, les gouttes sont représentées sur un graphe montrant l'intensité de la fluorescence du canal 1 (FAM) en fonction de l'intensité de fluorescence du canal 2 (VIC). Comme l'ADN a une distribution qui est aléatoire dans les gouttes, la division des gouttes sur ce graphe se fait en 4 groupes différents :

- Les gouttes qui sont doublement négatives (FAM et VIC négatifs), et qui seront placées en bas à gauche du graphe
- Les gouttes qui sont positives pour FAM et négatives pour VIC, et qui seront placées en haut à gauche du graphe
- Les gouttes qui sont négatives pour FAM et positives pour VIC, et qui seront placées en bas à droite du graphe
- Les gouttes qui sont doublement positives (FAM et VIC positifs), et qui seront placées en haut à droite du graphe.



**Figure 34** : Quantification absolue par la ddPCR.

L'ADN des échantillons est partitionnée dans des gouttelettes. En fonction de l'échantillon initial, la loi de Poisson permet de déterminer la concentration absolue de l'échantillon en fonction du nombre de gouttes positives et négatives avec un intervalle de confiance de 95% (Figure adaptée de Biorad).

L'analyse de la ddPCR se fait à l'aide du logiciel QuantaSoft développé par BIORAD, il donne le nombre de gouttes totales formées au cours de la réaction, le nombre de gouttes positives, le nombre de gouttes négatives. La concentration initiale de l'ADN cible est donnée en copie/ $\mu\text{L}$  grâce à la loi de Poisson basé sur un intervalle de confiance de 95%.

La formule utilisée pour la loi de Poisson est donc (Figure 34):

$$\text{Copies par goutte} = -\ln(1-p) \text{ ou } p \text{ est la fraction de gouttes positives}$$

La ddPCR permet donc une quantification absolue avec une meilleure sensibilité que la qPCR et offre un vaste domaine d'application.

- La quantification absolue d'un ADN cible : la ddPCR donne une concentration en copie/ $\mu\text{L}$  sans recours à l'utilisation d'une gamme standard donnant un avantage pour la quantification de la charge virale et bactérienne.
- La détection des altérations génomiques comme la variation d'un nombre de copies d'un gène : la variation d'un nombre de copies d'un gène repose sur la variabilité phénotypique qui nécessite un dosage sensible. La ddPCR peut mesurer jusqu'à une variation de 1.2 du nombre de copies d'un gène.
- La détection d'évènements rares : il est possible d'amplifier un seul gène présent dans un échantillon complexe. La ddPCR est assez sensible pour détecter de rares mutations.
- L'analyse de micrRNA
- Le séquençage nouvelle génération. La ddPCR peut quantifier des bibliothèques d'échantillons de séquençage pour augmenter la précision du séquençage et réduire les répliques.
- L'analyse en Single-cell

### 2.2.2 *ddPCR pour la quantification de l'ADNccc*

L'ADNccc pouvant être présent à de très faibles quantités dans la cellule, il était important de développer de nouvelles techniques plus sensibles. L'intérêt de développer des techniques suffisamment sensibles serait de mieux comprendre sa biologie et de mieux évaluer l'efficacité des traitements.

La ddPCR est un bon outil à mettre en place pour la quantification de ce minichromosome. De nombreuses études ont montré l'avantage de cette technologie par rapport à la qPCR dans différentes disciplines et notamment pour la détection de l'ADN du VHB.

En 2015, une étude a montré une bonne quantification et détection de l'ADN dans une gamme de 1 copie à  $10^5$  copies en utilisant un plasmide du VHB. En effet, pour les échantillons ayant une concentration supérieure à  $10^5$  copies, les valeurs pratiques dérivent par rapport aux valeurs théoriques. Une augmentation de la sensibilité a été démontrée dans les cellules HepG2.2.15 où la ddPCR permet une détection d'ADNccc à partir de 1ng d'ADN alors que la qPCR nécessite 50 ng d'ADN, et cela, avec une digestion par la PSAD et des amorces spécifiques à l'ADNccc (Mu et al. 2015a).

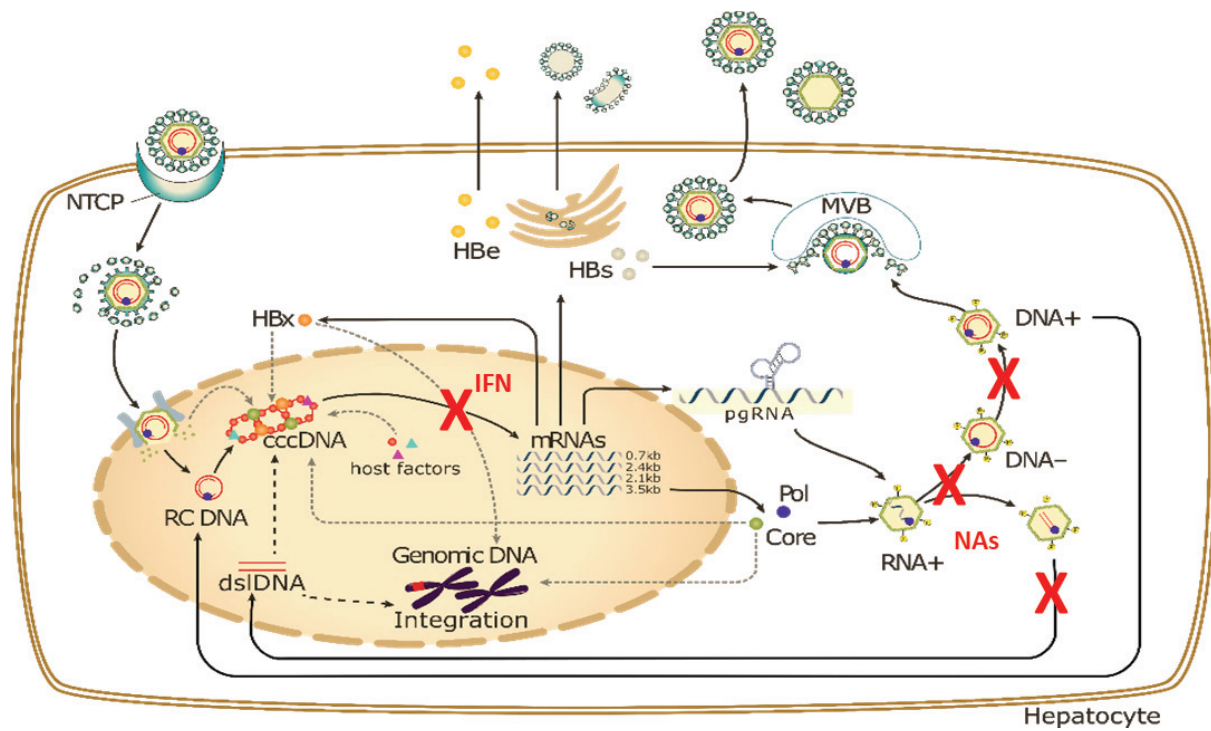
L'avantage de cette technologie a également été démontré sur des échantillons de patients infectés chroniquement et traités par l'IFN. L'efficacité de l'IFN peut être évaluée par la séroconversion des antigènes HBe, cependant cette séroconversion se fait seulement chez 30% des patients traités par IFN. Ainsi, la détection de l'ADNccc chez ces patients représente un meilleur biomarqueur. Dans une étude, la ddPCR permettait d'augmenter la sensibilité d'un facteur 150 par rapport à qPCR pour la détection de l'ADNccc ce qui a permis de mieux contrôler l'efficacité antivirale (Mu et al. 2017). Cette technique a également permis d'augmenter le seuil de détection pour la quantification de l'ADN du VHB dans les sérums de patients traité par le Ténofovir (Y. Liu et al. 2017).

Cette technologie a également permis de pouvoir détecter l'ADNccc dans des biopsies hépatiques de patient ayant une infection occulte du VHB qui se traduit par la présence d'ADN intrahépatique en l'absence d'antigènes HBs détectable. Les patients présentant une infection occulte peuvent avoir une réactivation de l'infection lors d'un état immunitaire compromis. Le diagnostic de ces infections nécessite des biopsies hépatiques afin d'évaluer la quantité d'ADN intrahépatique. En pratique, la reconnaissance de cette infection passe par la détection d'anticorps anti-HBc antigène dans le sérum agissant comme un biomarqueur indirect de cette infection. Ainsi la sensibilité de la ddPCR a permis de pouvoir déterminer la prévalence de l'ADNccc chez des patients ayant une infection occulte de HBV et d'évaluer la relation entre le taux d'ADNccc et le taux d'anticorps anti-HBc



antigène. Cette étude démontre l'avantage de développer de nouvelles technologies pour mieux appréhender le devenir de la maladie (Caviglia et al. 2018).

Des études ont montré que la ddPCR apporte un gain de sensibilité pour la détection des acides nucléiques et permet une meilleure détection de l'ADNccc dans des échantillons de patients. Mais aucune d'entre elles n'ont utilisé cette technologie pour mieux comprendre le fonctionnement de ce minichromosome. Il serait intéressant de l'utiliser pour évaluer l'efficacité de différents traitements à long terme, mais surtout pour évaluer l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc. Cela permettrait de mieux comprendre sa biologie et de pouvoir définir de nouvelles stratégies thérapeutiques.



**Figure 35 :** Action des traitements actuels sur le cycle d'infection du VHB.

L'IFN agit sur la transcription des ARN viraux alors que les analogues nucléos(t)idiques agissent sur la transcription inverse de l'ARNpg (Figure adaptée de Testoni, Durantel, et Zoulim 2017).

## Partie 3 : Traitements actuels

### 1 Les différents médicaments utilisés

Plus de 250 millions de personnes dans le monde sont atteintes actuellement d'une hépatite chronique et le VHB est responsable de 780 000 morts par an principalement dus à la cirrhose ou au CHC. Les premiers traitements antiviraux contre l'hépatite B ont été mis en place dans les années 1980. Actuellement il existe deux principales classes de traitements (**Figure 35**) :

- La classe des agents immunomodulateurs qui est constituée de l'IFN et de l'IFN Pegylé (PEG-IFN).
- La classe des analogues nucléos(t)idiques constituée de cinq molécules qui ont été approuvées par les autorités de santé : la Lamivudine (LAM), l'Entécavir (ETV), le Ténofovir (TDF), l'Adéfovir (ADV) et la Telbivudine (TBV). Une sixième molécule a été approuvée par l'Agence Européenne du Médicament et en cours d'approbation en France le Ténofovir Alafenamide (TAF).

Propriétés	PEG-IFN	Analogues de Nucléosides
Administration	Injection sous cutanée	oral
Durée du traitement	48 semaines	Traitement à long terme jusqu'à la perte des antigène HBs
Tolérance	Mauvaise	Bonne
Sécurité à long terme	Risque neurologique, psychiatrique, endocrinologique	Risque rénal et osseux pour certains analogues de nucléos(t)ides
Contre-indication	Nombreuses	Rares
Stratégie ciblée	Induire une réponse immunitaire à long terme	Stopper la réplication virale et la progression de la maladie
Effet sur la suppression virale	Modérée	Forte
Risque de réactivation viral après arrêt des traitements	Faible	Modéré si le traitement a été donné après la séroconversion des antigènes Hbe, Haute si le patient est négatif pour les antigènes HBe
Risque de résistance	Non	Dépend de l'analogue de nucléos(t)ide

**Tableau 2:** Tableau regroupant les différentes caractéristiques du traitement PEG-IFN et des traitements par analogues nucléos(t)idiques (Figure adaptée de Lampertico et al. 2017).

Ces traitements ont des effets différents sur le cycle viral. Tandis que l'IFN agit principalement sur la diminution de la transcription des ARN viraux et sur leur dégradation

(Pei, Chen, et Lu 2014), les analogues de nucléos(t)ides agissent au niveau de la polymérase virale lors de la transcription inverse.

## 1.1 Les Interférons (IFN)

C'est dans le milieu des années 80 que l'IFN devient le premier traitement approuvé pour l'hépatite B. La découverte de l'IFN a été faite en 1950 comme agent antiviral. Il est naturellement produit par les lymphocytes et est impliqué dans le contrôle des infections aiguës et chroniques.

L'IFN est un immunomodulateur qui a un effet antiviral indirect sur l'élimination du VHB en activant plusieurs gènes cellulaires et voies de signalisation de la réponse immunitaire. Il augmente l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de type 1 dans les cellules infectées et active la modulation de différents signaux immunitaires et cytokiniens qui inhibent la réplication virale.

Le traitement par l'IFN permet d'augmenter le niveau des cytokines pro inflammatoires (IL-12, IL-15), active des cellules CD4 spécifiques du VHB et les cellules « Natural Killers » qui contribuent largement au contrôle de la persistance virale. Cependant peu d'effet ont été montré sur l'activation des cellules T par l'IFN (Micco et al. 2013). Dans des modèles cellulaires d'infection par le VHB, l'IFN est capable à haute concentration d'induire le complexe APOBEC qui permettrait une destruction partielle du pool d'ADNccc (Julie Lucifora et al. 2014). Il a été également montré que l'IFN avait un effet sur la régulation épigénétique de l'ADNccc comme expliqué dans la partie 2 (Laura Belloni et al. 2012a).

L'addition d'une molécule pegylée (PEG) à l'IFN augmente sa demie-vie et son activité. Deux PEG-IFN ont été étudiés pour le traitement du VHB :

- Le premier ajoute une molécule pegylée de 40KDa à l'IFN alpha 2a (PEG-IFN alpha 2a). PEG-IFN alpha 2a a une demie-vie de 80h et est catabolisé par le foie et ses produits de dégradation sont actifs.
- Le second ajoute une molécule plus petite de 12KDa à l'IFN alpha 2b (PEG-IFN alpha 2b). PEG-IFN alpha 2b a une demie-vie de 40h et agit principalement comme une pro-drogue qui libère l'IFN.

Ils montrent une tolérance similaire avec des taux de réponses antivirales plus élevés que l'IFN seul. Le PEG-IFN alpha 2a est indiqué pour le traitement de certains patients positif ou négatif pour les antigènes HBe. Le PEG-IFN alpha 2b est utilisé principalement dans les pays asiatiques (Rijckborst et Janssen 2010).

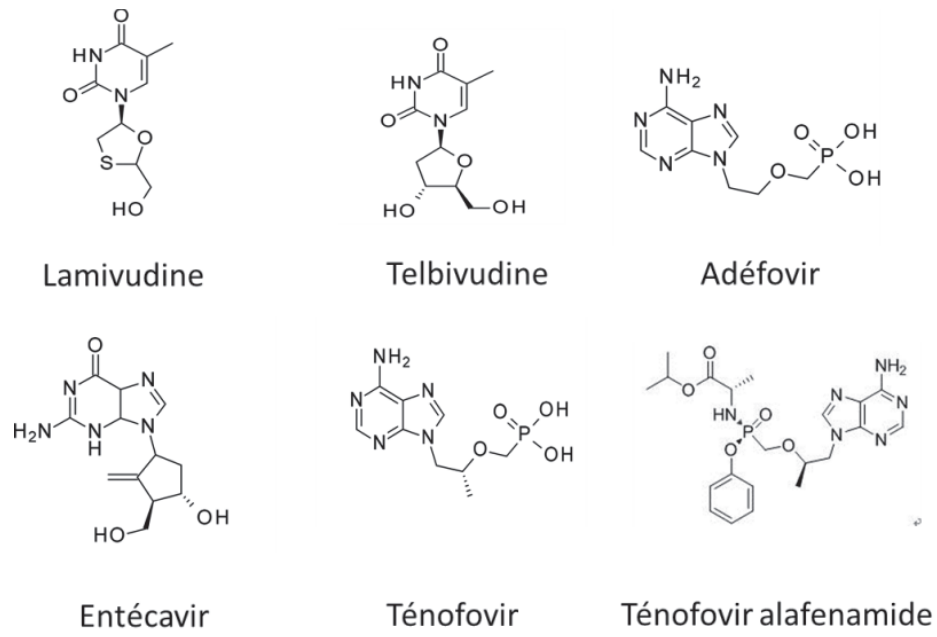
L'IFN est administré pour une période maximale de 48 semaines à une dose de 180µg/semaine par voie sous cutanée. Il génère peu de résistance et réduit les risques de développer une cirrhose ou un cancer à long terme. Cependant seulement un petit pourcentage de patients répond à ce traitement et il est à l'origine d'effets secondaires fréquents tels que le syndrome grippal, les céphalées, les myalgies, la fatigue, la perte de poids, la dépression, la perte de cheveux, la neutropénie, la thrombopénie. (Gupta et al. 2014).

## 1.2 Les analogues de nucléos(t)ides

L'émergence du VIH a permis le développement de nouveau traitement pour le VHB comme les analogues de nucléos(t)ides. Ils ciblent directement la polymérase virale en créant une compétition entre l'incorporation de substrats endogènes et des analogues de nucléos(t)ides. Ils entraînent une forte réduction de la synthèse de l'ADNrc, diminuent la production de virions et réduisent le recyclage des capsides matures dans le noyau des cellules infectées. Ils entraînent une réduction de la mort des hépatocytes et de l'inflammation du foie. Un traitement à long terme est associé à une amélioration des fonctions des cellules lymphocytes T spécifiques du VHB. Les analogues de nucléos(t)ides sont associés à une régression de la fibrose, à une diminution de la progression de la maladie et à une réduction du risque de développer un CHC après 5 à 6 ans de traitement.

Les six analogues nucléos(t)ides utilisés pour traiter le VHB se répartissent en deux groupes selon le taux de résistances qu'ils induisent (**Figure 36**):

- La Lamivudine, l'Adefovir, et la Telbivudine induisent un fort taux de résistance
- L'Entécavir, le Ténofovir et le Ténofovir alafenamide ont une baisse de résistance élevée. L'EASL recommande, donc, de les utiliser en première intention (Lampertico et al. 2017).



**Figure 36** : Structure des différents analogues nucléos(t)ides  
(Figure adaptée de Feng et al. 2018).

### 1.2.1 *La Lamivudine*

La Lamivudine a été le premier analogue de nucléos(t)ides oral approuvée pour le traitement des hépatites B chroniques (CHB) à une dose de 100mg/jour. Il s'agit d'un analogue de la cytidine qui est phosphorylé au niveau de ses métabolites actifs. Il agit comme un terminateur de la chaîne nucléotidique après compétition pour l'incorporation dans l'ADN viral. La Lamivudine normalise les taux d'ALAT, permet la séroconversion de l'antigène HBe (16 à 18% des cas après un an de traitement), entraîne la suppression de l'ADN et restaure l'intégrité des tissus hépatiques. Il a été montré qu'elle permettait de réduire les complications de la cirrhose.

Des études sur la conformation de la polymérase ont montré que les résidus F88, L180 et M204 jouaient un rôle important dans la conformation hydrophobe de la molécule et dans l'interaction de la molécule avec la Lamivudine. Bien que sa structure soit légèrement différente à celle d'une cytosine naturelle, la Lamivudine interagit avec le site actif de la polymérase du VHB induisant un changement de conformation de la polymérase au niveau du résidu M204 ce qui permet l'inhibition de la réplication virale.

L'inconvénient majeur de la Lamivudine est d'entraîner un taux élevé de résistance génotypique par mutation dans 76% des cas environ après 8 ans de traitement. Les principales mutations entraînées par la Lamivudine touchent la région M204 (rtM204V et rtM204I). Ce sont des mutations lors de la transcription inverse qui génère une Valine ou Isoleucine à la place de la Méthionine ce qui a pour effet de créer un encombrement stérique et empêche l'interaction de la molécule avec la polymérase. Ainsi dans certains cas ces mutations peuvent générer une augmentation de la réplication virale (Gupta et al. 2014).

### 1.2.2 *L'Adéfovir*

L'Adéfovir a été approuvé en 2002 par les autorités de santé à une dose de 10mg/jour. Il s'agit d'un analogue de l'Adénosine monophosphate. Il a été montré que cet analogue de nucléos(t)ide améliore les paramètres histologiques, viraux et biochimiques. Cependant le taux de la suppression virale est assez lent. L'un des avantages de l'Adéfovir est son efficacité contre les mutants résistants à la Lamivudine. Les patients ayant développés une résistance à la Lamivudine de type rtM204V restent sensibles à l'Adéfovir.

L'Adéfovir peut lui aussi générer deux mutations au niveau de la polymérase : rtA181V et la rtN236T. On observe 29 % de résistance à l'Adéfovir après 5 ans traitement. Une néphrotoxicité apparaît souvent après 4 à 12 mois de traitement qui est réversible à son arrêt (Gupta et al. 2014).

### 1.2.3 *La Telbivudine*

La Telbivudine a été approuvée en 2006 à une dose de 600mg/jour. Elle subit une phosphorylation pour former un triphosphate *via* les kinases cellulaires. Contrairement aux autres analogues de nucléos(t)ides, la Telbivudine possède une configuration en levogyre. Elle inhibe la polymérase cellulaire par un mécanisme de compétition avec la thymidine triphosphate et son incorporation entraîne la fin de la chaîne d'ADN. Cet analogue est plus puissant que la Lamivudine pour la suppression du VHB. La Telbivudine entraîne une meilleure réponse virale et biochimique que la Lamivudine et a un taux plus faible de résistance. La Telbivudine montre également une meilleure suppression virale que l'Adéfovir.

Après deux ans de traitement, on observe 10 à 25% de taux de résistance que les patients soient porteur ou non de l'antigène HBe. Ce taux augmente à 30% après la troisième année de traitement. La principale mutation observée est la rtM204I qui altère l'orientation de la polymérase et le positionnement des groupes méthylés. D'autres mutations peuvent être observées comme la rtA181T, rtL229W ou la rtL180M conduisant à une perte d'un groupement méthyl nécessaire à l'affinité entre la Telbivudine et la polymérase. Une combinaison de la mutation L180M et M204I entraîne un taux de résistance plus élevé à la Telbivudine.

La Telbivudine entraîne une néphrotoxicité plus importante que la Lamivudine. La Telbivudine associée avec le PEG-IFN peut être responsable d'effets secondaires comme des myalgies ou des neuropathies (Gupta et al. 2014). Ainsi actuellement la Telbivudine n'est plus un analogue de nucléos(t)idique de premier choix.

### 1.2.4 *L'Entécavir*

L'Entécavir a été approuvé en 2005, à la dose de 0.5mg/jour et de 1mg/jour pour les patients ayant développé des résistances à la Lamivudine. L'Entécavir est un analogue carboxylique de la Guanosine qui subit des phosphorylations intracellulaires au niveau de son



métabolite actif en 5'. Il est en compétition avec le substrat deoxyguanosine triphosphates et inhibe la polymérase virale du VHB. Plusieurs rôles ont été attribués à l'Entécavir :

- Il interfère avec les étapes précoces de l'amorçage des nucléotides qui sont nécessaires à l'initiation de la transcription inverse de l'ARNpg
- Il interfère avec la synthèse du brin négatif et positif de l'ADN.

Des études *in vitro* ont montré qu'il s'agissait d'un inhibiteur de l'amorçage de la polymérase virale contrairement aux autres analogues de nucléos(t)ides qui agissent comme des terminateurs de la chaîne d'ADN. Comparé à la Lamivudine, l'Entécavir montre une meilleure efficacité pour la réduction de la réplication d'ADN viral.

Les études de la structure moléculaire ont montré que l'Entécavir interagit avec la polymérase virale de la même façon que le substrat naturel et n'exige donc pas un changement de conformation des résidus pour une fixation. L'Entécavir inhibe l'élongation de la polymérase après addition de quelques nucléotides ce qui augmente l'encombrement sphérique et empêche ainsi l'ajout de nouvelles bases à l'ADN.

De plus, l'Entécavir génère de faible taux de résistance. Celui-ci est seulement de 1.2% des cas après 5 ans de traitement. Ceci s'explique par la nécessité de combiner 3 mutations pour produire une résistance à la molécule (rtI169T ; rtT184G ; rtS202I ; rtM250V). Cependant la résistance à la Lamivudine augmente celle de l'Entécavir du fait d'une résistance croisée liée aux mutants M204V/I. Chez des patients déjà résistants à la Lamivudine on observe un taux de 51% de résistance à l'Entécavir après 5 ans de traitement (Gupta et al. 2014).

### 1.2.5 *Le Tenofovir*

Le Tenofovir a été approuvé en 2008 à la dose de 300mg/jour. Il s'agit d'un terminateur de la chaîne d'ADN qui est en compétition avec la deoxyadénosine triphosphate en 5'incorporé par la polymérase virale.

Le Tenofovir a montré une efficacité supérieure à l'Adéfovir en termes de suppression virale, de séroconversion de l'antigène HBe et de normalisation des taux d'ALAT. Cette meilleure efficacité est en partie due à la dose administrée du Tenofovir qui est plus élevée que celle de l'Adéfovir.

Même après un traitement à long terme, le Ténofovir n'entraîne pas de résistance, quelques mutations ont été décrites (Gupta et al. 2014). Il s'accompagne d'effets secondaires rénaux et osseux.

Analogues	Substrats	Mutation générées
Lamivudine	Cytosine	M204I/V; L180M
Adéfovir	Adénosine	A181V/T; N236T; I233V
Entécavir	Guanosine	I169T; T181G; S202I; M250V; M204I/V
Telvivudine	Thymidine	M204I; L180I/V; L180M; A181V/T; L229 W/V
Ténofovir	Adénosine	A181V; N236T

**Tableau 3:** Mutations générées par les différents analogues de nucléos(t)ides.

Tableau regroupant les analogues de nucléos(t)ides en spécifiant le type de substrat avec qui ils sont en compétition et le type de mutation qu'ils peuvent générer sur la polymérase virale (Figure adaptée de Gupta et al. 2014).

Une nouvelle molécule dérivée du Ténofovir est aussi actuellement disponible. Le Ténofovir alafenamide fumarate (TAF) est une pro-drogue du Ténofovir qui est biodisponible, stable dans le plasma et permet une bonne libération de sa forme active dans les hépatocytes et dans les tissus lymphoïdes. Ainsi comparé au TDF, le TAF est administré à une dose plus faible (25mg/jour) avec la même efficacité et réduit la toxicité rénale. Il présente une meilleure tolérance à long terme avec des effets secondaires moins importants. Il reste pour le moment non commercialisé en France (Murakami et al. 2015).

## 2 Les stratégies thérapeutiques actuelles

Des recommandations sur la gestion de l'infection par le VHB ont été élaborées par l'EASL en 2017 (Lampertico et al. 2017). Elles concernent entre autres des propositions sur la mise en œuvre des stratégies thérapeutiques.

Nous présenterons dans ce paragraphe les recommandations concernant le primo-traitement des patients adultes sans considérer les situations particulières (co-infections, grossesses, immunosuppression, greffes hépatiques...).

## 2.1 Les objectifs du traitement

Le principal objectif de ces nouvelles stratégies thérapeutiques est le contrôle prolongé de la réplication virale.

Plusieurs biomarqueurs peuvent être pris en compte (Lampertico et al. 2017) :

- ADN viral indétectable en qPCR dans le sérum
- La perte des antigènes HBe, avec ou sans séroconversion anti-HBe, chez les patients initialement positifs pour les antigènes HBe, traduit un contrôle immunologique partiel de l'infection chronique
- La normalisation des ALAT est une réponse biochimique obtenue chez la majorité des patient ayant une élimination à long terme de la réplication virale.
- La perte des antigènes HBs, avec ou sans séroconversion anti-HBs, traduit l'élimination de la réplication et de l'expression des protéines virales.

## 2.2 Les indications thérapeutiques

Les indications de traitements sont généralement les mêmes chez les patients positifs ou négatifs pour les antigènes HBe. Elles reposent essentiellement sur une combinaison de trois critères (Lampertico et al. 2017) :

- Le taux de virémie
- Le taux d'ALAT
- La gravité des lésions hépatiques

Différentes situations peuvent se rencontrer (Lampertico et al. 2017) :

- L'indication typique de traitement repose sur l'association d'une virémie supérieure à 2000 UI/ml, une élévation du taux d'ALAT au-dessus de la normale et/ou des lésions histologiques modérée à sévère quel que soit le statut des antigènes HBe.
- Tous les patients cirrhotiques avec une virémie positive doivent être traités quel que soit le taux d'ALAT.
- Les patients avec une virémie supérieure à 20 000 UI/ml et un taux d'ALAT deux fois supérieure à la normale devraient commencer un traitement quel que soit le degré de fibrose

- Les patients avec une infection chronique par le VHB positive pour les antigènes HBe associant un taux normal d'ALAT normal, une virémie élevée peut être traités s'ils sont âgés de plus de trente ans quel que soit le degré de fibrose.
- Les patients avec une infection chronique par le VHB négative ou positive pour les antigènes HBe, avec des antécédents familiaux de cirrhose ou de CHC et ceux présentant des manifestations extrahépatiques peuvent être traités même si tous les critères d'indications de traitement ne sont pas présents.

## 2.3 Traitement par les analogues nucléos(t)ides

Le traitement de référence quel que soit la gravité des lésions hépatiques est l'administration à long terme d'un analogue nucléos(t)ides induisant un faible niveau de résistance. Il est recommandé d'utiliser en monothérapie ETV, TDF et TAF après sa commercialisation. LAM, ADV et TBV ne sont plus recommandés dans le traitement de l'infection chronique (Lampertico et al. 2017).

## 2.4 Traitement par PEG-IFN

Le PEG-IFN alpha peut être considéré comme un traitement de première intention chez certains patients ayant une hépatite B chronique légère ou modérée et quel que soit le statut des antigènes HBe et avec des facteurs prédictifs de bonne réponse :

- Une charge virale faible.
- Un taux d'ALAT supérieur ou égale trois fois à la normale et
- Des patients jeunes.

La durée standard du traitement est de 48 semaines. Une prolongation du traitement peut être bénéfique chez certains patients infectés négatif pour les antigènes HBe. Il est possible d'identifier de façon précoce après 12 ou 24 semaines de traitements les patients qui présentent des risques d'échec élevé. Ces règles d'arrêt dépendent des génotypes et permettent de mieux personnaliser le traitement (Lampertico et al. 2017).

## 2.5 Combinaison de traitement

Les stratégies de combinaison ne sont pas complètement établies avec les analogues les plus récents. La combinaison d'analogues nucléos(t)ides associés entre eux, ou l'association d'un analogue nucléos(t)ide avec le PEG-IFN n'est pas recommandée en

première intention. Mais chez des patients sélectionnés, l'association PEG-IFN à analogues de nucléos(t)ides avec des stratégies « add-on » ou de « switch » pourraient augmenter l'effet sur l'antigène HBs. De la même façon, si la suppression virale est incomplète et en plateau sous ETV ou TDF, chez un patient compliant, des stratégies « add-on » ou « switch » sont envisageables (Lampertico et al. 2017).

## 2.6 Limite des stratégies actuelles

Aucune des stratégies envisagées ne permet d'obtenir la guérison complète de la maladie. Après l'arrêt des traitements même à long terme la reprise de la réplication virale est habituelle. Il a été montré dans les modèles de d'infection du canard et de la marmotte, que l'ADNccc devenait la forme prédominante de l'ADN viral après traitement à long terme par des analogues de nucléos(t)ides (Le Guerhier et al. 2001, 2000). Ils empêchent la formation de nouvelles molécules d'ADNccc mais ne permettent pas d'éliminer le pool préexistant (Massimo Levrero et al. 2018). Ceci explique la reprise de la réplication virale. La guérison complète de la maladie nécessite de nouvelles stratégies qui visent à irradiquer le pool d'ADNccc.

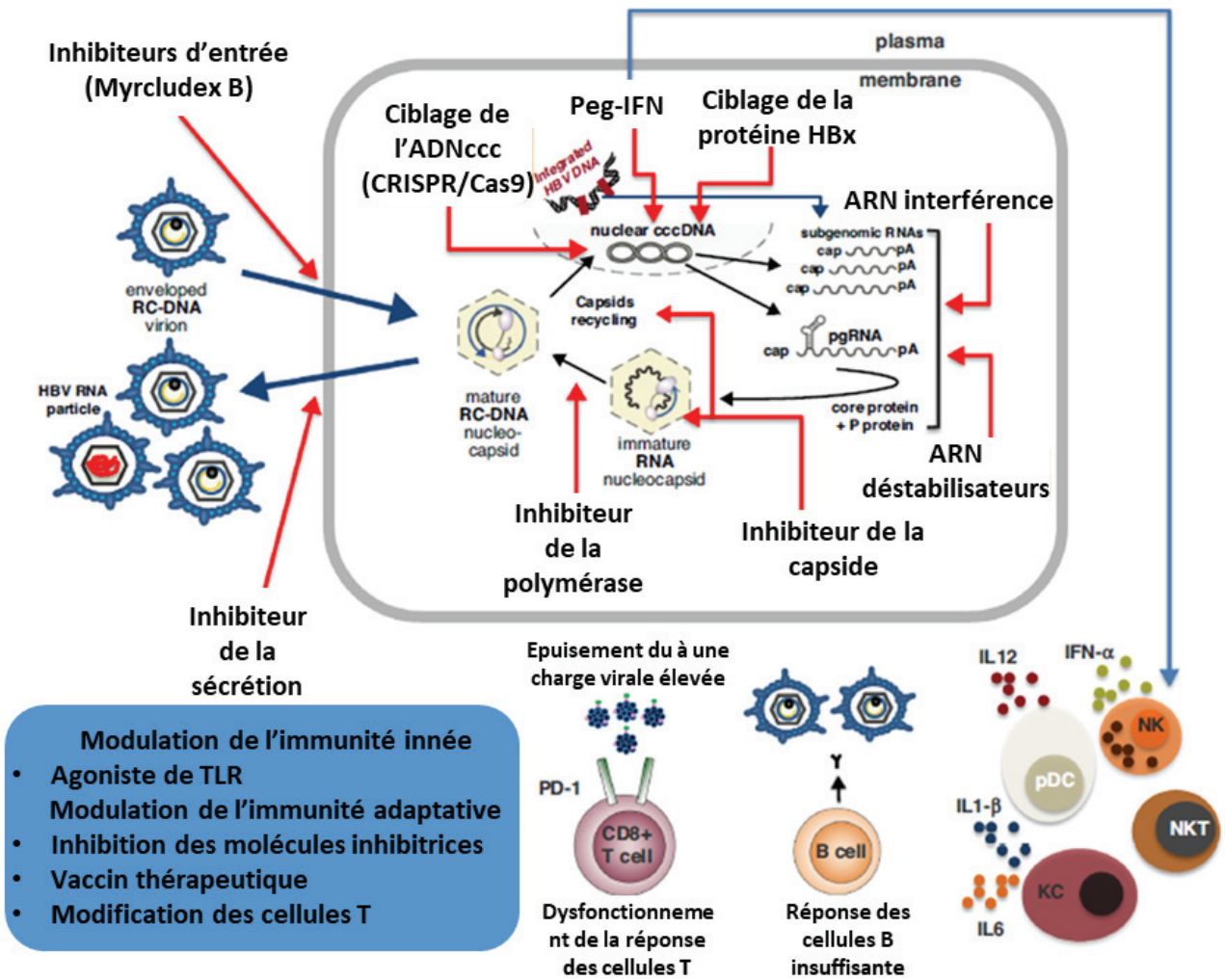


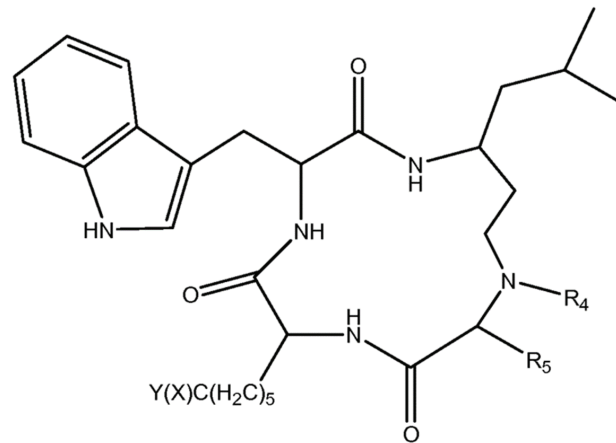
Figure 37 : Cycle viral du VHB et nouvelles cibles thérapeutiques. (Figure adaptée de Massimo Levrero et al. 2018).

## Partie 4 : Les nouvelles stratégies thérapeutiques pour cibler l'hépatite B

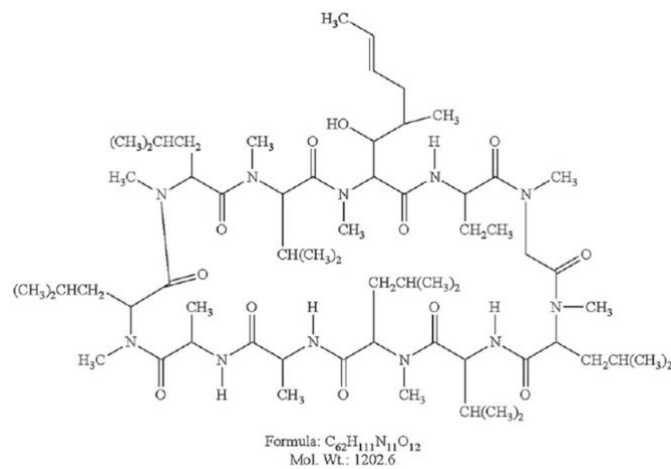
La guérison complète du VHB nécessite le contrôle de la persistance du génome viral et le contrôle du système immunitaire. Aucune des stratégies actuelles ne sont capables d'atteindre ces conditions. Il est donc indispensable de mettre au point des molécules innovantes qui auraient pour ambition de guérir l'hépatite B. Pour aboutir à ce résultat, il est nécessaire de créer un réseau de recherche associant tous les spécialistes de la maladie. Un programme pluridisciplinaire a été initié, en France, il y a quelques années : « HBV cure » et plus récemment au niveau international : « ICE-HBV ». Afin de mieux déterminer les objectifs de ces réseaux, trois formes de guérison ont été précisées (Zeisel et al. 2015; Revall et al. 2016; Lok et al. 2017) :

- La guérison complète. Elle associe un taux de HBsAg indétectable dans le sérum et une éradication de toutes les formes d'ADN du VHB, incluant l'ADNccc intrahépatique.
- La guérison fonctionnelle. Après arrêt des traitements, elle associe un taux de HBsAg et d'ADN du VHB indétectable dans le sérum de façon durable avec ou sans séroconversion des antigènes HBs. Elle s'accompagne d'une diminution du risque de défaillance hépatique et d'HCC. Mais il persiste un niveau résiduel d'ADNccc dans le noyau des hépatocytes.
- La guérison partielle. Après arrêt des traitements, elle associe à une virémie indétectable avec un taux de HBsAg persistant dans le sérum. Elle se caractérise aussi par la présence d'un niveau résiduel d'ADNccc dans le noyau des hépatocytes.

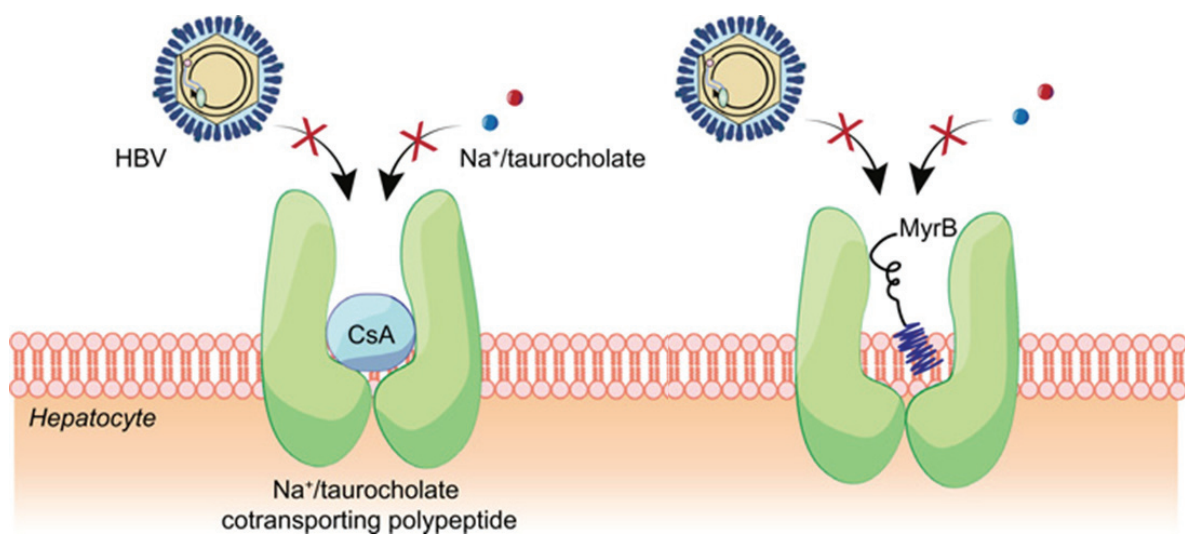
Le développement de nouveaux modèle précliniques *in vitro* et *in vivo* ainsi que la mise en place de techniques de biologie moléculaire plus sensibles ont permis de définir de nouvelles cibles et d'explorer de nouvelles stratégies afin de permettre d'obtenir la guérison de l'hépatite B selon ces définitions. Plusieurs stratégies sont envisagées afin de venir éradiquer l'ADNccc (**Figure 37**). Ces stratégies passent par un ciblage indirect au niveau des différentes étapes du cycle viral pour diminuer le pool d'ADNccc, ou bien par un ciblage direct de l'ADNccc.



**Figure 38 :** Structure du Myrcludex B



**Figure 39 :** Structure de la Cyclosporine A.  
(Figure adaptée de Feng et al. 2018).



**Figure 40 :** Mode d'action du Myrcludex B et de la Cyclosporine A sur le cycle viral du VHB  
Les deux molécules viennent se fixer sur le récepteur du virus, le NTCP, empêchant ainsi l'entrée du VHB dans la cellule (Figure adaptée de Verrier, Schuster, et Baumert 2017).



# 1 Ciblage indirect de l'ADNccc

Le ciblage indirect atteint des étapes du cycle du VHB qui pourraient empêcher la formation de l'ADNccc et le renouvellement du pool d'ADNccc. On distingue les agents permettant d'empêcher une nouvelle infection virale et les agents entraînant une diminution du pool de l'ADNccc.

## 1.1 Diminution de l'infection virale

### 1.1.1 *Les inhibiteurs d'entrée du VHB*

Le cycle de réinfection du VHB joue un rôle dans la persistance de la maladie. L'identification du NTCP comme récepteur d'entrée du VHB dans les hépatocytes a permis de développer des nouvelles stratégies permettant de bloquer l'entrée du virus. C'est le domaine preS1 des protéines de surfaces qui interagit avec la boucle extracellulaire du NTCP, ce qui permet l'endocytose du virus (Tang et al. 2017; Verrier, Schuster, et Baumert 2017).

Une des molécules identifiées permettant de bloquer l'interaction est le Myrcludex-B (**Figure 38**). Il s'agit d'un lipopeptide de 47 acides aminés qui mime le domaine preS1. Il bloque une nouvelle infection cellulaire de façon compétitive. Administré par voie sous-cutané, le Myrcludex entraîne une réduction de l'ADN du VHB et une normalisation du taux d'ALAT. Cette molécule a démontré une capacité à empêcher une réinfection par le VHB, mais aussi par VHD dans les modèles de culture cellulaire et dans les modèles de souris humanisées (Urban et al. 2014).

Une seconde molécule a été identifiée : la cyclosporine A (CsA) (**Figure 39**). Il s'agit d'un immunosuppresseur utilisé cliniquement au cours des allogreffes d'organes ou de tissus. Son application en virologie a montré son efficacité sur la réplication d'une variété de virus telle que VIH, VHC, le virus de la grippe... Dans le cas du VHB, la CsA inhibe l'activité du NTCP et comme le Myrcludex, elle empêche la fixation du NTCP avec la protéine de surface du virus (**Figure 40**). Des études sur la CsA sur le VHB ont montré une diminution de l'infection virale dans les modèles de culture cellulaire (Nkongolo et al. 2014).

La CsA peut être utilisée en monothérapie, mais aussi en combinaison avec des analogues nucléos(t)ides. Cette association augmenterait leur effet individuel et diminuerait

le pool d'ADNccc. Cependant, il n'y aucune certitude sur une efficacité suffisante pour éliminer les infections chroniques du VHB (Watashi et al. 2014). Les études sur la combinaison du Myrcludex avec le Ténofovir pendant 24 semaines ont montrés, chez des patients chroniquement co-infectés par le VHB et le VHD, une diminution des ADN du VHB dans le sérum de manière dose dépendante accompagnée d'une diminution voire une normalisation du taux d'ALAT chez certains patients. De nouveaux essais thérapeutiques sont en cours pour étudier l'effet de la combinaison du Myrcludex avec le PEG-IFN (Wedemeyer et al. 2018).

### 1.1.2 *Les inhibiteurs de la sécrétion virale*

Un des paramètres cliniques qui définit la guérison de l'hépatite B est l'élimination ou la séroconversion des antigènes HBs. De grandes quantités de HBs dans le foie ou dans la circulation entraînent une exposition prolongée des cellules T aux antigènes. Ceci provoque un épuisement fonctionnel de ces cellules qui se caractérise par une dérégulation des voies de signalisation. Une diminution de la sécrétion de ces antigènes permettrait de restaurer une activité immunitaire durable pour un meilleur contrôle de l'infection.

Ainsi les NAPs (Nucleic Acid Polymers) sont de plus en plus utilisés comme antiviraux. Il s'agit des oligonucléotides synthétiques qui incorporent des atomes de soufre pour une meilleure stabilité et qui peuvent interagir avec des glycoprotéines. Ces oligonucléotides permettent d'inhiber l'attachement viral au niveau des cellules (Vaillant 2016). Des études faites sur l'hépatite du canard ont montré que les NAPs bloquaient l'entrée du virus et empêchaient l'établissement de l'infection dans des modèles *in vivo* (Noordeen, Vaillant, et Jilbert 2013, 2013). Certains de ces composés ont été identifiés comme bloqueur de la sécrétion des antigènes HBs dans les hépatocytes infectés par le VHB (Vaillant 2016). Une étude a montré que le groupe de patients ayant reçu des NAPs en plus des analogues de nucléos(t)ides avait une meilleure diminution des antigènes HBs circulants, la moitié avait développé une séroconversion anti-HBs et une diminution de la virémie (Al-Mahtab, Bazinet, et Vaillant 2016).

Des études sur un traitement à long terme par des NAPs sont nécessaires afin d'évaluer leur efficacité virologique, leurs effets secondaires et leur résistance induite éventuellement.

## 1.2 Diminution du recyclage des virions

### 1.2.1 *Les inhibiteurs de la polymérase*

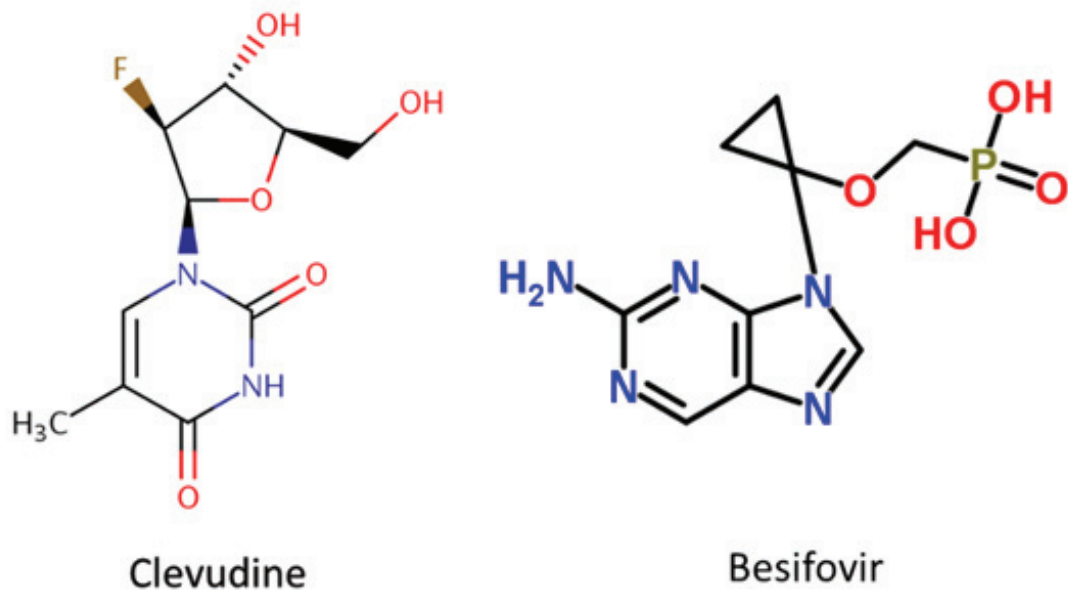
De nouveaux analogues de nucléos(t)ides sont envisagés.

La Clevudine est un analogue de nucléos(t)ide qui inhibe l'activité de la polymérase lors de l'amorçage de la transcription inverse (**Figure 41**). Cette molécule est actuellement autorisée en Asie, présente moins de problèmes de résistance comparé à l'Adéfovir mais possède une potentielle toxicité mitochondriale (Cho et al. 2017).

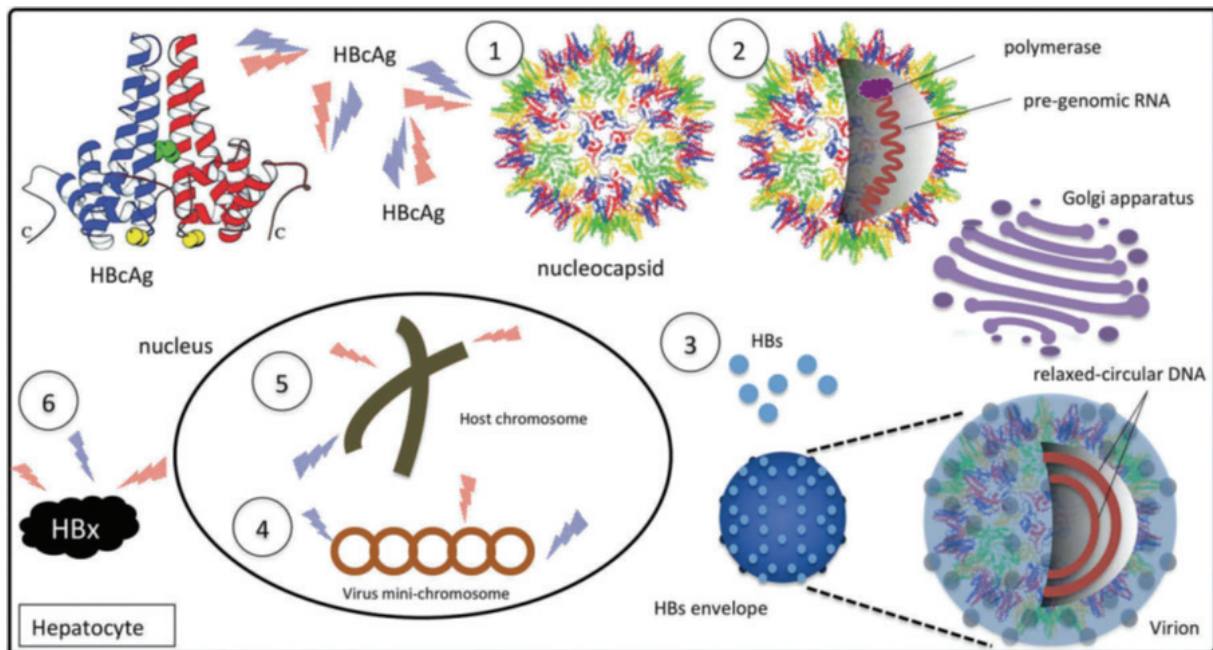
Le Besifovir est un nucléotide acyclique qui a une structure chimique similaire à celle de l'Adéfovir et du Ténofovir (**Figure 41**). Pour le moment cette molécule montre la même efficacité et la même tolérance que le TDF avec un effet peu établi sur l'ADNccc (Mak et al. 2018).

De nouvelles molécules d'analogues de nucléos(t)ides sous forme de pro-drogue sont en cours de développement (CMX-157, AGX-1009, lagociclovir). Il existe plusieurs avantages à l'utilisation de prodrogue tels l'augmentation de la demie-vie de la molécule et donc l'activité pharmacologique du médicament, une meilleure biodisponibilité et une plus faible toxicité. En effet les prodrogues ne peuvent être actives uniquement dans l'environnement possédant les enzymes nécessaires à son activation. Cependant, un traitement à long terme serait toujours nécessaire et la réduction de l'ADNccc serait principalement dépendant de la prolifération des hépatocytes (Soriano et al. 2017).

Parmi les inhibiteurs de polymérase, on distingue des inhibiteurs de la RNase H qui est un domaine de la polymérase et est crucial pour la réplication du VHB. Des criblages de molécules sont en cours afin de trouver le meilleur candidat qui pourrait être utilisé en combinaison avec des analogues de nucléos(t)ides (Tavis et Lomonosova 2015).



**Figure 41** : Structure des nouveaux inhibiteurs de la polymérase.  
(Figure adaptée de ChemSpider).



**Figure 42** : Structure et principales fonctions de la protéine Core du VHB.

La protéine core du VHB peut intervenir (1) dans la formation de la nucléocapside, (2) dans l'encapsidation de l'ARNpg, (3) dans la formation du virion et la sécrétion du virus, (4) dans la régulation de l'ADNccc, (5) dans l'interaction avec la réponse immunitaire de l'hôte et (6) dans la régulation de la protéine HBx (Figure de Mak et al. 2017).

### 1.2.2 *Les inhibiteurs de la nucléocapside*

La protéine Core est également ciblée comme nouvelle stratégie thérapeutique. Cette protéine multifonctionnelle joue un rôle important dans le cytoplasme lors du processus d'encapsidation et joue également un rôle dans le noyau sur la régulation épigénétique de l'ADNccc (Mak et al. 2017) (**Figure 42**).

Les molécules ciblant la nucléocapside sont souvent des modulateurs allostériques de la protéine Core (CpAM). Ces petites molécules altèrent les sous-unités des dimères de HBcAg provoquant un défaut dans la formation de la nucléocapside. Les CpAM peuvent être divisés en deux classes :

- Celles qui altèrent la formation de l'assemblage de la nucléocapside.
- Celles qui empêchent l'encapsidation de l'ARNpg.

Pour la première classe de CpAM, plusieurs molécules ont été identifiées. La première est le Bis-ANS qui inhibe l'assemblage de la capsid en induisant des forces ioniques qui modifient l'interaction des dimères de HBc. Aucune étude *in vivo* n'a été faite avec cette molécule. La deuxième est les HAP (Hétéroaryldihydropyrimidines) qui permet l'assemblage de la capsid en regroupant des polymères non-fonctionnels, menant ainsi à une nucléocapside non fonctionnelle. Cette molécule réduit l'ADN viral intrahépatique chez les souris transgéniques de manière dose dépendante avec une efficacité comparable à celle de la Lamivudine. Elle diminue également la concentration de HBcAg dans le cytoplasme. Peu de toxicité a été rapportée et l'arrêt de cette molécule montre un rebond de la réplication virale moins important que celle de la Lamivudine.

Pour la deuxième classe de CpAM, la molécule PPAs (Phenylpropenamides) a été identifiée. Cette molécule agit sur l'infektivité du VHB dans les modèles de culture cellulaire. Elle permet une bonne conformation de la nucléocapside mais n'est pas capable d'encapsider l'ARNpg, entraînant ainsi une accumulation de capsides vides, ce qui affecte la réplication virale.

Il a été montré que la protéine HBc avait un effet sur la régulation de l'ADNccc. L'effet des inhibiteurs de capsid sur cette étape du cycle viral a été montré *via* deux composés : HAP12 et sulfanilamides.

HAP12 tels que Bay 41-4109 et GSL-4 sont des molécules qui inhibent la transcription de l'ADNccc. L'analyse de la structure de ces molécules avec la protéine Core montre une interaction hydrophobique entre les deux composés au niveau de la partie C-terminale de la protéine Core, contribuant à un changement de conformation allostérique des sous-unités de la protéine. Dans les cellules HepAD38, les HAP12 réduisent l'acétylation des histones H3 qui sont fixés sur l'ADNccc et diminuent la présence de HBcAg sur l'ADNccc. Cette inhibition est plus importante lorsque la molécule est administrée pendant les étapes précoces de l'infection (L. Belloni et al. 2015).

Sulfanilamide est un autre groupe de molécules qui cible la formation de l'ADNccc en inhibant la conversion de l'ADNrc en ADNccc. Cependant, l'impact direct de cette molécule sur la protéine Core reste encore à démontrer.

Récemment, la molécule JNJ-632 a été identifiée. Il s'agit d'une Sulfamoylbenzamide avec une activité contre les génotypes A et D du VHB. Cette molécule permet la formation intacte de la capside du VHB mais réduit la quantité d'ARN intracellulaire, la sécrétion des antigènes, mais aussi entraîne une inhibition de la formation de l'ADNccc dans les PHH. Ces effets ont été observés lors d'une administration concomitante de la molécule et du VHB. Ces résultats suggèrent que les CpAM interfèrent avec les processus d'entrée, mais aussi post-entrée en amont de la formation de l'ADNccc (Berke et al. 2017). Deux autres molécules (JNJ-827 et JNJ-890) ont montré aussi leur efficacité sur l'inhibition de la transcription virale ainsi que sur l'établissement *de novo* de l'ADNccc (Lahlali et al. 2018).

Par leurs multiples modes d'action, ces molécules montreraient une meilleure efficacité par rapport aux analogues de nucléos(t)ides. Une combinaison entre les CpAM et les analogues de nucléos(t)ides ou PEG-IFN est également possible et pourrait empêcher l'amplification de l'ADNccc plus efficacement.

### 1.2.3 *Les inhibiteurs de la traduction du VHB*

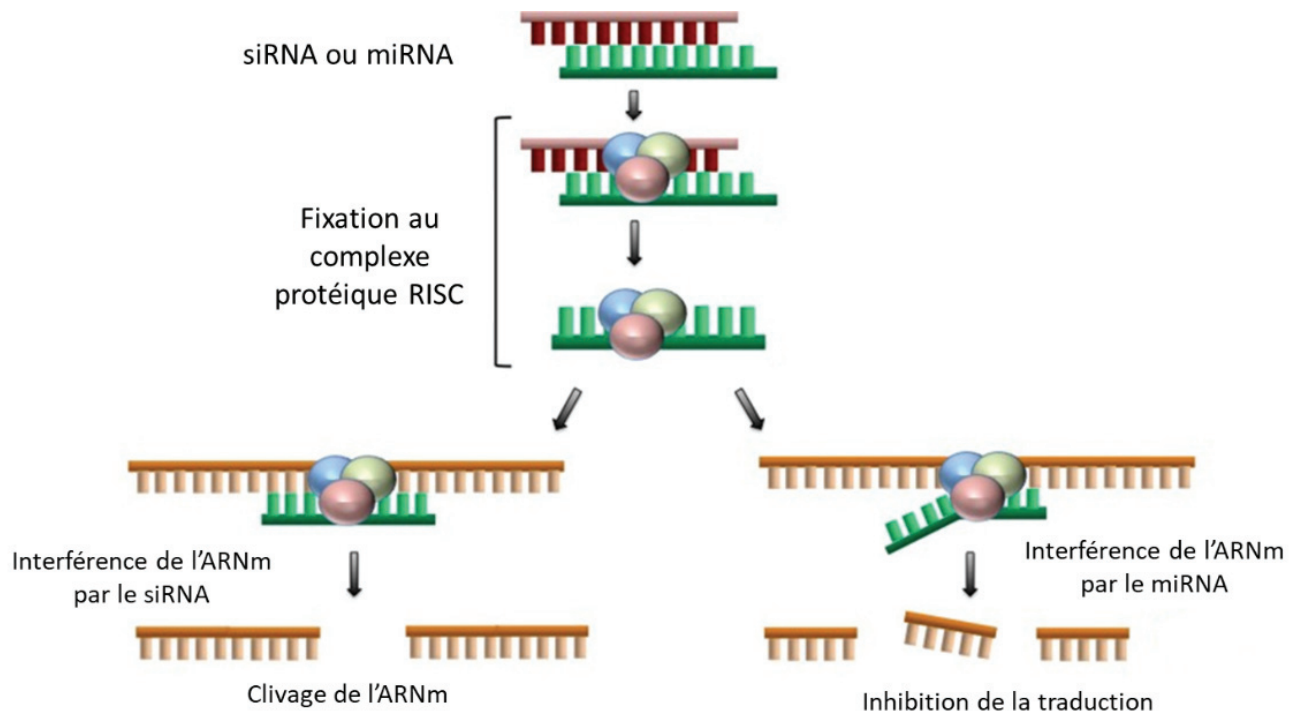
L'inhibition de la traduction passe par l'utilisation des ARN interférents pour bloquer la production des particules virales et donc la réplication.

Les ARN interférents sont des molécules qui vont inhiber la traduction et l'expression d'une protéine en venant directement cibler l'ARN messager. On distingue deux types d'ARN interférents : les microARN (miRNA) et les « small interfering RNA » (siRNA) (**Figure 43**).

- Les microRNA sont des ARN non-codants qui aident à la régulation de l'expression des gènes. Comme son nom l'indique, il s'agit d'un petit ARN de 2 à 8 nucléotides qui vient s'apparier avec l'ARN messenger ciblé. Les miRNA se fixent au complexe protéique RISC permettant la fixation sur l'ARN messenger pouvant avoir des mésappariements. Les miARN dérégulent la traduction et la stabilité de celui-ci.
- Les siRNA sont des ARN double-brins de 20 à 25 paires de bases qui se fixent par complémentarité à l'ARN messenger ciblé et qui entraînent sa dégradation. Les siRNA se fixent au complexe protéique RISC ce qui permet la reconnaissance, sans mésappariement, et le clivage de l'ARN messenger (Gish et al. 2015).

Plusieurs ARN interférents peuvent être utilisés pour bloquer la traduction des ARN viraux. L'avantage du génome du VHB est que tous les ARN possèdent la même extrémité ce qui rend plus facile la conception d'ARN interférents. Ces derniers ont été beaucoup étudiés dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Ebert et al. 2011). Cependant leur mode d'administration dans les modèles *in vivo* reste encore un défi. En effet, les siRNA sont majoritairement hydrophiles et chargés négativement, ce qui rend difficile leur transport dans le cytosol qui est l'endroit où réside le complexe permettant le clivage. Plusieurs méthodes ont été testées pour faciliter leurs transports notamment les nanoparticules, ou les DPC (dynamic polyconjugate) dans lesquels les siARN sont conjugués avec du cholestérol et co-injectés avec un peptide spécifique pour les hépatocytes (Rozema et al. 2007).

Il a été décrit, récemment un ARN interférent capable de venir cibler les ARNm transcripts du VHB avec une grande spécificité permettant de réduire la production des protéines, incluant la protéine HBs, avec un retour potentiel de la réponse immunitaire. Il en découle un ARNi thérapeutique, ARC-520, constitué de deux siRNA, conjugué à du cholestérol et au système DPC ce qui améliore l'incorporation aux hépatocytes (Schluep et al. 2017). L'ARC-520 est actuellement en phase clinique 2 avec des patients infectés chroniquement par le VHB et traités par analogues nucléos(t)ides en complément d'une étude sur des chimpanzés infectés chroniquement par le VHB. Les résultats montrent une diminution de l'antigène HBs dépendant du statut de l'antigène HBe et ont également permis de montrer l'implication de l'ADN du VHB intégré dans la production de l'antigène HBs (Wooddell et al. 2017).



**Figure 43 :** Mécanismes d'action des ARN interférents  
(Figure adaptée de (Ahmadzada, Reid, et McKenzie 2018))



## 1.3 Les immunothérapies

Les agents ciblant les facteurs de l'immunité innée et adaptative peuvent également jouer un rôle important dans l'élimination de l'infection par le VHB et le ciblage indirect de l'ADNccc.

### 1.3.1 *Réponses immunitaires innées*

Les « Toll like receptor » (TLR) sont une famille de récepteur qui jouent un rôle important dans l'immunité innée et adaptative de nombreux pathogènes (Aderem et Ulevitch 2000; Bertoletti, Tan, et Koh 2017). Ainsi, la génération d'agonistes pouvant activer ces récepteurs serait une des stratégies pour améliorer la réponse anti-VHB. GS 9620 est une molécule reconnue pour activer le TLR 7 (Gane et al. 2015). Il a été montré que cette molécule pouvait induire une disparition prolongée de l'ADN du VHB dans le sérum et dans le foie de chimpanzé (Lanford et al. 2013). Une étude sur des patients infectés chroniquement montre que cette molécule permet aussi l'activation du gène régulé par l'IFN, ISG15, mais n'a aucun effet antiviral significatif (Janssen et al. 2018). Ainsi, le TLR7 serait une cible stratégique à développer pour le contrôle et l'élimination du VHB.

D'autres cibles peuvent être envisagées. En effet, il a été montré que la réplication de HBV était sensible à la stimulation directe de TLR1/2, TLR2/6, TLR3, TLR4, RIGI/MDA5 et STING. Parmi les ligands testés dans des PHH et dans des cellules HepaRG différenciées, c'est la stimulation des TLR1/2 et TLR3 qui ont montré une plus grande efficacité dans la réduction des paramètres viraux permettant une activation des hépatocytes et des cellules immunitaires (Julie Lucifora et al. 2018).

La stimulation de ces récepteurs permettrait un meilleur contrôle du système immunitaire pouvant empêcher la ré-infection des cellules et donc diminuer le pool d'ADNccc.

### 1.3.2 *Réponses immunitaires adaptatives*

Une autre stratégie utilisée est le ciblage des cellules T. Lors d'une infection chronique par le VHB, ces derniers présentent une activation prolongée qui génère un dysfonctionnement en induisant des molécules inhibitrices. Deux stratégies peuvent être envisagées pour améliorer la réponse des cellules T : la première consiste à stimuler les cellules T défectives et la seconde à modifier des cellules T spécifiques du VHB (**Figure 44**).

Les thérapies basées sur la stimulation des cellules T portent sur l'inhibition des récepteurs inhibiteurs des cellules T tels que PD-1 ou bien sûr des vaccins thérapeutiques (Rao et al. 2017; Shire 2017).

Des études *ex vivo* sur le blocage de PD-1 ont montré une amélioration de la réponse antivirale des cellules T (Fiscaro et al. 2010; Tzeng et al. 2012). Ce type de thérapie a été utilisé avec succès sur des tumeurs malignes solides telles que le cancer du poumon ou bien le cancer du rein, mais peu de résultats sont disponibles sur des patients infectés chroniquement par le VHB (Daud et al. 2016).

Quelques essais cliniques ont été réalisés avec les vaccins thérapeutiques. Le principe de cette thérapie est d'augmenter la quantité et le fonctionnement antiviral des cellules T en utilisant différents composés antigéniques du VHB et en activant les cellules présentatrices d'antigènes. Ce type de vaccin a montré une certaine efficacité *in vitro* et dans les modèles animaux (Kosinska et al. 2013; Michel et al. 2001). Il a été développé un vaccin thérapeutique basé sur des adénovirus, le TG1050, qui code trois antigènes du VHB : la Core, la polymérase et la protéine de l'enveloppe. Dans les modèles de souris, ce vaccin thérapeutique a montré une réponse durable des cellules T mémoire contre le VHB. Une réduction de HBsAg et de l'ADN du VHB a été observée dans ces souris ce qui ne permet pas néanmoins d'éliminer l'infection.

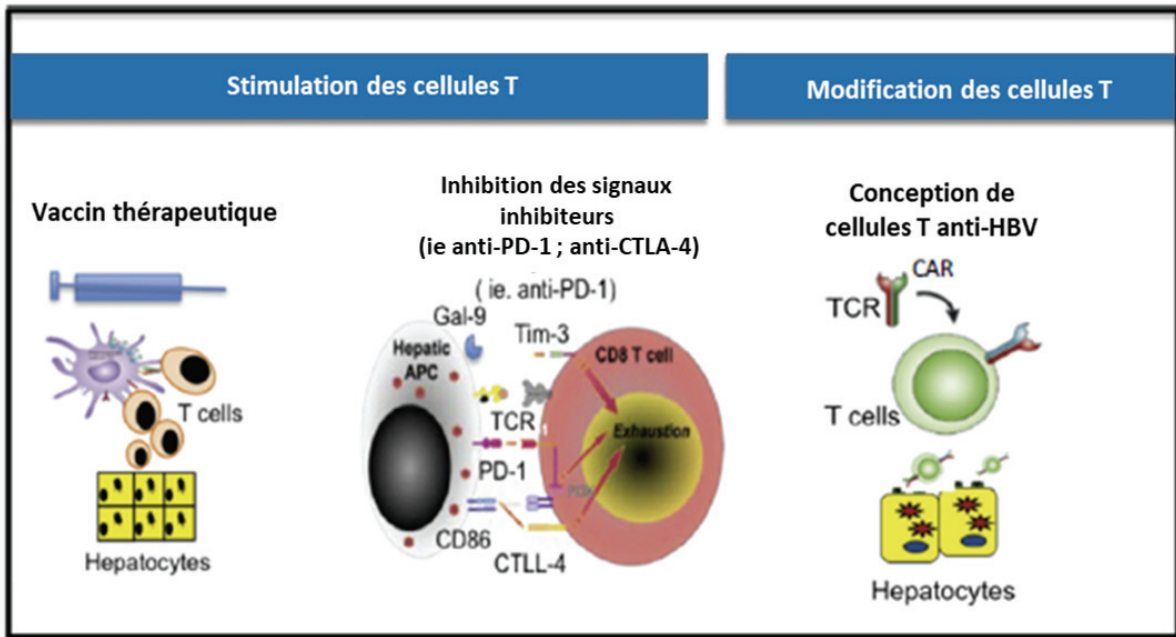
La seconde stratégie est de modifier les cellules T. Chez les patients atteints d'une hépatite B chronique, les cellules T sont dysfonctionnelles et les thérapies basées sur leur stimulation, peuvent être peu efficaces (Koh et Bertolotti 2015). L'utilisation de cellules T spécifiques du VHB a déjà été réalisée chez des patients atteints de leucémie et d'infection par le VHB (Ilan et al. 1993). Des cellules T spécifiques du VHB ont été construites en utilisant des récepteurs antigéniques chimériques conçus à partir d'anticorps spécifique du VHB ou de leucocytes humains de classe I ayant uniquement des récepteurs spécifiques du VHB (Bohne et al. 2008; Maini et Gehring 2016). L'efficacité de ces cellules a été montrée dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. L'inconvénient majeur de cette thérapie est la difficulté de production de ces cellules pour une utilisation clinique. Celle-ci est, en effet, strictement réglementée et nécessite un laboratoire spécialisé avec du personnel qualifié (June, Blazar, et Riley 2009; Kaiser et al. 2015).

L'efficacité des cellules T modifiées a également été montrée dans des cellules HepG2-NTCP et dans un modèle de souris humanisées. Dans ce cas, l'ARNm du récepteur TCR des cellules T spécifique du VHB a été transfecté dans des cellules T primaire au repos sans la nécessité d'une pré-activation et une culture *in vitro*. Ces cellules T reprogrammées produisent un effet antiviral directement sur les cellules infectées par l'activation du complexe intracellulaire LTBR/APOBEC. Ces cellules ont montré une diminution de 64% de l'ADNrc du VHB et 80% de réduction de l'ARNpg et de l'ADNccc dans les cellules HepG2-NTCP et une réduction de 50% dans les souris humanisées sans le déclenchement d'une réponse inflammatoire (Koh et al. 2018).

En effet, il est aussi important de prendre en compte le risque d'aggravation d'une inflammation hépatique. Une action trop importante du système immunitaire peut entraîner des dommages hépatiques qu'il est difficile de prévoir.

Enfin, une étude récente sur le génotypage du profil d'expression gène chez des patients ayant des cellules T dysfonctionnelles comparé à des patients ayant des cellules compétentes a permis l'identification de gène pouvant expliquer l'épuisement de ces cellules.

Il a été montré un dysfonctionnement de nombreux gènes cellulaires impliqués dans le contrôle énergétique et dans le métabolisme. Parmi eux, les gènes de la mitochondrie semblent être les plus déficients. Une restauration de l'activité mitochondriale par des agents anti-oxidants permettrait la reconstitution fonctionnelle des cellules T chez des patients infectés chroniquement. Ainsi le ciblage de la mitochondrie représente une nouvelle stratégie pour la restauration des cellules T et pour traiter les infections chroniques par le virus de l'hépatite B (Fisicaro et al. 2017).



**Figure 44 :** Stratégies envisagées pour l'immunodulation des cellules T par stimulation ou par modification. (Figure adaptée de Bertoletti, Tan, et Koh 2017).

## 2 Ciblage direct de l'ADNccc

### 2.1 La formation de l'ADNccc

Les mécanismes moléculaires de la conversion de l'ADNrc en ADNccc sont encore peu connus. Cependant un ADNrc déprotéinisé (DP-rcDNA) a pu être identifié. Celui-ci est retrouvé spécifiquement dans les cellules infectées et agit comme un intermédiaire de la formation de l'ADNccc. Ces caractéristiques en font une nouvelle cible thérapeutique pour inhiber l'ADNccc (Tuttleman, Pourcel, et Summers 1986). Les molécules de sulfonamide (DSS) ont montré un effet sur la formation et la maintenance de l'ADNccc sur des cellules HepDE19 (lignée cellulaire produisant des antigènes HBe dépendamment de l'ADNccc). Elles agissent comme co-inhibiteur de la production de l'ADNccc entraînant une diminution du DP-rcDNA. Ces composés auraient un effet uniquement s'ils sont administrés au début de l'infection (Cai et al. 2012).

### 2.2 Dérégulation épigénétique

L'ADNccc est un minichromosome, il est soumis aux mécanismes de régulation épigénétique. La fixation des histones H3 et H4 hyperacétylés sur l'ADNccc est corrélée avec une haute réplication virale chez les patients infectés par le VHB (Pollicino et al. 2006). Une stratégie serait de cibler ces mécanismes afin d'empêcher la réplication virale. L'IFN joue un rôle dans le ciblage indirect de l'ADNccc en réduisant l'acétylation de ces histones et la réplication virale (Laura Belloni et al. 2012a). La compréhension des mécanismes de régulation épigénétiques de l'ADNccc est un enjeu pour développer des traitements qui affecteront la réplication virale.

D'autres éléments interviennent dans ces mécanismes et notamment la protéine Core dont sa présence sur l'ADNccc a été démontrée dans différentes études (C. T. Bock et al. 2001). La protéine Core fixerait les îlots CpG sur l'ADNccc ce qui aurait un impact sur l'accessibilité de l'ADNccc aux différentes régulations épigénétiques (Guo et al. 2011). Bien que le rôle de HBc sur l'ADNccc reste encore controversé, empêcher la fixation de la protéine Core ou sa formation aurait un impact sur le cycle viral.

L'HBx joue un rôle essentiel dans le maintien de l'ADNccc. Des études ont montré que l'absence de la protéine HBx empêchait la réplication dans des modèles de cultures de cellules primaires des hépatocytes et dans les souris humanisées (Julie Lucifora et al. 2011).

Des études de CHIP ont montré que la fixation de la protéine HBx sur l'ADNccc induit le recrutement de protéines telles que SETDB1 qui permettent la condensation de l'ADNccc. L'HBx interagit également avec des répresseurs de la transcription empêchant leur fixation sur l'ADNccc. Plus récemment, il a été aussi découvert l'implication de HBx dans la dégradation de Smc5/6 empêchant la suppression de la transcription de l'ADNccc (Decorsière et al. 2016). Ainsi cibler la protéine HBx serait un atout majeur pour développer un traitement antiviral impactant l'ADNccc.

La transcription de l'ADNccc peut être aussi inhibée par des cytokines. L'IL-6 permettrait de diminuer la transcription de l'ADNccc en réduisant les niveaux des facteurs de transcription (HNF1 alpha et HNF4 alpha) à travers l'activation des voies de signalisation des MAP kinases. Il en résulte que la diminution de la fixation de HNF1 alpha et HNF4 alpha sur l'ADNccc s'accompagne de la relocalisation de la fixation de STAT3 de l'ADNccc sur les gènes cellulaires cibles de l'IL-6 (Palumbo et al. 2015).

L'IFN peut également avoir un rôle dans la régulation de l'ADNccc en modulant sa transcription. De nombreuses modifications activatrices sur le minichromosome du VHB peuvent être réduites en présence de l'activation du système immunitaire inné. Cela suggère que la régulation épigénétique de l'ADNccc pourrait être une cible thérapeutique (Laura Belloni et al. 2012a).

## 2.3 Dégradation de l'ADNccc

### 2.3.1 *Rôle de l'IFN et APOBEC*

Plusieurs cibles peuvent être envisagées. Il a été montré que l'IFN pouvait activer une cytidine déaminase : « l'apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3 », (l'APOBEC3B). Cette protéine modifie la cytidine en uracile et introduit un codon stop. Son implication dans la réplication virale a été démontrée pour le VIH. Dans le cas du VHB, il semblerait qu'à haute concentration, l'IFN entraînerait une surexpression d'APOBEC A3 et 3B qui co-localisent et interagissent directement avec la protéine Core du VHB dans les hépatocytes infectés. Le complexe APOBEC et Hbc sont transportés dans le noyau où ils sont en contact étroit avec l'ADNccc. La désamination de l'ADNccc par APOBEC se fait lors du passage transitoire de l'ADNccc en simple brin pendant l'étape de transcription. La présence d'un uracile sur l'ADNccc entraîne la reconnaissance de celui-ci par des protéines cellulaires

menant ainsi à sa dégradation. Un tel traitement pourrait être combiné avec des analogues de nucléos(t)ides afin d'empêcher le renouvellement de l'ADNccc (Julie Lucifora et al. 2014).

### 2.3.2 *Action des nucléases*

La meilleure des stratégies thérapeutiques pour éradiquer et inactiver totalement l'ADNccc, est de reconnaître directement cet ADN et de cibler ses propriétés fonctionnelles et structurales. Celles basées sur le génome éditng sont de plus en plus développées dans divers domaines. Le génome éditng est fondé sur l'utilisation de nucléases. Ce sont des enzymes de restriction modifiées qui ont un domaine de fixation à l'ADN et un domaine capable de générer des cassures double-brin (DSB) (**Figure 45**).

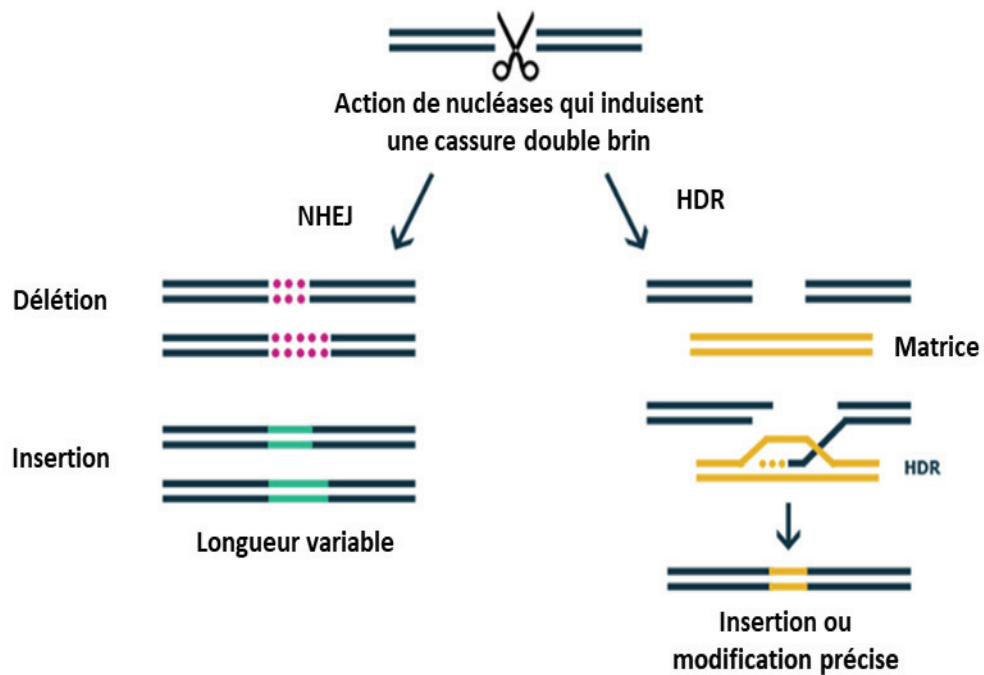
La cassure générée par ces systèmes sera soumise aux mécanismes de réparation de l'ADN. Le premier mécanisme de réparation : la jonction d'extrémité non-homologue (NHEJ pour Non Homologous End-Joining). Il s'agit d'un système non-conservateur qui permet directement la ligation des extrémités sans matrice homologue dans le milieu, ce qui conduit à un changement de l'information génétique correspondant généralement à une délétion.

Ce mécanisme fait intervenir une protéine, la ku70/80, qui va interagir avec les extrémités des brins cassés. Cette protéine possède deux activités :

- Une activité nucléase qui élimine les parties endommagées lors de la cassure.
- Une activité qui recrute la protéines DNA-PK qui va engendrer la ligation des extrémités des brins.

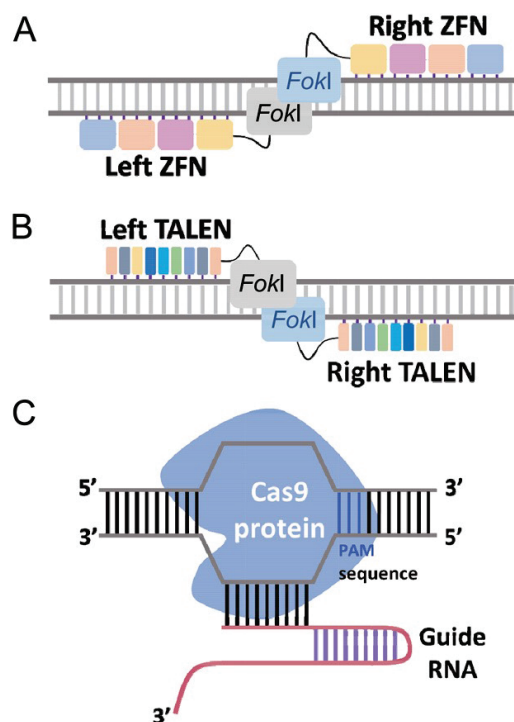
Le second mécanisme de réparation : la réparation homologue direct (HDR pour Homology direct repair). Il repart la lésion double brin avec une séquence homologue présente dans le milieu (Zaboikin et al. 2017).

Ce mécanisme fait intervenir d'abord un complexe protéique qui élimine l'extrémité des brins cassés de quelques nucléotides générant des extrémités simples brins. Un second complexe protéique intervient alors pour insérer des séquences présentes dans le milieu par le système de recombinaison possédant la modification souhaitée.



**Figure 45 :** Mécanismes de réparation de l'ADN après cassure double brin

Le mécanisme de recombinaison non homologue (NHEJ) permet la réparation de la cassure générant des délétions ou l'insertion de nucléotides. Le mécanisme de recombinaison homologue (HDR) permet l'insertion d'une séquence si celle-ci est dans le milieu (Figure adaptée de « DNA Repair – Emendo » s. d.).



**Figure 46:** Les principales nucléases utilisées pour le génome editing

A) Les Nucléases en doigt de Zing (ZFN) sont constituées de deux domaines, un permettant la cassure (FockI) et l'autre la fixation. B) Les Nucléases TALEN sont également constituées d'un domaine permettant la cassure (FockI) d'un autre permettant la fixation. C) Le système CRISPR/Cas9 est constitué d'une protéine Cas9 et de l'ARN guide (Figure de la publication de Shim et al. 2017).



L'utilisation du génome éditant comme outil thérapeutique, contrairement à la thérapie par expression de gène transitoire, peut générer un effet permanent. Actuellement, une douzaine d'essais cliniques utilisant le génome éditant sont en cours incluant les essais *in vivo* et *in vitro*. Cependant, il existe plusieurs lignes de conduite à respecter pour le contrôle de la qualité, la sécurité et l'efficacité du traitement. Il existe trois principales nucléases pour le génome éditant (Gaj, Gersbach, et Barbas 2013) (**Figure 46**):

- Nucléase Zinc Finger
- Nucléase TALEN
- CRISPR associé à la nucléase Cas

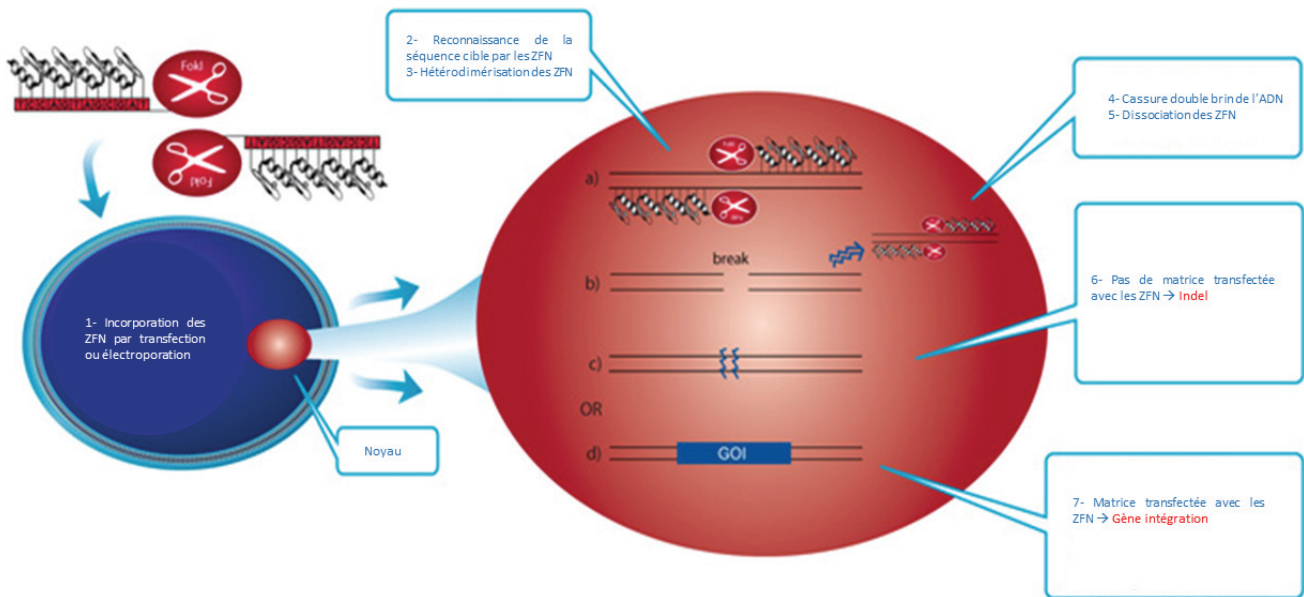
### 2.3.2.1 Zinc Finger (ZFN)

C'est la première nucléase à être utilisée pour la modification des gènes. Ce système combine un domaine de fixation à l'ADN, la protéine Zinc Finger, et un domaine nucléase FokI qui est une enzyme de restriction. Ainsi, chacun de ces domaines peut être isolé pour être optimisé de façon indépendante.

Le domaine protéique Zinc Finger possède des régions « Cys2-His2 fingers » de trente acides aminés capables de se fixer à un atome de Zinc pour former « un doigt de Zinc » et dont chaque doigt va reconnaître trois paires de bases de l'ADN. Ces régions peuvent s'associer en dimères pour augmenter la zone de clivage. Ainsi, plusieurs séquences différentes peuvent être ciblées *via* l'assemblage de ces dimères.

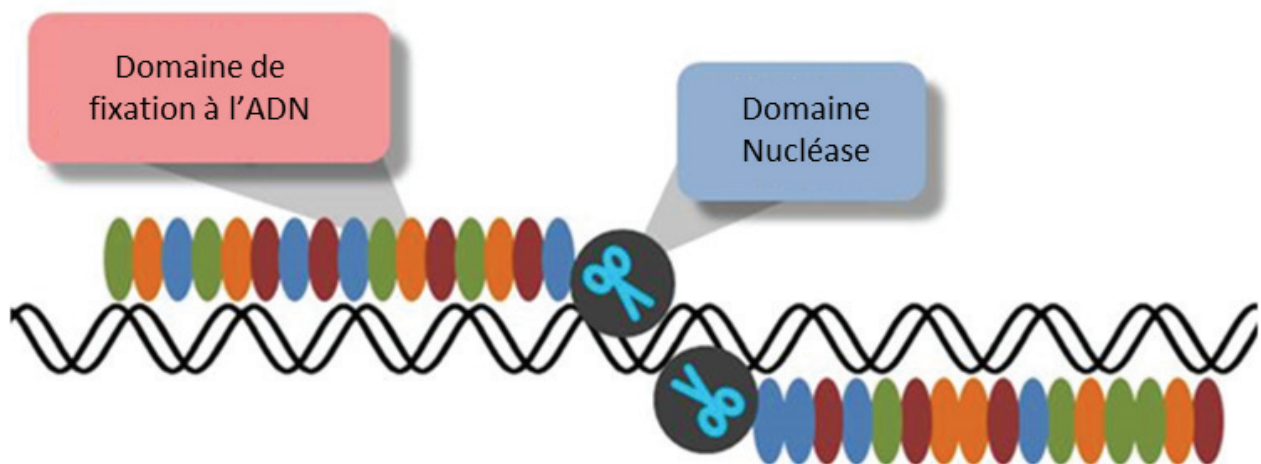
Le domaine FokI peut également se dimériser pour permettre le clivage de l'ADN. Le clivage ne peut avoir lieu que si ce domaine se trouve à proximité du doigt de Zinc. Ce système montre une grande spécificité puisqu'il nécessite la fixation des deux domaines sur les brins opposés de l'ADN cible pour permettre le clivage (Bibikova et al. 2001).

C'est en 1996 que le premier système ZFN fut créé comme une enzyme de restriction chimérique montrant une efficacité *in vitro* (Maeder et al. 2008). L'efficacité de ZFN comme génome éditant a été démontrée d'abord en 2001 montrant sa capacité à recombinaison l'ADN dans les oocytes de *Xenopus*, puis en 2006 sur la drosophile (Beumer et al. 2006). C'est à partir de là que le ZFN a été construit et modifié afin de pouvoir cibler une variété de gènes dans différents modèles organiques (**Figure 47**).



**Figure 47** : Mode d'action des nucléases en doigt de zinc (ZFN)

Après incorporation des ZFN par transfection ou électroporation, les nucléases se hétérodimérisent pour permettre la cassure double brin du gène cible. La réparation du brin se fait via le système de réparation de l'hôte par le mécanisme de NHEJ ou HDR (Figure adaptée de Sigma aldrich).



**Figure 48** : Mode d'action des nucléases TALEN

Elles possèdent une domaine nucléase qui permet la coupure et un domaine de reconnaissance à l'ADN (Figure adaptée de « TAL Effector Nucleases - TALE & TALENs - CRISPR-RGEN, TALEN & ZFN - Products » s. d.).

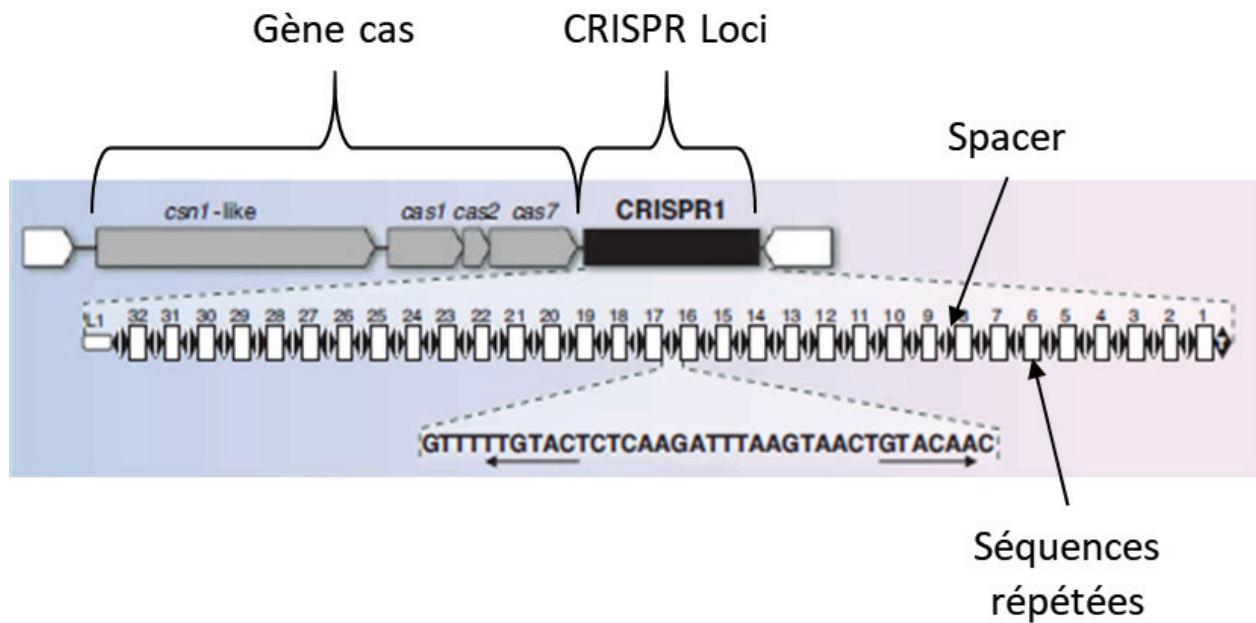
Ce système a été plus récemment utilisé pour cibler le génome de l'Hépatite B (Cradick et al. 2010). Son effet anti-VHB est décrit uniquement comme une preuve de concept pour perturber le génome viral du VHB dans des modèles de cultures cellulaires. Après la transfection du système par un vecteur AAV ciblant respectivement la polymérase et le gène X, la polymérase et le gène core, la polymérase uniquement, seulement 9%, 34% et 38% d'effets ont pu être observés. L'effet sur l'ADNccc n'a pas pu être validé (N. D. Weber et al. 2014). Il s'agit d'un système difficile à mettre en place puisqu'il nécessite une modification complète de la protéine lorsque l'on souhaite changer de séquence cible. Plusieurs études ont montré une toxicité cellulaire pour certains de ces ZFN.

### 2.3.2.2 TALEN

Les nucléases « Transcription Activator-Like Effector Nuclease » (TALEN) ont été conçues à partir de la protéine TALE et d'une enzyme permettant le clivage de l'ADN, généralement FokI (**Figure 48**). La protéine TALE a d'abord été retrouvée dans le gène de la bactérie *Xanthomonas* et contient un domaine de fixation à l'ADN constitué de 33 à 35 acides aminés répétés. La spécificité de la protéine est déterminée par deux acides aminés hypervariables qui sont connus sous le nom « Repeat-Variable Diresidues » (RVD) et permettent de reconnaître la séquence nucléotidique cible (Christian et al. 2010).

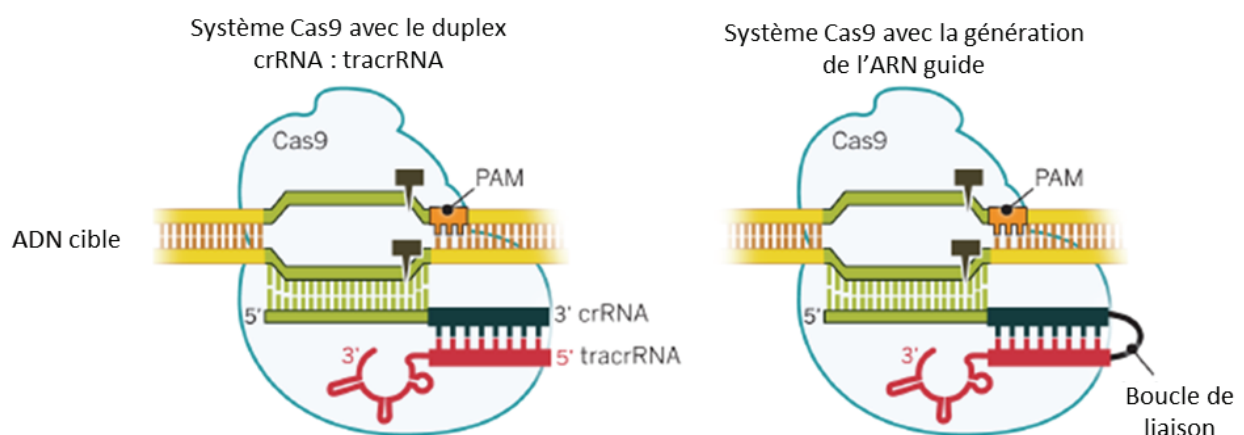
Leur effet anti-VHB a montré une efficacité sur l'ADNccc dans des modèles de culture cellulaire et une inhibition de la réplication virale dans les modèles murins (Bloom et al. 2013). Une étude réalisée sur les HepG2.2.15 a montré une perturbation de l'ADNccc de 12% et 35% lorsque les TALENs ciblent soit la protéine de surface soit la protéine Core sans toxicité cellulaire (Bloom et al. 2013). Leur efficacité a aussi été démontrée dans des modèles de souris par injection hydrodynamique, avec une réduction des antigènes HBs dans le sérum et l'observation de mutation sur l'ADN viral. L'effet des TALENs sur l'ADNccc a été confirmé dans des cellules HuH7 transfectées avec un ADNccc linéaire ciblant la région de la polymérase et la protéine Core. Une étude sur un effet synergique avec l'IFN alpha a montré une réduction de 60% du nombre de copies d'ADNccc dans les cellules HepG2.2.15 (Chen et al. 2014).

Malgré l'efficacité de ce système, il présente des problèmes similaires à ceux observés avec les ZFNs ce qui a conduit à l'utilisation du système CRISPR/Cas 9.



**Figure 49 :** Organisation du système CRISPR/Cas dans la bactérie.

Il contient, le CRISPR loci avec les séquences répétées le « spacer » et les gènes pour les protéines Cas (Figure adapte de Horvath et Barrangou 2010).



**Figure 50 :** Adaptation du système CRISPR/Cas comme outil génétique.

Schéma représentant la modification du système CRISPR/Cas9 de la bactérie pour l'utilisation en génome éditant. Le crRNA et le tracrRNA ont été associés pour former un seul ARN guide (Figure de Doudna et Charpentier 2014).

### 2.3.2.3 CRISPR/cas9

#### Les origines du système

Le système « Clustered regularly interspaced short palindromic repeats » (CRISPR) a été d'abord retrouvé dans le système immunitaire de la bactérie pour pouvoir se défendre contre les plasmides et les bactériophages. CRISPR est une famille d'ADN répétitifs retrouvée dans 90% du génome des *Archées* et 40% du génome de la bactérie. La première découverte de ce système a été faite en 1987 dans le génome d'*E.coli*. Le loci CRISPR consiste en plusieurs séquences répétitives séparées par une séquence variable qu'on appelle « spacer », correspondant généralement à la séquence cible du phage ou du plasmide et qui se trouve à proximité du gène cas (**Figure 49**). La taille des séquences répétées varie entre 23 et 47 paires de bases tandis que le « spacer » lui varie entre 21 et 72 paires de bases. Les séquences répétées sont généralement très conservées entre les espèces microbiennes. La plupart de ces séquences sont palindromiques, ce qui les stabilisent et leur donnent une structure secondaire très conservée. Le gène cas quant à lui, code de nombreuses protéines qui portent un domaine fonctionnel (nucléase, hélicases, polymérase...). Ainsi CRISPR en combinaison avec une protéine cas forme le système CRISPR/Cas (Horvath et Barrangou 2010).

La formation de ce système passe par trois étapes (S. Makarova et al. 2011) :

- L'insertion de la séquence étrangère comme « spacer » dans le loci CRISPR. Après une première infection, la séquence va être intégrée dans le loci et va rester en mémoire pour une nouvelle infection. Ainsi, la bactérie pourra reconnaître spécifiquement la séquence du phage.
- La transcription de la séquence « spacer » en un précurseur qu'on appelle le pré-crRNA, qui sera maturé pour former le crRNA qui contient une séquence répétée et la séquence « spacer » spécifique du phage. La maturation du crRNA dépend également d'une petite séquence située en amont : le tracrRNA (crRNA trans activé)
- L'association du crRNA et de la protéine Cas qui va venir cliver la séquence cible.

Chez la bactérie, il existe trois différents types de systèmes CRISPR/Cas nommés I, II, III qui possèdent des caractéristiques différentes (S. Makarova et al. 2011):

- Le type 1 et 2 nécessitent la reconnaissance d'une séquence « Protospacer adjacent motif » (PAM). Il s'agit d'une séquence spécifique sur l'ADN étranger pour permettre la fixation du complexe qui est située en amont de la séquence.
- Le type 1 et 3 qui impliquent l'intervention de plusieurs protéines Cas pour fonctionner.
- Le type 2 nécessite qu'une seule protéine pour permettre le clivage et dont le fonctionnement a été détourné pour le génome éditant à partir du système de *Streptococcus pyogenes* (Doudna et Charpentier 2014).

### Utilisation du système pour le génome éditant

Quelques modifications ont été apportées au système de base pour permettre son utilisation comme outil génétique (Doudna et Charpentier 2014). Le tracrRNA et le crRNA mature sont modifiés pour ne former qu'un seul ARN guide possédant deux caractéristiques (**Figure 50**):

- Une séquence de deux nucléotides située en 5' qui reconnaît la séquence cible étrangère.
- Une structure en double brin à l'extrémité 3' qui permet la fixation à la protéine Cas9.

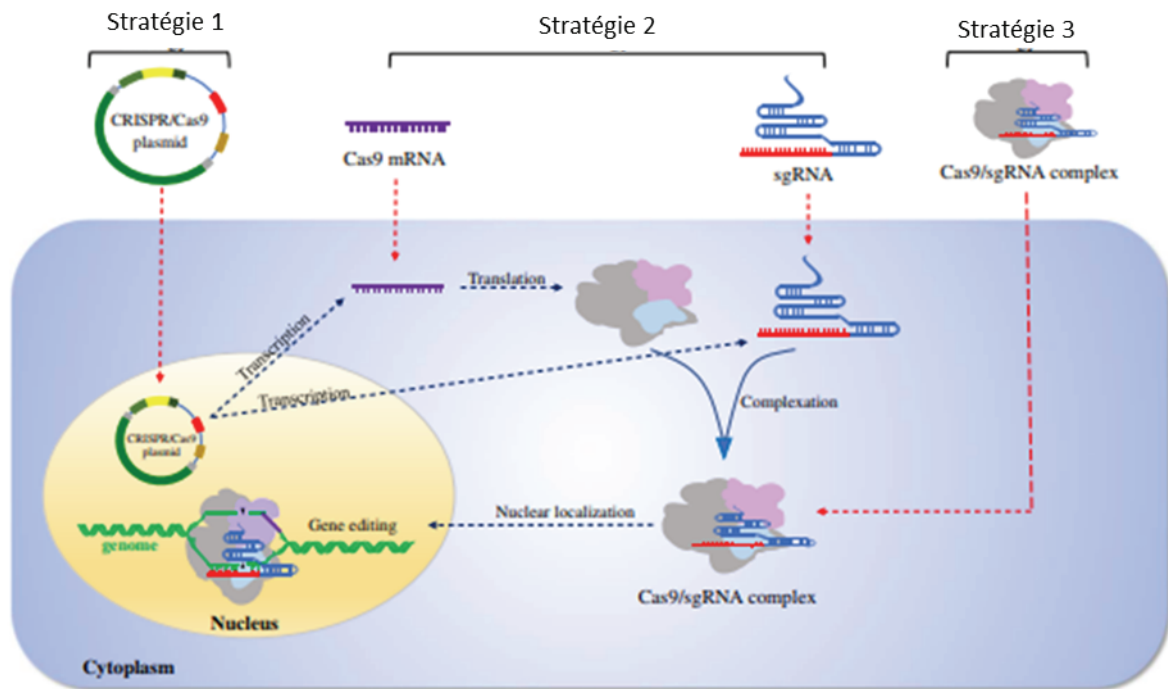
La protéine Cas9 est une protéine multifonctionnelle qui possède deux domaines nucléases : HNH et RuvC-Like. Cette protéine utilise son domaine HNH pour permettre le clivage du brin d'ADN qui est complémentaire de la séquence cible alors que le domaine RucV-like clive le brin opposé. Une mutation sur l'un de ses domaines entraîne la génération de variant permettant une cassure simple brin : « Nickase ». La génération de mutation sera d'ailleurs largement utilisée pour former un variant de ce système pouvant ainsi améliorer ses fonctions dans certains cas.

Ainsi, l'ARN guide (sgRNA) va reconnaître la séquence PAM en amont de la séquence cible. Cet ARN guide va pouvoir se fixer par complémentarité. La protéine Cas9 sera quant à elle fixée au niveau de l'extrémité 3' du brin de l'ARN guide et pourra cliver la séquence cible. Une fois la séquence cible clivée, cette dernière sera soumise au mécanisme de réparation de l'ADN (NHEJ ou HDR). L'avantage de ce système par rapport aux systèmes ZFN ou TALEN est que le système CRISPR nécessite donc seulement la modification de l'ARN

guide pour reconnaître différentes séquences alors que les autres systèmes nécessitent des modifications de la protéine ce qui est plus compliqué à mettre en place.

Différentes stratégies ont été développées pour permettre la modification de gènes et pour favoriser l'effet du système (C. Liu et al. 2017) (**Figure 51**). La première approche utilisée est l'introduction du système sous forme de plasmide codant à la fois la protéine Cas9 et l'ARN guide sur le même vecteur. Cette méthode permet d'éviter de multiplier les transfections, augmente le pourcentage de clivage et permet d'avoir une plus grande stabilité. L'inconvénient est que le plasmide doit être directement transfecté dans le noyau des cellules, ce qui produit plus de « off-target effect », nécessite la traduction de la protéine Cas9, et augmente ainsi le temps d'action du système. La seconde stratégie envisagée est l'incorporation de l'ARNm de la protéine Cas9 avec l'ARN guide pour former le complexe directement dans la cellule cible. L'avantage de cette méthode est qu'elle constitue une expression transitoire de la protéine Cas9 et permet de réduire les « off target effect ». Cependant, le manque de stabilité des ARNm constitue un obstacle pour rendre cette méthode complètement efficace. Enfin, la dernière stratégie utilisée pour générer le système est l'incorporation directe de la protéine Cas9 et de l'ARN guide sous forme de complexe ribonucléoprotéique (RNP). Cette méthode montre de nombreux avantages notamment sur la vitesse d'action du complexe, l'efficacité du clivage, la réduction des « off target effect » et la toxicité du système.

Ce système a été adapté pour permettre son utilisation dans de nombreux organismes et modèles cellulaires. Depuis sa découverte, de nombreuses publications ont été faites montrant ainsi son efficacité dans différents domaines d'études comme notamment l'agroalimentaire, les biotechnologies, la cancérologie ou encore la virologie. Des études ont montré que l'injection des différents composés du système dans les étapes précoces de l'embryogenèse générerait des modifications permettant des changements permanents et pouvant être transmises aux générations suivantes. Une étude sur la maladie de Duchenne sur des embryons de souris a montré que le système CRISPR/Cas9 pouvait efficacement corriger la mutation du gène de la dystrophine *via* la réparation homologue du brin permettant la restauration du phénotype (Long et al. 2014). L'efficacité du système a également été montré *in vivo* après injection hydrodynamique du système dans la veine de



**Figure 51 :** Les différentes formes d'incorporation du système CRISPR/Cas 9. La stratégie 1 consiste à incorporer le système CRISPR sous forme de plasmide. La stratégie 2 est l'incorporation l'ARNm du gène CRISPR et la stratégie 3 consiste à incorporer le système via un complexe RNP (Figure adaptée de C. Liu et al. 2017).



la queue de la souris corrigeant le mutant sur l'allèle fumarylacétoacétate hydrolase (FAH) qui mène à l'accumulation de métabolites toxiques et à la mort cellulaire des hépatocytes. L'injection de CRISPR/Cas9 a stabilisé la protéine après recombinaison homologue de l'allèle et a réduit la toxicité hépatocellulaire (Yao et al. 2018).

Les différentes expériences faites *in vitro* et *in vivo* constituent une preuve de concept de l'efficacité de CRISPR/Cas9 comme thérapie génique. Cependant, son utilisation comme outil thérapeutique nécessite certaines optimisations comme les méthodes de livraison du système (C. Liu et al. 2017). Actuellement deux groupes de vecteurs sont utilisés :

- Les vecteurs viraux
- Les vecteurs non-viraux

Parmi les vecteurs viraux, on distingue le vecteur « Adeno-associated virus » (AAV). Ce sont des vecteurs largement utilisés pour la transduction de plasmide du fait de leur spécificité, de leur capacité à infecter les cellules en division cellulaire ou non et de leur faible pathogénicité. L'un des inconvénients de ce vecteur est qu'il ne permet pas de délivrer la protéine Cas9 de *Streptococcus pyogène* avec l'ARN guide, l'ensemble étant trop grand pour permettre l'incorporation dans le vecteur. Pour pallier à ce problème, il est possible de générer deux vecteurs AAV séparant la Cas9 et l'ARN guide. Une autre alternative est l'utilisation de la Cas9 de *Staphylococcus aureus* qui montre la même efficacité de *S. Pyogenes*, mais qui est plus petite.

Le second vecteur viral utilisé est le lentivirus dont l'avantage majeur est son efficacité à infecter les cellules. L'inconvénient de ce système est le risque d'intégration dans le génome et la génération importante de « off target effect ».

Plusieurs vecteurs non-viraux ont également été développés tels que : la micro-injection, par exemple dans les embryons de souris, les polymères de nanoparticules, l'électroporation et les nanoparticules lipidiques (L. Li, Hu, et Chen 2018).

Dans notre travail, ce sont ces deux derniers types de vecteurs non-viraux qui ont été utilisés.

L'électroporation consiste à augmenter la perméabilité de la cellule pour permettre aux protéines ou aux acides nucléiques de pouvoir rentrer. L'inconvénient de ce système est le faible pourcentage d'efficacité et le taux de mort cellulaire élevé. Cependant, le taux d'efficacité est augmenté lors de l'électroporation des RNP par rapport au plasmide (DeWitt, Corn, et Carroll 2017).

L'administration *via* les nanoparticules lipidiques est de plus en plus développée pour les essais cliniques. L'utilisation des nanoparticules lipidiques pour l'incorporation des RNP a montré une efficacité de 80% dans une culture de cellules humaines après seulement un traitement.

Malgré les différentes méthodes développées pour permettre l'incorporation du système CRISPR/Cas9, des modifications restent encore à apporter afin d'augmenter l'efficacité et la sécurité de ces techniques.

L'avantage de ce système est la possibilité de modifier la protéine Cas9 afin de générer des variantes et d'augmenter son utilisation. Comme expliqué précédemment, la protéine Cas9 est constituée de deux sous-unités permettant chacune le clivage d'un des brins cible. Une des avancées a donc été de muter l'une des sous-unités pour permettre la cassure d'un seul des brins et de générer des « Nickases », on parle alors de nCas9. L'intérêt de muter l'une des sous-unités est de réduire les « off target effect » (Shen et al. 2014). Pour que le système soit entièrement efficace, il faut l'incorporation de deux nCas9 ce qui augmente la spécificité. Un autre variant a été aussi développé, il consiste à la mutation des deux sous-unités formant la dCas9. Les deux sous-unités perdent leur activité nucléase, mais le système permet toujours de reconnaître et de se fixer sur une séquence cible en présence de l'ARN guide (Du et Qi 2016; Gilbert et al. 2014). La dCas9 est souvent utilisée dans le contrôle de la transcription. En l'associant avec des facteurs activateurs ou répresseurs, cette dernière peut favoriser (CRISPRa) ou inhiber (CRISPRi) l'expression d'un gène après fixation du système sur une région promotrice (Larson et al. 2013).

## Le système CRISPR/Cas 9 et le virus de l'Hépatite B

Le système CRISPR/Cas9 constitue un bon outil pour parvenir à une éradication complète du génome du VHB et notamment de l'ADNccc (G. Lin, Zhang, et Li 2015) (**Figure 52**).

Plusieurs études ciblant le génome du VHB par CRISPR/Cas9 ont été faites avec des résultats plus ou moins probants. Celles-ci diffèrent par l'utilisation des ARN guides ciblant différentes régions du génome du VHB. L'objectif est de trouver la cible permettant la meilleure éradication du VHB, qu'elle soit conservée entre les génotypes et d'éviter un maximum les « off target effect ». La première étude a montré que ce système pouvait être utilisé pour perturber le génome du VHB *in vivo* et *in vitro*. Elle a montré qu'après la co-transfection d'un plasmide du VHB et du système CRISPR/Cas9 dans des cellules HuH7, la combinaison d'ARN guide ciblant différentes régions du VHB était capable de réduire la production de la protéine Core du VHB et des antigènes HBs. Ce même système permettait aussi de réduire la concentration des antigènes HBs dans le sérum et le niveau du vecteur du VHB intrahépatique dans un modèle de souris hydrodynamique (S.-R. Lin et al. 2014).

L'efficacité du système sur la réduction de la concentration de l'ADN du VHB et sur l'ADNccc a été étudiée dans les cellules HepaRG et HepaD38 (Kennedy et al. 2015).

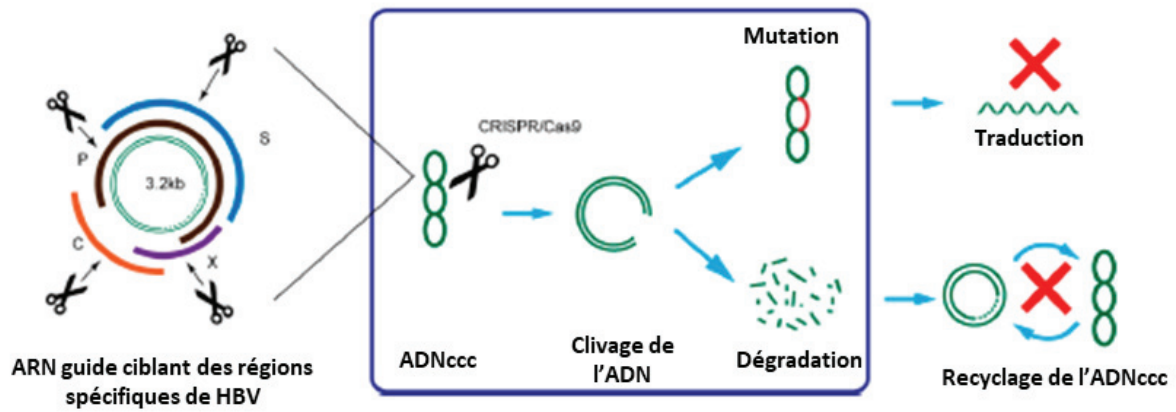
Ce système a également été utilisé sur des modèles d'infection par le VHB et notamment sur les cellules HepG2-NTCP, où le système CRISPR/Cas9 entraîne une diminution de l'infection d'un facteur 8 (Seeger et Sohn 2014).

L'efficacité de CRISPR/Cas9 sur l'ADNccc a été montrée en transfectant un precccDNA dans les cellules HuH7 et dans un modèle de souris (Dong et al. 2015). L'utilisation de nCas9 a également montré une efficacité sur le génome du VHB intégré dans des cellules HeLa et HEK293 (Karimova et al. 2015).

Cependant, malgré ces différentes études montrant l'utilité de ce système sur le VHB, de nombreuses améliorations restent à faire. Il existe peu de résultats sur la détection ou l'édition de l'ADNccc. Ces derniers sont soit peu optimaux (utilisation de plasmides precccDNA) soit absents. Plusieurs régions du génome du VHB ont été ciblées, mais l'efficacité des ARN guides diffère en fonction du type cellulaire. Aucune étude n'a été réalisée sur les cellules primaires telles que les PHH et des tests sur les différentes méthodes

d'incorporation du système telles que les RNP sont encore à démontrer. En effet, une étude sur l'incorporation du système CRISPR/cas9 par lentivirus a montré, par séquençage, que malgré le clivage de la séquence cible, celui-ci ne serait pas assez suffisant pour inactiver l'ADNccc (Seeger et Sohn 2016). Des améliorations restent donc à faire afin d'augmenter l'efficacité du système.

Ainsi, au cours de cette thèse, l'un de nos objectifs est de faire une preuve de concept de la dégradation de l'ADNccc dans des modèles d'infection comme le HepG2-NTCP une fois le pool d'ADNccc établi.



**Figure 52** : Mécanisme d'action du système CRISPR/Cas 9 pour la suppression du VHB.

Les ARN guides vont reconnaître des séquences spécifiques du virus de l'hépatite B ce qui entrainera soit sa mutation ou sa dégradation bloquant ainsi la traduction ou le recyclage de l'ADNccc (Figure adaptée de G. Lin, Zhang, et Li 2015).

## Chapitre 2 : PROJET DE THESE

### Les objectifs:

Le virus de l'hépatite B est un virus à ADN qui infecte les hépatocytes. Son cycle de réplication passe par la formation de deux ADN : l'ADNrc et l'ADNccc. Après l'entrée du virus dans les hépatocytes, le génome viral se retrouve dans le noyau des cellules infectées et est converti en ADNccc. Cet ADN est organisé comme un minichromosome dont la régulation fait intervenir des protéines cellulaires et virales. Cet ADN sert de matrice à la transcription virale et une seule molécule d'ADNccc permet la réactivation de la réplication. Ainsi, seule l'élimination de l'ADNccc permet-d'éradiquer l'infection.

Actuellement les options thérapeutiques préconisées sont l'utilisation des analogues des nucléos(t)idiques tels que le Ténofovir et l'Entécavir et/ou le PEG-IFN. Cependant, ces différents types de traitement ne ciblent pas directement l'ADNccc qui persiste dans le noyau des cellules infectées. En prenant en compte la demie-vie de l'ADNccc et celle des hépatocytes, il faudrait des années pour obtenir son élimination naturelle.

La méthode actuellement utilisée en routine pour détecter et quantifier l'ADNccc est la qPCR. Mais cette méthode présente des inconvénients. Elle dépend d'une gamme standard et sa limite de détection est souvent supérieure à la quantité d'ADNccc notamment dans des échantillons de biopsies de patients infectés chroniquement.

La technique de RCA a été développée pour permettre la quantification de faible concentration d'ADNccc. Elle permet une amplification du gène cible, mais doit être couplée à la technique de qPCR afin d'obtenir le nombre de copies d'ADNccc dans les échantillons. Ces limitations montrent la nécessité de développer de nouvelles technologies pour optimiser la détection et la quantification de l'ADNccc afin d'évaluer le devenir de la maladie chez les patients infectés chroniquement.

Les traitements actuels ne permettent pas de dégrader l'ADNccc. Ils permettent l'inhibition de la synthèse de l'ADNrc dans la nucléocapside et conduisent à une diminution de la viro-suppression, mais pas à l'élimination virale. Lors de l'infection par VHB, un pool d'ADNccc est formé avant d'être transcrit en ARN et rétrotranscrit en ADNrc. Même si les

analogues des nucléos(t)idiques empêchent la formation d'ADNccc de novo, ils ne permettent pas d'atteindre le pool d'ADNccc initialement formé. Bien que ce pool d'ADNccc puisse se diluer dans le temps, sa disparition n'est jamais totale et nécessite de développer de nouveaux traitements pour permettre son élimination. La stratégie la plus efficace serait la dégradation totale de l'ADNccc par l'action directe ou indirecte de molécule.

L'émergence du génome éditant ciblant directement l'ADN a ouvert une nouvelle voie dans la recherche de nouveaux traitements. Il utilise des enzymes clivant l'ADN viral de manière spécifique. Parmi les nucléases chimériques étudiées le système CRISPR/Cas9 présente un avantage important par sa facilité à être modifié pour cibler un gène spécifique. Des preuves de concept sur l'utilisation de ce système sur le VHB ont déjà été démontrées dans différentes études. Cependant, aucune d'entre elles n'ont observé une efficacité du système sur des modèles de culture primaire et dans un modèle d'infection *in vivo*. Sa capacité, à impacter l'ADNccc reste encore à démontrer.

Ainsi, les objectifs de cette thèse reposent sur trois axes :

- Le développement d'un nouvel outil nécessaire à une meilleure quantification de l'ADNccc.
- L'utilisation de cet outil pour évaluer l'impact des traitements actuels à long terme sur l'ADNccc dans des biopsies de patients infectés chroniquement par le VHB.
- L'établissement d'une preuve de concept de l'efficacité du système CRISPR/Cas 9 sur l'ADNccc dans les cellules HepG2-NTCP.

---

# Axe I :

---

Développement d'un nouvel outil  
permettant la détection et la  
quantification de l'ADNccc du VHB :

**La Droplet Digital PCR (ddPCR)**



## 1 Objectifs

Le « Gold standard » pour la quantification de l'ADNccc est la qPCR. Cette technique repose sur l'utilisation d'amorces qui viennent se fixer au niveau du « gap » de l'ADNrc pour permettre une amplification plus spécifique de l'ADNccc. La mise en place de cette technique a ainsi permis de déterminer la charge d'ADNccc dans de nombreux échantillons de patients et de faire des corrélations avec l'histoire naturelle de la maladie.

Cependant, elle présente plusieurs inconvénients. L'analyse dépend d'une gamme standard ce qui peut générer un biais dans la quantification. De plus, le seuil de sensibilité reste relativement élevé ce qui ne permet pas de détecter des faibles concentrations d'ADNccc notamment dans des biopsies de patients infectés par le VHB.

La PCR digitale est la dernière génération de PCR. Elle permet d'augmenter la détection et la quantification en valeur absolue et sans gamme standard grâce au partitionnement de l'échantillon dans des gouttelettes formées par émulsion entre l'huile et l'eau. Le développement de ces nouvelles générations de PCR, offre une nouvelle alternative pour la détection de l'ADNccc.

Au cours de cette thèse, l'objectif du premier axe a été de mettre en place la technique de Droplet Digital PCR (ddPCR) pour quantifier des faibles concentrations d'ADNccc. Cette technique repose sur le fractionnement de l'échantillon dans des gouttelettes. Chaque gouttelette peut contenir de 0 à 3 copies d'ADN ainsi que les réactifs permettant l'amplification du gène cible. Chaque goutte constitue un compartiment à part entière pour une réaction de PCR. Le générateur de gouttelettes peut générer entre 10 000 et 20 000 gouttelettes correspondant à autant de réaction de PCR. La quantification absolue de l'ADN dans l'échantillon initial repose ensuite sur la loi de Poisson, permettant de quantifier finement un nombre de copies d'ADN.

Cette technique présente plusieurs avantages. Contrairement à la qPCR, elle ne nécessite pas de gamme standard, elle est moins sensible aux inhibiteurs de PCR ce qui favorise la lecture en point final et elle est décrite pour avoir un meilleur seuil de sensibilité. Tout comme la qPCR, la quantification par ddPCR repose sur l'utilisation d'amorces spécifiques de l'ADNccc basé sur la technologie de détection par sondes Taqman.

## 2 Matériel et Méthodes

### Cultures cellulaires et infections virales

Les cellules HepG2-NTCP proviennent du laboratoire du Pr.Urban (Heidelberg) et sont maintenues en culture dans un milieu DMEM (Gibco) complété avec 5% de sérum (Gibco), 1% de pénicilline/ streptomycine, 1% de glutamine (Gibco) et 1% de sodium pyruvate (Gibco). Elles sont maintenues à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Pour la culture des cellules HepaRG, elles sont entretenues dans du milieu William complété avec 10% de sérum fœtal, 50U de pénicilline/streptomycine (Gibco), 5µg/mL d'insuline bovine et 5.10<sup>7</sup>M d'hydrocortisone. Les cellules sont maintenues à 37°C dans 5% de CO<sub>2</sub> pendant deux semaines pour la phase de prolifération. Durant cette phase, le milieu est changé tous les deux jours. Pour les phases de différenciation et d'infection, les cellules sont maintenues pendant deux semaines dans le même milieu Williams décrit précédemment, complété avec 2% de DMSO (Sigma).

Pour l'infection par le VHB, les cellules HepG2-NTCP ont étéensemencées dans des plaques de culture douze puits recouverts de collagène (BD Biosciences) à une densité 8.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> dans leur milieu d'entretien. Le lendemain, le milieu d'ensemencement a été remplacé par le milieu d'infection DMEM (Gibco) complété avec 5% de sérum (Gibco), 1% de pénicilline/ streptomycine, 1% de glutamine (Sigma) et 2% de DMSO. Après 72h, les cellules ont été infectées avec le VHB produit dans des cellules HepAD38. Les particules virales ont été obtenues par concentration du surnageant dans du PEG à 4% et par centrifugation à 12 000 rpm pendant 1h à 4°C. Le culot viral a été remis en suspension dans du milieu Williams et l'inoculation des cellules a été réalisée à une multiplicité d'infection de 1000 (MOI 1000) dans le milieu d'infection contenant 4% PEG 8000 (Sigma) pendant 16h à 37°C. Après la période d'inoculation, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS (Gibco) pour éliminer l'innoculum, puis gardées en culture avec le milieu d'infection pendant 7 jours.

### Production du plasmide pBR 322VHB

Le plasmide pBR 322 VHB a été transformé dans des bactéries Top 10 et a été incubé dans la glace pendant 30 min. Un choc thermique a été ensuite réalisé pendant 45s à 42°C et pendant 2 min à 4°C. Du milieu SOC a été ajouté dans les bactéries pendant une nuit à 37°C. Les bactéries ont été ensuite étalées sur des boîtes de L-agar contenant de l'ampicilline. La

colonie bactérienne a été transférée dans du milieu TB pendant 24h sous agitation à 37°C. Les bactéries ont été culottées par centrifugation à 6000g pendant 4 min à 4°C, puis la « Maxiprep » a été réalisée selon le protocole du kit de Machery-Nagel : « Plasmid DNA purification ». Une fois purifié, le plasmide a été digéré ou non avec l'enzyme de restriction NdeI (1U/1µg) et a été mis à la concentration de  $10^7$  copies.

### **Quantification des antigènes HBe et HBs**

Le surnageant des cellules a été prélevé au bout de 7 jours d'infection et 3 jours d'accumulation pour la quantification des antigènes viraux HBe et HBs afin de contrôler le niveau d'infection. La quantification a été réalisée selon les recommandations du fournisseur du Kit ELISA HBe ou HBs (Autobio, Chine).

### **Extraction ADN et ARN**

Les extractions d'ADN et d'ARN ont été réalisées selon les protocoles des Kits « MasterPure DNA purification » (Epicentre) pour l'ADN et « Nucleospin RNA plus » (Machery-Nagel) pour l'ARN. L'ADNccc a été obtenu par digestion par une DNase, soit la T5 exonucléase (T5) (NEB) pour la digestion des extraits d'ADN de lignées cellulaires, soit « la Plasmide Safe ATP-dependent DNase » (PSAD) (Epicentre) pour la digestion des extraits d'ADN de biopsies. Un consortium, constitué avec des membres du laboratoire, travaille sur les meilleures approches permettant la quantification de l'ADNccc. Ils préconisent l'utilisation de la PSAD sur les échantillons de biopsies qui peuvent avoir peu de matériel, car celle-ci serait moins délétère sur l'ADNccc. La digestion par la T5 se fait avec 30 unités d'enzyme à 37°C pendant 45 min. La digestion avec la PSAD se fait avec 10 unités d'enzyme et 1mM d'ATP à 37°C pendant 2h et elle a été inactivée pendant 30 min à 70°C.

### **Quantification de l'ADN et l'ARN du VHB par qPCR Taqman**

La quantification de l'ADN ou de l'ARN du VHB a été effectuée à partir d'un thermocycleur quantitatif (Applied Biosystem). La transcription inverse de l'ARN du VHB a été réalisée à partir du protocole du kit de la « Superscript III » (Thermo Fisher). La réaction de qPCR se fait avec des amorces et une sonde Taqman dont les séquences sont listées dans le tableau 4. Ces amorces sont spécifiques, respectivement pour l'ADNccc, et l'ARNpg dont la séquence a été adaptée à partir de la publication de Volz (Volz et al. 2007b).

Pour avoir un nombre de copies de particules virales par cellules, l'ADNccc est normalisé avec le gène de la  $\beta$ -globine dont la quantification est réalisée en duplex. L'ARNpg est normalisé par rapport à un gène de ménage, GusB, pour permettre de faire l'analyse relative du gène viral. Les amorces de la  $\beta$ -globine, de GusB et de l'ADNrc du VHB sont des amorces fournies par Life Technologies.

Des dilutions en série ont été effectuées avec le plasmide pBR 322 pour la gamme standard allant de  $10^7$  copies à  $10^2$  copies. Les réactions de qPCR sont réalisées selon les cycles décrits dans le tableau 5 et 6.

Acides nucléiques	Provenance	Amorces/Sondes	Régions du génome du VHB	Séquences
ADNccc	Laboratoire du Pr. Dandri	Sonde Taqman	1607-1629	[6FAM]CATGGAGACCACCGTGAACGCC[BHQ1]
	Laboratoire du Pr. Dandri	Amorce F	1575-1593	CCGTGTGCACTTCGCTTCA
	Laboratoire du Pr. Dandri	Amorce R	1864-1882	GCACAGCTTGGAGGCTTGA
ARNpg	Publication de Volz et al.	Sonde Taqman	2362-2388	[6FAM]AGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCC[BHQ1]
	Publication de Volz et al.	Amorce F	2267-2287	GGAGTGTGGATTTCGACTCCT
	Publication de Volz et al.	Amorce R	2421-2440	AGATTGAGATCTTCTGCGAC

**Tableau 4:** Amorces pour la quantification de l'ADNccc du VHB et l'ARN pg du VHB

Etapas du cycle	Température (°C)	Temps	Vitesse de variation	Nombre de cycles
Activation de l'enzyme	95	20 s	2,63°C/s	1
Dénaturation	95	1 s		40
Hybridation/ Elongation	60	20 s		

**Tableau 5 :** Cycle de PCR pour la quantification de l'ADNrc , la  $\beta$  globine, l'ARNpg et GusB par qPCR

Etapes du cycle	Température (°C)	Temps	Vitesse de variation	Nombre de cycles
Activation de l'enzyme	95	10 min	2,63°C/s	1
Dénaturation	95	1 s	2,63°C/s	40
Hybridation/ Elongation	65	60 s	2,42°C/s	

**Tableau 6 :** Cycle de PCR pour la quantification de l'ADNccc par qPCR

### Quantification de l'ADN et de l'ARN du VHB par la ddPCR

La quantification de l'ADN et l'ARN du VHB a été réalisée avec le QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 25 µL de la réaction de ddPCR comprend du Supermix 2X ddPCR (Bio-Rad, Pleasanton, CA, USA), 900 nmol/L de mélange d'amorces avec une sonde (dont les séquences sont référencées dans le tableau 4) et 5 µL de matrice d'ADN ou d'ARN de l'échantillon à quantifier. La plaque a été ensuite déposée dans l'automate générateur de gouttelettes (AutoDG) avec les consommables nécessaires pour permettre le partitionnement de l'échantillon à 20 000 gouttelettes environ.

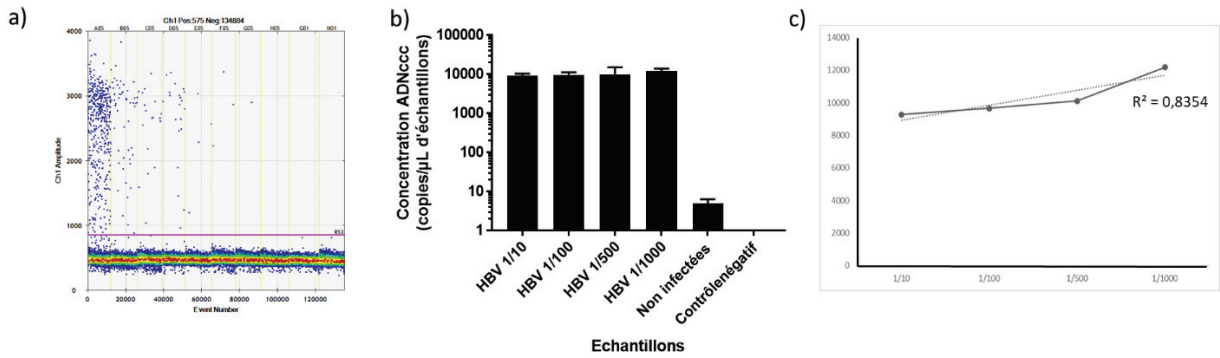
Cet automate utilise la microfluidique qui permet l'émulsion entre l'huile et les échantillons, pour générer des gouttes de la taille d'un nanolitre recommandée pour l'analyse en ddPCR. La plaque de PCR a été ensuite scellée avec un film perçable via PX1™ PCR plate sealer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) et l'amplification a été réalisée à l'aide du thermocycleur C1000 Touch™ deep-well (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

L'amplification par PCR est réalisée avec le protocole décrit dans le tableau 7. La plaque a été ensuite refroidie à 4°C. Après l'amplification, la plaque a été placée dans le lecteur QX100 Droplet Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Le signal de fluorescence des gouttes a été analysé à l'aide du logiciel QuantaSoft™ analysis software version 1.7 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Deux niveaux de fluorescences différents ont été visualisés correspondant au cluster positif (présence d'amplification) et au cluster négatif (absence d'amplification). Un seuil de fluorescence donné a été fixé pour l'ensemble des échantillons permettant de séparer ces deux clusters. La concentration absolue de chaque échantillon est

automatiquement calculée par le logiciel de ddPCR en calculant le ratio des gouttelettes positives sur le nombre de gouttelettes totales combiné avec la loi de Poisson.

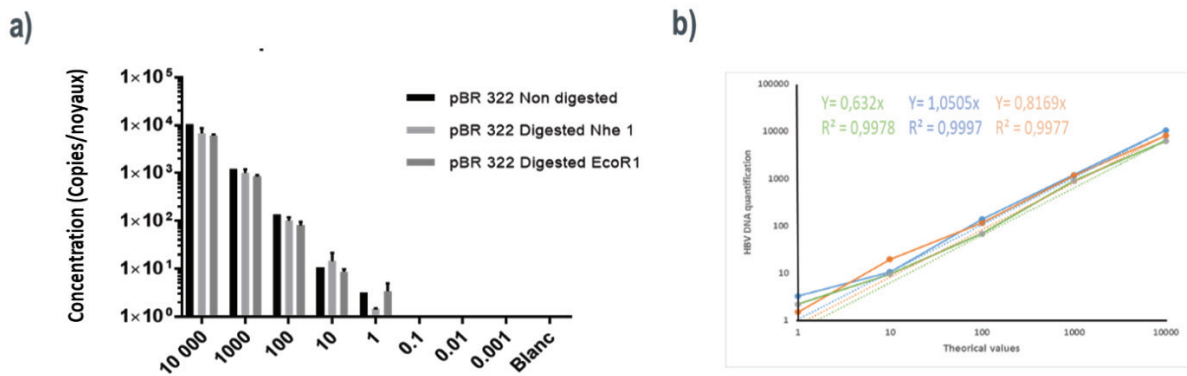
Etapes du cycle	Température (°C)	Temps	Vitesse de variation	Nombre de cycles
Activation de l'enzyme	95	10 min	-	1
Dénaturation	94	30 s	-	40
Hybridation/ Elongation	60	60 s	2°C/s	
Désactivation de l'enzyme	98	10 min	-	1

**Tableau 7:** Cycle de PCR pour la quantification de l'ADNccc par ddPCR



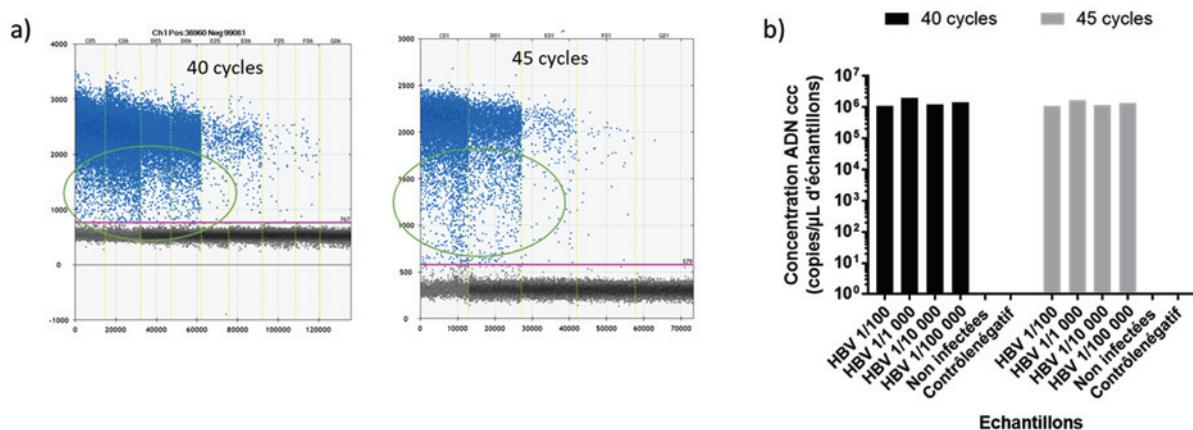
**Figure 53 :** Validation des amorces pour la quantification de l'ADNccc par ddPCR

a) Amplification de l'ADNccc de cellules HepG2-NTCP infectées par le VHB par ddPCR. Les échantillons sont dilués en série. b) Concentration d'ADNccc en copies/μL d'échantillons, obtenue pour les échantillons infectés et contrôle. c) Courbe de linéarité obtenue pour ces concentrations



**Figure 54 :** Effet de la circularisation sur la quantification de l'ADNccc

a) Le plasmide circulaire de VHB a été digéré par différentes enzymes de restriction (NheI et EcoRI) pour être linéarisé. Des dilutions en série du plasmide circulaire et linéaire ont été quantifiées par ddPCR. b) Analyse de la corrélation entre les valeurs obtenues par ddPCR et les valeurs théoriques. La droite bleue correspond à l'analyse des échantillons non digérés, la droite verte aux échantillons digérés par l'enzyme EcoR I, et la droite orange correspond aux échantillons digérés par l'enzyme Nhe I.



**Figure 55:** Comparaison du nombre de cycles de PCR sur la quantification de l'ADNccc

a) Comparaison de la séparation des clusters positifs et négatifs avec 40 ou 45 cycles. Les cercles verts montrent la réduction de la « pluie » avec l'augmentation du nombre de cycle b) Quantification de l'ADNccc par ddPCR en fonction du nombre de cycles de PCR réalisé et des dilutions en série.

### 3 Résultats

#### Validation des amorces pour la quantification des gènes viraux

Après infection des cellules HepG2-NTCP avec le VHB à MOI de 1000, l'ADN des cellules a été extrait et quantifié par ddPCR afin de tester les amorces pour la détection de l'ADNccc et de l'ADNrc. De même, l'ARN des cellules a été extrait pour permettre la validation des amorces pour la quantification de l'ARNpg.

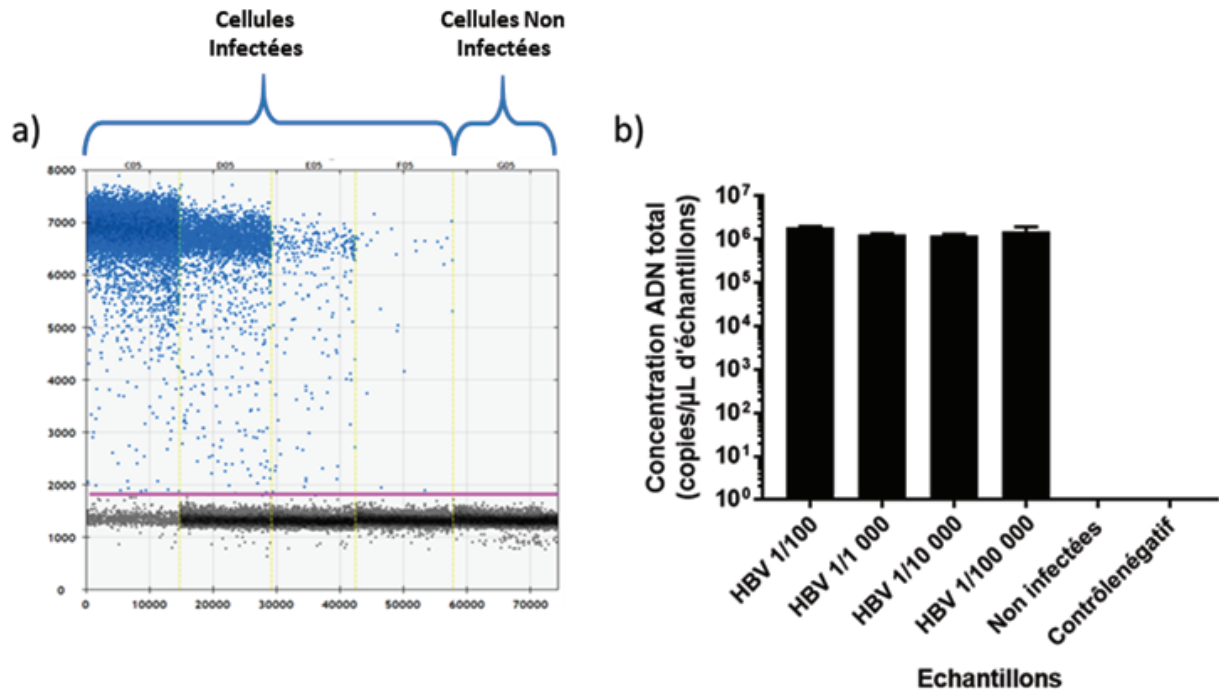
Pour augmenter la spécificité de détection, l'ADNccc a été préalablement digéré avec la T5. Pour avoir une bonne visibilité de l'efficacité des amorces, les échantillons ont été dilués au 10<sup>ième</sup>, 100<sup>ième</sup>, 500<sup>ième</sup> et 1000<sup>ième</sup>.

Les amorces testées sont des amorces adaptées du laboratoire du Pr. Dandri (Hamburg) et utilisées en routine dans notre laboratoire pour la quantification par qPCR. L'amplification spécifique pour l'ADNccc a été vérifiée avec des cellules non infectées et avec un contrôle négatif.

La figure 53 illustre que la ddPCR a permis une bonne quantification de l'ADNccc avec les amorces utilisées en routine pour la qPCR Taqman. La séparation des clusters de gouttelettes positives et des gouttelettes négatives a été facilement identifiable. Pour une application de la loi de Poisson et des résultats fiables, le nombre de gouttelettes totales doit être supérieur à 10 000 et le nombre de gouttelettes négatives supérieur à 100. Ces paramètres sont applicables dans les conditions d'expérimentation sélectionnées. Une excellente reproductibilité de la concentration finale obtenue par  $\mu\text{l}$  d'échantillon quel que soient les dilutions de matrice utilisées a montré la robustesse de ce test ( $R^2=0.83$ ).

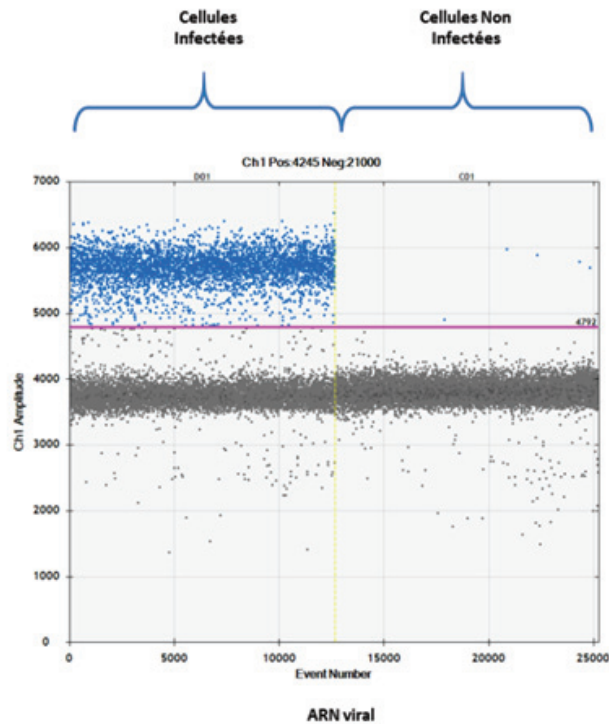
Afin de vérifier que la circularisation de l'ADNccc n'impacte pas l'amplification dans les gouttelettes, le plasmide pBR322 circulaire ou linéarisé par digestion avec des enzymes de restriction (EcoR I or Nhe I) a été utilisé. Pour augmenter la robustesse de nos résultats, une dilution en série de ce plasmide circulaire ou linéaire allant de 10 000 copies à 1 copie a été effectuée. Nos résultats montrent que l'amplification de l'ADN n'a pas été impactée par la circularisation du plasmide (figure 54). L'analyse entre les valeurs théoriques et les valeurs obtenues a montré une corrélation de  $R^2$  à 0.99 pour les 3 conditions. L'ADNccc peut donc être quantifié avec la même précision qu'un ADN linéaire par la ddPCR.





**Figure 56 :** Validation des amorces pour la quantification de l'ADN total par ddPCR

a) Amplification de l'ADN total de cellules HepG2-NTCP infectées par VHB par ddPCR. Les échantillons sont dilués en série. b) Concentration d'ADN total en copies/μL d'échantillons, obtenue pour les échantillons infectés et contrôle.



**Figure 57 :** Validation des amorces pour la quantification de l'ARNpg du VHB

Amplification par la ddPCR de l'ARNpg du VHB, avec des amorces spécifiques, extrait à partir de cellules HepG2-NTCP à MOI de 1000

Pour améliorer la séparation des clusters pour la quantification de l'ADNccc, il est préconisé d'augmenter le nombre de cycle de la PCR. Ainsi, nous avons testé l'augmentation du nombre de cycles à 45 au lieu des 40 cycles initialement recommandés par le fournisseur.

Pour cela, les échantillons d'ADNccc ont été dilués au 100<sup>ième</sup>, 1000<sup>ième</sup>, 10000<sup>ième</sup> et 100000<sup>ième</sup>. L'augmentation du nombre de cycles a permis une réduction de la « pluie » pour le cluster positif, et ainsi un meilleur positionnement du seuil. La quantification de l'ADNccc n'a pas été affectée par le nombre de cycles. (Figure 55)

Pour la vérification de l'efficacité des amorces de l'ADN total du VHB, les échantillons ont été dilués au 100<sup>ième</sup>, 1000<sup>ième</sup>, 10000<sup>ième</sup> et 100000<sup>ième</sup> après une nouvelle infection par le VHB, car la quantité d'ADN attendue est plus importante que pour l'ADNccc. Les amorces testées sont des amorces du commerce dont les séquences ne sont pas connues. Comme le montre la figure 56, la séparation des deux clusters positifs et négatifs a été optimale. Nous avons constaté une diminution du nombre de gouttelettes positives proportionnelle à la dilution de l'échantillon. Le nombre de gouttelettes totales et négatives répond aux exigences de qualité recommandées par Biorad. Au niveau de la quantification de l'ADN total, nous avons obtenu une bonne reproductibilité des concentrations après application du facteur de dilution.

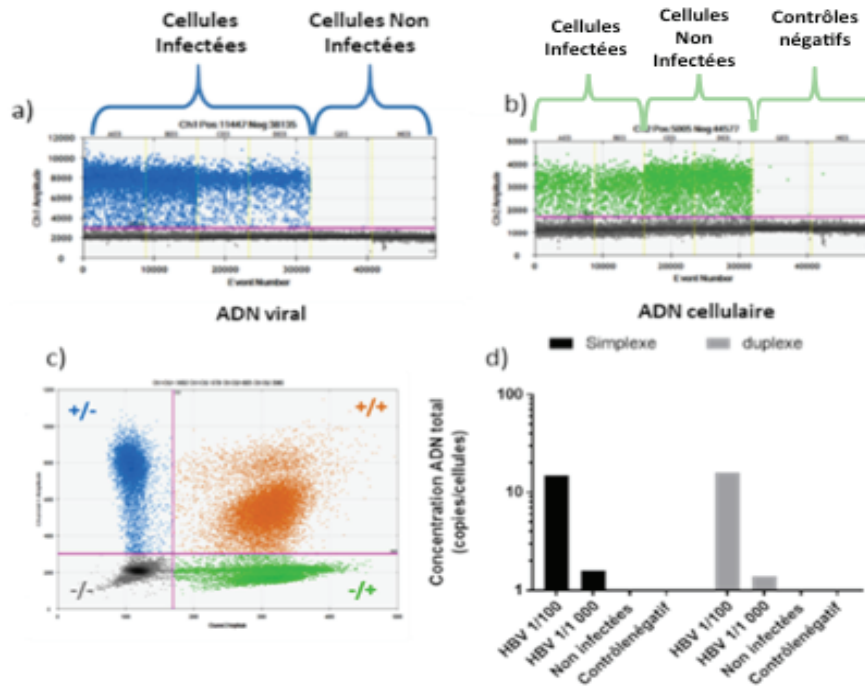
Ainsi, les amorces utilisées en routine pour la quantification de l'ADNccc et de l'ADN total par la technique de qPCR peuvent être utilisées par la ddPCR.

Après extraction des ARN, ces derniers ont été rétro-transcrits à l'aide de la Superscript III. La quantification de l'ARNpg se fait à l'aide des amorces utilisées en routine en qPCR. Les échantillons ont été dilués au 100<sup>ième</sup>, 1000<sup>ième</sup>. La spécificité de l'amplification de l'ARNpg a été vérifiée à partir de cellules non infectées.

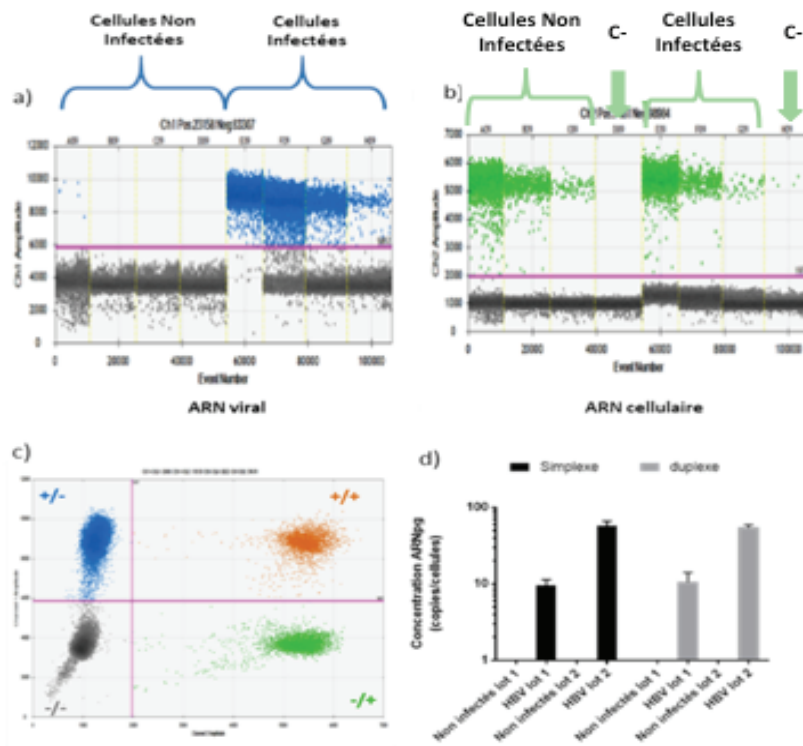
Comme observé dans la figure 57, une amplification efficace de l'ARNpg avec ces amorces a été constatée. On distingue correctement les clusters positifs et négatifs.

### **Validation de la quantification en duplex**

Afin de pouvoir normaliser les échantillons en nombre de copies par cellules, des ddPCR en duplex ont été mises au point, permettant de quantifier dans un même puit, l'ADN du VHB avec le gène de la  $\beta$ -globine eucaryote ainsi que l'ARNpg avec l'expression du gène eucaryote GusB.



**Figure 58 :** Analyse de la quantification de l'ADN viral et de l'ADN cellulaire en simplexe et en duplex. a) Analyse unidimensionnelle de l'ADN viral du VHB par ddPCR. b) Analyse unidimensionnelle de l'ADN cellulaire (HBB) par ddPCR. c) Analyse multidimensionnelle de l'ADN viral de VHB et de l'ADN cellulaire pour la quantification en duplex par ddPCR. d) Comparaison de la quantification de la concentration de l'ADN viral en copies par cellule en simplexe et en duplex



**Figure 59 :** Analyse de la quantification de l'ADN viral de VHB et de l'ADN cellulaire en simplexe et en duplex. a) Analyse unidimensionnelle de l'ARNpg viral du VHB par ddPCR. b) Analyse unidimensionnelle de l'ARN cellulaire (Gusb) par ddPCR. c) Analyse multidimensionnelle de l'ARNpg viral de VHB et de l'ARN cellulaire pour la quantification en duplex par ddPCR. d) Comparaison de la quantification de la concentration de l'ARNpg viral en copies par cellule en simplexe et en duplex.

Le niveau d'infection des cellules a été quantifié par ddPCR avec les amorces correspondantes. L'analyse simultanée en duplex par ddPCR nécessite des amorces avec des marquages différents. Ainsi, les amorces pour les gènes eucaryotes (B-globine et GusB) possèdent un marquage avec un fluorophore VIC en opposition avec les amorces virales disposant d'un marquage avec un fluorophore FAM.

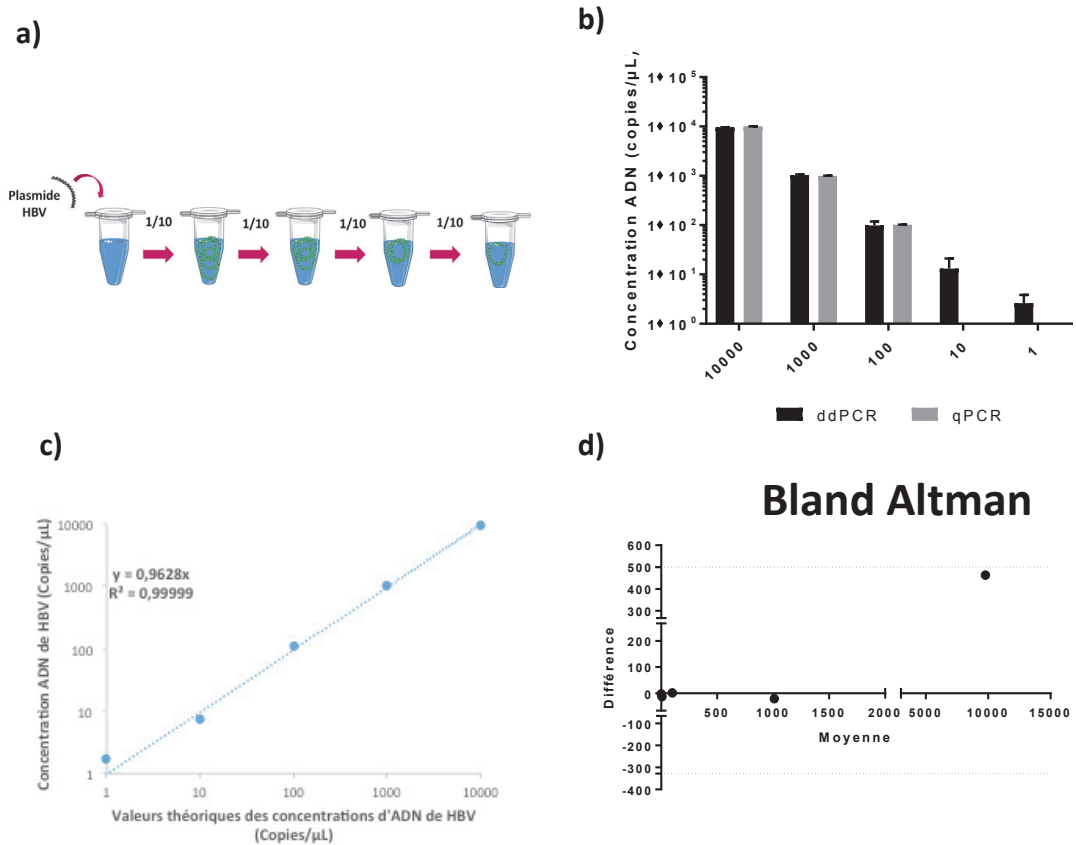
Pour vérifier l'efficacité de la quantification en duplex, les résultats ont été comparés avec l'analyse indépendante des gènes. Comme observé sur la figure 58 et 59, la séparation des clusters positifs et négatifs a été facilement identifiable lors de l'analyse unidimensionnelle et multidimensionnelle. La quantification des ADN et ARN viraux des gènes d'intérêt n'a pas varié en fonction de l'analyse en simplex ou en duplex.

### **Validation de la sensibilité de la ddPCR par rapport à la qPCR**

Pour vérifier l'augmentation de la sensibilité de la ddPCR par rapport à la qPCR pour la détection de l'ADNccc du VHB, la limite de détection de ces deux techniques a été comparée.

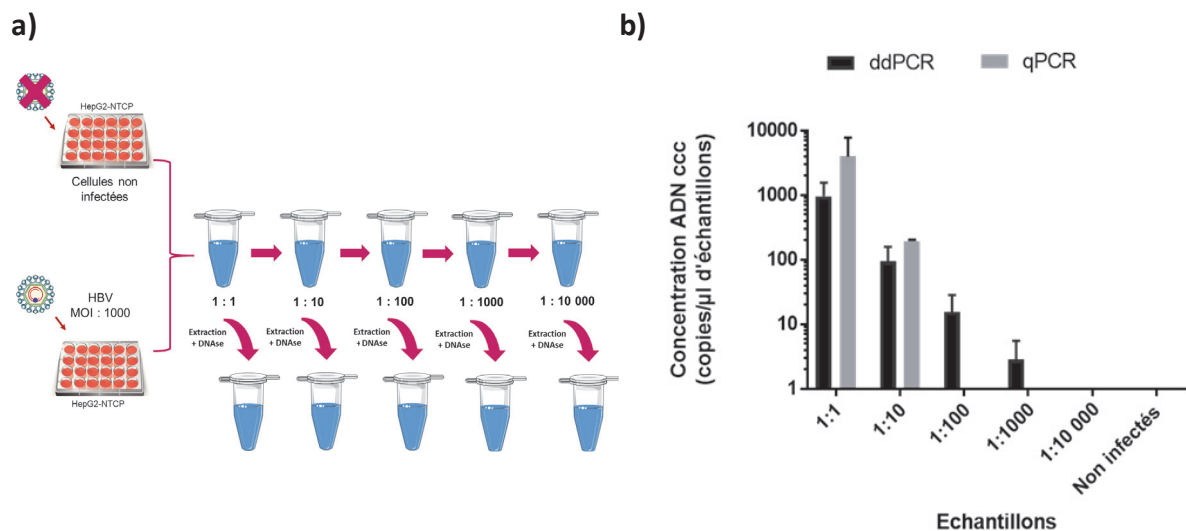
La première étape a été de valider la limite de détection des deux techniques sur le plasmide d'ADN du VHB, le pBR322. Pour cela, le plasmide a été dilué de 10 000 copies à 1 copie par réaction. Comme on peut le constater sur la figure 60, la ddPCR a permis la détection du plasmide jusqu'à 1 copie par réaction alors que la qPCR a une limite de détection de 100 copies par réaction. Les valeurs théoriques ont été également comparées avec les valeurs obtenues pour vérifier la cohérence des résultats. Il existe une bonne correspondance et une bonne linéarité. La ddPCR a permis d'augmenter la sensibilité de deux log et l'analyse de Bland Altman a permis de confirmer la concordance entre les deux techniques.

Afin d'évaluer la sensibilité de la technique de ddPCR par rapport à la qPCR dans les cellules HepG2-NTCP, des cellules infectées ont été mixées avec des cellules non infectées à différents ratios. Le but est de permettre de mimer des conditions où l'ADNccc est en proportion marginale par rapport à l'ADN total et cellulaire, pour confirmer la meilleure sensibilité de la ddPCR. Après l'infection des cellules avec le VHB, elles ont été mixées avec des cellules infectées avec un ratio de 1 : 1, puis à une dilution décroissante de 1 : 10, de



**Figure 60 :** Comparaison de la sensibilité de la ddPCR et de la qPCR dans la quantification du plasmide d'ADN du VHB

a) Schéma de la procédure expérimentale. b) Quantification en copies/μL de l'ADN du VHB par ddPCR et qPCR après plusieurs dilutions en série. Le cadre vert montre la limite de détection de la qPCR et le cadre rouge montre la limite de détection de la ddPCR. c) Analyse de la corrélation entre les valeurs obtenues par ddPCR et les valeurs théoriques. d) Analyse de Bland Altman montrant la correspondance entre la ddPCR et la qPCR.



**Figure 61 :** Comparaison de la sensibilité de la ddPCR et de la qPCR pour la détection de l'ADNccc dans des cellules HepG2-NTCP infectées. Analyse a été effectuée avec différents ratios cellulaires de cellules HepG2-NTCP infectées et non infectées. a) Schéma de la procédure expérimentale. b) Quantification en copies/μL de l'ADNccc par ddPCR et qPCR.

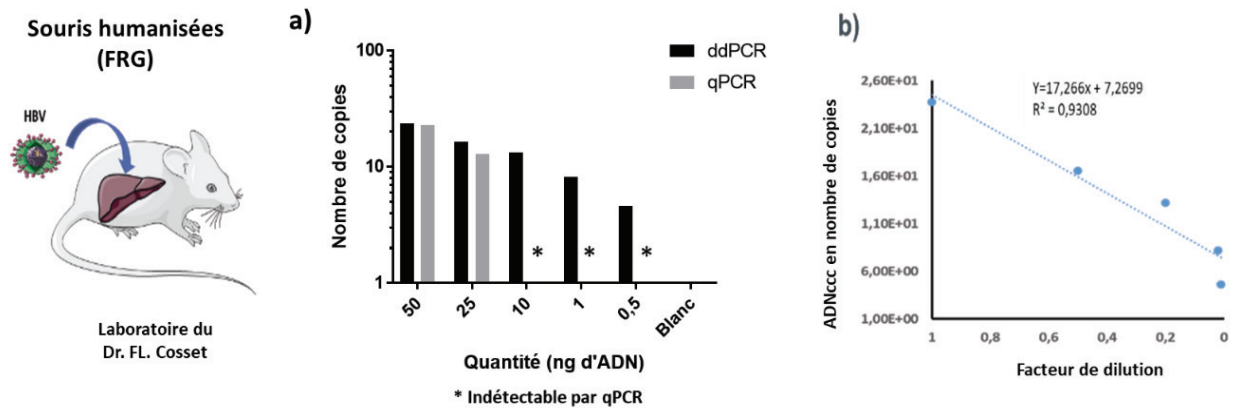
1 :100, de 1 :1000 et de 1 :10 000. Il s'agit d'un ratio théorique en considérant que 100% des cellules sont infectées. L'ADN cellulaire a été extrait au bout de 7 jours après infection.

Afin d'augmenter la spécificité de détection de l'ADNccc, l'ADN a été digéré avec la T5. Celle-ci digère de manière spécifique les ADN linéaires simples ou doubles brins et les ADN circulaires simples brin. Ainsi, comme on peut le constater dans la figure 61, le seuil de la détection ddPCR a été de 1 : 1000 alors que le seuil de la qPCR est de 1 :10. Ainsi dans des cellules HepG2-NTCP infectées par le virus VHB, la ddPCR a augmenté la sensibilité de détection de 2 log par rapport à la qPCR.

L'étape suivante a été de caractériser la détection de l'ADNccc dans les souris humanisées afin de se rapprocher du modèle humain. Pour cela, l'ADN total des souris a été extrait et digéré avec la PSAD, enzyme dont les propriétés permettent uniquement la conservation des ADN doubles brins circulaires comme l'ADNccc. L'utilisation de la PSAD permet de quantifier spécifiquement l'ADNccc. Différentes quantités d'ADN allant de 50ng à 0.5 ng ont été utilisées et l'ADNccc a été quantifié par ddPCR et qPCR. Comme constaté dans la figure 62, pour ces quantités d'ADN, la ddPCR a permis la détection de l'ADNccc dans tous les échantillons, avec une bonne linéarité ( $R^2= 0.9308$ ) par rapport aux facteurs de dilution, alors que l'ADNccc devient indétectable par qPCR partir de 10ng d'ADN extrait.

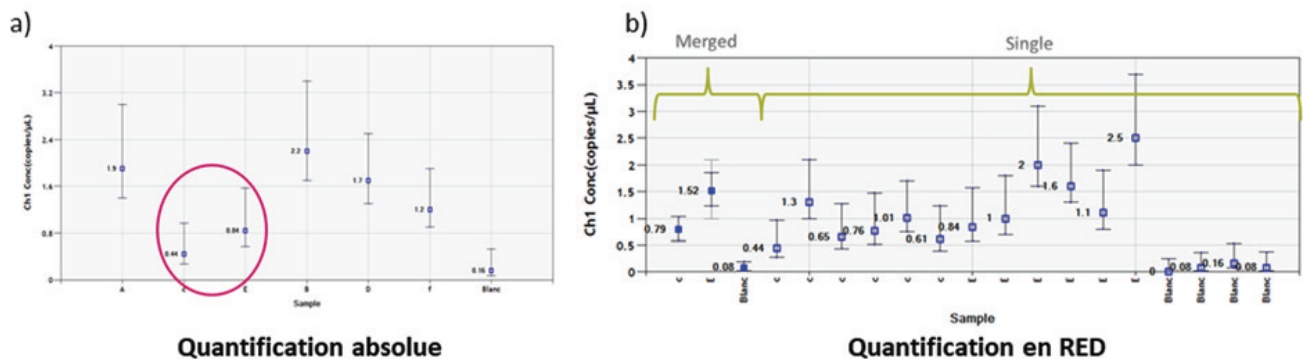
### **Validation de la détection des évènements rares**

La technique de ddPCR augmente la sensibilité de la détection et elle peut être améliorée par une analyse de détection des évènements rares. Cette technologie détecte des mutations ou des séquences rares présentes dans un échantillon. Elle consiste à analyser plusieurs répliques de notre l'échantillon afin d'augmenter le volume d'échantillonnage quantifié. Plus le nombre de répliques est important, plus la détection des évènements rares sera précise. Lors de l'analyse, la quantification de la cible est effectuée pour chaque réplique puis l'ensemble des résultats est analysé comme s'il s'agissait de l'analyse d'un seul et même échantillon. Ainsi, un nombre absolu de copies sera obtenu pour l'ensemble du volume d'échantillon analysé. La quantification absolue par l'application de la loi de Poisson se fera en additionnant le nombre de gouttelettes positives de tous les répliques. L'augmentation du nombre d'évènements, augmente la précision. Le développement de cette technique pour la quantification d'ADNccc dans des échantillons faiblement concentrés apporte un avantage pour améliorer la détection.



**Figure 62:** Comparaison de la sensibilité de la ddPCR et de la qPCR pour la détection l'ADNccc dans les souris humanisées.

Utilisation de souris humanisées par le laboratoire du Dr. Cosset. a) Quantification de l'ADN par ddPCR et qPCR. Les résultats sont représentés en nombre de copies en fonction de la quantité initiale d'ADN utilisée pour la PCR. b) Analyse de la linéarité entre la quantification par ddPCR en fonction des facteurs de dilutions.



**Figure 63 :** Validation de la technique de détection par évènement rare

Analyse d'échantillons d'ADN extraits de cellules HepaRG. a) Concentration de l'ADN en copie/μL lors d'une analyse absolue standard. Les échantillons les plus faiblement concentrés (encadrés en rose) sont utilisés pour l'analyse en évènements rares. b) Analyse en évènement rare des échantillons faiblement concentrés en plusieurs réplicas. Les résultats des concentrations sont obtenus soit en une analyse individuelle des réplicas soit lors de la fusion des réplicas pour obtenir la concentration de l'ADN en évènement rare.

Pour valider la technique de détection des évènements rares pour l'ADNccc, des cellules HepaRG infectées ont été utilisées car elles sont connues pour produire peu d'ADNccc.

Pour cela, les cellules ont été infectées par VHB et l'ADN a été extrait 7 jours après infection. Ces échantillons ont été fournis par le Dr. Julie Lucifora. Après extraction de l'ADN et digestion par la T5 pour la détection de l'ADNccc, les échantillons ont été quantifiés par ddPCR. Dans une première étape, les six échantillons ont été analysés avec la technique dite « standard ». Deux de ces échantillons ont été en limite de détection et n'ont pas permis de conclure sur la quantification de l'ADNccc. Ces deux échantillons ont été analysés par la détection des évènements rares, en réalisant 6 réplicas pour chacun d'entre eux, ce qui permet de faire une quantification absolue de l'ADNccc dans la totalité de chaque échantillon. La quantification en évènements rares a permis d'augmenter le nombre de gouttelettes positives et ainsi de conclure sur la présence ou non d'ADNccc pour des échantillons en limite de détection.

Comme on peut le voir dans la figure 63, cette technique a permis d'augmenter la sensibilité de détection et de confirmer la présence et la quantification de l'ADNccc dans ces cellules HepaRG infectées.



## 4 Discussion

Les résultats montrent que la mise en place de la ddPCR apporte un avantage important par rapport à la qPCR. Cette technique présente néanmoins quelques limites que nous préciserons.

Parmi les avantages, la ddPCR apporte une quantification absolue des échantillons, sans gamme standard qui peut avoir des efficacités de PCR différentes de celles des échantillons. La génération d'environ 20 000 gouttelettes correspond à autant de répliques qui évite de faire les répliques techniques. Cette méthode de quantification absolue, plus confortable et pratique enlève un biais de quantification.

De plus, la ddPCR permet un gain de sensibilité. La supériorité de la sensibilité de la ddPCR a été montrée dans de nombreuses publications et notamment sur la quantification de charges virales et bactériennes. Cette technologie a permis de détecter des faibles concentrations de *Plasmodium* (11 parasites/mL) alors que la qPCR ne permettait de détecter que 22 parasites/mL. La sensibilité de la ddPCR et la mise en place du duplex a permis de détecter différentes espèces de *Plasmodium* lors de co-infection avec une plus grande sensibilité (Srisutham et al. 2017). La ddPCR a été utilisée pour détecter de miARN dans le sérum de patients, biomarqueurs pour le cancer du poumon (P. Wang et al. 2015). La ddPCR a permis un gain de sensibilité de 2 à 4 facteurs par rapport à la qPCR, avec une plus faible variabilité.

Dans le cas de l'hépatite B, plusieurs études ont montré un gain de la sensibilité de la ddPCR pour la détection de l'ADNccc. Notre objectif était donc de confirmer ce gain au laboratoire pour appliquer cette technologie à des biopsies de patients infectés de façon chronique. Nos résultats ont montré une augmentation de 2 log de la sensibilité de la ddPCR par rapport à la qPCR. Nous avons retrouvé cette augmentation de la sensibilité sur la détection d'un plasmide VHB, mais aussi directement sur l'ADNccc dans le foie de souris humanisées infectées par le VHB. Le développement de l'utilisation de la ddPCR pour la quantification de l'ADNccc est donc un atout pour la suite du projet. Ce gain de sensibilité devrait nous permettre de quantifier l'ADNccc dans des biopsies de patients et ainsi de déterminer l'efficacité de traitement à long terme. Les techniques actuellement utilisées en routine comme la qPCR s'accompagnent d'un taux important de faux négatifs qui sont

nettement diminués par la ddPCR. Une telle technologie devrait permettre de mieux appréhender le devenir de la maladie chez des patients infectés chroniquement et de statuer sur la continuité des traitements.

Cette technique présente certaines limites. Pour les concentrations élevées, il est nécessaire de passer par la qPCR ou bien de diluer l'échantillon ce qui peut apporter un biais de quantification.

Bien que la sensibilité de la ddPCR soit plus élevée, sa spécificité n'est pas augmentée. En effet, la détection de l'ADNccc doit toujours passer par une étape de digestion de l'ADN linéaire et circulaire simple brin via la T5 ou la PSAD et le risque de contamination par l'ADNrc est toujours présent.

D'autre part, le temps d'acquisition des résultats en ddPCR est plus long que celui de la qPCR malgré un temps de manipulation identique. En effet, la technique nécessite le transfert de la plaque dans différents lecteurs et exige une étape de génération des gouttelettes qui augmente le temps d'acquisition. Le délai pour l'obtention des résultats rend donc cette technique difficile à développer en routine. Il faut aussi noter un coût de réactif plus important pour la ddPCR.

La mise au point de la détection d'évènements rares améliore la précision sur la quantification en réduisant le nombre de faux négatifs. Mais cette méthode nécessite l'utilisation de grande quantité d'échantillons ce qui la rend peu transposable pour des échantillons précieux comme les biopsies, dont le volume est parfois insuffisant pour obtenir un nombre de réplicas significatifs et impose parfois une seule tentative de quantification.

Enfin la ddPCR nécessite de nombreuses mises au point afin de certifier les résultats. Il est parfois difficile de séparer le cluster positif et le cluster négatif et en cas de concentration élevée, la quantification peut donc varier. Il est donc nécessaire de bien homogénéiser les échantillons afin de réduire « la pluie » de gouttelettes que l'on peut observer entre le cluster positif et négatif.

La ddPCR est donc une technique innovante qu'il est important d'inclure dans les efforts internationaux actuels visant à standardiser les technologies de détection de l'ADNccc et pour évaluer l'effet de nouvelles thérapies visant à réduire la taille de ce pool.

---

## Axe II :

---

*Utilisation de la ddPCR pour la quantification de l'ADNccc dans des biopsies de patients infectés chroniquement par le VHB.*

## 1 Objectifs

Actuellement, les traitements contre l'infection chronique par le VHB ne permettent pas d'éradiquer la maladie due à la persistance de l'ADNccc dans les noyaux des cellules. Une seule copie de ce minichromosome est suffisante pour permettre la réactivation de la réplication virale en cas d'arrêt de traitement.

Des modèles mathématiques suggèrent que seul un traitement à long terme serait nécessaire pour parvenir à l'élimination de l'ADNccc (Boyd et al. 2016a; Werle–Lapostolle et al. 2004). Le manque de sensibilité des méthodes actuelles pour la détection et la quantification de cet ADN telles que la qPCR, ne permettent pas d'évaluer l'efficacité de ces traitements à long-terme ce qui rend difficile la décision de l'arrêt du traitement.

Nous avons présenté dans l'axe 1 les résultats de la mise en place d'une nouvelle technologie de la quantification de l'ADNccc : la ddPCR. Le deuxième objectif de cette thèse est d'utiliser cette technologie sur des biopsies de patients infectés chroniquement par le VHB pour compléter la validation de cet outil, mais également pour évaluer les traitements à long terme sur ces patients. En effet, l'acquisition de nouvelles informations sur ce type de patient est primordiale dans l'accompagnement et dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'ADNccc.

Nous avons pu utiliser les biopsies hépatiques réalisées dans le cadre de trois cohortes :

- La première cohorte appartient à l'étude PEGAN dont le but était d'évaluer la combinaison du PEG-IFN avec un traitement par analogues nucléos(t)idiques.
- La deuxième cohorte est une étude sur des patients traités à long terme pendant trois à cinq ans par la Telbivudine. Ces patients ont été comparés avec des patients non traités.
- La troisième cohorte est une étude sur des biopsies de patients ayant bénéficié d'une transplantation hépatique dans le cadre du traitement d'une infection chronique par le VHB.

Ainsi, l'objectif de cet axe est d'utiliser la ddPCR pour quantifier l'ADN dans des biopsies hépatiques des patients étudiés dans ces trois cohortes.

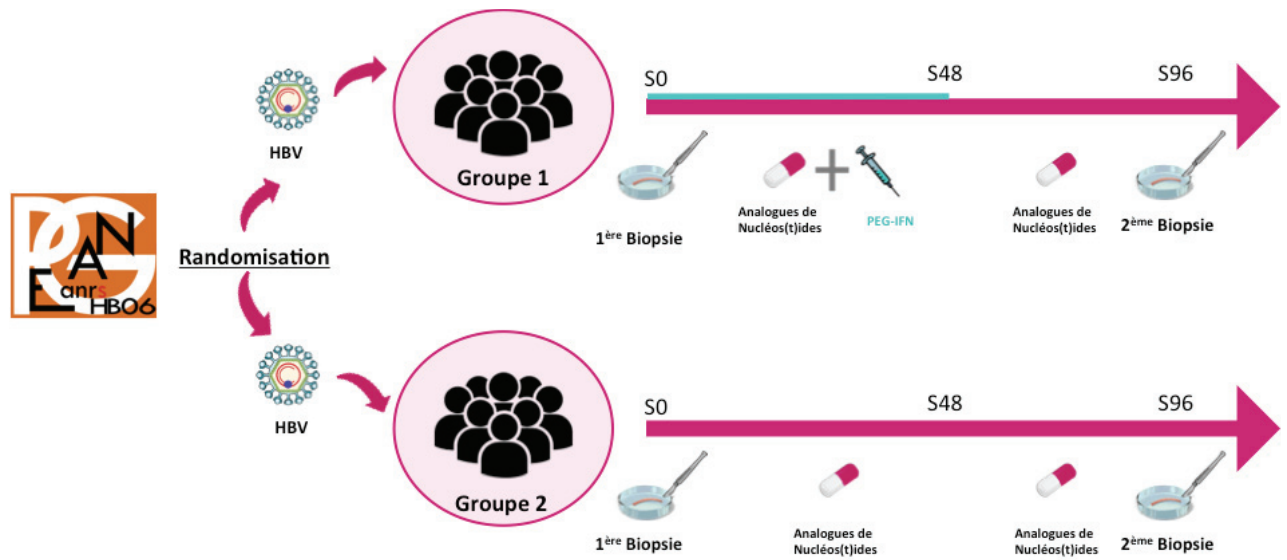


Figure 64 : Procédure expérimentale suivie par les patients inclus dans la cohorte PEGAN

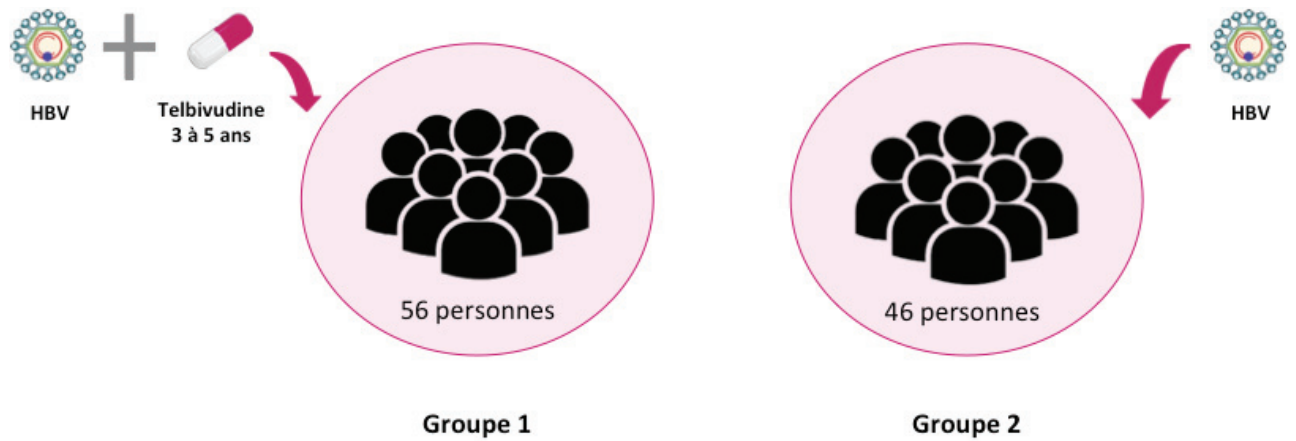


Figure 65 : Procédure expérimentale suivie par les patients inclus dans la cohorte de patients traités par la Telbivudine

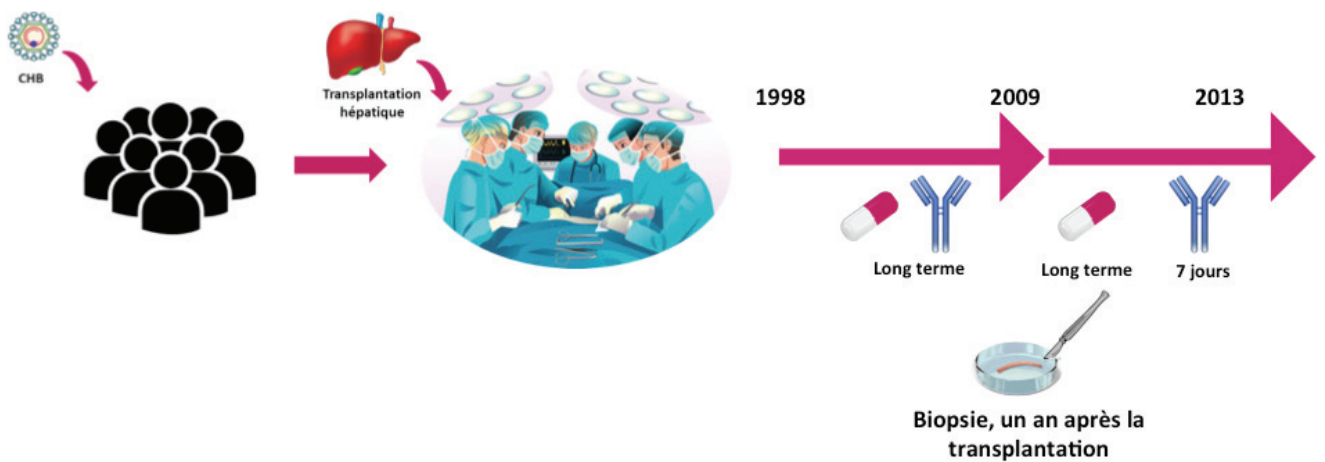


Figure 66 : Procédure expérimentale suivie par les patients inclus dans la cohorte de transplantés hépatiques de l'hôpital de Beaujon

## 2 Matériels et Méthodes

### Données sur les cohortes

#### *Cohorte PEGAN :*

Les patients inclus dans cet essai ouvert, contrôlé et randomisé étaient âgés de 18 à 75 ans et atteints d'une hépatite B chronique avec des antigènes HBe négatifs. Ils présentaient une charge virale négative pour l'ADN de VHB et ont été traités pendant au moins un an par analogues nucléos(t)idiques dans trois services de soins tertiaires en hépatologie en France. Les critères d'inclusion étaient :

- Une concentration en ALAT inférieure ou égale à cinq fois la limite normale supérieure
- Une concentration dans le sérum de l'alpha foetoprotéine inférieure à 50ng/mL
- Un test de grossesse négatif pour les femmes.

Les critères d'exclusion étaient :

- Une contre-indication pour le PEG-IFN
- Présence d'un CHC

Les patients ont été répartis aléatoirement dans deux groupes *via* une liste générée informatiquement avec stratification par leur titre en antigènes HBs. Le premier groupe a reçu une injection sous-cutanée de 180µg de PEG-IFN par semaine pendant 48 semaines en plus de leur traitement par des analogues nucléos(t)idiques. Le deuxième groupe a continué de recevoir leur traitement par des analogues nucléos(t)idiques seulement. Pour chaque patient de notre étude, une première biopsie a été réalisée le jour de l'inclusion et une seconde 96 semaines après le début de l'essai clinique (Bourlière et al. 2017) (Figure 64).

#### *Cohorte de patients traités par la Telbivudine :*

Cette cohorte a comparé deux groupes de patients :

- Un premier groupe de 56 patients avec une mono-infection pour l'hépatite B chronique traités par la Telbivudine pendant 3 à 5 ans. Les données cliniques et virologiques ont été collectées au début de l'étude et à la fin de l'étude. Les biopsies de ces patients ont été réalisées à la fin de l'étude puis les échantillons ont été congelés pour effectuer les analyses d'ADN et d'ARN.

- Un deuxième groupe de 46 patients qui ont été inclus rétrospectivement dans la cohorte. Ces patients étaient suivis pour une hépatite B chronique sans co-infection à l'hôpital universitaire de Lyon. Au moment de la biopsie, aucun d'entre eux ne recevaient de traitement ni n'avaient été traités antérieurement. Les biopsies hépatiques de ce groupe ont été effectuées pour des indications cliniques et une partie des échantillons ont été congelés pour être utilisées dans des recherches après l'obtention du consentement des patients. Ce protocole a été approuvé par le comité éthique de Lyon (Figure 65).

#### *Cohorte de transplantés hépatiques de l'hôpital de Beaujon :*

Les patients de cette cohorte ont bénéficié d'une transplantation hépatique pour traiter une infection par le VHB, à l'hôpital de Beaujon entre 1998 et 2013. Ces greffes hépatiques ont été réalisées soit dans un contexte de cirrhoses avec ou sans CHC soit dans le cadre d'une hépatite fulminante. Les biopsies ont été réalisées le jour de la transplantation et un an post transplantation.

Entre 1998 et 2009, la prévention contre la réinfection par le VHB était réalisée par une combinaison d'analogues de nucléos(t)idiques avec un traitement à long terme par des immunoglobulines HB. A partir de 2009, avec l'arrivée d'analogues de nucléos(t)idiques de seconde génération (entécavir et ténofovir), la méthode de prévention a été changée. Le traitement par analogues de nucléos(t)idiques a été débuté immédiatement après la transplantation et s'est poursuivi de façon indéterminée, les immunoglobulines HB ont été administrées pendant 7 jours seulement. Pour cette cohorte, trente-trois biopsies ont été analysées (Figure 66).

#### **Extraction d'ADN et ARN des échantillons de biopsie**

L'ADN et l'ARN ont été extraits à partir des biopsies congelées de foies humains. Les échantillons de foie ont d'abord été homogénéisés dans de la glace avec le « Tissue ruptor » (Quiagen) dans un tampon d'homogénéisation (TRIS HCL pH8 50mM ; EDTA 1mM, NaCL 150mM) puis divisés en trois pièces pour procéder à l'extraction et la purification de l'ADN et de l'ARN respectivement et la CHIP. Après une digestion par la protéinase K, l'ADN a été extrait *via* le kit « MAsterPUre » (Epicentre) en suivant les recommandations du fabricant. L'ARN lui a été extrait en utilisant le kit « Nucléospin Total RNA and protein isolation » (Macherey-Nagel). Une fois l'extraction faite, l'ARN a été rétrotranscrit en

utilisant le kit de la « superscript III » (Thermo Fisher). Une partie de l'ADN a été digérée par la PSAD pour la quantification de l'ADNccc. L'ADN et l'ARN ont ensuite été quantifiés par la technique de qPCR ou ddPCR.

### **Quantification ADN et ARN par qPCR**

La quantification de l'ADN ou de l'ARN du VHB a été effectuée à partir d'un thermocycleur quantitatif (Applied Biosystem). La transcription inverse de l'ARN du VHB a été réalisée à partir du protocole du kit de la « Superscript III » (Thermo Fisher). La réaction de qPCR se fait avec des amorces et une sonde Taqman dont les séquences sont listées dans le tableau 4. Ces amorces sont spécifiques respectivement pour l'ADNccc, et l'ARNpg dont la séquence a été adaptée à partir de la publication de Volz et *al.*

Pour avoir un nombre de copies de particules virales par cellules, l'ADNccc est normalisé avec le gène de la  $\beta$ -globine dont la quantification est réalisée en duplex. L'ARNpg est normalisé par rapport à un gène de ménage, GusB, pour permettre de faire l'analyse relative du gène viral. Les amorces de la  $\beta$ -globine, de GusB et de l'ADNrc du VHB sont des amorces fournies par Life Technologies.

Des dilutions en série ont été effectuées avec le plasmide pBR 322 pour la gamme standard allant de  $10^7$  copies à  $10^2$  copies. Les réactions de qPCR ont été réalisées selon les cycles décrits dans le tableau 5 et 6.

### **Quantification ADN et ARN par ddPCR**

La quantification de l'ADN et l'ARN du VHB a été réalisée avec le QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 25  $\mu$ L de la réaction de ddPCR comprend du Supermix 2X ddPCR (Bio-Rad, Pleasanton, CA, USA), 900 nmol/L de mélange d'amorces avec une sonde (dont les séquences sont référencées dans le tableau 4) et 5  $\mu$ L de matrice d'ADN ou d'ARN de l'échantillon à quantifier. La plaque a été ensuite déposée dans l'automate générateur de gouttelettes (AutoDG) avec les consommables nécessaires pour permettre le partitionnement de l'échantillon à 20 000 gouttelettes environ.

Cet automate utilise la microfluidique qui permet l'émulsion entre l'huile et les échantillons, pour générer des gouttes de la taille d'un nanolitre recommandée pour l'analyse en ddPCR. La plaque de PCR a été ensuite scellée avec un film perçable via PX1™

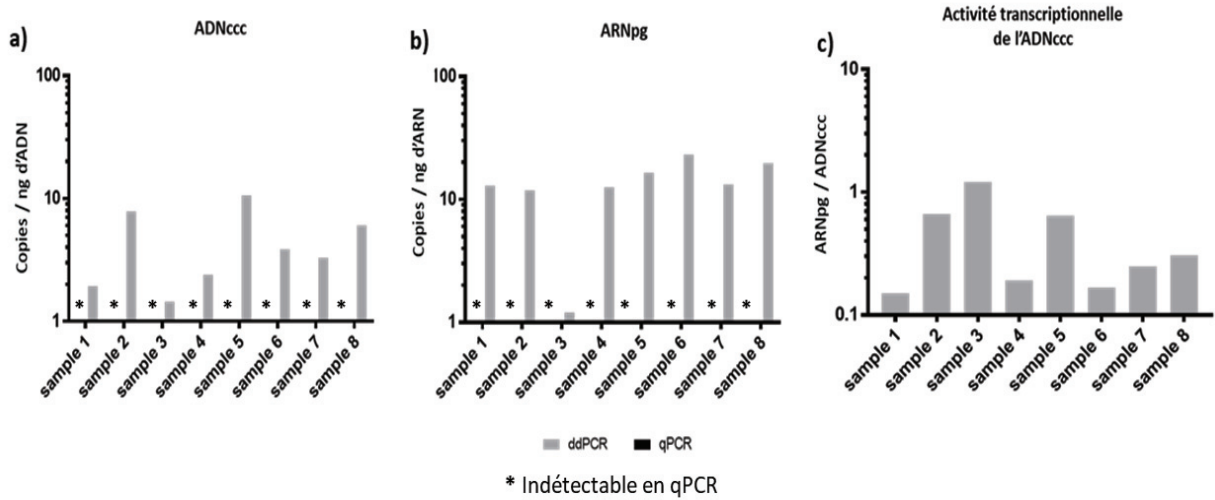


PCR plate sealer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) et l'amplification a été réalisée à l'aide du thermocycleur C1000 Touch™ deep-well (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

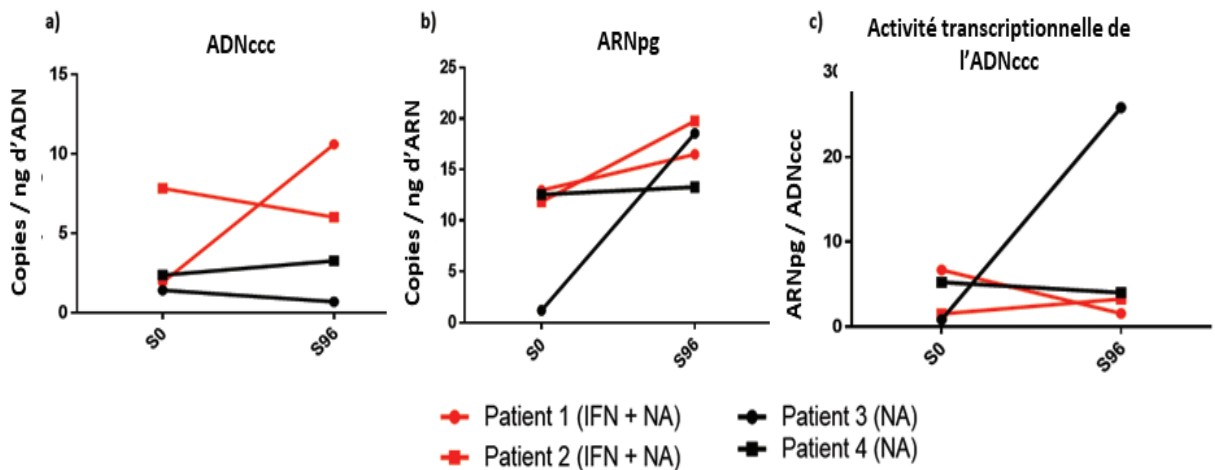
L'amplification par PCR a été réalisée avec le protocole décrit dans le tableau 7. La plaque a été ensuite refroidie à 4°C. Après l'amplification, la plaque a été placée dans le lecteur QX100 Droplet Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Le signal de fluorescence des gouttes a été analysé à l'aide du logiciel QuantaSoft™ analysis software version 1.7 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Deux niveaux de fluorescences différents ont été visualisés correspondant au cluster positif (présence d'amplification) et au cluster négatif (absence d'amplification). Un seuil de fluorescence donné a été fixé pour l'ensemble des échantillons permettant de séparer ces deux clusters. La concentration absolue de chaque échantillon est automatiquement calculée par le logiciel de ddPCR en calculant le ratio des gouttelettes positives sur le nombre de gouttelettes totales combiné avec la loi de Poisson.

### **Chromatine immunoprécipitation (μChIP)**

Pour le « cross-linking », la biopsie a été mise dans du PBS 1x avec du formaldéhyde 1% et incubée 5 min à température ambiante. La réaction de « cross-linking » a été arrêtée par une solution de glycine à la concentration finale de 0.125M. Les échantillons ont été lavés deux fois avec du PBS froid et centrifugés à 470g pendant 10 min à 4°C. Les échantillons peuvent être stockés à cette étape à -80°C. Après les étapes de lavage, les échantillons ont été re-suspendus dans un tampon de sonication (SDS 1% ; EDTA 10 mM ; TRIS –HCL pH8 50mM) puis ont été incubés 5 min dans de la glace. Les échantillons ont été ensuite traités dans le sonicateur pendant deux cycles de 30 secondes « on » et 30 secondes « off » puis ont été centrifugés pendant 10 min à 4°C à 12 000g. Le surnageant a été prélevé et une nouvelle centrifugation a été effectuée pendant 10 min à 4°C à 12 000g. Le surnageant a été à nouveau récolté et mis avec le premier surnageant prélevé pour un nouveau cycle de sonication et une nouvelle centrifugation a été effectuée pendant 10 min à 4°C à 12 000g. Puis la chromatine a été incubée avec les anticorps anti-K27Ac (3μg), anti-K56Ac (5μg), anti-k9me3 (3μg), anti K27me3 (3μg) pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons ont été lavés quatre fois à l'aide de portoir magnétique avec du RIPA contenant du PIC et PMSF puis avec du tampon d'élution (Tris-HCL pH 7.5 à 20mM ; EDTA 5mM ; NaCl 50mM ; SDS 1% ; Protéinase K 50μg et PIC 1X). Les échantillons ont été incubés pendant 2h à 68°C à 1300 rpm avant l'extraction au phénol chloroforme isomylalcohol.



**Figure 67 :** Quantification par ddPCR et qPCR de l'ADNccc et l'ARNpg dans des biopsies hépatiques  
 a) Quantification de l'ADNccc en copies par quantité d'ADN par ddPCR et qPCR. b) Quantification de l'ARNpg en copies par quantité d'ARN par ddPCR et qPCR. c) Evaluation de l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc par la mesure du ratio entre l'ARNpg et l'ADNccc.



**Figure 68 :** Quantification par ddPCR de l'ADNccc et de l'ARNpg dans les biopsies hépatiques de chaque patient analysé. S0 correspond à la biopsie faite le jour de l'inclusion. S96 correspond à 96 semaines après le début de l'étude a) Quantification de l'ADNccc en copies par quantité d'ADN. b) Quantification de l'ARNpg en copies par quantité d'ARN. c) Evaluation de l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc par la mesure du ratio de l'ARNpg et l'ADNccc.

### 3 Résultats

#### **Evaluation de l'ADNccc et de son activité transcriptionnelle dans la cohorte PEGAN :**

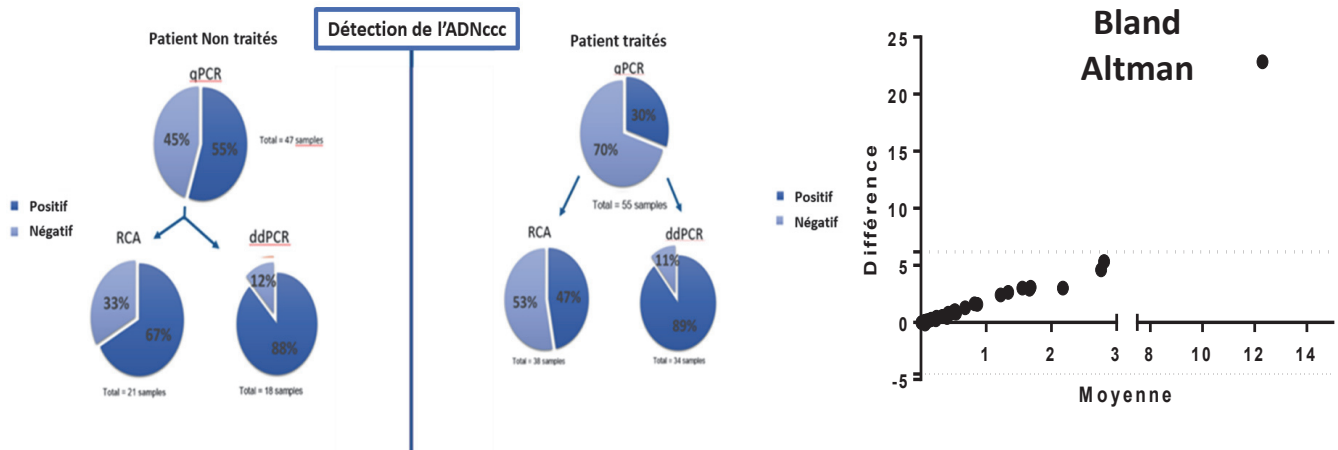
Pour cette cohorte 4 patients ayant eu une paire de biopsies ont été étudiées avec deux patients dans chaque groupe. Les biopsies ont été analysées en ddPCR et qPCR pour la quantification de l'ADNccc et l'ARNpg. Les échantillons étant faiblement concentrés, seule la technique en ddPCR a permis d'obtenir des résultats (figure 67). L'ensemble des résultats par qPCR ont été négatifs. L'analyse en ddPCR a confirmé la présence de l'ADNccc dans ces échantillons de biopsies ainsi que la présence de l'ARNpg. La présence de l'ARNpg indique donc que l'ADNccc est présent et transcriptionnellement actif. Pour évaluer son activité, nous avons exprimé le ratio de la concentration de l'ARNpg sur la concentration de l'ADNccc. Ainsi, on peut constater que même si l'ADNccc est présent, son activité transcriptionnelle reste peu élevée.

L'évolution du taux de l'ADNccc et de l'ARNpg entre la première et la deuxième biopsie ont été ensuite présentée pour chaque patient (figure 68). Aucune conclusion ne peut être faite sur l'effet des traitements, compte tenu du faible nombre de patients. On peut simplement constater que tous les patients ont un taux de ADNccc détectable dans les deux groupes. Cependant, on peut remarquer que l'un des patients a présenté une augmentation de l'ADNccc alors qu'un autre patient ayant eu un traitement différent a présenté une augmentation de l'ARNpg entre la première et la deuxième biopsie. Cette augmentation peut s'expliquer par un biais d'échantillonnage lors du prélèvement de la biopsie.

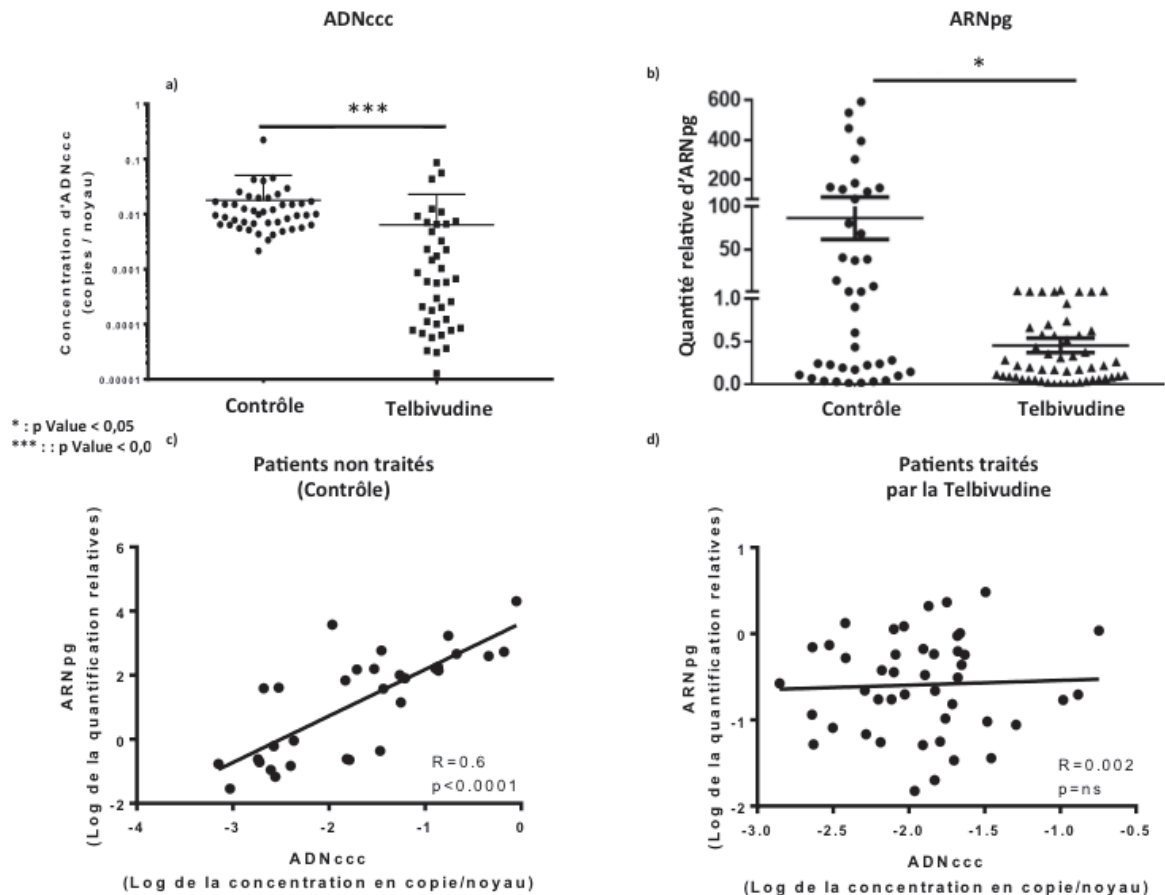
#### **Evaluation de l'ADNccc et de son activité transcriptionnelle dans la cohorte de patients traités par la Telbivudine**

Dans cette cohorte 56 patients traités à la Telbivudine et 42 patients contrôles ont été analysés afin d'évaluer la quantité d'ADNccc, de l'ARNpg et l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc.

L'analyse de l'ADNccc a été réalisée par la technique de qPCR, de RCA et de ddPCR pour affiner notre méthode de détection. La comparaison de ces différentes méthodes a permis de montrer une meilleure sensibilité de détection par la ddPCR. On constate ainsi



**Figure 69 :** Comparaison de la détection de l'ADNccc par la technique de qPCR, de RCA et de ddPCR dans le groupe de patients traités par la Telbivudine et le groupe contrôle. Analyse de Bland Altman validant la concordance de la ddPCR et qPCR pour la quantification de l'ADNccc.



**Figure 70 :** Quantification par ddPCR de l'ADNccc et par qPCR de l'ARNpg dans les biopsies hépatiques.

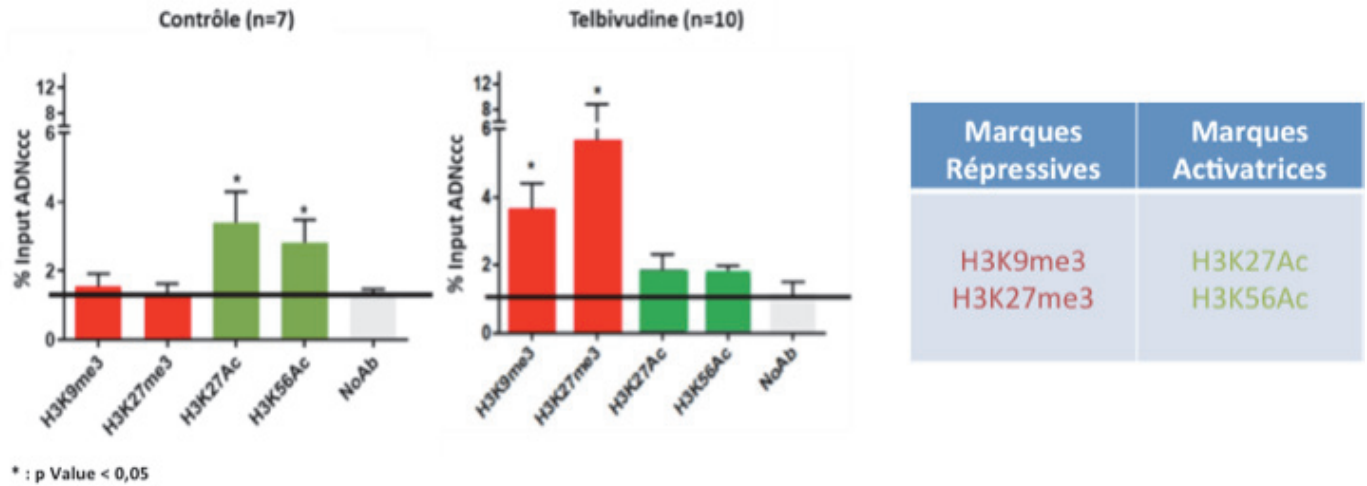
Selon le groupe de patients traités par Telbivudine et le groupe contrôle. a) Quantification de l'ADNccc en copies par noyau par ddPCR en fonction des deux groupes. b) Quantification relative de l'ARNpg par qPCR en fonction des deux groupes. c) Correspondance entre la quantification de l'ARNpg en fonction de la quantification de l'ADNccc chez patients non traités. d) Correspondance entre la quantification de l'ARNpg en fonction de la quantification de l'ADNccc chez patients traités par la Telbivudine.

que pour les patients non traités, 55% des patients étaient positifs pour l'ADNccc en qPCR. Parmi les 45% de patients négatifs en qPCR, 67% ont été positifs en ADNccc par la technique de RCA et 88% ont été positifs par la technique de ddPCR.

La même observation peut être faite chez les patients traités. On constate que, 30% des patients étaient positifs pour l'ADNccc en qPCR. Parmi les 70% de patients négatifs en qPCR, 47% ont été positifs en ADNccc par la technique de RCA et 89% ont été positif par la technique de ddPCR. On a aussi montré une meilleure détection de l'ADNccc par ddPCR. On peut noter que le pourcentage de détection de l'ADNccc est le même pour les patients traités et non traités. (Figure 69). L'analyse de Bland Altman a permis de comparer la ddPCR et la qPCR. Ainsi on constate la concordance entre les deux techniques surtout pour les plus faibles valeurs.

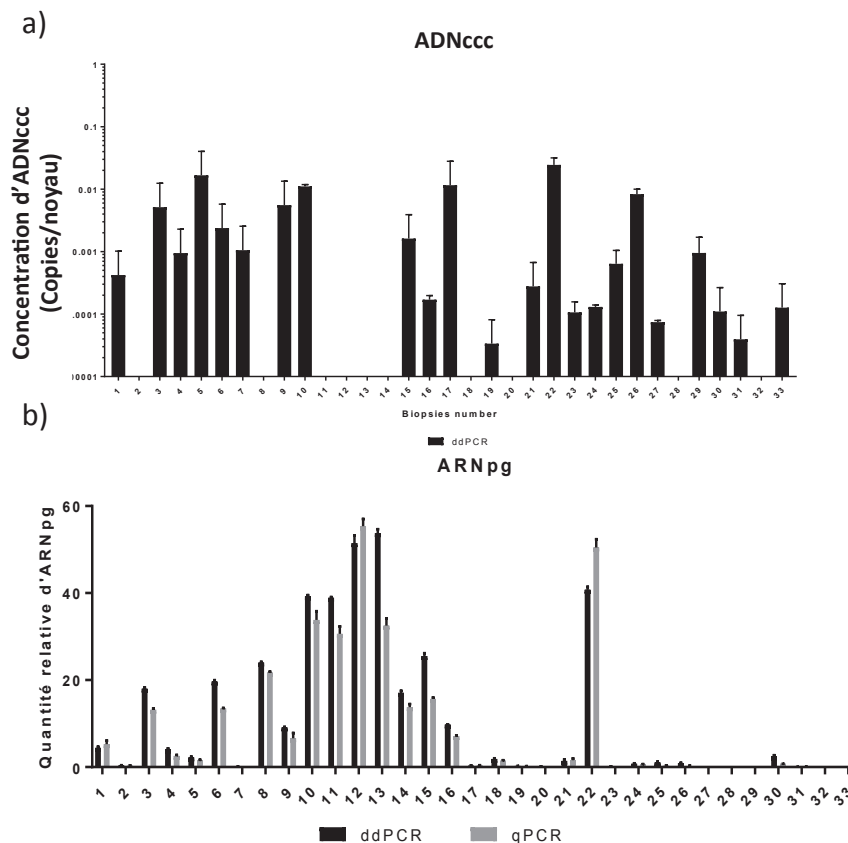
Au niveau quantitatif, on a constaté une diminution significative de l'ADNccc et de l'ARNpg. Afin d'évaluer l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc chez ces patients, une droite de corrélation entre l'ARNpg et l'ADNccc a été établit chez les patients contrôle et les patients traités par la Telbivudine. On constate ainsi une perte de la corrélation entre l'ARNpg et l'ADNccc chez les patients traités par la Telbivudine par rapport aux patients contrôle. (Figure 70).

Pour comprendre cette perte de corrélation que l'on peut observer chez les patients traités, des analyses de CHIP, sur 7 patients du groupe contrôle et sur 10 patients du groupe traités ayant eu le meilleur taux d'ADNccc, ont été réalisées avec des anticorps reconnaissant les modifications post traductionnelles des histones. Ainsi, on a pu constater, la présence d'enrichissement de marques répressives sur l'ADNccc chez les patients traités comparé au contrôle suggérant une diminution de la transcription de l'ADNccc (Figure 71). Une des hypothèses serait que la présence de la Telbivudine déclenche des mécanismes de répressions afin d'inhiber également la formation des ARN viraux et donc des particules subvirales.



**Figure 71 :** Evaluation de l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc par ChIP

a) Analyses de l'ADNccc, sur du matériel « crosslinkés » provenant des biopsies hépatiques dans les patients traités par Telbivudine et non traités. L'analyse a été effectuée en utilisant des anticorps contre les modifications post traductionnelles des histones. b) Tableau déterminant les modifications post traductionnelles des histones associées à une transcription négatives ou positive de l'ADNccc.



**Figure 72:** Quantification par ddPCR et qPCR de l'ADNccc et l'ARNpg dans les biopsies hépatiques.

a) Concentration de l'ADNccc en copies par noyau. Les concentrations sont détectables uniquement en ddPCR. b) Variation de la quantité d'ARNpg (Fold change) en fonction d'un gène de ménage cellulaire (GusB).

### **Evaluation sur l'ADNccc et de son activité transcriptionnelle dans la cohorte de transplantés hépatique de l'hôpital de Beaujon**

L'analyse des échantillons de cette cohorte a été réalisée en aveugle, sans connaître le groupe auxquels ils appartiennent. Pour l'ADNccc, tous les résultats en qPCR ont été indétectables. Pour la ddPCR, 23 échantillons ont été quantifiables pour l'ADNccc et 10 échantillons ont été indétectable pour l'ADNccc. Par contre, l'ARNpg a été détecté par les deux technologies compte tenu des concentrations plus élevées cet ARN. La présence de l'ARNpg suggère que l'ADNccc, même en faible quantité, est transcriptionnellement actif (Figure 72).

Sur les 33 échantillons analysés par ddPCR et qPCR, les corrélations avec les données cliniques ont été disponibles pour 26 échantillons seulement. Des analyses faites par les cliniciens de l'étude ont également montré qu'il n'y avait pas de différence entre les patients ayant reçu le traitement par Ig antiHBs à long terme (20 échantillons) par rapport aux patients ayant reçu le traitement par Ig antiHBs à court terme (6 échantillons). De plus, il semblerait qu'il n'y a pas de différences sur les paramètres viraux en fonction du statut des anticorps anti-HBc antigènes du donneur.

## 4 Discussion

Actuellement, les techniques de quantification de l'ADNccc ne sont pas assez sensibles pour détecter de faible quantité dans cet ADN dans des échantillons faiblement concentrés comme les biopsies. Ce manque de technologie ne permet pas d'évaluer et d'estimer correctement les effets des traitements.

Au cours de cette thèse, le premier axe de recherche a permis de mettre au point la technique de ddPCR pour la quantification de l'ADNccc. Nous avons montré que cette technique permettait un gain de la sensibilité de deux log par rapport à la qPCR. La discussion de cet axe se portera principalement sur des aspects techniques. Les aspects biologiques et cliniques seront abordés dans la discussion générale.

Nous avons utilisé la ddPCR pour évaluer les paramètres viraux dans trois cohortes de biopsies différentes. Nos résultats ont montré que les mises au point effectués dans le premier axe étaient suffisantes pour permettre la quantification de l'ADNccc et de l'ARNpg dans des échantillons de biopsies. Aucune mise au point supplémentaire n'a été nécessaire. Ni la composition de l'échantillon clinique, ni les conditions de stockage de ces échantillons n'ont interféré dans l'amplification des cibles.

Nos résultats ont montré que la spécificité de la qPCR et de la ddPCR était identique puisque nous avons pu obtenir les mêmes résultats sur la quantification de l'ARNpg dans la dernière cohorte de patients.

L'analyse de l'ADNccc dans ces cohortes confirme également la meilleure sensibilité de la ddPCR par rapport à la qPCR. Sur les biopsies analysées, la détection de l'ADNccc par qPCR a été possible dans seulement 36% des échantillons de la deuxième cohorte. La quantification de l'ADNccc dans les autres échantillons a été obtenue uniquement en ddPCR, car ils étaient en limite de détection de la qPCR.

De plus, une meilleure sensibilité de la ddPCR par rapport à la technique RCA a été démontrée dans l'étude de la seconde cohorte. Nous avons montré une augmentation de la sensibilité de 20% dans la détection de l'ADNccc. Il est important de constater que ce pourcentage de détection et d'augmentation de sensibilité n'est pas affecté par le traitement à long terme.



L'analyse de ces cohortes confirme l'utilisation de la ddPCR en deuxième intention. En effet, l'absence de gain en spécificité pour des fortes concentrations et l'augmentation de la sensibilité pour des faibles concentrations permettent de proposer l'utilisation de la qPCR pour identifier les échantillons faiblement concentrés et d'appliquer la ddPCR uniquement pour ces échantillons. Ceci présenterait un intérêt en terme de temps et de coût.

Cependant, certaines limitations sont encore à prendre en compte.

Premièrement, certains échantillons sont encore négatifs en ddPCR, notamment dans la dernière cohorte étudiée. Les résultats montrent une absence de détections de l'ADNccc alors qu'on détecte de l'ARNpg dans ces mêmes échantillons. Deux hypothèses peuvent être faites :

- La première hypothèse est qu'il existe une limite de détection de l'ADNccc par la ddPCR. Pour améliorer la sensibilité, la technique de détection par événements rares pourrait être envisagée. Cependant, elle nécessite un volume d'échantillon important.
- La seconde hypothèse est que le traitement par la PSAD a été trop délétère pour l'ADNccc entraînant son élimination. En effet, les conditions de stockage des biopsies, les cycles de congélation et de décongélation ainsi que les conditions de transports peuvent altérer certains échantillons les rendant plus sensible à la DNase.

Deuxièmement, comme évoqué dans l'axe 1, cette quantification est dépendante d'une DNase qui a un effet possible sur la détection des faux négatifs et des faux positifs. En effet, l'utilisation d'une DNase ne permet pas de se défaire à 100% de possible contamination par l'ADNrc. La spécificité de la technique dépendant également de l'efficacité de l'enzyme.

Malgré ces limites, la ddPCR apporte un avantage considérable pour la détection de l'ADNccc dans des biopsies de patients traités. Elle permet de mieux évaluer l'efficacité des traitements et confirme la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## 5 Article

Les résultats de la cohorte des patients traités par la telbivudine ont permis l'écriture d'une publication en concordant les données cliniques et virologiques dont la manuscrit est ci-joint.

### **HBV cccDNA amount, activity and epigenetic status in long-term nucleoside analogue-treated patients**

Fanny Lebossé<sup>1,2,3</sup>, Aurore Inchauspé<sup>1,2</sup>, Maëlle Locatelli<sup>1,2</sup>, Clothilde Miaglia<sup>1,2,3</sup>, Judith Fresquet<sup>1,2</sup>, Kamal Hamed<sup>4</sup>, Barbara Testoni<sup>1,2</sup> and Fabien Zoulim<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Cancerology Research Center of Lyon, INSERM U1052, Lyon, France

<sup>2</sup>Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France

<sup>3</sup>Hepatology Unit, Croix Rousse Hospital, Hospices Civils of Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup>Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ, USA

\* Corresponding author: Pr Fabien Zoulim

Cancer Research Center of Lyon, INSERM U1052

151, cours Albert Thomas

69003 Lyon

France

Tel: +33 4 72 68 19 70

## ABREVIATIONS

BL: Baseline

cccDNA: covalently closed circular DNA

CHB: chronic hepatitis B virus

ChIP: Chromatin ImmunoPrecipitation

ddPCR: digital droplet PCR

EP: End point

HBeAg: HBe Antigen

HBV: Hepatitis B Virus

HCC: Hepatocellular carcinoma

HIV: Human Immunodeficiency Virus

NUCs: Nucleos(t)ides Analogues

PEG-IFN: pegylated interferon

pgRNA: pregenomic RNA

qPCR: quantitative PCR (polymerase chain reaction)

RCA: Rolling Circle Amplification

rcDNA: relaxed circular DNA

## ABSTRACT

The covalently closed circular DNA (cccDNA) in the nucleus of infected cells is the hallmark of hepatitis B virus (HBV) infection. Its persistence in the host liver contributes to the chronicity of HBV infection and is responsible of viral reactivation after treatment withdrawal or recovery, under certain clinical conditions. Long-term antiviral therapies achieve viral suppression and are associated to decrease in the cccDNA pool. Nevertheless, they are unable to eliminate cccDNA from the infected cells, but evident limitations in the currently available techniques for cccDNA quantification prevent a correct and reliable detection of cccDNA in very low-viremic samples. We demonstrate that the use of droplet digital PCR (ddPCR) provides a useful tool to detect cccDNA in samples that scored negative using quantitative PCR and rolling circle amplification (RCA). In a cohort of long-term telbivudine treated patients, ddPCR allowed to detect and quantify cccDNA in 98% in tested samples, compared to only 30% detected by qPCR. Moreover, chromatin immunoprecipitation analysis of histone post-translational modifications associated to residual cccDNA associated to ddPCR indicates an enrichment in marks associated to repressed transcription, providing, for the first time, data on the epigenetic regulation of cccDNA under antiviral therapy *in vivo*. Altogether, we give evidence that the large majority of NUC-treated patients still harbor quantifiable cccDNA in their liver and that its epigenetic status could be different from treatment-naïve patients, thus providing new knowledge that could help in the evaluation of new combinatorial therapeutic strategies.

## INTRODUCTION

Almost 300 million people worldwide are chronically infected with Hepatitis B Virus (HBV) and consequently exposed to an increased risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) <sup>1</sup>. The hallmark of HBV infection is the presence of the covalently closed circular DNA (cccDNA) in the nucleus of infected cells <sup>2</sup>. The intrahepatic cccDNA is a stable episomal viral “minichromosome”, formed after the virus entry in the hepatocyte. It serves as the unique template for all viral RNAs production, comprised the pregenomic (pg)RNA <sup>2,3</sup>. The persistence of cccDNA in the host liver contributes to the chronicity of HBV infection and is responsible of viral reactivation after recovery, under certain clinical conditions, or treatment withdrawal <sup>4,5</sup>. New therapeutic strategies targeting cccDNA contingent or its replication are needed to eradicate HBV infection and two main objectives have been identified: intrahepatic cccDNA clearance (virological cure) or “silencing” (functional cure) <sup>6</sup>.

Nucleos(t)ides Analogues (NUCs) are the main drugs currently used for HBV treatment; they target the viral polymerase, blocking pgRNA reverse transcription and so infectious virion formation <sup>3</sup>. Although NUCs treatments enable an efficient control of viral replication, they have no direct effect on cccDNA. HBV replication could resume after NUCs cessation and virological relapses are often observed. A decrease of cccDNA amount after short or long course of NUCs therapy has been reported by different authors *in vitro* and *in vivo*, explained by the dilution of the intrahepatic pool of cccDNA mediated by cell divisions <sup>3,7-13</sup>. In a recent study, Lai *et al.* failed to detect any intrahepatic cccDNA for half of the 43 patients after 10 years of NUCs treatment, whereas some of the cccDNA-negative samples were positive for pgRNA and total intrahepatic HBV DNA <sup>13</sup>. These results questioned the sensitivity of the current cccDNA quantification techniques. This technical issue is crucial since the assessment

of new therapeutic strategies targeting virological cure, that is to say aiming to clear cccDNA will require the development of reliable HBV DNA detection techniques, adapted to *in vivo* studies and to the low levels of total DNA extracted from liver biopsies <sup>6</sup>.

To achieve HBV functional cure, therapeutic strategies targeting cccDNA “silencing” rather than its eradication are developed <sup>6</sup>. The viral minichromosome is epigenetically regulated by host and viral factors, the viral replication being activated or repressed at different levels. The cccDNA epigenetic regulation could be studied by Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) and the assessment of associated histone acetylation/deacetylation, methylation or DNA methylation <sup>4,14-16</sup>. The feasibility and interest of epigenetic studies by ChIP on liver biopsies samples from NUCs-treated patients has not been explored and to our best knowledge, no data have been reported regarding epigenetic modifications on cccDNA during NUCs treatment.

We took advantage of a cohort of 56 patients treated for 3 to 5 years with the nucleosides analogue Telbivudine to study intrahepatic viral markers *in vivo*, which could be relevant for the assessment of new HBV cure strategies, based on cccDNA clearance or “silencing”. We reported and compared intrahepatic viral DNA levels, measured by different techniques, including a high sensitive method allowing low levels quantification and suitable for *in vivo* studies in the context of HBV cure strategies. We also related for the first time the epigenetic characteristics of intrahepatic cccDNA after long term telbivudine treatment and suggested some epigenetic modulations under NUCs therapy. These results bring new insights into the *in vivo* efficacy of therapeutic strategies developed to cure HBV infection by targeting either cccDNA clearance or “silencing”.

## PATIENTS AND METHODS

*Patients*

Fifty-six patients (46 males and 10 females) from the clinical trial NV-02B-015 (Novartis Pharmaceuticals) were prospectively enrolled for the CLDT600ACN04E1 study, an extension of CLDT600ACN04E study assessing the efficacy and safety in fourth to sixth year of Telbivudine treatment in patients with Chronic Hepatitis B (CHB) (Novartis Pharmaceuticals). New consent was given and the study was approved by the competent ethical committee.

CHB patients had completed 3 to 5 years of Telbivudine therapy according to the NV-02B-015 and CLDT600ACN04E1 clinical trials and the treatment was continued. Clinical and virological data were collected before beginning of treatment (baseline (BL) of NV-02B-015 study) and at the end of follow up (end point (EP) of CLDT600ACN04E1 study) (Supplementary Figure 1). Histology was assessed on liver tissue at BL and liver biopsy performed at EP snap frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  to subsequent viral markers analysis.

For the study of cccDNA epigenetic regulation features, 7 untreated CHB patients from an historical cohort were used as comparative samples. These 7 CHB patients underwent liver biopsy in the frame of their clinical follow-up and a fragment was preserved for research purpose after patient's consent and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The protocol was approved by institutional Ethic Committees.

None of the patients from the clinical trial or the historical cohort presented Human Immunodeficiency Virus (HIV), Hepatitis C virus or Hepatitis Delta virus co-infection.

*Viral load and serological assessment*

Serum Viral Load (VL), ALT levels, HBeAg, HBe and HBs serologies were established at BL and EP by Novartis Pharmaceuticals according to international standards.

*Intrahepatic total HBV DNA, cccDNA and pgRNA quantification using qPCR method*

DNA was extracted from snap-frozen liver biopsies using the Master Pure™ DNA Purification Kit (Epicentre®, Illumina® Company, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. High Pure RNA Paraffin Kit (Roche® Life Science, Indianapolis, USA) was used for RNA extraction. Quantity and integrity of the extracted DNA and RNA were assessed by NanoDrop™ Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Patients' samples were run in duplicate and in two independent experiments. Quantitative PCR were performed using specific primers and fluorescence hybridization probes previously described<sup>17</sup> and a Light Cycler® 480 Real Time PCR System (Roche diagnostics, Mannheim, Germany). Before cccDNA quantification, total DNA was treated with Plasmid-safe DNase (Epicentre®, Illumina® Company, Madison, USA), to avoid relaxed circular DNA (rcDNA) contamination. Serial dilutions of an HBV monomer plasmid (pHBV-*EcoR1*) were used as standard for quantification. Beta-globin quantification was performed in parallel to assess the amount of HBV DNA copies/cell<sup>17</sup>. Complementary DNA synthesis from intrahepatic RNA was performed using the SuperScript™ III first-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen by Life Technologies©, Carlsbad, United States). Specific primers and TaqMan® fluorescence hybridization probes were previously described by Volz *et al*<sup>18</sup>. Results were normalized over the housekeeping gene GUSB (Hs00939627\_m1, ThermoFischer Scientific).

*cccDNA detection using Rolling Circle Amplification (RCA)*



Rolling Circle Amplification (RCA) was performed as previously described<sup>19,20</sup>. We assessed the presence of intrahepatic cccDNA in qPCR negative samples using this one-step PCR method, specific of circular genomes in the absence of additional steps of completion and ligation (see Supplementary Methods for details). The presence of RCA products after amplification was assessed by two different methods: Southern Blot to confirm the successful procedure and full-length HBV genomic PCR amplification (forward primer\_P1: TTTTTCACCTCTGCCTAATCA; reverse primer\_P2: AAAAAGTTGCATGGTGCTGGTG) to allow cccDNA detection in samples with low HBV DNA levels<sup>21</sup> (Supplementary Figure 2).

#### *Intrahepatic total HBV DNA and cccDNA quantification by droplet digital PCR*

We quantified intrahepatic total HBV DNA and cccDNA by the QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad®) according to the manufacturer's instructions. Before cccDNA quantification, total DNA was treated with Plasmid-safe DNase (Epicentre®), to avoid rcDNA contamination. Briefly, the 25 µL ddPCR reaction comprised of 2X ddPCR Supermix for probes (no dUTP) (Bio-Rad®), 900 nM HBVcccDNA forward (5'-CCGTGTGCACTTCGCTTCA -3'), and reverse (5'-GCACAGCTTGGAGGCTTGA -3') primers, 250 nM HBV probe (5'-CATGGAGACCACCGTGAACGCCC-3'), and 5 µL of DNA sample. The plate were loaded with required consumables into the Automated Droplet Generator to partition the sample around 20, 000 droplets in 20µL. Then the PCR plate was amplified in the C1000 Touch™ thermal cycler (Bio-Rad®). The cycling PCR were as follows: an initial enzyme activation of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of denaturation for 30s at 94 °C, annealing for 60s at 60 °C (ramping rate set to 2 °C/s), and a final incubation for 10 min at 98 °C, ending at 4 °C. After amplification, the plate was placed into the QX100 Droplet Droplet Reader (Bio-Rad®). The ddPCR data were analyzed using the QuantaSoft analysis software (Bio-Rad®). Positive droplets with higher fluorescent

signals and negative droplets with lower fluorescent signals were divided by applying a fluorescence amplitude threshold. The absolute concentration of each sample was automatically reported by the ddPCR software by calculating the ratio of the positive droplets over the total droplets combined with Poisson distribution. To obtain the HBV DNA concentration per cell, we quantified beta-globin in the same sample, using the ddPCR and the primers described above for qPCR method. The pBR322-HBV construct was used to assess linearity of ddPCR quantification and to compare it to qPCR.

#### *Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) from frozen liver biopsies*

ChIPs from liver biopsies were performed as described by Testoni *et al.*<sup>22</sup>. Briefly, frozen biopsies were removed from the freezer and immediately added with PBS/1% formaldehyde and incubated 10 minutes at room temperature. Crosslinking reaction was quenched with 0.125M glycine. After centrifugation, the cross-linked biopsy was resuspended in lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA, 1% SDS, protease inhibitors) and homogenized with the help of a pestle. Supernatant was then sonicated in a Bioruptor (Diagenode) for 2x30seconds cycles, diluted 1:10 in RIPA Buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% Na-deoxycolate, protease inhibitors) and incubated with Dynabeads® Protein G and 3µg of each antibody (ChIP-grade anti-H3K27Ac, H3K56Ac, H3K9me3, H3K27me3, Diagenode) overnight at 4°C rotating. After immunoprecipitation, washes and reverse crosslinking, the samples were extracted twice with phenol/chloroform, once with chloroform and ethanol precipitated in the presence of 30 µg of glycogen (Sigma Aldrich). Quantitative PCR was performed using cccDNA-specific primers and probes (see above).

#### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using Prism 7 software (Graphpad Software® San Diego, CA, USA). Mann Whitney U Test and Kruskal Wallis test were used to compare numerical data and Chi-square test was used to compare frequencies between groups, with Fischer exact test correction if necessary.

## RESULTS

### *Patients' characteristics and virological outcomes*

At the time of enrollment, all of the patients presented a chronic hepatitis status, according to the new nomenclature defined by the last EASL guidelines<sup>23</sup> : 37 were HBeAg-positive and 19 patients were HBeAg-negative and all had transaminases levels higher than ULN. The median age was 29 years old, HBeAg-positive patients being significantly younger than HBeAg-negative ones. Patients were infected with HBV genotype C (n=43) or genotype B (n=13) (Table 1). Baseline viral load (VL) and ALT levels tended to be higher for HBeAg-positive patients, and the duration of telbivudine treatment was similar between the 2 groups (median 234, 208 and 260 weeks, respectively in the entire cohort, HBeAg-positive and HBeAg-negative group) (Table 1). Before treatment, the majority of the patients showed low histological scores of necroinflammatory activity and fibrosis although HBeAg-negative patients showed a significant higher proportion of patients with advanced fibrosis (Supplementary Figure 3).

At end point, i.e. one year after enrolment in CLDT600ACN04E study and after three to five years of telbivudine therapy, 28 of the 37 (76%) HBeAg-positive patients had lost HBeAg and 15 (40%) had experienced HBe seroconversion (Table 2). VL was undetectable for 26 patients (17 HBeAg-positives and 9 HBeAg-negative), without any significant difference in frequency between HBeAg groups. Only two baseline HBeAg-positive patients experienced HBeAg loss after telbivudine therapy (Table 2). All the patients had normalization of their ALT levels. No differences in BL age, VL and ALT levels were found between patients who had negative VL or not at end-point (Supplementary Table 1) and patients who had HBeAg loss and/or seroconversion or not (Supplementary Table 2).

### *Intrahepatic viral markers quantification after telbivudine treatment using the qPCR method*

Liver biopsy samples were available for all patients at end-point. Intrahepatic total HBV DNA (tHBV DNA), cccDNA and pgRNA were quantified using the qPCR method already described<sup>24</sup> and showed in Table 2. tHBV DNA levels after telbivudine therapy were less than 1 copy/cell in all the patients. These values are much lower than those published by our group using the same quantification method in a European cohort of untreated CHB patients (median  $1.9 \cdot 10^1$ ,  $2.3 \cdot 10^3$  and  $6.3 \cdot 10^0$  copies/cell respectively in total cohort and for HBeAg-positive and –negative patients)<sup>24</sup> or those recently reported by Lai et al. in an cohort of genotype B and C untreated CHB patients with another quantification technique (median  $2.86 \cdot 10^2$  copies/cell in total cohort)<sup>13</sup>. Intrahepatic cccDNA level was under the limit of detection for 39 out of 56 (70%) patients using the qPCR method. Baseline HBeAg-positive patients showed a higher proportion of detectable cccDNA than HBeAg-negative ones, where only two patients resulted cccDNA-positive by qPCR method (Table 2). Similarly to tHBV DNA, pgRNA, the main viral transcript, showed low intrahepatic levels after telbivudine treatment (median  $1.98 \cdot 10^{-1}$ ,  $2.08 \cdot 10^{-1}$  and  $1.98 \cdot 10^{-1}$  respectively for entire cohort, HBeAg-positive and –negative patients (Table 2)), especially for HBeAg-positive patients when compared to levels reported by our group using the same technique in a European cohort of untreated CHB patients (median  $1.62 \cdot 10^2$  for HBeAg-positive patients)<sup>24</sup>.

No differences for intrahepatic or intrahepatic tHBV DNA amount, cccDNA presence or pgRNA levels after telbivudine therapy was reported according to VL negativization, HBeAg loss and/or seroconversion (Supplementary Tables 1 and 2).

#### *Intrahepatic cccDNA detection using rolling circle amplification and droplet digital PCR*

To further investigate the presence cccDNA molecules in the liver samples with undetectable cccDNA by qPCR, we decide to perform two supplementary approaches: Rolling circle amplification (RCA) and digital droplet PCR (ddPCR). RCA was shown to be highly specific for complete circular forms of HBV genome and particularly adapted for the amplification of

cccDNA in liver tissue with low levels of viral replication<sup>19</sup>. Among the 39 samples with undetectable cccDNA by qPCR, 29 showed a positive signal after RCA analysis (Figure 1 and Supplementary Figure 4). Since the major limitation of RCA technique resides on the fact that it is not quantitative, we decided to use ddPCR, which has been recently shown to be more sensitive than qPCR in detecting HBV genome in low-level HBV infected samples<sup>25</sup>,<sup>26</sup>(+Mu et al, Scientific Reports 2017). In particular, we could confirm that ddPCR is 2 log more sensitive than qPCR both with in vitro and in vivo derived DNA samples and that the circular nature of cccDNA does not affect ddPCR quantification (Supplementary Figure 5). 27 out of 34 samples with undetectable cccDNA by qPCR that were tested both in RCA and ddPCR resulted positive for cccDNA signal with both approaches, while only 1 sample was positive only by RCA and ddPCR allowed to detect cccDNA in six more patients than RCA (Figure 1 and Supplementary Figure 3). As a whole, intrahepatic cccDNA assessment after combining qPCR and ddPCR results revealed detectable cccDNA for 50 out of 51 patients tested (Table 1, Figure 1 and Supplementary Figure 3). cccDNA levels quantified with ddPCR after telbivudine treatment had a median of  $4.43 \cdot 10^{-3}$ ,  $7.27 \cdot 10^{-3}$  and  $3.72 \cdot 10^{-3}$  copies/cell in the entire cohort and for HBeAg-positive and -negative patients, respectively (Table 3) and were much lower than the amount reported in a European cohort of untreated CHB patients by our group using the qPCR method (median  $1.8 \cdot 10^{-1}$ ,  $6.9 \cdot 10^0$  and  $1 \cdot 10^{-1}$  copies /cell respectively in the entire cohort and for HBeAg-positive and -negative patients) or in a cohort of genotype B and C untreated CHB patients ( $7.3 \cdot 10^1$  copies / cell in the entire cohort).

#### *Epigenetic characteristics under telbivudine treatment*

pgRNA is the major product derived from cccDNA transcriptional activity<sup>2,4</sup>. Given the low levels of pgRNA found in our Telbivudine-treated patients, we wondered if it could be justified not only by a low level of its transcriptional template, i.e. cccDNA, but also by a reduction of its activity. To test this hypothesis, we performed chromatin immunoprecipitation

(ChIP) analysis on liver samples derived from 10 telbivudine-treated patients (HBeAg-positive n=6, HBeAg-negative n=4) and compared them to 7 untreated CHB patients with active HBV transcription and replication (HBeAg-positive n=5, HBeAg-negative n=2) as a comparative group (see Supplementary Table 3 for patients' characteristics). We assessed the levels of cccDNA-associated histone post-translational modifications (PTMs) associated to either active (H3K27Ac, H3K56Ac) or inactive (H3K9me3, H3K27me3) transcription<sup>16</sup>. As expected, untreated CHB patients presented a significant enrichment of positive histone PTMs on cccDNA (Figure 2A), while telbivudine-treated patients showed no significant enrichment respect to NoAb control of positive histone PTMs but an increase of histone PTMs associated to repressed transcriptional activity (Figure 2B).

## DISCUSSION

Taking advantage of a cohort of CHB patients treated for 3 to 5 years with the nucleoside analogue Telbivudine, we studied *in vivo* intrahepatic viral features of treated patients, using a method which could be pertinent for future therapeutic studies aiming to cure HBV infection. Intrahepatic total HBV DNA levels were low in our cohort compared to previous report from untreated patients<sup>13,24</sup>. Similarly to the study of Lai *et al.*, we found that the majority of the patients had undetectable levels of intrahepatic cccDNA after long course of NUCs treatment, when assessed with qPCR technique<sup>13</sup>. The intrahepatic cccDNA detection using a reliable method adapted to *in vivo* analysis and low levels of DNA is a fundamental issue to assess new therapeutic strategies aiming to clear the cccDNA contingent. RCA performed on negative qPCR samples showed the presence of cccDNA for most of the patients. We then used a new technique based on digital droplet PCR which showed in our study a better sensitivity for low levels of standard concentrations<sup>25</sup>. The relevance of this technique has been reported for the study of occult HBV infection and after interferon therapy<sup>26</sup>. ddPCR revealed the presence of intrahepatic cccDNA for all but one liver biopsies of telbivudine-treated patients, despite at very low levels. The amount of cccDNA reported in this study were lower than those described previously in untreated chronic hepatitis B cohort<sup>13,24</sup>, highlighting the relevance of ddPCR quantification when assessing the efficacy of therapeutic strategies targeting the cccDNA contingent. This report is also fundamental for the development of indirect and non-invasive markers of the intrahepatic cccDNA pool under treatment. The serological markers recently described correlate with intrahepatic cccDNA levels after short course of NUCs treatment but their interest for long term therapies management should be confirmed based on high sensitive cccDNA detection methods<sup>27,28</sup>. Beside intrahepatic cccDNA quantification, the study of its epigenetic regulation could be interesting for the assessment of anti-viral treatments. We reported in this study low levels of



pgRNA, as described in the study of Lai *et al*<sup>13</sup>. This observation could be surprising since NUCs affect the viral polymerase and the pgRNA reverse transcription but do not impact pgRNA formation from cccDNA template. We could make 2 main hypotheses to explain this result: the decrease of pgRNA due to the drop of intrahepatic cccDNA amount or a change on epigenetic cccDNA regulation. We reported in this study the feasibility of CHIP and cccDNA epigenetic characterization on patients' samples, even after NUCs treatment and in presence of low levels of viral DNA. This kind of assessment shows a growing interest in the context of development of new HBV cure therapeutic strategies, especially those aiming to "silence" cccDNA<sup>6</sup>. Few studies have reported cccDNA epigenetic modifications *in vivo* and no data are available regarding these characteristics for treated patients<sup>4</sup>. *In vitro* studies suggest an effect of pegylated interferon- $\alpha$  (PEG-IFN) on epigenetic modulations whereas no effect has been described for NUCs<sup>4,16</sup>. We showed here for the first time epigenetic cccDNA features after long course of telbivudine treatment. Our results suggest epigenetic changes with a significant increase of histone methylation associated with repressive status whereas epigenetic changes observed *in vitro* after PEG-IFN treatment were related to a decrease of active marks<sup>16</sup>. These results suggested the worth of epigenetic studies in therapeutic context to complete quantification assay even for treatments without any expected effect on cccDNA epigenetic regulation.

All together, these results showed the interest of new methods to assess the efficacy of therapeutic strategies in the perspective of HBV cure. Intrahepatic cccDNA contingent should be measured using high sensitive techniques since the classical qPCR method is unable to detect low levels of cccDNA. This is important for the study of treatments aiming to virological cure (cccDNA clearance) but also for the development of indirect markers of cccDNA for patients under treatment. The study of cccDNA epigenetic features is feasible for treated patients with low levels of cccDNA and could be a surrogate marker of therapeutic

efficacy. This assessment is especially relevant for therapeutic strategies targeting cccDNA “silencing” and should be performed in future clinical trials.

## REFERENCES

1. OMS | Hépatite B. *WHO*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/fr/>. Accessed May 3, 2015
2. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*. 2015. doi:10.1136/gutjnl-2015-309809
3. Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol*. 2005;42:302–308.
4. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2009;51:581–592.
5. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med*. 1996;2:1104–1108.
6. Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, et al. Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions-report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut*. 2015. doi:10.1136/gutjnl-2014-308943
7. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*. 2004;126:1750–1758.
8. Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, et al. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Baltim Md*. 2006;44:675–684.
9. Bowden S, Locarnini S, Chang T-T, et al. Covalently closed-circular hepatitis B virus DNA reduction with entecavir or lamivudine. *World J Gastroenterol*. 2015;21:4644–4651.
10. Wong DK-H, Seto W-K, Fung J, et al. 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*. 2013;11:1004–1010.e1.
11. Allweiss L, Volz T, Giersch K, et al. Proliferation of primary human hepatocytes and prevention of hepatitis B virus reinfection efficiently deplete nuclear cccDNA in vivo. *Gut*. 2018;67:542–552.
12. Boyd A, Lacombe K, Lavocat F, et al. Decay of ccc-DNA marks persistence of intrahepatic viral DNA synthesis under tenofovir in HIV-HBV co-infected patients. *J Hepatol*. 2016;65:683–691.
13. Lai C-L, Wong D, Ip P, et al. Reduction of covalently closed circular DNA with long-term nucleos(t)ide analogue treatment in chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2016. doi:10.1016/j.jhep.2016.08.022
14. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:19975–19979.
15. Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, et al. IFN- $\alpha$  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*. 2012;122:529–537.
16. Tropberger P, Mercier A, Robinson M, Zhong W, Ganem DE, Holdorf M. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:E5715-5724.
17. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*. 2004;126:1750–1758.

18. Volz T, Lutgehetmann M, Wachtler P, et al. Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. *Gastroenterology*. 2007;133:843–852.
19. Margeridon S, Carrouée-Durantal S, Chemin I, et al. Rolling circle amplification, a powerful tool for genetic and functional studies of complete hepatitis B virus genomes from low-level infections and for directly probing covalently closed circular DNA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3068–3073.
20. Martel N, Gomes SA, Chemin I, Trépo C, Kay A. Improved rolling circle amplification (RCA) of hepatitis B virus (HBV) relaxed-circular serum DNA (RC-DNA). *J Virol Methods*. 2013;193:653–659.
21. Günther S, Li BC, Miska S, Krüger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol*. 1995;69:5437–5444.
22. Testoni B, Durantal D, Lebossé F, et al. Ribavirin restores IFN $\alpha$  responsiveness in HCV-infected livers by epigenetic remodelling at interferon stimulated genes. *Gut*. 2016;65:672–682.
23. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu, European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2017. doi:10.1016/j.jhep.2017.03.021
24. Lebossé F, Testoni B, Fresquet J, et al. Intrahepatic innate immune response pathways are downregulated in untreated chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2017;66:897–909.
25. Mu D, Yan L, Tang H, Liao Y. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system. *Biotechnol Lett*. 2015;37:2063–2073.
26. Caviglia GP, Abate ML, Tandoi F, et al. Quantitation of HBV cccDNA in anti-HBc-positive liver donors by droplet digital PCR: A new tool to detect occult infection. *J Hepatol*. 2018. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.021
27. Wang J, Yu Y, Li G, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients. *J Hepatol*. 2017. doi:10.1016/j.jhep.2017.08.021
28. Gao Y, Li Y, Meng Q, et al. Serum Hepatitis B Virus DNA, RNA, and HBsAg: Which Correlated Better with Intrahepatic Covalently Closed Circular DNA before and after Nucleos(t)ide Analogue Treatment? *J Clin Microbiol*. 2017;55:2972–2982.

## **FIGURES LEGENDS**

**Figure 1:** cccDNA detection using RCA or ddPCR. Representative plots of 39 qPCR-negative patients samples

**Figure 2:** epigenetic marks on cccDNA

Epigenetic cccDNA features of untreated CHB comparative group (n=7) (A) and Telbivudine-treated patients (n=10) (B). \*p<0.05

**Table 1:** Demographical and virological baseline characteristics

	Total cohort (n=56)	Baseline HBeAg + patients (n=37)	Baseline HBeAg – patients (n=19)	p value
<b>Age</b> <sup>1,2</sup> (years)	29 (25 - 41)	27 (23 - 33)	39 (30 - 44)	0.0004
<b>Viral genotype</b> <sup>3</sup>				
<b>A</b>	-	-	-	
<b>B</b>	13	11	2	ns
<b>C</b>	43	26	17	
<b>D</b>	-	-	-	
<b>E</b>	-	-	-	
<b>Baseline Viral load</b> <sup>1,2</sup> (IU/mL)	1.2 x10 <sup>8</sup> (1.4x10 <sup>6</sup> – 7x10 <sup>8</sup> )	2.1 x10 <sup>8</sup> (2.7x10 <sup>7</sup> - 1.2x10 <sup>9</sup> )	2.2 x10 <sup>6</sup> (2.8x10 <sup>5</sup> - 5.4x10 <sup>8</sup> )	ns
<b>Baseline ALT level</b> <sup>1,2</sup> (IU/L)	1.6 x10 <sup>2</sup> (9.4x10 <sup>1</sup> - 2.6x10 <sup>2</sup> )	1.6 x10 <sup>2</sup> (1x10 <sup>2</sup> - 2.5x10 <sup>2</sup> )	1.3 x10 <sup>2</sup> (6.2x10 <sup>1</sup> - 3.4x10 <sup>2</sup> )	ns
<b>Duration of telbivudine treatment</b> <sup>1,2</sup> (weeks)	234 (157 - 261)	208 (157 - 261)	260 (158 - 261)	ns

<sup>1</sup> Data are expressed as median (1<sup>st</sup> quartile – 3<sup>rd</sup> quartile); <sup>2</sup> Mann Whitney U test used for comparison between HBeAg + and – groups; <sup>3</sup> Chi square test between groups; \* p<0.05 between HBeAg+ and – patients

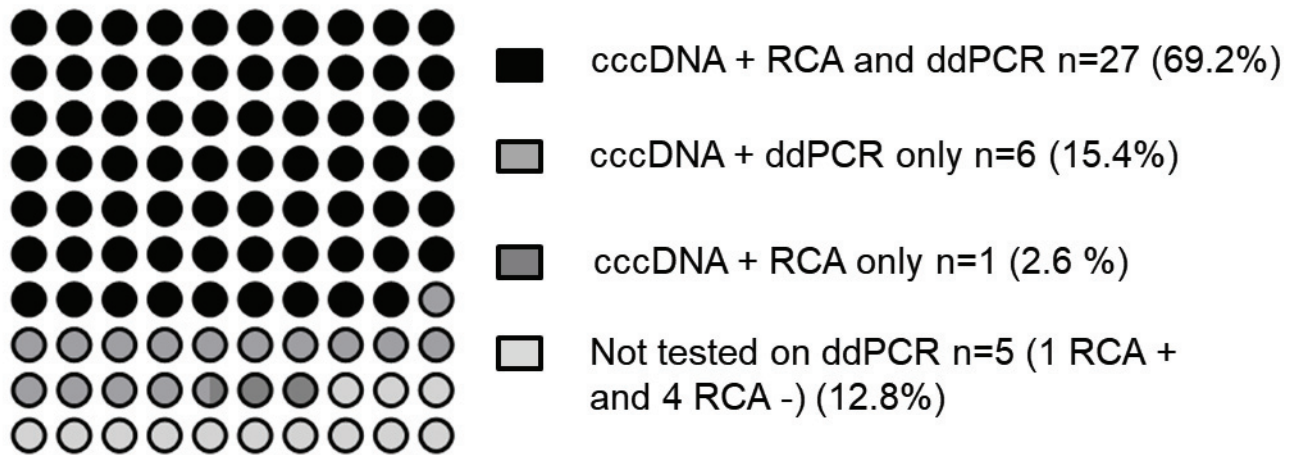
**Table 2:** Virological outcomes at end point

		Total cohort (n=56)	Baseline HBeAg + patients (n=37)	Baseline HBeAg – patients (n=19)	P value
<b>SERUM</b>	<b>Virological outcomes</b>				
	HBe Ag loss	-	28	-	
	HBe seroconversion	-	15	-	
	HBs Ag loss	2	2	0	
	HBs seroconversion	0	0	0	
	<b>End point Viral load <sup>1</sup></b> (detectable / undetectable)	27 / 26	18 / 17	9 / 9	ns
	<b>End point ALT level <sup>2,3</sup></b> (IU/L)	24 (18 - 38)	23 (18 - 31)	34 (19 - 48)	ns
<b>LIVER</b>	<b>Intrahepatic total HBV DNA <sup>2,3,4</sup></b> (copies / cell)	1.49 x 10 <sup>-1</sup> (5.23 x 10 <sup>-2</sup> – 2.61 x 10 <sup>-1</sup> )	1.76 x 10 <sup>-1</sup> (8.9 x 10 <sup>-2</sup> – 2.76 x 10 <sup>-1</sup> )	7.7 x 10 <sup>-2</sup> (4.4 x 10 <sup>-2</sup> – 2.43 x 10 <sup>-1</sup> )	ns
	<b>Intrahepatic cccDNA <sup>1,4</sup></b> <b>Detectable / undetectable</b>	17 / 56	15 / 37	2 / 19	0.002
	<b>Intrahepatic pgRNA <sup>2,3,4</sup></b> Relative quantity	1.98 x 10 <sup>-1</sup> (6.20 x 10 <sup>-2</sup> – 6.03 x 10 <sup>-1</sup> )	2.08 x 10 <sup>-1</sup> (8.18 x 10 <sup>-2</sup> – 6.44 x 10 <sup>-1</sup> )	1.98 x 10 <sup>-1</sup> (5.10 x 10 <sup>-2</sup> – 5.74 x 10 <sup>-1</sup> )	ns

<sup>1</sup> Chi square test between groups; <sup>2</sup> Data are expressed as median (1<sup>st</sup> quartile – 3<sup>rd</sup> quartile); <sup>3</sup> Mann Whitney U test used for comparison between HBeAg + and – groups; <sup>4</sup> Data were obtained using qPCR method

Figure 1.

## Representative plot of 39 qPCR-negative samples

**Table 3:** Intrahepatic HBV DNA quantification by digital droplet PCR

	Total cohort (n=49)	Baseline HBeAg + patients (n=31)	Baseline HBeAg – patients (n=18)
<b>Intrahepatic total HBV DNA</b> <sup>1</sup> (copies / cell)	1.46 x 10 <sup>-1</sup> (8.02 x 10 <sup>-2</sup> – 3.01 x 10 <sup>-1</sup> )	2.13 x 10 <sup>-1</sup> (9.49 x 10 <sup>-2</sup> – 3.13 x 10 <sup>-1</sup> )	1.09 x 10 <sup>-1</sup> (6.32 x 10 <sup>-2</sup> – 2.11 x 10 <sup>-1</sup> )
<b>Intrahepatic cccDNA</b> <sup>1</sup> (copies / cell)	4.43 x 10 <sup>-3</sup> (2.37 x 10 <sup>-3</sup> – 1.62 x 10 <sup>-2</sup> )	7.27 x 10 <sup>-3</sup> (3.00 x 10 <sup>-3</sup> – 1.95 x 10 <sup>-2</sup> )	3.72 x 10 <sup>-3</sup> (1.59 x 10 <sup>-3</sup> – 9.17 x 10 <sup>-3</sup> )

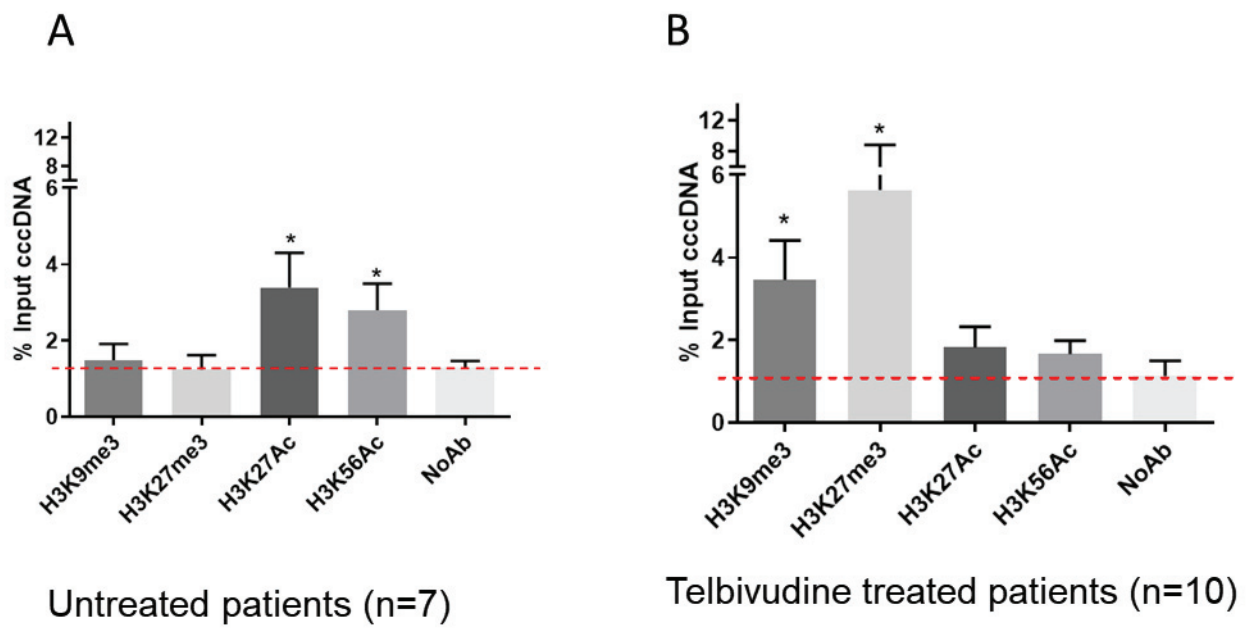
<sup>1</sup> Data are expressed as median (1<sup>st</sup> quartile – 3<sup>rd</sup> quartile)

<sup>2</sup> Data obtained using ddPCR method, available for 31 HBeAg+ patients and 18 HBeAg- patients

\* p<0.05 between HBeAg+ and – patients



Figure 2.



## **SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS**

**Supplementary Figure 1:** Summary of the study and clinical trials, baseline and end point

**Supplementary Figure 2:** Workflow of RCA set-up for liver biopsies

**Supplementary Figure 3.** Knodell activity and Ishak fibrosis scores at baseline for the entire cohort and HBeAg-positive and –negative patients

**Supplementary Figure 4:** Representative chart figuring the different methods applied for cccDNA assessment on patients samples

**Supplementary Figure 5:** Comparison of HBV plasmid quantification at different determined concentrations using qPCR or ddPCR techniques (A); ddPCR quantification of circular or linearized plasmid at different determined concentrations (B)

**Supplementary Table 1:** Baseline and end point characteristics, duration of Telbivudine treatment according to EP Viral Load<sup>1</sup>

	<b>VL under limit of detection End Point <sup>1</sup> n= 26</b>	<b>Detectable VL End Point <sup>1</sup> n= 27</b>	<b>p</b>
<b>Age <sup>2,3</sup></b> (years)	33 (25 - 41)	29 (25 - 40)	ns
<b>Baseline Viral Load <sup>2,3</sup></b> (IU/mL)	1.9 x 10 <sup>8</sup> (1.2 x 10 <sup>6</sup> – 5.6 x 10 <sup>8</sup> )	4.3 x 10 <sup>7</sup> (1.3 x 10 <sup>6</sup> – 1.3 x 10 <sup>9</sup> )	ns
<b>Baseline ALT level <sup>2,3</sup></b> (IU/L)	1.8 x 10 <sup>2</sup> (1 x 10 <sup>2</sup> – 3.3 x 10 <sup>2</sup> )	1.5 x 10 <sup>2</sup> (9 x 10 <sup>1</sup> – 2.2 x 10 <sup>2</sup> )	ns
<b>Baseline HBeAg<sup>4</sup></b> (+/-)	17 / 9	18 / 9	ns
<b>Duration of Telbivudine treatment <sup>2,3</sup></b> (weeks)	209 (158 - 261)	260 (157 - 261)	ns
<b>End Point pgRNA</b> relative quantity	2 x 10 <sup>-1</sup> (6.1 x 10 <sup>-2</sup> – 6 x 10 <sup>-1</sup> )	2.2 x 10 <sup>-1</sup> (5.5 x 10 <sup>-2</sup> – 7.5 x 10 <sup>-1</sup> )	ns
<b>End Point intrahepatic total HBV DNA</b> (copies/cell)	1.3 x 10 <sup>-1</sup> (5.2 x 10 <sup>-2</sup> – 2.6 x 10 <sup>-1</sup> )	1.8 x 10 <sup>-1</sup> (5.3 x 10 <sup>-2</sup> – 2.6 x 10 <sup>-1</sup> )	ns
<b>End Point intrahepatic cccDNA <sup>4</sup></b> Detectable / undetectable	6 / 20	10 / 17	ns

<sup>1</sup> Data are available only for 53 patients; <sup>2</sup> Data are expressed as median (1<sup>st</sup> percentile-3<sup>rd</sup> percentile); <sup>3</sup> Mann Whitney U test using for comparison between HBeAg + and – groups; <sup>4</sup> Chi square test between groups

**Supplementary Table 2:** Baseline and end point characteristics, duration of telbivudine treatment according to EP HBeAg loss or seroconversion<sup>1</sup>

	EP HBeAg loss <sup>2</sup> n=28	No HBeAg loss at EP <sup>2</sup> n=9	p <sup>3</sup>	EP seroconversion <sup>2</sup> n=15	HBeAg No seroconversion at EP <sup>2</sup> n=22	p <sup>3</sup>
<b>Age</b> (years)	27 (21 – 36)	28 (25 -33)	ns	25 (18 – 32)	29 (25 -39)	0.06
<b>Baseline VL</b> (IU/mL)	3.5 x 10 <sup>8</sup> (4.5 x 10 <sup>7</sup> – 1.5 x 10 <sup>9</sup> )	2.3 x 10 <sup>7</sup> (6.5 x 10 <sup>5</sup> – 2.5 x 10 <sup>8</sup> )	0.06	1.8 x 10 <sup>8</sup> (4.3 x 10 <sup>7</sup> – 1 x 10 <sup>9</sup> )	2.5 x 10 <sup>8</sup> (4.9 x 10 <sup>6</sup> – 1.7 x 10 <sup>9</sup> )	ns
<b>Baseline ALT level</b> (IU)	1.7 x 10 <sup>2</sup> (1.3 x 10 <sup>2</sup> - 2.5 x 10 <sup>2</sup> )	1 x 10 <sup>2</sup> (7.9 x 10 <sup>1</sup> – 3.3 x 10 <sup>2</sup> )	ns	1.7 x 10 <sup>2</sup> (1.4 x 10 <sup>2</sup> - 2.4 x 10 <sup>2</sup> )	1.4 x 10 <sup>2</sup> (9 x 10 <sup>1</sup> – 3.1 x 10 <sup>2</sup> )	ns
<b>Duration of telbivudine treatment</b> (weeks)	260 (157 – 261)	165 (157 – 260)	ns	172 (157 – 261)	234 (157 – 261)	ns
<b>End Point pgRNA</b> relative quantity	1.5 x 10 <sup>-1</sup> (6 x 10 <sup>-2</sup> – 4.8 x 10 <sup>-1</sup> )	5.7 x 10 <sup>-1</sup> (1.3 x 10 <sup>-1</sup> – 1.1 x 10 <sup>0</sup> )	0.06	1.1 x 10 <sup>-1</sup> (3.4 x 10 <sup>-2</sup> – 5.1 x 10 <sup>-1</sup> )	3.1 x 10 <sup>-1</sup> (8.7 x 10 <sup>-2</sup> – 6.8 x 10 <sup>-1</sup> )	ns
<b>End Point intrahepatic total HBV DNA</b> (copies/cell)	1.5 x 10 <sup>-1</sup> (8.6 x 10 <sup>-2</sup> – 2.5 x 10 <sup>-1</sup> )	2.6 x 10 <sup>-1</sup> (1 x 10 <sup>-1</sup> – 3.1 x 10 <sup>-1</sup> )	ns	2.2 x 10 <sup>-1</sup> (6.2 x 10 <sup>-2</sup> – 2.9 x 10 <sup>-1</sup> )	1.5 x 10 <sup>-1</sup> (9.9 x 10 <sup>-2</sup> – 2.3 x 10 <sup>-1</sup> )	ns
<b>End Point intrahepatic cccDNA<sup>4</sup></b> Detectable / undetectable	12 / 16	3 / 6	ns	6 / 9	9 / 13	ns

<sup>1</sup> Data concerned 37 baseline HBeAg-positive patients; <sup>2</sup> data are expressed as median (1<sup>st</sup> percentile-3<sup>rd</sup> percentile); <sup>3</sup> Mann Whitney U test used for comparison between HBeAg + and – groups; <sup>4</sup> Chi square test between groupS

**Supplementary Table 3:** Demographical and virological characteristics of Telbivudine-treated patients and CHB controls patients assessed for epigenetic marks on cccDNA

	Telbivudine-treated patients (n=10)		Untreated CHB Comparative group (n=7)		p
<b>Age</b> <sup>1,2</sup> (years)	29 (26 - 35)		22 (19 - 34)		ns
<b>Genotype</b> <sup>3</sup> (B / C / D)	3 / 7 / 0		1 / 5 / 1		ns
<b>HBeAg</b> <sup>3,4</sup> (+/-)	6 / 4		5 / 2		ns
<b>pgRNA</b> <sup>1,2,5</sup> relative quantity	3.7	x 10 <sup>-1</sup>	1.6	x 10 <sup>-2</sup>	0.0001
	(8.4 x 10 <sup>-2</sup> – 9.8 x 10 <sup>-1</sup> )		(1.5 x 10 <sup>2</sup> – 1.7 x 10 <sup>3</sup> )		
<b>Intrahepatic total HBV DNA</b> <sup>1,2,5</sup> (copies/cell)	2.6	x 10 <sup>-1</sup>	7.1	x 10 <sup>1</sup>	0.0001
	(1.1 x 10 <sup>-2</sup> – 3.4 x 10 <sup>-1</sup> )		(3.8 x 10 <sup>1</sup> – 2.3 x 10 <sup>2</sup> )		
<b>Intrahepatic cccDNA</b> <sup>1,2,5</sup> (copies/cell)	2.4	x 10 <sup>-1</sup>	2.7	x 10 <sup>0</sup>	0.0001
	(1.1 x 10 <sup>-1</sup> – 3.4 x 10 <sup>-1</sup> )		(9.5 x 10 <sup>-1</sup> – 3.2 x 10 <sup>0</sup> )		

<sup>1</sup> Mann Withney U test used for comparison between each group; <sup>2</sup> data are expressed as median (1<sup>st</sup> percentile-3<sup>rd</sup> percentile); <sup>3</sup>  $\chi^2$  test used to compare non quantitative values; <sup>4</sup> HBeAg status at the time of liver biopsy; <sup>5</sup> intrahepatic viral markers assessed with qPCR method

---

## Axe III

---

*Preuve de concept de la dégradation de  
l'ADNccc par CRISPR/Cas 9 dans les  
HepG2-NTCP.*

## 1 Objectifs

Les stratégies thérapeutiques actuelles de l'hépatite B associent des analogues nucléos(t)idiques et de l'IFN. Ces traitements entraînent une réduction de la charge virale. Cependant, ils ne ciblent pas l'ADNccc et ne permettent pas de guérir la maladie du fait de la persistance de ce minichromosome. Cet ADN étant la matrice de la transcription virale, la persistance d'une seule copie permet de réactiver une réplication virale en cas d'arrêt de traitement.

Comme nous l'avons observé dans les résultats de l'axe II, les hépatocytes des patients infectés chroniquement par le VHB et traités à long terme avec ces traitements, contiennent toujours de l'ADNccc qui est transcriptionnellement actif. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches qui ciblent directement l'ADNccc.

L'une des stratégies envisagée est de dégrader voire de détruire l'ADNccc par le génome éditant. Elle consiste à cibler l'ADNccc avec une nucléase qui va générer une cassure double brin sur l'ADN. Cette cassure va être prise en charge par le système de réparation cellulaire *via* une reconstitution non-homologue ou une reconstitution homologue en présence de matrice dans le milieu. Cette réparation va créer des mutations pouvant rendre inactif voire détruire l'ADN cible. Les premières techniques pour venir cibler l'ADN faisaient intervenir les protéines ZFN ou bien TALEN (Gaj, Gersbach, et Barbas 2013). Ces protéines contiennent deux domaines, l'un permettant la reconnaissance de l'ADN et l'autre permettant le clivage de l'ADN cible. Cependant, il s'agissait de manipulation lourde puisque chaque ciblage de l'ADN nécessite une modification de la protéine.

La découverte du système CRISPR/Cas 9 a permis de relancer le génome éditant. Ce système se compose d'un ARN guide qui va se fixer sur la protéine Cas 9 et reconnaître spécifiquement l'ADN cible. Ainsi, seule la modification de l'ARN guide est nécessaire pour cibler une nouvelle séquence. Dans la structure initiale du système CRISPR/Cas9, deux séquences sont indispensables pour son fonctionnement en plus de la protéine Cas9. Le crRNA permet le ciblage de la séquence d'intérêt par la protéine Cas9 et le tracrRNA permet de relier le crRNA et la protéine Cas9. Afin de faciliter l'utilisation de ce système comme génome éditant, les deux séquences ont été modifiées en un seul ARNguide fonctionnel de 20 nucléotides (Doudna et Charpentier 2014).

Cette technique a déjà été utilisée pour venir cibler le génome du VHB. L'incorporation des CRISPR/Cas9 a été testée via différents vecteurs tel que les lentivirus ou bien l'AAV et leur efficacité sur le VHB a été montrée. Cependant, ces systèmes d'incorporation présentent quelques inconvénients. L'effet sur l'ADNccc n'a pas toujours été démontré et l'efficacité de ce système dans un modèle de cellule primaire reste encore à faire. De plus, le taux de génération des « off target effect » est élevé, car une fois le système incorporé, l'expression de chaque composé continue indéfiniment jusqu'à la perte de l'ADN pendant la division cellulaire.

L'objectif du troisième axe est de faire la preuve de concept de l'efficacité de ce système sur l'ADNccc dans des cellules d'infectées par le VHB en utilisant des ribonucléoprotéines (RNP) comme vecteurs.

Les Cas9 RNP sont un complexe qui associe la protéine Cas9 purifiée et l'ARN guide (DeWitt, Corn, et Carroll 2017). L'assemblage de ce complexe se fait in vitro et peut être directement incorporé dans la cellule par la technique standard d'électroporation ou transfection. Cette méthode permet le clivage de la séquence cible avec une efficacité similaire à celle observée via l'expression d'un plasmide. De plus, elle présente l'avantage de la rapidité de l'expression des composés et leur présence dans la cellule est limitée dans le temps. Il s'agit d'une incorporation directement fonctionnelle du complexe qui peut être détectable en forte concentration peu de temps après la transfection et qui peut être rapidement éliminé dans la cellule par les voies de dégradation protéique, limitant ainsi les « off target effect ». Contrairement à cette méthode, l'incorporation du système par un plasmide ou un vecteur viral, nécessite la transcription et la traduction du gène Cas9 via la machinerie cellulaire pour avoir un complexe fonctionnel.

Notre approche a ainsi pour but de venir cibler l'ADNccc. Deux mécanismes peuvent être attendus :

- Le premier mécanisme permettrait le clivage entraînant directement la dégradation de l'ADNccc.
- Le deuxième mécanisme permettrait le clivage de l'ADNccc induisant des mutations « non-sens » ou létales après réparation par le système de l'hôte.



## 2 Matériels et Méthodes

### **Optimisation des conditions d'incorporation du système CRISPR/Cas 9 par des ribonucléoprotéines**

#### *Assemblage des RNP :*

Le crRNA (100 $\mu$ M) a été mélangé à concentration équimolaire avec tracrRNA (IDT) (100 $\mu$ M) pour former un complexe d'ARNguide à 1  $\mu$ M ou 3 $\mu$ M dans le tampon « Nuclease free duplex » (IDT). Pour mettre au point la technique, le crRNA (IDT) reconnaît spécifiquement le gène HPRT qui est un gène redondant dans la cellule et dont le clivage ne perturbe pas les fonctions cellulaires. Le tracrRNA est soit marqué avec ATTO 550 pour visualiser directement le complexe au microscope, soit non marqué lors des essais d'infection. L'assemblage de l'ARNguide et de la Cas 9 a été fait dans le milieu DMEM sans sérum à un ratio de 1:1 à la concentration de 10, 30 et 50 nM. Après une incubation à température ambiante pendant 10min, la mixture ARNguide/Cas9 a été transfectée dans les cellules comme détaillé plus bas.

#### *Transfection des RNP dans les cellules :*

Pour la transfection du complexe ARNguide/Cas9, deux transfectants ont été testés : le JetPRIME et le JetCRISPR (Polyplus transfection). Pour cela, 10, 30 ou 50 nM de RNP ont été mélangés avec le transfectant et ont été incubés pendant 15min avant d'être déposés sur les cellules pendant une nuit (18-20h). Les cellules ont été conservées en culture dans du milieu classique pour une période d'incubation nécessaire selon l'étude.

#### *Microscopie :*

Pour la vérification de la transfection des RNP-ATTO550, les cellules ont été visualisées au microscope (Nikon Eclipse TS2R) avec l'objectif 20X à 24h ou 40h après transfection. Les cellules ont été conservées sur la plaque de culture pour une meilleure adhérence.

#### *T7E1 essai :*

L'ADN cellulaire extrait a été utilisé pour vérifier le clivage des constructions CRISPR/Cas 9 à l'aide du kit T7E1 assay (Alt-R® Genome Editing Detection Kit. IDT) et selon les recommandations du fabricant. Brièvement, l'ADN extrait a été d'abord amplifié par PCR avec des amorces qui reconnaissent spécifiquement la région qui a subi les mutations générées par CRISPR/Cas 9. Une fois amplifiés, les produits de PCR ont été dénaturés et

hybridés pour former des hétéroduplex entre les séquences mutées et les séquences non mutées. Les hétéroduplex formés ont été soumis à la digestion par le T7 endonucléase I, qui reconnaît spécifiquement les mésappariements. Si les CRISPR ont été efficaces, il y a donc eu réparation du brin clivé par NHEJ permettant la formation des hétéroduplex entre les amplicons ayant des mésappariements (les mutés avec les non mutés).

## **Optimisation des conditions d'infection**

### *Culture cellulaire :*

Les cellules HepG2-NTCP proviennent du laboratoire du Pr.Urban (Heidelberg) et sont maintenues en culture dans un milieu DMEM (Gibco) complété avec 5% de sérum (Gibco), 1% de pénicilline/ streptomycine, 1% de glutamine (Gibco) et 1% de sodium pyruvate (Gibco). Elles sont maintenues à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

### *Production des particules virales :*

Le virus VHB a été produit dans des cellules HepAD38. Les particules virales ont été obtenues par concentration du surnageant dans du PEG à 4% et par centrifugation à 12000 rpm pendant 1h à 4°C. Le culot viral a été remis en suspension dans du milieu Williams (Gibco).

### *Infection des cellules :*

Pour l'infection par VHB, les cellules HepG2-NTCP ont étéensemencées dans des plaques recouvertes de collagène (BD Biosciences) à une densité  $1.10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> dans leur milieu d'entretien. Le lendemain, les cellules ont été mises dans le milieu d'infection DMEM (Gibco) complété avec 5% de sérum (Gibco), 1% de pénicilline/ streptomycine, 1% de glutamine (Sigma), 1% de sodium pyruvate et 2% de DMSO. Après 72h, l'inoculation des cellules a été réalisée à une MOI de 250, 500 ou 1000 dans le milieu d'infection contenant 4% PEG 8000 (Sigma) pendant 16h à 37°C. Après la période d'inoculation, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS (Gibco), puis ont été mises en culture avec le milieu d'infection. Les cellules ont été alors soit laissées en culture pendant 7 jours soit réensemencées au bout de 24h ou 48h. Pour le réensemencement, les cellules ont été trypsinées et ont étéensemencées dans des nouvelles plaques 12 puits recouvertes de collagène à une concentration cellulaire de  $5,2.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>.

### *Infection des cellules en suspension :*

Pour l'infection en suspension, les cellules HepG2-NTCP en culture ont été trypsinées et ont été directement mises en contact avec le virus dans du milieu d'infection contenant 4% PEG 8000 (Sigma) à une MOI de 250, 500 ou 1000 avant l'ensemencement à une densité  $1.10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules ont été inoculées avec le virus pendant 16h à 37°C. Après la période d'inoculation, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS (Gibco), puis ont été mises en culture avec le milieu d'infection pendant 7 jours.

### *Immunofluorescence :*

Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde à 4% pendant 10 min. Elles ont été ensuite incubées avec un anticorps anti-HBcAg (ABCAM) diluée au 1/2000 pendant une nuit 4°C. Le lendemain, les cellules ont été rincées et incubées avec un anticorps secondaire anti-souris pendant 1h. Les cellules ont été marquées au DAPI (1/5000) pendant 5 min avant d'être observées au microscope.

### *Quantification des antigènes HBe et HBs :*

Le surnageant des cellules a été prélevé au bout de 7 jours d'infection et de 3 jours d'accumulation pour la quantification des antigènes viraux HBe et HBs afin de contrôler le niveau d'infection. La quantification a été réalisée selon les recommandations du fournisseur du Kit ELISA HBe ou HBs (Autobio, Chine).

## **Systeme CRISPR/Cas9 ciblant le génome du VHB**

### *Optimisation du système CRISPR/Cas 9 sur le plasmide VHB :*

Pour déterminer les conditions optimales de clivage du génome de VHB, les 8 ARN guides anti-VHB, dont les séquences sont répertoriées dans le tableau 9, ont été testés sur les plasmides du VHB pBR322 et pCH9. L'assemblage des ARN guides spécifiques du VHB (Tableau 8) et de la Cas 9 ont été réalisés dans le milieu de clivage à un ratio de 1:1 à la concentration de 30 nM. Ce milieu contient HEPES pH7,5 à 20mM, KCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, du glycérol à 5%, du DTT à 1mM et de l'EDTA à 0,25mM. Après une incubation à température ambiante pendant 10min, l'ADN plasmidique a été ajouté au complexe ARNguide/Cas9 à un ratio 10:1. Après 60min d'incubation, 20mg/mL de protéinase K a été ajoutée pendant 20min à température ambiante afin d'éliminer la protéine Cas9 fixée sur l'ADN. Les échantillons migrent ensuite sur un gel d'agarose 1% dans du TAE 1X à 100V. Le poids moléculaire a été contrôlé avec le marqueur de poids à une échelle de 1 KB.

### *Système CRISPR/Cas9 dans des cellules infectées par le VHB :*

Selon le protocole d'optimisation d'infection par réensemencement, les cellules HepG2-NTCP ont été ensemencées dans une plaque recouverte de collagène à une densité  $1 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> dans le milieu de culture. Le lendemain, le milieu a été changé avec du milieu d'infection. Après 72h en présence de DMSO, les cellules ont été infectées par le VHB à une MOI de 1000 avec du milieu d'infection contenant 4% de PEG 8000 pendant une nuit à 37°C. Après la période d'inoculation, les cellules ont été lavées avec du PBS et les cellules ont été réensemencées dans une plaque recouverte de collagène à une densité de  $5,2 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup>. Au bout de 24h, les RNP CRISPR/Cas9 spécifiques de VHB ont été assemblés comme le protocole décrit précédemment et ont été transfectés avec le JetCRISPR à une concentration de 50mM. Le lendemain, le milieu a été changé avec du milieu d'infection et au bout de 5 jours les cellules ont été récoltées pour contrôler les différents paramètres viraux.

Afin de vérifier l'efficacité des CRISPR/Cas9, plusieurs contrôles ont été réalisés. Deux contrôles cellulaires sans transfection de RNP, 2 contrôles négatifs avec des séquences ARN guide non ciblantes (numéro 1 et numéro 2 provenant de IDT) et un contrôle ayant l'ARN guide spécifique du gène HPRT. La normalisation des résultats a été faite à partir de la moyenne de ces 4 contrôles.

### **Extraction ADN et ARN**

L'extraction d'ADN et d'ARN a été réalisée selon les protocoles des Kits « MasterPure DNA purification » (Epicentre) pour l'ADN et « Nucleospin RNA plus » (Machery-Nagel) pour l'ARN. L'ADNccc a été obtenue par digestion avec 30 unités de T5 (NEB) à 37°C pendant 45 min.

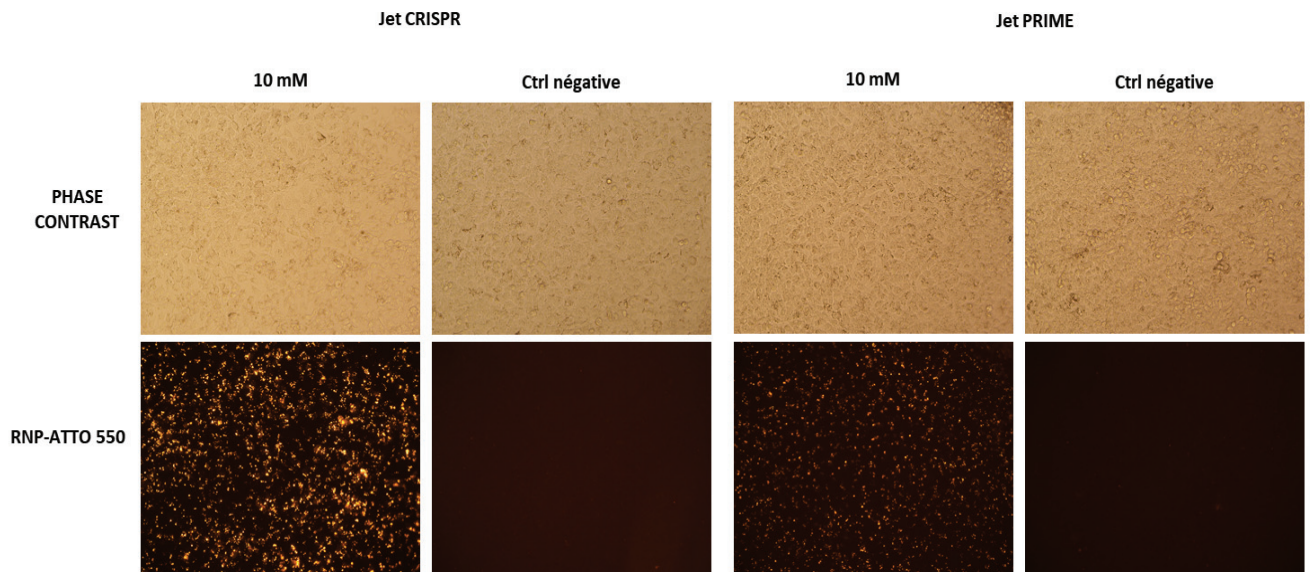
### **Quantification de l'ADN et l'ARN de VHB par qPCR Taqman**

La quantification de l'ADN ou l'ARN du VHB a été effectuée à partir de « l'Applied Biosystem qPCR assay ». La transcription inverse de l'ARN de VHB a été réalisée à partir du protocole du kit de la « Superscript III » (Thermo Fisher). La réaction de PCR a été faite avec des amorces Taqman dont les séquences sont listées dans le tableau 4 et qui sont spécifiques respectivement pour l'ADNccc, et l'ARNpg dont la séquence a été adaptée à partir de la publication de Volz (Volz et al. 2007b). Le gène de la  $\beta$  globine et le gène GusB ont été également quantifiés en duplex pour permettre la normalisation en nombre de copies virales par cellule pour l'ADN et la normalisation par rapport à un gène de ménage

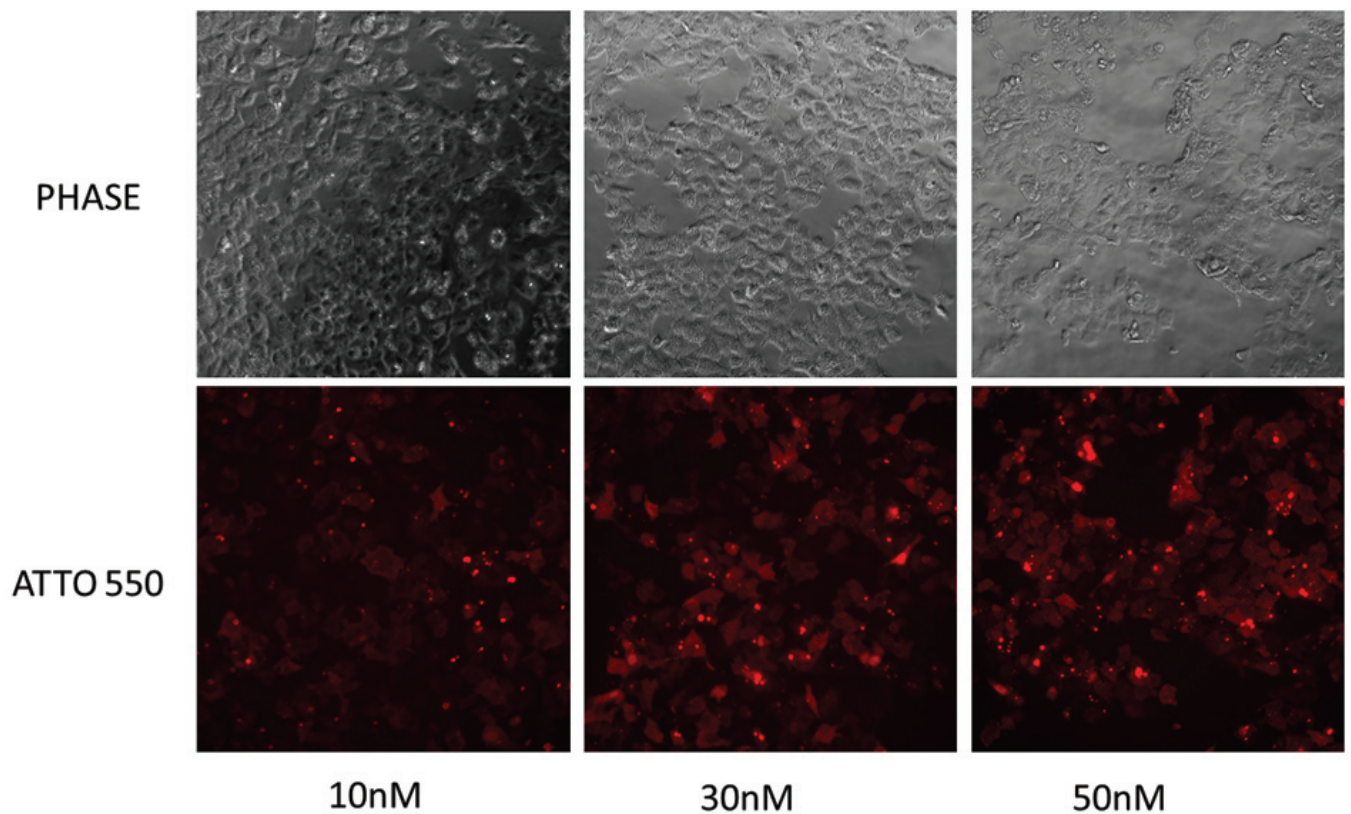
pour l'ARNpg. Ces amorces ainsi que celle de l'ADNrc de VHB sont des amorces fournies par life Technologies. Des dilutions en série ont été effectuées avec le plasmide pBR 322 pour la gamme standard allant de  $10^2$  copies à  $10^7$  copies. Les réactions de PCR ont été réalisées selon les cycles décrits dans les tableaux 5 et 6.

Name	Séquences	Cible sur HBV	Nombre de cible sur le plasmide
CRCL1	ggaccctgctcgtgttac	HBs / Polymérase	Unique
Sanofi 1	ggtatcgctggatgtgtctg	PreS/ PreS1/PreS2/ Polymérase	Unique
Sanofi 2	agtgttgctgacgcaacc	Polymérase/EnhancerI	Unique
Sanofi 3	cctctgccgatccatactg	Pi polymérase	Unique
CRCL 3	ggggcgcacctctctttacg	HBx	Unique
Sanofi 4	aagcctccaagctgtgcctt	PreC/Hbe/Epsilon	2 sites
Sanofi 5	taaagaatttgagctactg	Hbe/Core/Signal Poly A	2 sites
Sanofi 6	tcgcctcgacagcgagatc	Hbe/HB/Pol	1 site

**Tableau 8 :** Séquences des 8 ARN guides sélectionnés pour tester leur efficacité contre le génome de VHB dans un plasmide et dans les cellules HepG2-NTCP infectées par le VHB.



**Figure 73 :** Comparaison de 2 transfectants pour la lipofection des RNP-CRISPR/Cas9  
 Images au microscope électronique de cellules HepG2-NTCP transfectées avec des RNP CRISPR/Cas9 HPRT par le JetPRIME ou le JetCRISPR.



**Figure 74 :** Comparaison de 3 concentrations (10nM, 30nM et 50nM) pour la lipofection des RNP-CRISPR/Cas9  
 Images au microscope électronique (20x) des RNP CRISPR/Cas9 HPRT dans les cellules HepG2-NTCP transfectées avec le jetCRISPR. Les cellules ont été transfectées à 10nM, 30nM et 50nM.

### 3 Résultats

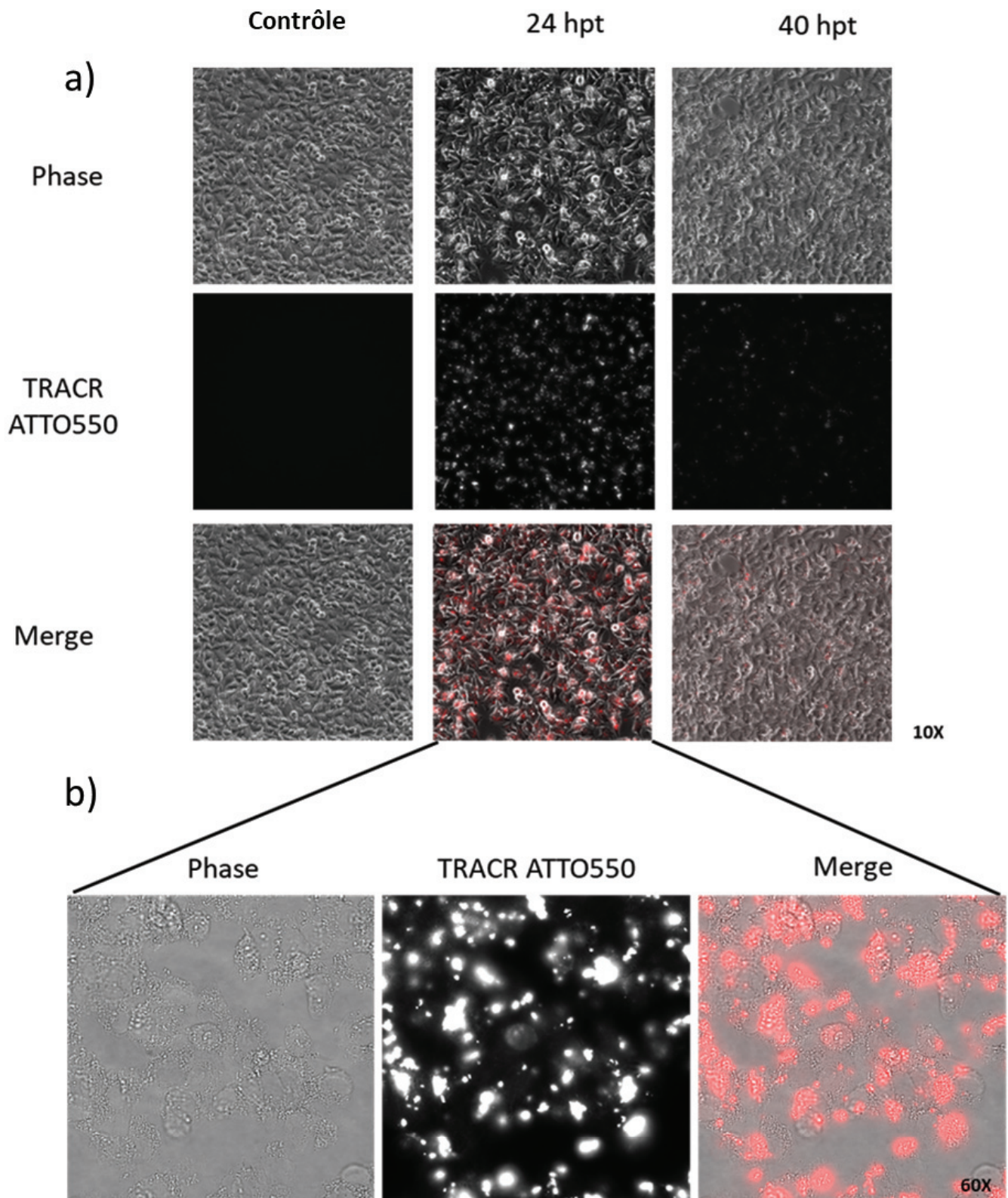
#### **Optimisation des conditions d'incorporation du système CRISPR/Cas 9 par l'utilisation des ribonucléoprotéines (RNP)**

Afin d'optimiser les conditions de lipofection, deux différents transfectants ont été testés : le JetPRIME et le JetCRISPR. Ils ont donc été testés sur des cellules HepG2-NTCP en utilisant une concentration de 10mM de RNP. Ils ont été laissés en contact pendant 16h. Afin de pouvoir visualiser le complexe RNP-CRISPR/Cas9 au microscope, le tracrRNA est marqué avec de l'ATTO 550. Nous avons montré que le taux de lipofection est plus efficace avec le JetCRISPR qu'avec le JetPRIME. En effet, nous observons un marquage fluorescent du complexe plus présent dans les cellules transfectées avec le JetCRISPR (figure 73).

Afin d'améliorer l'efficacité de la transfection, différentes concentrations du complexe dans les cellules HepG2-NTCP ont été testées : 10 nM ; 30 nM et 50nM. Nous avons observé une corrélation entre l'intensité de fluorescence et la concentration de transfectant utilisé (Figure 74). L'utilisation de 30nM et 50nM du complexe montre un marquage optimal avec une localisation cytoplasmique et nucléaire dans les 2 conditions sans toxicité cellulaire. Pour s'assurer de l'efficacité de clivage des CRISPR/Cas9 nous avons choisi la concentration de 50nM pour la suite de nos expériences.

Il est connu dans la littérature que le complexe RNP-CRISPR/Cas9 peut être dégradé rapidement dans certains types cellulaires (Liang et al. 2015). Afin d'évaluer la durée de conservation du complexe par la cellule, une cinétique a été réalisée à 24h et 40h après transfection. On observe 24 heures après transfection, un marquage fluorescent dans la quasi-totalité des cellules témoignant de la présence du complexe. Cependant, 40 heures après transfection, on observe une diminution du marquage fluorescent montrant ainsi une dissociation du complexe (Figure 75).

Avec 3 signaux NLS sur la protéine Cas9, une forte localisation nucléaire est attendue. Nous avons donc vérifié si le complexe nucléaire était actif et suffisant pour induire du génome editing.



**Figure 75 :** Cinétique de transfection des RNP CRISPR/Cas9 HPRT

a) Image au microscope (10X) des RNP CRISPR/Cas9 marqués ATTO550 dans les cellules HepG2-NTCP. Les images ont été prises 24 heures ou 40 heures post transfection. b) Images au microscope (60x) à 24 heures post transfection des RNP CRISPR/Cas9 marqués ATTO550 dans les cellules HepG2-NTCP.



Pour le contrôler, le système CRISPR/Cas9 ciblant le gène HPRT et l'enzyme T7E1 qui permet de reconnaître les mésappariements entre les nucléotides a été utilisée.

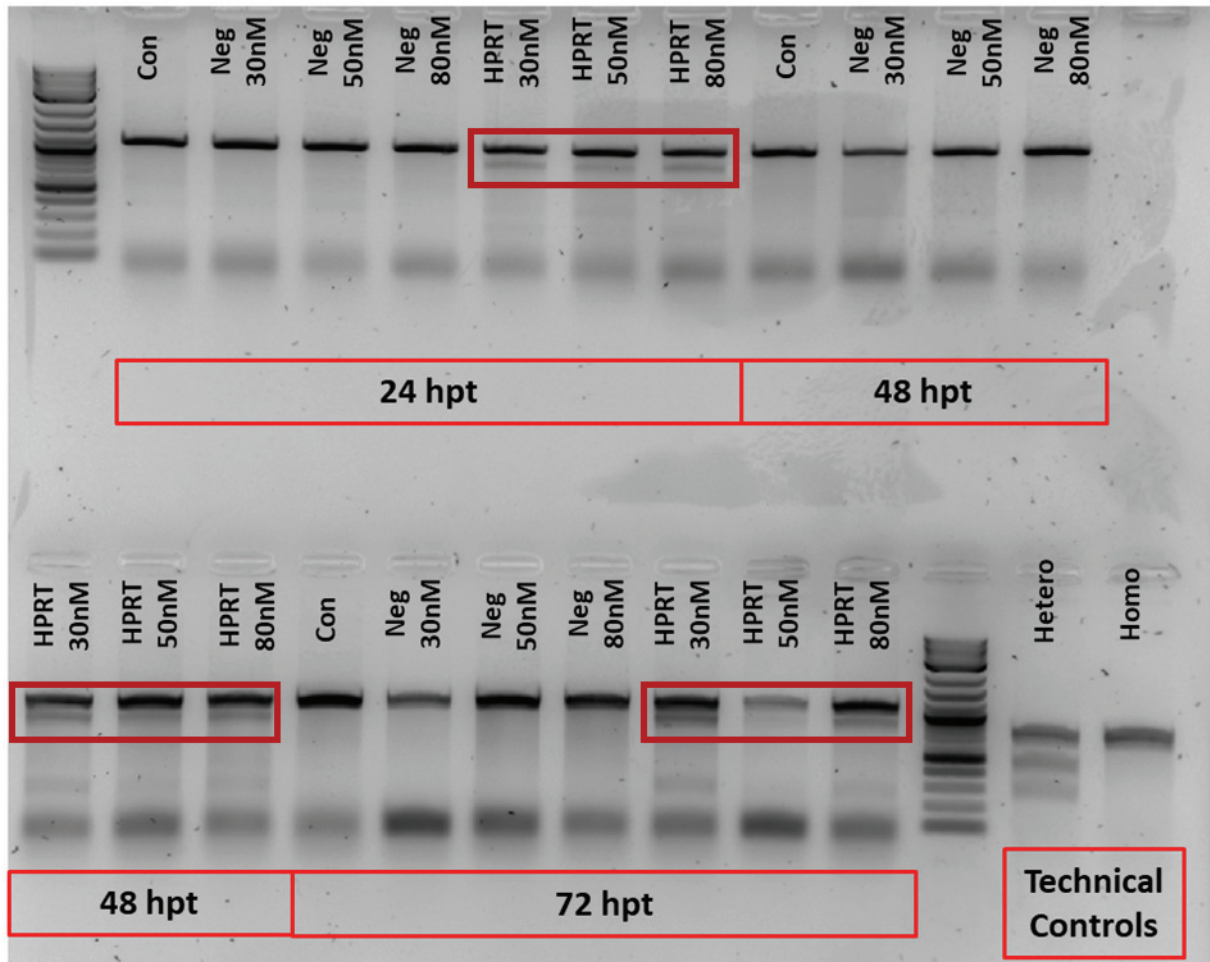
Il a été montré dans la publication de Liang et al, 2015, que la cinétique d'incorporation et de détection des RNP était différente de la cinétique de clivage du système. Pour le confirmer, une cinétique de clivage a été analysée à 24h, 48h et 72h après transfection, en parallèle de la cinétique d'incorporation réalisée à 24h et 40h après transfection comme présentée précédemment.

Comme observé dans la figure 75, on a constaté la présence des complexes dans les cellules au bout de 24 heures après transfection et une diminution du marquage au bout de 40 heures après transfection.

Cependant, comme on peut le voir dans la figure 76, la cinétique du clivage de l'ADN par l'enzyme T7E1 est différente. On constate une efficacité de clivage des complexes dès 24 heures, et cela, jusqu'à 72 heures après transfection.

En effet, l'analyse par gel d'agarose montre 3 bandes. La bande de poids moléculaire plus élevée correspond aux fragments non digérés et les deux bandes de plus petites tailles correspondent aux fragments ayant subi la digestion par l'enzyme. Même si les complexes semblent être dégradés au bout de 24h, l'effet du génome éditant persiste même au bout de 72h après transfection avec une meilleure efficacité. Le clivage du gène par le système CRISPR est observé avec les concentrations de 30, 50 et 80 nM de complexes. Les résultats observés confirment ceux déjà publiés par Liang et al en 2015.

Ainsi, les résultats ont montré que les RNP CRISPR/Cas9 ont été incorporés dans la cellule et ont été capables de cliver l'ADN cible.



**Figure 76 :** Digestion par la T7E1

Gel à 1% d'agarose représentant la migration des produits de PCR après dénaturation, hybridation de des hétéroduplex et digestion par l'enzyme T7E1. Les cellules HepG2-NTCP ont été transfectées avec différentes concentrations de RNP CRISPR/Cas9 HPRT (30, 50, 80nM). L'Adn cellulaire pour la vérification du clivage a été extrait au bout de 24, 48 et 72 heures post transfection. Deux contrôles ont été réalisés, le premier contrôle représente les cellules sans transfection tandis que le deuxième contrôle représente la transfection des cellules avec une RNP CRISPR/Cas9 sans ARN guide.

### Optimisation des conditions d'infection

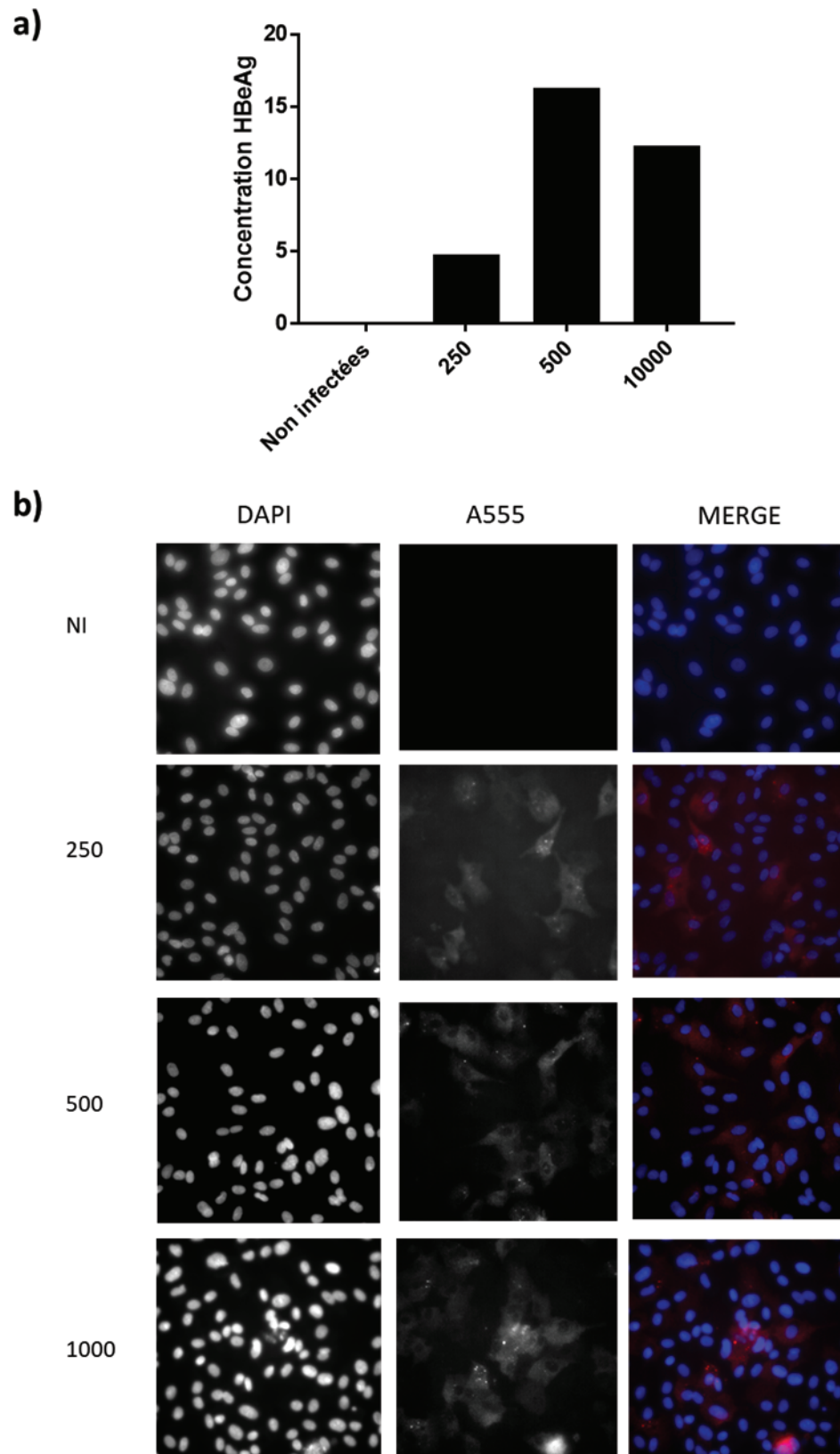
Une transfection efficace nécessite que les cellules ne soient pas trop confluentes. A l'inverse pour obtenir un niveau d'infection élevé des cellules HepG2-NTCP avec le virus du VHB, les cellules doivent être confluentes. Pour pouvoir combiner et regarder l'effet anti-VHB des CRISPR en utilisant des RNP, il est nécessaire d'optimiser les conditions d'infections qui sont utilisées en routine au laboratoire.

Nous avons donc testé deux types d'infections différentes :

- L'infection des cellules en suspension (Okuyama-Dobashi et al. 2015)
- L'infection des cellules puis réensemencement des cellules infectées

Pour l'infection en suspension, les cellules ont été directementensemencées et infectées avec le virus VHB à différentes MOI 250 ; 500 ; 1000. Les cellules ont été conservées pendant 5 jours en culture avant d'être fixées pour l'immunofluorescence anti-HBc antigène. Le surnageant des cellules a été récolté pour analyser les antigènes HBe par ELISA.

Comme observé dans la figure 77, les cellules peuvent être infectées par VHB lors d'une infection en suspension. Cependant, le taux d'infection reste faible avec au maximum 20 PEI U/mL de HBe antigène détecté. Ce qui est confirmé par l'analyse par fluorescence avec le marquage par HBc antigène avec un anticorps marqué Alexa555. Cependant, peu d'informations sont connues sur l'effet de la trypsine sur le récepteur NTCP. Ainsi la trypsinisation des cellules pré-infection pourrait jouer un rôle sur les paramètres viraux.



**Figure 77** : Analyse des paramètres viraux des cellules HepG2-NTCP infectées en suspension.

a) ELISA sur le surnageant des cellules récoltés 7 jours post infection pour le dosage des HBe antigènes. b) Images au microscope électronique (20X) des cellules HepG2-NTCP infectées en suspension. Les cellules ont été fixées 7 jours post infection et marquées avec un anticorps anti-HBc antigènes Alexa550. L'infection a été testée à MOI 250 ; 500 ; 1000.

Pour continuer l'optimisation de l'infection et permettre ainsi la transfection de nos complexes, les cellules ont étéensemencées à une densité de  $1.10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>, puis elles ont été infectées par le VHB. Après l'infection, les cellules ont été réensemencées à une densité de  $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> 48 heures après l'infection.

L'infection par le VHB pour cette expérience a été réalisée avec une MOI de 1000. Pour contrôler cette infection, un ELISA sur le surnageant des cellules a été fait pour déterminer la concentration des antigènes HBe et un marquage immunofluorescent avec les anticorps anti-HBc antigènes a été réalisé.

Comme observé dans la figure 78, l'ELISA montre un faible taux d'antigènes HBe avec une concentration de 25 PEI U/mL. Cependant, on constate un marquage positif de la protéine HBc par immunofluorescence qui confirme l'infection de ces cellules.

Cette technique de réensemencement des cellules après infection a permis de trouver un bon ajustement entre le niveau de confluence des cellules nécessaire à la transfection et celui nécessaire pour obtenir un taux d'infection satisfaisant.

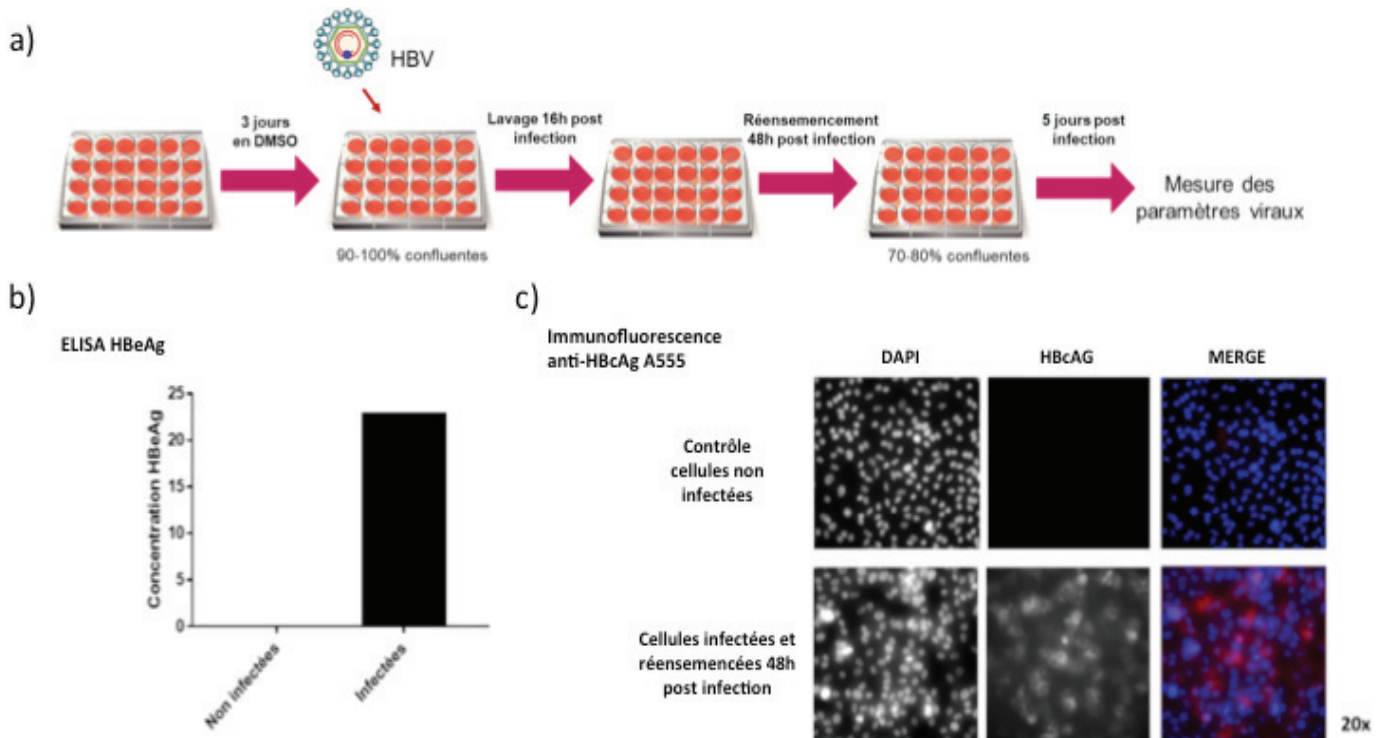
### **Système CRISPR/Cas9 ciblant le génome du VHB**

Les 8 ARN guides sélectionnés à partir de publications ont été testés sur un plasmide du VHB. Ces ARN guides ciblent des régions différentes du VHB. Les séquences de ces ARN ont été reportées dans le tableau numéro 7. L'objectif est de confirmer que le système CRISPR/cas9 avec ces ARN guides sont capables de cliver un plasmide contenant génome du VHB et de confirmer ce clivage dans notre modèle d'infection par le VHB.

Pour l'étude du clivage de la protéine Cas9 sur le génome du VHB, nous avons donc utilisé le plasmide du VHB pCH9 3091 qui présente 1.3 fois le génome du VHB. L'intérêt de l'utilisation de ce plasmide est donc d'augmenter nos chances de clivage et de s'assurer de la fonctionnalité de nos guides.

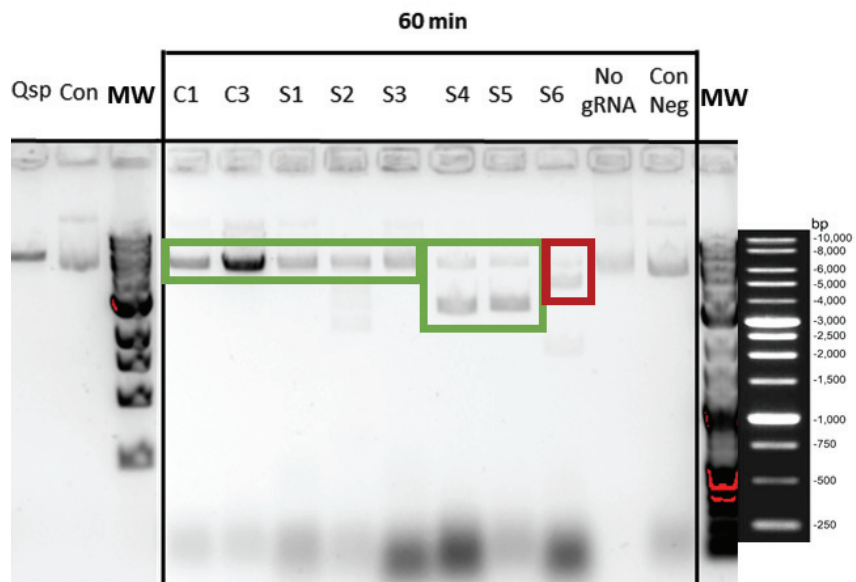
Pour vérifier la spécificité de nos résultats, plusieurs contrôles ont été réalisés. Un contrôle sans digestion du plasmide (Con), un contrôle avec la digestion par Qsp qui permet de linéariser le plasmide et un contrôle avec des RNP sans ARNguides (No gRNA).

Dans la figure 79, la présence de bandes à la taille attendue, à 6000 paires de bases, montre une bonne efficacité de nos ARN guides C1, C3 S1, S2 et S3 ce qui confirme le clivage du



**Figure 78** : Analyse des paramètres viraux sur les cellules HepG2-NTCP infectées et réensemencées à une MOI de 1000.

a) Schéma représentant le protocole expérimental d'infection. b) ELISA sur le surnageant des cellules récoltés 7 jours post infection pour le dosage des HBe antigènes. c) Images au microscope des cellules réensemencées 48h après infection par VHB. Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-HBc antigène Alexa555.



**Figure 79** : Clivage du plasmide VHB par le système CRISPR/Cas 9.

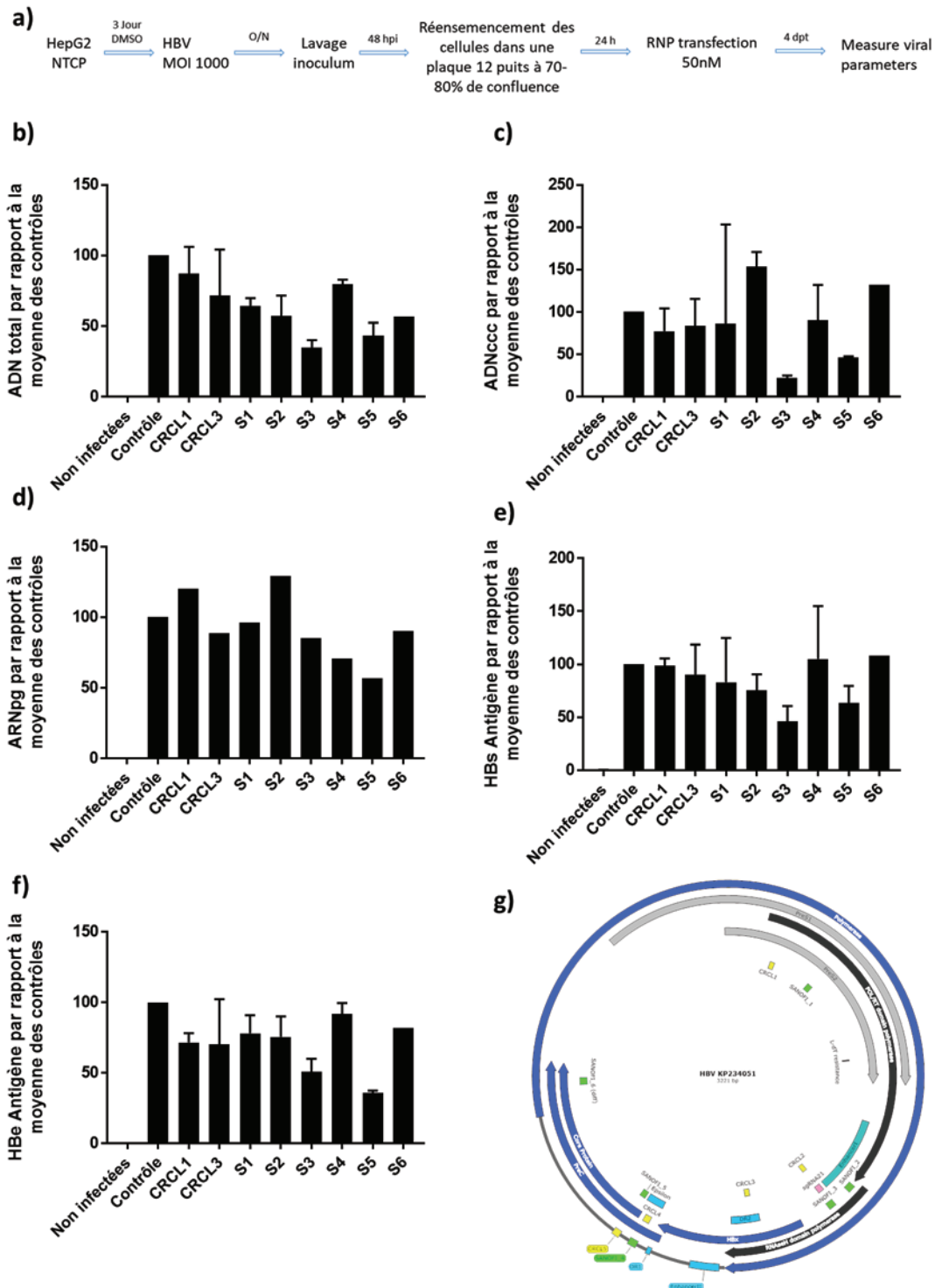
Gel d'agarose à 1% montrant le clivage du plasmide VHB pCH9 3022 par les RNP CRISPR/Cas9. Plusieurs ARN guide ont été testés ciblant des séquences différentes. C1 : CRCL1 ; C3 : CRCL3 ; S1 : Sanofi 1 ; S2 : Sanofi 2 ; S3 : Sanofi 3 ; S4 : Sanofi 4 ; S5 : Sanofi 5 ; S6 : Sanofi 6. Les rectangles verts montrent les bons clivages par les RNP CRISPR/Cas9 alors que le rectangle rouge montre un mauvais clivage par le RNP CRISPR/Cas9

plasmide. Les ARN guides S4 et S5 sont également efficace pour le clivage avec deux bandes attendues à 6000 et 3000 paires de bases, car ces ARN présentent deux sites fixation sur le plasmide. Seul l'ARN guide S6 présente une efficacité moindre. Deux mutations ont été retrouvées proche de la séquence PAM empêchant ainsi la fixation de l'ARNguide.

Ces résultats *in vitro* montre l'efficacité du clivage de la Cas9 avec les différents ARN guide étudiés à l'exception de l'ARN guide S6 qui présente deux mésappariements.

Après avoir constaté, le clivage du plasmide du VHB par la Cas9, nous avons vérifié la fonctionnalité du complexe ARN guide/CRISPR dans les conditions d'infection établies précédemment. Les cellules HepG2-NTCP ont été infectées puis réensemencées 48 heures après infection. Au bout de 24 heures après réensemencement, les RNP CRISPR/Cas9 ont été transfectées avec le JetCRISPR contenant l'un des 8 ARN guides testés précédemment. Au bout de 7 jours après infection, les cellules et le surnageant ont été récoltés pour analyser les différents paramètres viraux et vérifier l'efficacité de nos ARN guides. Les résultats ont été normalisés à partir des différents contrôles décrits dans la partie matériel et méthodes.

Parmi les 8 ARN guides testés, l'ARN guide S3 et S5 montre une meilleure efficacité sur l'ADNccc avec une diminution respectivement de 80 à 60% par rapport aux contrôles. Leur efficacité sur le VHB est confirmée avec une diminution de la quantité de l'ADN total (de 66% et de 57% respectivement) et avec une diminution des antigènes HBe de 50 et 35% respectivement. Malgré une forte diminution de l'ADNccc, on observe une diminution moins importante de l'ARNpg de 15% et de 45% respectivement (figure 80).



**Figure 80 :** Effet des RNP CRISPR/Cas9 sur l'infection des cellules par VHB

Analyse des différents paramètres viraux du VHB après transfection des RNP CRISPR/Cas9 dans des cellules HepG2-NTCP infectées. a) Protocole expérimental de l'infection. b) Quantification relative de l'ADN total du VHB par rapport à la moyenne des contrôles. c) Quantification relative de l'ADNccc du VHB par rapport à la moyenne des contrôles. d) Quantification relative de l'ARNpg du VHB par rapport à la moyenne des contrôles. e) Quantification relative de l'antigène HBs du VHB par rapport à la moyenne des contrôles. f) Quantification relative de l'antigène HBe du VHB par rapport à la moyenne des contrôles. g) Carte du génome de VHB représentant la position des 8 ARN guide utilisés pour le système CRISPR/Cas9



## 4 Discussion

La preuve de concept de l'efficacité du système CRSIPR/Cas9 anti-VHB est un atout pour la génération de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les traitements actuels ne permettant pas de dégrader directement l'ADNccc. Il est nécessaire de mettre en place des stratégies visant à cibler directement ce minichromosome.

Plusieurs études sur l'utilisation de ce système contre le virus de l'hépatite B ont déjà été réalisées. Cependant, peu d'entre elles ont montré une efficacité de ce système sur l'ADNccc dans des modèles d'infection notamment dans des modèles de culture primaire tels que les PHH. De plus, peu d'études ont été faites sur l'incorporation de ce système *via* des RNP (DeWitt, Corn, et Carroll 2017).

Dans ces travaux de thèse, nous avons pu donc mettre au point un système permettant l'incorporation des RNP CRISPR/Cas9 anti-VHB dans un modèle d'infection par VHB. Ainsi, nous avons testé différents transfectants pour favoriser l'incorporation de nos RNP dans le noyau des cellules, bien qu'on ait pu observer une meilleure transfection avec le JetCRISPR par rapport au JetPRIME, des optimisations pourraient être apportées. Les résultats ont été directement observables au microscope, mais aucune quantification sur le pourcentage d'efficacité n'a été faite. La mise en place d'une telle quantification nous permettrait d'obtenir un ratio entre les cellules transfectées ou pas et de pouvoir optimiser les conditions pour augmenter le nombre de cellules transfectées et l'efficacité de notre système. Dans notre cas, la différence entre les deux transfectants a directement permis de voir l'efficacité de l'un par rapport à l'autre et de passer à la mise au point de l'essai avec la T7E1 pour voir l'efficacité de notre complexe.

Nous avons ensuite testé différentes concentrations de RNP et choisis la concentration de 50nM pour favoriser nos chances de clivage. Des expériences similaires pourraient être réalisées avec des concentrations plus faibles afin de contrôler si nous gardons la même efficacité sur les paramètres viraux. En effet, nos résultats de mise au point en microscopie montrent un taux de transfection à 30nM qui est comparable à celui observé à 50nM, ce qui dans ce cas permettrait en plus de réduire les coûts.

Nous avons ensuite vérifié la fonctionnalité des RNP en contrôlant la cinétique d'incorporation. Nous avons pu confirmer la rapidité d'incorporation de ce système en les

détectant dès 24h post transfection. Un autre avantage des RNP est la limitation de la génération des « off-target effect » car ils sont rapidement dégradés et favorisent la formation de multiplexing ce qui permet d'augmenter l'efficacité du clivage. Cependant, il s'agit d'un mode d'incorporation transitoire et donc inadéquat en cas d'expression stable ou élevée de composants CRISPR. De plus, ils ne sont pas encore adaptés au modèle *in vivo*.

Des optimisations sur les conditions d'infection ont dû être réalisées pour permettre la transfection de nos cellules. En effet, pour favoriser l'infection des cellules, ces dernières doivent être confluentes alors que pour favoriser les transfusions, les cellules doivent être peu confluentes. Nous avons donc testé différents types de protocoles.

Le premier protocole testé a été l'infection des cellules en suspension (Okuyama-Dobashi et al. 2015). En effet, il a été décrit que cela permettrait une meilleure accessibilité au récepteur NTCP des cellules ce qui favoriserait l'efficacité d'infection. Nos résultats obtenus ont ainsi montré que l'infection en suspension était réalisable, mais le taux d'infection restait peu élevé. Des optimisations pourraient être faites au protocole en augmentant par exemple la densité cellulaire. De plus, l'effet de la trypsine pré infection pourrait jouer sur la structure du récepteur. La trypsine, étant une protéase à large spectre, pourrait cliver le récepteur et les corécepteurs potentiels (H.-L. Huang et al. 2010). On pourrait vérifier par immunofluorescence la présence de ce récepteur post trypsine. Il serait intéressant de mettre en place un protocole où l'utilisation de la trypsine serait remplacé par l'acutase dont l'effet altère moins les protéines de surface.

Le second protocole testé afin de favoriser les conditions d'infection et de transfection est le réensemencement des cellules 48h après l'infection à une densité cellulaire plus faible. Les résultats obtenus par immunofluorescence avec un anticorps anti-HBc antigène ont permis de montrer que les cellules restaient infectées même après réensemencement. Les résultats de microscopie ont été confirmés en contrôlant la quantité d'antigène HBe dans le surnageant des cellules. La concentration des antigènes n'est pas élevée et cela peut s'expliquer par le réensemencement qui entraîne un changement de milieu et la réduction du temps d'accumulation dans le surnageant.

Ces différentes étapes de mise au point nous ont permis de mettre en place un protocole et d'obtenir des résultats préliminaires. Nous avons mis en évidence l'efficacité de

deux ARN guide sur les huit testés ayant un impact sur l'ADNccc. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport aux contrôles pour permettre une meilleure visualisation.

Différentes optimisations peuvent venir s'ajouter à ces résultats préliminaires. Tout d'abord, il serait nécessaire de confirmer l'effet de ce système sur la diminution de l'ADNccc par la technique Southern Blot. Ensuite, il serait intéressant lors des prochaines expérimentations de vérifier également le génome éditant via l'enzyme T7E1. En effet, cela ajouterait une confirmation du clivage de notre ADNccc et nous permettrait d'avoir un pourcentage de clivage. Cette méthode semi-quantitative est souvent limitée en sensibilité, peut générer des faux positifs et ne détecte pas les mutations uniques ou réparées. (Vouillot, Thélie, et Pollet 2015). De grandes quantités d'ADN sont généralement nécessaires pour vérifier le clivage qui est parfois sous-estimé.

D'autres techniques d'édition sont envisageables pour s'assurer du clivage de notre gène. Le « gold standard » reste les techniques de séquençage permettant de visualiser directement sur le brin d'ADN la présence ou l'absence de nucléotide ou bien l'insertion de mutation. Les méthodes de séquençage ont beaucoup évolué depuis quelques années permettant la mise en place de techniques à haut débit avec notamment le NGS (Next génération séquencing). Ces dernières donnent ainsi la possibilité de pouvoir séquencer des grandes quantités d'ADN en peu de temps. L'inconvénient reste le coût qui rend difficile d'utilisation pour des mises au point.

Pour optimiser, les résultats sur le contrôle de l'édition, il serait aussi intéressant de développer un protocole avec la ddPCR. Une des fonctionnalités de cette technique est de repérer des mutations avec de faibles quantités d'ADN. La ddPCR pour la détection du génome éditant permettrait d'avoir une réponse rapide, peu coûteuse et précise. Il est possible de déterminer le pourcentage de NHEJ en utilisant en duplex une sonde marquée avec le fluorochrome FAM ciblant une séquence en amont de la séquence cible et une sonde marquée VIC qui cible la séquence cible. Ainsi le ratio entre la concentration obtenue pour les gouttelettes uniquement FAM positive et la concentration obtenue pour les gouttelettes doublement positives permet d'obtenir le pourcentage des mutations réalisées par NHEJ.

La vérification du génome éditant permettrait de voir le type de mutations et de contrôler si les mutations réalisées ont été faites sur des parties codantes ou non. Une étude

sur l'analyse des mutations de l'ADNccc induite par le système CRISPR/Cas9 ciblant le gène HBx a montré que sur un million de séquences analysées par NGS (Seeger et Sohn 2016) :

- 90% des séquences portent une mutation sur la région cible
- 60% des séquences présentes une mutation unique au niveau du quatrième nucléotide en amont de la séquence PAM et seulement 8% de ces mutations correspondent à l'insertion d'un résidu C
- 10% des séquences présentent une mutation unique au niveau du troisième nucléotide en amont de la séquence PAM (site préférentiel du clivage de la Cas9)
- 16% des séquences montrent une délétion de 2 à 6 nucléotides
- 7% des séquences montrent une délétion de 3 à 6 nucléotides situés au niveau de l'ORF de HBx.

Cette analyse complète montre que malgré le clivage des séquences par le système CRISPR/Cas9, celui-ci resterait insuffisant pour inactiver l'ADNccc de façon complète. Cependant, cette étude utilise l'incorporation du système *via* des lentivirus ciblant un seul gène. Une analyse similaire serait à faire en utilisant une autre méthode d'incorporation telle que les ribonucléotides, en regardant également d'autres séquences cibles, mais aussi en combinant plusieurs ARN guides différents.

L'avantage de ce système est qu'il peut combiner plusieurs guides en même temps permettant ainsi de gérer plusieurs mutations ou délétions favorisant les effets anti-VHB. Plusieurs mises au point sont également à prévoir. Notamment sur le nombre d'ARN guides à incorporer en même temps et les séquences à cibler. Le ratio nécessaire aux différents ARN guides pour favoriser une meilleure réduction des paramètres viraux, mais aussi la position relative des séquences cibles.

Enfin, il serait aussi nécessaire d'optimiser ces conditions pour permettre la preuve de concept de l'efficacité du système dans des PHH. Actuellement, peu de méthodes ont montré une grande efficacité de transfection dans des cellules primaires. Récemment, il a été montré que la transfection des RNP CRISPR dans des cellules primaires de cellules T murines et humaines était possible par électroporation offrant ainsi la possibilité d'étendre ce système à d'autres cellules primaires (Seki et Rutz 2018).

## Chapitre 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ADNccc joue un rôle primordial dans la pathogénèse du VHB puisqu'il est la matrice pour la réplication virale. Son élimination définit la guérison complète de la maladie. Cependant, plusieurs défis sont encore à relever pour y parvenir. De nombreux laboratoires tentent aujourd'hui de quantifier et d'éliminer l'ADNccc (X. Li et al. 2017; Julie Lucifora et Protzer 2016).

Premièrement, il est nécessaire de développer des technologies suffisamment sensibles et robustes pour quantifier finement l'ADNccc. En effet, peu de copies de cet ADN sont présentes dans les hépatocytes, notamment dans les échantillons de biopsie, et une seule copie est nécessaire pour la réalisation d'un cycle viral. Aujourd'hui, dans des patients traités par des analogues nucléosidiques et/ou PEG-IFN, de faibles quantités d'ADNccc sont encore présentes montrant ainsi l'inefficacité de ces traitements à cibler la matrice du VHB.

Deuxièmement, afin de pouvoir quantifier l'ADNccc, il est nécessaire d'effectuer une digestion par une DNase en amont de la quantification. Cette DNase a pour but d'éliminer tous les ADN simples brins et les ADN doubles brins linéaires. Cependant, l'efficacité des enzymes utilisés peut apporter un biais dans la quantification. L'utilisation de la PSAD surestime les concentrations en ADNccc car son efficacité est inférieure à 100 %. A l'inverse, l'utilisation de la T5 peut dégrader une partie de l'ADNccc aboutissant ainsi à une sous-estimation de sa quantification. Le choix de la DNase parmi les différentes disponibles pour l'élimination de l'ADNccc rendent difficile la comparaison des résultats. A défaut de trouver une solution permettant de quantifier l'ADNccc sans avoir recours à une digestion enzymatique préalable, il serait nécessaire de standardiser la méthode de digestion au niveau international pour mieux évaluer les résultats de quantification de l'ADNccc.

Ces travaux de thèse reposent sur la mise au point de l'utilisation d'une nouvelle technologie, la ddPCR, permettant de quantifier l'ADNccc dans des biopsies de patients infectés chroniquement par le VHB et ayant bénéficié des traitements à long terme. Dans la perspective d'élaborer de nouvelles stratégies permettant la guérison complète de la maladie, nous avons mis en place une procédure expérimentale avec le système CRISPR/Cas 9 pour établir une preuve de concept du ciblage de l'ADNccc.

### La ddPCR : nouvelle technologie pour la quantification de l'ADNccc.

Plusieurs méthodes de qPCR ont été développées pour pouvoir doser l'ADNccc (nested, RCA, compétitive, classique) (X. Li et al. 2017). Cependant, bien que ces techniques permettent la détection de ce minichromosome, elles nécessitent toujours l'utilisation d'une courbe standard, avec tous les inconvénients associés.

- L'utilisation d'une gamme standard pour la quantification des échantillons peut générer des biais si l'efficacité d'amplification de la matrice utilisée pour la gamme (généralement un plasmide) est différente de l'efficacité d'amplification des échantillons (biopsies pas exemple).
- La limite de sensibilité de la qPCR ne permet pas de quantifier des échantillons faiblement concentrés en ADNccc (Xu et al. 2011; Margeridon et al. 2008a; Takkenberg, Menting, et Beld 2012; Addison et al. 2000).

La technique de ddPCR déjà utilisée dans de nombreux domaines, présente des avantages par rapport à la qPCR (Gutiérrez-Aguirre et al. 2015; van Ginkel et al. 2017; Denis et al. 2016; Garcia et al. 2018; Maheshwari et al. 2017). L'avènement de la ddPCR a constitué un atout pour la détection de l'ADNccc et la compréhension de la pathogénèse de VHB. En 2014, il a été démontré que la ddPCR pouvait être utilisée pour déterminer le nombre de copies d'ADN du VHB dans des échantillons cliniques fixés en paraffine et permettait de corréler le statut du CHC et la quantité d'ADN de VHB (J.-T. Huang et al. 2015). En 2015, il a été montré une meilleure sensibilité de la ddPCR pour la détection de l'ADNccc comparée à la qPCR dans des modèles de culture cellulaire puis en 2017 sur une cohorte de patients traités par IFN (Mu et al. 2015a, 2017).

Les avantages de la ddPCR nous ont conduits à utiliser cette technologie pour quantifier l'ADNccc dans nos échantillons. Pour s'assurer de la fiabilité de nos résultats, il a été nécessaire de l'optimiser avec nos conditions expérimentales. Les différentes étapes de mise au point de la ddPCR ont permis d'augmenter la sensibilité de 2 log par rapport à la qPCR pour la quantification d'un plasmide d'ADN du VHB. La sensibilité est également augmentée lorsque la quantification de l'ADNccc est réalisée dans des échantillons hépatiques de souris humanisées. La ddPCR nous a permis d'apporter un gain uniquement lors de la quantification d'échantillons faiblement concentrés, mais ne permet pas d'augmenter la spécificité du fait de la nécessité d'utiliser une DNase. Un comité international, dont font

partie des membres de notre laboratoire, tente de résoudre ce problème pour harmoniser la détection.

En plus d'une sensibilité accrue, l'avantage de cette technologie est d'apporter une quantification absolue précise des échantillons tout en s'affranchissant de l'utilisation d'une gamme standard. L'absence de la gamme standard apporte également un avantage au niveau de la quantification des ARN. Dans notre cas, cette technologie nous a permis de mieux évaluer l'expression de l'ARNpg qui est un indicateur de la présence et de la fonctionnalité de l'ADNccc. En effet, celui-ci est transcrit à partir de l'ADNccc et sa détection dans les échantillons testés confirme donc que l'ADNccc est toujours présent et transcriptionnellement actif.

La mise en place de la détection par événements rares permet une augmentation supplémentaire de la précision et de la sensibilité de la technique. Elle est basée sur la multiplication de réplicas. En multipliant les réplicas de l'échantillon d'intérêt, on augmente la capacité de détection en diminuant les biais liés à l'expérimentateur et à la manipulation. L'inconvénient est que cette méthode nécessite de grandes quantités d'échantillons à analyser, ce qui est parfois non compatible avec les procédures d'expérimentations, notamment pour les biopsies.

Ainsi, la mise au point de la ddPCR dans notre laboratoire a permis l'utilisation de cette technologie pour la quantification de l'ADNccc dans des biopsies de patients infectés chroniquement.

### **Détection de l'ADNccc dans des cohortes de patients traités.**

Actuellement, il existe 2 types de traitements pour les hépatites chroniques : les analogues de nucléos(t)ides, et le PEG-IFN (Lampertico et al. 2017). Aucun de ces traitements n'est capable d'éradiquer la maladie. Ces derniers permettent uniquement une diminution de la charge virale et réduisent le risque de cirrhose et de CHC sans toutefois affecter les niveaux d'ADNccc dans les hépatocytes.

L'absence de technologie suffisamment sensible pour détecter l'ADNccc à de faibles concentrations et la difficulté d'obtenir des biopsies ont rendu difficile l'évaluation de l'efficacité des traitements à long-terme. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié trois cohortes différentes. Chacune comportait des patients traités pour le VHB. La mise en

place de la ddPCR a permis d'évaluer de façon fiable et sensible la concentration de l'ADNccc intrahépatique dans les biopsies provenant de ces trois cohortes.

- Cohorte PEGAN :

La première cohorte, PEGAN, est un essai prospectif et randomisé pour évaluer le traitement par PEG-IFN. L'objectif de cet essai était d'évaluer si la prise à long terme d'analogues de nucléos(t)ides (au moins un an avant inclusion dans la cohorte) suivie de la prise de PEG-IFN favorisait la perte de l'HBsAg, en comparaison avec une monothérapie par des analogues de nucléos(t)ides.

Une première analyse de cette cohorte ne montre pas d'effet de l'ajout du traitement PEG-IFN sur l'élimination des antigènes HBs (Bourlière et al. 2017). Cependant, il a été décrit que l'IFN pouvait jouer un rôle sur la régulation transcriptionnelle de l'ADNccc (Laura Belloni et al. 2012a). Nous avons donc analysé ces biopsies, par ddPCR, pour évaluer l'effet du PEG-IFN sur cet ADN.

Les échantillons ont été testés par qPCR et ddPCR. La détection a pu être possible uniquement avec la technique de ddPCR montrant ainsi l'importance de cette technologie. Les résultats ne semblent pas montrer d'impact du PEG-IFN dans l'élimination des ADNccc comparé à un traitement par analogues nucléos(t)ides seul. La faible quantité d'échantillons (4 patients) ne nous permet pas de conclure formellement sur l'effet du PEG-IFN.

La présence de l'ARNpg dans ces échantillons a montré que l'ADNccc est transcriptionnellement actif. L'analyse de l'état transcriptionnel de l'ADNccc par la technique de ChIP permettrait de déterminer les marques épigénétiques présentes sur l'ADNccc. En effet, bien que l'ARNpg soit présent, l'étude des marques activatrices ou répressives de la transcription sur l'ADNccc apporterait des informations nécessaires à la compréhension du mécanisme d'action du PEG-IFN sur la régulation de cet ADNccc.

- Cohorte de patients traités par la Telbivudine :

La seconde cohorte de patients étudiée au cours de cette thèse était constituée de 56 patients traités par la Telbivudine pendant 3 à 5 ans. Ces patients ont été comparés à un groupe contrôle rétrospectif de 47 patients non traités.



L'analyse des résultats confirme la meilleure sensibilité de la ddPCR par rapport à la qPCR. Ces analyses montrent la présence d'ADNccc et d'ARNpg. Dans le groupe traité par la Telbivudine, on a constaté une diminution significative de leur quantité comparée au groupe contrôle ainsi qu'une diminution de l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc mesurée par le ratio ARNpg/ADNccc.

La diminution de l'ADNccc après traitement à long terme peut s'expliquer par la division cellulaire et le renouvellement des hépatocytes, lors de la compensation de la perte cellulaire provoquée par la réponse des cellules T (W. S. Mason et al. 2007). L'action de la telbivudine empêche la formation de nouvelles molécule d'ADNrc et ainsi la formation de nouvelles molécules d'ADNccc qui ne possèdent pas d'origine de réplication. La mort cellulaire et la mitose entraînent donc sa dilution, voire sa perte, dans les cellules filles expliquant la diminution de celui-ci à long terme.

Pour vérifier l'état transcriptionnel de l'ADNccc, certains échantillons ont été testés en CHIP avec des anticorps dirigés contre des histones modifiées. Cette analyse a révélé un enrichissement des marques épigénétiques répressives sur l'ADNccc en présence de Telbivudine. Il est difficile de savoir s'il s'agit d'un effet direct ou indirect de la Telbivudine.

Pour confirmer le changement du statut épigénétique de cet ADN, il serait intéressant de vérifier l'effet de la Telbivudine *in vitro*. L'altération des marques épigénétiques par la Telbivudine a déjà été mise en évidence au niveau des gènes cellulaires. Il a été démontré que le VHB était associé à des modifications du profil de méthylation sur les histones de différents gènes cellulaires dans des cellules HepG2.2.15 et dans des échantillons cliniques hépatiques. La majorité des gènes modulés par le VHB jouent un rôle dans la pathogenèse. L'ajout de la Telbivudine dans ces échantillons a entraîné une restauration du profils d'expression notamment au niveau des gènes limitant l'entrée du virus et les gènes de l'immunité (Tian et al. 2014). L'action de la Telbivudine sur des gènes cellulaires laisse imaginer qu'un effet répressif peut se produire sur l'ADNccc.

Les mécanismes par lesquels la Telbivudine initie un changement des marques épigénétiques sont encore inconnus. En effet, les analogues de nucléos(t)ides interviennent au niveau de la transcription inverse empêchant la formation de l'ADNrc à partir de l'ARNpg, et donc la formation de virions infectieux. Ceci peut entraîner une accumulation des

transcrits viraux dans la cellule ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de particules à ARN (ARNpg et épissé) (Lam et al. 2017). On pourrait alors imaginer un mécanisme de rétro contrôle par la cellule, faisant intervenir des facteurs cellulaires pour inhiber la transcription du VHB. Un cycle de répression et d'activation de l'ADNccc, directement dépendant de la quantité d'ARNm viraux pourrait avoir lieu. Il serait donc intéressant de vérifier si des protéines impliquées dans un tel mécanisme interagissent avec l'ADNccc par la technique de CHIP en absence/présence d'analogues de nucléos(t)ides.

Il serait également intéressant de vérifier si l'arrêt de la Telbivudine génère un retour de marques activatrices sur l'ADNccc. Cela est difficilement faisable sur des échantillons de biopsies et la mise en place d'un protocole *in vitro* permettrait plus facilement de vérifier les marques épigénétiques par CHIP. Mais la durée du traitement *in vitro* ne sera jamais identique à celle des patients traités à long-terme. En effet, il est difficile de garder des cellules en culture durant une longue période.

Des analyses complémentaires pourraient être effectuées pour vérifier si la Telbivudine impacte d'autres mécanismes de la régulation épigénétique. En effet, au cours de cette thèse, seules les modifications du profil des histones ont été observées. Il serait intéressant de vérifier si la Telbivudine impacte également le statut de méthylation de l'ADNccc au niveau des îlots CpG. Trois régions d'îlots CpG ont été identifiées au niveau du génome du VHB. La méthylation de ces îlots est associée à un état réprimé de la transcription (Y. Zhang et al. 2014). Ainsi une analyse de l'ADNccc par séquençage bisulfite après traitement par la Telbivudine permettrait de voir l'état de méthylation. Cette technique permet la conversion des cytosines non méthylées en uracile permettant ainsi de détecter les sites de méthylation. La présence de méthylation au niveau des îlots CpG confirmerait ainsi le statut réprimé de l'ADNccc observé par les analyses de CHIP.

On pourrait également vérifier si la Telbivudine a un impact sur le positionnement de l'ADNccc dans le noyau cellulaire. En effet, il a été montré que la modification des îlots CpG et la modification des histones entraînent un changement de conformation de la chromatine, ce qui modifie sa localisation dans des régions chromatiennes spécifiques. Dans cette étude, la technique 4C (Circular chromosomal confirmation capture) a été utilisée pour rechercher la localisation nucléaire de l'ADNccc dans les hépatocytes et pour étudier son interaction avec le génome de l'hôte. Cette technologie a été mise au point afin d'analyser

l'organisation spatiale de la chromatine dans le noyau. Il a été ainsi montré que lorsque l'ADNccc était transcriptionnellement actif, il se positionne dans une région subnucléaire regroupant des facteurs et des structures permettant la transcription active de la chromatine. A l'inverse, l'absence de HBx, protéine virale participant à la régulation transcriptionnelle de l'ADNccc, entraînait un changement de localisation menant alors l'ADNccc dans une zone faiblement transcriptionnelle (Hensel et al. 2018). Ainsi, il serait intéressant de confirmer le statut réprimé de l'ADNccc par la Telbivudine en vérifiant sa position dans le noyau des hépatocytes.

Il faudrait également vérifier et confirmer si les autres analogues de nucléos(t)ides entraînent le même effet sur la transcription de l'ADNccc. En effet, il existe 6 molécules qui ont été approuvées. Cependant, la plupart d'entre elles amènent des mutations qui génèrent des résistances. C'est le cas de la Telbivudine qui génère 10 à 25% de mutation chez les patients traités et qui n'est donc plus recommandée dans le cas du traitement contre l'hépatite B. Il serait important de vérifier si le Ténofovir, recommandé par l'EASL, apporte les mêmes effets sachant qu'aucune résistance n'a été décrite pour le moment avec cet analogue. En plus des analogues de nucléos(t)ides, cet impact pourrait être vérifié avec les nouvelles stratégies thérapeutiques en cours de développement en combinaison ou non avec les analogues de nucléos(t)ides. Comme par exemple, l'utilisation des inhibiteurs de capsides ciblant la protéine HBc impliquée aussi dans la structure de l'ADNccc, pourrait augmenter les impacts sur la transcription de l'ADNccc

- Cohorte de transplantés hépatiques de l'hôpital de Beaujon :

La troisième cohorte regroupe des patients ayant bénéficiés d'une transplantation hépatique dans le cadre d'un traitement pour le VHB. Selon l'année de l'inclusion des patients, le traitement post transplantation varie. Les patients ont été traités avec des analogues de nucléos(t)ides à long terme et des immunoglobulines HBIg, soit pendant une durée indéterminée, soit pendant 7 jours pour la période la plus récente. Deux biopsies ont été réalisées, la première le jour de la transplantation et la seconde un an après. L'objectif de l'étude de cette cohorte a été de contrôler les paramètres viraux intrahépatiques par la ddPCR, afin de vérifier l'absence du VHB dans les greffons.

La détection par ddPCR de ces échantillons a permis de mettre en évidence la présence de l'ADNccc dans 23 échantillons sur 33 et la présence de l'ARNpg dans tous les échantillons. Il n'y avait pas de différence selon la durée du traitement IG anti HBs ni selon le statut des anticorps anti-HBc du donneur. La présence de l'ADNccc affirme la réinfection des greffons et celle de l'ARNpg suggère que l'ADNccc est toujours transcriptionnellement actif. Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer la présence du VHB.

La première hypothèse serait qu'il existe un autre réservoir du VHB qui réinfecte le foie transplanté. Plusieurs études ont montré qu'il pouvait exister un réservoir extra-hépatique du VHB, les cellules mononuclées sanguines périphériques, « Peripheral blood mononuclear cells » (PBMC). Il a été rapporté que ces cellules étaient permissives à l'infection par le VHB mais sa réplication a été démontrée seulement dans quelques études (Datta et al. 2009; Rong et al. 2007; Stoll-Becker et al. 1997; Q. Yan et al. 2016). La technique *Hybridation In situ* a montré que 10% des PBMC contenaient de l'ARN du VHB chez les porteurs de l'infection. Il a également été rapporté l'importance de la variabilité génétique du VHB pour la réinfection hépatique (Hadchouel et al. 1988). Une étude a montré que des patients ayant eu une réinfection après transplantation avaient un variant du VHB muté au niveau de l'acide aminé 145 de la protéine HBsAg, qui correspond au « déterminant a » reconnu par les anticorps (McMahon et al. 1992). Une autre mutation a également été détectée au niveau de la région preCore/Core et notamment au niveau du codon stop du gène preCore (Fang et al. 1993). La plupart de ces mutations seraient retrouvées au niveau des PBMC porteur du VHB. Ces résultats sont très controversés. Néanmoins, un tropisme du VHB pour les PBMC pourrait expliquer la longue persistance du virus et la réinfection du foie transplanté.

La deuxième hypothèse serait que la présence de particules circulantes dans le sérum de patients réinfecterait le foie transplanté. Plusieurs particules sous-virales circulantes ont été décrites pour le VHB. Parmi elles, on distingue des particules non-infectieuses sans génome avec ou sans capsid. Récemment, il a été découvert des particules contenant de l'ARN. Ces particules ont été retrouvées dans le sérum de patients infectés chroniquement (Jie Wang et al. 2016; Jansen et al. 2016). L'action des analogues de nucléos(t)ides ne diminuerait pas significativement la présence de ces particules dans le sérum, et même l'augmenterait *in vitro*. Une étude sur les cellules HepaRG et PHH a montré par la technique d'immunoprécipitation avec des anticorps anti-HBs que ces particules étaient enveloppées.

Sous l'action de détergent, une immunoprécipitation avec des anticorps anti-HBc a également permis de montrer que ces particules étaient encapsidées. De plus, un gradient de ces particules a montré qu'elles avaient la même densité que les particules de Dane. Des analyses par Northern Blot et par 3' race ont permis de montrer que ces particules contenaient de l'ARNpg ou l'ARN épissé (Lam et al. 2017; Jansen et al. 2016). Ainsi, ces données permettent d'émettre l'hypothèse que ces particules pourraient être infectieuses et que leur présence dans le sérum pourrait permettre une réinfection des cellules hépatiques. Cependant, ceci reste encore à être démontré.

La présence d'ADNccc dans nos échantillons de biopsie confirme la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant l'éradication de cette matrice virale. Actuellement, plusieurs axes peuvent être envisagés.

### **CRISPR/Cas9 : nouvelle stratégie pour cibler l'ADNccc :**

Le développement du système CRISPR/Cas9 anti-VHB, comme outil expérimental, ciblant l'ADNccc est au centre des recherches actuelles. Ce système permet grâce à un ARN guide de cibler directement une séquence d'intérêt et de générer un clivage grâce à la protéine Cas9. Au cours de cette thèse, différentes étapes de mise au point ont été faites pour cibler l'ADNccc avec ce système. Après avoir testé différents types de transfectants et de mode d'infection, nous avons mis en place un protocole d'incorporation de nos ARN guides anti-VHB *via* un complexe RNP dans des cellules HepG2-NTCP infectées.

Les résultats préliminaires ont montré que le système CRISPR/Cas9 pouvait réduire jusqu'à 80% l'ADNccc avec l'ARN guide S3 ciblant la polymérase et le S5 ciblant l'ORF preCore/Core. Cependant, aucune vérification par l'enzyme T7E1 ou en NGS n'a encore été réalisée pour contrôler le clivage et les possibles « off-target effect » générés. Plusieurs étapes sont encore à considérer pour permettre une validation complète du système. Bien que l'incorporation par RNP présente de nombreux avantages notamment sur la réduction de « off target effect » et la rapidité d'action du complexe, ce protocole doit encore être validé sur des cellules primaires et *in fine* une validation *in vivo* devra aussi être réalisée.

Une des particularités du système CRISPR/Cas 9 est la possibilité de cibler plusieurs gènes en même temps avec des ARN guides différents. Ainsi, la mise au point de la combinaison des ARN guides testés pourrait augmenter l'efficacité observée sur l'ADNccc.

Cependant, ce système présente des limites qu'il est important de prendre en compte.

Premièrement, le risque de « off-target effect » ne peut pas être entièrement éliminé. Les ARN guides peuvent cibler de façon non-spécifique des séquences du génome de l'hôte. Le ciblage de ces séquences peut générer des mutations (insertion /délétion) ou des dégradations non contrôlées, ce qui peut fragiliser son intégrité. Les conséquences de ces mutations ne sont pas connues, mais peuvent être délétères (favoriser la carcinogénèse par exemple). Récemment, il a été montré que les régions non-spécifiques ciblées par le système CRISPR/Cas9 pouvait être déterminées en utilisant le séquençage du génome (Tsai et al. 2015). Une analyse du génome pour les ARN guides du VHB reste à réaliser.

La deuxième limite concerne le clivage de l'ADNccc. En effet, deux phénomènes peuvent se produire : soit le clivage n'est pas réparé par le système de l'hôte, ce qui génère la dégradation de l'ADNccc ; soit le clivage est soumis au système de réparation de l'hôte ce qui induit des mutations. Cependant, les effets de ces mutations sur l'ADNccc ne sont pas connus. Ces dernières peuvent le rendre inactif, mais certaines pourraient avoir des conséquences négatives comme l'augmentation de la réplication virale, l'intégration dans le génome de l'hôte ou la carcinogénèse.

Enfin, il est connu que l'ADN du VHB s'intègre dans le génome de l'hôte (Sung et al. 2012). Le clivage de l'ADNccc par le système CRISPR/Cas9 pourrait donc également cliver le génome intégré qui partage des séquences identiques avec l'ADNccc. Bien que de nombreuses études ont montré l'efficacité de ce système pour inactiver ou dégrader les séquences du VHB intégrées (Seeger et Sohn 2014; Karimova et al. 2015; H. Li et al. 2016, 2017), le clivage de ces séquences peut causer des dommages au niveau du génome de l'hôte avec le risque d'augmenter son instabilité et de favoriser la carcinogénèse.

Plusieurs adaptations du système CRISPR/cas9 existent et peuvent être envisagées pour cibler le VHB et notamment pour réduire le risque d' « off-target effect ». Les ARN guides sont capables de se fixer sur une séquence avec une tolérance de 5 mésappariements offrant une variété de gènes non-cibles pour la fixation. Pour imaginer une application thérapeutique, il est essentiel d'augmenter la spécificité du système pour que ce dernier ne cible que la séquence d'intérêt.

- La génération de la nCas9 :

Une première adaptation possible consiste à muter un des deux domaines catalytiques de la protéine Cas9. La Cas9 est constituée de deux domaines RuvC et HNH, la mutation d'un seul acide aminé sur le domaine RuvC permet de l'inactiver. Le clivage n'est possible qu'avec le domaine HNH. Ainsi, uniquement, le brin complémentaire à l'ARN guide est clivé, ce qu'on appelle une « nickase » ou nCas9 (Trevino et Zhang 2014). Pour permettre le clivage double brin, il est donc nécessaire de délivrer deux nCas9 avec chacun un ARN guide adjacent de la séquence PAM. La cassure double du brin peut donc avoir lieu uniquement si les deux nCas9 se fixent, améliorant grandement la spécificité (Ran et al. 2013). Il est important de vérifier que l'efficacité de clivage obtenu soit aussi active que celle produite par le système classique. La réduction du risque des « off-target effect » par ce type de système a été démontrée dans des modèles de cultures cellulaires montrant une spécificité 100 fois supérieure de la nCas9 par rapport à une Cas9 non modifiée.

- La génération de la dCas9 :

Une deuxième adaptation possible consiste à muter les deux domaines catalytiques pour former une protéine inactive qu'on appelle la dCas9. Ce système garde sa fonction de fixation sur la séquence cible, mais ne permet pas son clivage limitant les risques de « off-target effect ».

Cette dCas9 peut avoir plusieurs utilisations :

Premièrement, l'utilisation de la dCas9 sans ajout de modifications permet sa fixation sur la séquence cible ce qui provoque un encombrement stérique qui arrête la transcription par la polymérase (Larson et al. 2013). Par exemple, la fixation de ce système au niveau des régions promotrices de l'ADNcc bloquerait la formation de l'ARNpg et donc la formation de nouveaux virions. Le ciblage des promoteurs des autres ARN viraux permettrait de perturber le cycle viral. Notamment, il serait intéressant de bloquer la formation de la protéine Core et de la protéine X, protéines jouant toutes les deux un rôle dans la régulation de l'ADNcc. La première semble jouer un rôle dans la structure de la chromatine alors que la seconde intervient plutôt dans la régulation de sa fonction.

Deuxièmement, l'utilisation de la dCas9 en la fusionnant avec un domaine protéique répresseur permettrait de diminuer l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc (CRISPRi). Plusieurs protéines répressives peuvent être envisagées :

- **La fusion avec une cytidine désaminase** : Ce système consiste à fusionner le système dCas9 avec une cytidine désaminase permettant de convertir la cytosine en uracile au niveau de la séquence ciblée (Eid, Alshareef, et Mahfouz 2018). L'adaptation de ce système contre le VHB permettrait de désaminer directement l'ADNccc entraînant sa dégradation.
- **La fusion avec une méthyltransférase** : L'ADNccc étant un minichromosome, il est soumis au code de la régulation épigénétique de l'hôte avec des protéines histones et non histones (Tropberger et al. 2015a). Il a été montré que l'ADN est soumis à une méthylation médiée par des ADN méthyltransférases. Cette méthylation peut se réaliser au niveau des îlots CpG entraînant une répression de la transcription (Guo et al. 2011) Le génome de VHB contient 3 régions d'îlots CpG. Il a été montré que leur méthylation est associée à une diminution de la quantité d'ARNpg. Il serait donc possible d'envisager un système CRISPR/dCas9 fusionné avec une enzyme méthyltransférase ciblant ces îlots CpG ou des régions adjacentes pour entraîner une répression de la transcription (McDonald et al. 2016).
- **La fusion avec une déacétylase** : D'autres modifications épigénétiques peuvent être régulées par ce type de mécanisme. En effet, ce système peut être combiné avec diverses protéines impliquées dans la modification des histones. La fusion de ce système avec des protéines telle que KRAB, qui permet la déacétylation des histones en recrutant des complexes, favoriserait la répression de la transcription (Thakore et al. 2015).

Troisièmement, l'utilisation de la dCas9 en la fusionnant avec une protéine activatrice permettrait l'activation de la transcription (CRISPRa) (Russa et Qi 2015). Il a été décrit que les protéines désaminases APOBEC3A et APOBEC3B jouaient un rôle clef dans la réponse immunitaire intracellulaire ciblant directement l'ADNccc (Julie Lucifora et al. 2014). Ces protéines entraînent la déamination des nucléotides de l'ADNccc entraînant ainsi des mutations voire sa dégradation. Cependant, l'activation de ces protéines dans les cellules infectées reste compliquée, car le virus élabore des stratégies contournant la réponse



immunitaire. La fusion de la dCas9 avec des facteurs activateurs tels que p300 acétyltransferase, (Hilton et al. 2015), ou VP64, (Maeder et al. 2013), ciblant le promoteur de la famille des protéines ABOPEC/AID activerait la transcription de ces protéines et favoriserait la dégradation de l'ADNccc (Kostyushev et al. 2018). Il a donc été montré que le ciblage de ce promoteur dans des cellules HepG2 transfectées avec un plasmide d'ADNccc de VHB réduisait la quantité d'ADNccc de 60% *via* l'activation d'APOBEC3A.

- La génération CRISPR/Cpf1 anti-VHB :

Enfin, la découverte de la protéine Cpf1 comme protéine effectrice du système CRISPR de classe 2 de *Francisella tularensis* offre de nouvelles perspectives (Zetsche et al. 2015). Cette protéine présente des fonctionnalités comparables à celle de la protéine Cas9 mais possède des caractéristiques différentes. Premièrement, la maturation de ce système ne nécessite pas de tracrRNA. Deuxièmement, ce système permet la reconnaissance de séquences PAM qui sont riches en T (TTTN) contrairement au système CRISPR/Cas9 qui permet la reconnaissance de séquences PAM riches en G (NGG). Troisièmement, ce système permet la génération de cassure à bout cohésif et non à bout franc comme le système CRISPR/Cas 9 ce qui diminuerait le risque d'intégration dans le génome de l'hôte une fois l'ADN clivé. De plus, la conformation de la protéine empêche une ligation trop rapide des brins clivés. Enfin, contrairement à la protéine Cas9, les protéines Cpf1, contiennent un seul domaine protéique similaire à RucV rendant l'inactivation et la formation d'une dCpf1 plus facile.

Ces propriétés permettent ainsi d'envisager de nouvelles approches pour venir cibler l'ADNccc. Notamment, la reconnaissance de séquences PAM riches en T permettrait d'élargir le domaine d'action et de cibler de nouvelles séquences montrant une efficacité supérieure. Une recherche préliminaire sur le génome de VHB a permis ainsi de définir 127 nouveaux ARN guides qui seraient envisageables avec ce système CRISPR/Cpf1. Parmi elles, 11 séquences ont un pourcentage de spécificité supérieur à 99% et représentent celles étant le moins susceptible de générer des « off-target effect ».

N°	Position	Brin	Séquences	PAM	Score de spécificité	Cible sur HBV
1	1447	+	cgtcccgtcggcgtgaatc	ttta	99.8965461	Polymérase/ HBx
2	1443	+	tttacgtcccgtcggcgtg	tttg	99.794929	Polymérase/ HBx
3	612	-	gcgaaagcccaggacgatgg	tttt	99.6311633	Polymérase/PréS1/PréS2
4	1316	+	gctcgagccggtctggagc	tttt	99.6247982	Polymérase
5	298	+	taggggatcaccctgtgt	tttc	99.5769137	Polymérase/PréS1/PréS2
6	1558	+	cgcggctctcccgtctgtgc	ttta	99.5466589	Polymérase/ HBx
7	297	+	ctaggggatcaccctgtgtg	tttt	99.429763	Polymérase/PréS1/PréS2
8	611	-	cgaaagcccaggacgatggg	tttg	99.3004806	Polymérase/PréS1/PréS2
9	1337	-	cgcgagaggacgacagaatt	tttc	99.2902842	Polymérase
10	499	-	gcatggtcccgtactgtgtg	tttt	99.1528433	Polymérase/PréS1/PréS2
11	2949	+	ccgatcatcagttggaccct	tttc	99.1022648	Polymérase/PréS1

**Tableau 9 :** ARN guide possibles pour la combinaison avec la protéine CpF1  
Séquences des ARN guides complémentaires du génome de VHB. Pour chaque séquence, il est notifié la position sur le génome, le brin cible, la séquence, le pourcentage de spécificité et le gène ciblé.

Il serait donc intéressant de tester les ARN guide 1,2 et 6 qui ciblent la polymérase et la protéine HBx. En inhibant ces deux gènes, la réplication virale serait perturbée. L'action sur la polymérase empêcherait la formation de nouveaux virions alors que l'action sur la protéine HBx régulerait négativement l'ADNccc (Tableau 9).

Récemment, il a été montré qu'un système CRISPR/Cpf1 de *Acidaminococcus sp* pouvait être transfecté dans des hépatocytes primaires préparées à partir de souris humanisées *via* un vecteur adénovirus (Tsukamoto et al. 2018). Ainsi, la mise en place de ce système apporte un bénéfice pour l'utilisation de ces outils dans des cellules primaires et ouvre des nouvelles perspectives dans l'élaboration d'un système CRISPR anti-VHB dans les PHH.

La mise en place de toutes ces nouvelles perspectives CRISPR offrent de nombreuses possibilités pour éliminer l'ADNccc. Cependant, la plupart restent encore des perspectives fondamentales et l'utilisation du système CRISPR en thérapeutique est encore un long processus. Actuellement, il existe un seul essai clinique en cours d'approbation. Il s'agit d'une étude portant sur la mise en place d'une thérapie CRISPR/Cas9 contre le  $\beta$ -thalassémie. Les cellules du patient seront prélevées et le système CRISPR/cas9 sera incorporé dans ces cellules en culture avant d'être réinjectés au patient. Cependant, l'extension à d'autres maladies est encore un défi faisant intervenir des enjeux éthiques. En effet, depuis sa découverte, cette technologie ne cesse de se développer. L'expansion de cette technologie à l'Homme peut générer de rapides dérives. Notamment, se pose la

question des modifications des lignées germinales entraînant des effets encore inconnus chez l'Homme.

Ces études ont permis d'optimiser la technique de ddPCR pour quantifier finement l'ADNccc au sein d'échantillons faiblement concentrés et d'évaluer l'efficacité des traitements, actuels et/ou futurs. L'analyse de différentes cohortes de patients sous traitements, et même après une transplantation, montre la persistance de l'ADNccc et sa répllication *via* la présence de l'ARNpg dans les échantillons. Cela confirme l'incapacité des traitements actuels à éradiquer la maladie à la fois dans les hépatocytes mais également très probablement dans d'autres réservoirs de l'infection (sang / PBMC de patients). De nouvelles perspectives et stratégies se mettent en place et notamment l'utilisation du système CRISPR/Cas9. Des analyses préliminaires montrent une réduction de l'ADNccc par ce système. Cependant de nombreuses mises au point et évaluations doivent encore être réalisées avant d'envisager une application thérapeutique.

## Bibliographie :

- Addison, W. R., W. W. Wong, K. P. Fischer, et D. L. Tyrrell. 2000. « A Quantitative Competitive PCR Assay for the Covalently Closed Circular Form of the Duck Hepatitis B Virus ». *Antiviral Research* 48 (1): 27-37.
- Aderem, A., et R. J. Ulevitch. 2000. « Toll-like Receptors in the Induction of the Innate Immune Response ». *Nature* 406 (6797): 782-787. <https://doi.org/10.1038/35021228>.
- Ahmadzadeh, Tamkin, Glen Reid, et David R. McKenzie. 2018. « Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer ». *Biophysical Reviews* 10 (1): 69-86. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0392-1>.
- Allefs, J J, E M Salentijn, F A Krens, et G J Rouwendal. 1990. « Optimization of non-radioactive Southern blot hybridization: single copy detection and reuse of blots. » *Nucleic Acids Research* 18 (10): 3099-3100.
- Allweiss, Lena, et Maura Dandri. 2016. « Experimental in Vitro and in Vivo Models for the Study of Human Hepatitis B Virus Infection ». *Journal of Hepatology* 64 (1 Suppl): S17-S31. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.012>.
- . 2017. « The Role of cccDNA in HBV Maintenance ». *Viruses* 9 (6). <https://doi.org/10.3390/v9060156>.
- Allweiss, Lena, Tassilo Volz, Katja Giersch, Janine Kah, Giuseppina Raffa, Joerg Petersen, Ansgar W. Lohse, et al. 2018. « Proliferation of Primary Human Hepatocytes and Prevention of Hepatitis B Virus Reinfection Efficiently Deplete Nuclear CccDNA in Vivo ». *Gut* 67 (3): 542-552. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312162>.
- Al-Mahtab, Mamun, Michel Bazinet, et Andrew Vaillant. 2016. « Safety and Efficacy of Nucleic Acid Polymers in Monotherapy and Combined with Immunotherapy in Treatment-Naive Bangladeshi Patients with HBeAg+ Chronic Hepatitis B Infection ». *PLoS One* 11 (6): e0156667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156667>.
- Antona, Denise, et Christine Larsen. 2010. « Épidémiologie de l'hépatite B en France » 14: 12.
- Azuma, Hisaya, Nicole Paulk, Aarati Ranade, Craig Dorrell, Muhsen Al-Dhalimy, Ewa Ellis, Stephen Strom, Mark A. Kay, Milton Finegold, et Markus Grompe. 2007. « Robust Expansion of Human Hepatocytes in Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> Mice ». *Nature Biotechnology* 25 (8): 903-910. <https://doi.org/10.1038/nbt1326>.
- Beck, Juergen, et Michael Nassal. 2007. « Hepatitis B Virus Replication ». *World Journal of Gastroenterology* 13 (1): 48-64.
- Belloni, L., G. A. Palumbo, L. Li, S. R. Chirapu, L. Calvo, L. Lupacchini, M. G. Finn, U. Lopatin, A. Zlotnick, et M. Levrero. 2015. « Anti Capsid Drugs HAP12 and AT130 Target HBV Core Protein Nuclear Functions ». *Digestive and Liver Disease* 47 (février): e10. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.01.026>.
- Belloni, Laura, Lena Allweiss, Francesca Guerrieri, Natalia Pediconi, Tassilo Volz, Teresa Pollicino, Joerg Petersen, Giovanni Raimondo, Maura Dandri, et Massimo Levrero. 2012a. « IFN- $\alpha$  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* 122 (2): 529-537. <https://doi.org/10.1172/JCI58847>.

- . 2012b. « IFN- $\alpha$  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* 122 (2): 529–37. <https://doi.org/10.1172/JCI58847>.
- Belloni, Laura, Teresa Pollicino, Francesca De Nicola, Francesca Guerrieri, Giuseppina Raffa, Maurizio Fanciulli, Giovanni Raimondo, et Massimo Levrero. 2009a. « Nuclear HBx Binds the HBV Minichromosome and Modifies the Epigenetic Regulation of CccDNA Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (47): 19975–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908365106>.
- . 2009b. « Nuclear HBx Binds the HBV Minichromosome and Modifies the Epigenetic Regulation of CccDNA Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (47): 19975–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908365106>.
- Berke, Jan Martin, Pascale Dehertogh, Karen Vergauwen, Ellen Van Damme, Wendy Mostmans, Koen Vandyck, et Frederik Pauwels. 2017. « Capsid Assembly Modulators Have a Dual Mechanism of Action in Primary Human Hepatocytes Infected with Hepatitis B Virus ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00560-17>.
- Bertoletti, Antonio, Anthony Tanoto Tan, et Sarene Koh. 2017. « T-Cell Therapy for Chronic Viral Hepatitis ». *Cytotherapy* 19 (11): 1317–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.07.011>.
- Beumer, Kelly, Gargi Bhattacharyya, Marina Bibikova, Jonathan K. Trautman, et Dana Carroll. 2006. « Efficient Gene Targeting in Drosophila With Zinc-Finger Nucleases ». *Genetics* 172 (4): 2391–2403. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.052829>.
- Bibikova, M., D. Carroll, D. J. Segal, J. K. Trautman, J. Smith, Y. G. Kim, et S. Chandrasegaran. 2001. « Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (1): 289–97. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.289-297.2001>.
- Billioud, Gaëtan, Malika Ait-Goughoulte, et Fabien Zoulim. 2010. « Cycle de réplication du VHB et molécules antivirales » 14: 17.
- Bissig, Karl-Dimiter, Tam T. Le, Niels-Bjarne Woods, et Inder M. Verma. 2007. « Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: A chimeric animal model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51): 20507–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710528105>.
- Bloom, Kristie, Abdullah Ely, Claudio Mussolino, Toni Cathomen, et Patrick Arbuthnot. 2013. « Inactivation of Hepatitis B Virus Replication in Cultured Cells and in Vivo with Engineered Transcription Activator-like Effector Nucleases ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (10): 1889–97. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.170>.
- Bock, C. T., S. Schwinn, S. Locarnini, J. Fyfe, M. P. Manns, C. Trautwein, et H. Zentgraf. 2001. « Structural Organization of the Hepatitis B Virus Minichromosome. » *Journal of Molecular Biology* 307 (1): 183–96. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4481>.
- Bock, Claus-Thomas, Peter Schranz, Claus Hobe Schröder, et Hanswalter Zentgraf. 1994. « Hepatitis B Virus Genome Is Organized into Nucleosomes in the Nucleus of the Infected Cell ». *Virus Genes* 8 (2): 215–29. <https://doi.org/10.1007/BF01703079>.
- Bohne, Felix, Markus Chmielewski, Gregor Ebert, Katja Wiegmann, Timo Kürschner, Andreas Schulze, Stephan Urban, Martin Krönke, Hinrich Abken, et Ulrike Protzer. 2008. « T

- Cells Redirected against Hepatitis B Virus Surface Proteins Eliminate Infected Hepatocytes ». *Gastroenterology* 134 (1): 239-47. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.002>.
- Bouchard, Michael J., et Robert J. Schneider. 2004. « The Enigmatic X Gene of Hepatitis B Virus ». *Journal of Virology* 78 (23): 12725-34. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.12725-12734.2004>.
- Bourlière, Marc, Pascaline Rabiega, Nathalie Ganne-Carrie, Lawrence Serfaty, Patrick Marcellin, Yoann Barthe, Dominique Thabut, et al. 2017. « Effect on HBs Antigen Clearance of Addition of Pegylated Interferon Alfa-2a to Nucleos(t)ide Analogue Therapy versus Nucleos(t)ide Analogue Therapy Alone in Patients with HBe Antigen-Negative Chronic Hepatitis B and Sustained Undetectable Plasma Hepatitis B Virus DNA: A Randomised, Controlled, Open-Label Trial ». *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology* 2 (3): 177-88. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30189-3](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30189-3).
- Bowden, Scott, Stephen Locarnini, Ting-Tsung Chang, You-Chen Chao, Kwang-Hyub Han, Robert G. Gish, Robert A. de Man, Miao Yu, Cyril Llamoso, et Hong Tang. 2015. « Covalently Closed-Circular Hepatitis B Virus DNA Reduction with Entecavir or Lamivudine ». *World Journal of Gastroenterology* 21 (15): 4644-51. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i15.4644>.
- Boyd, Anders, Karine Lacombe, Fabien Lavocat, Sarah Maylin, Patrick Mialhes, Caroline Lascoux-Combe, Constance Delaugerre, Pierre-Marie Girard, et Fabien Zoulim. 2016a. « Decay of Ccc-DNA Marks Persistence of Intrahepatic Viral DNA Synthesis under Tenofovir in HIV-HBV Co-Infected Patients ». *Journal of Hepatology* 65 (4): 683-91. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.014>.
- . 2016b. « Decay of Ccc-DNA Marks Persistence of Intrahepatic Viral DNA Synthesis under Tenofovir in HIV-HBV Co-Infected Patients ». *Journal of Hepatology* 65 (4): 683-91. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.014>.
- Cai, Dawei, Courtney Mills, Wenquan Yu, Ran Yan, Carol E. Aldrich, Jeffrey R. Saputelli, William S. Mason, et al. 2012. « Identification of Disubstituted Sulfonamide Compounds as Specific Inhibitors of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Formation ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (8): 4277-88. <https://doi.org/10.1128/AAC.00473-12>.
- Cai, Dawei, Hui Nie, Ran Yan, Ju-Tao Guo, Timothy M. Block, et Haitao Guo. 2013. « A Southern Blot Assay for Detection of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA from Cell Cultures ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1030: 151-61. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-484-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-484-5_13).
- Caviglia, Gian Paolo, Maria Lorena Abate, Francesco Tandoi, Alessia Ciancio, Antonio Amoroso, Mauro Salizzoni, Giorgio Maria Saracco, Mario Rizzetto, Renato Romagnoli, et Antonina Smedile. 2018. « Quantitation of HBV CccDNA in Anti-HBc-Positive Liver Donors by Droplet Digital PCR: A New Tool to Detect Occult Infection ». *Journal of Hepatology*, avril. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.021>.
- Chaar, Mira El, Tamima El Jisr, et Jean-Pierre Allain. s. d. « Hepatitis B Virus DNA Splicing in Lebanese Blood Donors and Genotype A to E Strains: Implications for Hepatitis B Virus DNA Quantification and Infectivity ». Consulté le 2 août 2018. <https://doi.org/10.1128/JCM.01251-12>.
- Chang, Mei-Hwei, et Ding-Shinn Chen. 2015. « Prevention of Hepatitis B ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021493>.

- Chen, Jieliang, Wen Zhang, Junyu Lin, Fan Wang, Min Wu, Cuncun Chen, Ye Zheng, Xiuhua Peng, Jianhua Li, et Zhenghong Yuan. 2014. « An Efficient Antiviral Strategy for Targeting Hepatitis B Virus Genome Using Transcription Activator-like Effector Nucleases ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 22 (2): 303-311. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.212>.
- Cho, Eun Young, Hyung Joon Yim, Young Kul Jung, Sang Jun Suh, Yeon Seok Seo, Ji Hoon Kim, Hong Soo Kim, et al. 2017. « Management of Clevudine-Resistant Chronic Hepatitis B: A Multicenter Cohort Study ». *Gut and Liver* 11 (1): 129-135. <https://doi.org/10.5009/gnl15597>.
- Christian, Michelle, Tomas Cermak, Erin L. Doyle, Clarice Schmidt, Feng Zhang, Aaron Hummel, Adam J. Bogdanove, et Daniel F. Voytas. 2010. « Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases ». *Genetics* 186 (2): 757-761. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>.
- Churin, Yuri, Martin Roderfeld, et Elke Roeb. 2015. « Hepatitis B virus large surface protein: function and fame ». *Hepatobiliary Surgery and Nutrition* 4 (1): 1-10. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.12.08>.
- Cougot, Delphine, Yuanfei Wu, Stefano Cairo, Julie Caramel, Claire-Angélique Renard, Laurence Lévy, Marie Annick Buendia, et Christine Neuveut. 2007. « The Hepatitis B Virus X Protein Functionally Interacts with CREB-Binding Protein/P300 in the Regulation of CREB-Mediated Transcription ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (7): 4277-4287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606774200>.
- Cradick, Thomas J., Kathy Keck, Shannon Bradshaw, Andrew C. Jamieson, et Anton P. McCaffrey. 2010. « Zinc-Finger Nucleases as a Novel Therapeutic Strategy for Targeting Hepatitis B Virus DNAs ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (5): 947-954. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.20>.
- Dandri, Maura, Martin R. Burda, Alexander Bürkle, David M. Zuckerman, Hans Will, Charles E. Rogler, Heimer Greten, et Joerg Petersen. 2002. « Increase in de Novo HBV DNA Integrations in Response to Oxidative DNA Damage or Inhibition of Poly(ADP-Ribosyl)ation ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35 (1): 217-223. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.30203>.
- Datta, Sibnarayan, Rajesh Panigrahi, Avik Biswas, Partha K. Chandra, Arup Banerjee, Pradip K. Mahapatra, Chinmoy K. Panda, et al. 2009. « Genetic Characterization of Hepatitis B Virus in Peripheral Blood Leukocytes: Evidence for Selection and Compartmentalization of Viral Variants with the Immune Escape G145R Mutation ». *Journal of Virology* 83 (19): 9983-9992. <https://doi.org/10.1128/JVI.01905-08>.
- Daud, Adil I., Kimberly Loo, Mariela L. Pauli, Robert Sanchez-Rodriguez, Priscila Munoz Sandoval, Keyon Taravati, Katy Tsai, et al. 2016. « Tumor Immune Profiling Predicts Response to Anti-PD-1 Therapy in Human Melanoma ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (9): 3447-3452. <https://doi.org/10.1172/JCI87324>.
- Decorsière, Adrien, Henrik Mueller, Pieter C. van Breugel, Fabien Abdul, Laetitia Gerossier, Rudolf K. Beran, Christine M. Livingston, et al. 2016. « Hepatitis B Virus X Protein Identifies the Smc5/6 Complex as a Host Restriction Factor ». *Nature* 531 (7594): 386-389. <https://doi.org/10.1038/nature17170>.
- Denis, Jérôme Alexandre, Alexia Patroni, Erell Guillerm, Dominique Pépin, Naoual Benali-Furet, Janine Wechsler, Gilles Manceau, et al. 2016. « Droplet digital PCR of circulating tumor cells from colorectal cancer patients can predict KRAS mutations

- before surgery ». *Molecular Oncology* 10 (8): 1221-1231. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.05.009>.
- Devonshire, Alison S., Rebecca Sanders, Timothy M. Wilkes, Martin S. Taylor, Carole A. Foy, et Jim F. Huggett. 2013. « Application of next Generation QPCR and Sequencing Platforms to mRNA Biomarker Analysis ». *Methods (San Diego, Calif.)* 59 (1): 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.07.021>.
- DeWitt, Mark A., Jacob E. Corn, et Dana Carroll. 2017. « Genome Editing via Delivery of Cas9 Ribonucleoprotein ». *Methods (San Diego, Calif.)* 121-122: 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.04.003>.
- « DNA Repair – Emendo ». s.d. Consulté le 2 août 2018. <https://emendobio.com/technology/dna-repair/>.
- Dong, Chunsheng, Liang Qu, Haoyi Wang, Lin Wei, Yuansu Dong, et Sidong Xiong. 2015. « Targeting Hepatitis B Virus CccDNA by CRISPR/Cas9 Nuclease Efficiently Inhibits Viral Replication ». *Antiviral Research* 118 (juin): 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.015>.
- Doudna, Jennifer A., et Emmanuelle Charpentier. 2014. « Genome Editing. The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9 ». *Science (New York, N.Y.)* 346 (6213): 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.
- Du, Dan, et Lei S. Qi. 2016. « CRISPR Technology for Genome Activation and Repression in Mammalian Cells ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2016 (1): pdb.prot090175. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot090175>.
- Duriez, Marion, Yassmina Mandouri, Bouchra Lekbaby, Hualin Wang, Aurélie Schnuriger, Francois Redelsperger, Chiara Ida Guerrero, et al. 2017. « Alternative Splicing of Hepatitis B Virus: A Novel Virus/Host Interaction Altering Liver Immunity ». *Journal of Hepatology* 67 (4): 687-699. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.025>.
- Dusséaux, Mathilde, Guillemette Masse-Ranson, Sylvie Darche, James Ahodantin, Yan Li, Oriane Fiquet, Elodie Beaumont, et al. 2017. « Viral Load Affects the Immune Response to HBV in Mice With Humanized Immune System and Liver ». *Gastroenterology* 153 (6): 1647-1661.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.034>.
- Ebert, Gregor, Hendrik Poeck, Julie Lucifora, Nikola Baschuk, Knud Esser, Irene Esposito, Gunther Hartmann, et Ulrike Protzer. 2011. « 5' Triphosphorylated Small Interfering RNAs Control Replication of Hepatitis B Virus and Induce an Interferon Response in Human Liver Cells and Mice ». *Gastroenterology* 141 (2): 696-706, 706.e1-3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.05.001>.
- Eid, Ayman, Sahar Alshareef, et Magdy M. Mahfouz. 2018. « CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks ». *Biochemical Journal* 475 (11): 1955-1964. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170793>.
- European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu, et European Association for the Study of the Liver. 2017a. « EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the Management of Hepatitis B Virus Infection ». *Journal of Hepatology*, avril. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>.
- . 2017b. « EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the Management of Hepatitis B Virus Infection ». *Journal of Hepatology* 67 (2): 370-398. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>.



- Fang, J. W., F. Y. Tung, G. L. Davis, D. J. Dolson, D. H. Van Thiel, et J. Y. Lau. 1993. « Fibrosing Cholestatic Hepatitis in a Transplant Recipient with Hepatitis B Virus Precore Mutant ». *Gastroenterology* 105 (3): 901-904.
- Feng, Song, Lu Gao, Xingchun Han, Taishan Hu, Yimin Hu, Haixia Liu, Andrew W. Thomas, et al. 2018. « Discovery of Small Molecule Therapeutics for Treatment of Chronic HBV Infection ». *ACS Infectious Diseases* 4 (3): 257-277. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00144>.
- Fisicaro, Paola, Valeria Barili, Barbara Montanini, Greta Acerbi, Manuela Ferracin, Francesca Guerrieri, Debora Salerno, et al. 2017. « Targeting Mitochondrial Dysfunction Can Restore Antiviral Activity of Exhausted HBV-Specific CD8 T Cells in Chronic Hepatitis B ». *Nature Medicine* 23 (3): 327-336. <https://doi.org/10.1038/nm.4275>.
- Fisicaro, Paola, Caterina Valdatta, Marco Massari, Elisabetta Loggi, Elisabetta Biasini, Luca Sacchelli, Maria Cristina Cavallo, et al. 2010. « Antiviral Intrahepatic T-Cell Responses Can Be Restored by Blocking Programmed Death-1 Pathway in Chronic Hepatitis B ». *Gastroenterology* 138 (2): 682-693, e1-4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.052>.
- Gaj, Thomas, Charles A. Gersbach, et Carlos F. Barbas. 2013. « ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering ». *Trends in Biotechnology* 31 (7): 397-405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>.
- Galle, P. R., J. Hagelstein, B. Kommerell, M. Volkmann, P. Schranz, et H. Zentgraf. 1994. « In Vitro Experimental Infection of Primary Human Hepatocytes with Hepatitis B Virus ». *Gastroenterology* 106 (3): 664-673.
- Gane, Edward J., Young-Suk Lim, Stuart C. Gordon, Kumar Visvanathan, Eric Sicard, Richard N. Fedorak, Stuart Roberts, et al. 2015. « The Oral Toll-like Receptor-7 Agonist GS-9620 in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection ». *Journal of Hepatology* 63 (2): 320-328. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.037>.
- Gao, Yuhua, Yutang Li, Qinghua Meng, Zhanqing Zhang, Ping Zhao, Qinghua Shang, Yue Li, et al. 2017. « Serum Hepatitis B Virus DNA, RNA, and HBsAg: Which Correlated Better with Intrahepatic Covalently Closed Circular DNA before and after Nucleos(t)ide Analogue Treatment? ». *Journal of Clinical Microbiology* 55 (10): 2972-2982. <https://doi.org/10.1128/JCM.00760-17>.
- Garcia, Jessica, Julien Forestier, Eric Dusserre, Anne-Sophie Wozny, Florence Geiguer, Patrick Merle, Claire Tissot, et al. 2018. « Cross-Platform Comparison for the Detection of RAS Mutations in CfDNA (DdPCR Biorad Detection Assay, BEAMing Assay, and NGS Strategy) ». *Oncotarget* 9 (30): 21122-21131. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24950>.
- Gheit, Tarik, Souad Sekkat, Lucyna Cova, Michèle Chevallier, Marie Anne Petit, Olivier Hantz, Mylène Lesénéchal, Abdallah Benslimane, Christian Trépo, et Isabelle Chemin. 2002. « Experimental Transfection of *Macaca Sylvanus* with Cloned Human Hepatitis B Virus ». *The Journal of General Virology* 83 (Pt 7): 1645-1649. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-7-1645>.
- Gilbert, Luke A., Max A. Horlbeck, Britt Adamson, Jacqueline E. Villalta, Yuwen Chen, Evan H. Whitehead, Carla Guimaraes, et al. 2014. « Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation ». *Cell* 159 (3): 647-661. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.029>.

- Gill, Upkar S., et Patrick TF Kennedy. 2014. « Chronic hepatitis B virus in young adults: the need for new approaches to management ». *Expert Review of Anti-infective Therapy* 12 (9): 1045-1053. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.940899>.
- Ginkel, Joost H. van, Manon M. H. Huibers, Robert J. J. van Es, Remco de Bree, et Stefan M. Willems. 2017. « Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck cancer patients ». *BMC Cancer* 17 (1): 428. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3424-0>.
- Gish, Robert G., Man-Fung Yuen, Henry Lik Yuen Chan, Bruce D. Given, Ching-Lung Lai, Stephen A. Locarnini, Johnson Y. N. Lau, Christine I. Wooddell, Thomas Schlupe, et David L. Lewis. 2015. « Synthetic RNAi Triggers and Their Use in Chronic Hepatitis B Therapies with Curative Intent ». *Antiviral Research* 121 (septembre): 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.019>.
- Glebe, Dieter, et Stephan Urban. 2007. « Viral and Cellular Determinants Involved in Hepadnaviral Entry ». *World Journal of Gastroenterology* 13 (1): 22-38.
- Godoy, Patricio, Nicola J. Hewitt, Ute Albrecht, Melvin E. Andersen, Nariman Ansari, Sudin Bhattacharya, Johannes Georg Bode, et al. 2013. « Recent Advances in 2D and 3D in Vitro Systems Using Primary Hepatocytes, Alternative Hepatocyte Sources and Non-Parenchymal Liver Cells and Their Use in Investigating Mechanisms of Hepatotoxicity, Cell Signaling and ADME ». *Archives of Toxicology* 87 (8): 1315-1530. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>.
- Gripon, P., C. Diot, N. Thézé, I. Fourel, O. Loreal, C. Brechot, et C. Guguen-Guillouzo. 1988. « Hepatitis B Virus Infection of Adult Human Hepatocytes Cultured in the Presence of Dimethyl Sulfoxide ». *Journal of Virology* 62 (11): 4136-43.
- Gripon, Philippe, Isabelle Cannie, et Stephan Urban. 2005. « Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by Acylated Peptides Derived from the Large Viral Surface Protein ». *Journal of Virology* 79 (3): 1613-1622. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1613-1622.2005>.
- Gripon, Philippe, Sylvie Rumin, Stephan Urban, Jacques Le Seyec, Denise Glaise, Isabelle Cannie, Claire Guyomard, Josette Lucas, Christian Trepo, et Christiane Guguen-Guillouzo. 2002. « Infection of a Human Hepatoma Cell Line by Hepatitis B Virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24): 15655-160. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>.
- Günther, S., B. C. Li, S. Miska, D. H. Krüger, H. Meisel, et H. Will. 1995. « A Novel Method for Efficient Amplification of Whole Hepatitis B Virus Genomes Permits Rapid Functional Analysis and Reveals Deletion Mutants in Immunosuppressed Patients ». *Journal of Virology* 69 (9): 5437-44.
- Günther, S., G. Sommer, A. Iwanska, et H. Will. 1997. « Heterogeneity and Common Features of Defective Hepatitis B Virus Genomes Derived from Spliced Pregenomic RNA ». *Virology* 238 (2): 363-71. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8863>.
- Guo, Yan-Hai, Yong-Nian Li, Jin-Rong Zhao, Ju Zhang, et Zhen Yan. 2011. « HBc Binds to the CpG Islands of HBV CccDNA and Promotes an Epigenetic Permissive State ». *Epigenetics* 6 (6): 720-26.
- Gupta, Nidhi, Milky Goyal, Catherine H. Wu, et George Y. Wu. 2014. « The Molecular and Structural Basis of HBV-resistance to Nucleos(t)ide Analogs ». *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 2 (3): 202-11. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00021>.

- Gutiérrez-Aguirre, Ion, Nejc Rački, Tanja Dreo, et Maja Ravnikar. 2015. « Droplet Digital PCR for Absolute Quantification of Pathogens ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1302: 331-47. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2620-6\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2620-6_24).
- Hadchouel, M., C. Pasquinelli, J. G. Fournier, R. N. Hugon, J. Scotto, O. Bernard, et C. Brechot. 1988. « Detection of Mononuclear Cells Expressing Hepatitis B Virus in Peripheral Blood from HBsAg Positive and Negative Patients by in Situ Hybridisation ». *Journal of Medical Virology* 24 (1): 27-32.
- He, Ming-Liang, Jun Wu, Ying Chen, Marie C. Lin, George K. K. Lau, et Hsiang-fu Kung. 2002. « A New and Sensitive Method for the Quantification of HBV CccDNA by Real-Time PCR ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (5): 1102-7.
- Heermann, K H, U Goldmann, W Schwartz, T Seyffarth, H Baumgarten, et W H Gerlich. 1984. « Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. » *Journal of Virology* 52 (2): 396-402.
- Hensel, Kai O., Franziska Cantner, Felix Bangert, Stefan Wirth, et Jan Postberg. 2018. « Episomal HBV Persistence within Transcribed Host Nuclear Chromatin Compartments Involves HBx ». *Epigenetics & Chromatin* 11 (1): 34. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0204-2>.
- « Hepatitis B Statistics - MHAHS ». s. d. Consulté le 2 août 2018. <http://www.mhahs.org.au/index.php/en/media-page/statistics/hepatitis-b-statistics>.
- Hilton, Isaac B., Anthony M. D'Ippolito, Christopher M. Vockley, Pratiksha I. Thakore, Gregory E. Crawford, Timothy E. Reddy, et Charles A. Gersbach. 2015. « Epigenome Editing by a CRISPR-Cas9-Based Acetyltransferase Activates Genes from Promoters and Enhancers ». *Nature Biotechnology* 33 (5): 510-17. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>.
- Horvath, Philippe, et Rodolphe Barrangou. 2010. « CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea ». *Science (New York, N.Y.)* 327 (5962): 167-70. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>.
- Hu, Jianming, et Kuancheng Liu. 2017. « Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application ». *Viruses* 9 (3): 56. <https://doi.org/10.3390/v9030056>.
- Huang, Hsiang-Ling, Hsiang-Wei Hsing, Tzu-Chia Lai, Yi-Wen Chen, Tian-Ren Lee, Hsin-Tsu Chan, Ping-Chiang Lyu, et al. 2010. « Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells ». *Journal of Biomedical Science* 17 (1): 36. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-36>.
- Huang, Jing-Tao, Ying-Juan Liu, Jin Wang, Zhi-Gao Xu, Ying Yang, Fan Shen, Xing-Hui Liu, Xin Zhou, et Song-Mei Liu. 2015. « Next Generation Digital PCR Measurement of Hepatitis B Virus Copy Number in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Hepatocellular Carcinoma Tissue ». *Clinical Chemistry* 61 (1): 290-96. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230227>.
- Ilan, Y., A. Nagler, R. Adler, E. Naparstek, R. Or, S. Slavin, C. Brautbar, et D. Shouval. 1993. « Adoptive Transfer of Immunity to Hepatitis B Virus after T Cell-Depleted Allogeneic Bone Marrow Transplantation ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 18 (2): 246-52.
- Jaeschke, Hartmut. s. d. « Are Cultured Liver Cells the Right Tool to Investigate Mechanisms of Liver Disease or Hepatotoxicity? » *Hepatology* 38 (4): 1053-55. <https://doi.org/10.1002/hep.1840380433>.
- Jansen, L., Neeltje A. Kootstra, Karel A. van Dort, R. Bart Takkenberg, Hendrik W. Reesink, et Hans L. Zaaijer. 2016. « Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Is Present in Virions in

- Plasma and Is Associated With a Response to Pegylated Interferon Alfa-2a and Nucleos(t)ide Analogues ». *The Journal of Infectious Diseases* 213 (2): 224-232. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv397>.
- Janssen, Harry L. A., Maurizia R. Brunetto, Yoon Jun Kim, Carlo Ferrari, Benedetta Massetto, Anh-Hoa Nguyen, Adarsh Joshi, et al. 2018. « Safety, Efficacy and Pharmacodynamics of Vesatolimod (GS-9620) in Virally Suppressed Patients with Chronic Hepatitis B ». *Journal of Hepatology* 68 (3): 431-440. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.027>.
- Johne, Reimar, Hermann Müller, Annabel Rector, Marc van Ranst, et Hans Stevens. 2009. « Rolling-Circle Amplification of Viral DNA Genomes Using Phi29 Polymerase ». *Trends in Microbiology* 17 (5): 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.02.004>.
- Julander, Justin G., Richard J. Colonno, Robert W. Sidwell, et John D. Morrey. 2003. « Characterization of Antiviral Activity of Entecavir in Transgenic Mice Expressing Hepatitis B Virus ». *Antiviral Research* 59 (3): 155-161.
- June, Carl H., Bruce R. Blazar, et James L. Riley. 2009. « Engineering Lymphocyte Subsets: Tools, Trials and Tribulations ». *Nature Reviews. Immunology* 9 (10): 704-716. <https://doi.org/10.1038/nri2635>.
- Kaiser, A. D., M. Assenmacher, B. Schröder, M. Meyer, R. Orentas, U. Bethke, et B. Dropulic. 2015. « Towards a Commercial Process for the Manufacture of Genetically Modified T Cells for Therapy ». *Cancer Gene Therapy* 22 (2): 72-78. <https://doi.org/10.1038/cgt.2014.78>.
- Kann, M., B. Sodeik, A. Vlachou, W. H. Gerlich, et A. Helenius. 1999. « Phosphorylation-Dependent Binding of Hepatitis B Virus Core Particles to the Nuclear Pore Complex ». *The Journal of Cell Biology* 145 (1): 45-55.
- Karimova, Madina, Niklas Beschorner, Werner Dammermann, Jan Chemnitz, Daniela Indenbirken, Jan-Hendrik Bockmann, Adam Grundhoff, et al. 2015. « CRISPR/Cas9 Nickase-Mediated Disruption of Hepatitis B Virus Open Reading Frame S and X ». *Scientific Reports* 5 (septembre): 13734. <https://doi.org/10.1038/srep13734>.
- Kay, Alan, et Fabien Zoulim. 2007. « Hepatitis B Virus Genetic Variability and Evolution ». *Virus Research* 127 (2): 164-176. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.021>.
- Keasler, Victor V., Amanda J. Hodgson, Charles R. Madden, et Betty L. Slagle. 2009. « Hepatitis B virus HBx protein localized to the nucleus restores HBx-deficient virus replication in HepG2 cells and in vivo in hydrodynamically-injected mice ». *Virology* 390 (1): 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.001>.
- Kennedy, Edward M., Leda C. Bassit, Henrik Mueller, Anand V. R. Kornepati, Hal P. Bogerd, Ting Nie, Payel Chatterjee, Hassan Javanbakht, Raymond F. Schinazi, et Bryan R. Cullen. 2015. « Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease ». *Virology* 476 (février): 196-205. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.001>.
- Ko, Chunkyu, Sooyoung Lee, Marc P. Windisch, et Wang-Shick Ryu. 2014. « DDX3 DEAD-Box RNA Helicase Is a Host Factor That Restricts Hepatitis B Virus Replication at the Transcriptional Level ». *Journal of Virology* 88 (23): 13689-13698. <https://doi.org/10.1128/JVI.02035-14>.
- Köck, J., E. M. Borst, et H. J. Schlicht. 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 ». *Journal of Virology* 70 (9): 5827-5831.

- Köck, J, et H J Schlicht. 1993. « Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. » *Journal of Virology* 67 (8): 4867-4874.
- Koh, Sarene, et Antonio Bertoletti. 2015. « Circumventing Failed Antiviral Immunity in Chronic Hepatitis B Virus Infection: Triggering Virus-Specific or Innate-like T Cell Response? » *Medical Microbiology and Immunology* 204 (1): 87-94. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0377-7>.
- Koh, Sarene, Janine Kah, Christine Y.L. Tham, Ninghan Yang, Erica Ceccarello, Adeline Chia, Margaret Chen, et al. 2018. « Nonlytic Lymphocytes Engineered to Express Virus-Specific T-Cell Receptors Limit HBV Infection by Activating APOBEC3 ». *Gastroenterology* 155 (1): 180-193.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.03.027>.
- Kosinska, Anna D., Ejuan Zhang, Lena Johrden, Jia Liu, Pia L. Seiz, Xiaoyong Zhang, Zhiyong Ma, et al. 2013. « Combination of DNA Prime--Adenovirus Boost Immunization with Entecavir Elicits Sustained Control of Chronic Hepatitis B in the Woodchuck Model ». *PLoS Pathogens* 9 (6): e1003391. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003391>.
- Kostyushev, Dmitry, Sergey Brezgin, Anastasiya Kostyusheva, Dmitry Zarifyan, et Vladimir Chulanov. 2018. « O-024: A novel CRISPR/Cas9-based approach to transient activation of intracellular host restriction factors results in strong suppression of hepatitis B virus and degradation of cccDNA ». In *Journal of Viral Hepatitis*. Vol. 25. [https://doi.org/10.1111/jvh.20\\_12922](https://doi.org/10.1111/jvh.20_12922).
- Koumbi, Lemonica, et Peter Karayiannis. 2016. « The Epigenetic Control of Hepatitis B Virus Modulates the Outcome of Infection ». *Frontiers in Microbiology* 6 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01491>.
- Kramvis, Anna. 2016. « The Clinical Implications of Hepatitis B Virus Genotypes and HBeAg in Pediatrics ». *Reviews in Medical Virology* 26 (4): 285-303. <https://doi.org/10.1002/rmv.1885>.
- Ladner, S K, M J Otto, C S Barker, K Zaifert, G H Wang, J T Guo, C Seeger, et R W King. 1997. « Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (8): 1715-1720.
- Lahlali, Thomas, Jan Martin Berke, Karen Vergauwen, Adrien Foca, Koen Vandyck, Frederik Pauwels, Fabien Zoulim, et David Durantel. 2018. « Novel Potent Capsid Assembly Modulators Regulate Multiple Steps of the Hepatitis B Virus Life-Cycle ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, juillet, AAC.00835-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00835-18>.
- Lai, Ching-Lung, Danny Wong, Philip Ip, Malgorzata Kopaniszen, Wai-Kay Seto, James Fung, Fung-Yu Huang, et al. 2016. « Reduction of Covalently Closed Circular DNA with Long-Term Nucleos(t)ide Analogue Treatment in Chronic Hepatitis B ». *Journal of Hepatology*, septembre. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.022>.
- Lam, Angela M., Suping Ren, Christine Espiritu, Mollie Kelly, Vincent Lau, Lingjie Zheng, George D. Hartman, Osvaldo A. Flores, et Klaus Klumpp. 2017. « Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulators, but Not Nucleoside Analogs, Inhibit the Production of Extracellular Pregenomic RNA and Spliced RNA Variants ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00680-17>.
- Lampertico, Pietro, Kosh Agarwal, Thomas Berg, Maria Buti, Harry L.A. Janssen, George Papatheodoridis, Fabien Zoulim, et Frank Tacke. 2017. « EASL 2017 Clinical Practice

- Guidelines on the Management of Hepatitis B Virus Infection ». *Journal of Hepatology* 67 (2): 370-398. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>.
- Lanford, Robert E., Bernadette Guerra, Deborah Chavez, Luis Giavedoni, Vida L. Hodara, Kathleen M. Brasky, Abigail Fosdick, et al. 2013. « GS-9620, an Oral Agonist of Toll-like Receptor-7, Induces Prolonged Suppression of Hepatitis B Virus in Chronically Infected Chimpanzees ». *Gastroenterology* 144 (7): 1508-1517.e1-10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.003>.
- Larson, Matthew H., Luke A. Gilbert, Xiaowo Wang, Wendell A. Lim, Jonathan S. Weissman, et Lei S. Qi. 2013. « CRISPR Interference (CRISPRi) for Sequence-Specific Control of Gene Expression ». *Nature Protocols* 8 (11): 2180-2196. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.132>.
- Le Guerhier, F., C. Pichoud, S. Guerret, M. Chevallier, C. Jamard, O. Hantz, X. Y. Li, et al. 2000. « Characterization of the Antiviral Effect of 2',3'-Dideoxy-2', 3'-Didehydro-Beta-L-5-Fluorocytidine in the Duck Hepatitis B Virus Infection Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (1): 111-122.
- Le Guerhier, F., C. Pichoud, C. Jamard, S. Guerret, M. Chevallier, S. Peyrol, O. Hantz, et al. 2001. « Antiviral Activity of Beta-L-2',3'-Dideoxy-2',3'-Didehydro-5-Fluorocytidine in Woodchucks Chronically Infected with Woodchuck Hepatitis Virus ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (4): 1065-1077. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1065-1077.2001>.
- Lebossé, Fanny, Barbara Testoni, Judith Fresquet, Floriana Facchetti, Enrico Galmozzi, Maëlen Fournier, Valérie Hervieu, et al. 2017. « Intrahepatic Innate Immune Response Pathways Are Downregulated in Untreated Chronic Hepatitis B ». *Journal of Hepatology* 66 (5): 897-909. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.12.024>.
- Levrero, M., O. Jean-Jean, C. Balsano, H. Will, et M. Perricaudet. 1990. « Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Expression in Human Cells and Anti-HBx Antibodies Detection in Chronic HBV Infection ». *Virology* 174 (1): 299-304.
- Levrero, Massimo, Teresa Pollicino, Jorg Petersen, Laura Belloni, Giovanni Raimondo, et Maura Dandri. 2009a. « Control of cccDNA Function in Hepatitis B Virus Infection ». *Journal of Hepatology* 51 (3): 581-592. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.022>.
- . 2009b. « Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection ». *Journal of Hepatology* 51 (3): 581-592. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.022>.
- Levrero, Massimo, Miroslava Subic, Francois Villeret, et Fabien Zoulim. 2018. « Perspectives and Limitations for Nucleo(t)Side Analogs in Future HBV Therapies ». *Current Opinion in Virology* 30 (juin): 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.04.006>.
- Li, Hao, Chunyu Sheng, Hongbo Liu, Guangze Liu, Xinying Du, Juan Du, Linsheng Zhan, et al. 2016. « An Effective Molecular Target Site in Hepatitis B Virus S Gene for Cas9 Cleavage and Mutational Inactivation ». *International Journal of Biological Sciences* 12 (9): 1104-1113. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16064>.
- Li, Hao, Chunyu Sheng, Shan Wang, Lang Yang, Yuan Liang, Yong Huang, Hongbo Liu, et al. 2017. « Removal of Integrated Hepatitis B Virus DNA Using CRISPR-Cas9 ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (mars). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00091>.
- Li, Ling, Shuo Hu, et Xiaoyuan Chen. 2018. « Non-Viral Delivery Systems for CRISPR/Cas9-Based Genome Editing: Challenges and Opportunities ». *Biomaterials* 171 (juillet): 207-218. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.031>.

- Li, Mingming, Ji A. Sohn, et Christoph Seeger. 2018. « Distribution of Hepatitis B Virus Nuclear DNA ». *Journal of Virology* 92 (1): e01391-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01391-17>.
- Li, Xiaoling, Jinghua Zhao, Quan Yuan, et Ningshao Xia. 2017. « Detection of HBV Covalently Closed Circular DNA ». *Viruses* 9 (6). <https://doi.org/10.3390/v9060139>.
- Liang, Xiquan, Jason Potter, Shantanu Kumar, Yanfei Zou, Rene Quintanilla, Mahalakshmi Sridharan, Jason Carte, et al. 2015. « Rapid and Highly Efficient Mammalian Cell Engineering via Cas9 Protein Transfection ». *Journal of Biotechnology* 208 (août): 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.024>.
- Lin, Guigao, Kuo Zhang, et Jinming Li. 2015. « Application of CRISPR/Cas9 Technology to HBV ». *International Journal of Molecular Sciences* 16 (11): 26077-86. <https://doi.org/10.3390/ijms161125950>.
- Lin, Su-Ru, Hung-Chih Yang, Yi-Ting Kuo, Chun-Jen Liu, Ta-Yu Yang, Ku-Chun Sung, You-Yu Lin, et al. 2014. « The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo ». *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 3 (août): e186. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.38>.
- Liu, Chang, Li Zhang, Hao Liu, et Kun Cheng. 2017. « Delivery Strategies of the CRISPR-Cas9 Gene-Editing System for Therapeutic Applications ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 266 (novembre): 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012>.
- Liu, F., Y. Song, et D. Liu. 1999. « Hydrodynamics-Based Transfection in Animals by Systemic Administration of Plasmid DNA ». *Gene Therapy* 6 (7): 1258-66. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300947>.
- Liu, Yang, Andrea L. Cathcart, William E. Delaney, et Kathryn M. Kitrinos. 2017. « Development of a Digital Droplet PCR Assay to Measure HBV DNA in Patients Receiving Long-Term TDF Treatment ». *Journal of Virological Methods* 249: 189-93. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.015>.
- Lok, Anna S., Fabien Zoulim, Geoffrey Dusheiko, et Marc G. Ghany. 2017. « Hepatitis B Cure: From Discovery to Regulatory Approval ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66 (4): 1296-1313. <https://doi.org/10.1002/hep.29323>.
- Long, Chengzu, John R. McAnally, John M. Shelton, Alex A. Mireault, Rhonda Bassel-Duby, et Eric N. Olson. 2014. « Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 345 (6201): 1184-88. <https://doi.org/10.1126/science.1254445>.
- Lu, Jia-Jie, En-Qiang Chen, Jia-Hong Yang, Tao-You Zhou, Li Liu, et Hong Tang. 2012. « A mutation in the interferon regulatory element of HBV may influence the response of interferon treatment in chronic hepatitis B patients ». *Virology Journal* 9 (janvier): 10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-10>.
- Luangsay, Souphalane, Malika Ait-Goughoulte, Maud Michelet, Océane Floriot, Marc Bonnin, Marion Gruffaz, Michel Rivoire, et al. 2015. « Expression and Functionality of Toll- and RIG-like Receptors in HepaRG Cells ». *Journal of Hepatology* 63 (5): 1077-85. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.022>.
- Luangsay, Souphalane, Marion Gruffaz, Nathalie Isorce, Barbara Testoni, Maud Michelet, Suzanne Faure-Dupuy, Sarah Maadadi, et al. 2015. « Early Inhibition of Hepatocyte Innate Responses by Hepatitis B Virus ». *Journal of Hepatology* 63 (6): 1314-22. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.014>.

- Lucifora, J., D. Durantel, L. Belloni, L. Barraud, S. Villet, I. E. Vincent, S. Margeridon-Thermet, et al. 2008. « Initiation of Hepatitis B Virus Genome Replication and Production of Infectious Virus Following Delivery in HepG2 Cells by Novel Recombinant Baculovirus Vector ». *The Journal of General Virology* 89 (Pt 8): 1819-1828. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83659-0>.
- Lucifora, Julie, Silke Arzberger, David Durantel, Laura Belloni, Michel Strubin, Massimo Levrero, Fabien Zoulim, Olivier Hantz, et Ulrike Protzer. 2011. « Hepatitis B Virus X Protein Is Essential to Initiate and Maintain Virus Replication after Infection ». *Journal of Hepatology* 55 (5): 996-1003. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.015>.
- Lucifora, Julie, Marc Bonnin, Ludovic Aillot, Floriane Fusil, Sarah Maadadi, Laura Dimier, Maud Michelet, et al. 2018. « Direct Antiviral Properties of TLR Ligands against HBV Replication in Immune-Competent Hepatocytes ». *Scientific Reports* 8 (1): 5390. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23525-w>.
- Lucifora, Julie, David Durantel, Barbara Testoni, Olivier Hantz, Massimo Levrero, et Fabien Zoulim. 2010. « Control of Hepatitis B Virus Replication by Innate Response of HepaRG Cells ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (1): 63-72. <https://doi.org/10.1002/hep.23230>.
- Lucifora, Julie, et Ulrike Protzer. 2016. « Attacking Hepatitis B Virus CccDNA--The Holy Grail to Hepatitis B Cure ». *Journal of Hepatology* 64 (1 Suppl): S41-48. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.009>.
- Lucifora, Julie, Anna Salvetti, Xavier Marniquet, Laurent Maily, Barbara Testoni, Floriane Fusil, Aurore Inchauspé, et al. 2017. « Detection of the Hepatitis B Virus (HBV) Covalently-Closed-Circular DNA (CccDNA) in Mice Transduced with a Recombinant AAV-HBV Vector ». *Antiviral Research* 145 (septembre): 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.07.006>.
- Lucifora, Julie, Yuchen Xia, Florian Reisinger, Ke Zhang, Daniela Stadler, Xiaoming Cheng, Martin F. Sprinzl, et al. 2014. « Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus CccDNA ». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6176): 1221-1228. <https://doi.org/10.1126/science.1243462>.
- Luckenbaugh, L., K. M. Kitrinou, W. E. Delaney, et J. Hu. 2015. « Genome-Free Hepatitis B Virion Levels in Patient Sera as a Potential Marker to Monitor Response to Antiviral Therapy ». *Journal of Viral Hepatitis* 22 (6): 561-70. <https://doi.org/10.1111/jvh.12361>.
- Mabit, H., K. M. Breiner, A. Knaust, B. Zachmann-Brand, et H. Schaller. 2001. « Signals for Bidirectional Nucleocytoplasmic Transport in the Duck Hepatitis B Virus Capsid Protein ». *Journal of Virology* 75 (4): 1968-1977. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1968-1977.2001>.
- Maeder, Morgan L., Samantha J. Linder, Vincent M. Cascio, Yanfang Fu, Quan H. Ho, et J. Keith Joung. 2013. « CRISPR RNA-Guided Activation of Endogenous Human Genes ». *Nature Methods* 10 (10): 977-979. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2598>.
- Maeder, Morgan L., Stacey Thibodeau-Beganny, Anna Osiak, David A. Wright, Reshma M. Anthony, Magdalena Eichinger, Tao Jiang, et al. 2008. « Rapid "Open-Source" Engineering of Customized Zinc-Finger Nucleases for Highly Efficient Gene Modification ». *Molecular Cell* 31 (2): 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.016>.
- Maheshwari, Yogita, Vijayanandraj Selvaraj, Subhas Hajeri, et Raymond Yokomi. 2017. « Application of Droplet Digital PCR for Quantitative Detection of *Spiroplasma citri* in



- Comparison with Real Time PCR ». *PLOS ONE* 12 (9): e0184751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184751>.
- Maini, Mala K., et Adam J. Gehring. 2016. « The Role of Innate Immunity in the Immunopathology and Treatment of HBV Infection ». *Journal of Hepatology* 64 (1 Suppl): S60-70. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.028>.
- Mak, Lung-Yi, Wai-Kay Seto, Ching-Lung Lai, et Man-Fung Yuen. 2018. « Pharmacokinetic Evaluation of Besifovir for the Treatment of HBV Infection ». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 14 (1): 101-6. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1417983>.
- Mak, Lung-Yi, Danny Ka-Ho Wong, Wai-Kay Seto, Ching-Lung Lai, et Man Fung Yuen. 2017. « Hepatitis B Core Protein as a Therapeutic Target ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21 (12): 1153-59. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1397134>.
- Margeridon, Séverine, Sandra Carrouée-Durandel, Isabelle Chemin, Luc Barraud, Fabien Zoulim, Christian Trépo, et Alan Kay. 2008a. « Rolling Circle Amplification, a Powerful Tool for Genetic and Functional Studies of Complete Hepatitis B Virus Genomes from Low-Level Infections and for Directly Probing Covalently Closed Circular DNA ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (9): 3068-73. <https://doi.org/10.1128/AAC.01318-07>.
- . 2008b. « Rolling Circle Amplification, a Powerful Tool for Genetic and Functional Studies of Complete Hepatitis B Virus Genomes from Low-Level Infections and for Directly Probing Covalently Closed Circular DNA ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (9): 3068-73. <https://doi.org/10.1128/AAC.01318-07>.
- Martel, Nora, Selma A. Gomes, Isabelle Chemin, Christian Trépo, et Alan Kay. 2013a. « Improved Rolling Circle Amplification (RCA) of Hepatitis B Virus (HBV) Relaxed-Circular Serum DNA (RC-DNA) ». *Journal of Virological Methods* 193 (2): 653-59. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.045>.
- . 2013b. « Improved Rolling Circle Amplification (RCA) of Hepatitis B Virus (HBV) Relaxed-Circular Serum DNA (RC-DNA) ». *Journal of Virological Methods* 193 (2): 653-59. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.045>.
- Mason, A. L., L. Xu, L. Guo, M. Kuhns, et R. P. Perrillo. 1998. « Molecular Basis for Persistent Hepatitis B Virus Infection in the Liver after Clearance of Serum Hepatitis B Surface Antigen ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 27 (6): 1736-42. <https://doi.org/10.1002/hep.510270638>.
- Mason, W. S., S. Litwin, C. Xu, et A. R. Jilbert. 2007. « Hepatocyte Turnover in Transient and Chronic Hepadnavirus Infections ». *Journal of Viral Hepatitis* 14 Suppl 1 (novembre): 22-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2007.00911.x>.
- Maynard, James E., Kenneth R. Berquist, Donald H. Krushak, et Robert H. Purcell. 1972. « Experimental Infection of Chimpanzees with the Virus of Hepatitis B ». *Nature* 237 (5357): 514-15. <https://doi.org/10.1038/237514a0>.
- McAuliffe, Vincent J., Robert H. Purcell, et John L. Gerin. 1980. « Type B Hepatitis: A Review of Current Prospects for a Safe and Effective Vaccine ». *Reviews of Infectious Diseases* 2 (3): 470-92. <https://doi.org/10.1093/clinids/2.3.470>.
- McDonald, James I., Hamza Celik, Lisa E. Rois, Gregory Fishberger, Tolison Fowler, Ryan Rees, Ashley Kramer, Andrew Martens, John R. Edwards, et Grant A. Challen. 2016. « Reprogrammable CRISPR/Cas9-Based System for Inducing Site-Specific DNA Methylation ». *Biology Open* 5 (6): 866-74. <https://doi.org/10.1242/bio.019067>.

- McMahon, G., P. H. Ehrlich, Z. A. Moustafa, L. A. McCarthy, D. Dottavio, M. D. Tolpin, P. I. Nadler, et L. Ostberg. 1992. « Genetic Alterations in the Gene Encoding the Major HBsAg: DNA and Immunological Analysis of Recurrent HBsAg Derived from Monoclonal Antibody-Treated Liver Transplant Patients ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 15 (5): 757-766.
- Micco, Lorenzo, Dimitra Peppas, Elisabetta Loggi, Anna Schurich, Lucy Jefferson, Carmela Cursaro, Arianna Martello Panno, et al. 2013. « Differential Boosting of Innate and Adaptive Antiviral Responses during Pegylated-Interferon-Alpha Therapy of Chronic Hepatitis B ». *Journal of Hepatology* 58 (2): 225-233. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.09.029>.
- Michel, M. L., S. Pol, C. Brechot, et P. Tiollais. 2001. « Immunotherapy of Chronic Hepatitis B by Anti HBV Vaccine: From Present to Future ». *Vaccine* 19 (17): 2395-2399.
- Mingozzi, Federico, Yi-Lin Liu, Eric Dobrzynski, Antje Kaufhold, Jian Hua Liu, YuQin Wang, Valder R. Arruda, Katherine A. High, et Roland W. Herzog. 2003. « Induction of Immune Tolerance to Coagulation Factor IX Antigen by in Vivo Hepatic Gene Transfer ». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (9): 1347-1356. <https://doi.org/10.1172/JCI16887>.
- Minor, Marissa M., et Betty L. Slagle. 2014. « Hepatitis B Virus HBx Protein Interactions with the Ubiquitin Proteasome System ». *Viruses* 6 (11): 4683-4702. <https://doi.org/10.3390/v6114683>.
- Mu, Di, Liang Yan, Hui Tang, et Yong Liao. 2015a. « A Sensitive and Accurate Quantification Method for the Detection of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA by the Application of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Amplification System ». *Biotechnology Letters* 37 (10): 2063-2073. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1890-5>.
- . 2015b. « A Sensitive and Accurate Quantification Method for the Detection of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA by the Application of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Amplification System ». *Biotechnology Letters* 37 (10): 2063-2073. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1890-5>.
- Mu, Di, Fang-Chao Yuan, Yu Chen, Xiao-Yan Jiang, Liang Yan, Ling-Yu Jiang, Jian-Ping Gong, Da-Zhi Zhang, Hong Ren, et Yong Liao. 2017. « Baseline Value of Intrahepatic HBV DNA over CccDNA Predicts Patient's Response to Interferon Therapy ». *Scientific Reports* 7 (1): 5937. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05242-y>.
- Murakami, Eisuke, Ting Wang, Yeojin Park, Jia Hao, Eve-Irene Lepist, Darius Babusis, et Adrian S. Ray. 2015. « Implications of Efficient Hepatic Delivery by Tenofovir Alafenamide (GS-7340) for Hepatitis B Virus Therapy ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (6): 3563-3569. <https://doi.org/10.1128/AAC.00128-15>.
- Nassal, Michael. 2008. « Hepatitis B Viruses: Reverse Transcription a Different Way ». *Virus Research* 134 (1-2): 235-249. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.12.024>.
- . 2015a. « HBV CccDNA: Viral Persistence Reservoir and Key Obstacle for a Cure of Chronic Hepatitis B ». *Gut*, juin. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309809>.
- . 2015b. « HBV CccDNA: Viral Persistence Reservoir and Key Obstacle for a Cure of Chronic Hepatitis B ». *Gut* 64 (12): 1972-1984. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309809>.
- Newbold, J. E., H. Xin, M. Tencza, G. Sherman, J. Dean, S. Bowden, et S. Locarnini. 1995. « The Covalently Closed Duplex Form of the Hepadnavirus Genome Exists in Situ as a Heterogeneous Population of Viral Minichromosomes ». *Journal of Virology* 69 (6): 3350-3357.

- Ning, Xiaojun, David Nguyen, Laura Mentzer, Christina Adams, Hyunwook Lee, Robert Ashley, Susan Hafenstein, et Jianming Hu. 2011. « Secretion of Genome-Free Hepatitis B Virus--Single Strand Blocking Model for Virion Morphogenesis of Para-Retrovirus ». *PLoS Pathogens* 7 (9): e1002255. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002255>.
- Nkongolo, Shirin, Yi Ni, Florian A. Lempp, Christina Kaufman, Thomas Lindner, Katharina Esser-Nobis, Volker Lohmann, Walter Mier, Stefan Mehrle, et Stephan Urban. 2014. « Cyclosporin A Inhibits Hepatitis B and Hepatitis D Virus Entry by Cyclophilin-Independent Interference with the NTCP Receptor ». *Journal of Hepatology* 60 (4): 723-731. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.022>.
- Noordeen, Faseeha, Andrew Vaillant, et Allison R. Jilbert. 2013. « Nucleic Acid Polymers Inhibit Duck Hepatitis B Virus Infection in Vitro ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (11): 5291-5298. <https://doi.org/10.1128/AAC.01003-13>.
- odeckmyn. 13:02:26 UTC. « Zoulim chapitre fields virology 2013 lwbk1180-ch68 p2185-2221 ». Santé & Médecine. <https://fr.slideshare.net/odeckmyn/zoulim-chapitre-fields-virology-2013-lwbk1180ch68-p21852221>.
- Okuyama-Dobashi, Kaori, Hirotake Kasai, Tomohisa Tanaka, Atsuya Yamashita, Jun Yasumoto, Wenjia Chen, Toru Okamoto, et al. 2015. « Hepatitis B Virus Efficiently Infects Non-Adherent Hepatoma Cells via Human Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide ». *Scientific Reports* 5 (novembre): 17047. <https://doi.org/10.1038/srep17047>.
- « OMS | Hépatite B ». s. d. WHO. Consulté le 3 mai 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/fr/>.
- Palumbo, Gianna Aurora, Cecilia Scisciani, Natalia Pediconi, Leonardo Lupacchini, Dulce Alfalate, Francesca Guerrieri, Ludovica Calvo, et al. 2015. « IL6 Inhibits HBV Transcription by Targeting the Epigenetic Control of the Nuclear CccDNA Minichromosome ». *PloS One* 10 (11): e0142599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142599>.
- Patient, Romuald, Christophe Hourieux, et Philippe Roingeard. 2009. « Morphogenesis of Hepatitis B Virus and Its Subviral Envelope Particles ». *Cellular Microbiology* 11 (11): 1561-1570. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01363.x>.
- Pei, Rong-Juan, Xin-Wen Chen, et Meng-Ji Lu. 2014. « Control of hepatitis B virus replication by interferons and Toll-like receptor signaling pathways ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20 (33): 11618-11629. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11618>.
- Persing, D. H., H. E. Varmus, et D. Ganem. 1987. « The PreS1 Protein of Hepatitis B Virus Is Acylated at Its Amino Terminus with Myristic Acid ». *Journal of Virology* 61 (5): 1672-1677.
- Petersen, J., M. Dandri, S. Gupta, et C. E. Rogler. 1998. « Liver Repopulation with Xenogenic Hepatocytes in B and T Cell-Deficient Mice Leads to Chronic Hepadnavirus Infection and Clonal Growth of Hepatocellular Carcinoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1): 310-315.
- Pollicino, Teresa, Laura Belloni, Giuseppina Raffa, Natalia Pediconi, Giovanni Squadrito, Giovanni Raimondo, et Massimo Levrero. 2006. « Hepatitis B Virus Replication Is Regulated by the Acetylation Status of Hepatitis B Virus CccDNA-Bound H3 and H4 Histones ». *Gastroenterology* 130 (3): 823-837. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.001>.

- Ran, F. Ann, Patrick D. Hsu, Chie-Yu Lin, Jonathan S. Gootenberg, Silvana Konermann, Alexandro Trevino, David A. Scott, et al. 2013. « Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity ». *Cell* 154 (6): 1380-1389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>.
- Rao, Martin, Davide Valentini, Ernest Dadoo, Alimuddin Zumla, et Markus Maeurer. 2017. « Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Infectious Diseases: Learning from the Cancer Paradigm ». *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 56 (mars): 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.028>.
- Rasche, A., Bfcd Souza, et J. F. Drexler. 2016. « Bat Hepadnaviruses and the Origins of Primate Hepatitis B Viruses. » *Current Opinion in Virology* 16 (février): 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.015>.
- Rehermann, B, C Ferrari, C Pasquinelli, et F V Chisari. 1996. « The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response ». *Nature Medicine* 2 (10): 1104-1108.
- Ren, S., et M. Nassal. 2001. « Hepatitis B Virus (HBV) Virion and Covalently Closed Circular DNA Formation in Primary Tupaia Hepatocytes and Human Hepatoma Cell Lines upon HBV Genome Transduction with Replication-Defective Adenovirus Vectors ». *Journal of Virology* 75 (3): 1104-1116. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1104-1116.2001>.
- Revill, Peter, Barbara Testoni, Stephen Locarnini, et Fabien Zoulim. 2016. « Global Strategies Are Required to Cure and Eliminate HBV Infection ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 13 (4): 239-248. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.7>.
- Rhim, J A, E P Sandgren, R D Palmiter, et R L Brinster. 1995. « Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (11): 4942-4946.
- Rijckborst, Vincent, et Harry L. A. Janssen. 2010. « The Role of Interferon in Hepatitis B Therapy ». *Current Hepatitis Reports* 9 (4): 231-238. <https://doi.org/10.1007/s11901-010-0055-1>.
- Rivière, Lise, Laetitia Gerossier, Aurélie Ducroux, Sarah Dion, Qiang Deng, Marie-Louise Michel, Marie-Annick Buendia, Olivier Hantz, et Christine Neuveut. 2015. « HBx Relieves Chromatin-Mediated Transcriptional Repression of Hepatitis B Viral CccDNA Involving SETDB1 Histone Methyltransferase ». *Journal of Hepatology* 63 (5): 1093-1102. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.023>.
- Rong, Qifei, Jun Huang, Enben Su, Jun Li, Jianyong Li, Lili Zhang, et Kejiang Cao. 2007. « Infection of Hepatitis B Virus in Extrahepatic Endothelial Tissues Mediated by Endothelial Progenitor Cells ». *Virology Journal* 4 (avril): 36. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-36>.
- Rozema, David B., David L. Lewis, Darren H. Wakefield, So C. Wong, Jason J. Klein, Paula L. Roesch, Stephanie L. Bertin, et al. 2007. « Dynamic PolyConjugates for Targeted in Vivo Delivery of siRNA to Hepatocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (32): 12982-12987. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703778104>.
- Russa, Marie F. La, et Lei S. Qi. 2015. « The New State of the Art: Cas9 for Gene Activation and Repression ». *Molecular and Cellular Biology* 35 (22): 3800-3809. <https://doi.org/10.1128/MCB.00512-15>.

- S. Makarova, Kira, Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan J. J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, et al. 2011. « Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems ». *Nature Reviews. Microbiology* 9 (6): 467-477. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- Schluep, Thomas, Jason Lickliter, James Hamilton, David L. Lewis, Ching-Lung Lai, Johnson YN Lau, Stephen A. Locarnini, Robert G. Gish, et Bruce D. Given. 2017. « Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of ARC-520 Injection, an RNA Interference-Based Therapeutic for the Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection, in Healthy Volunteers ». *Clinical Pharmacology in Drug Development* 6 (4): 350-362. <https://doi.org/10.1002/cpdd.318>.
- Schmitt, Sigrid, Dieter Glebe, Tanja K. Tolle, Günter Lochnit, Dietmar Linder, Rudolf Geyer, et Wolfram H. Gerlich. 2004. « Structure of Pre-S2 N- and O-Linked Glycans in Surface Proteins from Different Genotypes of Hepatitis B Virus ». *The Journal of General Virology* 85 (Pt 7): 2045-2053. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79932-0>.
- Schödel, F., D. Peterson, J. Zheng, J. E. Jones, J. L. Hughes, et D. R. Milich. 1993. « Structure of Hepatitis B Virus Core and E-Antigen. A Single Precore Amino Acid Prevents Nucleocapsid Assembly ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (2): 1332-1337.
- Schreiner, Sabrina, et Michael Nassal. 2017. « A Role for the Host DNA Damage Response in Hepatitis B Virus cccDNA Formation—and Beyond? » *Viruses* 9 (5). <https://doi.org/10.3390/v9050125>.
- Seeger, Christoph, et Ji A Sohn. 2014. « Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9 ». *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 3 (12): e216. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.68>.
- Seeger, Christoph, et Ji A. Sohn. 2016. « Complete Spectrum of CRISPR/Cas9-Induced Mutations on HBV CccDNA ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 24 (7): 1258-1266. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.94>.
- Seki, Akiko, et Sascha Rutz. 2018. « Optimized RNP Transfection for Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout in Primary T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 215 (3): 985-997. <https://doi.org/10.1084/jem.20171626>.
- Sells, M A, M L Chen, et G Acs. 1987. « Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (4): 1005-1009.
- Shen, Bin, Wensheng Zhang, Jun Zhang, Jiankui Zhou, Jianying Wang, Li Chen, Lu Wang, et al. 2014. « Efficient Genome Modification by CRISPR-Cas9 Nickase with Minimal off-Target Effects ». *Nature Methods* 11 (4): 399-402. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2857>.
- Shim, Gayong, Dongyoon Kim, Gyu Thae Park, Hyerim Jin, Soo-Kyung Suh, et Yu-Kyoung Oh. 2017. « Therapeutic Gene Editing: Delivery and Regulatory Perspectives ». *Acta Pharmacologica Sinica* 38 (6): 738-753. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.2>.
- Shire, Norah J. 2017. « Cure Strategies for Hepatitis B Virus: The Promise of Immunotherapy ». *Clinical Pharmacology in Drug Development* 6 (2): 186-194. <https://doi.org/10.1002/cpdd.317>.
- Soriano, Vincent, Pablo Barreiro, Laura Benitez, Jose M. Peña, et Carmen de Mendoza. 2017. « New Antivirals for the Treatment of Chronic Hepatitis B ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 26 (7): 843-851. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1333105>.

- Soussan, P., F. Garreau, H. Zylberberg, C. Ferray, C. Brechot, et D. Kremsdorf. 2000. « In Vivo Expression of a New Hepatitis B Virus Protein Encoded by a Spliced RNA ». *The Journal of Clinical Investigation* 105 (1): 55-60. <https://doi.org/10.1172/JCI8098>.
- Soussan, Patrick, Rosella Tuveri, Bertrand Nalpas, Florianne Garreau, Flora Zavala, Annie Masson, Stanislas Pol, Christian Brechot, et Dina Kremsdorf. 2003. « The Expression of Hepatitis B Spliced Protein (HBSP) Encoded by a Spliced Hepatitis B Virus RNA Is Associated with Viral Replication and Liver Fibrosis ». *Journal of Hepatology* 38 (3): 343-48.
- Srisutham, Suttipat, Naowarat Saralamba, Benoit Malleret, Laurent Rénia, Arjen M. Dondorp, et Mallika Imwong. 2017. « Four human Plasmodium species quantification using droplet digital PCR ». *PLoS ONE* 12 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175771>.
- Stieger, Bruno. 2011. « The Role of the Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) and of the Bile Salt Export Pump (BSEP) in Physiology and Pathophysiology of Bile Formation ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n° 201: 205-59. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4_5).
- Stoeckl, Lars, Anneke Funk, Ariane Kopitzki, Boerries Brandenburg, Stefanie Oess, Hans Will, Hüseyin Sirma, et Eberhard Hildt. 2006. « Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (17): 6730-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509765103>.
- Stoll-Becker, S, R Repp, D Glebe, S Schaefer, J Kreuder, M Kann, F Lampert, et W H Gerlich. 1997. « Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients. » *Journal of Virology* 71 (7): 5399-5407.
- Strick-Marchand, Helene, Mathilde Dusséaux, Sylvie Darche, Nicholas D. Huntington, Nicolas Legrand, Guillemette Masse-Ranson, Erwan Corcuff, et al. 2015. « A Novel Mouse Model for Stable Engraftment of a Human Immune System and Human Hepatocytes ». *PLoS ONE* 10 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119820>.
- Su, T. S., C. J. Lai, J. L. Huang, L. H. Lin, Y. K. Yauk, C. M. Chang, S. J. Lo, et S. H. Han. 1989. « Hepatitis B Virus Transcript Produced by RNA Splicing ». *Journal of Virology* 63 (9): 4011-18.
- Summers, J., A. O'Connell, et I. Millman. 1975. « Genome of Hepatitis B Virus: Restriction Enzyme Cleavage and Structure of DNA Extracted from Dane Particles ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (11): 4597-4601.
- Summers, J., P. M. Smith, et A. L. Horwich. 1990. « Hepadnavirus Envelope Proteins Regulate Covalently Closed Circular DNA Amplification ». *Journal of Virology* 64 (6): 2819-24.
- Sung, Wing-Kin, Hancheng Zheng, Shuyu Li, Ronghua Chen, Xiao Liu, Yingrui Li, Nikki P. Lee, et al. 2012. « Genome-Wide Survey of Recurrent HBV Integration in Hepatocellular Carcinoma ». *Nature Genetics* 44 (7): 765-69. <https://doi.org/10.1038/ng.2295>.
- Sureau, C., J. L. Romet-Lemonne, J. I. Mullins, et M. Essex. 1986. « Production of Hepatitis B Virus by a Differentiated Human Hepatoma Cell Line after Transfection with Cloned Circular HBV DNA ». *Cell* 47 (1): 37-47.
- Takkenberg, R. B., S. Menting, et M. G. H. M. Beld. 2012. « Validation of a Sensitive and Specific Real-Time PCR for Detection and Quantitation of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA in Plasma of Chronic Hepatitis B Patients ». *Methods in*

- Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 903: 113-128. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-937-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-937-2_7).
- « TAL Effector Nucleases - TALE & TALENs - CRISPR-RGEN, TALEN & ZFN - Products ». s. d. Consulté le 2 août 2018. <http://labomics.com/products/rngen-talen-zfn/tales-talens/tal-effector-nucleases.html>.
- Tang, Liudi, Qiong Zhao, Shuo Wu, Junjun Cheng, Jinhong Chang, et Ju-Tao Guo. 2017. « The Current Status and Future Directions of Hepatitis B Antiviral Drug Discovery ». *Expert Opinion on Drug Discovery* 12 (1): 5-15. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1255195>.
- Tavis, John E., et Elena Lomonosova. 2015. « The Hepatitis B Virus Ribonuclease H as a Drug Target ». *Antiviral Research* 118 (juin): 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.002>.
- Testoni, Barbara, David Durantel, Fanny Lebossé, Judith Fresquet, François Helle, Francesco Negro, Maria Francesca Donato, Massimo Levrero, et Fabien Zoulim. 2016. « Ribavirin Restores IFN $\alpha$  Responsiveness in HCV-Infected Livers by Epigenetic Remodelling at Interferon Stimulated Genes ». *Gut* 65 (4): 672-682. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-309011>.
- Testoni, Barbara, David Durantel, et Fabien Zoulim. 2017. « Novel Targets for Hepatitis B Virus Therapy ». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 37 Suppl 1: 33-39. <https://doi.org/10.1111/liv.13307>.
- Testoni, Barbara, Massimo Levrero, et Fabien Zoulim. 2017. « Challenges to a Cure for HBV Infection ». *Seminars in Liver Disease* 37 (3): 231-242. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1606212>.
- Thakore, Pratiksha I., Anthony M. D'Ippolito, Lingyun Song, Alexias Safi, Nishkala K. Shivakumar, Ami M. Kabadi, Timothy E. Reddy, Gregory E. Crawford, et Charles A. Gersbach. 2015. « Highly Specific Epigenome Editing by CRISPR-Cas9 Repressors for Silencing of Distal Regulatory Elements ». *Nature Methods* 12 (12): 1143-1149. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3630>.
- Tian, Yi, Dongjing Ni, Weibing Yang, Yi Zhang, Keji Zhao, Jianxun Song, Qing Mao, et al. 2014. « Telbivudine Treatment Corrects HBV-Induced Epigenetic Alterations in Liver Cells of Patients with Chronic Hepatitis B ». *Carcinogenesis* 35 (1): 53-61. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt317>.
- Tong, Shuping, et Peter Revill. 2016. « Overview of Hepatitis B Viral Replication and Genetic Variability ». *Journal of Hepatology* 64 (1): S4-S16. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.027>.
- Trevino, Alexandro E., et Feng Zhang. 2014. « Genome Editing Using Cas9 Nickases ». *Methods in Enzymology* 546: 161-174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00008-8>.
- Tropberger, Philipp, Alexandre Mercier, Margaret Robinson, Weidong Zhong, Don E. Ganem, et Meghan Holdorf. 2015a. « Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (42): E5715-E5724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518090112>.
- . 2015b. « Mapping of Histone Modifications in Episomal HBV CccDNA Uncovers an Unusual Chromatin Organization Amenable to Epigenetic Manipulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (42): E5715-5724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518090112>.

- Tsai, Shengdar Q., Zongli Zheng, Nhu T. Nguyen, Matthew Liebers, Ved V. Topkar, Vishal Thapar, Nicolas Wyvekens, et al. 2015. « GUIDE-Seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases ». *Nature biotechnology* 33 (2): 187-197. <https://doi.org/10.1038/nbt.3117>.
- Tsukamoto, Tomohito, Eiko Sakai, Shunsuke Iizuka, Marcos Taracena-Gándara, Fuminori Sakurai, et Hiroyuki Mizuguchi. 2018. « Generation of the Adenovirus Vector-Mediated CRISPR/Cpf1 System and the Application for Primary Human Hepatocytes Prepared from Humanized Mice with Chimeric Liver ». *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 41 (7): 1089-1095. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00222>.
- Tuttleman, J. S., C. Pourcel, et J. Summers. 1986. « Formation of the Pool of Covalently Closed Circular Viral DNA in Hepadnavirus-Infected Cells ». *Cell* 47 (3): 451-460.
- Tzeng, Horng-Tay, Hwei-Fang Tsai, Hsiu-Jung Liao, Yi-Jiun Lin, Lieping Chen, Pei-Jer Chen, et Ping-Ning Hsu. 2012. « PD-1 Blockage Reverses Immune Dysfunction and Hepatitis B Viral Persistence in a Mouse Animal Model ». *PloS One* 7 (6): e39179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039179>.
- Urban, Stephan, Ralf Bartenschlager, Ralf Kubitz, et Fabien Zoulim. 2014. « Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV into Hepatocytes ». *Gastroenterology* 147 (1): 48-64. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.030>.
- Vaillant, Andrew. 2016. « Nucleic Acid Polymers: Broad Spectrum Antiviral Activity, Antiviral Mechanisms and Optimization for the Treatment of Hepatitis B and Hepatitis D Infection ». *Antiviral Research* 133: 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.07.004>.
- Valsamakis, Alexandra. s. d. « Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B ». Consulté le 2 août 2018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-07>.
- Velazquez, Victoria M., et Arash Grakoui. 2012. « Immune Quiescence and Hepatitis B Virus: Tolerance Has Its Limits ». *Gastroenterology* 143 (3): 529-532. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.089>.
- Verrier, Eloi R., Catherine Schuster, et Thomas F. Baumert. 2017. « Advancing hepatitis B virus entry inhibitors ». *Journal of hepatology* 66 (4): 677-679. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.028>.
- Volz, Tassilo, Marc Lutgehetmann, Paul Wachtler, Anna Jacob, Alexander Quaas, John M Murray, Maura Dandri, et Joerg Petersen. 2007a. « Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients ». *Gastroenterology* 133 (3): 843-852. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.057>.
- Volz, Tassilo, Marc Lutgehetmann, Paul Wachtler, Anna Jacob, Alexander Quaas, John M. Murray, Maura Dandri, et Joerg Petersen. 2007b. « Impaired Intrahepatic Hepatitis B Virus Productivity Contributes to Low Viremia in Most HBeAg-Negative Patients ». *Gastroenterology* 133 (3): 843-852. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.057>.
- Vouillot, Léna, Aurore Thélie, et Nicolas Pollet. 2015. « Comparison of T7E1 and Surveyor Mismatch Cleavage Assays to Detect Mutations Triggered by Engineered Nucleases ». *G3: Genes/Genomes/Genetics* 5 (3): 407-415. <https://doi.org/10.1534/g3.114.015834>.
- Walsh, Renae, Stewart Nuttall, Peter Revill, Danni Colledge, Liza Cabuang, Sally Soppe, Olan Dolezal, Kate Griffiths, Angeline Bartholomeusz, et Stephen Locarnini. 2011. « Targeting the Hepatitis B Virus Precore Antigen with a Novel IgNAR Single Variable



- Domain Intrabody ». *Virology* 411 (1): 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.034>.
- Wang, Jie, Tao Shen, Xiangbo Huang, G. Renuka Kumar, Xiangmei Chen, Zhenzhen Zeng, Ruiyang Zhang, et al. 2016. « Serum Hepatitis B Virus RNA Is Encapsidated Pregenome RNA That May Be Associated with Persistence of Viral Infection and Rebound ». *Journal of Hepatology* 65 (4): 700-710. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.029>.
- Wang, Jing, Yiqi Yu, Guojun Li, Chuan Shen, Zhefeng Meng, Jianming Zheng, Yanhong Jia, et al. 2017. « Relationship between Serum HBV-RNA Levels and Intrahepatic Viral as Well as Histologic Activity Markers in Entecavir-Treated Patients ». *Journal of Hepatology*, septembre. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.021>.
- Wang, Ping, Fengxiang Jing, Gang Li, Zhenhua Wu, Zule Cheng, Jishen Zhang, Honglian Zhang, et al. 2015. « Absolute Quantification of Lung Cancer Related MicroRNA by Droplet Digital PCR ». *Biosensors & Bioelectronics* 74 (décembre): 836-842. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.048>.
- Wang, Tianzhen, Ran Zhao, Yiqi Wu, Dan Kong, Lei Zhang, Di Wu, Chao Li, Chong Zhang, Zuxi Yu, et Xiaoming Jin. 2011. « Hepatitis B virus induces G1 phase arrest by regulating cell cycle genes in HepG2.2.15 cells ». *Virology Journal* 8 (mai): 231. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-231>.
- Watashi, Koichi, Ann Sluder, Takuji Daito, Satoko Matsunaga, Akihide Ryo, Shushi Nagamori, Masashi Iwamoto, et al. 2014. « Cyclosporin A and Its Analogs Inhibit Hepatitis B Virus Entry into Cultured Hepatocytes through Targeting a Membrane Transporter, Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (5): 1726-1737. <https://doi.org/10.1002/hep.26982>.
- Weber, M., V. Bronsema, H. Bartos, A. Bosserhoff, R. Bartenschlager, et H. Schaller. 1994. « Hepadnavirus P Protein Utilizes a Tyrosine Residue in the TP Domain to Prime Reverse Transcription. » *Journal of Virology* 68 (5): 2994-2999.
- Weber, Nicholas D., Daniel Stone, Ruth Hall Sedlak, Harshana S. De Silva Felixge, Pavitra Roychoudhury, Joshua T. Schiffer, Martine Aubert, et Keith R. Jerome. 2014. « AAV-Mediated Delivery of Zinc Finger Nucleases Targeting Hepatitis B Virus Inhibits Active Replication ». *PLoS One* 9 (5): e97579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097579>.
- Weber, O., K.-H. Schlemmer, E. Hartmann, Ina Hagelschuer, A. Paessens, E. Graef, K. Deres, et al. 2002. « Inhibition of Human Hepatitis B Virus (HBV) by a Novel Non-Nucleosidic Compound in a Transgenic Mouse Model ». *Antiviral Research* 54 (2): 69-78.
- Wedemeyer, H., P. Bogomolov, A. Blank, L. Allweiss, M. Dandri-Petersen, B. Bremer, N. Voronkova, et al. 2018. « Final Results of a Multicenter, Open-Label Phase 2b Clinical Trial to Assess Safety and Efficacy of Myrcludex B in Combination with Tenofovir in Patients with Chronic HBV/HDV Co-Infection ». *Journal of Hepatology* 68 (avril): S3. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(18\)30224-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(18)30224-1).
- Wei, X., et D. L. Peterson. 1996. « Expression, Purification, and Characterization of an Active RNase H Domain of the Hepatitis B Viral Polymerase ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (51): 32617-32622.
- Werle-Lapostolle, Bettina, Scott Bowden, Stephen Locarnini, Karsten Wursthorn, Jorg Petersen, George Lau, Christian Trepo, et al. 2004a. « Persistence of CccDNA during the Natural History of Chronic Hepatitis B and Decline during Adefovir Dipivoxil Therapy ». *Gastroenterology* 126 (7): 1750-1758.

- . 2004b. « Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy ». *Gastroenterology* 126 (7): 1750–58.
- Werle–Lapostolle, Bettina, Scott Bowden, Stephen Locarnini, Karsten Wursthorn, Jorg Petersen, George Lau, Christian Trepo, Patrick Marcellin, Zachary Goodman, et William E. Delaney IV. 2004. « Persistence of CccDNA during the Natural History of Chronic Hepatitis B and Decline during Adefovir Dipivoxil Therapy1 ». *Gastroenterology* 126 (7): 1750–58. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.018>.
- Wieland, Stefan F. 2015. « The Chimpanzee Model for Hepatitis B Virus Infection ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021469>.
- Wong, Danny Ka-Ho, Wai-Kay Seto, James Fung, Philip Ip, Fung-Yu Huang, Ching-Lung Lai, et Man-Fung Yuen. 2013. « Reduction of Hepatitis B Surface Antigen and Covalently Closed Circular DNA by Nucleos(t)ide Analogues of Different Potency ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 11 (8): 1004-1010.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.01.026>.
- Wooddell, Christine I., Man-Fung Yuen, Henry Lik Yuen Chan, Robert G. Gish, Stephen A. Locarnini, Deborah Chavez, Carlo Ferrari, et al. 2017. « RNAi-Based Treatment of Chronically Infected Patients and Chimpanzees Implicates Integrated Hepatitis B Virus DNA as a Source of HBsAg ». *Science translational medicine* 9 (409). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan0241>.
- Wu, H. L., P. J. Chen, S. J. Tu, M. H. Lin, M. Y. Lai, et D. S. Chen. 1991. « Characterization and Genetic Analysis of Alternatively Spliced Transcripts of Hepatitis B Virus in Infected Human Liver Tissues and Transfected HepG2 Cells ». *Journal of Virology* 65 (4): 1680–86.
- Wursthorn, Karsten, Marc Lutgehetmann, Maura Dandri, Tassilo Volz, Peter Buggisch, Bernhard Zollner, Thomas Longerich, et al. 2006. « Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44 (3): 675–84. <https://doi.org/10.1002/hep.21282>.
- Xu, Chun-Hai, Zhao-Shen Li, Jun-Ying Dai, Hai-Yang Zhu, Jian-Wu Yu, et Shu-Lan Lü. 2011. « Nested Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA ». *Chinese Medical Journal* 124 (10): 1513–16.
- Yan, Huan, Bo Peng, Wenhui He, Guocai Zhong, Yonghe Qi, Bijie Ren, Zhenchao Gao, et al. 2013. « Molecular Determinants of Hepatitis B and D Virus Entry Restriction in Mouse Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide ». *Journal of Virology* 87 (14): 7977–91. <https://doi.org/10.1128/JVI.03540-12>.
- Yan, Huan, Bo Peng, Yang Liu, Guangwei Xu, Wenhui He, Bijie Ren, Zhiyi Jing, Jianhua Sui, et Wenhui Li. 2014. « Viral Entry of Hepatitis B and D Viruses and Bile Salts Transportation Share Common Molecular Determinants on Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide ». *Journal of Virology* 88 (6): 3273–84. <https://doi.org/10.1128/JVI.03478-13>.
- Yan, Huan, Guocai Zhong, Guangwei Xu, Wenhui He, Zhiyi Jing, Zhenchao Gao, Yi Huang, et al. 2012. « Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus ». *eLife* 1 (novembre). <https://doi.org/10.7554/eLife.00049>.

- Yan, Qin, Ying-Hua Lan, Yan-Xin Huang, Rong-Shan Fan, Lan Liu, Shu-Peng Song, et Yong-Guo Li. 2016. « Hepatitis B Virus Replication Is Upregulated in Proliferated Peripheral Blood Lymphocytes ». *Molecular Medicine Reports* 13 (4): 3581-3587. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4973>.
- Yang, Dan, Longchao Liu, Danming Zhu, Hua Peng, Lishan Su, Yang-Xin Fu, et Liguozhang. 2014. « A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy ». *Cellular and Molecular Immunology* 11 (1): 71-78. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.43>.
- Yao, Xuan, Xing Wang, Junlai Liu, Linyu Shi, Pengyu Huang, et Hui Yang. 2018. « CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Integration In Vivo Using a Homology-Mediated End Joining-Based Strategy ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 133 (12). <https://doi.org/10.3791/56844>.
- Yeh, C. T., H. T. Chiu, C. M. Chu, et Y. F. Liaw. 1998. « G1 Phase Dependent Nuclear Localization of Relaxed-Circular Hepatitis B Virus DNA and Aphidicolin-Induced Accumulation of Covalently Closed Circular DNA ». *Journal of Medical Virology* 55 (1): 42-50.
- Yuen, Man-Fung, Ding-Shinn Chen, Geoffrey M. Dusheiko, Harry L. A. Janssen, Daryl T. Y. Lau, Stephen A. Locarnini, Marion G. Peters, et Ching-Lung Lai. 2018. « Hepatitis B Virus Infection ». *Nature Reviews. Disease Primers* 4 (juin): 18035. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.35>.
- Zaboikin, Michail, Tatiana Zaboikina, Carl Freter, et Narasimhachar Srinivasakumar. 2017. « Non-Homologous End Joining and Homology Directed DNA Repair Frequency of Double-Stranded Breaks Introduced by Genome Editing Reagents ». *PloS One* 12 (1): e0169931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169931>.
- Zeisel, Mirjam B., Julie Lucifora, William S. Mason, Camille Sureau, Jürgen Beck, Massimo Levrero, Michael Kann, et al. 2015. « Towards an HBV Cure: State-of-the-Art and Unresolved Questions-Report of the ANRS Workshop on HBV Cure ». *Gut*, février. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308943>.
- Zetsche, Bernd, Jonathan S. Gootenberg, Omar O. Abudayyeh, Ian M. Slaymaker, Kira S. Makarova, Patrick Essletzbichler, Sara E. Volz, et al. 2015. « Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System ». *Cell* 163 (3): 759-771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>.
- Zhang, Xiaonan, Wei Lu, Ye Zheng, Weixia Wang, Lu Bai, Liang Chen, Yanling Feng, Zhanqing Zhang, et Zhenghong Yuan. 2016. « In Situ Analysis of Intrahepatic Virological Events in Chronic Hepatitis B Virus Infection ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (3): 1079-1092. <https://doi.org/10.1172/JCI83339>.
- Zhang, Xiaonan, Lei Yue, Zhanqing Zhang, et Zhenghong Yuan. 2017. « Establishment of a Fluorescent In Situ Hybridization Assay for Imaging Hepatitis B Virus Nucleic Acids in Cell Culture Models ». *Emerging Microbes & Infections* 6 (11): e98. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.84>.
- Zhang, Yongmei, Richeng Mao, Ran Yan, Dawei Cai, Yijun Zhang, Haoxiang Zhu, Yaoyue Kang, et al. 2014. « Transcription of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Is Regulated by CpG Methylation during Chronic Infection ». *PloS One* 9 (10): e110442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110442>.
- Zoulim, F., J. Saputelli, et C. Seeger. 1994. « Woodchuck Hepatitis Virus X Protein Is Required for Viral Infection in Vivo ». *Journal of Virology* 68 (3): 2026-2030.
- Zoulim, F., et C. Seeger. 1994. « Reverse Transcription in Hepatitis B Viruses Is Primed by a Tyrosine Residue of the Polymerase ». *Journal of Virology* 68 (1): 6-13.

- Zoulim, Fabien. 2005a. « New Insight on Hepatitis B Virus Persistence from the Study of Intrahepatic Viral CccDNA ». *Journal of Hepatology* 42 (3): 302-8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.12.015>.
- . 2005b. « New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA ». *Journal of Hepatology* 42 (3): 302-8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.12.015>.
- Zoulim, Fabien, et Stephen Locarnini. 2009. « Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues ». *Gastroenterology* 137 (5): 1593-1608.e1-2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.063>.
- Zoulim, Fabien, Barbara Testoni, et Fanny Lebossé. 2013. « Kinetics of Intrahepatic Covalently Closed Circular DNA and Serum Hepatitis B Surface Antigen during Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B: Lessons from Experimental and Clinical Studies ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 11 (8): 1011-13. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.04.010>.

## Annexes

---

# Article

---

## Detection of the hepatitis B virus (HBV) covalently-closed-circular DNA (cccDNA) in mice transduced with a recombinant AAV-HBV vector.

Lucifora J, Salvetti A, Marniquet X, Mailly L, Testoni B, Fusil F, Inchauspé A, Michelet M, Michel ML, Levrero M, Cortez P, Baumert TF, Cosset FL, Challier C, Zoulim F, Durantel D.

Publié dans

Antiviral Research, Septembre 2017, Volume 145, Pages 14-19



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/antiviral](http://www.elsevier.com/locate/antiviral)

## Detection of the hepatitis B virus (HBV) covalently-closed-circular DNA (cccDNA) in mice transduced with a recombinant AAV-HBV vector



Julie Lucifora<sup>a</sup>, Anna Salvetti<sup>a</sup>, Xavier Marniquet<sup>b</sup>, Laurent Mailly<sup>c</sup>, Barbara Testoni<sup>a</sup>, Floriane Fusil<sup>d</sup>, Aurore Inchauspe<sup>a,b</sup>, Maud Michelet<sup>a</sup>, Marie-Louise Michel<sup>e</sup>, Massimo Levrero<sup>a</sup>, Pierre Cortez<sup>b</sup>, Thomas F. Baumert<sup>c,f</sup>, François-Loïc Cosset<sup>d</sup>, Cécile Challier<sup>b</sup>, Fabien Zoulim<sup>a,g,h,\*\*</sup>, David Durantel<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR\_5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France

<sup>b</sup> Sanofi R&D, Infectious Disease Therapeutic Area, Marcy l'Étoile, France

<sup>c</sup> INSERM U1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>d</sup> INSERM, U1111, International Center for Infectology Research (ICRI) Team EMR, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon, France

<sup>e</sup> INSERM U894, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>f</sup> Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>g</sup> Hospices Civils de Lyon (HCL), Lyon, France

<sup>h</sup> Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 June 2017

Received in revised form

9 July 2017

Accepted 10 July 2017

Available online 11 July 2017

#### Keywords:

Hepatitis B virus

cccDNA

Adeno-associated virus

Immune-competent mouse

Immune-therapeutics

### ABSTRACT

Hepatitis B Virus (HBV) persists in infected hepatocytes as an episomal covalently-closed-circular DNA mini-chromosome, called cccDNA. As the main nuclear transcription template, HBV cccDNA is a key replication intermediate in the viral life cycle. Little is known about the mechanisms involved in its formation, maintenance and fate under antiviral therapies. This is mainly due to the lack of small immune-competent animal models able to recapitulate the entire HBV replication cycle, including formation of HBV cccDNA. Here we report that HBV cccDNA can be detected by Southern blot analyses in the liver of C57BL/6 mice transduced with AAV-HBV. HBV cccDNA persists in the liver of these animals together with the AAV-HBV episome. We also set up a PCR strategy to distinguish the HBV cccDNA from the AAV-HBV episome. These suggest that the AAV-HBV/mouse model might be relevant to test drugs targeting HBV cccDNA regulation and persistence.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

The Hepatitis B virus (HBV) circulates in the blood of patients as virions containing a partially double stranded relaxed circular DNA

(rcDNA). However, the virus persists in the nucleus of infected hepatocytes as a covalently-closed-circular DNA, called HBV cccDNA, which is the template for all viral RNAs production. HBV cccDNA is organized in a chromatin-like structure that displays a typical beads-on-a-string arrangement by electron microscopy (Newbold et al., 1995; Bock et al., 1994). Host histone proteins as well as other proteins involved in gene expression regulation are bound to HBV cccDNA (Bock et al., 2001) and its transcriptional activity is subjected to the "histone code" (Pollicino et al., 2006). Since it does not contain an origin of replication, HBV cccDNA persistence relies on its stability in non-dividing cells and/or on its replenishment via re-import of rcDNA from neo-synthesized nucleocapsids (Seeger et al., 2013). The universal rebound of HBV replication upon withdrawal from nucleos(t)ide analogue

**Abbreviations:** AAV, adeno-associated virus; cccDNA, covalently closed circular DNA; DIG, digoxigenin; dsL, double stranded linear DNA; HBV, Hepatitis B Virus; HDV, Hepatitis Delta Virus; kb, kilo base; MW, molecular weight; NTCP, sodium taurocholate cotransporting polypeptide; p.i., post-infection; p.t., post-transduction; qPCR, quantitative PCR; rcDNA, relaxed circular DNA; ss, single stranded DNA.

\* Corresponding author. Cancer Research Center of Lyon (CRCL), UMR INSERM U1052, CNRS 5286, 151 Cours Albert Thomas, 69424, Lyon Cedex 03, France.

\*\* Corresponding author. Cancer Research Center of Lyon (CRCL), UMR INSERM U1052, CNRS 5286, 151 Cours Albert Thomas, 69424, Lyon Cedex 03, France.

E-mail addresses: [fabien.zoulim@inserm.fr](mailto:fabien.zoulim@inserm.fr) (F. Zoulim), [david.durantel@inserm.fr](mailto:david.durantel@inserm.fr) (D. Durantel).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.07.006>  
0166-3542/© 2017 Published by Elsevier B.V.

treatment (Zoulim and Locarnini, 2009), as well as traces of HBV-DNA remaining detectable years after clinical recovery from acute hepatitis (Rehermann et al., 1996; Maynard et al., 2005), indicate that HBV cccDNA has an extremely long half-life in the human liver. Current therapies against HBV infection are effective at suppressing viral replication and improve long-term outcome (Marcellin et al., 2003; Zoulim et al., 2016), but do not affect HBV cccDNA transcription template (Boyd et al., 2016).

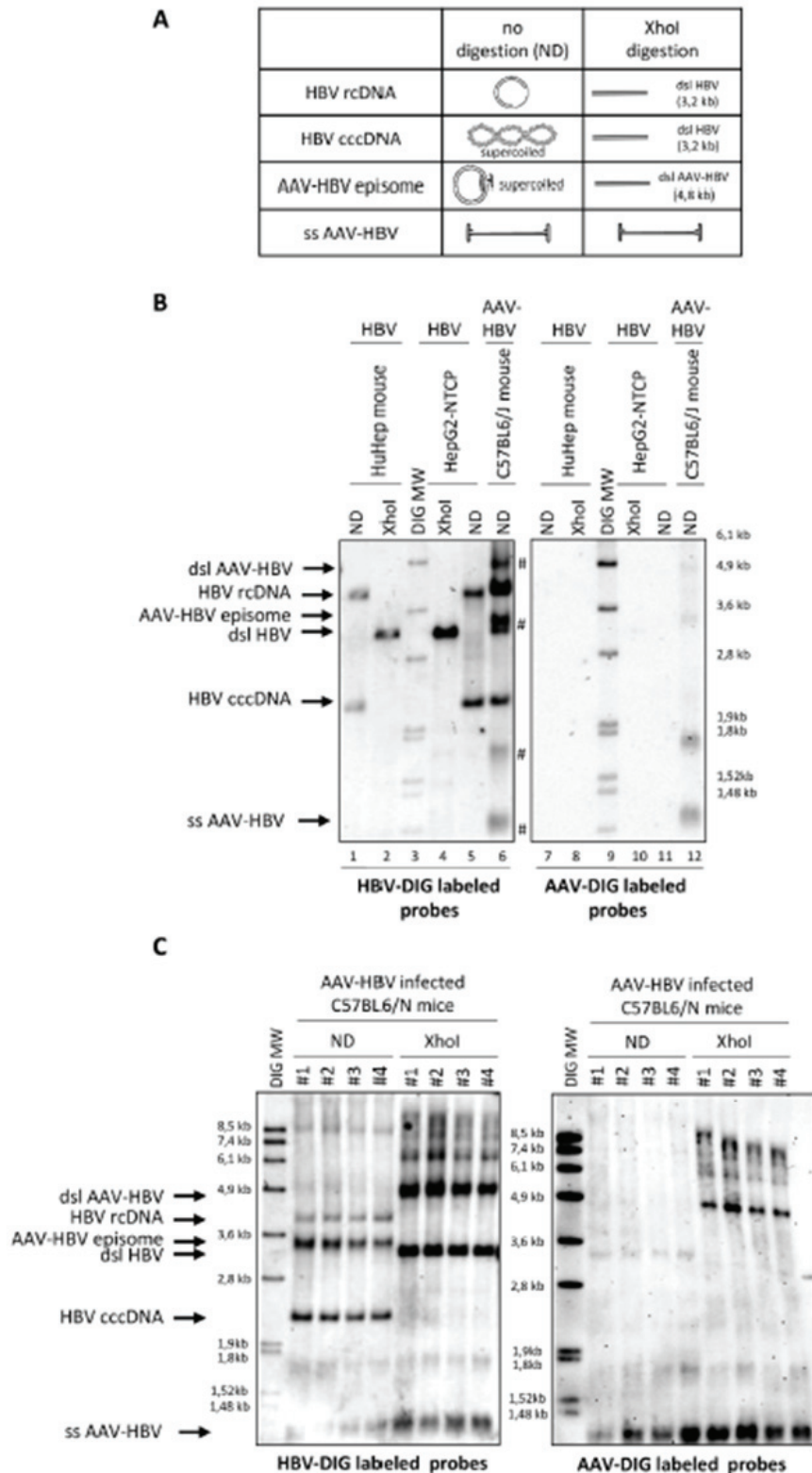
Although many steps of the HBV life cycle have been now well studied, the mechanisms of HBV cccDNA formation and regulation, as well as its regulatory interplay with the host immune system, are still poorly understood. While cell culture models are valuable to characterize defined aspects of the viral life cycle, *in vivo* models are invaluable to study the fate of HBV cccDNA during long-term chronic infection and evaluate new antiviral strategies, including immune-therapies. HBV has an extremely narrow host-range since it only infects hominoid apes, including chimpanzees. The latter have been used in pivotal studies deciphering host responses during acute HBV infection (Guidotti et al., 1999; Wieland et al., 2004) but are no longer available for experimental studies (Harrington, 2012). The use of Macaques, relevant for toxicology studies, is under investigation as an alternative *in vivo* model of HBV infection but economic reasons retrain their use (Dupinay et al., 2013).

Mice, considered as a less expensive alternative animal model, are naturally not susceptible to HBV infection since the mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) orthologue does not allow HBV entry into murine hepatocytes (Yan et al., 2012; Lempp et al., 2016). Mice or murine cell lines over-expressing the human NTCP can efficiently be infected by Hepatitis Delta virus (HDV) particles that share the same envelop as HBV and therefore enter by similar pathway. However, HBV replication was not detected and HBV cccDNA formation was suggested to be restricted in mouse cells (Lempp et al., 2016, 2017; Heet al., 2015; Mailly et al., 2017). To circumvent this issue, different alternatives have been proposed. Immune-deficient mice have been used to generate humanized liver models (HuHep mice) that are susceptible to HBV infection (Allweiss and Dandri, 2016). However, the absence of a functional immune system in these animals prevents the study of immunological issues regarding HBV infection, as well as the evaluation of novel immune-therapies. The injection of HBV minicircle or viral vectors in immune-competent mice was proposed to bypass limiting steps (i.e., entry and HBV cccDNA formation) and allow transcription of HBV RNAs as well as virus production. Indeed, transfection of HBV minicircle led to the formation of HBV cccDNA-like molecules in hepatocytes and to persistent HBV replication *in vivo* (Guo et al., 2016; Yan et al., 2017). Chronic HBV infection has also been successfully established in immune-competent mice by inoculating low doses of adenovirus- (Huang et al., 2012) or adeno-associated virus (AAV) vectors containing the HBV genome (Dion et al., 2013; Yang et al., 2014; Ye et al., 2015). These models have proven useful for immunological studies. However, despite the fact that HBV cccDNA has been previously detected in HNF1a null HBV transgenic mice (Raney et al., 2001) and in a murine hepatic cell line derived from a hTGF- $\alpha$  transgenic mouse that harbor an inducible HBV genome integration (Cui et al., 2015), it was assumed that its formation and maintenance would not occur in AAV-HBV-transduced mice, as it was reported for humanized NTCP transgenic mice (Lempp et al., 2016).

Here, we investigated the establishment of an HBV cccDNA pool in AAV8-HBV-transduced C57BL6 mice in comparison with HBV-infected HuHep mice and HBV-infected HepG2-NTCP cells. Intrahepatic DNA was extracted following a Hirt procedure that favors the enrichment of low molecular weight DNA such as the HBV cccDNA (see supplementary material and methods). It was then

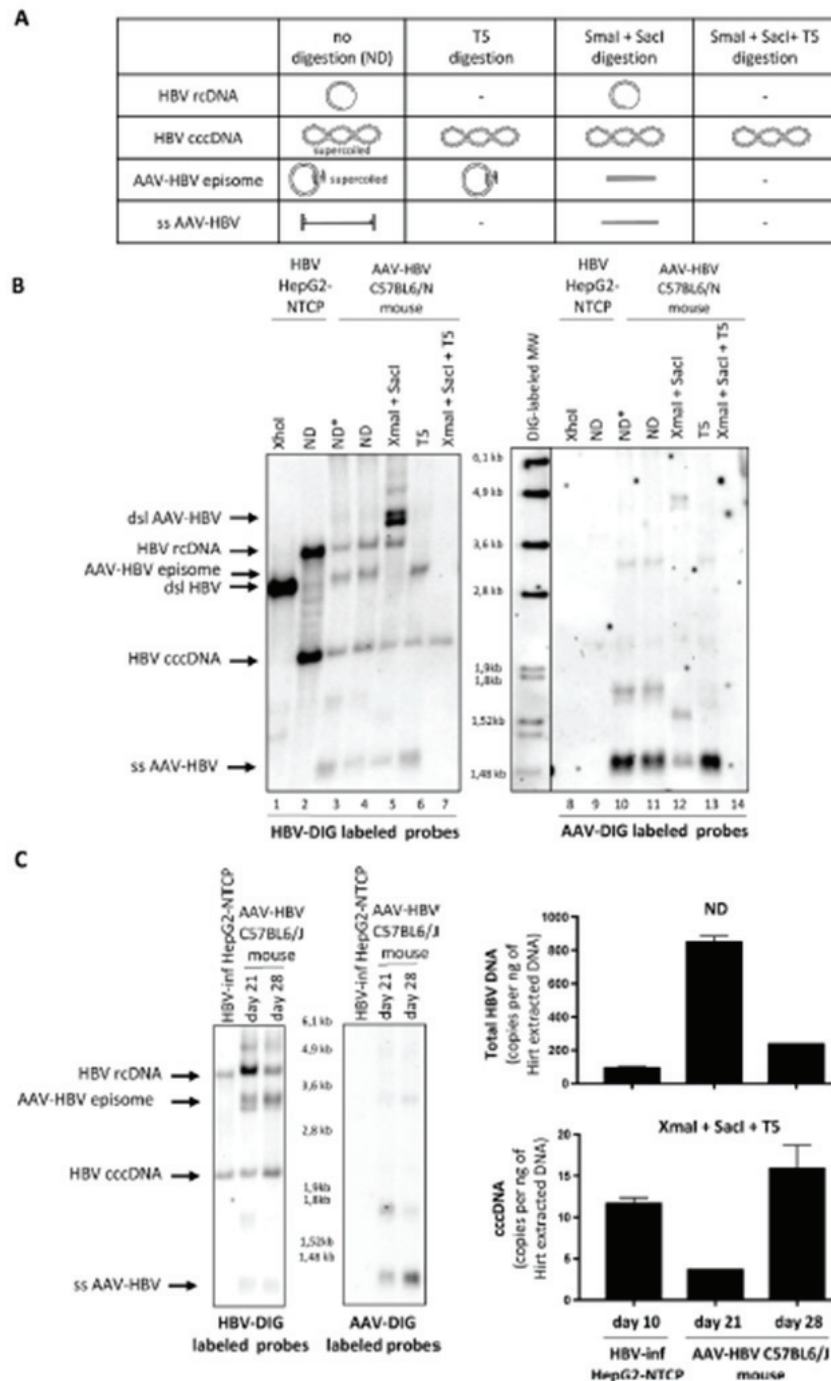
subjected to Southern blot analysis, the gold standard method to specifically detect HBV cccDNA (Nassal, 2015). Different HBV DNA forms were theoretically expected to be detected in AAV-HBV transduced cells. Those include the HBV polymerase-free rcDNA, the single-stranded (ss) AAV-HBV DNA (from incoming AAV particles), the episomal circular double-stranded (ds) AAV-HBV DNA monomers and multimers (formed by recombination (Nakai et al., 2000, 2001)) as well as, hypothetically, the HBV cccDNA formed by re-import of HBV rcDNA from neo-formed cytoplasmic nucleocapsids (Fig. 1A). The HBV DNA circular forms should theoretically all be linearized upon digestion at the unique *Xho*I site (Fig. 1A). HBV rcDNA and cccDNA were detected at their respective expected size (given their agarose mobility properties according to their relaxed or supercoiled state) in HBV-infected HuHep mice or HepG2-NTCP cells (Fig. 1B, lanes 1 and 5). As expected (Fig. 1A), *Xho*I digestion resulted in a single 3.2 kb band corresponding to a double stranded linear (dsl) HBV DNA (Fig. 1B, lanes 2 and 4). Interestingly, we also observed signals corresponding to the HBV rcDNA and cccDNA forms in intrahepatic DNA extracted from an AAV-HBV-transduced C57BL6 mouse (Fig. 1B, lane 6). Importantly, these forms were not detected with a specific DIG-labeled AAV-vector probes (Fig. 1B, lane 12). Additional bands with mobility properties around 1.4 kb, 1.7 kb, 3.4 kb, and 4.8 kb (Fig. 1B, lanes 6, #) were observed in the AAV-HBV-transduced C57BL6 mouse sample, but not in the HBV-infected HepG2-NTCP or HuHep mouse samples. These additional bands corresponded to AAV sequences as confirmed by hybridization with specific AAV DIG-labeled probes (Fig. 1B, lane 12). The 4.8 kb and 1.4 kb bands corresponded to the AAV-HBV dsDNA and ssDNA, respectively (Fig. 1A). The two intermediate bands migrating at a 3.4 and 1.7 kb position, probably corresponded to circular episomal AAV-HBV monomers containing either a full-length or a truncated AAV-HBV genome, respectively. Detection of all these HBV DNA forms, including cccDNA, was confirmed in different AAV-HBV-transduced C57BL6 mice (coming from different laboratories, but transduced with the same AAV8-HBV vector (Dion et al., 2013)) (Fig. 1C). Digestion with an HBV single cutter mainly resulted in a 3.2 kb band corresponding to the HBV dsDNA and in a 4.8 kb band corresponding to the AAV-HBV dsDNA, while leaving AAV-HBV ssDNA intact (Fig. 1C, *Xho*I). The higher MW forms visible above the AAV-HBV dsDNA after digestion with *Xho*I were most likely AAV-HBV concatemers.

While Southern blot analyses allow to distinguish between the different HBV DNA forms, the sensitivity of the technique is rather low (around  $7.5 \times 10^4$  copies with our method), time consuming and less reproducible than selective qPCR methods. In addition, if true discrimination of the HBV cccDNA from the almost identical viral linear DNA or rcDNA is still challenging, discrimination of HBV cccDNA from the AAV-HBV episome is even more challenging, as they not only share common sequences but also are both episomal forms. To increase the specificity of HBV cccDNA detection, a nuclease digestion is usually performed before selective qPCR methods based on the use of primers (and probes) spanning the nick in the HBV rcDNA and hybridizing to its "gap region". T5 exonuclease, that degrades HBV rcDNA but should leave episomal HBV cccDNA molecules intact, is currently widely used (Niu et al., 2017). Accordingly, the cccDNA band was still detected in AAV-HBV samples after digestion with T5 (Fig. 2B, lane 6). In addition, as expected, the circular closed AAV-HBV episome was also resistant to the T5 exonuclease activity (Fig. 2A and 2B lanes 6 and 13). Surprisingly, the AAV-HBV ssDNA band was also unaffected by T5 digestion (Fig. 2B, lanes 6 and 13). This might be due to the complex secondary structure formed by the AAV ITRs that have been shown to be less accessible for DNA polymerases for instance (Fagone et al., 2012). To specifically detect only HBV cccDNA, we used a combination of digestion with *Xma*I and *Sac*I restriction



**Fig. 1.** Detection of the HBV cccDNA in AAV-HBV transduced C57BL6 mice. (A) Schematic representation of HBV DNA forms extracted by a Hirt procedure and their expected modifications after XhoI digestion. (B) Intrahepatic DNAs from an HBV-infected HuHep mouse (day 84 p.i.), an AAV-HBV-transduced C57BL6/J mouse (day 28 p.i.) or HBV-infected HepG2-NTCP cells (day 10 p.i.) were extracted following a Hirt procedure and submitted to Southern blot analyses using HBV-DIG or AAV-DIG labeled probes. (C) Intrahepatic DNAs from 20 AAV-HBV-transduced C57BL6/N mice (day 84 p.i.) were extracted following a Hirt procedure, pooled in four different groups (#1, #2, #3, #4), digested or not by XhoI and subjected to Southern blot analyses using HBV-DIG or AAV-DIG labeled probes. ND: not digested, MW: molecular weight.





**Fig. 2.** Strategy to distinguish between the HBV cccDNA and the AAV-HBV episome in AAV-HBV transduced CS7BL6 mice. (A) Schematic representation of HBV DNA forms extracted by a Hirt procedure and their expected behavior after the indicated digestions. (B) Intrahepatic DNAs from an AAV-HBV transduced CS7BL6/N mouse (day 28 p.t.) or HBV-infected HepG2-NTCP cells (day 10 p.i.) were extracted following a Hirt procedure, digested or not by indicated restriction enzymes and subjected to Southern blot analyses using HBV-DIG or AAV-DIG labeled probes. (C) Intrahepatic DNAs from two AAV-HBV-transduced CS7BL6/J mice sacrificed respectively at day 21 p.t. and day 28 p.t. or HBV-infected HepG2-NTCP cells (day 10 p.i.) were extracted following a Hirt procedure, digested or not by XmaI, SacI and T5 and subjected to Southern blot analyses using HBV-DIG, AAV-DIG labeled probes (left panels) or specific qPCR analyses to quantify total HBV DNA or cccDNA (right panels). ND: not digested, MW: molecular weight \*not digested with no digestion buffer or incubation at 37 °C.

enzymes, that cut only in the AAV-HBV vector (Figs. S1, 2A, and 2B lanes 5 and 12), followed by incubation with the T5 exonuclease resulting in complete degradation of all the AAV DNA species, including HBV-AAV SS forms (likely due to the cut in the ITRs by *Xma*I) (Fig. 2A and B lanes 7 and 14). We confirmed that this triple digestion allowed to detect cccDNA by qPCR by comparing three different DNA samples (one extracted from HBV-infected HepG2-NTCP cells and two extracted from AAV-HBV-transduced C57BL6 mouse livers) containing different amounts of total HBV DNA and cccDNA (Fig. 2C).

Overall, we demonstrated that an HBV 3.2 kb cccDNA can be genuinely detected in livers from AAV-HBV-transduced C57BL6 mice that display a chronic HBV infection (as shown by stable secretions of HBeAg, HBsAg and viremia (Fig. S2)). Until now, HBV cccDNA detection in mouse cells was reported in only two studies using HNF1a null HBV transgenic mice (Raney et al., 2001) or a murine hepatic cell line derived from a hTGF- $\alpha$  transgenic mouse that harbors an inducible and integrated HBV genome (Cui et al., 2015). The advantage of the AAV-HBV-transduced mouse model over those latter models is that (i) different HBV genotypes or mutants can be easily inserted into the AAV vectors and (ii) different mouse strains with different genetic background can be used. The model will further allow studies to determine the half-life of HBV cccDNA and to understand if the presence of HBV cccDNA may influence and explain the outcome of the infection after AAV-HBV transduction in different mouse strains (Chou et al., 2015). As the mouse NTCP orthologue does not allow HBV entry into cells (Lempp et al., 2016), HBV propagation cannot occur in AAV-HBV transduced C57BL6 mice. This suggests that HBV cccDNA might be formed by recycling of *de novo*-formed cytoplasmic nucleocapsids in AAV-HBV transduced mouse hepatocytes. If so, the model would allow to (i) identify the factors that may influence HBV cccDNA formation by recycling of newly-formed cytoplasmic nucleocapsids (ii) to study the impact of nucleos(t)ides analogues or core protein allosteric modulators (Durantel and Zoulim, 2016) on HBV cccDNA recycling within chronically infected hepatocytes and determine whether a combination of these two classes of antiviral agents could help depleting the pool of intrahepatic HBV cccDNA (Boyd et al., 2016). Alternatively, HBV cccDNA could also be formed by recombination from the AAV-HBV episome. This could explain, at least in part, why HBV cccDNA was not detected in HBV-transgenic C57BL6 mice (Guidotti et al., 1995). But this remains to be adequately investigated by long-term studies using nucleoside analogues to prevent potential recycling and/or AAV-HBV vector with mutation on ATGs of HBC gene to altogether prevent nucleocapsid formation. If cccDNA originates from genuine recycling the model will be useful to study both recycling itself and molecules, which could interfere with it. If cccDNA originates from recombination, then the model will yet be useful to study molecules capable to silence and/or induce degradation of cccDNA. It also remains to be determined if the detected cccDNA is functional and can genuinely lead to viral RNA synthesis, as well as if it would eventually take over the AAV-HBV episome as the main template for viral transcription. These hypotheses are so far indirectly supported by a recent study describing the disappearance of AAV-HBV and AAV-HDV episomes in transduced C57BL6 mice without a significant decline of HBV viral load (Suarez-Amaran et al., 2017).

In conclusion, our results highlight the relevance of the AAV-HBV/mouse model that will be pivotal to decipher the mechanisms of HBV cccDNA maintenance and regulation as well as to evaluate the fate of HBV cccDNA under novel therapies combining direct acting antivirals with immune-modulatory drugs for instance (Bian et al., 2017; Martin et al., 2015).

## Acknowledgments

The academic laboratories are supported by grants from ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis; grants from CSS4/CSS7 study committee), INSERM, the DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061) and the LabEx Ecofect (ANR-11-LABX-0048) of the "Université de Lyon", within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR), the EU Infect ERA HBVcc and the LabEx HEPSYS. The present work has been supported by the "Sanofi-INSERM HBV Cure program" of Inserm, CIRI, CRCL and Sanofi (confer to the following link; <http://www.anrs.fr/Hepatitis-virales-B-et-C/Recherche-fondamentale/Actualites/Communique-de-presse-SANOFI-INSERM-HBV-Cure-program-une-alliance-medicale-academique-et-pharmaceutique-pour-la-recherche-sur-l-hepatite-B>). The authors thanks Judith Fresquet, Audrey Diederichs, Laura Dimier, Nicolas Brignon, Halim Guerraoui and Virginie Archimbaud and for their technical assistance. We thank the Pasteur Institute (France) for providing pAAV-HBV1.2 and the Plateforme de Thérapie Génique in Nantes (France) for the production of the *in vivo* certified lots of AAV-HBV vectors and the adeno-uPA vector. We thank Jean-François Henry, Nadine Aguilera and Jean-Louis Thoumas from the animal facility (PBES, Plateau de Biologie Experimental de la Souris, ENS de Lyon) as well as Anaïs Ollivier for their technical help in handling mice.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.07.006>.

## References

- Allweiss, L., Dandri, M., 2016. Experimental *in vitro* and *in vivo* models for the study of human hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 64 (1 Suppl. 1), S17–S31.
- Bian, Y., et al., 2017 Apr 26. Vaccines targeting PreS1 domain overcome immune tolerance in HBV carrier mice. *Hepatology*. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.29239> [Epub ahead of print].
- Bock, C.T., et al., 1994. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* 8 (3), 215–229.
- Bock, C.T., et al., 2001. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* 307 (1), 183–196.
- Boyd, A., et al., 2016. Decay of ccc-DNA marks persistence of intrahepatic viral DNA synthesis under tenofovir in HIV-HBV co-infected patients. *J. Hepatol.* 65 (4), 683–691.
- Chou, H.H., et al., 2015. Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the establishment of gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (7), 2175–2180.
- Cui, X., Guo, J.T., Hu, J., 2015. Hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation in immortalized mouse hepatocytes associated with nucleocapsid destabilization. *J. Virol.* 89 (17), 9021–9028.
- Dion, S., et al., 2013. Adeno-associated virus-mediated gene transfer leads to persistent hepatitis B virus replication in mice expressing HLA-A2 and HLA-DR1 molecules. *J. Virol.* 87 (10), 5554–5563.
- Dupinay, T., et al., 2013. Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among Macaca fascicularis from Mauritius Island. *Hepatology* 58 (5), 1610–1620.
- Durantel, D., Zoulim, F., 2016. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J. Hepatol.* 64 (1 Suppl. 1), S117–S131.
- Fagone, P., et al., 2012. Systemic errors in quantitative polymerase chain reaction titration of self-complementary adeno-associated viral vectors and improved alternative methods. *Hum. Gene Ther.* Methods 23 (1), 1–7.
- Guidotti, L.G., et al., 1995. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* 69 (10), 6158–6169.
- Guidotti, L.G., et al., 1999. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 284 (5415), 825–829.
- Guo, X., et al., 2016. The recombinant cccDNA produced using minicircle technology mimicked HBV genome in structure and function closely. *Sci. Rep.* 6, 25552.
- Harrington, M., 2012. State of the (research) chimp. *Lab. Anim.* (NY) 41 (2), 31.
- He, W., et al., 2015. Hepatitis D virus infection of mice expressing human sodium taurocholate Co-transporting polypeptide. *PLoS Pathog.* 11 (4), e1004840.
- Huang, L.R., et al., 2012. Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice. *Gastroenterology* 142 (7), 1447–50 e3.

- Lempp, F.A., et al., 2016. Evidence that hepatitis B virus replication in mouse cells is limited by the lack of a host cell dependency factor. *J. Hepatol.* 64 (3), 556–564.
- Lempp, F.A., et al., 2017 Feb 13. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of Hepatitis B Virus infection in macaque and pig hepatocytes. *Hepatology*. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.29112> [Epub ahead of print].
- Mally, L., Zeisel, M.B., Baumert, T.F., 2017 May 3. Towards novel immunocompetent animal models for hepatitis B virus infection. *Hepatology*. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.29249> [Epub ahead of print].
- Marcellin, P., et al., 2003. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 348 (9), 808–816.
- Martin, P., et al., 2015. TG1050, an immunotherapeutic to treat chronic hepatitis B, induces robust T cells and exerts an antiviral effect in HBV-persistent mice. *Gut* 64 (12), 1961–1971.
- Maynard, M., et al., 2005. Sustained HBs seroconversion during lamivudine and adefovir dipivoxil combination therapy for lamivudine failure. *J. Hepatol.* 42 (2), 279–281.
- Nakai, H., Storm, T.A., Kay, M.A., 2000. Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J. Virol.* 74 (20), 9451–9463.
- Nakai, H., et al., 2001. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J. Virol.* 75 (15), 6969–6976.
- Nassal, M., 2015. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* 64 (12), 1972–1984.
- Newbold, J.E., et al., 1995. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J. Virol.* 69 (6), 3350–3352.
- Niu, C., et al., 2017. The Smc5/6 complex restricts HBV when localized to ND10 without inducing an innate immune response and is counteracted by the HBVX protein shortly after infection. *PLoS One* 12 (1), e0169648.
- Pollino, T., et al., 2006. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* 130 (3), 823–837.
- Raney, A.K., et al., 2001. Nuclear covalently closed circular viral genomic DNA in the liver of hepatocyte nuclear factor 1 alpha-null hepatitis B virus transgenic mice. *J. Virol.* 75 (6), 2900–2911.
- Rehermann, B., et al., 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 (10), 1104–1108.
- Seeger, C., Zoulim, F., Mason, W., 2013. Molecular biology of hepatitis B viruses. In: Howley, D.K. & P. (Ed.), *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Suarez-Amaran, L., et al., 2017 May 17. A new HDV mouse model identifies mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) as a key player in IFN-beta induction. *J. Hepatol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.010> pii: S0168-8278(17)32046-9. [Epub ahead of print].
- Wieland, S., et al., 2004. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (17), 6669–6674.
- Yan, H., et al., 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1, e00049.
- Yan, Z., et al., 2017. HBVcircle: a novel tool to investigate hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *J. Hepatol.* 66 (6), 1149–1157.
- Yang, D., et al., 2014. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy. *Cell Mol. Immunol.* 11 (1), 71–78.
- Ye, L., et al., 2015. Adeno-associated virus vector mediated delivery of the HBV genome induces chronic hepatitis B virus infection and liver fibrosis in mice. *PLoS One* 10 (6), e0130052.
- Zoulim, F., Locarnini, S., 2009. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 137 (5), 1593–608 e1-2.
- Zoulim, F., Lebosse, F., Levrero, M., 2016. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections. *Curr. Opin. Virol.* 18, 109–116.

---

## Présentations en Congrès

---

- **Sanofi Infectious Disease day**

Lyon, Janvier 2018

**Poster:** Droplet digital PCR quantitation of HBV cccDNA pool and transcriptional activity in long-term nucleos(t)ide analogue treated patients

Aurore Inchauspé, Maëlle Locatelli, Fanny Lebossé, Audrey Diederichs, Amandine Freydier-Berthet, Antoine Alam, Kara Carter, Laurent Fraise, Marc Bourlière, Kamal Hamed, Cecile Challier, Barbara Testoni and Fabien Zoulim

- **18<sup>th</sup> meeting of national hepatitis network-ANRS**

Paris, Avril 2018

**Oral:** Droplet digital PCR quantitation of HBV cccDNA pool and transcriptional activity in long-term nucleos(t)ide analogue treated patients

Aurore Inchauspé, Maëlle Locatelli, Fanny Lebossé, Audrey Diederichs, Amandine Freydier-Berthet, Antoine Alam, Kara Carter, Laurent Fraise, Marc Bourlière, Kamal Hamed, Cecile Challier, Barbara Testoni and Fabien Zoulim

- **EASL international liver congress**

Paris, Mai 2018

**Poster:** Droplet digital PCR quantitation of HBV cccDNA pool and transcriptional activity in long-term nucleos(t)ide analogue treated patients

Aurore Inchauspé, Maëlle Locatelli, Fanny Lebossé, Audrey Diederichs, Amandine Freydier-Berthet, Antoine Alam, Kara Carter, Laurent Fraise, Marc Bourlière, Kamal Hamed, Cecile Challier, Barbara Testoni and Fabien Zoulim

- **5<sup>th</sup> CRCL day**  
Lyon, Mai 2018

**Poster:** Droplet digital PCR quantitation of HBV cccDNApool and transcriptional activity in long-term nucleos(t)ide analogue treated patients

Aurore Inchauspé, Maëlle Locatelli, Fanny Lebossé, Audrey Diederichs, Amandine Freydier-Berthet, Antoine Alam, Kara Carter, Laurent Fraise, Marc Bourlière, Kamal Hamed, Cecile Challier, Barbara Testoni and Fabien Zoulim