



HAL
open science

Mutations dans la région précocore du virus de l'hépatite B et fibrose hépatique : approche épidémiologique et application fondamentale

Adeline Pivert

► **To cite this version:**

Adeline Pivert. Mutations dans la région précocore du virus de l'hépatite B et fibrose hépatique : approche épidémiologique et application fondamentale. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2017. Français. NNT : 2017ANGE0075 . tel-02191498

HAL Id: tel-02191498

<https://theses.hal.science/tel-02191498>

Submitted on 23 Jul 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.

Thèse de Doctorat

Adeline PIVERT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie et Santé

Discipline : Santé

Spécialité : Microbiologie

Unité de recherche : Equipe HIFIH-UPRES EA3859

Soutenue le 20 décembre 2017

Thèse N° : 192004

Mutations dans la région précore du virus de l'hépatite B et fibrose hépatique : approche épidémiologique et application fondamentale

JURY

Rapporteurs :

Vincent THIBAUT, PU-PH, INSERM 1085, Université Rennes 1
Patrick SOUSSAN, MCU-PH, INSERM 1135, Université Paris 5

Examineurs :

Catherine GAUDY-GRAFFIN, MCU-PH, INSERM 966, Université Tours
Vincent PROCACCIO, PU-PH, CNRS 6214 – INSERM U1083, Université Angers

Directeur de Thèse :

Alexandra DUCANCELLE, PU-PH, UPRES EA3859, Université Angers

Co-directeur de Thèse :

Françoise LUNEL-FABIANI, PU-PH, UPRES EA3859, Université Angers

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée Adeline PIVERT, déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signé le

Cette partie a beau intervenir en page 3 d'un mémoire qui en compte 182, elle est pourtant pour moi la dernière et la plus difficile à rédiger... Il faut trouver les mots. Les mots justes. Ce n'est pas toujours ma qualité première alors je vais essayer d'être sincère...

Mes plus vifs remerciements vont au **Pr Alexandra Ducancelle**, directrice de cette thèse. Alexandra, que de chemins parcourus ensemble depuis votre arrivée à Angers en 2005. D'abord un Master puis cette Thèse pour laquelle, il faut bien l'avouer, je n'étais pas débordante de motivation. Mais rien que le fait de partager ce travail avec vous m'a donné l'envie de relever le challenge. Merci pour votre disponibilité malgré vos multiples casquettes. Merci pour la détermination dont vous faites preuve dans la recherche (et ailleurs). Merci pour votre bienveillance permanente. Merci pour tout en fait ! J'espère encore partager longtemps des projets à vos côtés.

Je remercie le **Pr Françoise Lunel-Fabiani**, co-directrice de ce travail et responsable de l'UF de Virologie, qui m'a accueillie il y a maintenant 16 ans au laboratoire. Grâce à votre confiance dans mon travail, j'ai pu prendre de nombreuses responsabilités au sein du laboratoire ce qui me comble chaque jour.

Je tiens à adresser mes remerciements au **Pr Vincent Thibault** et au **Dr Patrick Soussan**, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et de participer au jury de soutenance. Soyez assurés de mon profond respect pour vos travaux et de ma reconnaissance quant à votre relecture.

Je remercie le **Dr Catherine Gaudy-Graffin** et le **Pr Vincent Procaccio** pour avoir activement participé au bon déroulement de cette thèse par l'intermédiaire des comités de suivi. Les échanges ont toujours été constructifs et m'ont à chaque fois redonné du cœur à l'ouvrage. Merci d'avoir accepté de participer au jury de soutenance, la boucle est bouclée. Catherine, merci pour ta disponibilité et ton enthousiasme à chacune de nos rencontres.

REMERCIEMENTS

Et puis il y a les remerciements moins académiques mais tout aussi importants... Par qui commencer, je ne sais pas, tellement les personnes ci-après ont toutes, par quelque manière que ce soit, une place importante dans l'aboutissement de ce travail.

Caroline, je te dois une partie de ces travaux. Merci pour cette année où tu as su relancer ce projet grâce à ton Master. Merci pour les encouragements pour la rédaction, les points culture cellulaire, et ton enthousiasme pour la recherche. Merci pour ta grande disponibilité et pour n'avoir jamais dit non ! Bon vent pour la suite, en espérant travailler de nouveau ensemble.

Je tiens à remercier **Tri**, voisin de bureau et collègue de doctorat. Bonne route à Aurillac, et merci pour ces trois années au laboratoire, riches de partages scientifiques et de discussions « qualité ».

Estelle et Laurent, de l'Inserm U1232. Merci pour votre disponibilité à toute épreuve, merci pour la microscopie électronique, les western-blot, et l'entraide quotidienne que l'on partage.

Catherine Guillet, de la PACEM. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité. Merci pour l'aide apportée pour les cytométries en flux.

Je tiens à remercier vivement **Claude Baillou** et le **Pr François Lemoine** du CIMI à Paris, pour la collaboration et l'aide apportée dans la mise en place de la technologie lentivirale au laboratoire.

J'exprime ici toute ma gratitude envers le **Dr David Durantel**, **Julie Lucifora** et **Maud Michelet**, de l'Inserm U1052 à Lyon, qui nous ont reçus dans leurs locaux quand les doutes s'installaient. Merci pour votre collaboration et l'aide dans la mise en place de la culture d'HepaRG au laboratoire.

Hélène (« la nôtre », comme on dit au labo). Quoi dire !? Toi-même tu connais ma difficulté à poser tout cela ici. Merci à toi pour toutes ces années partagées. Merci pour notre relation amicale de travail, car oui c'est possible ! Merci pour les nombreuses discussions qu'elles soient personnelles ou professionnelles. Merci pour ton soutien dans la réalisation de ce manuscrit et dans d'autres sujets. Sourissez !!!!!

Hélène (« de bactério », il faut bien se comprendre). Merci pour ton soutien, pour ces petits moments de piscine à midi et pour nos déjeuners dans ton bureau, pour m'avoir encouragé à me mettre à rédiger.

REMERCIEMENTS

Les remerciements les plus sincères, chaleureux, et tout autre qualificatif qui pourraient traduire ma gratitude envers l'équipe de virologie du CHU d'Angers dont je fais partie depuis 16 ans : **Maryline, Isabelle, Aude, Dominique, Corinne, Estelle, Sylvain, Paul-Olivier, Véronique**. Venir au labo est un plaisir pour moi aussi grâce à vous et à l'énergie positive que toute l'équipe dégage chaque jour. aux équipes voisines de bactério et de parasito et à **Elise**, chef qualité, qui est un véritable exemple de bonne humeur.

Quand j'ai commencé, je ne pensais à remercier qu'une seule personne. **Christine**, merci de m'avoir tout appris ou presque. Vous nous manquez.

Merci à **Geo** et **Vaness**. Ça n'est plus le jeudi, ni toutes les semaines, mais j'aime nos soirées qui font du bien.

A mes copines et amies basketteuses ou anciennes basketteuses, que je ne listerai pas mais que je remercie pour la joie des soirées partagées, la bonne humeur des réunions, le soutien dans les moments difficiles. Merci à ma co pour la solidarité et le reste.

Merci **les Josies** pour les séances de courses à pied ensemble, un véritable exutoire de pouvoir se plaindre librement !!!

Merci à ma belle-famille, **Marie** et **François**, pour le soutien logistique avec les enfants, pour les encouragements et de toujours me faire croire que ce que je fais est impressionnant !

Merci à mon frère **Thibault** et à **Séverine**, à ma sœur **Phanie** et à **Pascal**, à mes neveux **Olivier, Louis** et **Lino**, à ma nièce **Erin**. La famille c'est fun.

Un grand, que dis-je, un immense, un gigantesque MERCI pour tout ce que vous faites pour moi, pour nous. **Papa** et **Maman**, votre soutien inconditionnel, vos encouragements à toute épreuve et votre confiance en nous est un atout inestimable chaque jour. MERCI.

The last but not least, mon cocon, mon p'tit nid douillet, mon chaton et ma chatoune, mes enfants, **Malo** et **Léna**. Merci pour votre énergie, vos sourires, vos rires qui sont mon carburant au quotidien. Ça y est, je vais avoir du temps pour vous !
Merci à **Manu**.

Ce travail vous est dédié

*« Chaque fois que la science avance d'un pas,
c'est qu'un imbécile la pousse, sans le faire exprès. »*

Emile Zola, « La joie de vivre »

Résumé

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) reste un problème de santé publique avec plus de 880 000 décès chaque année dans le monde. Au stade chronique de l'infection virale B, des complications peuvent survenir comme la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. L'implication du VHB, de ses protéines ou de sa variabilité génétique dans la fibrose hépatique reste à élucider. Toutefois, des méta-analyses semblent montrer un lien statistiquement significatif entre la présence de la double mutation A1762T/G1764A dans le promoteur basal du core (PBC) du VHB et la fibrose sévère. C'est pourquoi nous avons orienté nos travaux de recherche selon deux axes : l'implication des mutations du PBC et de la région précore (PC) dans la sévérité des lésions hépatiques ainsi que le rôle des protéines HBc et HBe du VHB dans l'induction de la fibrogénèse. Dans un premier temps, deux études cliniques ont permis de confirmer l'association significative du double mutant PBC avec la fibrose sévère indépendamment du génotype viral. Nous avons également démontré un effet antagoniste de la mutation G1899A située dans la région PC vis-à-vis du double mutant PBC dans la sévérité de la fibrose. La deuxième partie de nos travaux a consisté à développer une technique innovante de production de protéines en utilisant la transduction de la lignée HepaRG par des vecteurs lentiviraux contenant la séquence de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein). En parallèle, nous avons synthétisé des particules lentivirales contenant les séquences sauvages et mutées du PBC et de la région PC, avec pour objectif de produire les protéines HBc et HBe dans les HepaRG.

Mots clés

Virus de l'hépatite B – Mutations du promoteur basal du core et précore – Technologie lentivirale – HepaRG – Fibrose hépatique

Abstract

The hepatitis B virus (HBV) infection remains a significant public health problem with more than 880 000 deaths every year worldwide. At the stage of chronic HBV infection, complications can occur such as fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The role of HBV, its protein and its genomic variability in fibrosis are still unclear. Meta-analysis seems to indicate a strong link between the double mutation A1762T/G1764A detection in the basal core promotor (BCP) of HBV and the development of fibrosis. In this context, our work aimed to explore: i. the implication of BCP or precore (PC) regions mutations on the severity of fibrosis, and ii. the role of HBc and HBe proteins in fibrosis induction. For the first approach, our studies confirmed the association between the presence of the BCP double mutation and severe fibrosis, independently of the viral genotype. We also showed that the G1899A mutation in the PC region presents an antagonist effect regarding the double BCP mutant for fibrosis severity. In the second part of our work, we developed an innovative technology to produce protein via the transduction of HepaRG cells using lentiviral technology with a plasmid vector containing GFP (green fluorescent protein) sequence. We also obtained lentiviral particles containing the wild and mutated sequences for the BCP and PC regions, in order to produce HBc and HBe protein in HepaRG cells and to explore of the pathogenic role of BCP and PC mutants.

Key words

Hepatitis B virus – Basal core promotor and precore mutations – Lentiviral technology – HepaRG – liver fibrosis

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS	8
TABLE DES TABLEAUX	10
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1. Virus de l'Hépatite B	16
1.1. Classification et structure	16
1.1.1. La famille des Hepadnaviridae	16
1.1.2. La particule virale	17
1.2. Génome et Protéines	19
1.2.1. Organisation du génome	19
1.2.2. Les protéines virales	23
1.3. Cycle viral et physiopathologie	29
1.3.1. Cycle viral	29
1.3.2. Epidémiologie du VHB	34
1.3.3. Physiopathologie	36
1.4. Traitements et vaccin	42
1.4.1. Traitement préventif : le vaccin	42
1.4.2. Traitements curatifs	43
1.5. Variabilité	44
1.5.1. Variabilité génotypique	46
1.5.2. Variabilité phénotypique	52
2. La fibrose hépatique au cours de l'hépatite B	66
2.1. Définitions	66
2.2. Physiopathologie	67
2.2.1. Activation des CEF	68
2.2.2. Entretien des CEF activées	69
2.2.3. Prolifération de la MEC	70
2.2.4. Marqueurs de la fibrogénèse	71
2.3. Rôle des protéines du VHB dans la fibrose hépatique	73

3. Modèles d'études protéiques in vitro	75
3.1. Cultures cellulaires	75
3.1.1. Cellules primaires	76
3.1.2. Lignées hépatocytaires	77
3.1.3. Cellules HepaRG	78
3.2. Utilisation pour le VHB	79
3.2.1. Infection des cellules primaires ou en lignée	79
3.2.2. Transfection transitoire	80
3.2.3. Lignées cellulaires à expression stable	81
3.2.4. Transduction par les vecteurs viraux	82
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE	93
TRAVAUX DE THESE	96
1. Chapitre 1 : Etude des mutations de la région PC du VHB chez les donneurs de sang	97
2. Chapitre 2 : Etude de l'impact des mutations des régions PBC et PC du VHB sur la fibrose hépatique chez les patients infectés chroniquement	107
3. Chapitre 3 : Mise au point de la transduction de cellules HepaRG par des vecteurs lentiviraux	118
4. Chapitre 4 : Production des particules lentivirales exprimant les protéines HBc et HBe du VHB	137
4.1. Introduction	137
4.2. Matériel et méthodes	139
4.2.1. Cellules	139
4.2.2. Obtention des séquences d'intérêt	140
4.2.3. Clonage dans le plasmide pGEM [®] -T Easy Vector	143
4.2.4. Construction des vecteurs d'expression	146
4.2.5. Production des particules lentivirales	149
4.3. Résultats	153
4.3.1. Quantifications des ADN purifiés	153
4.3.2. Séquences des particules lentivirales	154
4.3.3. Titrage des surnageants viraux	162
4.4. Conclusions et perspectives	163
CONCLUSIONS	167
BIBLIOGRAPHIE	172

Table des illustrations

Figure 1 : Arbre phylogénétique représentant la famille des hepadnavirus [9].....	17
Figure 2 : Représentation schématique du VHB.	18
Figure 3 : Modèles des structures virales circulantes du VHB [13].....	19
Figure 4 : Organisation génomique du VHB [14].	20
Figure 5 : Structure du signal d'encapsidation ϵ	23
Figure 6 : Structure de la région pol du VHB (d'après Kay, 2006 [18]).	24
Figure 7 : Structures des complexes d'AgHBc (d'après Zlotnick <i>et al.</i> [20]).	25
Figure 8 : Etapes de la synthèse de l'AgHBe.	26
Figure 9 : Conformations des protéines de surface du VHB [23].	28
Figure 10 : Cycle viral du VHB [29].....	30
Figure 11 : Carte de prévalence mondiale de l'Hépatite B [51].	36
Figure 12 : Histoire naturelle de l'infection par le VHB à l'âge adulte.	37
Figure 13 : Cinétique des marqueurs du VHB au cours de l'infection aiguë.	38
Figure 14 : Arbre phylogénétique représentant les clusters génotypiques du VHB [67]. ...	47
Figure 15 : Répartition géographique des génotypes du VHB [72].	50
Figure 16 : Mutations principales décrites dans le gène RT/Pol (d'après Lim <i>et al.</i> [80]).	54
Figure 17 : Représentation des principales positions des acides aminés de la protéine S modifiés par mutation de la séquence nucléotidique [84].	56
Figure 18 : Comparaison des séquences de la région PBC sauvage et mutée avec les séquences du récepteur nucléaire et du facteur de transcription HNF1 (d'après Li <i>et al.</i> [86]).	58
Figure 19 : Impact de la mutation G1896A dans la région PC du génome du VHB.	60
Figure 20 : Structure tige-boucle du signal d'encapsidation et mutations de la région PC.	62
Figure 21 : Processus de fibrogénèse faisant intervenir les CEF [123].	68

Figure 22 : Mécanismes principaux d'activation des CEF.....	69
Figure 23 : Nouvelles fonctionnalités des CEF activées (d'après Friedman [122]).....	71
Figure 24 : Hépatocytes en culture au lendemain de l'ensemencement (photothèque du laboratoire de Virologie, CHU Angers).	76
Figure 25 : Lignée hépatocytaire HepG2.	77
Figure 26 : Cellules HepaRG en culture (image fournie par l'équipe du Pr Zoulim).	78
Figure 27 : Principe de la technologie de transduction par les baculovirus.	83
Figure 28 : Principe de la technologie de production des AAV recombinants.	85
Figure 29 : Plasmide d'expression contenant le gène d'intérêt.	88
Figure 30 : Composition du plasmide d'enveloppe.....	89
Figure 31 : Composition du plasmide d'encapsulation.	90
Figure 32 : Principe de production de particules lentivirales par co-transfection transitoire.	91
Figure 33 : Performances analytiques du modèle proposé.....	109
Figure 34 : Constructions des plasmides d'expression contenant les séquences des régions PBC, PC et C.	138
Figure 35 : Carte du plasmide pGEM®-T Easy utilisé pour le pré-clonage (Promega). ..	144
Figure 36 : Photographie du gel de migration E-Gel® SizeSelect™.....	147
Figure 37 : Carte du plasmide pENG EF1 α -GFP (d'après INSERM UMR1135).	148
Figure 38 : Carte du plasmide d'encapsulation pCMV9 (d'après INSERM UMR1135). ..	150
Figure 39 : Carte du plasmide d'enveloppe VSV-G (d'après INSERM UMR1135).....	151

Table des tableaux

Tableau 1 : Histoire naturelle et classification des phases de l'infection par le VHB.	40
Tableau 2 : Caractéristiques des génotypes du VHB (adapté d'après Kay et Zoulim [64]).	48
Tableau 3 : Liste des mutations du PBC décrites.	59
Tableau 4 : Différences d'expressions protéiques et de fonctionnalités entre les CEF quiescentes et les CEF activées (d'après Lamireau <i>et al.</i> [119]).....	73
Tableau 5 : Plasmas des patients utilisés pour obtenir les séquences d'intérêt.	140
Tableau 6 : Amorces utilisées lors de l'amplification des séquences d'intérêt (régions PBC, PC, C) et du séquençage.	141
Tableau 7 : Quantifications des suspensions d'ADN.	154
Tableau 8 : Résultats des mesures de l'Ag p24 sur les surnageants viraux.	162
Tableau 9 : Résultats des mesures de l'ARN sur les surnageants viraux.	163

Liste des abréviations

aa : acides aminés
AAV : Adeno Associated Virus
Ac : anticorps
ADNccc : ADN circulaire clos de manière covalente
ADNrc : ADN relâché circulaire
Ag : antigène
ALAT : ALanine Amino Transférase
ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites
ARNpg : ARN pré-génomique
AUROC : Area under the ROC
BSA : Bovine Serum Albumin
C : core
CEF : Cellules Etoilées du foie
CHC : Carcinome Hépatocellulaire
CMV : Cytomégalovirus
cPPT : central PolyPurine Tract
DHBV : Duck Hepatitis B Virus
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DR : Direct Repeat
EASL : European Association for the Study of the Liver
EF1- α : Elongation Factor 1- α
EFS : Etablissements Français du Sang
EN : Enhancer
GFP : Green Fluorescent Protein
GRE : Glucocorticoïde Responsive Element
HEK : Human Embryonic Kidney
HLA : Human Leukocyte Antigen
HNF1 : Hepatocyte Nuclear Factor
HPH : Hépatocytes Primaires Humains
HSPG : HeparanSulfate ProteoGlycanes
IC : Intervalle de Confiance
ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN : Interferon
IL : InterLeukine
INTS : Institut National de Transfusion Sanguine

IPTG : Isopropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
ITR : Inverted Terminal Repeat
LTR : Long Terminal Repeat
MCS : Multi-Clonage Site
MEC : Matrice extracellulaire
MHR : Major Hydrophilic Region
miR : micro ARN
MMP : MétalloProtéase Matricielle
NTCP : sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OR : Odd-Ratio
ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert)
PBC : Promoteur Basal du Core
PBS : Primary Binding Site
PC : précore
PC/C : précore/core
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
PDGF : Platelet-derived growth factor
PEG : Polyéthylène Glycol
PEV : Programme Elargi de Vaccination
pol : polymérase
PRE : Post-transcriptional Regulatory Element
rAAV : recombinant AAV
RBS : Receptor Binding Site
RE : Reticulum Endoplasmique
RRE : Rev Response Elements
ROC : Receiving Operating Characteristic
SMA : Smooth Muscle Actin
TGF : Transforming Growth Factor
TIMP : Inhibiteur tissulaire des metalloproteases
TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
UI : Unités Internationales
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VSV : Virus de la stomatite vésiculeuse
WPRES : WHV Posttranscriptional Response Element
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Introduction

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) relève d'un problème de santé publique mondial. En effet, plus de 2 milliards de personnes dans le monde ont déjà rencontré le virus, et parmi elles, plus de 257 millions de personnes sont infectées chroniquement. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ce virus est responsable de plus de 880 000 décès par an que ce soit lié à une hépatite fulminante ou lorsque que l'infection chronique évolue vers la cirrhose ou le cancer du foie [1]. Dans les pays à forte prévalence en Asie et en Afrique, le VHB représente la 1^{ère} cause de cancer du foie.

Depuis la découverte de l'antigène (Ag) Australia par Blumberg en 1965 [2], de nombreuses recherches ont été menées afin de connaître la structure virale, le cycle cellulaire et la pathogénèse liée au VHB. Actuellement, ces notions sont largement décrites dans la littérature, mais certaines connaissances restent controversées ou peu documentées [3]. Néanmoins, la description précoce de la structure de ce virus a permis de mettre au point en 1976 le premier vaccin qui protège d'un cancer, dont l'efficacité approche les 95% [4]. Dans les pays où l'infection par le VHB est endémique, la généralisation de la vaccination des enfants dès la naissance a d'ailleurs permis de diminuer considérablement le taux d'infection chronique chez les adultes [5-7]. En effet, le Programme Elargi de Vaccination (PEV) lancé par l'OMS en 1974 a été modifié en 1992 pour inclure la vaccination systématique des nourrissons dans tous les pays du monde avant 1997.

La particularité du VHB est sa grande variabilité. En effet, outre les génotypes existants, on observe au cours de l'infection chronique l'apparition de mutants phénotypiques qui pourraient être impliqués dans la physiopathologie de l'infection virale. Malgré de nombreuses études épidémiologiques, les mécanismes d'action reliant les mutants phénotypiques à l'évolution des lésions hépatiques restent controversés. De plus, peu de modèles d'études *in vitro* existent pour l'étude de ces mécanismes.

L'infection par le VHB dans le monde reste une problématique prioritaire pour l'OMS et la recherche continue d'avancer, que ce soit d'un point de vue fondamental, thérapeutique ou vaccinal.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Virus de l'Hépatite B

1.1. Classification et structure

1.1.1. La famille des Hepadnaviridae

Les *Hepadnaviridae*, ou famille des *Hepadnavirus*, rassemblent les virus présentant les caractères suivants : génome ADN complètement ou partiellement double brin, activité rétro-transcriptase au cours du cycle viral et tropisme hépatocytaire. Ils sont donc responsables de la majorité des hépatites virales chez les humains et les animaux avec une spécificité d'hôte étroite.

Cette famille comporte deux genres (Figure 1) : les *Orthohepadnavirus*, qui infectent principalement les mammifères et les *Avihepadnavirus*, trouvés chez les espèces aviaires [8]. La spécificité d'hôte est liée à la faible homologie génétique entre les différents genres : seulement 40% d'homologie sont détectés entre les génomes des virus aviaires et des virus humains.

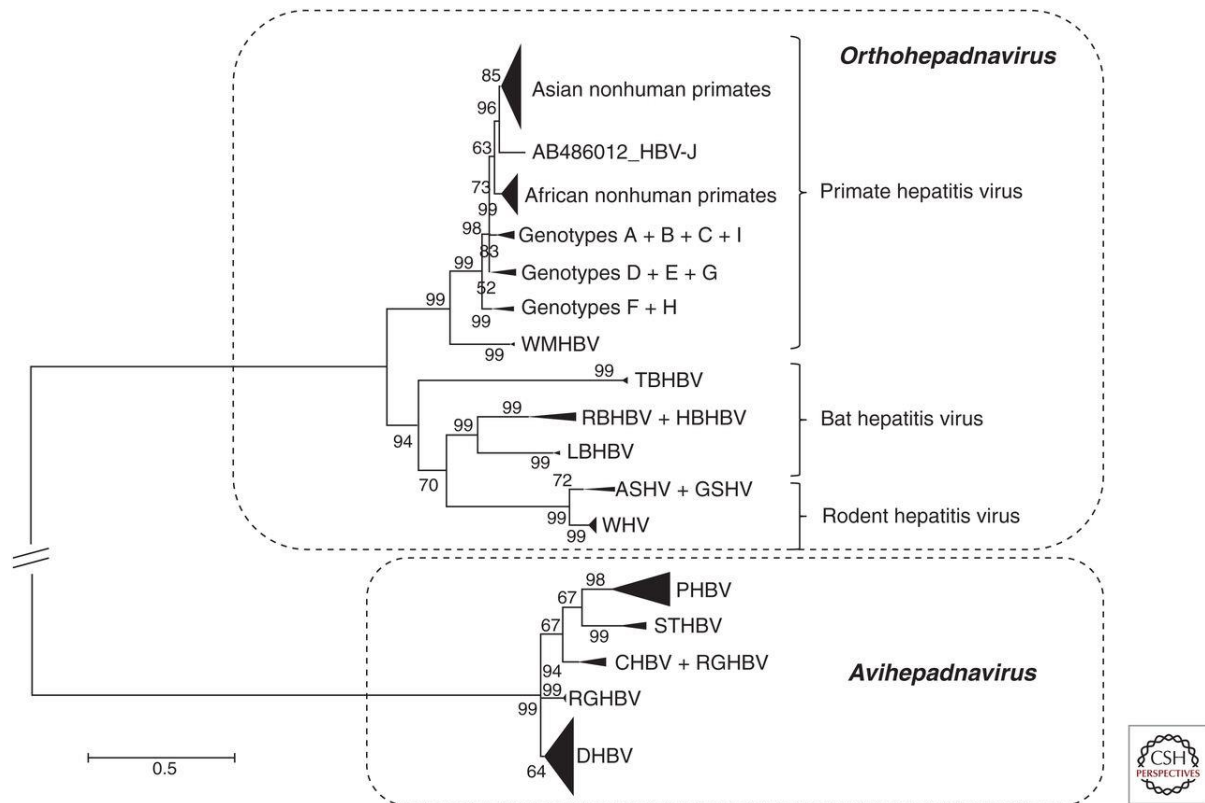


Figure 1 : Arbre phylogénétique représentant la famille des hepadnavirus [9].

Les génotypes A à J concernent les VHB humains. WMHBV (Woolly monkey) : souche infectant les singes lagothrix. Les GSHV (Ground Squirrel) et ASHV (Artic Squirrel) sont les virus de l'hépatite des écureuils. La marmotte est infectée par le WHV (Woodchuck). Les Bat hepatitis virus sont spécifiques des chauves-souris et les Rodent hepatitis virus des rongeurs. PHBV (Parrot) : VHB du perroquet ; STHBV (Stork) : VHB de la cigogne ; CHBV (Crane) : VHB de la grue ; RGHBV (Ross Goose) : VHB de l'oie ; DHBV (Duck) : VHB du canard.

1.1.2. La particule virale

Après la découverte de l'Ag Australia par Blumberg dans le plasma d'un aborigène australien au début des années 1960, la présence de cet antigène sera identifiée comme marqueur de certaines des hépatites virales post transfusionnelles. La notion de virus de l'hépatite B et d'antigène HBs (AgHBs) apparaîtra quelques années plus tard [2]. En 1970, Dane identifie en microscopie électronique des particules virales dans le sérum d'un patient atteint d'hépatite [10].

Les particules infectieuses sont de petites sphères d'environ 42 nm de diamètre dont l'enveloppe est une bi-couche lipidique issue de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) cellulaire dans laquelle est enchâssée une grande quantité d'AgHBs (Figure 2). A l'intérieur de cette enveloppe, une capsidie icosaédrique composée de l'antigène HBc (AgHBc) enferme l'ADN viral et la polymérase virale. Bien que ce soit un virus enveloppé, le VHB est relativement résistant dans le milieu extérieur.

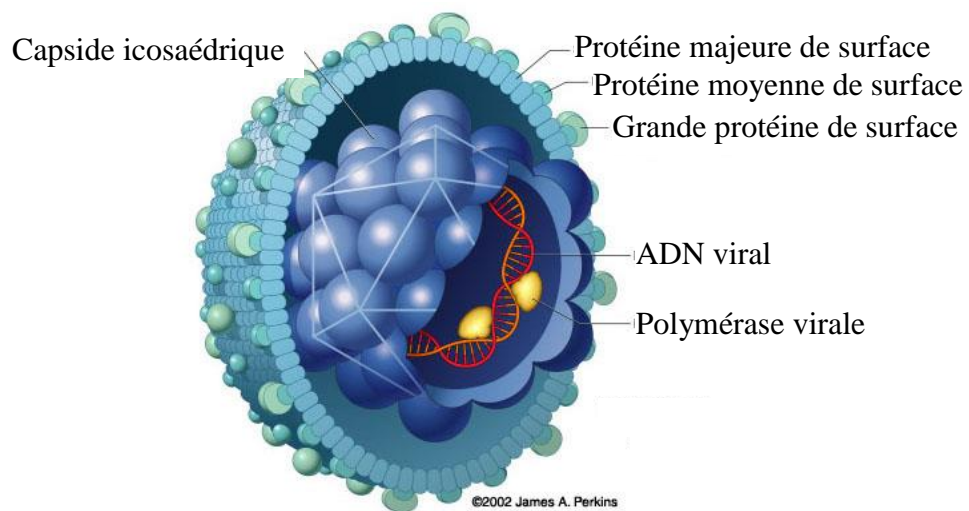


Figure 2 : Représentation schématique du VHB.

L'assemblage des protéines HBc en homodimères forme la capsidie icosaédrique qui enferme le génome et la polymérase virale. Les différentes formes de protéines de surface (AgHBs) s'assemblent et se lient à la membrane du RE cellulaire pour former l'enveloppe virale.

Dans le sérum des patients infectés par le VHB, des particules non infectieuses composées uniquement d'AgHBs et ne contenant ni capsidie ni génome viral ont également été mises en évidence en microscopie électronique (Figure 3). Deux formes ont été décrites : des bâtonnets (100nm) et des sphères (22nm) [10]. Le rôle de ces particules vides reste mal connu, mais l'hypothèse qui domine serait qu'elles permettent aux virions infectieux d'échapper au système immunitaire en augmentant artificiellement le nombre de cible pour les anticorps (Ac) neutralisants [11]. En effet, ces particules subvirales sont synthétisées en large excès par rapport aux virions [12].

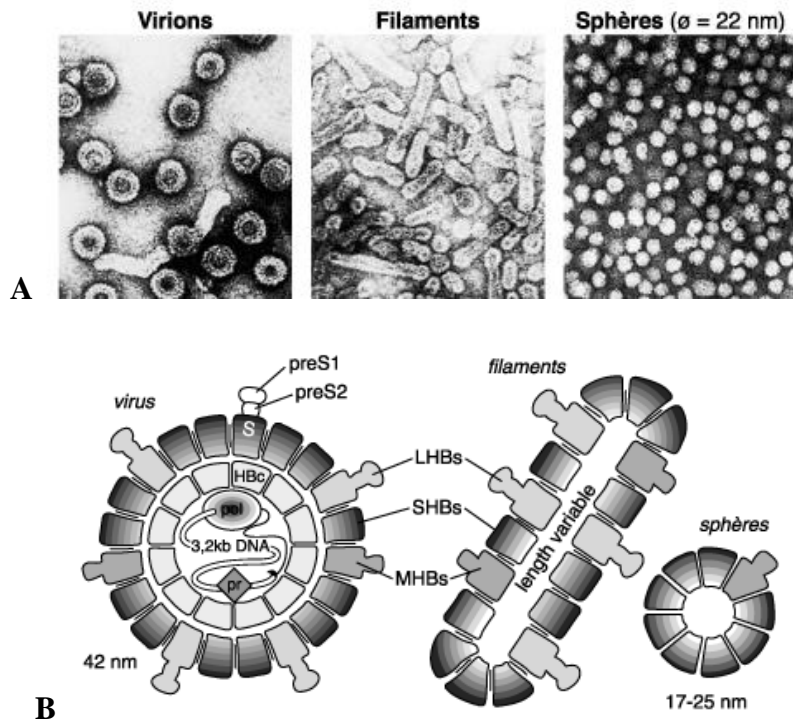


Figure 3 : Modèles des structures virales circulantes du VHB [13].

(A) Visualisation en microscopie électronique des virions contenant l'ADN viral, et des filaments et sphères vides et composés uniquement d'AgHBs. (B) Schématisation des structures virales circulantes.

1.2. Génome et Protéines

Les *Hepadnavirus* sont des virus hépatotropes à ADN, d'où leur nom. Le génome du VHB est particulièrement compact, complexe et organisé.

1.2.1. Organisation du génome

a) Constitution du génome viral

La molécule d'ADN viral est circulaire, partiellement double brin et relâchée. Sa taille, variable selon les génotypes, est d'environ 3,2 kb. Cependant, la quantité d'information génétique portée est extrêmement importante. En effet, 4 cadres de lecture ouverts (Open Reading Frame ou ORF) chevauchants permettent la synthèse des protéines virales (Figure 4).

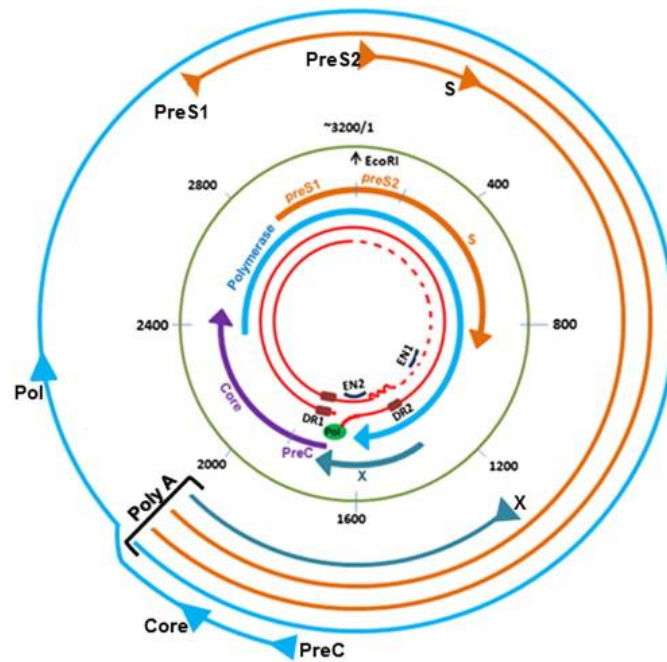


Figure 4 : Organisation génomique du VHB [14].

Le génome partiellement double brin est schématisé en rouge au centre avec la polymérase fixée en extrémité 5' du brin négatif. Les parties codantes de chaque protéine sont annotées par les flèches bleu clair, orange, violet et bleu foncé. A l'extérieur du cercle vert où est reportée la numérotation du génome, en orange, les cadres de lecture ouverts permettant la synthèse des protéines d'enveloppe S, M et L. En bleu foncé, l'ORF concernant la protéine X. En bleu clair, le 4^{ème} ORF qui code l'ARN pré-génomique donnant lieu à la synthèse de l'AghBc et de la polymérase. L'AghBe est codé par l'ARNm PC. Des séquences régulatrices (EN1 et 2, DR1 et 2) sont également décrites sur le génome.

La numérotation du génome est artificiellement commencée au site de restriction EcoRI dans la région préS2. Les 2 brins sont inégaux et l'ADN circulaire est fermé de façon non covalente. Le brin de polarité négative (-) est le plus long. Une polymérase est liée de façon covalente à son extrémité 5'. Le brin de polarité positive (+) est incomplet. Son extrémité 5' est complémentaire de l'extrémité 5' du brin (-) sur quelques paires de bases afin de garantir la forme circulaire du génome.

b) Cadres de lectures ouverts

La totalité du génome du VHB est codant. Les 4 cadres de lectures ouverts sont chevauchants et permettent la synthèse de 7 protéines.

- La région préS/S code les 3 protéines d'enveloppe : la majeure S (Small) issue de la région S est la protéine majeure de surface ; la moyenne M (Medium) codée par la région préS2/S et enfin la grande L (Large) concerne la région PréS1/préS2/S.
- Le gène P recouvre plus de 80% du génome et code une ADN polymérase ARN/ADN dépendante (pol). Cette enzyme possède ainsi une activité polymérase, reverse transcriptase et RNase H.
- Le gène X code la protéine HBx.
- La région précore/core (PC/C) comporte 2 codons d'initiation en phase. L'un au début de la région précore (PC) qui permet la synthèse d'une pré-protéine maturée en antigène HBe (AgHBe) ; l'autre au début du gène C permettant l'expression de l'AgHBc.

c) **Eléments régulateurs**

La transcription de l'ADN est médiée par la présence de séquences régulatrices virales (Figure 4). Parmi celles-ci, les séquences EN1 et EN2 pour Enhancer I et II qui permettent d'activer la transcription de l'ensemble des ARN viraux via différentes cytokines hépatiques notamment, et de certains gènes hôtes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire [15]. La séquence GRE (Glucocorticoïde Responsive Element), située dans le gène S, permet d'augmenter jusqu'à cinq fois l'activité transcriptionnelle via EN1 [16]. Enfin une séquence PRE (Post-transcriptional Regulatory Element) est probablement impliquée dans la régulation de l'épissage des ARN viraux et l'export des ARNm viraux non épissés vers le cytoplasme [17].

Quatre promoteurs sont également décrits en amont des régions codantes :

- Le promoteur préS1 contrôle la transcription de l'ARNm de la protéine préS1. Ce promoteur est faible avec une forte spécificité hépatocytaire et est régulé par EN1.
- Le promoteur S contrôle la transcription des ARNm des protéines préS2 et S. Son activité est modulée par EN1 et EN2. Il n'est pas spécifique des hépatocytes mais son activité est maximale dans le foie.
- La fonction, la position, le rôle du promoteur X sont mal connus. *In vitro* c'est un promoteur fort, mais son activité apparaît régulée négativement dans le foie [18].
- Le promoteur basal du core (PBC) contrôle deux transcriptions : celle de l'ARN pré-génomique (ARNpg) et celle de l'ARNm PC. Son rôle est primordial puisque l'ARNpg est la matrice pour la réplication du génome viral et pour la synthèse des ARNm des protéines HBc et pol. Son activité, maximale dans le foie, est principalement modulée par EN2.

Certains éléments structuraux interviennent également dans le cycle cellulaire. Parmi ceux-ci, deux séquences répétées DR1 et DR2 (Direct Repeat), un signal de polyadénylation et un signal d'encapsidation.

Les séquences DR1 et DR2 sont deux séquences de 11 nucléotides situées aux extrémités 5' des brins (-) et (+) respectivement (Figure 4). Entre ces 2 séquences, les deux brins sont cohésifs sur environ 200 paires de bases et c'est ce qui permet de maintenir la circularité du génome.

Le signal d'encapsidation ϵ (epsilon) est une structure tige-boucle particulièrement importante lors de l'initiation de la transcription inverse et pendant les étapes d'encapsidation du génome viral (Figure 5) [19]. Cette séquence, située en aval de la séquence DR1 dans le gène PC/C, contient le codon d'initiation de l'AgHBc et les mutations en positions 1896 et 1899 que nous détaillerons plus loin dans le manuscrit.

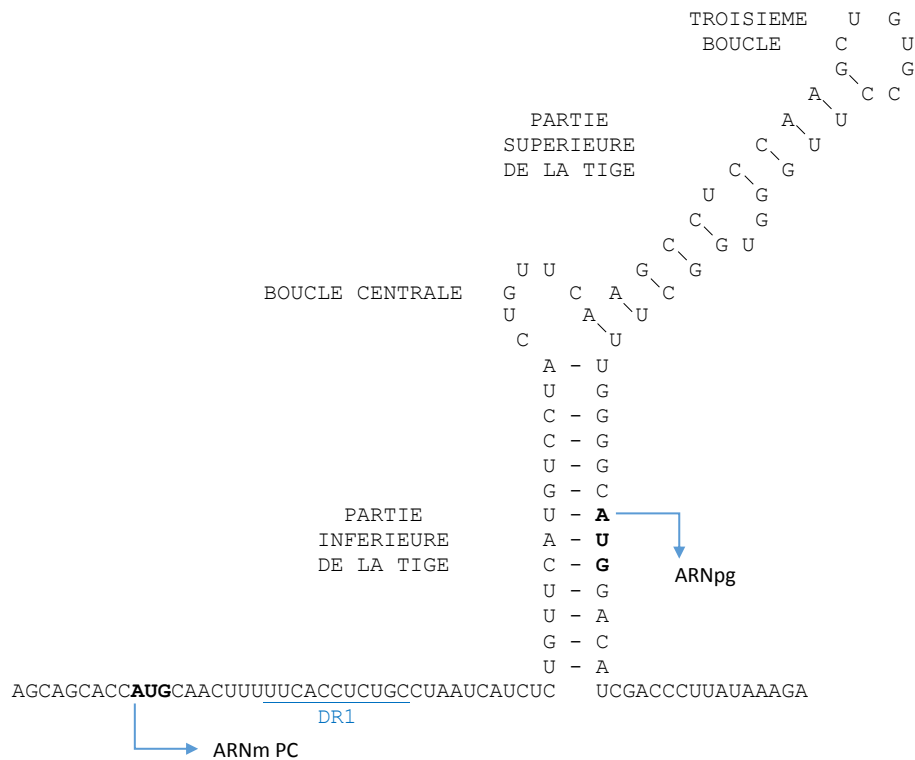


Figure 5 : Structure du signal d'encapsidation ϵ .

En gras, les codons d'initiation de la transcription : le premier codon initie la transcription de l'ARNm PC, le second celui de l'ARNpg. La séquence DR1 est soulignée. Le signal ϵ joue un rôle primordial lors des étapes d'encapsidation de l'ADN viral et d'initiation de la transcription inverse en permettant à la polymérase virale de se fixer à l'ARNpg.

Enfin, un signal de polyadénylation est également décrit en 3' du signal d'encapsidation, dans la région C. L'ensemble des ARN viraux sont polyadénylés au même endroit (Figure 4).

1.2.2. Les protéines virales

a) La polymérase

L'ADN polymérase est codée par la plus grande partie du génome, l'ORF P. Cette protéine a plusieurs activités et comporte 4 domaines protéiques (Figure 6).

La région N-terminale présente le domaine « protéine terminale ». Ce domaine a un rôle essentiel dans l'initiation de la répllication du génome viral [3]. En effet, c'est cette forme

protéique de 183 acides aminés (aa) qui est fixée de manière covalente à l'extrémité 5' du brin (-).

Les activités polymérasas sont assurées par le domaine « transcriptase inverse / ADN polymérase ». Cette protéine d'environ 165 aa permet la transcription de l'ARNpg en brin (-) et la synthèse du brin (+) à partir du brin (-).

Entre ces deux régions, un domaine « espaceur » de 227 aa est décrit. Ce domaine est fréquemment muté mais ne remet pas en question les fonctionnalités de la polymérase. Il en assure également la flexibilité qui va permettre aux domaines à activité enzymatique de fonctionner de façon optimale.

Enfin, la partie N-terminale de la région P code la fonction RNase H qui permet la digestion de l'ARNpg utilisé lors de la synthèse du brin (-) par transcription inverse.



Figure 6 : Structure de la région pol du VHB (d'après Kay, 2006 [18]).

Quatre domaines protéiques forment la région pol et lui confèrent ses différentes activités. La région espaceur n'a pas d'activité protéique. La protéine terminale est primordiale dans la fixation de la pol à l'ARNpg. Les régions RT/pol et RNase H regroupent les fonctions enzymatiques de la protéine.

b) La protéine HBc

La protéine HBc est issue de la transcription de la région C à partir du 2^{ème} codon d'initiation présent dans l'ORF PC/C. Cette protéine (185 aa) est traduite à partir de l'ARNpg sous le contrôle du PBC. Elle n'est pas sécrétée mais est constitutive de la capsid virale. Les molécules hélicoïdales d'HBc d'environ 22kDa s'assemblent en homodimères par un pont disulfure dans la partie N-terminale. Trois dimères s'associent alors pour former des hexamères qui s'assemblent et forment la capsid de symétrie icosaédrique (Figure 7).

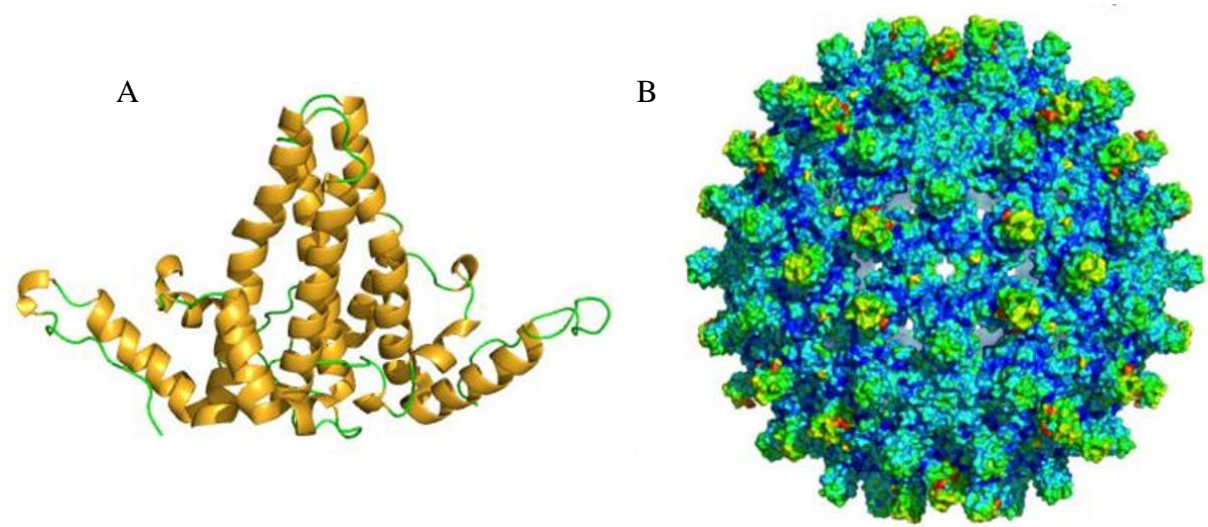


Figure 7 : Structures des complexes d'AgHBc (d'après Zlotnick *et al.* [20]).
 (A) Un dimère d'AgHBc. (B) Une capsid de symétrie $T=4$ principalement retrouvée chez les patients (environ 95% des virions), constituée de 120 dimères d'AgHBc. La capsid de symétrie $T=3$ est construite à partir de 90 dimères d'AgHBc.

La partie C terminale de la protéine est très basique ce qui lui permet d'interagir avec les acides nucléiques encapsidés. Plusieurs sites de phosphorylation sont également identifiés sur la protéine C, ainsi que des sites de localisation nucléaire ce qui permet d'orienter la migration de l'ADN viral dans la cellule lors de l'infection d'un hépatocyte. Hormis son implication majeure dans la formation de la capsid, la protéine C est impliquée dans bien d'autres fonctions du cycle viral. En effet, elle semble intervenir dans la régulation de la transcription, la destruction de l'ADN circulaire clos de manière covalente (ADNccc), la reverse transcription de l'ADN viral. Certaines études ont également étudié les interactions de la protéine C avec certaines protéines cellulaires [20].

c) La protéine HBe

Bien qu'issu de la même ORF PC/C que l'AgHBc, l'AgHBe, est codé directement par l'ARNm PC. La traduction de cet ARNm est médiée par le PBC et conduit à une pré-protéine précurseur de 25kDa. Cette pré-protéine comporte 29 aa supplémentaires par rapport à l'AgHBc. Le peptide signal en N-terminale permet de l'adresser vers le RE. La pré-protéine subit alors une maturation post-transcriptionnelle durant laquelle elle est clivée en N-terminale et en C-terminale pour donner naissance à la protéine HBe de 16kDa (Figure 8) [21].

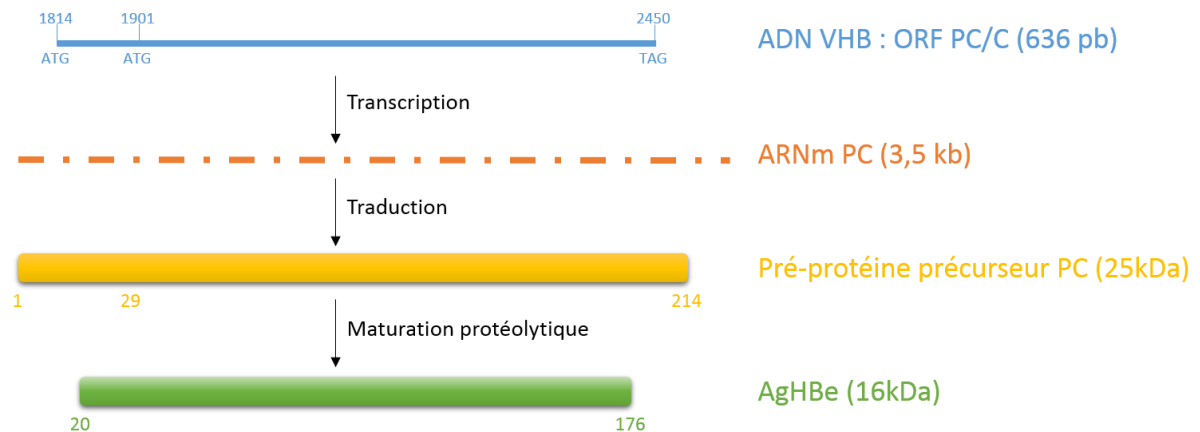


Figure 8 : Etapes de la synthèse de l'AgHBe.

L'ARNm PC est le plus long des ARN viraux transcrits. La maturation protéolytique a lieu dans le RE grâce au peptide signal en N-terminale (19 nucléotides) qui est clivé par la suite.

Cette protéine est soluble et fortement excrétée par les hépatocytes infectés lors de la phase de réplication virale active. Sa fonction reste encore mal définie, mais l'hypothèse prédominante serait que cette protéine, qui n'est pas constitutive des particules virales mais qui possède un fort potentiel immunogène, détourne le système immunitaire et favorise ainsi l'échappement viral. En effet, aucune donnée ne montre que cette protéine est indispensable au cycle viral. Cependant, la quantité d'AgHBe est clairement corrélée à la charge virale et sa présence semble liée à l'établissement de la persistance virale [22].

d) Les protéines d'enveloppe

Le génome du VHB permet la synthèse de 3 protéines de surface ou protéines d'enveloppe : la protéine majeure codée par le gène S et les protéines moyenne et large codées respectivement par les régions préS2/S et préS1/préS2/S (Figure 4). Ces 3 protéines forment l'enveloppe des particules virales infectieuses et non infectieuses. La partie C-terminale, c'est-à-dire la région S, est commune aux trois formes de protéine d'enveloppe. Cette région est responsable de l'enchâssement des protéines dans la membrane du RE. Ainsi, les trois molécules, protéines S, M et L, sont intégrées à la membrane par la même extrémité C-terminale (Figure 9).

La protéine S ou AgHBs, protéine de 24kDa, représente 85% des protéines de surface. Elle présente un site de glycosylation et sa synthèse est médiée par le promoteur S.

La protéine moyenne M (31kDa) comporte une extension en N-terminale qui sera présente dans la lumière du RE donc à la surface des particules virales. Son expression est également sous l'influence du promoteur S et elle possède un deuxième site de glycosylation par rapport à l'AgHBs.

La troisième protéine, L, 39kDa, est issue de son propre ARNm dont l'expression est médiée par le promoteur préS1. La protéine L est présente sous 2 formes. Dans la première, la partie N-terminale (préS1 particulièrement) est complètement orientée dans la lumière du RE et donc exprimée à la surface des particules virales. Cette disposition est un élément essentiel pour la reconnaissance des virions par les hépatocytes [23]. La seconde expose la partie N-terminale (régions préS1 et préS2) dans le cytosol et est indispensable pour la fixation de la capsid virale et l'assemblage des virions.

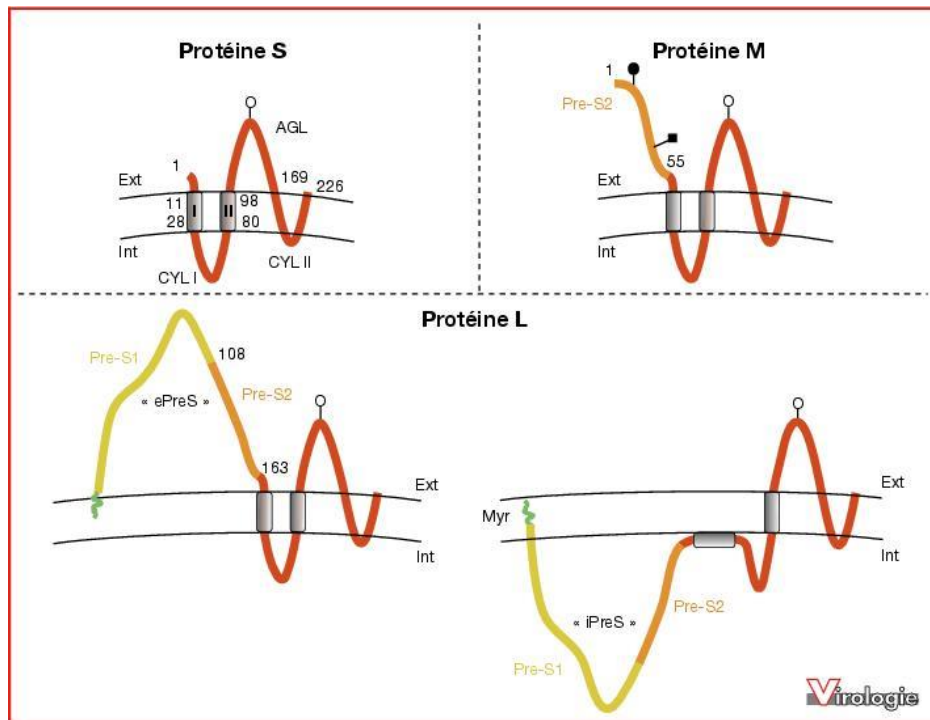


Figure 9 : Conformations des protéines de surface du VHB [23].

Cercles et carrés : sites de glycosylation. Int : Coté cytoplasmique de la membrane du RE et intérieur des particules virales. Ext : Lumière du RE et surface des particules virales. Myr : acide myristique. La protéine S est largement majoritaire. L'enchâssement dans la membrane du RE de la protéine L existe sous deux formes. La première conformation de la protéine L est indispensable à l'entrée des virus dans la cellule, alors que la deuxième permet de lier la capsid à l'enveloppe dans les particules virales.

Ces trois protéines portent le même déterminant antigénique. Les particules subvirales sont constituées des trois formes de protéines d'enveloppe en quantités différentes : la protéine majeure S est majoritaire par rapport à M et L [23].

e) La protéine HBx

La protéine X est codée par la région X sous l'influence du promoteur X. Le gène X est une région très conservée entre les génotypes, plus que le reste du génome. Cette petite protéine (17kDa) porte bien son nom, puisque son rôle reste encore aujourd'hui mal connu et controversé. De nombreuses fonctions virales, cellulaires, immunitaires et oncogènes lui sont attribuées, ce qui lui confère potentiellement un rôle important dans l'établissement de l'infection [24]. Notamment, l'impact de la protéine HBx avec la p53 cellulaire a été décrit

récemment : la protéine virale serait associée à une hyper phosphorylation de p53 qui entrainerait une modification de la régulation de la mort cellulaire gérée par la protéine cellulaire [25]. Egalement, la diminution de l'expression de la voie cellulaire TRIF induisant l'interféron (IFN) par la protéine HBx permettrait au virus d'échapper au système immunitaire et ainsi d'établir une infection chronique [26]. Cependant, cette protéine est absente chez le DHBV alors que l'infection chronique est possible chez le canard. Le rôle de cette protéine est aujourd'hui encore exploré, notamment son implication dans les processus oncogènes [24].

1.3. Cycle viral et physiopathologie

1.3.1. Cycle viral

Compte tenu de l'absence de modèles efficaces de culture du VHB, les premières et principales étapes du cycle viral ont été décrites par l'étude d'un modèle de culture de cellules hépatiques primaires infectées par le DHBV. Cependant, les virus aviaires comme le DHBV ne possèdent que 40% d'homologie avec le VHB et les différences dans leur cycle, leur structure, leur composition génétique sont donc nombreuses. De plus, l'acquisition, l'entretien et l'infection des hépatocytes primaires est relativement difficile et rend ces recherches plus que fastidieuses. Ainsi, une lignée cellulaire hépatique a été mise au point par une équipe française afin d'obtenir un nouveau modèle d'étude de l'infection par le VHB qui soit le plus fidèle possible : les HepaRG [27]. Au bout de quatre semaines de culture en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO), une différenciation est observée en deux types cellulaires : des cholangiocytes et des hépatocytes. Ces cellules expriment particulièrement les marqueurs spécifiques du foie (ARNm et protéines) en phases de différenciation. Ces cellules bipotentes sont permissives au VHB [28]. Leurs caractéristiques proches des hépatocytes primaires ont permis ces dernières années de mieux comprendre certaines étapes du cycle viral (Figure 10).

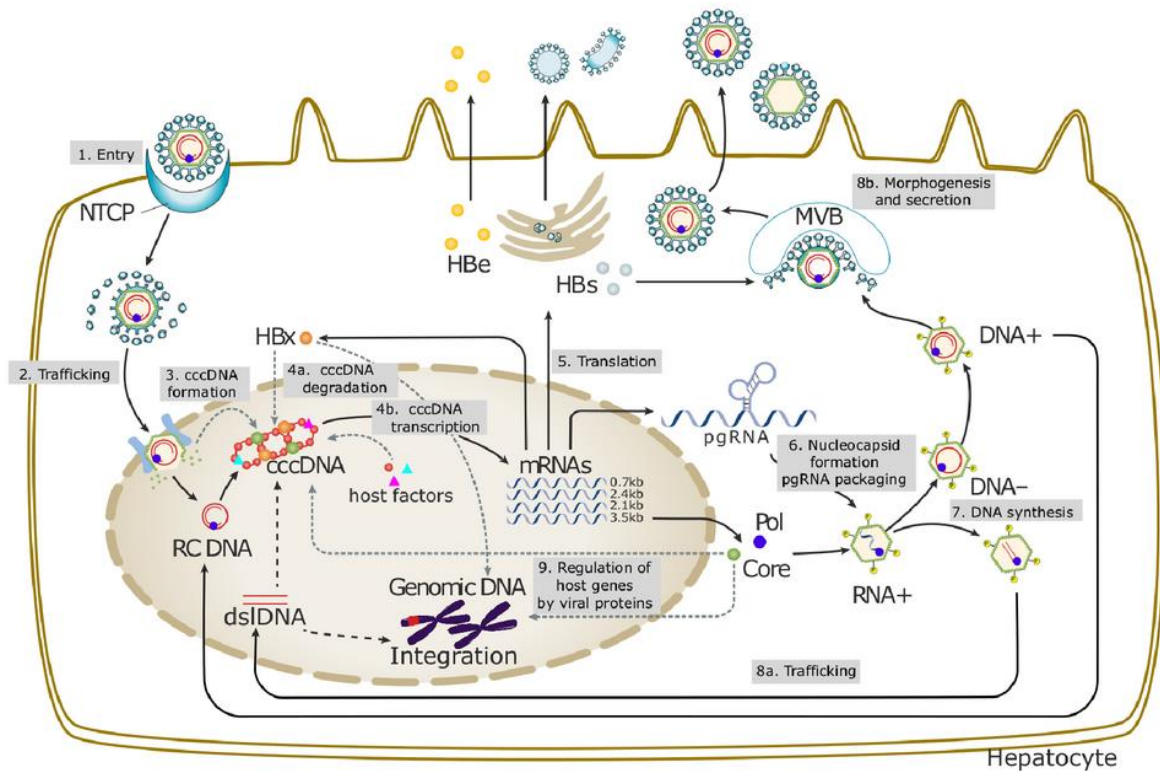


Figure 10 : Cycle viral du VHB [29].

(1) Le virus se fixe sur la cellule via un récepteur récemment identifié, le NTCP. (2) La capside virale est libérée dans le cytoplasme et migre vers le noyau. (3) L'ADN viral est converti en ADNccc qui sert de matrice pour la transcription (4). Les transcrits ARN viraux sont envoyés vers le cytoplasme où ils sont traduits en protéines virales (5) ou encapsidés avec la polymérase pour l'ARNpg (6). La capside contenant l'ARNpg est soit maturée via le RE pour devenir un virion relâché par la cellule (8b), soit orientée vers le noyau pour alimenter le stock d'ADNccc (8a). Parallèlement, certaines protéines virales sont sécrétées par la cellule : les AgHBe sous forme libre et les AgHBs sous forme de particules vides non infectieuses.

a) Reconnaissance et attachement de la particule virale

La première étape du cycle est l'attachement viral à la cellule cible. La forte spécificité d'hôte d'une part et le tropisme strict d'autre part seraient en partie liées à la protéine d'enveloppe L et le domaine préS1 qui la constitue [30]. En effet, cette région est sensiblement variable entre les différents virus aviaires et humains, et plusieurs études ont démontré que la modification de cette région altère la spécificité d'hôte du VHB [31]. Récemment, l'étape précoce d'attachement viral a été décrite plus précisément en montrant que le virus se lie à l'hépatocyte via les protéoglycanes héparanes sulfates (HSPG) exprimés

à la surface puis qu'il est reconnu spécifiquement par un récepteur. Ce dernier, le polypeptide co-transportant le sodium et le taurochlorate, autrement nommé NTCP, est impliqué dans le transport des sels biliaires. Le virus se fixe au NTCP via la région préS1, et plus particulièrement la région du Receptor Binding Site (RBS) située entre les aa 9 et 15 [32, 33]. Cependant, ces mêmes études font également l'expérience d'éteindre l'expression du NTCP dans des cellules permissives comme les HepaRG et n'observent qu'une réduction de l'infection et non pas une absence totale, ce qui suggère que ce récepteur n'est pas le seul intervenant dans la reconnaissance de la cellule et l'entrée du virus [34].

b) Internalisation de la particule virale

Concernant l'internalisation du virion dans la cellule hépatique, deux hypothèses sont avancées. Le premier mécanisme envisagé est une endocytose de la particule virale qui s'est attachée via les HSPG puis fixée au NTCP avec clivage de l'enveloppe dans l'endosome puis libération de la nucléocapside dans le cytoplasme [35]. Parallèlement, un deuxième mécanisme a été décrit proposant une fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire permettant la libération de la capsid dans le cytoplasme [36]. Le mécanisme le plus décrit et le plus étudié est actuellement l'endocytose de la particule virale, le peptide de fusion mis en évidence pourrait alors intervenir dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome avant la libération de la capsid [37]. Ces voies d'internalisation restent encore controversées et très étudiées notamment compte tenu de leur impact dans la mise au point de traitements efficaces [34, 38-40].

c) Transport vers le noyau

La capsid migre dans le cytoplasme vers le noyau au sein du réseau de microtubules cellulaires grâce aux signaux de localisation cellulaire de l'AgHBc puis le génome mature phosphorylé est libéré dans le noyau via l'interaction avec les complexes des pores

nucléaires. La molécule d'ADN est alors sous forme relâchée circulaire (ADNrc) et liée à la polymérase virale. Ces étapes de migration et d'entrée dans le noyau sont également peu décrites pour le VHB [41].

d) Constitution de l'ADNccc

Une fois dans le noyau, l'extrémité du brin (+) incomplet de l'ADNrc est pris en charge par une polymérase, mais son origine reste encore indéterminée : est-ce la polymérase virale liée de manière covalente ou est-ce une polymérase de l'hôte [3] ? Bien que son existence soit largement démontrée et acceptée, les étapes de la formation de l'ADNccc restent obscures. En effet, l'ADNrc doit être débarrassé de l'amorce ARN présente à l'extrémité 5' du brin (+), de la polymérase virale liée à l'extrémité 5' du brin (-) et des séquences répétées à cette même extrémité (DR1). Puis, les 2 brins doivent être liés pour former une molécule circulaire. Des topoisomérases cellulaires interviendraient alors pour compacter cette molécule à l'aide d'histones permettant ainsi de super-enrouler cet ADN. L'ADNccc sous forme super-enroulée est souvent appelé « mini-chromosome » car c'est lui qui porte l'information génétique virale et persiste dans le noyau des cellules infectées durant toute leur vie. D'une part, l'ADNccc est la matrice pour la synthèse des transcrits viraux, et d'autre part, la conformation de l'ADNccc lui confère une très grande stabilité dans le noyau. Ainsi, l'ADNccc est lié à la persistance du virus en conservant un stock relativement constant de 10 à 50 copies par cellule, et à la réactivation virale dans des contextes d'immunosuppression par exemple [42].

Lors de la constitution du pool d'ADNccc, certaines molécules d'ADN linéaire double brin, intermédiaires entre l'ADNrc et l'ADNccc, peuvent également être intégrées dans le génome de la cellule hôte. Cette étape représente une impasse dans le cycle viral puisque les séquences ne peuvent être transcrites en ARNpg, mais serait potentiellement impliquée dans les mécanismes d'oncogénèse en modifiant l'expression des gènes proches

du site d'intégration. Ce phénomène est peu fréquent (1 pour 100 000 cellules) et les sites d'intégration dans le génome de la cellule paraissent aléatoires. Les mécanismes reliant l'intégration de séquences virales et le développement de lésions hépatiques restent peu connus, mais plusieurs hypothèses sont avancées, comme l'apparition de mutation suite à l'insertion, l'expression de protéines virales oncogènes ou l'instabilité des chromosomes ayant intégré des séquences du VHB [43].

e) Transcription du génome viral

L'ARN polymérase cellulaire interagit alors avec l'ADNccc pour former les ARNpg et les ARNm nécessaires à la synthèse des protéines virales. Cette étape est régulée par des mécanismes épigénétiques cellulaires et par des protéines virales comme la protéine X probablement. Les ARN sont alors transportés dans le cytoplasme pour être traduits pour les ARNm et une partie des ARNpg et encapsidés pour le reste d'ARNpg [3]. Dans le cytoplasme, la polymérase virale se lie à l'ARNpg puis s'associe aux protéines C via le signal d'encapsidation pour former la nucléocapside virale [44].

f) Réplication du génome viral

L'ARNpg sert également de matrice pour la constitution du brin d'ADN (-) qui composera le génome des nouvelles particules virales. Au cours de la rétro-transcription, l'ARNpg est directement dégradé par la polymérase qui a une activité RNase H. Seule la répétition de la séquence DR1 sera conservée et utilisée comme amorce pour la synthèse du brin (+). Ainsi, de nouvelles capsides matures sont formées contenant un ADNrc dont la circularité est assurée par l'appariement des séquences répétées DR1 en 3' et 5' [44].

g) Synthèse des protéines virales et des virions

Dans le même temps, les ARNm sont traduits en protéines virales qui vont être soit sécrétées, soit servir à la formation des nouveaux virions.

La protéine C est traduite dans le cytoplasme à partir de l'ARNpg. Elle s'auto-assemble pour former la nucléocapside virale qui intégrera l'ARNpg. Celui-ci servira de matrice pour synthétiser l'ADNrc dans les nucléocapsides.

L'ARNm PC permet la synthèse de l'AgHBe qui est lui sécrété par la cellule infectée.

Les protéines d'enveloppe, traduites à partir des ARNm préS2/S et préS1/préS2/S, sont insérées dans la membrane du RE. Les nucléocapsides contenant l'ADNrc sont dirigées vers le RE et s'y attache via les domaines pré-S1 et pré-S2 de la protéine L exprimés du côté cytosolique. Le bourgeonnement de la membrane permet la libération de virions dans la lumière du RE. Les particules subvirales constituées uniquement de protéines d'enveloppes sont également issues du RE par bourgeonnement. Ce mécanisme est probablement mis en place pour éviter l'accumulation dans la cellule des protéines d'enveloppe produites en large excès.

h) Sécrétion des particules virales

Les particules virales sont transportées dans l'appareil de Golgi puis les virions sont libérés de la cellule vers le compartiment sanguin. Le mécanisme de sécrétion est lui aussi mal connu, mais a probablement lieu par exocytose.

Les nucléocapsides en excès sont recyclées vers le noyau pour augmenter le stock d'ADNccc dans le noyau, mais ce phénomène semble limité *in vitro* [45].

1.3.2. Epidémiologie du VHB

Le virus est transmis principalement par voies parentérale et sexuelle, mais on le retrouve également dans de nombreux liquides biologiques comme la salive, le lait maternel,

la sueur. Les sujets AgHBs positifs représentent le réservoir naturel du virus. C'est un virus très résistant dans le milieu extérieur. Les contaminations interhumaines directes sont fréquentes, qu'elles soient horizontales (sexuelles, parentérales) ou verticales (mère-enfant).

La chronicité de l'infection est définie par la persistance de l'AgHBs plus de 6 mois dans le sang du patient. Le risque de passage à la chronicité augmente avec la précocité de l'infection : le risque de passage à la chronicité est de 90% chez les nouveau-nés contaminés à la naissance *versus* 6% lorsque la contamination survient à l'âge adulte [46]. L'existence de symptômes cliniques lors d'une hépatite aiguë dépend également de l'âge de l'infection : l'infection est asymptomatique dans 75% des cas chez les adultes et dans 90% des cas chez les enfants de moins de 5 ans [47].

La prévalence du VHB est géographiquement variable, avec des zones de très fortes prévalences comme l'Asie du Sud-Est et l'Afrique subsaharienne, des régions de prévalence modérée (Europe de l'Est, Japon, Amérique du Sud) et d'autres avec une faible prévalence (Amérique du Nord et Europe de l'Ouest) (Figure 11). Dans les zones de forte prévalence, comme en Afrique, les taux de séropositivité AgHBs peuvent atteindre plus de 20% [48-50]. Dans ces pays, le VHB est un fort problème de santé publique, et ce malgré l'existence d'un vaccin efficace. Les campagnes de prévention, de vaccination des enfants et de traitement y sont très importantes mais encore insuffisantes.

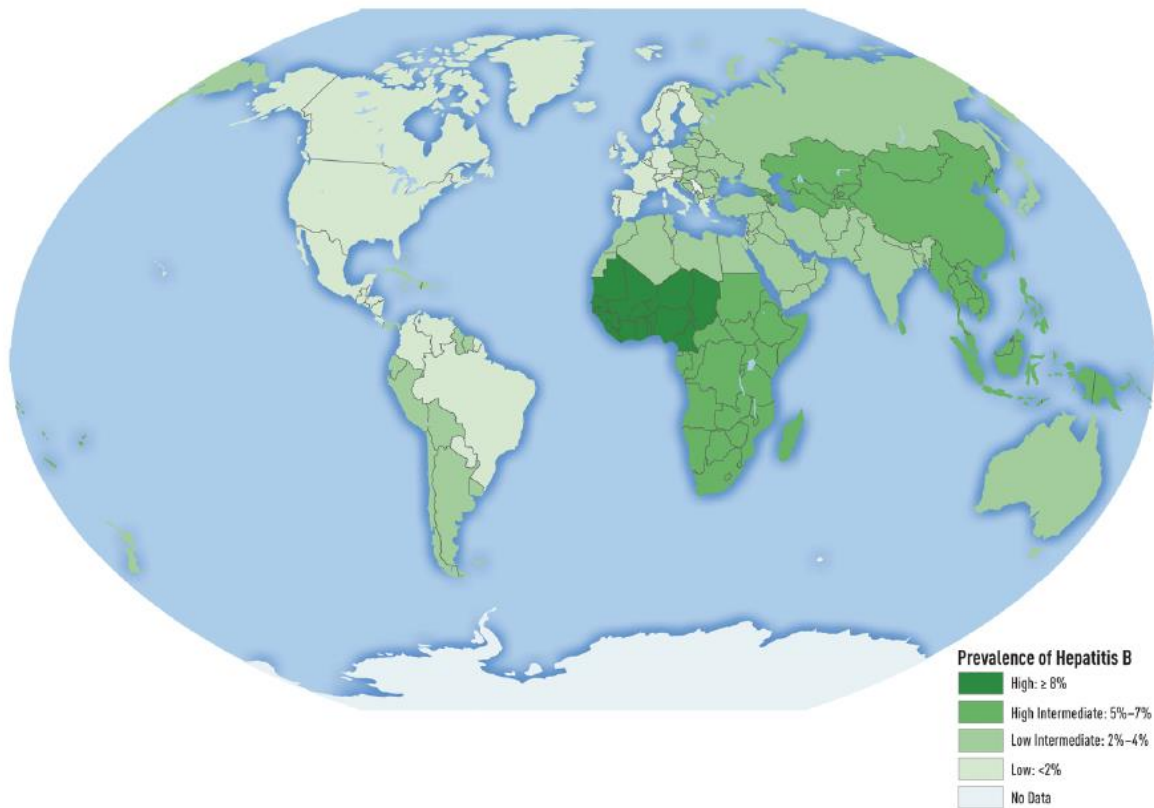


Figure 11 : Carte de prévalence mondiale de l'Hépatite B [51].

Des zones de fortes prévalences (vert très foncé) contrastent avec des zones très faiblement endémiques (vert très clair). La majorité des pays se situent dans des zones de prévalence intermédiaire (vert foncé à clair). Les données de prévalence datent de 2005.

1.3.3. Physiopathologie

a) Histoire naturelle

Le VHB n'est pas un virus cytopathogène. Les lésions hépatiques sont provoquées par le système immunitaire qui, en réponse à l'agression virale, détruit les cellules infectées. C'est lorsque le système immunitaire s'emballe que la cytolysé hépatique est amplifiée et que les lésions deviennent sévères. Lorsque le patient est contaminé par le VHB à l'âge adulte, l'évolution de l'infection est résolutive dans environ 94% des cas. Dans environ 6% des cas, la maladie évolue vers une infection chronique avec une persistance virale chez l'hôte et l'établissement d'un équilibre entre le virus et le système immunitaire. Cette phase, auparavant nommée « phase de tolérance immune », est aujourd'hui appelée « infection

chronique B AgHBe positive » selon les recommandations de l'Association Européenne pour l'Etude du Foie (EASL) [52]. Rarement (moins de 1% des cas), on observe une hépatite fulminante qui mène au décès dans 80% des cas en l'absence de transplantation hépatique (Figure 12).

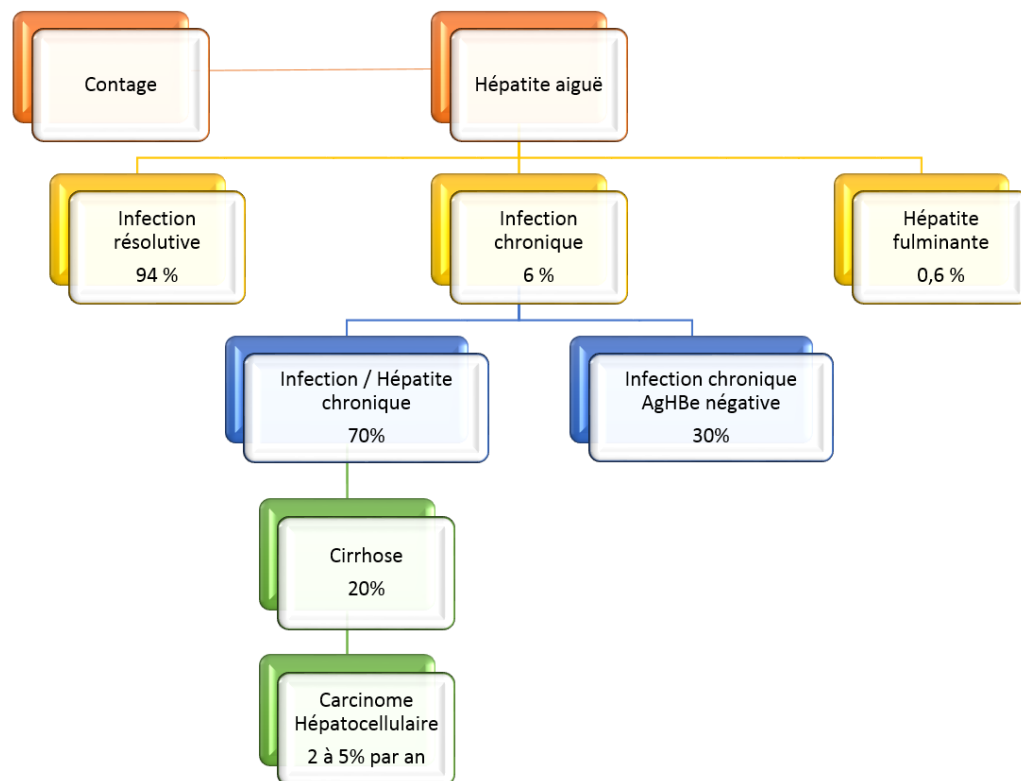


Figure 12 : Histoire naturelle de l'infection par le VHB à l'âge adulte.

L'infection résolutive est caractérisée par la disparition de l'AgHBs et l'apparition des Ac anti-HBc et anti-HBs. L'infection chronique est définie par la persistance de l'AgHBs plus de 6 mois dans le sang du patient. La cirrhose et le carcinome hépatocellulaire sont les conséquences à long terme d'une infection chronique non maîtrisée. L'hépatite fulminante est rare mais l'issue est fatale dans 80% des cas. L'histoire naturelle de l'infection par le VHB est différente selon le moment de l'infection (naissance, petite enfance ou âge adulte) [46, 53].

b) Hépatite aiguë

Chez l'adulte, l'infection aiguë étant le plus souvent asymptomatique, elle passe inaperçue et le diagnostic n'est posé qu'ensuite, au cours de l'infection chronique ou à l'occasion de la découverte d'une autre pathologie. Après une période d'incubation entre un et trois mois, on peut observer une phase pré-ictérique caractérisée par des symptômes non spécifiques : nausées, asthénie, fièvre, arthralgies et troubles digestifs. Un ictère plus ou moins intense peut ensuite être observé et orientera le diagnostic vers une hépatite.

Le marqueur biologique qui apparaît le premier est l'AgHBs, qui disparaît dans le cas d'une infection résolutive en moins de 6 mois. L'ADN viral et l'AgHBe sont également transitoirement détectables. Puis les Ac anti-HBc, IgM puis IgG, apparaissent et sont conservés par le système immunitaire du patient. Ils témoignent du contact avec le virus et restent stables au cours de la vie. Enfin, l'infection résolutive est marquée par la séroconversion HBs, avec l'apparition des Ac anti-HBs. (Figure 13). Les symptômes cliniques sont liés à l'augmentation du taux d'AgHBs.

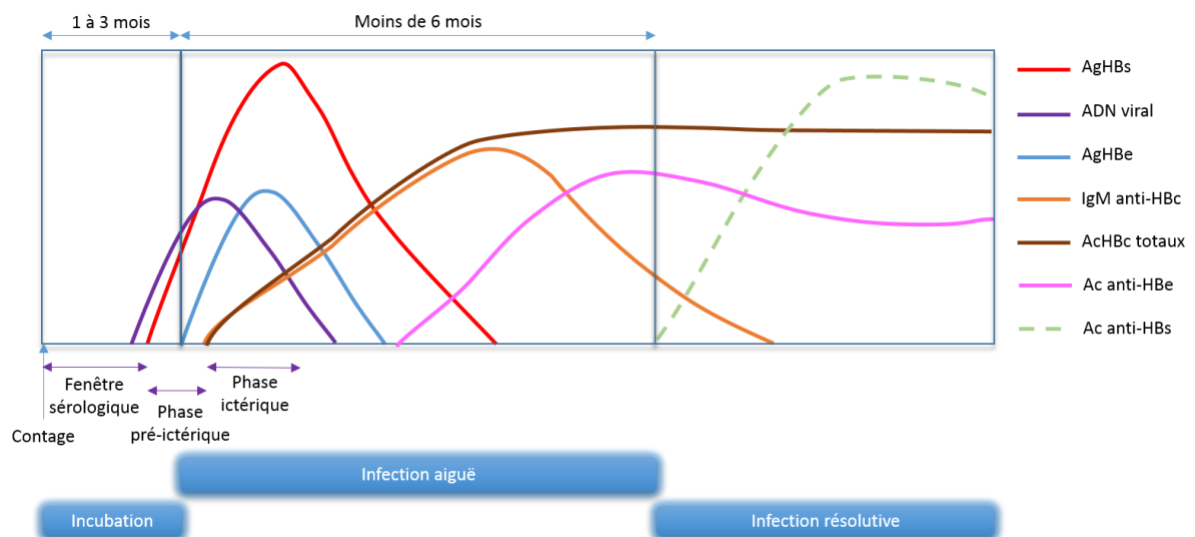


Figure 13 : Cinétique des marqueurs du VHB au cours de l'infection aiguë.

Des symptômes cliniques peuvent apparaître au cours de l'infection aiguë, comme une augmentation des transaminases qui signe une cytolyse hépatique liée à la réaction du système immunitaire envers le virus. La fenêtre sérologique correspond au délai après le contage pendant lequel aucun marqueur sérologique n'est détectable.

c) Hépatite chronique

L'hépatite chronique est définie par la persistance de l'AgHBs plus de six mois dans le sang du patient. L'installation du virus chez l'hôte suite à un échappement au système immunitaire est peu fréquente chez l'adulte, alors que chez l'enfant, elle survient dans la quasi-totalité des cas, notamment en lien avec l'immaturation du système immunitaire. L'infection chronique est le plus souvent asymptomatique et sa découverte est fortuite ou tardive. En effet, l'évolution naturelle est la cytolysé hépatique sévère avec apparition d'une cirrhose chez 20% des patients infectés chroniquement. L'incidence du carcinome hépatocellulaire (CHC) ou cancer du foie, est de 2 à 5% par an en l'absence de traitement chez les patients atteints de cirrhose (Figure 12).

La cinétique des marqueurs biologiques répond à une succession de plusieurs phases reliées à l'équilibre existant entre le système immunitaire de l'hôte et la réplication virale. Si un élément vient à déséquilibrer cette relation, alors l'infection évolue vers des lésions hépatiques plus sévères. L'histoire naturelle de l'infection chronique se découpe en quatre phases principales. Les cinquième et sixième phases sont en marge de l'histoire naturelle de la maladie et interviennent dans des cas particuliers (Tableau 1).

Tableau 1 : Histoire naturelle et classification des phases de l'infection par le VHB.

L'ancienne terminologie a été remplacée lors de la conférence de l'EASL en 2017 [52]. Les phases de réactivation et d'infection occulte sont peu fréquentes et n'apparaissent que dans des cas particuliers détaillés plus loin dans le manuscrit. Les niveaux de charge virale peuvent être variables d'un patient à un autre.

	AgHBe positive		AgHBe négative		Réactivation	Infection occulte
	Infection chronique	Hépatite chronique	Infection chronique	Hépatite chronique		
AgHBs	+++	++/+++	+	++	+	-
AcHBs	-	-	-	-	+/-	+
AgHBe	+	+	-	-	-	-
AcHBe	-	-	+	+	+	+
ADN VHB	+++	++	+/-	+	+	+
Transaminases	Normales	Élevées	Normales	Élevées	Élevées	Normales
Lésions hépatiques	Aucune	Modérées à sévères	-	Modérées à sévères	Modérées à sévères	Cirrhose
Ancienne terminologie	Immuno tolérance	Immuno réactive	Portage inactif	Hépatite chronique		

Lors de l'infection chronique AgHBe positive (anciennement phase d'immuno-tolérance), les marqueurs de cytololyse (transaminases) restent normaux ou faiblement augmentés. Pendant cette phase, le virus se multiplie rapidement et abondamment : l'AgHBe et l'ADN viral peuvent être détectés en grande quantité dans le sérum du patient.

La phase suivante est une phase d'immunité active dite d'hépatite chronique AgHBe positive (anciennement phase de clairance immune) au cours de laquelle la réponse immunitaire adaptative s'installe et entraîne une destruction massive des hépatocytes infectés. Les marqueurs viraux directs (AgHBe et ADN viral) diminuent progressivement et les transaminases augmentent, marquant la cytololyse hépatique. C'est pendant cette phase que l'on peut observer une séroconversion HBe avec apparition des anticorps et disparition de l'antigène, indépendante de la présence ou non de mutants PC que nous détaillerons plus loin dans le manuscrit. Ensuite, deux évolutions sont possibles : une infection chronique AgHBe négative ou une hépatite chronique AgHBe négative.

Pendant la phase d'infection chronique AgHBe négative (anciennement phase de portage inactif) s'établit un équilibre entre le système immunitaire et la réplication virale qui est contrôlée. Les marqueurs directs dont l'AgHBe sont alors faiblement exprimés, limitant ainsi la lyse des hépatocytes et permettant une normalisation du taux des transaminases.

Si l'équilibre entre le système immunitaire et la réplication virale est compromis, une hépatite chronique AgHBe négative (anciennement hépatite chronique) peut s'installer de façon précoce ou tardive. L'hépatite chronique est caractérisée par l'apparition des Ac anti-HBe et des transaminases élevées signant une atteinte hépatique modérée à sévère. Dans certains cas, une séroconversion HBs spontanée peut être observée et signe alors une infection résolutive, mais l'ADNccc reste présent dans les cellules.

Cette persistance virale explique le risque de réactivation à partir de l'ADNccc dans certaines circonstances cliniques comme l'immunodépression. Dans cette phase de réactivation, on observe un rebond de l'ADN viral sérique, une élévation des transaminases. Une nouvelle séroconversion HBe est possible si le virus qui émerge n'est pas un mutant PC.

La dernière des six phases décrites est l'infection occulte. Celle-ci correspond à une perte de l'AgHBs et un ADN faiblement répliatif. Les complications histologiques sont plutôt peu sévères, et un contexte d'immunodépression favoriserait également l'évolution de l'infection vers cette sixième phase [54].

1.4. Traitements et vaccin

1.4.1. Traitement préventif : le vaccin

Le premier vaccin préventif contre le VHB mis au point en 1976 par Philippe Maupas était d'origine plasmatisque, c'est-à-dire isolé à partir de plasmas de patients séropositifs pour le VHB [4]. De ces plasmas ont été isolées des fractions d'AgHBs très immunogène. Grâce à ces antigènes, la réponse immunitaire du patient est stimulée et synthétise des anticorps neutralisants qui le protégeront lors d'un contact ultérieur avec le virus. Sa commercialisation en France par les laboratoires Pasteur Mérieux intervient en 1981. Quelques années plus tard, en 1989, un vaccin construit par génie génétique a été mis sur le marché pour remplacer les anciens vaccins. Les protéines S recombinantes qu'il contient ont été obtenues par insertion du gène dans des levures (ENGERIX B®, GSK ; HBVaxPro®, MSD) ou des cellules ovariennes de hamster (GENHEVAC B Pasteur®, Pasteur Mérieux). Ainsi, seule une fraction du virus est nécessaire pour développer une immunité protectrice chez le patient. L'efficacité de ces vaccins, démontrée par un taux d'Ac anti-HBs supérieur à 10UI/ml (Unités Internationales), est d'environ 95% pour 3 ou 4 doses administrées selon le vaccin [55]. Il existe des patients non répondeurs à la vaccination (moins de 5%) dont les facteurs de risques seraient le sexe masculin, l'âge supérieur à 40 ans, le tabagisme, l'immunodépression et certains groupes HLA (Human Leukocyte Antigen) [56]. La vaccination est donc un véritable moyen de maîtrise de l'infection par le VHB.

En 1991, l'OMS a lancé une campagne mondiale d'éradication du VHB en annonçant un programme élargi de vaccination, mis en place dans beaucoup de pays et ayant montré une excellente efficacité [5-7]. Seule la France a interrompu ce programme en 1998 contre l'avis de l'OMS suite à une polémique installée dans les médias sur la relation soupçonnée entre vaccination anti-VHB et développement d'une sclérose en plaque [57]. Aucune étude

scientifique n'a montré de relation entre le vaccin anti-VHB et les maladies démyélinisantes ou auto-immunes. Le programme n'a toujours pas repris, mais, après une nette diminution du nombre de nourrissons vaccinés jusqu'en 2007, on observe depuis 2008 une augmentation de la couverture vaccinale avec 81,5% des nourrissons vaccinés. Cette nette amélioration chez le nourrisson est probablement liée au remboursement depuis 2008 du vaccin hexavalent qui comprend la valence VHB. En revanche, la couverture vaccinale chez l'adolescent souffre du creux vaccinal entre 1998 et 2007 et reste inférieure à 50% [58]. Dans ce contexte d'amélioration de santé publique et d'absence de preuve concernant l'existence de liens entre vaccination et affection démyélinisante, l'OMS recommande de vacciner les nourrissons le plus tôt possible et les adultes des populations à risque suivantes : personnes issues de zones de forte endémie, professionnels de santé, personnes vivant en milieu carcéral, patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou le virus de l'hépatite C (VHC), usagers de drogues par voie intraveineuse, personnes ayant des comportements sexuels à risque.

1.4.2. Traitements curatifs

Deux types de molécules sont actuellement utilisés : les analogues nucléosidiques et nucléotidiques qui ciblent le virus, et les traitements immuno-modulateurs qui régulent la réponse immunitaire. L'objectif d'un traitement est d'obtenir un ADN viral indétectable et de manière optimale une perte de l'AgHBs. Lors de l'infection par le VHB, la clairance de l'AgHBs et la séroconversion Ac anti-HBs sont nécessaires pour considérer l'infection comme résolue. Cette séroconversion est rarement observée, et les molécules actuelles ne permettent pas d'éliminer l'ADNccc des cellules. Ainsi, dans le contexte de l'hépatite chronique B, le but du traitement est d'améliorer la qualité de vie du patient et de limiter la progression des atteintes hépatiques. Cela se traduit par un contrôle de la réplication virale ou contrôle virologique c'est-à-dire une charge virale inférieure à 3 log UI/ml, une

normalisation des transaminases et une stabilisation ou régression des lésions hépatiques. L'autre choix thérapeutique est le traitement par IFN pégylé, qui présente les avantages d'une durée limitée dans le temps (48 semaines) et de l'absence de risque de résistance. En revanche, ce traitement est moins bien toléré par rapport aux analogues et nécessite des injections hebdomadaires, ce qui peut impacter la qualité de vie des patients.

Le suivi de l'efficacité du traitement est réalisé par la mesure de la charge virale plasmatique. La quantification de l'AgHBs peut également être utilisée dans le suivi du patient traité puisque plusieurs études montrent la corrélation entre sa quantification et le niveau de charge virale [59, 60]. C'est également un marqueur prédictif de réponse à l'IFN : la baisse du titre d'AgHBs en dessous de 1 500UI/ml après douze semaines de traitement est prédictive d'une perte de l'AgHBe et d'une charge virale inférieure à 2 000UI/ml dans 45% des cas. Inversement, l'absence de diminution du titre (génotypes A et D) ou un taux supérieur à 20 000UI/ml (génotypes B et C) est associée à une faible probabilité de réponse virologique [61].

1.5. Variabilité

Classiquement, la variabilité des virus à ADN est inférieure à celle des virus à ARN. Cependant, pour le VHB et l'ensemble des *Hepadnavirus*, on observe une variabilité génétique particulièrement élevée qui peut s'expliquer par trois mécanismes principaux.

- Reverse transcription

Au cours du cycle viral, le génome du VHB passe par un intermédiaire ARN comme matrice pour l'ADN génomique qui est encapsidé pour la formation de nouveaux virions. L'ADN polymérase ARN dépendante virale utilisée à cette étape est dépourvue d'activité exonucléasique 3'-5' qui lui permettrait de corriger les mésappariements de nucléotides. Ainsi, un fort taux de mutations est associé à cette étape du cycle viral. Le taux d'erreur est

estimé à 10^{-5} substitutions/base/cycle [62]. Même si ce taux est similaire à celui observé chez certains virus à ARN, il est 10 000 fois plus élevé que chez les autres génomes ADN [63].

- Réplication virale élevée

Par ailleurs, on observe une forte réplication virale pour le VHB, avec 10^{12} virions produits par jour lors de l'infection chronique, ce qui multiplie d'autant les possibilités de mutations aléatoires [62].

- Persistance virale

L'autre particularité du cycle viral qui influe sur cette variabilité importante est la persistance cellulaire de l'ADNccc dont le stock est alimenté en continu par le recyclage des nucléocapsides qui ne sont pas excrétées [64].

Ces trois mécanismes associés font du VHB un des virus les plus variables : statistiquement, chaque nucléotide du génome peut subir une mutation chaque jour. Cependant, la plupart de ces variants sont défectifs et sont éliminés. D'autres présentent des mutations silencieuses sans conséquence sur la fonction ou la structure des protéines virales. Enfin, considérant la particularité du génome du VHB qui comporte quatre cadres de lectures chevauchants, une mutation en un point peut affecter plusieurs gènes alors que le fitness de la particule virale doit être conservé [64]. On parle de quasi-espèces virales lorsque la souche sauvage cohabite chez le sujet infecté avec des variants minoritaires qui pourraient émerger sous une pression de sélection [63]. On distingue deux types de variabilité chez ce virus : la variabilité génotypique qui correspond à l'évolution naturelle des *Hepadnavirus* au cours du temps et la variabilité phénotypique qui correspond à l'émergence de variants mieux adaptés à la pression de sélection appliquée au virus.

1.5.1. Variabilité génotypique

L'évolution des virus au cours du temps, selon les paramètres décrits plus hauts, conduit à l'existence de sérotypes ou de génotypes. La classification en sérotypes caractérisés par le polymorphisme de l'AgHBs et définis en déterminants majeurs et mineurs est moins utilisée aujourd'hui. Elle est remplacée par la classification en génotypes qui repose sur le séquençage complet du génome viral ou de la région S.

a) Caractéristiques génomiques

Deux génotypes sont définis par une divergence de plus de 8% entre les séquences complètes, et les sous-types diffèrent au minimum de 4% [65, 66]. Concernant la caractérisation des génotypes, on parle également de clustering en analyse phylogénétique [66]. Actuellement, selon l'homologie des séquences et les clusters phylogénétiques, huit génotypes identifiés de A à H sont officiellement recensés (Figure 14).

Deux autres génotypes I et J ont été récemment décrits mais non intégrés à ce jour dans la classification taxonomique publiée par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Cependant, selon les dernières recommandations de l'EASL, le génotype I fait partie des neuf génotypes décrits pour le VHB [52]. Pour les génotypes A, B, C, D et F, plusieurs sous-types sont décrits. Le génotype C est celui qui présente le plus de sous-types et serait donc le génotype le plus ancien ayant eu plus de temps pour se diversifier [67].

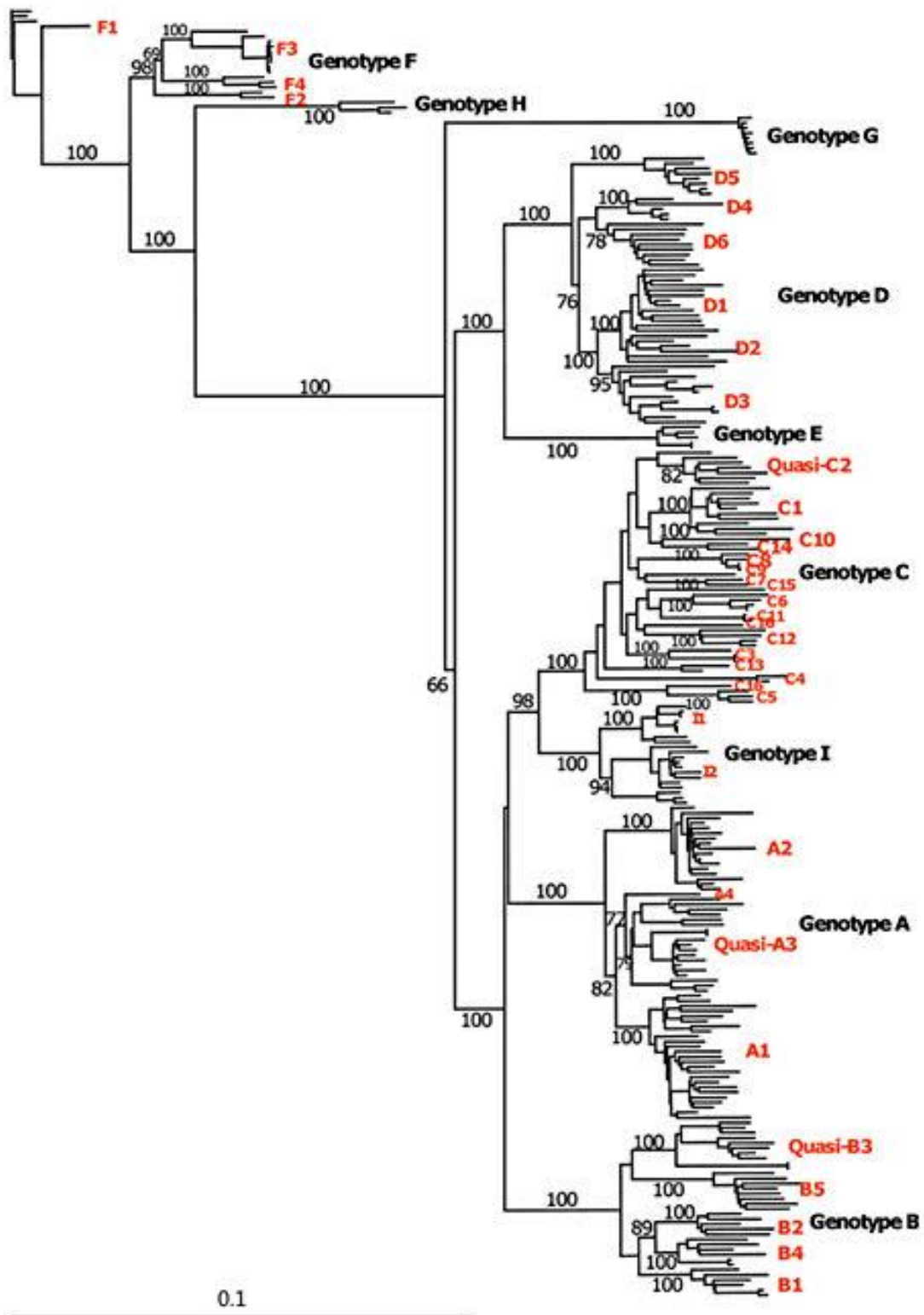


Figure 14 : Arbre phylogénétique représentant les clusters génotypiques du VHB [67].
 Cet arbre a été obtenu à partir de 250 séquences complètes de génomes VHB disponibles sur Genbank, alignées et analysées selon la méthode de Neighbor-Joining en appliquant un bootstrap de 1000 itérations. Les chiffres aux jonctions sont les pourcentages d'occurrences du bootstrap. En rouge sont notifiés les sous types.

La taille totale du génome viral est également différente selon les génotypes, entre 3182 et 3248 nucléotides (

Tableau 2). Le génotype G a notamment 36 nucléotides supplémentaires à l'extrémité N-terminale de la région C : la taille de l'AgHBc est donc augmentée de 12 aa [63]. Au contraire, le génotype D présente 33 nucléotides de moins à l'extrémité C-terminale de la région préS1, ce qui affecte également la région Pol plus courte de 11 aa.

Tableau 2 : Caractéristiques des génotypes du VHB (adapté d'après Kay et Zoulim [64]).

(*) Absence de classification officielle selon l'ITCV. (§) Les numéros Genbank sont donnés à titre indicatif, plusieurs séquences sont répertoriées pour chaque génotype dans la base de données Genbank. Les sérotypes mentionnés sont les sérotypes majoritaires retrouvés pour chaque génotype.

Génotype	Sous types existants	Sérotype	Taille du génome complet (nt)	Taille des protéines (aa)			Exemple de numéro d'accèsion Genbank [§]
				Pol	C	PreS1	
A	A1-A4	adw2	3221	845	185	119	AM282986.1
B	B1-B5	adw2, ayw1	3215	843	183	119	AB981583.1
C	C1-C16	adrq+	3215	843	183	119	AY040627.1
D	D1-D7	ayw2, ayw3	3182	832	183	108	AJ344117.1
E	-	ayw4	3212	842	183	118	HE974384.1
F	F1-F4	adw4	3215	843	183	119	HE974369.1
G	-	adw2	3248	842	195	118	AB625343.1
H	-	adw4	3215	843	183	119	AB275308.1
I*	I1-I2	adw	3215	843	184	120	AB231908.1
J*	-	adw	3182	832	183	108	AB486012.1

Il est également possible et même fréquent d'observer des recombinaisons intra et inter génotypes. Ce phénomène s'explique par la possibilité pour un sujet d'être co-infecté par deux génotypes différents qui cohabiteraient chez l'hôte. Cette cohabitation est favorable à un génotype qui est majoritairement détecté, alors que le second peut émerger suite à des pressions de sélection [68]. Les mécanismes de recombinaisons ne sont pas clairement

détaillés, mais au cours du cycle viral, plusieurs étapes peuvent être le siège d'évènements recombinants. La première hypothèse serait une recombinaison ARN-ARN durant l'encapsidation de l'ARNpg. Mais la plus plausible serait l'existence d'ADNccc de deux (ou plus) génotypes différents dans le noyau de la cellule où de tels évènements sont largement décrits. Des points de recombinaison ont été identifiés dans les régions C et S [67, 69]. De nombreux cas de recombinaison ont été décrits, notamment entre les génotypes A et C, B et C, C et D [70]. Les deux nouveaux génotypes I et J seraient également des virus recombinants. Le génotype I a été décrit chez trois patients et il s'apparenterait à un recombinant de trois souches A, C et G [71]. Le génotype J serait un recombinant du génotype humain C et du virus de l'hépatite B du gibbon [69]. Bien qu'une seule souche ait été mise en évidence, l'analyse phylogénétique suggère un passage de barrière d'espèce. Ces recombinaisons sont donc très importantes dans l'évolution du VHB au cours du temps.

b) Répartition géographique

Les génotypes et sous-types présentent une répartition géographique mondiale (Figure 15). En Europe, les génotypes A et D sont les plus prévalents ; en Asie, ce sont les génotypes B et C qui sont fréquemment rencontrés ; en Afrique, le génotype E est prédominant, alors que le génotype F est plutôt prévalent en Amérique du Sud [66]. Le génotype G est décrit principalement en France et aux Etats-Unis mais est faiblement prévalent [70]. Le génotype H est quant à lui décrit en Amérique centrale et Sud [72]. Le génotype I est décrit en Asie (Vietnam, Laos, Inde) et le génotype J a été identifié chez un patient ayant voyagé à Bornéo [71, 73].

La répartition géographique des virus est actuellement en bouleversement du fait des mouvements de populations. En effet, en France, on observe une nette augmentation de la prévalence du génotype E due au flux d'immigration du continent africain [74, 75]. Aux

Etats-Unis, véritable melting-pot de population, on observe d'ailleurs des prévalences quasiment similaires entre les génotypes A, B, C et D [76]. Le génotype D est le plus répandu, ce qui explique qu'il est également le plus divergent entre les différents sous-types. En effet, les mouvements de populations influencent énormément la variabilité virale et contribuent à accentuer le brassage génétique en favorisant les recombinaisons et les mutations. Ces deux phénomènes dépendent alors de facteurs viraux, mais aussi environnementaux ou hôte dépendants (facteur ethnique notamment).

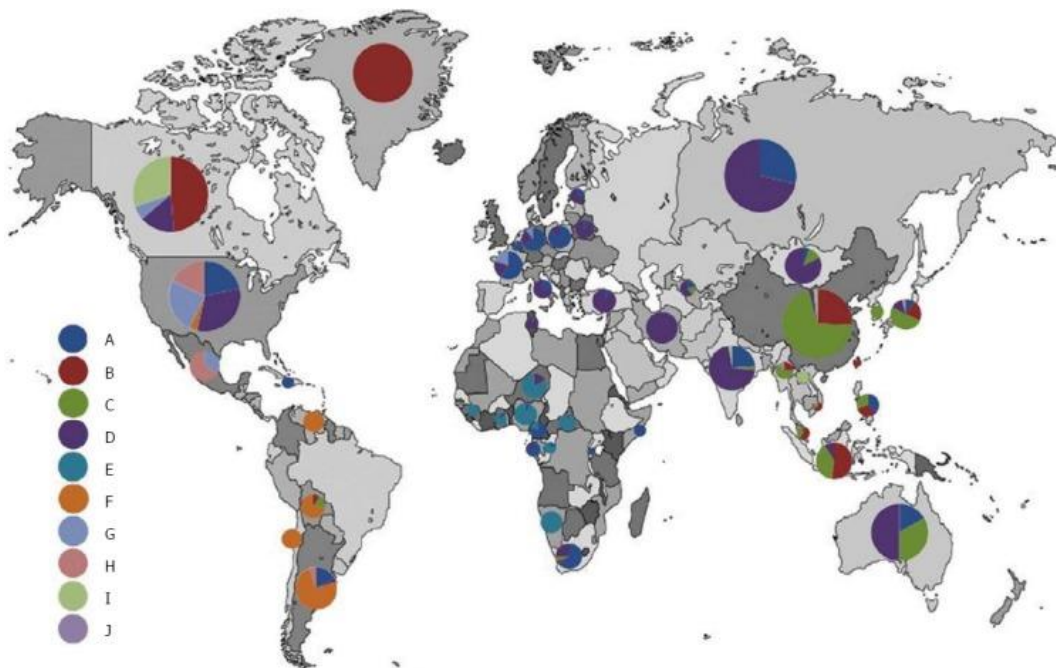


Figure 15 : Répartition géographique des génotypes du VHB [72].

Pour construire cette carte, 3179 séquences complètes du VHB ont été étudiées venant de 46 régions géographiques. Les différences avec les données de la littérature sont dues à l'utilisation exclusive de génomes complets qui ne sont pas toujours disponibles. La taille des cercles n'est pas proportionnelle à la prévalence du VHB.

c) Impact clinique

De nombreuses études ont porté sur l'implication des génotypes dans la sévérité de la maladie hépatique. Les résultats restent controversés [77]. Dans les études asiatiques, où les génotypes B et C sont très largement majoritaires, il apparaît que l'incidence du CHC est plus importante pour les patients infectés par un génotype C. Pour ce génotype, il est

également largement démontré que la séroconversion HBe est moins fréquente et plus tardive au cours de l'infection par rapport aux génotypes A, B, D et F [67]. Le génotype C est alors décrit comme le plus virulent, présentant des charges virales plus élevées et des séroconversions HBe et HBs plus tardives [78]. Ces deux phénomènes facilitent l'aggravation de la maladie hépatique. Dans une étude espagnole, il a été montré que les génotypes A et B présentaient un taux supérieur de clairance de l'AgHBs par rapport aux génotypes C et D, mais pas de différence concernant la séroconversion HBe. Dans les études européennes où il existe une codominance des génotypes D et A, le génotype D apparaît plus pathogène. En effet, il serait associé à un plus mauvais pronostic histologique, mais également à des séroconversions HBs et HBe plus rares et plus tardives respectivement. L'incidence du CHC est également supérieure à celle retrouvée chez les patients infectés par un génotype A. Concernant le génotype E, les données sont contradictoires : il a été montré que la charge virale des patients et le taux de positivité AgHBe étaient supérieurs à ceux trouvés chez les patients infectés par le génotype D alors qu'il est fortement prévalent chez des donneurs de sang qui représentent potentiellement une population de porteurs inactifs de l'infection. Au Mexique, il a été montré que le génotype H était plus fréquemment décrit dans les infections occultes pour lesquelles l'incidence du CHC est faible, ce qui pourrait dénoter une plus faible virulence de ce génotype. En Argentine, le génotype F est plus fréquemment retrouvé dans les hépatites aiguës [70]. Malgré le nombre d'études menées dans quasiment toutes les régions du globe, elles sont confrontées à la répartition géographique très différente des génotypes et il existe donc un biais dans la composition des cohortes. D'une manière générale, il est difficile de lier le génotype du VHB avec la sévérité des lésions hépatiques tant les facteurs influents sont nombreux et variés (hôte, environnement...).

1.5.2. Variabilité phénotypique

Comme expliqué précédemment, chez un même individu, la population virale circulante est composée de différentes souches sauvages et mutées sur différentes positions du génome : on parle de quasi-espèces virales. Ces variants sont génétiquement très proches avec une homologie de séquences supérieure à 96%. Ils sont moins stables dans le temps que les variants génotypiques car leur émergence n'est possible qu'en présence d'une pression de sélection qui peut être immunologique, immunitaire ou médicamenteuse. En effet, lorsqu'une pression de sélection s'exerce, la souche virale mutée la plus adaptée deviendra majoritaire car elle présente un avantage sélectif par rapport à la souche sauvage. Inversement, en l'absence de pression de sélection, c'est la souche sauvage qui sera favorisée car elle présente une capacité répliquative plus efficace que celle du ou des variants phénotypiques présents.

Compte tenu de l'organisation génomique du VHB et des cadres de lecture chevauchants, toute mutation intervenant dans une région précise du génome peut impacter potentiellement les autres régions génomiques et ainsi, affecter d'autres étapes du cycle viral comme l'assemblage, la stabilité du virion ou la capacité répliquative virale. C'est pourquoi seules les mutations bénéfiques pour le virus ou celles qui affectent le moins la réplication seront sélectionnées. D'autres mutations permettent au virus de restaurer sa capacité répliquative ou de maintenir des activités enzymatiques essentielles : ce sont des mutations de compensation.

Les mutations les plus fréquemment décrites concernent la région de la polymérase pour les mutations de résistances aux anti-viraux, la région de l'enveloppe pour les mutants S et la région core pour les mutants du PBC et PC.

a) Mutants de la polymérase

Parmi les drogues antivirales utilisées pour traiter une hépatite B, la classe des analogues nucléotidiques et nucléosidiques est largement utilisée : ces molécules provoquent un arrêt prématuré de la réplication en entrant en compétition avec les nucléotides naturels et en agissant comme des terminateurs de chaîne. Les mutations de résistance apparaissent avant la mise sous traitement suite aux mésappariements de l'ADN polymérase du VHB qui se produisent au cours du cycle viral. L'instauration du traitement va favoriser l'émergence des souches portant les mutations de résistance au traitement donné, alors que les souches sauvages seront éliminées. Les mutants sélectionnés présentent des modifications notamment dans le motif acides aminés YMDD situé dans le domaine C de la polymérase et codant le site catalytique de l'enzyme. Le résultat est que l'affinité de la polymérase pour les molécules antivirales est diminuée et l'efficacité du traitement est altérée [64]. Il faut noter qu'une numérotation particulière du gène de la polymérase a été mise en place pour permettre d'identifier de façon consensuelle les différentes mutations associées à la résistance au niveau des acides aminés. Cette numérotation commence au premier acide aminé du domaine RT/Pol qui est codifié « rt1 » [79].

Parmi les mutations décrites, une substitution nucléotidique provoquant un changement d'acide aminé en position rt204 d'une Méthionine par une Isoleucine ou une Valine (rtM204I/V) est particulièrement décrite (Figure 16). Cette mutation majeure, en modifiant le motif YMDD du site catalytique de l'enzyme, devient délétère pour le fitness viral. D'autres mutations compensatoires sont alors souvent associées à la mutation rtM204I/V, comme la rtL180M qui permet de restaurer le niveau de charge virale [14, 64]. La mutation rtM204I/V confère une résistance croisée à plusieurs molécules de par la position extrêmement stratégique qu'elle occupe (lamivudine, emtricitabine, telbivudine).

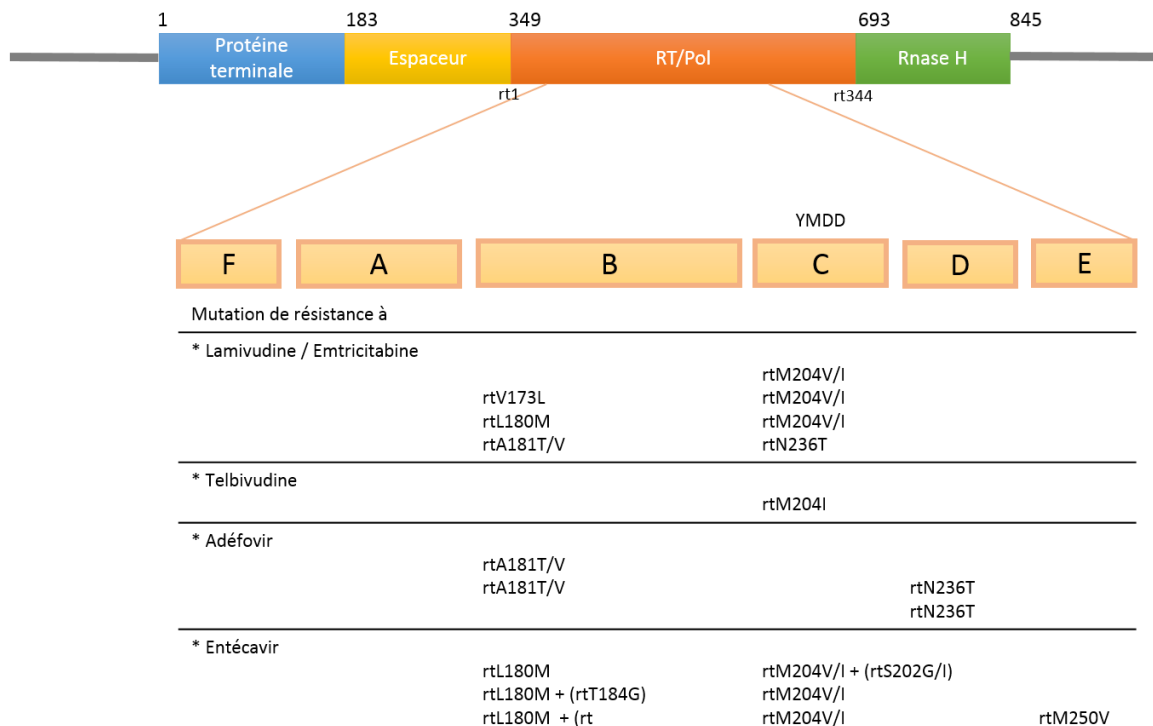


Figure 16 : Mutations principales décrites dans le gène RT/Pol (d’après Lim *et al.* [80]).

La numérotation spécifique « rt » est définie pour attribuer une position consensuelle aux mutations en s’affranchissant du fait que le génome est circulaire et que sa taille peut varier selon les génotypes. Ainsi, le 1^{er} acide aminé de la région RT/Pol commençant par un motif conservé EDWGPC entre les différents génotypes est nommé « rt1 ». Le site catalytique de l’enzyme est codé par le domaine C. Lorsque le motif YMDD, également conservé entre les génotypes, est modifié suite à une substitution nucléotidique, alors la résistance aux analogues nucléosidiques est systématique (lamivudine, emtricitabine et telbivudine). Les mutations dans le domaine B sont le plus souvent des mutations compensatoires. Chaque ligne correspond à une combinaison de mutations entraînant la résistance, les mutations entre parenthèses sont facultatives.

Pour définir la capacité de la molécule antivirale à sélectionner les souches résistantes, on parle de barrière génétique. Plusieurs critères sont utilisés pour la définir : le nombre de mutations nécessaires pour atteindre la résistance, l’impact de la mutation sur la capacité répliquative et sur la sensibilité à l’antiviral mais également la concentration plasmatique optimale pour que la molécule soit active. On parle de barrière génétique basse lorsque le nombre de mutations nécessaire pour entraîner une résistance est faible ou qu’une seule mutation peut impacter la sensibilité à toute une classe thérapeutique. C’est notamment le cas pour la lamivudine et l’emtricitabine. A l’inverse, l’entécavir, analogue de dernière génération, possède une barrière génétique élevée, puisque quatre à cinq mutations dans les

domaines B et D de la polymérase sont nécessaires pour atteindre la résistance à cette molécule.

b) Mutants de l'enveloppe

Parmi les mutations permettant au virus d'échapper au système immunitaire, sont décrites des substitutions dans la région préS/S, notamment dans le domaine exposé en surface des particules appelé Major Hydrophilic Region (MHR). Cette partie de l'AgHBs est la cible principale des anticorps synthétisés dans la réponse humorale, donc induits naturellement lors de l'infection ou par la vaccination. Des insertions et des délétions sont décrites, mais la majorité des mutations retrouvées sont de simples substitutions nucléosidiques qui modifient l'antigénicité de la protéine d'enveloppe. Ainsi, les anticorps dirigés contre l'AgHBs sauvage n'ont qu'une faible affinité pour l'AgHBs produit par ces souches mutées. On parle de mutants d'échappement vaccinal puisqu'ils sont largement décrits chez les enfants nés de mères séropositives et vaccinés à la naissance, mais ils sont également retrouvés chez des patients non vaccinés. Ainsi, ces variants minoritaires existant dans la quasi espèce peuvent émerger chez les transplantés hépatiques suite à l'injection d'immunoglobulines anti-HBs [64]. Il est très probable que les substitutions décrites soient nécessaires mais non suffisantes à l'échappement viral. En effet, les variants ne peuvent émerger que si la réponse Ac anti-HBs est limitée quantitativement et dirigée contre un seul épitope d'AgHBs. Ainsi, ces événements sont rares et la prévalence des mutants d'échappement à la vaccination reste faible [81].

Plusieurs mutations sont décrites dans le domaine MHR et autour. La plus documentée est la substitution G145R dans le déterminant « a » [14]. D'autres positions sont décrites, entraînant une diminution de l'affinité des Ac anti-HBs pour l'antigène (Figure 17). La majorité de ces variants d'échappement à la vaccination sont stables dans le temps. La

réplication n'est pas ou peu altérée et la transmission horizontale ou verticale est possible [64].

D'autre part, du fait de l'existence des ORF chevauchants, les mutations de la polymérase impactent le gène S et inversement. Ainsi, certaines mutations de résistances aux antiviraux peuvent modifier la conformation de l'AgHBs. Par exemple, les rtM204I et rtA181T introduisent un codon stop prématuré dans le gène S aux positions 196 et 172 respectivement, avec pour conséquence la production d'une protéine S tronquée [82]. Inversement, la mutation G145A qui correspond à un changement rtW153Q, permettrait de restaurer la fonction de réplication des mutants de résistance sélectionnés sous pression de sélection thérapeutique [83].

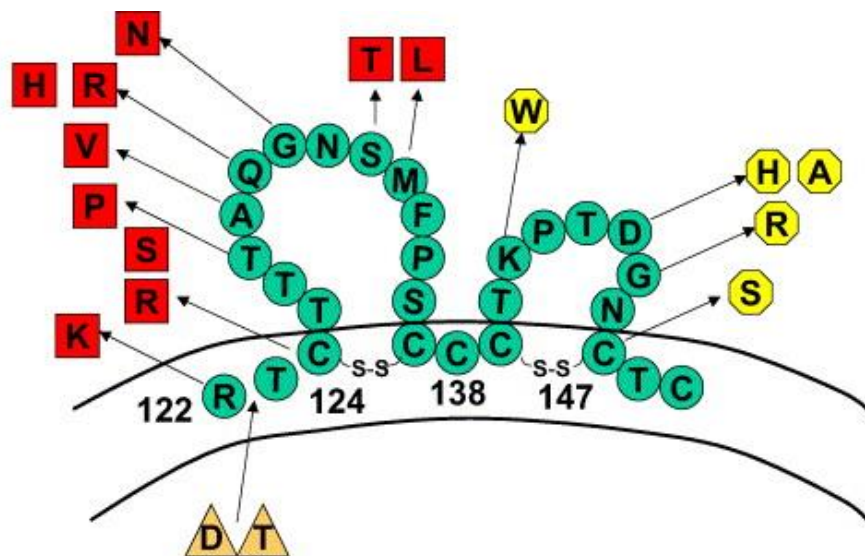


Figure 17 : Représentation des principales positions des acides aminés de la protéine S modifiés par mutation de la séquence nucléotidique [84].

Les triangles oranges représentent les insertions d'acides aminés, les carrés rouges et les ronds jaunes représentent les substitutions. Le déterminant « a » s'étend des acides aminés 124 à 149 (ronds verts). Les changements d'acides aminés dans ce domaine de la protéine S entraînent un changement conformationnel et une diminution de l'affinité des anticorps.

Les mutants de l'enveloppe peuvent impacter la sensibilité de détection de l'AgHBs des tests diagnostiques actuellement disponibles. Pour limiter le risque de faux négatif, la plupart des trousse commerciales utilisent des cocktails d'anticorps polyclonaux / monoclonaux pour la capture et/ou la détection de l'AgHBs.

c) Mutants de la protéine X

Du fait du chevauchement des ORF, les mutations du PBC impactent la protéine X qui est alors tronquée en partie C-terminale et présente une altération de sa fonction transactivatrice [14]. Les substitutions K130M et V131I, qui correspondent au double mutant du PBC, aboutissent à une protéine tronquée qui active la prolifération des cellules hépatiques [85]. Des mutations sont également décrites dans le domaine N-terminale de la protéine HBx, qui est associée à la régulation négative. Parmi celles-ci, la V5M et la P38S, qui sont également, par chevauchement du gène de la polymérase, des positions liées à la résistance aux antiviraux (codons rt204 et rt236). Ces mutations ont été décrites comme associées à des lésions hépatiques sévères. Mais comme le rôle de la protéine X est encore mal défini, il est difficile de déterminer précisément l'importance des mutations décrites dans la physiopathologie du VHB [85].

d) Mutants précore / core et PBC

La région PC/C est une région du génome très conservée car riche en éléments régulateurs qui influencent la transcription, l'encapsidation virale et la synthèse des protéines. D'autre part, son importance dans le cycle cellulaire (matrice pour la transcription de l'ARNpg) lui confère une importante stabilité nécessaire au bon déroulement de la réplication virale. De plus, l'ORF PC/C possède deux codons d'initiation en phase en position 1814 et 1901. Les mutations dans les régions PBC, PC et C sont assez fréquentes et très documentées.

Substitutions dans le PBC

De nombreuses études ont été menées concernant la description des mutations dans cette région. La plus fréquemment décrite est une double substitution A1762T et G1764A. Ces mutations modifient un site de fixation à un récepteur nucléaire, ce qui implique une baisse de la synthèse des ARN pilotés par ce promoteur, à savoir l'ARNpg et l'ARNm PC (Figure 18). Cependant, cela permet également la création d'un site de fixation pour un autre facteur de transcription HNF1 (Hepatocyte Nuclear Factor) qui restore la capacité de transcription de l'ARNpg uniquement [86]. Ainsi, seul l'ARNm PC est impacté et la synthèse de l'AgHBe est alors diminuée, alors que la réplication reste stable voire augmentée [87].

La double mutation du PBC n'est pas spécifique d'un génotype, même si l'apparition du site de fixation à HNF1 est plus probable au vu de la séquence chez les génotypes A, C, F, G et H par rapport aux génotypes D et E. Ainsi, pour ces derniers, la double mutation serait moins favorable au virus, et la prévalence du double mutant du PBC est donc variable selon les génotypes [64].

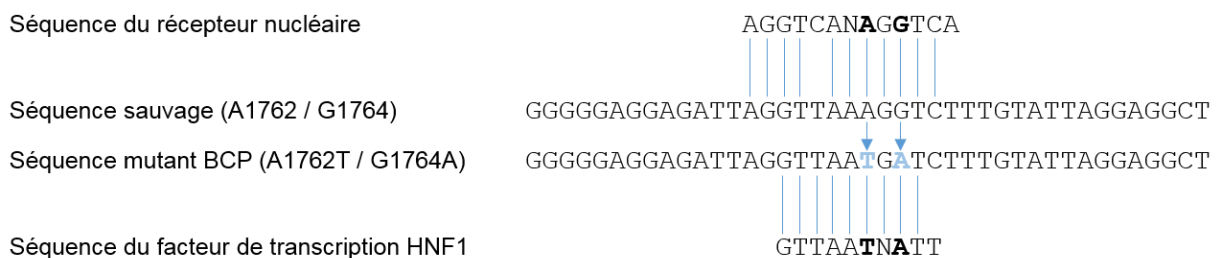


Figure 18 : Comparaison des séquences de la région PBC sauvage et mutée avec les séquences du récepteur nucléaire et du facteur de transcription HNF1 (d'après Li *et al.* [86]).

Les séquences PBC utilisées sont de génotype A. En gras les nucléotides concernés par la double mutation PBC en position 1762 et 1764, en bleu les nucléotides mutés. Les traits rejoignent les nucléotides identiques entre les séquences. Ainsi, la double mutation diminue la spécificité de la séquence PBC avec la séquence du récepteur nucléaire, mais augmente son affinité avec celle du facteur de transcription HNF1.

D'autres mutations ont également été décrites dans le PBC, modifiant la synthèse de l'AgHBe et la capacité répliquative du virus (Tableau 3). Cependant, ces mutations sont peu étudiées, et leur impact sur le pouvoir pathogène viral ou sur la sévérité des lésions hépatiques reste méconnu. La double mutation A1762T / G1764A est la plus prévalente quelles que soient les cohortes étudiées (génotypes, géographie, stade des lésions hépatiques) [88-90].

Tableau 3 : Liste des mutations du PBC décrites.

La double mutation A1762T / G1764A est la plus documentée des mutations du PBC. Peu d'études ont abordé la prévalence des autres mutations et leur impact clinique [87, 91, 92]. Il est également possible que ces mutations aient un rôle important au niveau de la protéine X, du fait des cadres de lectures chevauchants.

Mutations et combinaisons	Rôle associé	Référence
T1753C + A1762T / G1764A	Augmentation de la réplication virale Diminution de la synthèse d'AgHBe	[87]
G1757A	Prédisposition au double mutant PBC	[91]
A1762T / G1764A	Augmentation de la réplication virale Diminution de la synthèse d'AgHBe	[87]
T1753C + C1766T + A1762T / G1764A	Augmentation de la réplication virale Diminution de la synthèse d'AgHBe	[87]
T1768A	Pas d'impact démontré Associée à la C1766T	[92]
A1775G	Pas d'impact démontré Uniquement retrouvé dans le génotype C	[92]

Substitutions dans la région PC

De nombreuses mutations ponctuelles sont décrites dans la région PC du génome du VHB. Les premières descriptions ont été apportées dans le début des années 1980 en Italie, chez des patients présentant un profil sérologique particulier (AgHBs positif, AgHBe négatif et Ac anti-HBe positif) associé à une virémie positive [93]. L'étude moléculaire des souches virales a montré l'existence de mutations dans la région PC du virus. Depuis, de nombreuses

études ont été menées dans le monde entier afin de décrire la prévalence de ces mutations et leur impact clinique. La mutation trouvée le plus fréquemment est une substitution nucléotidique en position 1896 qui remplace une guanine (G) par une adénine (A). Cette substitution a un impact fort sur la transcription de la protéine HBe puisque un codon stop en découle en position 28, ce qui entraîne l'arrêt de la synthèse du précurseur protéique PC (Figure 19).

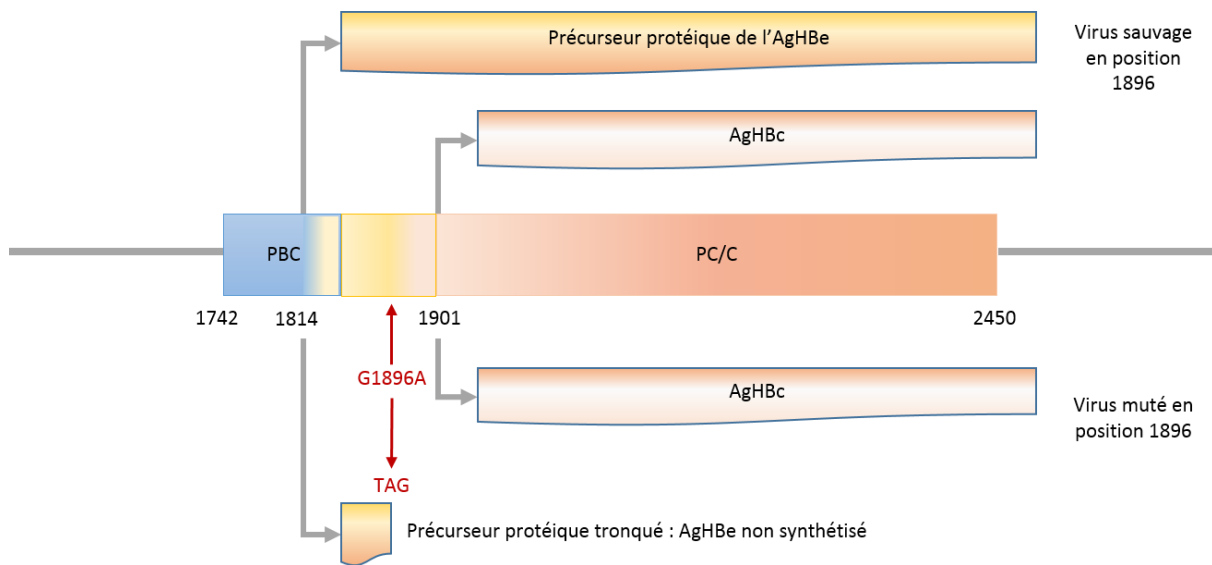


Figure 19 : Impact de la mutation G1896A dans la région PC du génome du VHB.

La substitution G1896A implique l'apparition d'un codon stop en position 28 dans la transcription du gène PC/C. L'ARNm PC issu de cette transcription conduit à la synthèse de l'AgHBe via un précurseur protéique. Ainsi, chez les patients porteurs d'un virus présentant cette mutation, la détection de l'AgHBe est la plupart du temps impossible.

Contrairement au double mutant du PBC, la mutation G1896A est décrite plus spécifiquement pour les génotypes B, C, D et E par rapport aux génotypes A, F et H. En effet, cette mutation, et la plupart des mutations affectant la région PC, se situent dans la structure tige-boucle du signal d'encapsidation ϵ . Pour les génotypes B, C, D et E, le nucléotide en position 1858 est une thymine (T) donc la mutation G1896A stabilise la structure tige-boucle et la quasi-espèce qui la porte est donc favorisée (Figure 20). Au contraire, concernant les génotypes A, F et H, la base en position 1858 appariée au cœur de

cette structure avec la base en position 1896 est un C. Ainsi, une mutation G1896A déstabiliserait la tige-boucle et diminuerait le fitness viral. Pour stabiliser la structure secondaire, il faudrait alors un deuxième évènement mutationnel en position 1858 [94]. Concernant le génotype G, une Adénine est présente en position 1896 pour le virus sauvage [95]. La mutation C1858T est également décrite pour les génotypes A, F et H mais serait plutôt une mutation de compensation (Figure 20).

D'autres mutations ont été décrites dans le gène PC, comme une substitution G1899A. L'impact sur la synthèse de l'AgHBe est moindre puisque cette substitution nucléotidique n'entraîne pas l'apparition d'un codon stop mais juste une substitution d'une glycine par un acide aspartique modifiant ainsi la structure tertiaire de la protéine et le signal d'encapsidation. Une substitution d'une guanine par une thymidine en position 1862 a également été décrite et entraîne une modification du site de clivage de la pré-protéine PC (Figure 20). La phénylalanine qui remplace la valine au codon 17 empêche la maturation de la pré-protéine en AgHBe dans le RE [96]. Cette mutation, de par sa position dans la boucle du signal d'encapsidation ε pourrait également diminuer la réplication virale mais de façon génotype dépendant. Ainsi, la G1862T est plus retrouvée associée au génotype A qu'au génotype D. En effet, il a été montré *in vitro* que la présence de cette mutation diminuait la réplication des isolats de génotype D alors qu'elle n'avait pas d'effet chez les isolats de génotypes A [96].

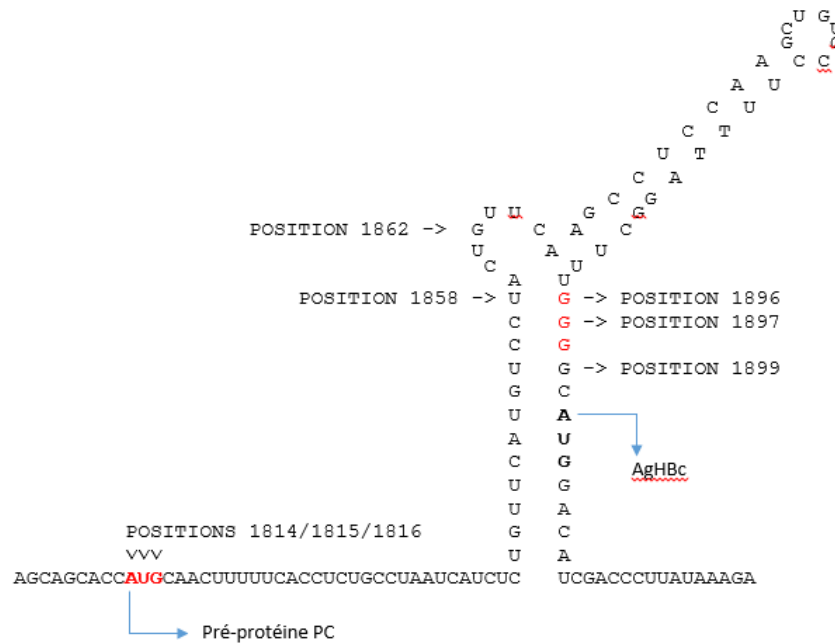


Figure 20 : Structure tige-boucle du signal d'encapsulation et mutations de la région PC.

En gras les codons d'initiation des transcriptions de la pré-protéine PC et de l'AgHBc. Les positions des principales mutations décrites sont reportées. En rouge les codons qui sont atteints par une substitution nucléotidique et deviennent des codons stop abolissant la synthèse de la pré-protéine PC (codon 1 et codon 28). La mutation décrite en 1858 est décrite pour les génotypes A uniquement lorsque la G1896A est présente, pour stabiliser la structure tige-boucle. La mutation G1862T entraîne une modification du site de clivage de la pré-protéine PC et de la boucle du signal d'encapsulation.

Plus rarement, une substitution G1897A a également été décrite entraînant, de la même manière que la G1896A, un codon stop en position 28 ce qui implique l'arrêt de la synthèse de l'AgHBe [92].

Sont également décrites des substitutions dans le codon d'initiation de la traduction de l'ARNm PC, aux positions 1814, 1815 ou 1816 (Figure 20). En l'absence de codon d'initiation, la traduction est interrompue et la pré-protéine PC n'est pas produite [97].

D'autres mutations peuvent être retrouvées, comme une C1817T, ou une G1898A mais leurs descriptions sont limitées et leur impact sur l'AgHBe et la réplication sont peu détaillées. Il a également été décrit une insertion d'une adénine entre les nucléotides 1838 et 1839 [95].

Substitutions, insertions et délétions dans la région C

L'AgHBc, qui provient de la traduction de la région C de l'ARNpg, représente une cible pour le système immunitaire. Ainsi, les acides aminés constituant la structure reconnue par les lymphocytes sont fréquemment modifiés par le biais de mutations intervenant dans la région C du virus. Ces mutations altèrent fréquemment la sécrétion des capsides, qualitativement ou quantitativement. Au vu des effets néfastes sur la réplication, ces mutants sont souvent défectifs et leur transmission est rare.

Des insertions ont été décrites et leurs caractéristiques dépendent du génotype : une insertion de 6 nucléotides pour le génotype A et une insertion de 36 nucléotides pour le génotype G au tout début de la séquence du gène C (après le codon 1). La taille de l'AgHBc est alors plus grande et sans retentissement fonctionnel puisque des particules virales sont formées avec la même efficacité que la protéine sauvage [64, 98]. La réplication de ces souches est normale, mais la co-infection avec un isolat d'un autre génotype permet d'augmenter la réplication des souches de génotypes G [98].

Parmi la quasi espèce virale, il a été montré que de nombreux variants co-existaient, certains présentant le génome sauvage, d'autres des mutations ponctuelles et enfin certaines souches délétées, notamment dans le gène C. Ces délétions impactent fortement la structure de la capside, formée par des dimères de protéine HBc et les retentissements sur la réplication peuvent être multiples : assemblage de la capside impossible, encapsidation de l'ARNpg non fonctionnelle, impact sur la reverse transcription. En présence de mutants délétés, il est nécessaire pour le virus de transcomplémenter la protéine de capside par un AgHBc issu d'une souche sauvage et possédant toutes les capacités d'assemblage et d'encapsidation pour permettre au virus de se répliquer correctement [99].

Impact clinique

De nombreuses études, certaines très récentes, ont été menées concernant l'impact des mutations dans le PBC et les régions PC et C sur la fibrose hépatique et l'évolution vers de lésions sévères [100, 101]. Des méta-analyses ont également été récemment publiées pour pouvoir définir les associations significatives entre mutations de ces régions et sévérité des lésions hépatiques [102, 103].

Concernant les mutations du PBC, et notamment le double mutant A1762T / G1764A, il est admis aujourd'hui, au vu des résultats des études menées dans plusieurs pays, que sa présence est liée à une évolution des lésions hépatiques de mauvais pronostic [70]. En France, sa présence a été corrélée à des stades de fibrose sévère (>F2) dans une étude menée chez les patients infectés chroniquement en comparaison aux biopsies hépatiques [104]. En Asie, une étude cas-témoin de 251 patients a montré qu'une forte proportion de mutants PBC dans la quasi-espèce est favorable à l'apparition d'un CHC [88]. En Afrique, une étude en Gambie a montré une prévalence significativement supérieure du double mutant PBC chez des patients présentant des lésions hépatiques importantes de type cirrhose et CHC [105]. Aux Etats-Unis, une cohorte de 101 de patients atteints de CHC a été comparée à 67 patients présentant une infection chronique sans lésions hépatiques. Les résultats montrent que la présence du double mutant PBC augmente significativement le risque de CHC [106]. Ces études sont des exemples des nombreuses publications sur le sujet, et montre d'une part la répartition mondiale du double mutant, mais également sa corrélation avec les fibroses sévères et le CHC. Les méta-analyses ont d'ailleurs confirmé ces données à plus grande échelle et en réduisant les biais de cohorte pouvant être liés à l'âge, au génotype ou à l'ethnie. Il est également supposé que l'effet fibrosant du double mutant PBC serait lié aux changements d'acides aminés dans le gène X dans la région C-terminale imposés par les cadres de lecture chevauchants [70].

Certaines études ont aussi montré que l'accumulation du nombre de mutations dans le PBC favorise la sévérité des lésions, notamment l'association du double mutant PBC et de la T1753C [100, 107].

Concernant la mutation G1896A, les données de prévalence sont discordantes selon les études et vont de 25% à 70% [75, 101, 108]. La mutation est aussi bien décrite chez les porteurs chroniques, que dans les hépatites aiguës, fulminantes ou chez les porteurs inactifs, mais les études sont également contradictoires [75, 101, 109-111]. Il a été montré dans certaines études que la mutation G1896A était liée à la sévérité des lésions hépatiques et à l'apparition du CHC, mais d'autres études n'ont pas retrouvé de lien significatif [100, 102, 103, 109]. Quelques études se sont intéressées au rôle de l'AgHBe dans la réponse immunitaire dirigée contre le VHB. Parmi celles-ci, il a été montré que l'expression de certains récepteurs de la famille des Toll-like receptors (TLR) était significativement liée au taux d'AgHBe circulant. L'expression des TLR-3 et TLR-4 serait augmentée dans les lymphocytes T stimulés par l'AgHBe [112]. A l'inverse, l'expression du TLR-2 a été décrite comme diminuée chez les patients AgHBe positif [113]. De plus, plusieurs études récentes ont montré que les niveaux de TLR-2 et TLR-4 dans le sérum sont augmentés en présence de la mutation G1896A chez les patients AgHBe négatif [114, 115]. L'augmentation de l'expression du TLR-2 a également été décrite chez les patients présentant des lésions hépatiques sévères, comme pour le TLR-4 [112, 114]. L'augmentation du niveau de TLR-2, dont l'action sur l'expression de cytokines inflammatoires est largement décrite, est également associée dans ces études à une augmentation des transaminases pouvant traduire l'intensité de la réponse immunitaire de l'hôte contre le VHB [114].

La mutation G1899A, plus récemment décrite, reste également soumise à controverse quant à son implication dans la sévérité des lésions hépatiques. Certaines études, notamment asiatiques, ont montré un lien statistique entre la présence de la mutation G1899A et

l'évolution vers le CHC [107, 116, 117]. Ces données ont été confirmées par une méta-analyse qui associe indépendamment la mutation G1899A avec le CHC [100].

2. La fibrose hépatique au cours de l'hépatite B

La fibrose hépatique est un mécanisme de cicatrisation pathologique mis en place dans le foie suite à des agressions tissulaires chroniques. Plusieurs facteurs peuvent induire l'inflammation des tissus hépatiques : hépatites virales B et C, maladie auto-immune, pathologie biliaire, intoxication. Dans l'hépatite B, la destruction massive par le système immunitaire des cellules infectées entraîne une inflammation importante, parfois non maîtrisée. L'évolution des poussées de fibrose dans l'hépatite chronique B est l'apparition d'une cirrhose dont l'incidence a été estimée entre 2 et 6 % par an [118]. La cirrhose est la cause principale de morbidité et de mortalité des hépatites virales B, mais les mécanismes mis en jeu dans la fibrogénèse de cause virale restent encore peu connus.

2.1. Définitions

La fibrogénèse est un processus dynamique de production de matrice extracellulaire (MEC). Au cours de l'infection par le VHB, l'inflammation importante qui est déclenchée induit une désorganisation de ce processus par la sécrétion de molécules activant la production de la MEC et d'autres inhibant sa destruction. La dégradation de la MEC est appelée fibrolyse. Dans le foie normal, la fibrogénèse et la fibrolyse sont en équilibre [118].

La MEC est un constituant minoritaire du foie normal. Elle est composée d'un ensemble de macromolécules, telles que les collagènes, glycoprotéines, élastine, protéoglycanes et glycosaminoglycanes. Elle est structurée autour des vaisseaux et des canaux biliaires sous forme de lame basale et de matrice interstitielle. Elle est impliquée dans la différenciation des cellules hépatiques notamment, mais impacte également leur fonctionnement (adhésion, communication, migration) [119, 120].

La fibrose résulte donc d'une fibrogénèse non maîtrisée et d'une fibrolyse inhibée. Ainsi, lors de l'infection virale, la MEC se dépose en excès dans les espaces portes du foie [120]. L'accumulation de tissu collagène qui en résulte détruit complètement l'architecture tissulaire du foie. Ce phénomène peut être réversible si l'agression est limitée dans le temps. Le tissu atteint peut être réparé en restaurant l'équilibre fibrogénèse / fibrolyse. Mais lors de l'infection virale B, la chronicité de l'agression hépatique ne permet pas de retrouver un équilibre et de limiter les lésions.

Les cellules étoilées du foie (CEF) jouent un rôle primordial dans l'établissement de la fibrogénèse [121]. Ces cellules, peu nombreuses dans le foie sain, sont localisées dans l'espace de Disse. Elles sont alors à l'état quiescent et leur fonction principale est le stockage de la vitamine A [122]. Lors du processus de fibrogénèse, leur activation serait à l'origine de l'accumulation de la MEC dans les espaces portes.

2.2. Physiopathologie

Lors de l'hépatite chronique B, les hépatocytes infectés sont massivement détruits par le système immunitaire. Ces lésions entraînent la libération de cytokines qui vont permettre l'activation des cellules de Kupffer et des CEF. Une fois activées, les CEF deviennent des cellules myofibroblastiques contractiles et produisent de nombreux constituants de la MEC et en inhibent sa dégradation. En parallèle, les cytokines synthétisées par les CEF activées permettraient alors d'entretenir la différenciation des CEF quiescentes et ainsi amplifier le processus de fibrogénèse (Figure 21).

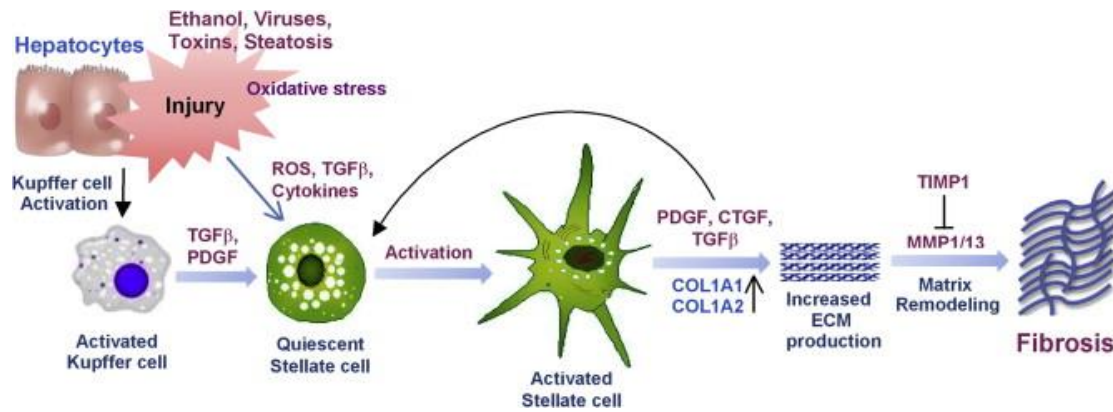


Figure 21 : Processus de fibrogénèse faisant intervenir les CEF [123].

TGF : Transforming Growth Factor. *MMP* : Métalloprotéase matricielle. *ECM* : Extracellular matrix (MEC). Suite à une agression du foie, les hépatocytes lésés mobilisent les cellules de Kupffer et activent les CEF via la sécrétion de cytokines. Une fois activées, les CEF produisent de façon intensive les composants de la MEC ainsi que des cytokines capables de continuer leur activation comme le TGF- β . D'autre part, les CEF synthétisent également la MMP-1 qui dégrade le collagène dans le foie sain. Lorsqu'elles sont activées, les CEF diminuent la synthèse des MMP et augmentent la production des inhibiteurs des MMP à savoir les TIMP. Ainsi, le collagène s'accumule et le remodelage de la MEC est modifié, favorisant le tissu fibreux.

2.2.1. Activation des CEF

Lors de l'infection par le VHB, des mécanismes spécifiques et non spécifiques d'activation des CEF sont mis en jeu (Figure 22). Récemment, la voie des TLR a été mise en évidence comme une voie de signalisation spécifique et liée à l'immunité innée dirigée contre les agents pathogènes (bactéries, virus) [118]. Le TLR4 notamment, récepteur protéique transmembranaire a été décrit à la surface des CEF et il a été relié à la réponse immunitaire innée dirigée contre le VHB. La fixation du ligand sur ce récepteur entraîne l'activation d'une voie de signalisation cellulaire indépendante de l'IFN, la voie MyD88. Cette voie conduit à l'activation de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, comme le TGF- β (Transforming Growth Factor), les interleukines (IL) 6, 10, et 12 notamment, ainsi que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor) [124]. Toutefois, les mécanismes d'activation paracrine des CEF par les hépatocytes infectés et les cellules de Kupffer sont les plus précoces. Lorsque ces cellules sont infectées par le VHB, elles libèrent des cytokines comme le TGF- β , le Platelet Derived Growth Factor (PDGF) qui permettent l'activation des CEF

[125]. La fibronectine produite par les cellules endothéliales a également un effet activateur sur les CEF [119, 122].

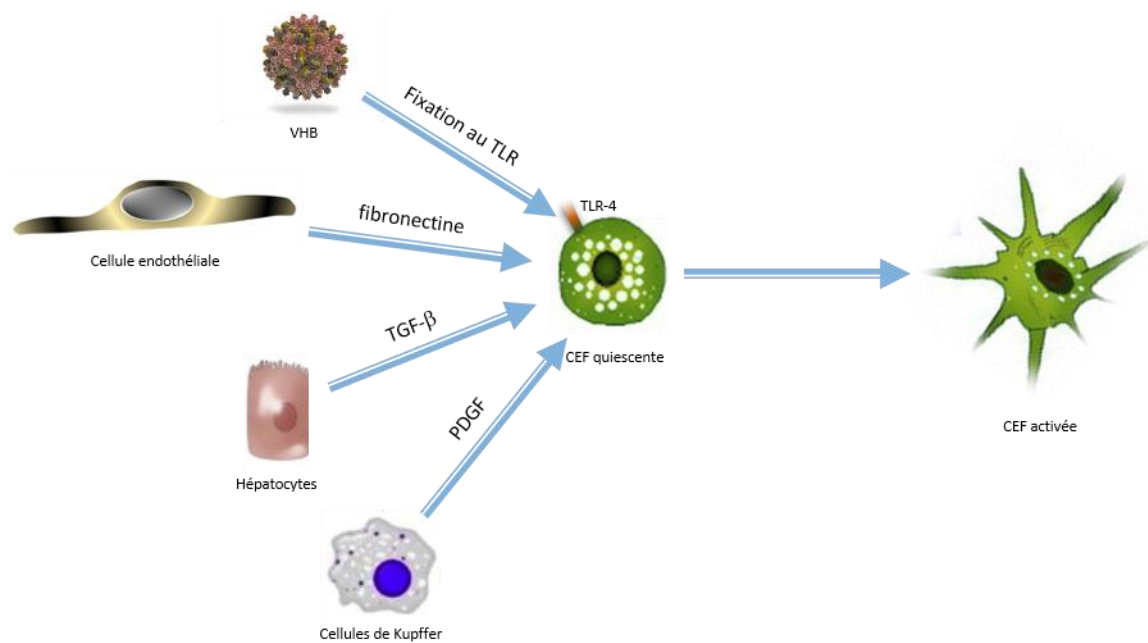


Figure 22 : Mécanismes principaux d'activation des CEF.

Les CEF peuvent être activées par différents mécanismes en lien avec une agression du foie. Ces mécanismes sont les plus décrits actuellement [118, 122, 125].

2.2.2. Entretien des CEF activées

Les cytokines pro-inflammatoires produites par les CEF activées stimulent à leur tour les CEF quiescentes. Ainsi, grâce à ces mécanismes paracrines et autocrines, les CEF hépatiques restent activées en permanence et maintiennent la fibrogénèse. Parmi ces cytokines, l'action du TGF-β est largement démontrée. Mais le PDGF et certaines interleukines sont également décrites, ainsi que le collagène (type I et III) et la fibronectine. Ces deux dernières molécules sont des composants de la MEC, ce qui implique que la dérégulation de la MEC entretient également l'activation des CEF [125].

2.2.3. Prolifération de la MEC

Les CEF activées produisent l'ensemble des composants de la MEC. De plus, elles modifient complètement leur comportement initial, avec la perte de leur fonction principale de stockage de la vitamine A, mais également l'acquisition de nouvelles fonctionnalités : la prolifération, la contractilité, la fibrogénèse, le chimiotactisme et la dégradation de la matrice cellulaire [118]. Par exemple, la prolifération des CEF et le chimiotactisme impliquent une augmentation du nombre de cellules pouvant synthétiser du collagène. Le statut de CEF activée permet également d'augmenter la quantité de composants de la MEC synthétisée par cellule, c'est-à-dire la capacité de fibrogénèse. La faible expression protéique des métalloprotéases matricielles (MMP), notamment la MMP-1, par les CEF activées ainsi que l'augmentation de l'expression des TIMP, inhibiteur des MMP, modifie la dégradation du micro environnement cellulaire en limitant la destruction des collagènes. Ce phénomène accentue la désorganisation de la MEC et amplifie le processus de fibrogénèse en favorisant l'accumulation de tissu fibreux [122] (Figure 23).

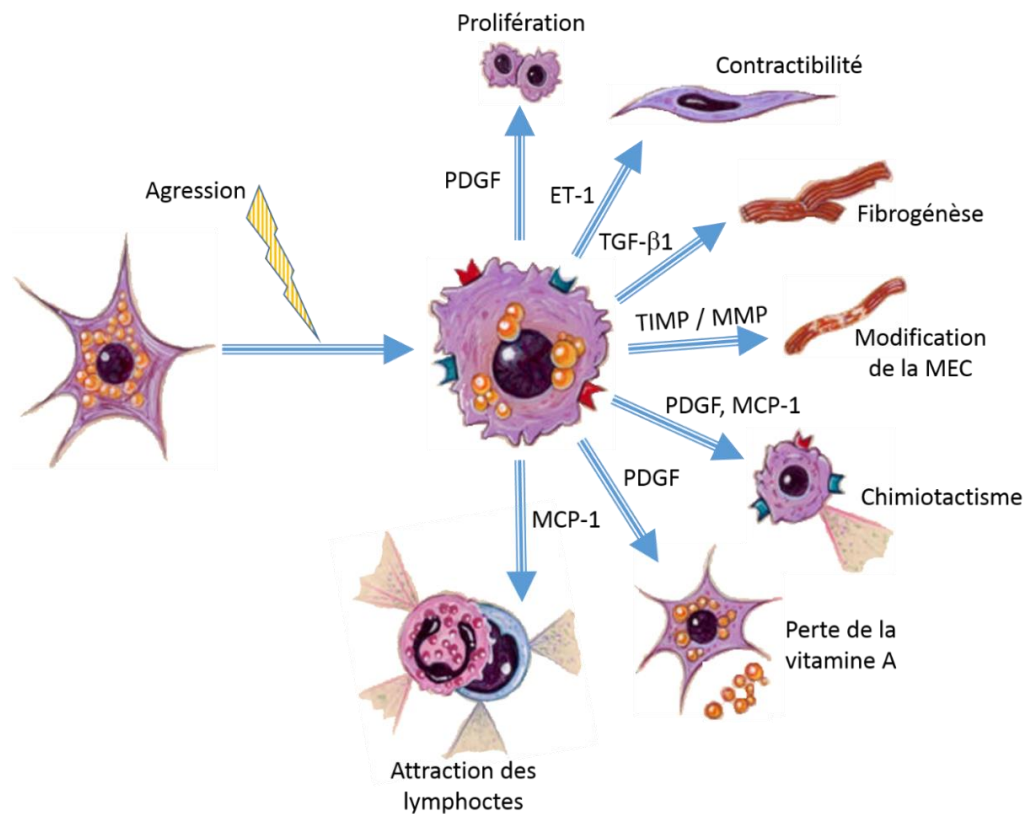


Figure 23 : Nouvelles fonctionnalités des CEF activées (d'après Friedman [122]).

Les CEF activées acquièrent de nouvelles fonctionnalités et perdent leur principale caractéristique à l'état quiescent à savoir le stockage de la vitamine A. De nombreuses cytokines sont synthétisées qui vont permettre à la fibrose de se développer : activation de la fibrogénèse par le TGF- β , diminution de la fibrolyse (augmentation de la synthèse des TIMP et diminution des MMP), prolifération cellulaire importante amplifiant le phénomène.

2.2.4. Marqueurs de la fibrogénèse

L'expression de certaines protéines est modifiée lors de l'activation des CEF (Tableau 4). Le marqueur principal est le TGF- β . En effet, cette cytokine intervient d'une part dans l'activation paracrine des CEF par les hépatocytes infectés, mais également dans la stimulation paracrine et l'entretien des CEF activées. C'est une cytokine pro-inflammatoire qui induit une augmentation de la synthèse des collagènes, protéoglycanes et glycoprotéines, ainsi que des TIMP. Ses fonctionnalités sont largement décrites, mais l'influence du VHB sur son expression reste peu détaillée. Le PDGF est également un

marqueur important qui intervient dans les deux modes de stimulation des CEF via les cellules de Kupffer. Parmi les interleukines pro-inflammatoires, l'IL-6 apparaît augmentée par la protéine C du VHB via trois voies cellulaires dont la voie NF- κ B [126]. L'augmentation de l'expression de l'IL-17 est également décrite dans l'infection par le VHB et est corrélée à la sévérité des lésions hépatiques [127]. Une équipe s'est également intéressée à l'IL-31 pour montrer que l'expression de cette interleukine pro-inflammatoire est augmentée chez les sujets atteints d'infection chronique B par rapport aux sujets contrôles [128]. Les protéases et les inhibiteurs intervenant dans le mécanisme de fibrolyse qui est inhibé sont également des marqueurs clés de l'apparition et de l'entretien des lésions hépatiques. Ainsi, les MMP-1 qui ciblent particulièrement les collagènes et les TIMP sont décrits comme essentiels [119].

Le collagène I est le constituant principal du tissu fibreux et l'augmentation de sa synthèse est un marqueur de développement de fibrose hépatique. L'ensemble des constituants de la MEC sont également des marqueurs significatifs de fibrose hépatique, comme la fibronectine qui de plus intervient dans l'activation des CEF [119, 122].

Tableau 4 : Différences d'expressions protéiques et de fonctionnalités entre les CEF quiescentes et les CEF activées (d'après Lamireau *et al.* [119]).

La fonction principale des CEF quiescentes est le stockage de la vitamine A. Cette fonction est perdue après leur activation. Les interleukines pro-inflammatoires sont notamment l'IL-6, IL-17, IL-31 dans le cas de l'infection par le VHB.

	CEF quiescentes	CEF activées	
Synthèse des composants MEC	Collagène I	0	+++
	Autres collagènes (III, IV et VI)	+	++
	Fibronectine	+	++
	Autres glycoprotéines	+	+
	Protéoglycanes	+	++
Synthèse des protéases	MMP-1	+	0
	Autres MMP	+	+
	TIMP-1	+	++
Stockage Vitamine A	+++	0	
Cytokines	TGF- β	0	+++
	PDGF	0	++
	Interleukines pro-inflammatoires	0	+++

2.3. Rôle des protéines du VHB dans la fibrose hépatique

Peu d'études sont menées pour avancer sur le rôle des protéines HBc, HBe et HBx du VHB dans la fibrose hépatique.

Concernant la protéine HBx, des travaux menés en système de milieu de culture conditionné ont démontré que la protéine virale induisait notamment la sécrétion de TGF- β , collagène I et α -SMA (Smooth Muscle Actin) par les hépatocytes et favorisait donc la prolifération et l'activation des CEF [129]. Une étude a confirmé ces résultats en co-culture CEF / lignée hépatocytaire exprimant HBx de façon stable : la protéine virale était significativement liée au développement de la fibrose en activant la prolifération des CEF et en régulant positivement certaines cytokines pro-fibrotiques comme par exemple α -SMA,

TGF- β et le collagène I [130]. Une autre étude très récente a proposé qu'HBx intervienne dans le développement de la fibrose hépatique en régulant positivement via un microARN (miR), l'enzyme qui catalyse la formation du collagène [131].

Concernant la protéine HBc, son action est souvent étudiée en comparaison avec HBx. Une étude a montré que ces deux protéines induisaient le processus de fibrogénèse via le TGF- β [24]. Une autre étude a également démontré en co-culture CEF / hépatocytes, que ces protéines activaient *in vitro* la prolifération des CEF et augmentaient les niveaux d'expressions des ARNm du PDGF et de son récepteur, du collagène 1 et de α -SMA [132]. Enfin, une étude a montré que la protéine HBc rendait les hépatocytes plus sensibles à l'apoptose induite par le TNF- α [133].

Une seule étude très récente a étudié l'impact de la protéine PC sur l'expression des gènes pro-fibrotiques par les CEF. Les résultats n'ont pas montré de différences significatives *in vitro* entre des cellules n'exprimant aucune protéine du VHB et des cellules transfectées transitoirement avec un plasmide contenant le gène PC ou le gène X [134].

Devant le faible nombre de publications, notamment concernant les protéines HBc et HBe, il est nécessaire de mettre au point des outils permettant d'étudier leur implication dans la fibrogénèse et dans l'activation et la prolifération des CEF.

3. Modèles d'études protéiques *in vitro*

Les connaissances sur le cycle viral, le développement de molécules antivirales et l'étude des résistances aux antiviraux ont fortement évolué dans la dernière décennie, notamment grâce à l'amélioration des modèles d'études disponibles pour le VHB. Les modèles animaux, que nous n'aborderons pas dans ce manuscrit ont permis de grandes avancées dans la compréhension de l'infection par le VHB. *In vitro*, la mise au point de modèles cellulaires reste essentielle pour définir de nombreuses étapes clés du cycle viral d'une part mais aussi pour mieux appréhender l'évolution vers l'infection chronique. En effet, l'infection *in vitro* par le VHB a longtemps été impossible et reste encore aujourd'hui à améliorer.

3.1. Cultures cellulaires

Afin d'étudier chaque détail du cycle viral et l'impact du VHB sur la cellule et son environnement, il serait idéal que le modèle cellulaire reproduise exactement l'infection *in vivo*. Cependant, ce modèle n'est pas disponible à ce jour, notamment en raison du tropisme étroit du VHB et de la grande spécificité d'hôte des *Hepadnavirus*.

3.1.1. Cellules primaires

La culture d'hépatocytes primaires humains (HPH) reste le modèle de référence pour la culture du VHB. En effet, les caractéristiques de ces cellules sont identiques aux cellules *in vivo*. Ce sont des cellules de morphologie cubique, souvent binuclées (Figure 24). Cependant, obtenir des HPH reste fastidieux et soumis à d'importantes contraintes, éthiques notamment. En effet, les HPH sont issus de prélèvements de foies humains dans des zones saines obtenues lors d'opérations de patients présentant des lésions hépatiques. Ainsi, les conditions d'obtention en font des cellules rares et de qualité variable. De plus, la diversité génétique humaine impose des caractéristiques différentes des cellules selon les prélèvements.

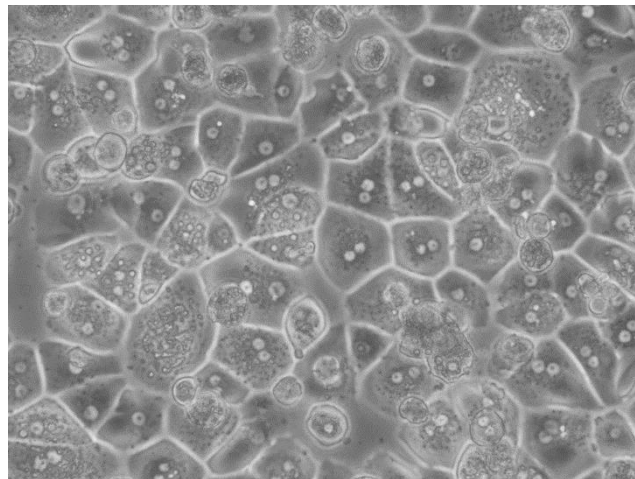


Figure 24 : Hépatocytes en culture au lendemain de l'ensemencement (photothèque du laboratoire de Virologie, CHU Angers).

Ces cellules sont issues d'une manipulation de perfusion de foie sain par la collagénase. Elles ont été mises en culture sur des plaques recouvertes de collagène afin d'en assurer l'adhérence. Leur morphologie est plutôt cubique avec des cellules mononuclées et d'autres binuclées. La confluence est quasiment atteinte en 24h.

3.1.2. Lignées hépatocytaires

Les cellules primaires étant donc difficiles d'obtention et d'utilisation, la plupart des modèles d'études utilisent des lignées cellulaires hépatiques humaines. Parmi ces cellules, les plus couramment citées sont les HepG2. Ce sont des cellules dérivées du foie d'un adolescent présentant un CHC. Ces cellules sont très bien caractérisées : elles expriment beaucoup de molécules spécifiques du foie ainsi que les marqueurs plasmatiques (albumine, transferrine, fibrinogène...). Leur morphologie diffère des HPH puisque ce sont des cellules d'aspect épithélial présentant un seul noyau (Figure 25). L'acquisition et l'entretien d'une telle lignée est simple, la durée de vie en culture est quasiment infinie et leur phénotype est stable dans le temps.

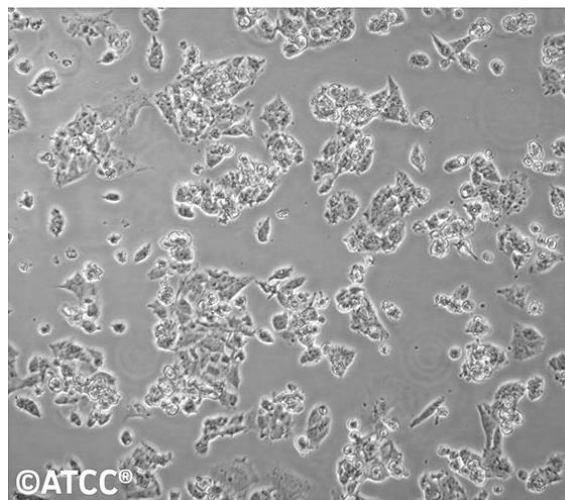


Figure 25 : Lignée hépatocytaire HepG2.

Les cellules HepG2 ont une morphologie épithéliale. Elles sont mononucléées. Leur prolifération est rapide et l'entretien aisé ne nécessite aucun additif.

3.1.3. Cellules HepaRG

Récemment, une nouvelle lignée cellulaire hépatique dérivée d'un carcinome hépatocellulaire chez une femme a été mise au point [27]. Les cellules HepaRG sont non cancéreuses et initialement indifférenciées. L'ajout de DMSO dans le milieu de culture permet aux cellules de se différencier en hépatocytes et cellules biliaires (Figure 26). La morphologie des HepaRG est similaire à celle des HPH et surtout, l'expression des récepteurs, transporteurs membranaires et des facteurs de transcription spécifiques au foie est également comparable entre les deux types cellulaires.

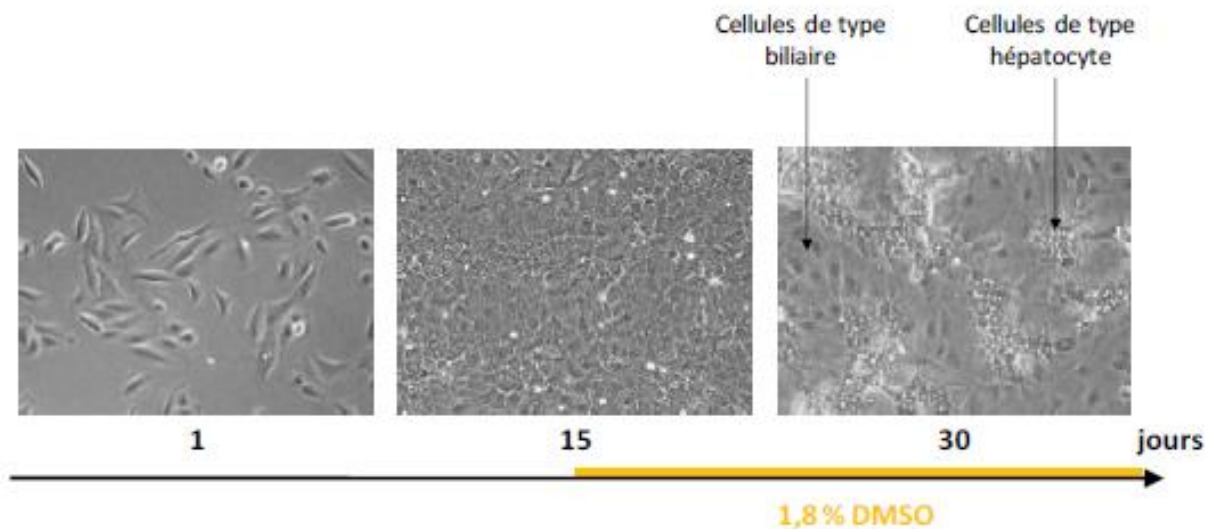


Figure 26 : Cellules HepaRG en culture (image fournie par l'équipe du Pr Zoulim).

A gauche, 1 jour après l'ensemencement : les cellules sont indifférenciées et présentent une morphologie de type épithéliale. A droite, les mêmes cellules au bout de 30 jours pendant lesquels le milieu a été complété avec du DMSO : les cellules se sont alors différenciées en hépatocytes et cholangiocytes. Le stade différencié peut être entretenu pendant plusieurs mois.

3.2. Utilisation pour le VHB

3.2.1. Infection des cellules primaires ou en lignée

L'infection directe des HPH par le VHB est faiblement efficace, au vu de la permissivité courte de ces cellules et de leur faible longévité en culture [135]. Il est également démontré que l'activité métabolique *in vitro* des HPH diminue au cours du temps, notamment les fonctions hépatiques ce qui impacte fortement la réplication du VHB [136].

L'infection des lignées d'hépatome par le VHB est difficile, probablement en lien avec l'absence du récepteur NTCP découvert il y a peu comme nécessaire à l'entrée du virus. Certaines études ont montré que la production de virion était possible suite à la transfection directe du génome du VHB, mais ces résultats sont controversés [136]. Au laboratoire, une étude sur l'efficacité de différentes solutions désinfectantes a été menée sur des cultures cellulaires de HepG2 mises en contact avec du plasma présentant une charge virale élevée. Ainsi, l'efficacité du désinfectant a été évaluée en mesurant l'AgHBs sécrété dans le milieu de culture, ce qui suggère que le virus est entré dans la cellule et synthétise les protéines virales [137].

Les HepaRG sont permissives au VHB [27]. Le fait que le virion puisse infecter directement la cellule et supporter le cycle viral dans son intégralité permet d'en appréhender plus précisément les étapes clés, notamment l'entrée dans la cellule. Cependant, l'infection des HepaRG reste peu efficace. Malgré des conditions d'infections très particulières et adaptées, seulement 20% des cellules sont finalement infectées par le VHB. Le taux maximal d'infection est obtenu en utilisant des cellules très différenciées, une longue incubation avec les virions, à une température de 32°C plutôt que 37°C et l'ajout de polyéthylène glycol (PEG). La raison pour laquelle ce taux est si faible est encore mal identifiée, mais serait probablement en lien avec la polarisation des hépatocytes qui sont regroupés en îlots et donc l'accès à l'ensemble des cellules serait limité [28]. Cette faible efficacité d'infection et

l'ajout nécessaire de réactifs comme les DMSO et PEG sont des inconvénients majeurs pour les études d'entrée du virus dans la cellule. En effet, le DMSO et le PEG altèrent les membranes cellulaires et l'infection des hépatocytes par des virions en leur présence pourrait être biaisée.

L'infection directe par le VHB est donc encore confrontée à de sérieuses limites, malgré les avancées importantes de ces dernières années, notamment grâce à la lignée HepaRG. Aucun système cellulaire ne permet actuellement de reproduire *in vitro* l'infection chronique par le VHB.

3.2.2. Transfection transitoire

Dans le cas où le virus n'est pas mis directement en contact avec la cellule pour l'infecter, mais que c'est le génome viral qui est transféré dans les cellules, on parle de transfection. Lorsque l'expression du génome viral n'est pas stable dans la cellule, on parle de transfection transitoire. En effet, l'ADN transfecté est perdu au cours du temps suite à la dégradation cellulaire des ADN plasmidiques et à la division des cellules. Il est possible de transfecter un ADN dans des lignées cellulaires en utilisant ou non des vecteurs pour délivrer le génome dans la cellule.

Dans la transfection transitoire sans vecteur, le génome du VHB, après avoir été amplifié puis digéré, est circularisé par les enzymes cellulaires et sert de matrice lors de la transcription. Avec cette technique, le taux de réplication reste assez faible et la détection des ARN viraux doit être réalisée à l'aide de PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitatives (qPCR) très sensibles. L'avantage principal est que l'expression des protéines virales reste soumise aux promoteurs viraux uniquement et respecte donc les synthèses naturelles du virus [138].

L'autre approche utilise des vecteurs plasmidiques pour amener le génome du VHB dans la cellule. Dans ce cas, l'équivalent ADN de l'ARNpg est intégré dans un vecteur de

transfection sous l'influence d'un promoteur fort. Une telle technologie a été bénéfique dans la compréhension du rôle des protéines du VHB, mais aussi dans celui des éléments régulateurs [15]. Les premières études ayant permis de relier les mutants de la polymérase à des résistances aux antiviraux ont été menées par transfection transitoire et mutagenèse dirigée. Cependant, ces tests de première génération étaient limités par une réplication assez faible et par le fait que la présence de quasi-espèces virales n'était pas du tout prise en compte. De nouvelles études ont mis au point récemment des tests utilisant des clones de l'ensemble de la quasi-espèce virale, corrigeant ainsi le biais précédent [138].

Dans les deux technologies de transfection transitoire, les niveaux de réplication restent faibles. Comme une fraction minoritaire des cellules en culture est transfectée, l'impact de la réplication virale sur la cellule reste difficile à analyser. De plus, le caractère transitoire de la transfection ne permet pas d'étudier à long terme les effets de la réplication du VHB sur la cellule.

3.2.3. Lignées cellulaires à expression stable

Afin d'améliorer l'étude du cycle viral, la lignée HepG2 a été modifiée pour exprimer de façon stable le génome du VHB. Cette lignée, HepG2.2.15 a été obtenue en transfectant un dimère de génome viral à l'aide d'un vecteur portant une résistance à la généticine. Après sélection, les cellules exprimant les protéines virales ont été multipliées et la stabilité de l'expression démontrée pendant plus de six mois [139]. L'avantage de ce type de lignée est la possibilité de constituer facilement des solutions de virions infectieux qui peuvent être utilisés ensuite sur d'autres types cellulaires. La lignée HepG2.2.15 a ouvert la voie des lignées cellulaires à expression stable et de nouvelles lignées exprimant différentes souches de VHB ont alors vu le jour, notamment concernant des mutants résistants au antiviraux [138].

3.2.4. Transduction par les vecteurs viraux

Parallèlement à ces techniques d'infection, des techniques de transduction par le génome viral total ou partiel ont été mises au point. Plusieurs technologies peuvent être utilisées, présentant chacune des avantages et inconvénients dans l'étude du VHB. Parmi celles-ci, l'utilisation de baculovirus, de vecteurs dérivés de virus associés aux adénovirus (AAV) ou de vecteurs lentiviraux. Ces trois techniques peuvent être utilisées pour délivrer le génome du VHB à l'intérieur d'hépatocytes en culture et ainsi explorer la réplication, la synthèse protéique, les résistances ou le cycle viral du VHB.

a) Baculovirus

Les baculovirus sont des virus enveloppés qui infectent les insectes mais qui sont également capables de pénétrer dans différents types de cellules dont les hépatocytes. Les baculovirus ont la capacité de délivrer le transgène dans le noyau de la cellule sans s'y répliquer et en engendrant que peu d'effets cytopathogènes. Le gène d'intérêt est alors inséré dans un vecteur de transfert présentant des séquences homologues au génome super enroulé du baculovirus. La recombinaison a lieu entre le gène d'intérêt et le génome du baculovirus dans une cellule d'insecte. Les baculovirus contenant le gène d'intérêt peuvent ensuite infecter des cellules en culture comme des hépatocytes et délivrer le transgène au noyau afin qu'il soit traduit. Le transgène peut être une simple séquence protéique ou le génome viral complet, puisque les baculovirus acceptent jusqu'à 10kb selon les types (Figure 27).

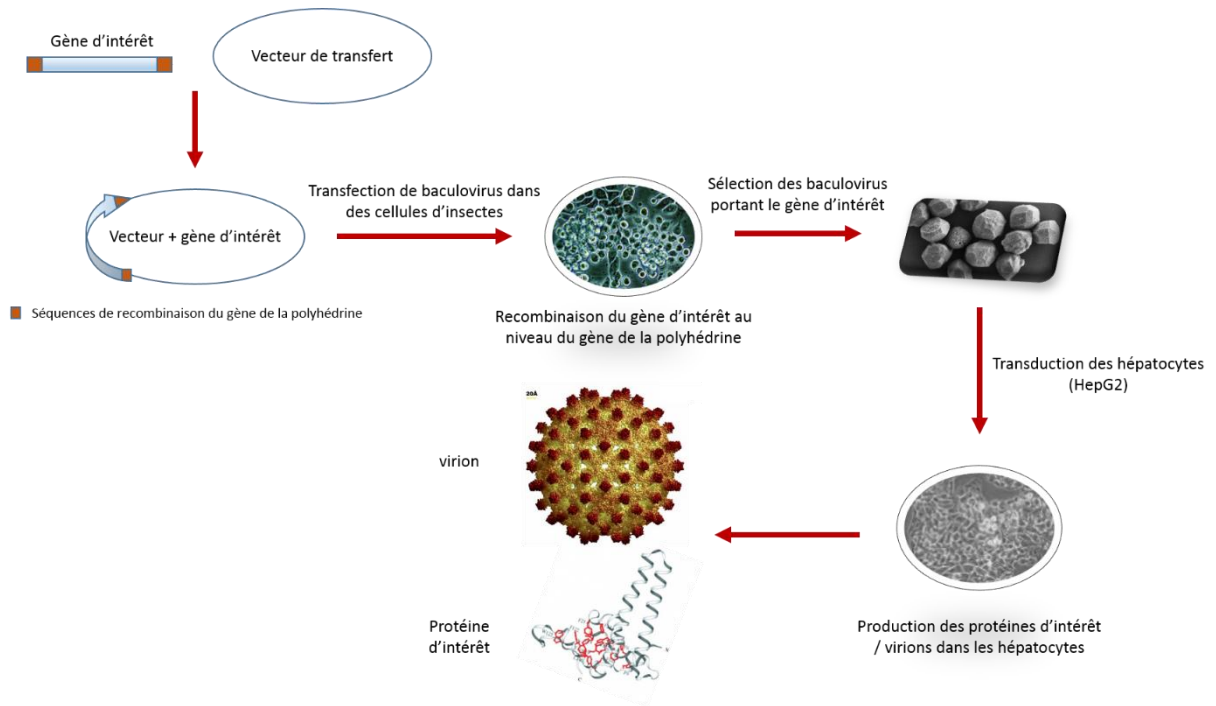


Figure 27 : Principe de la technologie de transduction par les baculovirus.

Le gène d'intérêt est flanqué des séquences de recombinaisons du gène de la polyhédrine présent sur le génome des baculovirus. L'insertion du gène d'intérêt dans le génome superenroulé du baculovirus a lieu dans les cellules d'insectes. Les baculovirus comportant le gène d'intérêt sont sélectionnés et transduits dans une lignée cellulaire comme les HepG2 qui permet la production de virion ou de protéines recombinantes selon le gène intégré initialement [140, 141].

Des études ont été menées sur la capacité d'infection des HepG2 par un baculovirus contenant 1,3 unités de génome du VHB à la place du gène codant la polyhédrine. En effet, il est nécessaire de délivrer cette quantité de génome afin de pouvoir obtenir l'ARNpg qui est plus long que le génome lui-même. Le modèle mis au point permet d'obtenir une réplication élevée du VHB. Il permet également de détecter l'ADNccc, même en faible quantité [140]. Ce système de transduction se révèle particulièrement intéressant pour l'étude de génomes mutés du VHB, notamment concernant les mutations de résistances. En effet, il suffit d'intégrer au baculovirus un génome modifié par mutagenèse dirigée. Ce système permet également d'évaluer l'efficacité de traitements antiviraux à différents stades de la réplication [141].

b) Vecteurs issus des virus adéno-associés

Les AAV sont de petits virus défectifs non enveloppés de 20 à 25 nm de diamètre. Leur découverte est liée à la mise en évidence de contaminant de cultures d'adénovirus d'où leur appellation. La co-infection entre un AAV et un adénovirus est nécessaire pour conduire à un cycle de réplication efficace. Cependant, aucune maladie humaine n'est aujourd'hui liée à une infection par les AAV. Seuls deux gènes sont codés par le génome des AAV : le gène *rep* est nécessaire à la réplication virale alors que le *cap* code les protéines structurales. Ces gènes sont bornés par deux séquences terminales répétées inversées (ITR). En l'absence de virus associé qui permettrait aux AAV de compléter leur cycle de réplication, le génome est intégré spécifiquement dans le génome de la cellule hôte et reste latent. Il existe plus de 100 variants d'AAV qui se distinguent par leur capsid. Cette grande diversité leur confère un tropisme varié et des caractéristiques de transduction différentes [142].

La construction d'AAV recombinant (rAAV) est possible en remplaçant les séquences codantes par le gène d'intérêt entre les ITR. La production de vecteurs AAV est réalisée par co-transfection de trois plasmides dans des cellules embryonnaires de rein humain, les HEK293T (Human Embryonic Kidney) qui sont très permissives. Le premier plasmide contient le gène d'intérêt borné par les séquences ITR du rAAV. Le second, appelé plasmide d'enveloppe, apporte les gènes codants les protéines *rep* et *cap* des AAV. Le troisième ou plasmide helper, comprend les gènes nécessaires à la complétude du cycle viral du rAAV (Figure 28). Initialement, la construction de vecteur rAAV nécessitait l'infection de la cellule permissive par les adénovirus directement pour apporter les gènes accessoires. Actuellement, l'utilisation d'un plasmide pour l'apport de ces gènes permet de limiter les contaminations [143]. Ensuite, l'infection des cellules cibles par le rAAV est classique puisque ce virus est facilement cultivable, et le transgène persiste dans la cellule transduite.

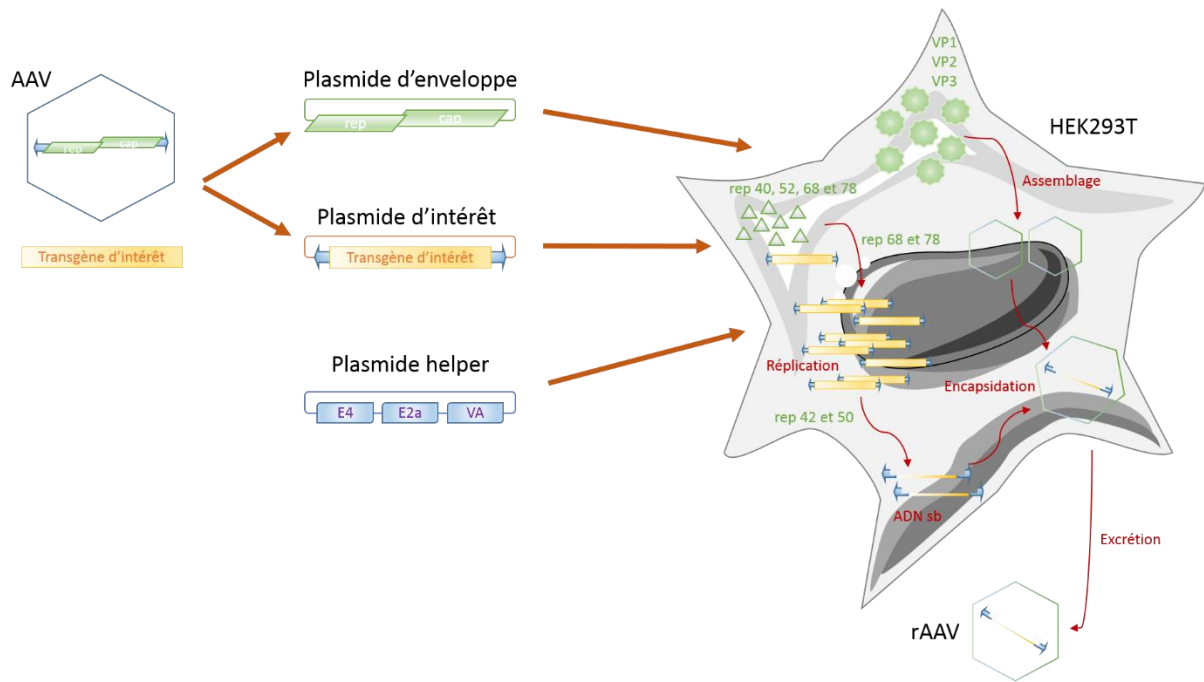


Figure 28 : Principe de la technologie de production des AAV recombinants.

AAV : virus adéno-associé. rAAV : virus adéno-associé recombinant. La production de rAAV est obtenue en co-transfectant trois plasmides dans des cellules permissives HEK293T : le plasmide d'enveloppe permet de synthétiser les protéines des AAV (rep : protéines liées à la réplication, cap : protéines structurales ou VP), le plasmide d'intérêt contient le transgène borné par les séquences nécessaires à l'intégration du génome dans le génome de la cellule hôte, le plasmide helper apporte les protéines des adénovirus nécessaires à la complétude du cycle AAV (E4 pour l'induction de l'apoptose, E2A pour la réplication de l'ADN, VA pour la régulation de la transcription). Ce schéma a été réalisé d'après Okada [144].

L'inconvénient majeur de cette technologie est la faible capacité d'intégration limitée à 4,7kb. Cependant, la faible toxicité, l'absence de maladie associée chez l'homme, la possibilité de cibler des cellules particulières selon le génotype d'AAV utilisé en font des points forts. Ces caractéristiques sont particulièrement intéressantes dans la thérapie génique [142]. Concernant le VHB, cette technologie permet de transduire le génome complet qui est de petite taille. Ainsi, plusieurs études récentes utilisent les rAAV pour mettre au point un modèle d'infection chez la souris qui permettrait d'étudier le cycle viral ou l'effet de molécules antivirales [145, 146]. Egalement, l'infection d'une souris transgénique par un rAAV contenant le génome du VHB a permis de détecter le cccDNA dans le foie de l'animal de façon persistante. Ce modèle pourrait ouvrir la voie d'études pour de nouvelles molécules

antivirales ciblant l'ADNccc [147]. Peu d'études utilisent cette technologie pour transduire une partie du génome du VHB. Seulement deux études asiatiques publiées ont utilisé cette technologie pour transduire des cellules dendritiques avec un rAAV contenant d'une part l'AgHBs et d'autre part l'AgHBc [148, 149].

c) Vecteurs lentiviraux

Les *Lentivirus* sont des virus enveloppés à génome ARN de la famille des *Retroviridae*. Ce sont des virus caractérisés par une longue période d'incubation, d'où leur nom, et un effet cytopathogène fort sur les cellules du système immunitaire. Le plus connu des *Lentivirus* est le VIH. Les vecteurs lentiviraux les plus fréquents dérivent de ce virus. Le cycle réplcatif du VIH comporte deux phases : une phase pré-intégrative et une phase post-intégrative. Au cours de la première étape, le VIH pénètre dans la cellule par fusion des membranes. L'ARN viral est alors décapsidé et rétro-transcrit puis transporté vers le noyau pour que l'ADN proviral s'intègre dans le génome de la cellule hôte. Lors de la deuxième étape, les gènes viraux intégrés sont transcrits par la machinerie cellulaire, les protéines virales traduites, la capsidie assemblée pour pouvoir libérer un virion infectieux par bourgeonnement des membranes. La production d'un vecteur lentiviral dans le but de l'utiliser *in vitro* nécessite la suppression de la phase post intégrative du cycle viral et des gènes pathogènes pour l'homme afin de sécuriser la technologie. Le principe de la technologie repose sur le remplacement des gènes pathogènes par un ou plusieurs gènes d'intérêt dans le génome de la particule lentivirale pour pouvoir ensuite reproduire la phase pré-intégrative dans la cellule cible. L'intégration des gènes d'intérêt dans le génome de la cellule permet une expression stable du transgène sans production de particules infectieuses. Les lentivirus ont donc l'avantage de n'entraîner aucune réaction immunitaire. Comme tous les vecteurs intégratifs, leur utilisation en thérapie génique reste soumise à la contrainte de la maîtrise du site d'intégration dans le génome cellulaire. Concernant leur utilisation en

recherche *in vitro*, ils ont l'avantage de pouvoir infecter des cellules quiescentes ou en division.

La production de ces vecteurs consiste en la co-transfection transitoire de trois vecteurs qui apportent chacun les gènes nécessaires à la constitution des particules dans des cellules HEK293T :

- Le plasmide d'expression contient le gène d'intérêt et les séquences conservées qui agissent en *cis*, c'est-à-dire qui doivent être retrouvées dans les particules virales.
- Le plasmide d'enveloppe contient les gènes des protéines d'enveloppe du VIH-1 ou d'un autre virus qui serait plus adapté aux cellules cibles.
- Le plasmide d'encapsulation contient les gènes des protéines structurales qui agissent en *trans* pour former les particules virales. Les séquences LTR (Long Terminal Repeat) ont été délétées pour éviter l'encapsulation et la retro-transcription de cet ARN.

Construction du plasmide d'expression

Le plasmide d'expression est construit par clonage moléculaire. Le gène d'intérêt, borné par des sites de restrictions enzymatiques, est intégré au niveau du site de multi-clonage (MCS) du vecteur d'expression. Les séquences du VIH-1 nécessaires agissant en *cis* sont également sur ce plasmide :

- La séquence RRE (Rev Response Elements) est nécessaire à la fixation de la protéine *rev* du VIH-1 qui va permettre l'export des transcrits viraux vers le cytoplasme ;
- La séquence Ψ est un signal spécifique pour l'encapsulation ;
- La séquence PBS (Primary Binding Site) est le site de fixation de l'amorce de retro-transcription ;

- La séquence cPPT (central PolyPurine Tract) est nécessaire à la synthèse du brin positif et à l'import nucléaire de l'ADN proviral.

Le gène d'intérêt est sous l'influence d'un promoteur fort, comme le promoteur CMV (Cytomegalovirus) qui est un promoteur viral ou le promoteur EF1- α (Elongation Factor) qui est un promoteur d'origine humaine. Ils entraînent des niveaux très importants de réplication du gène qu'ils contrôlent. De part et d'autres des séquences codantes (séquences VIH-1 et gène d'intérêt), des séquences non codantes LTR sont positionnées. Elles sont nécessaires à l'encapsulation des transcrits ARN et à leur rétro-transcription. La séquence U3, qui contient un promoteur viral et est nécessaire à l'intégration de l'ADN viral, compose également les LTR dans le VIH-1. Dans le cas des vecteurs d'expression, le LTR en 3' du vecteur a été délété afin d'assurer la biosécurité des vecteurs. En effet, lors de la rétro-transcription, la délétion est reportée en 5' et le vecteur est inactivé. La séquence WPRE (WHV Post-transcriptional Response Element) peut également être utilisée pour augmenter l'expression du gène d'intérêt (Figure 29).



Figure 29 : Plasmide d'expression contenant le gène d'intérêt.

La composition de ce plasmide est un exemple choisi par rapport au plasmide utilisé au laboratoire, d'autres constructions sont disponibles. Les séquences LTR sont les séquences non codantes du VIH-1 importantes pour la réplication virale. Les séquences en amont du transgène (PBS, Ψ , RRE et cPPT) sont les séquences régulatrices en cis. EF1- α est le promoteur qui contrôle le transgène. WPRE est une séquence non rétrovirale qui amplifierait l'expression du transgène. $\Delta U3$ signifie que la séquence LTR en 3' est délétée de la séquence U3 correspondant au promoteur viral.

Composition du plasmide d'enveloppe

Un des avantages de la technologie lentivirale est la possibilité de pseudotyper les particules afin d'améliorer leur tropisme cellulaire. Ainsi, il est possible d'utiliser d'autres protéines d'enveloppe que celles du VIH-1. La protéine la plus utilisée est la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), dont l'expression est contrôlée par un promoteur fort (Figure 30). En effet, cette protéine confère aux particules lentivirales un très large tropisme, notamment dans les cellules humaines. Seules quelques cellules ne sont pas transductibles par des particules exprimant la VSV-G à leur surface puisqu'elles n'expriment pas le récepteur qui a récemment été identifié [150]. L'utilisation de la VSV-G à la surface de l'enveloppe des particules lentivirales induit qu'elles suivent le cycle viral des virus VSV quant à la reconnaissance, l'entrée dans la cellule et la décapsidation des vecteurs.



Figure 30 : Composition du plasmide d'enveloppe.

La composition de ce plasmide est un exemple choisi par rapport au plasmide utilisé au laboratoire, d'autres constructions sont disponibles. Le gène de la glycoprotéine du VSV (VSV-G) est sous l'influence d'un promoteur fort (CMV) afin de la produire en quantité.

Composition du plasmide d'encapsidation

Le plasmide d'encapsidation contient les séquences en *trans* nécessaires à la formation de particules lentivirales effectives. Ces séquences sont sous l'influence d'un promoteur fort souvent viral comme le CMV. Plusieurs protéines virales sont nécessaires à l'obtention du vecteur lentiviral. Le plasmide d'encapsidation ou de transcomplémentation contient donc les protéines *gag*, *pro*, *pol*, *tat* et *rev*. La séquence Ψ a été déléetée pour éviter toute encapsidation des protéines du VIH-1 (Figure 31). La séquence *gag* code les protéines de capsid nécessaires pour l'encapsidation du génome du vecteur lentiviral codé par le

vecteur d'expression. La séquence *pro* code la protéase virale nécessaire au clivage *gag/pol*. La séquence *pol* permet la synthèse des enzymes intervenant dans la réplication virale, la reverse transcriptase et l'intégrase. Les gènes *tat* et *rev* sont nécessaires lors de l'assemblage des particules lentivirales et agissent comme des activateurs transcriptionnel et post-transcriptionnel respectivement. La protéine *rev* est en effet capable de se fixer sur la séquence RRE afin de permettre l'export des ARN viraux vers le cytoplasme. Le plasmide ne contient aucune séquence d'intégration comme les LTR ou de réplication comme cPPT. Afin d'améliorer encore la biosécurité des vecteurs, certaines équipes utilisent quatre plasmides en séparant le plasmide d'encapsulation et en isolant la protéine *rev*.

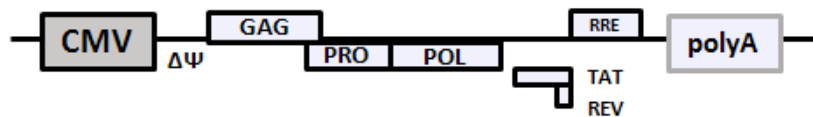


Figure 31 : Composition du plasmide d'encapsulation.

La composition de ce plasmide est un exemple choisi par rapport au plasmide utilisé au laboratoire, d'autres constructions sont disponibles. Les séquences en amont du transgène gag, pro, pol, tat et rev sont issues du VIH-1 et sont nécessaires en trans à l'obtention de particules virales effectives. CMV est un promoteur fort. ΔΨ signifie que la région Ψ est déléetée.

Production des particules lentivirales

Pour produire des particules, les trois plasmides décrits ci-dessus sont transfectés transitoirement dans les cellules HEK293T (Figure 32). Ces cellules sont très permissives et permettent la production de forts titres viraux. Pour améliorer le titre viral, une ultra-centrifugation du surnageant cellulaire filtré est possible [151].

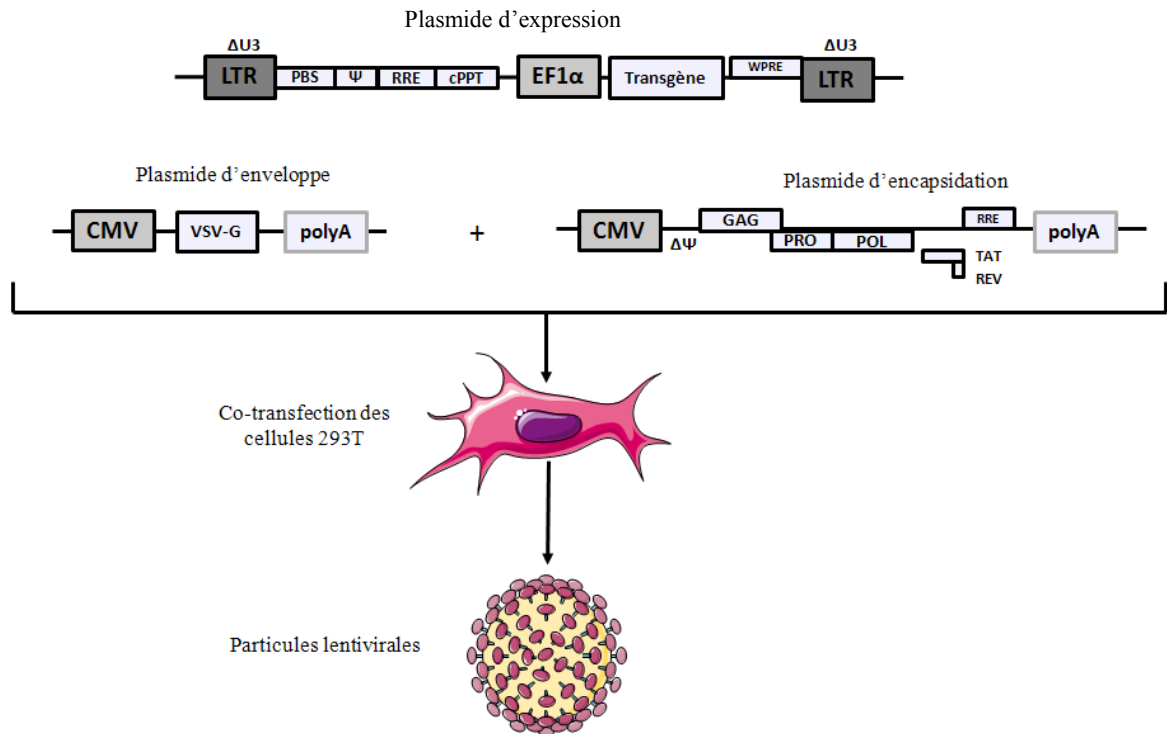


Figure 32 : Principe de production de particules lentivirales par co-transfection transitoire. Les trois plasmides (*expression, enveloppe et encapsidation*) sont transfectés simultanément dans des cellules HEK293T. Chaque plasmide exprime les protéines structurales, enzymatiques ou accessoires en *cis* ou en *trans* nécessaires à la constitution de particules virales fonctionnelles. Les cellules 293T sont utilisées comme « support » de production et les particules virales fonctionnelles sont libérées dans le surnageant. Ce dernier est filtré et peut être ultracentrifugé pour améliorer la concentration des particules.

Le titre viral peut être estimé par la mesure en ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) de l'Ag p24 du VIH-1 qui est codée par la séquence *gag* et constitue la capsid de la particule virale. Le titre ARN peut également être utilisé en réalisant une RT-qPCR ciblant les gènes clés du vecteur d'expression (PBS) sur la suspension virale [152]. Cependant, ces deux technologies de quantification du nombre de particules virales dans le surnageant surestiment le titre infectieux en tenant compte des particules virales vides pour l'Ag p24 ou des particules virales défectives pour le titre ARN [153]. Si le transgène le permet, il est possible d'utiliser des techniques indirectes de quantification après transduction des cellules par les particules lentivirales. En effet, l'utilisation de la cytométrie en flux est soumise à l'existence d'Ac marqué par un fluorochrome dirigé contre la protéine

d'intérêt ou à l'utilisation d'une protéine d'intérêt directement fluorescente ou construite en fusion avec une protéine fluorescente comme la GFP (Green Fluorescent Protein). La quantification de l'ADN intégré par qPCR est également possible après transduction de cellules [152].

La technologie lentivirale présente de nombreux avantages pour son utilisation *in vitro*. En effet, c'est un système d'expression stable dans les cellules quiescentes ou en division. De plus, la possibilité de pseudotyper les particules permet d'obtenir un tropisme très large. Autre avantage, il n'y a aucun effet cytopathogène de ces particules lentivirales, ce qui garantit l'absence d'interférence lors de la production de protéines virales (si le transgène est d'origine viral) dans les cellules cibles. L'inconvénient majeur supporté est la question de la biosécurité. Cependant, depuis plusieurs années, ce paramètre s'améliore continuellement pour qu'aujourd'hui, ce ne soit plus un problème pour les études *in vitro*. Contrairement aux AAV, les vecteurs lentiviraux présentent de plus un faible potentiel immunogène et une capacité de clonage allant jusqu'à 8kb [154]. Comme pour les AAV, il est donc possible de transduire le génome complet du VHB et de produire des pseudo-particules. Une étude récente a d'ailleurs montré via l'utilisation de ces particules construites par la technologie lentivirale, que la présence du NTCP à la surface des cellules était un élément nécessaire mais non suffisant à l'établissement de l'infection par le VHB [155]. Il a également été démontré que l'utilisation d'un vecteur lentiviral exprimant la protéine HBc induisait une réponse immunitaire cellulaire chez la souris [156]. Peu d'études se sont intéressées à la production de protéines du VHB par la technologie lentivirale, mais une étude a montré que le niveau d'ADN transféré dans le foie de la souris et la persistance de l'ADN du VHB et de l'AgHBs était supérieur en utilisant la technologie lentivirale par rapport aux AAV [157].

**OBJECTIFS DES
TRAVAUX DE
RECHERCHE**

Concernant le PBC, l'implication des mutations dans la sévérité des lésions hépatiques est aujourd'hui définie comme favorisant une évolution vers le CHC ou la cirrhose. Malgré de nombreuses publications sur le sujet, le rôle des mutants PC reste controversé. Au cours de ces travaux, nous avons abordé l'étude des mutations des régions PC et PBC sous deux approches différentes.

1- Une approche clinique comprenant deux études qui ont permis de préciser les données épidémiologiques françaises concernant la prévalence des mutants des régions PC et PBC. La première étude, menée en collaboration avec l'Institut National de Transfusion Sanguine (INTS), avait pour objectif d'identifier la prévalence de ces mutations dans une population de donneurs de sang découverts séropositifs pour le VHB à l'occasion de leur don. La deuxième étude, multicentrique et financée par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites (ANRS), a été réalisée chez des patients porteurs chroniques du VHB et suivis pour cette infection dans les services de Gastro-entérologie des centres hospitaliers français. Dans cette deuxième étude, l'objectif secondaire était d'établir un lien entre la présence des mutations PC et PBC et la sévérité des lésions hépatiques chez les patients infectés par le VHB.

2- Nous nous sommes orientées vers une approche plus fondamentale de l'étude du rôle des mutations des régions PC et PBC sur la sévérité des lésions hépatiques. A travers le projet Lenticore, nous souhaitons apporter des outils et des connaissances supplémentaires concernant l'impact *in vitro* des mutations des PBC et PC sur la fibrose hépatique. Ce projet comporte plusieurs étapes :

- construire les particules lentivirales contenant des séquences d'intérêt du VHB
- produire les protéines HBe et HBc après transduction des lignées HepaRG

La mise en place de ces outils technologiques constitue une approche innovante dans l'étude *in vitro* des protéines du VHB et un réel pari scientifique puisque la transduction des HepaRG par les lentivirus n'a jamais été décrite à ce jour. Enfin, le dernier objectif du projet

L'objectif sera d'étudier le rôle des protéines HBe et HBc du VHB et des mutants PBC et PC dans la modulation de la sécrétion de cytokines pro-fibrotiques (collagène 1, TGF- β , PDGF, α -SMA, MMP-1) par les hépatocytes. La culture du VHB restant toujours difficile, un modèle de co-culture d'hépatocytes et de cellules hépatiques stellaires est en développement au laboratoire. Ce troisième volet reste une perspective à poursuivre suite à ce travail de thèse.

TRAVAUX DE THESE

1. Chapitre 1 : Etude des mutations de la région PC du VHB chez les donneurs de sang

Correlation Between The Promoter Basal Core and Precore Mutations and HBsAg Quantification in French Blood Donors Infected With Hepatitis B Virus. A. Pivert, A. Servant-Delmas, F. Lunel-Fabiani, H. Le Guillou-Guillemette, S. Laperche, and A. Ducancelle. **J. Med. Virol.** 87 : 529–535, **2015**.

L'infection chronique par le VHB comporte plusieurs phases en fonction de l'équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et l'agent pathogène. Au cours de la phase d'infection chronique AgHBe négative, anciennement nommée « portage inactif », le système immunitaire contrôle parfaitement la réplication virale qui est très réduite voire inhibée. Ce mécanisme explique que les lésions hépatiques soient minimales, et le patient est souvent asymptomatique. Certains auteurs se sont intéressés à la prévalence des mutants PC et du PBC dans une population particulière de patients, les donneurs de sang nouvellement dépistés AgHBs. Ces patients étaient dans la majorité des cas dans la phase d'infection chronique AgHBe négative. Ces études ont montré une forte prévalence des mutants PC chez ces patients [108, 158]. Sachant qu'il n'existait aucune donnée chez les donneurs de sang français, nous avons initié un projet en collaboration avec le Dr Syria Laperche (INTS) et les Etablissements Français du Sang (EFS) afin d'étudier la prévalence des mutants PBC et PC dans cette population.

Notre étude, menée chez 200 volontaires donneurs de sang présentant une sérologie positive pour l'AgHBs confirmée sur un deuxième prélèvement, a été réalisée entre 2006 et 2007. Les sérologies VIH et VHC étaient négatives, et les patients naïfs de traitement contre le VHB. Les données épidémiologiques (âge, sexe, origine géographique, mode de

contamination) et des données cliniques ont été colligées à l'aide d'un questionnaire diffusé préalablement à tous les centres de transfusion.

Le statut sérologique vis-à-vis du VHB a été fourni par l'INTS. Contrairement au statut Ac antiHBe, les résultats de l'AgHBe n'étaient malheureusement disponibles que pour une minorité de patient (77/200). La charge virale VHB par qPCR en temps réel, le génotypage des souches de VHB par séquençage de la polymérase et la recherche des mutations par séquençage des régions PBC et PC ont également été réalisés au laboratoire de Virologie du CHU d'Angers. Concernant le génotypage, les séquences réalisées ont été comparées une à une à une banque de données contenant l'ensemble des 8 génotypes décrits. La quantification de l'AgHBs a également été réalisée afin de montrer l'intérêt d'utiliser ce marqueur virologique dans cette population particulière de patients et d'étudier le titre d'AgHBs en fonction du génotype et du profil des mutations PBC et PC.

Le génotypage des souches de VHB a confirmé la prédominance des infections par des souches de VHB de génotypes D (36%), A (29%), et E (20%). La prévalence pour les génotypes B et C était faible. Concernant les mutations des régions PBC et PC, la mutation G1896A (mutation PC) a été retrouvée chez 60% des donneurs (107/180) alors que le double mutant PBC était minoritaire (63/172, 37%). Ces mutations étaient principalement retrouvées chez les patients présentant des Ac anti-HBe (94% pour les mutants PC, 85% pour les mutants PBC). Les donneurs de sang infectés par un virus portant la mutation PC avaient une charge virale VHB significativement plus basse que ceux infectés par un virus PC sauvage (3,28 log UI/ml versus 4,28 log UI/ml, $p=0,0002$) ainsi qu'un titre AgHBs plus faible (3,73 log UI/ml versus 4,21 log UI/ml, $p=0,003$). En revanche, nous n'avons pas montré de différence significative entre les charges virales et les titres d'AgHBs chez les donneurs de sang infectés par un virus portant la double mutation PBC et ceux infectés par un virus PBC sauvage. Une analyse multivariée a été réalisée pour chacune des mutations PC et PBC mais l'effectif trop faible des populations virales détectées n'a pas permis

d'obtenir des résultats probants. D'autre part, l'absence de données concernant la gravité des lésions hépatiques a limité l'étude des facteurs indépendants de fibrose.

Cette étude a permis de confirmer les données de la littérature concernant d'une part la distribution des génotypes en France [159-161] ; et d'autre part, la forte prévalence de la mutation PC dans la population des donneurs de sang [108, 158]. Nous avons également montré que la charge virale et le niveau d'AgHBs étaient diminués lorsque la mutation PC était présente, ce qui suggère une infection virale moins productive chez ces patients avec un contrôle de la réplication virale par le système immunitaire. Sachant que les donneurs de sang dans notre étude étaient tous asymptomatiques au moment de leur don, il est probable que la majorité d'entre eux étaient au stade d'infection chronique AgHBe négative. Cependant, nous ne disposions pas des données de la biopsie hépatique ou des marqueurs non invasifs de fibrose ni du dosage des transaminases pour confirmer cette hypothèse. Ces résultats posent la question du rôle de la mutation G1896A dans la sévérité des lésions hépatiques. En effet, dans notre étude, la mutation G1896A était plutôt associée à une évolution favorable de la maladie hépatique. Les différentes phases décrites dans l'histoire naturelle de l'hépatite chronique B suivent un processus dynamique au cours du temps sous la pression de la réponse immunitaire de l'hôte. La sélection des mutants PBC et PC pourrait également contribuer à ce processus complexe selon des mécanismes encore inconnus.

Correlation Between The Promoter Basal Core and Precore Mutations and HBsAg Quantification in French Blood Donors Infected With Hepatitis B Virus

A. Pivert,¹ A. Servant-Delmas,² F. Lunel-Fabiani,¹ H. Le Guillou-Guillemette,¹ S. Laperche,² and A. Ducancelle^{1*}

¹Laboratoire de virologie et Laboratoire HIFIH, UPRES EA 3859, University Hospital Angers, 4, rue Larrey 49000, Angers, France

²Département d'études des agents transmissibles par le sang, Centre national de référence des hépatites B et C et du VIH en transfusion, National Blood Transfusion Institute, F-75015, Paris, France

Hepatitis B virus (HBV) basal core promoter (BCP) and precore (PC) mutations, HBV viral load and HBV surface antigen (HBsAg) quantification were screened to assess correlations between these HBV markers in asymptomatic chronic hepatitis B carriers in France. From January 2006 to July 2007, 200 sera were collected from patients who were discovered to be HBsAg-positive when they volunteered to give blood. Direct sequencing of precore/core gene was used to detect A1762T/G1764A mutations in the BCP and G1896A in the PC region. HBV viral load and HBsAg were quantified with two commercial assays. The prevalence of the BCP and PC mixed/mutants were 37% and 60% respectively ($P=0.0001$). HBV DNA level and HBsAg titer were significantly lower in subjects harboring the mixed/mutant PC virus compared to those infected by the wild phenotype. No significant difference was observed in HBV viral loads of blood donors infected by wild or mixed/mutant BCP viruses. Mutant or mixed PC virus was associated with male gender, HBeAb-positive status and HBV/D and HBV/E genotypes. BCP mutations were associated with age, and both HBV/A-HBV/E genotypes. The genetic properties of HBV in this cohort showed that most of the blood donors had a negative HBeAg serological status and harbored the PC mutant phenotype in combination with low levels of both HBV DNA and HBsAg. As the study was conducted in healthy subjects who could be considered as asymptomatic carriers, these results suggest a possible protective effect of the G1896A mutation against severe liver lesions. **J. Med. Virol.** 87:529–535, 2015.

© 2014 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: hepatitis B; blood donor; G1896A mutation; basal core promoter mutation; HBsAg titre

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) is the most common cause of serious liver disease in the world [McMahon, 2014]. Beyond the manifestations associated with acute hepatitis, chronic HBV infection results in a highly increased risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (Bruix and Llovet, 2003; Llovet et al., 2003).

HBV has been classified into 8 genotypes separated by more than 8% genetic diversity (A–H) in the entire genome sequence [Pujol et al., 2009]. Subgenotype diversity has also been described within several HBV genotypes, with a minimum genetic distance of 4%. Genotype A (HBV/A) is distributed worldwide and is the main genotype found in Europe, North America, Africa and India. Genotypes B (HBV/B) and C (HBV/C) are predominant in East and Southeast Asia and Australia. Genotype D (HBV/D) is mainly found in the Mediterranean countries and in India. Genotype E (HBV/E) is most frequent in West Africa. Genotype G (HBV/G) has been characterized in samples from

*Corresponding author: Alexandra Ducancelle, CHU d'Angers, Laboratoire de virologie et Laboratoire HIFIH, UPRES EA 3859, 4, rue Larrey, 49000 Angers, France.
E-mail: alducancelle@chu-angers.fr

Accepted 1 August 2014

DOI 10.1002/jmv.24064

Published online 29 August 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

the USA, Mexico, and France. Genotypes F (HBV/F) and H (HBV/H) are found exclusively in Central and South America.

A number of genetic variants have been reported in the basic core promoter (BCP) and the precore (PC) regions. The most frequently reported variants in the BCP region are an A-to-T substitution at position 1762 and a G-to-A substitution at position 1764, both involved in decreasing hepatitis B e antigen (HBeAg) expression [Okamoto et al., 1994]. G-to-A change at nucleotide 1896 (codon 28) in the PC region (G1896A mutation or PC mutation), which creates a premature stop codon, prevents the translation of the precore protein and completely abolishes the production of HBeAg [Carman et al., 1989]. Mutations in the BCP and the PC regions of the HBV genome are associated with variations in viral replication rates and severity of liver disease [Kitab et al., 2012; Tong, 2005; Truong et al., 2007; Datta et al., 2008; Tsai et al., 2008]. Few data are available concerning BCP and PC mutations in the setting of blood donation. Recently, several studies described a high frequency of G1896A mutation (>55%) in Indian, Scottish and French blood donors who were positive for hepatitis B surface antigen (HBsAg) [Davidson et al., 2005; Ducancelle et al., 2011; Vivekanandan et al., 2004]. The results of those studies support the notion that BCP and/or PC mutants may be under-reported in asymptomatic chronic HBV carriers.

Recently, quantitative immunoassays for the detection of HBsAg became available. They offer more reliable quantitative data for the prediction of clinical and treatment outcomes [Moucarri et al., 2009a] or for the classification of patients during chronic HBV infection [Martinot-Peignoux et al., 2013]. Data concerning the quantitation of HBsAg in asymptomatic chronic HBV carriers remain limited. Therefore, the present study was conducted to investigate the distribution of BCP and PC mutants and their correlation with HBV DNA viral load and HBsAg levels in asymptomatic French blood donors positive for HBsAg.

MATERIALS AND METHODS

Samples

In France, all HBsAg-positive blood donations are centralized prospectively in the national reference center for HBV and HCV in blood transfusions within the National Blood Transfusion Institute (NBTI) for further investigations. From January 2006 to July 2007, 200 voluntary blood donors, deferred subsequently, who were identified as HBsAg-positive in French blood centers (including overseas departments and territories) were included in this study. Blood donors were informed that their samples could be used for research purposes at the time of sampling. All included blood donors were naive of any antiviral treatment against HBV and negative for anti-HCV and anti-HIV antibodies.

For all included donors, epidemiological characteristics (age, sex, origin, risk factor of contamination) and virological data (HBeAg, antibody against HBeAg (anti-HBe), HBV viral load, and HBV genotype) were retrieved from the national blood donor surveillance data bank at the NBTI.

HBV Infection Markers

HBsAg and antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc) were assessed using the Prism assays (Abbott Diagnostics, Rungis, France), Monolisa HBsAg plus (Biorad, Marnes la Coquette, France) and Monolisa anti-HBc Plus (Biorad) in continental France and AxSYM (Abbott Diagnostics) in the overseas departments and territories. HBeAg and HBeAb were tested with Ag/Ac EBK assay (Diasorin, Saluggia, Italy) and antibodies against HBsAg (HBsAb) with AUSAB IMx or Murex anti-HBs (Diasorin). HBV DNA viral load was determined using COBAS Taqman HBV assay (Roche Diagnostics, Meylan, France) showing a limit of detection of 6 IU/ml (linear quantitation range from 20 IU/ml–1.7 10⁸ IU/ml).

HBV genotyping was based on an S-gene sequencing method described elsewhere [Servant-Delmas et al., 2010].

Detection of BCP and PC Mutations

HBV DNA extraction and amplification. Molecular characterization of BCP and PC mutations was performed in Angers University Hospital. HBV-DNA was extracted from 500 µl of plasma using the m2000 sp Platform (Abbott Molecular Diagnostics, Les Plaines, USA) according to the manufacturer's instructions. Amplification of the BCP/PC region was performed with an in-house nested PCR protocol as described previously [Friedt et al., 1999]. PCR products covering the BCP/PC region (363 bp) were purified using Nucleospin Extract II columns (Macherey Nagel, Düren, Germany) and used as templates for direct sequencing. Purified BCP/PC PCR products were sequenced bi-directionally using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies). After purification, sequences of amplified nucleic acids were determined using the ABI 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, Foster City, USA).

Analysis of HBV sequences. Nucleotide sequences were analyzed with SeqScape software (Life Technologies, Foster City, USA). BCP and PC region sequence changes were used to determine the wild/mixed/mutant PC and BCP phenotypes. The presence of a point mutation from G-to-A at the nucleotide 1896 defined the mutant PC phenotype (G1896A). The two-nucleotide substitutions A-T at nucleotide 1762 and G-A at nucleotide 1764 (A1762T/G1764A) corresponded to the double mutant BCP phenotype. At these positions, mixed populations were defined by the detection of the two wild/mutant phenotypes at 20% minimum [Wang et al., 2007; Varghese et al., 2009].

HBsAg Quantitation

HBsAg was quantified using Architect HBsAg QT (Abbott Diagnostics) on an I1000sr automate, which has a range of quantification from 0.05–250.0 IU/ml. Samples were automatically tested at a dilution of 1:500 and those with HBsAg levels under 175 IU/ml were retested 1:1.

Statistical Analysis

Data handling and analyses were performed with SPSS software for Windows, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Groups were compared for distributed data using the Student's *t*-test. Statistical comparisons of samples with BCP and PC phenotypes were performed using Mann-Whitney and Fisher's exact tests as appropriate. A logistic regression was used to determine whether the identified variables (age, sex, HBe status, HBV DNA, HBsAg titer, HBV genotypes) were associated with the presence of BCP and PC mutations. The Spearman correlation coefficient was used to correlate serum levels of HBsAg and HBV DNA levels. $P \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Characteristics of HBV Blood Donors

Among the 200 included donors, there were 68 women and 132 men with a mean age of 30 years (range: 18–64 years).

Fifty-six percent of the subjects originated from Africa, 39% from Europe and 5% from Asia. Coming from an endemic area (43%) was the highest ranking identified risk factor, followed by transfusion history (19%), nosocomial transmission (7%), intrafamilial contamination (3%), vertical transmission (1%), sexual transmission (1%), and drug addiction (1%). These risk factors were combined in 19% of the cases whereas no risk factor was identified in 6% of the cases.

Eighty-five percent (170/200) of the samples were HBeAg-negative and HBeAb-positive. All of the HBeAg-negative samples were HBeAb-positive and vice versa.

HBV/D was predominant (36%), followed by HBV/A (29%), HBV/E (20%), HBV/C (8%), HBV/B (6%) and HBV/F (1%). The mean age (\pm SD) of donors infected with HBV/D (32 ± 12 years) was significantly higher than that of donors infected with HBV/C (26 ± 8 years) or HBV/E (26 ± 7 years) ($P = 0.01$). There was no significant difference in age between subjects infected with HBV/D or HBV/A (29 ± 12 years) or HBV/B (28.5 ± 11 years).

The mean of HBV viral load (\pm SD) for the 200 samples was low ($3.49 \log \text{IU/ml} \pm 1.90$). HBV/B-infected blood donors had higher viral loads ($4.77 \log \text{IU/ml} \pm 2.71$) than the others but the difference was not significant: HBV/A ($3.33 \log \text{IU/ml} \pm 2$; $P = 0.10$), HBV/C ($4.44 \log \text{IU/ml} \pm 2.83$; $P = 0.50$), HBV/D ($3.16 \log \text{IU/ml} \pm 1.46$; $P = 0.06$), HBV/E

($3.76 \log \text{IU/ml} \pm 1.55$; $P = 0.24$) and HBV/F ($4.12 \log \text{IU/ml} \pm 2.30$; $P = 0.76$).

The rate of HBeAb-positive samples according to genotype was: 96% (69/72) for HBV/D, 87% (35/40) for HBV/E, 81% (46/57) for HBV/A, 75% (12/16) for HBV/C and 50% (6/12) for HBV/B.

PC and BCP Mutations

PC mutation profiles were determined in 180 subjects: 73 (40%) and 107 (60%) harbored respectively G1896 wild-type and A/G1896 mixed viruses. BCP mutation profiles were successfully obtained in 172 blood donors. Wild and mutant/mixed viruses were found respectively in 109/172 (63%) and 63/172 (37%) samples (Tables I and II).

Tables I and II illustrate the distribution of the BCP and PC mutations according to demographic and virological data. Conversely to the BCP mutations, blood donors infected by the mixed-mutant PC virus were younger than those infected by the wild PC virus. The mutated and mixed PC viral populations were distributed mostly in males (OR = 11.4, [95% CI 4.55; 30.25]). Mixed/mutated BCP and PC populations were distributed mostly in anti-HBe-positive patients as compared to patients without anti-HBe: 94% (101/107) versus 6% (6/107) in position 1896 ($P < 0.0001$) and 85% (54/63) versus 14% (9/63) in nucleotides 1762/1764. No significant differences were noted in HBV viral load between wild and mutated-mixed BCP populations ($3.73 \log \text{IU/ml}$ versus $3.59 \log \text{IU/ml}$, $P = 0.6$). In contrast, HBV viral load was lower in blood donors harboring the mutant PC virus compared to those infected by the wild virus: $3.28 \log \text{IU/ml}$ versus $4.28 \log \text{IU/ml}$ ($P = 0.0002$). The distribution of BCP and PC mutations appeared to be correlated with the HBV genotype: the G1896A mutation was associated with HBV/D and HBV/E, while the BCP mutant was mostly found in genotypes HBV/A and HBV/C.

HBsAg Quantitation

The median and mean of HBsAg titers in the blood donor population were respectively 4,386 IU/ml and 3,602 IU/ml (range 0.15–186,245 IU/ml). Univariate analysis showed a correlation of HBsAg levels with age groups. The mean HBsAg titer was higher in the age groups <19 years (15,030 IU/ml) and 20–30 years (10,528 IU/ml), compared to the groups 31–40 years (4,371 IU/ml, $P = 0.026$), 41–50 years (6,034 IU/ml, $P = 0.01$) and 51–65 years (4,804 IU/ml, $P = 0.04$).

The mean HBsAg titer according to the HBV genotypes showed a higher, but statistically insignificant, value for HBV/C: 18,739 IU/ml versus 11,228 IU/ml for HBV/A, 4,454 IU/ml for HBV/B, 5,495 IU/ml for HBV/D, 12,042 IU/ml for HBV/E and 13,429 IU/ml for HBV/F.

As relates to the HBe status, the mean HBsAg level was higher in HBeAg-positive subjects

TABLE I. Relationship Between Wild and Mixed/Mutant Type Precore Virus (PC) and HBV Infection Markers in HBV Deferred Blood Donors

Blood donor characteristics	Wild PC	Mixed/Mutant PC	P-value	OR	CI 95%
Number/total	73/180	107/180			
%	40	60			
Age					
Mean	29.61	27.52	0.22	0.5	[0.26; 0.95]
SD	11.76	10.66			
CI 95%	[26.86; 32.35]	[25.47; 29.56]			
Gender					
Female	30	6	<0.0001	0.08	[0.03; 0.21]
Male	43	101	<0.0001	11.4	[4.55; 30.25]
HBe Status					
anti-HBe positive (%)	50 (68)	101 (94)	<0.0001	7.7	[2.96; 20.22]
anti-HBe negative (%)	23 (32)	6 (6)	<0.0001	0.12	[0.04; 0.33]
HBV DNA					
Mean	4.28	3.28	0.0002	0.5	[0.11; 2.20]
SD	2.36	1.19			
CI 95%	[3.79; 4.83]	[3.05; 3.50]			
HBsAg titer					
mean	16550	5459	0.003		
SD	31277	6263			
CI 95%	[9552; 23847]	[4258; 6659]			
HBV genotypes					
A	41	9	<0.0001	0.07	[0.03; 0.16]
B	8	3	NS	0.23	[0.06; 0.91]
C	7	8	NS	0.76	[0.26; 2.20]
D	9	56	<0.0001	7.8	[3.52; 17.27]
E	7	31	0.001	3.84	[1.58; 9.30]
F	1	0	NS		

OR, odds ratio; SD, standard deviation; NS, not significant.

TABLE II. Relationship Between Wild and Mixed/mutant Type BCP Virus and HBV Infection Markers in HBV Deferred Blood Donors

Blood donor characteristics	Wild BCP	Mixed/Mutant BCP	p-value	OR	CI 95%
Number/total	109/172	63/172			
%	63	37			
Age					
Mean	28.18	29.24	0.56	2.48	[1.29; 4.78]
SD	11.15	11.64			
CI 95%	[26.06; 30.298]	[26.30; 32.17]			
Gender					
Female	41	16	NS	0.56	[0.28; 1.12]
Male	68	47	0.02	1.77	[0.89; 3.52]
HBe status					
HBeAb positive (%)	91 (83)	54 (85)	NS	1.18	[0.49; 2.82]
HBeAb negative (%)	18 (16)	9 (14)	NS	0.84	[0.35; 2]
HBV DNA					
Mean	3.73	3.59	0.6	1.7	[0.38; 7.51]
SD	1.9	1.61			
CI 95%	[3.36; 4.09]	[3.18; 3.99]			
HBsAg titer					
mean	11955	6798	0.058	1	
SD	26285	8295			
CI 95%	[6964; 16945]	[4708; 8887]			
HBV genotypes					
A	22	26	0.01	2.77	[1.30; 5.51]
B	11	0	0.01	nd	
C	5	10	0.01	3.92	[1.27; 12]
D	40	20	NS	0.8	[0.40; 1.54]
E	30	7	0.02	0.32	[0.13; 0.80]
F	1	0	NS	nd	

OR, odds ratio; SD, standard deviation; NS, not significant.

compared to HBeAg-negative patients: 30,330 IU/ml versus 5,830 IU/ml ($P=0.005$).

Interestingly, HBsAg titer appeared to correlate with the BCP/PC mutation profiles. HBsAg titer was significantly lower in subjects harboring the mutant PC virus than in those with the wild PC virus: 5,459 IU/ml versus 16,550 IU/ml ($P=0.003$). No significant difference was observed between HBsAg titers of mutant and wild BCP viruses: 6,798 IU/ml versus 11,955 IU/ml ($P=0.058$). HBsAg titer was increased, albeit insignificantly, in subjects infected with a BCP mutant virus compared to those infected with a PC mutant virus.

Overall, HBsAg titer and HBV DNA serum levels were very weakly correlated ($r=0.01$). However, the correlation between HBsAg titer and HBV DNA was stronger in HBeAg-positive subjects ($r=0.66$ vs. $r=0.11$ for HBeAg-negative subjects, data not shown).

DISCUSSION

The present study provides information on the distribution of BCP and PC mutations and their relationship with HBV genotypes, HBe status, HBV DNA level and HBsAg titer in French blood donors. The distribution of HBV genotypes observed in this study is in line with the results obtained previously in a French multicenter retrospective study performed in 262 patients with chronic HBV infection, in which the most frequent genotypes were D (27%) and A (24%), followed by E (13%), C (12%) and B (7%) [Halfon et al., 2006]. The higher proportion of HBV/E in the present study (20% versus 13%) is explained by the high percentage of African subjects. This genotype is particularly of concern for two reasons. Firstly, from an epidemiological point of view, the prevalence of HBV/E might increase over the next few decades in countries submitted to migratory flow from Africa. Secondly, few data are available regarding its clinical characteristics. In this study, a significant proportion of HBV/C (8%) was also found among the voluntary blood donors characterized by Asian origin and younger age. The younger age for HBV/C-infected subjects could be explained by the route of transmission, mostly mother-to-child in Asia, as opposed to sexual transmission or childhood contamination in Africa.

The present study demonstrated a high prevalence for the G1896A mutation (60% in the entire population, 94% in HBeAg-negative/anti-HBe-positive subjects) in French blood donors. BCP mutants were found less frequently (37% in the entire population). Davidson et al. reported a similar prevalence of PC mutations (55%) in HBeAg-negative/HBeAb-positive samples [Davidson et al., 2005]. High frequencies of G1896A mutation (65% and 83%) have been described in Indian blood donors infected by HBV and in 18 genotype-E carriers in Senegal [Vivekanandan et al., 2004; Vray et al., 2006]. Biswas et al. reported

a lower rate of PC mutations (32.7%) in 55 blood donors from eastern India, but in their study the detection of the G1896A mutation was performed using PCR-RFLP, which failed in approximately a quarter of the HBeAg-negative population, offering a possible explanation for the discrepancy with others studies [Biswas et al., 2008].

The present study demonstrated that blood donors infected by PC mutants had both significantly lower HBV viral load and HBsAg titer than those infected by wild PC type (3.28 log IU/ml vs. 4.28 log IU/ml and 5,449 IU/ml vs. 16,550 IU/ml). Interestingly, the mean viral load observed in PC mutants (3.28 log IU/ml) was below the threshold proposed by the European Association for the Study of the Liver (EASL) to define the inactive state of HBV (2,000 IU/ml i.e., 3.30 log IU/ml) [EASL, 2012]. In addition, Brunetto et al. demonstrated that quantitative HBsAg may be used as a surrogate marker to differentiate active and inactive carriers [Brunetto et al., 2010]. However, the present study was conducted in healthy subjects who could be considered as inactive carriers; since the asymptomatic subjects mostly harbored the mutant PC virus in combination with low levels of both HBV DNA and HBsAg, it appears probable that these virological patterns corresponded to a less productive HBV infection and that no significant liver disease had occurred in the subjects at the time of inclusion. Unfortunately, neither histological data nor ALT determination was available to confirm this hypothesis. These results raise the question of the protective role of the G1896A mutation against severe liver injuries. Previous findings supported that the PC mutant phenotype influences the evolution of HBV infection toward a state of inactive carriage. This hypothesis is supported by a study showing that the prevalence of PC mutants was higher in asymptomatic carrier blood donors than in chronic or acute hepatitis B patients, and that PC mutation was associated with the asymptomatic state of HBV [Gandhe et al., 2003]. Another study showed that HBV strains with G1896A alone were significantly more prevalent in inactive carriers than in patients with active chronic hepatitis [Kitab et al., 2012]. Conversely, clinical studies have shown that a high rate of BCP mutation may contribute to liver disease progression, the development of hepatocellular carcinoma and poor clinical outcomes in HBV carriers [Kao et al., 2003; Yang et al., 2008; Utama et al., 2009]. In the present study, no association between the double mutant and viral load was found, in contrast to the results of Candotti et al. (2006). The present results confirmed those of previous studies suggesting that these variants do not correlate with substantial changes in viral replication [Grandjacques et al., 2000].

As anti-HBe seroconversion occurs early in most chronically infected individuals, several decades of evolution may favor the accumulation of mutations in HBV strains under immune pressure. This hypothesis

is supported by the positive correlation observed between the BCP mutation and age in the present cohort. Conversely, PC mutant prevalence was not associated with age, suggesting different selection pressures applied to BCP and PC regions.

HBsAg quantification is a worthwhile tool that can be used in association with HBV DNA to classify patients during HBV infection. The HBsAg titer found in this study was significantly higher in HBeAg-positive subjects than in HBeAg-negative subjects who harbored PC and/or BCP mutants, which is in agreement with previous studies conducted in different areas [Chan et al., 2010; Nguyen et al., 2010]. Although the impact of age on HBsAg remains unclear, in the present study, HBsAg levels tended to decrease with age. These findings suggest that HBsAg vary during the natural course of HBV infection and that profound immune pressure plays a major role in reducing HBsAg titers. However, the present study confirmed the influence of HBV genotypes on HBsAg quantification [Moucari et al., 2009b]. These findings suggest that HBsAg production should be considered in the management of chronic hepatitis B according to patient age and immune status, and viral factors.

This study did have some limitations, notably as related to its retrospective design with a single collection of serum and an absence of histological data. It would have been useful to follow these patients longitudinally through the different phases of infection, although such longitudinal follow-up is difficult given that patients may remain in either the immune-tolerant or the non/low-replicative phases for many years. As ALT determination in French blood donations was abandoned in 2003, biochemical parameters were not available to calculate a non-invasive fibrosis test. Therefore, the prevalence of the PC mutant seems to correlate with the HBV genotype repartition. It was shown that the nucleotide 1896 is located opposite to the nucleotide 1858 in the stem loop of the encapsidation signal; the nucleotide 1858 is a cytosine in HBV/A and a thymine (T) in the other genotypes (B, C, D and E) (Papatheodoridis and Hadziyannis, 2001). The G1896A mutation pairs with T1858, enhancing the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal [Lok et al., 1994]. Therefore, the high frequency of PC mutation observed in French HBV carriers might be related in part to the predominant HBV/D and HBV/E.

In conclusion, a high prevalence of the G1896A mutation was found in an asymptomatic HBV-infected blood donor population in France. The association of the G1896A mutation with negative HBe status and low levels of both HBV DNA and HBsAg argues for a possible protective effect of PC mutations in the severity of liver lesions. Further large studies are needed to confirm the clinical significance of the G1896A mutation, as concerns particularly the

impact of in vitro HBV core protein expression in the mechanism of fibrogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all our colleagues at the Etablissement Français du Sang and the Centre de Transfusion Sanguine des Armées who participated in the national blood donor surveillance program and particularly Michèle Maniez, Marie Hélène Elghouzzi, Françoise Levacon, Josiane Pillonel, Yves Piquet and Valérie Barlet.

REFERENCES

- Biswas A, Chandra PK, Datta S, Panigrahi R, Banerjee A, Chakrabarti S, Biswas K, Patra D, Bhattacharya P, Chakravarty R. 2008. Frequency and distribution of hepatitis B virus genotypes among eastern Indian voluntary blood donors: Association with precore and basal core promoter mutations. *Hepatology* 39:53–59.
- Bruix J, Llovet JM. 2003. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 39:S59–63.
- Brunetto MR, Oliveri F, Colombaro P, Moriconi F, Ciccorossi P, Coco B, Romagnoli V, Cherubini B, Moscato G, Maina AM, Cavallone D, Bonino F. 2010. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 139:483–490.
- Candotti D, Opare-Sem O, Rezvan H, Sarkodie F, Allain JP. 2006. Molecular and serological characterization of hepatitis B virus in deferred Ghanaian blood donors with and without elevated alanine aminotransferase. *J Viral Hepat* 13:715–724.
- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. 1989. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 2:588–591.
- Chan HL, Wong VW, Wong GL, Tse CH, Chan H, YSung JJ. 2010. A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B. *Hepatology* 52:1232–1241.
- Datta S, Biswas A, Chandra PK, Banerjee A, Panigrahi R, Mahapatra PK, Chakrabarti S, Panda CK, Chakravarty R. 2008. Molecular epidemiology and clinical significance of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations in eastern India. *Intervirology* 51:275–284.
- Davidson F, Lycett C, Sablon E, Petrik J, Dow BC. 2005. Hepatitis B virus genotypes and precore mutations in Scottish blood donors. *Vox Sang* 88:87–92.
- Ducancelle A, Servant-Delmas A, Beuvelet T, Balan V, Pivert A, Maniez M, Laperche S, Lunel-Fabiani F. 2011. [Results of a novel real-time PCR, sequence analysis, Inno-LiPA line probe assays in the detection of hepatitis B virus G1896A precore mutation in French blood donors.]. *Pathol Biol (Paris)*. 59:21–27.
- EASL. 2012. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 57:167–185.
- Friedt M, Gerner P, Lausch E, Trubel H, Zabel B, Wirth S. 1999. Mutations in the basic core promoter and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B. *Hepatology* 29:1252–1258.
- Gandhe SS, Chadha MS, Walimbe AM, Arankalle VA. 2003. Hepatitis B virus: prevalence of precore/core promoter mutants in different clinical categories of Indian patients. *J Viral Hepat* 10:367–382.
- Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, Chevallier P, Pichoud C, Maisonnas M, Trepo C, Zoulim F. 2000. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: Correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol* 33:430–439.
- Halfon P, Bourliere M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, Renou C, Penaranda G, Saadoun D, Thibault V, Serpaggi J, Varastet M, Tainturier MH, Poynard T, Cacoub P. 2006. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in

- France: Correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat* 13:329–335.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. 2003. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 124:327–334.
- Kitab B, Essaid El, Feydi A, Afifi R, Trepo C, Benazzouz M, Essamri W, Zoulim F, Chemin I, Alj HS, Ezzikouri S, Benjelloun S. 2012. Variability in the precore and core promoter regions of HBV strains in Morocco: characterization and impact on liver disease progression. *PLoS One* 7:e42891(1–10). doi: 10.1371/journal.pone.0042891
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. 2003. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362:1907–1917.
- Lok AS, Akarca U, Greene S. 1994. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4077–4081.
- Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Asselah T, Marcellin P. 2013. The role of HBsAg quantification for monitoring natural history and treatment outcome. *Liver Int* 33:125–132.
- McMahon BJ. 2014. Chronic hepatitis B virus infection. *Med Clin North Am* 98:39–54.
- Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, Ripault MP, Castelnau C, Martinot-Peignoux M, Dauvergne A, Asselah T, Boyer N, Bedossa P, Valla D, Vidaud M, Nicolas-Chanoine MH, Marcellin P. 2009a. Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology* 49:1151–1157.
- Moucari R, Martinot-Peignoux M, Mackiewicz V, Boyer N, Ripault MP, Castelnau C, Leclere L, Dauvergne A, Valla D, Vidaud M, Nicolas-Chanoine MH, Marcellin P. 2009b. Influence of genotype on hepatitis B surface antigen kinetics in hepatitis B e antigen-negative patients treated with pegylated interferon-alpha2a. *Antivir Ther* 14:1183–1188.
- Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, Croagh C, Bell S, Desmond PV, Levy M, Locarnini SA. 2010. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: A perspective on Asia. *J Hepatol* 52:508–513.
- Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. 1994. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 68:8102–8110.
- Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. 2001. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 8:311–321.
- Pujol FH, Navas MC, Hainaut P, Chemin I. 2009. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 286:80–88.
- Servant-Delmas A, Mercier M, El Ghouzzi MH, Girault A, Bouchardeau F, Pillonel J, Laperche S. 2010. National survey of hepatitis B virus (HBV) polymorphism in asymptomatic HBV blood donors from 1999 to 2007 in France. *Transfusion* 50:2607–2618.
- Tong S. 2005. Mechanism of HBV genome variability and replication of HBV mutants. *J Clin Virol* 34:S134–S138.
- Truong BX, Seo Y, Yano Y, Ho PT, Phuong TM, Long DV, Son NT, Long NC, Kato H, Hayashi Y, Trach NK, Kasuga M. 2007. Genotype and variations in core promoter and pre-core regions are related to progression of disease in HBV-infected patients from Northern Vietnam. *Int J Mol Med* 19:293–299.
- Tsai WL, Lo GH, Hsu PI, Lai KH, Lin CK, Chan HH, Chen WC, Cheng JS, Liu YC, Huang TS, Ger LP, Lin HH. 2008. Role of genotype and precore/basal core promoter mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B with acute exacerbation. *Scand J Gastroenterol* 43:196–201.
- Utama A, Purwantomo S, Siburian MD, Dhenni R, Gani RA, Hasan I, Sanityoso A, Miskad UA, Akil F, Yusuf I, Achwan WA, Soemohardjo S, Losutan SA, Martamala R, Lukito B, Budihusodo U, Lesmana LA, Sulaiman A, Tai S. 2009. Hepatitis B virus subgenotypes and basal core promoter mutations in Indonesia. *World J Gastroenterol* 15:4028–4036.
- Varghese V, Shahriar R, Rhee SY, Liu T, Simen BB, Egholm M, Hanczaruk B, Blake LA, Gharizadeh B, Babrzadeh F, Bachmann MH, Fessel WJ, Shafer RW. 2009. Minority variants associated with transmitted and acquired HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance: Implications for the use of second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52:309–315.
- Vivekanandan P, Abraham P, Sridharan G, Chandy G, Shaji RV, Daniel D, Raghuraman S, Daniel HD, Subramaniam T. 2004. High frequency of the 1896 precore mutation in patients and blood donors with hepatitis B virus infection from the Indian subcontinent. *Mol Diagn* 8:51–56.
- Vray M, Debonne JM, Sire JM, Tran N, Chevalier B, Plantier JC, Fall F, Vernet G, Simon FMbPS. 2006. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Dakar, *J Med Virol* 78:329–334.
- Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW. 2007. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 17:1195–1201.
- Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ. 2008. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 100:1134–1143.

2. Chapitre 2 : Etude de l'impact des mutations des régions PBC et PC du VHB sur la fibrose hépatique chez les patients infectés chroniquement

Different precore/core mutations of hepatitis B interact with, limit, or favor liver fibrosis severity. A. Ducancelle, A. Pivert, S. Bertrais, J. Boursier, V. Balan, P. Veillon, H. Le Guillou-Guillemette, V. Thibault, S. Castelain, B. Roquebert, M. Coste-Burel, V. Mackiewicz, E. Schvoerer, S. Larrat, S. Maylin, S. Alain, V. Loustaud-Ratti, E. Gordien, J. Gozlan, V. Brodard, S. Chevaliez, P. Calès and F. Lunel-Fabiani. **J. Gastroenterol. Hepatol.** 31 : 1750–1756, **2016.**

Dans la continuité de notre étude de prévalence réalisée chez les patients donateurs de sang, nous avons souhaité préciser les données françaises de prévalence concernant les génotypes du VHB et les mutations dans le PBC et la région PC chez des patients infectés chroniquement par le VHB et naïfs de traitement. Ce projet a été supporté par l'ANRS (2008-2, CSS7 n°1399). Notre objectif secondaire était l'étude de l'impact des génotypes et des mutations des PBC et de la région PC sur la sévérité des lésions hépatiques.

Cette étude rétrospective, multicentrique a été réalisée sur des prélèvements congelés issus de quatorze centres français répartis sur la métropole et participant au groupe AC11/AC33 de l'ANRS. Les données épidémiologiques, virologiques et histologiques ont été recueillies à l'inclusion des patients. Le génotypage a été réalisé par séquençage direct de la région polymérase du VHB et les séquences comparées à une banque de données contenant les 8 génotypes. La recherche des mutations dans les régions PBC et PC a été réalisée par séquençage de ces régions du génome en focalisant notre étude sur les mutations aux positions 1757, 1762, 1764, 1896 et 1899.

Les données histologiques ont pu être colligées pour 252 patients recrutés entre 2009 et 2013. Ces données étaient essentielles à la comparaison des souches mutées et sauvages

vis-à-vis des lésions hépatiques. Parmi eux, 26,2% (66/252) présentaient un stade de fibrose sévère supérieur ou équivalent à F3 en score Metavir, 73,8% (166/252) ne présentaient pas ou peu de lésions (F0-F1-F2). La majorité des patients (75%) étaient au stade d'infection ou d'hépatite chronique AgHBe négative. Un taux d'ALAT (Alanine Amino-Transférase) élevé a été retrouvé chez 44% des patients. Les données de prévalence des génotypes ont confirmé les données de notre première étude à savoir une co-dominance des génotypes E, A et D (29,2%, 27,5% et 23,3% respectivement) dans des proportions équivalentes. Le double mutant du PBC a été détecté chez 34,1% des patients, alors que la mutation G1896A était présente chez 54,9% des sujets inclus ($p < 0,05$).

L'analyse multivariée de ces données a mis en évidence des facteurs prédictifs indépendants de lésions hépatiques sévères ($\geq F3$) comme l'âge, le sexe et les transaminases élevées. L'analyse des Odds-ratios (OR) montre que la présence du double mutant isolé est plutôt en faveur de lésions hépatiques sévères (OR = 2,94 – IC (intervalle de confiance) : 1,09 – 7,94), comme décrit dans la littérature. Dans la région PC, la mutation G1896A ne semble pas associée à un risque de fibrose sévère alors que la mutation G1899A, lorsqu'elle est associée au double mutant du PBC est plutôt en faveur de lésions peu sévères (OR = 0,39 – IC : 0,04 – 3,76). Ces résultats suggèrent donc un rôle antagoniste de la mutation G1899A vis-à-vis du double mutant du PBC dans le risque de fibrose sévère ($p = 0,015$).

Enfin, à partir de ces données biologiques et virologiques, nous avons pu établir un modèle de prédiction de fibrose. La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic ou courbe de performance) construite à l'aide des variables âge, sexe, ALAT, mutations PBC et 1899, nous a permis de classer correctement les patients dans plus de 80% des cas (Figure 33).

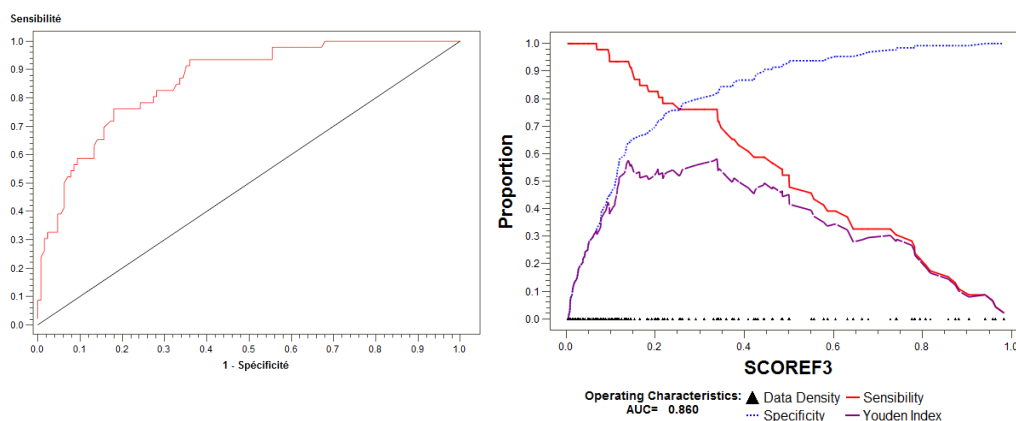


Figure 33 : Performances analytiques du modèle proposé.

Le premier graphique représente la courbe ROC : AUROC (area under ROC) = 0,86 – IC : 0,80 – 0,91. Le deuxième graphique montre les sensibilité (en rouge) et spécificité (en bleu) de la technique, ainsi que l'index de Youden (en violet) qui mesure la précision de la technique.

A posteriori, et suite à ces résultats, nous avons également étudié la prévalence de la mutation G1899A et son association au double mutant BCP dans la cohorte des patients donneurs de sang. La mutation G1899A a été identifiée pour 32,6% des patients (56/172), mais elle n'est associée à la mutation PBC que pour 8 patients. Sans données de fibrose, il est difficile de relier ce profil à la sévérité des lésions hépatiques, et le faible effectif limite la puissance statistique.

Au cours de cette étude, nous avons pu réaliser la quantification des AgHBcr ou core related antigen (Lumipulse®, Fujirebio) sur une partie de l'effectif de cette cohorte (n = 166). L'AgHBcr correspond aux produits issus de la traduction du gène PC/C, à savoir l'AgHBe, l'AgHBc et la pré-protéine PC [162]. Nous avons ensuite étudié la corrélation entre le taux d'AgHBcr et l'ADN du VHB, le génotype viral et le profil des mutations du PBC et de la région PC. Nos résultats ont montré une faible corrélation avec la charge virale ($r^2 = 0,42$), et aucune relation significative n'a été trouvée entre le niveau d'AgHBcr et les génotypes du VHB. Nous avons également montré que le niveau d'AgHBcr n'était pas significativement lié à la présence du double mutant BCP ou de la mutation G1899A. Ces données devront être analysées plus précisément au vu des nouvelles publications récentes

sur ce marqueur, qui montrent que l'AgHBcr est un marqueur sérique fortement représentatif de l'ADNccc [163].

Les résultats de cette étude menée chez les patients infectés chroniquement et suivis pour leur infection ont confirmé les données de la littérature concernant la relation entre la présence du double mutant dans le PBC et la fibrose sévère. En revanche, l'effet antagoniste de la mutation G1899A vis-à-vis du double mutant du PBC sur le risque de fibrose sévère est un résultat original non retrouvé dans la littérature internationale. Nous montrons une diminution significative de la prévalence des lésions hépatiques sévères chez les patients infectés par une souche virale portant l'association du double mutant et de la mutation G1899A par rapport au groupe de sujets infectés par un virus muté uniquement dans le PBC. La mutation G1899A a été décrite dans plusieurs phases de l'infection comme dans les hépatites fulminantes ou associée à un risque élevé de CHC [116, 164]. Mais peu d'études se sont intéressées au rôle de l'association des mutations dans les régions PBC et PC au cours de l'histoire naturelle de la maladie. Notre hypothèse serait que les mutants PBC et PC, qui apparaissent au cours de l'évolution naturelle de l'hépatite B, pourraient interagir avec les mécanismes cellulaires de l'induction de la fibrogénèse hépatique et moduler l'expression des marqueurs pro- et anti-fibrotiques.

HEPATOLOGY

Different precore/core mutations of hepatitis B interact with, limit, or favor liver fibrosis severity

Alexandra Ducancelle,* Adeline Pivert,* Sandrine Bertrais,[†] Jérôme Boursier,[†] Viorica Balan,* Pascal Veillon,* Hélène le Guillou-Guillemette,* Vincent Thibault,[‡] Sandrine Castelain,[§] Bénédicte Roquebert,[¶] Marianne Coste-Burel,** Vincent Mackiewicz,^{††} Evelyne Schwoerer,^{‡‡} Sylvie Larrat,^{§§} Sarah Maylin,^{¶¶} Sophie Alain,^{***} Véronique Loustaud-Ratti,^{†††} Emmanuel Gordien,^{‡‡‡} Joël Gozlan,^{§§§} Véronique Brodard,^{¶¶¶} Stéphane Chevaliez,^{****} Paul Calès[†] and Françoise Lunel-Fabiani*

*Laboratory of Virology[†]Liver-Gastroenterology Department, University Hospital & LUNAM University and HIFIH laboratory, UPRES EA 3859, SFR 4208, Angers, [‡]Laboratory of Virology, Pontchaillou Hospital, Rennes University Hospital, Rennes, [§]Laboratory of Virology, Amiens University Hospital, and EA 4294, Amiens, [¶]Laboratory of Virology, Bichat Claude Bernard Hospital, Paris-Diderot University, ^{††}Laboratory of Virology, Beaujon Hospital & University (HUPNVS), ^{¶¶}Laboratory of Virology, Saint Louis Hospital & University, and ^{§§§}Laboratory of Virology, Saint Antoine University Hospital, Paris, ^{**}Laboratory of Virology, Hôtel Dieu Hospital & LUNAM University, and EA4271, Nantes, ^{‡‡}Laboratory of Virology, Nancy Hospital & University, Vandoeuvre-les-Nancy, ^{§§}Virology Department, Reference Center of Neuromuscular Disease, Grenoble University Hospital, La Tronche, ^{***}Laboratory of Virology, UMR Inserm 1092, Dupuytren Hospital & University, and ^{†††}Liver-Gastroenterology Department, Dupuytren Hospital & University, Limoges, ^{‡‡‡}Laboratory of Virology, University Hospital of Paris Seine-Saint-Denis, Avicenne, Associated with the National Reference Center for Viral Hepatitis B, C and Delta in France, Bobigny, ^{¶¶¶}Laboratory of Virology, Robert Debré Hospital, Reims and ^{****}Laboratory of Virology, Henri Mondor Hospital, National Reference Centre for Viral Hepatitis B, C and Delta, and Inserm U955, Créteil, France

Key words

A1762T/G1764A, BCP mutation, fibrosis, G1896A, G1899A, HBV genotype, Hepatitis B, PC mutation.

Accepted for publication 6 March 2016.

Correspondence

Alexandra Ducancelle, Laboratory of Virology, University Hospital & LUNAM University and HIFIH laboratory, UPRES EA 3859, SFR 4208, 4, rue Larrey 49000 Angers, France.
Email: alducancelle@chu-angers.fr

Declaration of conflict of interest: None.

Financial support: This study was supported by ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis): Number 2008–406.

Abstract

Background and Aim: The impact of basal core promoter (BCP) and precore (PC) mutants of the hepatitis B virus (HBV) on liver disease severity remains controversial. The aim of the present study was to screen BCP and PC mutations in 252 HBV surface antigen (HBsAg) positive carriers in France and to assess relationships between these mutations and severe fibrosis.

Methods: Direct sequencing of the precore/core gene was used to detect A1762T/G1764A and G1757A mutations in the BCP and G1896A and G1899A mutations in the PC region. **Results:** The prevalences of A1762T/G1764A, G1757A, G1896A, and G1899A mutations were 34.1%, 38.7%, 54.9%, and 29.3% ($P < 0.001$), respectively. The independent predictors of severe fibrosis (\geq F3 Metavir) were older age ($P < 0.001$), male gender ($P = 0.012$), elevated alanine aminotransferase ($P < 0.001$), and the double A1762T/G1764A mutant with no other mutations ($P = 0.011$). Interestingly, the association of the G1899A mutation with the double A1762T/G1764A mutant significantly counteracted the deleterious effect of the sole double A1762T/G1764A mutant (odds ratio [OR] = 0.28 vs. OR = 3.55, respectively, $P = 0.028$).

Conclusions: Patients with the A1762T/G1764A mutation have a higher risk of severe fibrosis. The G1899A mutation is a protective factor against severe fibrosis that counteracted the deleterious effect of the A1762T/G1764A mutation. Finally, host phenotypic and HBV genotypic markers independently predict fibrosis severity.

Introduction

Chronic hepatitis B (CHB) is a significant global health problem with approximately 400 million cases worldwide.^{1,2} The course of hepatitis B virus (HBV) infection depends on several factors.^{3,4}

CHB is a dynamic process that results in a balance between the host immune response and HBV replication. During the HBeAg seroconversion phase, the pressure by the host immune system selects a number of genetic variants in the basal core promoter (BCP) and precore (PC) regions.^{5,6} The major missense or nonsense mutations in the PC region are found in codons 1, 2, 28, and 29. Among these, the G1896A mutation in codon 28 creates a premature stop codon, which prevents the translation of the PC

protein and completely abolishes the production of HBeAg.⁷ In the BCP region, an A-to-T substitution at position 1762 (A1762T) and a G-to-A substitution at position 1764 (G1764A) are the most frequently reported and associated with a decrease in HBeAg expression.⁸ An in vitro study showed that the A1762T/G1764A double mutation downregulates precore mRNA and slightly increases the efficiency of pregenomic mRNA and core mRNA.⁹ The relationships between PC/BCP mutants and hepatitis severity or cirrhosis are unclear.

The clinical relevance of the G1896A mutation is controversial. In a previous study, we reported a high prevalence of G1896A in a cohort of French blood donors who were inactive HBV carriers.¹⁰ Some studies described an association between G1896A and

severe hepatic lesions,^{11,12} whereas others reported no associations between the mutation and clinical outcomes.¹³ Also, a new G-to-A mutation at position 1899 (G1899A) in the PC region appears to correlate significantly with the incremental risk of hepatocellular carcinoma (HCC).^{14,15} In the BCP region, an association between the A1762T/G1764A double mutation and severe liver hepatitis or increased risk for HCC has been frequently reported in many Asian studies.^{16–18} Another mutation in the BCP region, a G-to-A change at position 1757 (G1757A), seems to affect negatively the emergence of the A1762T/G1764A double mutation.¹⁹ A recent work demonstrated that G1757A was associated with protection against advanced liver disease ($P=0.001$).²⁰

In France, there are few data on the prevalence and clinical significance of HBV genotypes and BCP/PC mutants. Ganne-Carrié *et al.* reported that the combination of PC/BCP mutants was associated with severe liver fibrosis.²¹ More recently, Lapalus *et al.* reported that BCP variants were associated with a higher risk of severe liver disease.²² Thus, it is imperative to update these data to enable a better understanding of the impact of BCP/PC mutants on the severity of liver disease.

Our primary objective with the present study was to complete data on the prevalence of BCP/PC mutations circulating among active or inactive CHB patients in France. We focused primarily on the G1757A, A1762T/G1764A, G1896A, and G1899A mutations. Our secondary objectives were to evaluate associations between BCP and/or PC mutants and liver disease severity and to propose a novel CHB-specific model for liver severity including non-invasive viral parameters.

Methods

Patients. This national multi-center study (14 participating virology laboratories) included 252 treatment-naïve patients with CHB whose samples were collected by the Virology Department in Angers University Hospital between 2009 and 2013. The patients were retrospectively included if they were HBV surface antigen (HBsAg)-positive for at least 6 months irrespective of the HBe status, had no prior or current anti-HBV treatment, and had all necessary laboratory/diagnostic data available (ALT, HBV-DNA level, HBV genotype, non-invasive hepatic fibrosis blood test, or liver biopsy). One to three (consecutive, at an interval of ≥ 6 months) serum samples were collected and frozen from each subject. No supplementary samples were needed during the study. To enable a comparison of the effects of mutations on the degree of fibrosis, the participating laboratories were requested to choose serum samples for which the necessary biochemical (ALT), viral (HBeAg, anti-HBe, HBV-DNA, and HBV genotype), and liver fibrosis markers were available at a same date. In most of the centers, liver biopsy was used to assess liver fibrosis. In the remaining centers, either vibration-controlled transient elastography (VCTE; Fibroscan, Echosens, France) or a non-invasive blood test sometimes in combination with histology was performed. Fibrosis stage was assessed according to the METAVIR scoring system, that is, F0: no fibrosis; F1: portal fibrosis without septa; F2: portal fibrosis with rare septa; F3: numerous septa without cirrhosis; and F4: cirrhosis.²³ For the present study, the patients were classified as having severe ($\geq F3$) or non-severe fibrosis ($< F3$). The choice of F3 as a cut-off was based on the results of a previous study,

demonstrating that F2 stage was critical to accurately evaluate fibrosis level as it was a source of variability in histological scoring.²⁴

All the included patients were negative for hepatitis C virus (HCV), hepatitis Delta virus, and HIV antibodies. Oral informed consent was obtained at the time of sampling, and the study was approved by the Research Ethics Committee of Angers hospital.

Hepatitis B virus DNA quantification and genotyping. A fully automated system (m2000sp/m2000rt, Abbott Diagnostic, USA) was used for serum HBV-DNA extraction and real-time polymerase chain reaction (PCR) quantification; the range of the latter was 1 to 9 log IU/mL. HBV genotypes were determined by direct sequencing of the HBV polymerase gene as previously described.²⁵

Detection of basal core promoter and precore mutations. The BCP (nt 1742–1849) and the PC (nt 1814–1900) regions of the HBV genome were amplified by nested PCR as previously described.²⁶

Polymerase chain reaction products covering the PC region (363 bp) were purified using NucleoSpin gel and PCR clean-up (Macherey Nagel, Germany) and used as templates for direct sequencing.

Purified HBV PCR products were sequenced bi-directionally using the BigDye Terminator v3.1 kit (Life Technologies, USA). After purification, sequences of amplified nucleic acids were determined using an ABI 3130xl genetic analyzer (Life Technologies, USA) and the nucleotide sequences analyzed and compared with a consensus sequence using SeqScape v2.6 software (Life Technologies, USA).

Nucleotide mutations were defined by their differences to the consensus sequence, and dual signals (mixed type) were considered as a mutant type.

Statistical methods. Statistical analyses were performed using SAS software version 9.3 (SAS Institute Inc., USA).

Characteristics of patients were expressed as mean \pm standard deviation or frequency (%). McNemar's test for paired samples was used to compare the prevalence of mutations located in the BCP region, then those in the PC region. Comparisons of non-severe and severe fibrosis groups were performed using the non-parametric Wilcoxon–Mann–Whitney test for continuous variables and the non-parametric Fisher's exact test for qualitative variables. To assess the clinical relevance of each mutation, we firstly compared the proportion of patients having the genetic characteristic as a function of fibrosis severity (Metavir F0–F2 vs. F3–F4). Backward, multivariate binary logistic regression with backward elimination was then used to identify the independent factors related to severe fibrosis (Metavir F3–F4). Internal validation was performed using a bootstrap resampling method (100 bootstrap samples) consisting of a repeated sampling (with replacement) from the original entire dataset, followed by a backward logistic regression procedure in each subsample (100 subsamples here). The inclusion of final predictors was based on the frequency of their appearance in the multiple bootstrap models. We tested the one-way interactions between the independent

predictors. The final model calibration was assessed by the Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test. The discriminative ability of the model-derived risk score was assessed by its area under the receiver operating characteristic (AUROC) with a 95% confidence interval. The optimal diagnostic cut-off was determined according to the highest Youden index (sensitivity + specificity – 1). The performance for severe fibrosis diagnosis using this cut-off was assessed by calculating sensitivity, specificity, and positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV).

Results

Characteristics of patients. The baseline characteristics of patients are presented in Table 1, globally and according to liver fibrosis status (F0–F2 and F3–F4). Metavir liver fibrosis stages were available for 252 patients. Those with severe fibrosis (F3–F4) were significantly older ($P < 0.001$) and had both higher elevated ALT level ($P < 0.001$) and HBV-DNA level ($P < 0.001$) than patients in the non-severe fibrosis group.

Regarding geographical origin, 45.7% of the subjects were born in Africa, 34.8% in Europe, 19% in Asia, and 0.5% in the USA.

Prevalence of hepatitis B virus genotypes. Hepatitis B virus genotyping was performed for the 252 included patients. Among them, HBV/E was predominant (29.2%), followed in order by HBV/A (27.5%), HBV/D (23.3%), HBV/B (7.9%), HBV/C (7.9%), HBV/F (3.8%), and HBV/G (0.4%) (Table 1).

Prevalence of basal core promoter and precore mutations. Two hundred forty-two and 240 sequences were successful in the PC and BCP regions, respectively (Table 2). Sequencing failures were due to undetectable or low HBV viral loads. In the PC region, the G1896A mutation was more frequent than the G1899A mutation: 54.9% (48.6–61.1%) versus 29.3% (23.9–35.3%), P from McNemar's test < 0.001 . In the BCP region, the G1764A mutation was more prevalent than the G1757A and A1762T mutations: 45.4% (39.2–51.7%) versus 38.7% (32.8–45%) and 40% (34–46.3%), respectively. Moreover,

Table 1 Baseline characteristics of the patients

Variable	Metavir liver fibrosis stage							P-value
	All patients (n = 252)		F0–F2 (n = 186)		F3–F4 (n = 66)			
	N	% or mean (SD)	N	% or mean (SD)	N	% or mean (SD)		
Age (years)	252	44.3 (13.6)	186	40.9 (11.9)	66	53.5 (14.0)	<0.001	
Sex (%)								
	Male	140	55.6	97	51.9	43	66.2	0.059
	Female	112	44.4	90	48.1	22	33.8	
Origin (%)	Missing data	31	—	21	—	10	—	0.028
	France	46	20.8	31	18.7	15	27.3	
	Other European countries	20	9.0	11	6.6	9	16.4	
	French overseas departments and territories	11	5.0	10	6.0	1	1.8	
	Asia	42	19.0	29	17.5	13	23.6	
	Africa	101	45.7	84	50.6	17	30.9	
	United States	1	0.5	1	0.6	0	0.0	
HBV genotype (%)	donnée manquante	12	—	10	—	2	—	0.002
	A	66	27.5	49	27.7	17	27.0	
	B	19	7.9	18	10.2	1	1.6	
	C	19	7.9	8	4.5	11	17.5	
	D	56	23.3	39	22.0	17	27.0	
	E	70	29.2	54	30.5	16	25.4	
	F	9	3.8	9	5.1	0	0.0	
	G	1	0.4	0	0.0	1	1.6	
HBV-DNA (logIU/mL)		248	4.71 (2.16)	185	4.48 (2.17)	63	5.36 (2.01)	<0.001
HBeAg (%)	Missing data	28	—	17	—	11	—	0.110
	Negative	168	75.0	132	77.6	36	66.7	
	Positive	56	25.0	38	22.4	18	33.3	
Anti-HBe Ac (%)	Missing data	8	—	3	—	5	—	0.210
	Negative	54	22.1	37	20.1	17	28.3	
	Positive	190	77.9	147	79.9	43	71.7	
Elevated ALT (%)	Missing data	9	—	8	—	1	—	<0.001
	No	135	55.6	119	66.5	16	25.0	
	yes	108	44.4	60	33.5	48	75.0	

P-value from non-parametric Wilcoxon–Mann–Whitney test for continuous variables and from non-parametric Fisher's exact test for qualitative variables.

ALT, alanine aminotransferase; HBV, hepatitis B virus; SD, standard deviation.

Table 2 Prevalence of PC and BCP mutations in the total cohort

PC and BCP mutations	Successful sequences N (%)	Category	N	%	95% CI (Lower)	95% CI (Upper)
Single mutations						
G1896A	242 (96)	Wild	109	45	38.9	51.3
		Mutant/mixed	133	54.9	48.6	61.1
G1899A	242 (96)	Wild	171	70.6	64.6	76
		Mutant/mixed	71	29.3	23.9	35.3
G1757A	240 (95.2)	Wild	147	61.2	54.9	67.1
		Mutant/mixed	93	38.7	32.8	45
A1762T	240 (95.2)	Wild	144	60	53.6	65.9
		Mutant/mixed	96	40	34	46.3
G1764A	240 (95.2)	Wild	131	54.5	48.2	60.7
		Mutant/mixed	109	45.4	39.2	51.7
Combined mutations						
A1762T/G1764A	240 (95.2)	Mutant/mixed	82	34.1	28.4	40.3

BCP, basal core promoter; CI, confidence interval; PC, precore.

the double A1762T/G1764A mutation was observed in 34.1% of cases.

Figure 1 presents the distribution of BCP and PC mutations in patients with non-severe and severe fibrosis. In the PC region, the frequency of mutated-mixed 1896 and 1899 mutants did not significantly differ between the non-severe and severe fibrosis groups. In the BCP region, the A1762T/G1764A double mutation was significantly more frequent in the severe fibrosis group and the G1757A mutation significantly more frequent in the non-severe group.

Predictors of severe fibrosis

Univariate analysis (data not shown). In the 252 patients, severe fibrosis was associated with older age ($P < 0.001$), higher HBV-DNA levels ($P = 0.006$), elevated ALT ($P < 0.001$) and detection of the single mutations A1762T ($P < 0.001$) and G1764A ($P < 0.001$), or the A1762T/G1764A double mutation

(OR (95% CI) = 2.89 (1.56–5.36, $P = 0.001$). Conversely, the G1757A mutation decreased the risk of having severe fibrosis (0.36 (0.18–0.70), $P = 0.003$).

The inverse relationship between severe fibrosis and mutations in the PC region appeared more marked for G1899A than for G1896A, but not to the point of statistical significance: 0.57 (0.29–1.12, $P = 0.101$).

Multivariate analysis. Binary logistic regression analysis in patients with all data ($n = 186$) showed that age ($P < 0.001$), sex ($P = 0.013$), ALT level ($P < 0.001$), the G1899A mutant ($P = 0.023$), and the A1762T/G1764A double mutant ($P = 0.009$) were independently related to severe fibrosis (data not shown). HBV genotype was not identified as an independent factor related to severe fibrosis ($P = 0.241$). Internal validation using a bootstrap resampling method for variable selection confirmed that age, sex, ALT level, the G1899A mutant and the A1762T/G1764A double mutant were the most robust markers of severe fibrosis (because

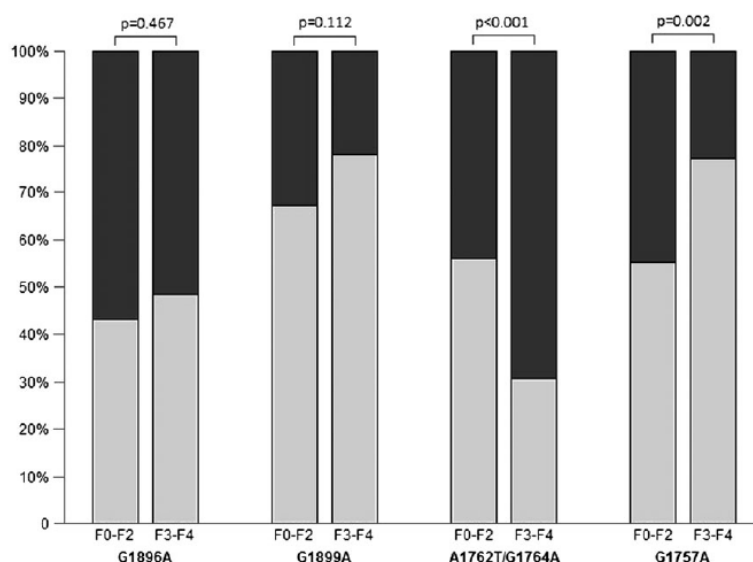


Figure 1 Repartition of the basal core promoter (BCP)/precore (PC) wild and mutated viruses in relation to Metavir fibrosis stages. In the PC region, the frequency of mutated-mixed 1896 mutants did not significantly differ between the two groups (56.9% vs. 51.6%, $P = 0.467$). The wild-type 1899 virus was predominant in both non-severe (67.1%) and severe fibrosis (78.1%) patients. Concerning the BCP region, the A1762T/G1764A double mutation was significantly more frequent in the severe fibrosis group (69.4% vs. 43.9% in the non-severe group, $P < 0.001$). Conversely, the G1757A mutation was significantly more frequent in the non-severe group (44.8% vs. 22.8% in the severe fibrosis group, $P = 0.002$). Phenotype status: □, wild type and ■, mutant mixed.

each variable was independently related to severe fibrosis in at least 50% of the bootstrap samples), and that HBV genotype fell short of being a robust marker (Table 3).

As there was a significant interaction between G1899A and the double A1762T/G1764A mutant, the statuses for these mutations were combined in the final multivariate model (Table 4). The OR (95% CI) for having severe fibrosis was 3.55 (1.33–9.46), $P=0.011$ for patients having only the A1762T/G1764A double mutation as compared with patients with the wild-type virus, whereas the ORs were non-significant for patients having the G1899A mutation in the absence (0.44 (0.05–4.17), $P=0.512$) or presence (0.99 (0.29–3.45), $P=0.992$) of the A1762T/G1764A double mutation. The OR of patients with both G1899A and A1762T/G1764A mutations as compared with patients having only the A1762T/G1764A mutation was 0.28

(0.09–0.87), $P=0.028$ (Fig. 2). In other words, the G1899A mutation neutralized the increased risk of severe fibrosis associated with the A1762T/G1764A double mutation.

The good calibration of the built multivariate diagnostic model for severe fibrosis ($\geq F3$) was confirmed by the P -value of the Hosmer–Lemeshow test ($P=0.717$). The model-derived risk score, combining age, sex, elevated ALT, A1762T/G1764A and G1899A mutations, had good discriminative ability for severe fibrosis with an AUROC of 0.86 [95% CI 0.80–0.92]. Using the Youden cut-off (0.270), the percentage of correctly classified patients was 79.6%, sensitivity 81.3%, specificity 79.0%, PPV 57.4%, and NPV 92.4%.

Adding the HBV genotype to the multivariate model did not result in a significant increase in the AUROC (0.87 [0.81–0.93] vs. 0.86 [0.80–0.92], $P=0.379$). Also, the net reclassification index did not illustrate an improvement in discriminative ability (-0.03 [95% CI -0.12 – 0.07], $P=0.58$).

Table 3 Identification of independent predictor for severe fibrosis using backward logistic regression procedure in 100 bootstrap samples

Variable	Count
Age (years)	99
Elevated ALT (Yes vs. No)	93
Sex (F vs. M)	64
A1762T/G1764A (mutant/mixed vs. wild)	58
G1899A (mutant/mixed vs. wild)	55
Genotype	41
G1757A (mutant/mixed vs. wild)	38
G1896A (mutant/mixed vs. wild)	23
HBV-DNA (log IU/mL)	18
HBeAg (positive vs. negative)	10
Anti-HBe Ac (positive vs. negative)	2

Number of times each variable was identified as independent predictor of severe fibrosis using backward logistic regression procedure in 100 bootstrap samples from the original dataset (186 subjects). The most robust predictors (selected in > 50% of the bootstrap models) are in black characters and the least robust (selected in < 50% of the bootstrap models) are in gray characters.

ALT, alanine aminotransferase; HBV, hepatitis B virus.

Discussion

Several hepatitis B viral factors predictive of clinical outcomes have been identified. The REVEAL-HBV study showed that HBV viral load is a strong predictor of cirrhosis in adults with chronic HBV infection.²⁷ Other viral parameters, such as the HBV genotype, PC/BCP mutants or pre-S deletions, may also influence the course of severe liver disease.²⁸ Several prospective studies have furthermore demonstrated that patients with the A1762T/G1764A double mutation are more predisposed to severe fibrosis or HCC than those with the wild-type virus.^{29–31} Chu *et al.* demonstrated that the BCP double mutation was associated with progression to cirrhosis rather than HCC in chronic HBV infection.³² In a sub-study of the SEARCH B cohort, the A1762T/G1764A double mutant was determined qualitatively and correlated quantitatively with cirrhosis.²⁷ In the present study, we found that the A1762T/G1764A double mutant was independently associated with severe fibrosis and, interestingly, that HBV genotype was not an independent predictor. These results are in agreement with those reported by Lapalus *et al.*²² More recently, a longitudinal cohort study showed a dose–response

Table 4 Independent factors combined in our model-derived risk score to discriminate patients with severe fibrosis ($\geq F3$)

	Sample size	$\geq F3(n)$	Regression coefficient	Standard error	P -value	OR	95% CI	
							Lower	Upper
Age (years)	186	48						
Sex	186	48	0.075	0.018	<0.001	1.08	1.04	1.12
Men (reference)	99	32	—	—	—	1	—	—
Women	87	16	-1.107	0.441	0.012	0.33	0.14	0.78
ALT								
Normal (reference)	100	11	—	—	—	1	—	—
Elevated	86	37	1.706	0.452	<0.001	5.50	2.27	13.34
HBV mutations								
Wild-type (reference)	65	9	—	—	—	1	—	—
G1899A only	20	1	-0.820	1.147	0.512	0.44	0.05	4.17
A1762T/G1764A only	71	31	1.268	0.500	0.011	3.55	1.33	9.46
A1762T/G1764A + G1899A	30	7	-0.006	0.635	0.992	0.99	0.29	3.45

ALT, alanine aminotransferase; CI, confidence interval; HBV, hepatitis B virus; OR, odds ratio.

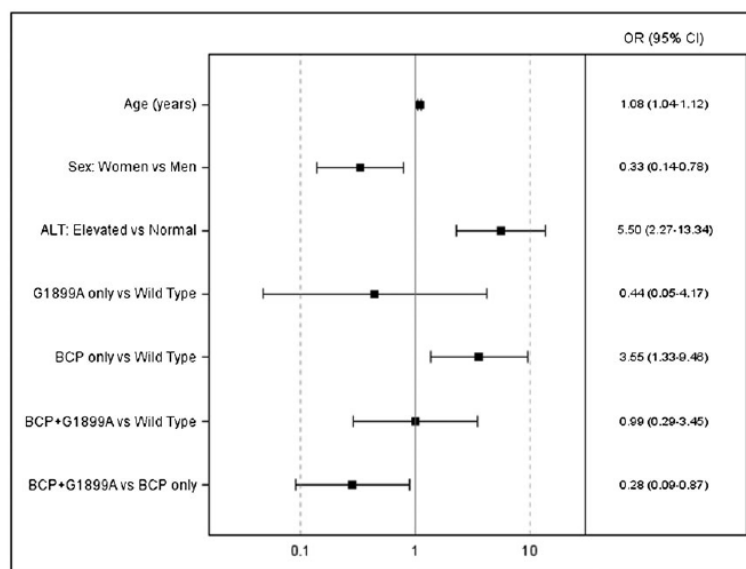


Figure 2 Multivariate-adjusted odds ratio (OR) for the independent predictors of severe fibrosis (\geq F3). The OR of patients with both G1899A and A1762T/G1764A mutations as compared with patients having only A1762T/G1764A mutation was 0.28 (0.09–0.87), $P=0.028$. Basal core promoter (BCP) corresponds to the A1762T/G1764A double mutation. BCP-G1899A *versus* BCP: adjusted OR = 0.28 [0.09–0.87], $P=0.028$. ALT, alanine aminotransferase.

relationship between BCP mutant proportion and cirrhosis risk.³³ In their population of 251 HBV carriers, the authors of that study demonstrated that the risk of cirrhosis was higher in patients with a BCP mutant proportion $\geq 45\%$. That finding was validated in a case–control study (adjusted OR: 2.81, 95% CI 1.40–5.67). Thus, screening for the A1762T/G1764A double mutation appears to be more accurate for the evaluation of fibrosis.

The role of the G1896A mutation is more controversial. In the present study, this mutation was not significantly associated with severe fibrosis. In a previous work, we found a high prevalence of the single G1896A mutation in a cohort of French blood donors who were inactive HBV carriers.¹⁰ Comparably, Kitab *et al.* found that HBV sequences with G1896A alone were significantly more prevalent in inactive HBV carriers than in patients with advanced liver disease and active chronic hepatitis,⁶ and Liu *et al.*, in the meta-analysis discussed earlier, reported that the G1896A mutation was not associated with a risk of HCC. These complementary findings seem to suggest that the selection of the G1896A mutation, in the absence of the A1762T/G1764A double mutation, may provide favorable clinical outcomes. Interestingly, however, the impact of the G1896A mutation may be different according to ethnicity. Liao *et al.* reported that this PC mutation correlated with an increased risk among Asians but they found no such correlation in Caucasians and Africans.¹⁵

Also, in the PC region, the G1899A mutation has been described in association with fulminant hepatitis B in children,²⁶ the severity of liver disease in Moroccan HBV carriers,⁶ and an increased risk of HCC in Asia.³⁴ A recent meta-analysis reported a significant relationship between the G1899A mutation and an increased risk of HCC, but most of the studies used in that meta-analysis had not clearly evaluated the G1899A mutation in association with other PC and BCP mutations.¹⁵ In our study, we showed a protective role for the G1899A mutation against severe fibrosis. This trend (OR: 0.44) was not significant when the mutation was present alone. Interestingly, the association of G1899A mutation with the

A1762T/G1764A double mutation significantly decreased the risk (OR: 0.28) of severe fibrosis in our patients. Thus, in multivariate logistic regression, the G1899A mutation nullified the deleterious effect of the A1762T/G1764A double mutation. To our knowledge, this has not been previously reported. Therefore, the selection of the G1899A mutation during the natural course of hepatitis B may interfere with some hypothetical mechanisms proposed in the pathophysiology of HBV-induced hepatocarcinogenesis and decrease the virulence of the BCP double mutant.^{35–37}

The main limit of the present study is its use of qualitative analysis, for example, Sanger sequencing. Qualitative analysis is limited, as it cannot describe exact proportions of viral mutants. Usually, a threshold of $> 50\%$ is used to define a dominant viral strain, but it is difficult to interpret data when the proportions of wild and mutant viruses are comparable. With recent advances in biotechnology, such as pyrosequencing, the quantification of these viral variants has become possible and more accurate, but few data are available.

In summary, the highlights of this study are the identification of independent risk factors to predict significant fibrosis (\geq F3) in patients with chronic hepatitis B and, unprecedentedly, the description of the G1899A mutation as an independent protective factor against severe fibrosis. This study confirms that BCP mutation is closely associated with an increased risk of developing severe fibrosis. Further, international studies are needed to examine the cumulative effect of mutations on the progression of liver disease during the long course of chronic infection,³⁸ particularly the antagonistic role of G1899A in the presence of BCP mutants. In the future, the detection of these PC and BCP mutations may be helpful in identifying HBV-infected subjects who will develop cirrhosis and thus need active antiviral treatments.

Acknowledgments

The authors thank the AC11-HBV Study and AC33-Virology groups from the ANRS, Dr Christine Larsen, coordinator of the

Infectious Diseases Department at the French Institute for Public Health Surveillance (InVS, 12 rue du Val d'Osne - 94415 Saint-Maurice Cedex France, France) and all the clinicians who participated in this study. The authors thank K. Erwin for proofreading the English manuscript.

References

- Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* 2004; **11**: 97–107.
- Kao JH. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *Korean J. Intern. Med.* 2011; **26**: 255–61.
- Wright TL, Lau JY. Clinical aspects of hepatitis B virus infection. *Lancet* 1993; **342**: 1340–4.
- Fattovich G. Natural history of hepatitis B. *J. Hepatol.* 2003; **39** (Suppl 1): S50–8.
- Funk ML, Rosenberg DMLok AS. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J. Viral Hepat.* 2002; **9**: 52–61.
- Kitab B, Essaid El Feydi A, Afifi R *et al.* Variability in the precore and core promoter regions of HBV strains in Morocco: characterization and impact on liver disease progression. *PLoS One* 2012; **7**: e42891.
- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S *et al.* Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; **2**: 588–91.
- Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y *et al.* Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J. Virol.* 1994; **68**: 8102–10.
- Tong S. Mechanism of HBV genome variability and replication of HBV mutants. *J. Clin. Virol.* 2005; **34** (Suppl 1): S134–8.
- Pivert A, Servant-Delmas A, Lunel-Fabiani F, Le Guillou-Guillemette H, Laperche SDucancelle A. Correlation between the promoter basal core and precore mutations and HBsAg quantification in French blood donors infected with hepatitis B virus. *J. Med. Virol.* 2014; **87**: 529–35.
- Ozasa A, Tanaka Y, Orito E *et al.* Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; **44**: 326–34.
- Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. *Liver Int.* 2007; **27**: 1356–63.
- Gandhe SS, Chadha MS, Walimbe AM, Arankalle VA. Hepatitis B virus: prevalence of precore/core promoter mutants in different clinical categories of Indian patients. *J. Viral Hepat.* 2003; **10**: 367–82.
- Wu JC, Huang YH, Chau GY *et al.* Risk factors for early and late recurrence in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2009; **51**: 890–7.
- Liao Y, Hu X, Chen J *et al.* Precore mutation of hepatitis B virus may contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *PLoS One* 2012; **7**: e38394.
- Liu S, Zhang H, Gu C *et al.* Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009; **101**: 1066–82.
- Chen CH, Lee CM, Lu SN *et al.* Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2005; **43**: 6000–6.
- Bai X, Zhu Y, Jin Y *et al.* Temporal acquisition of sequential mutations in the enhancer II and basal core promoter of HBV in individuals at high risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2011; **32**: 63–8.
- Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Zali MR, Norder H, Magnius LO. T1764G1766 core promoter double mutants are restricted to Hepatitis B virus strains with an A1757 and are common in genotype D. *J. Gen. Virol.* 2005; **86**: 2451–8.
- Poustchi H, Mohamadkhani A, Bowden S *et al.* Clinical significance of precore and core promoter mutations in genotype D hepatitis B-related chronic liver disease. *J. Viral Hepat.* 2008; **15**: 753–60.
- Ganne-Carrie N, Williams V, Kaddouri H *et al.* Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *J. Med. Virol.* 2006; **78**: 335–40.
- Lapalus M, Laouenan C, Cardoso AC *et al.* Precore/core promoter variants to predict significant fibrosis in both HBeAg positive and negative chronic hepatitis B. *Liver Int.* 2015.
- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; **24**: 289–93.
- Rousselet MC, Michalak S, Dupre F *et al.* Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology* 2005; **41**: 257–64.
- Villeneuve JP, Durantel D, Durantal S *et al.* Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J. Hepatol.* 2003; **39**: 1085–9.
- Friedt M, Gerner P, Lausch E, Trubel H, Zabel B, Wirth S. Mutations in the basic core promoter and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999; **29**: 1252–8.
- Lin CL, Tseng TC, Kao JH. What can we learn from hepatitis B virus clinical cohorts? *Liver Int.* 2015; **35** (Suppl 1): 91–9.
- Lin CL, Kao JH. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B. *J. Biomed. Sci.* 2008; **15**: 137–45.
- Yang Y, Sun JW, Zhao LG, Bray F, Xiang YB. Quantitative evaluation of hepatitis B virus mutations and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis of prospective studies. *Chin J Cancer Res.* 2015; **27**: 497–508.
- Yang HI, Yeh SH, Chen PJ *et al.* Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2008; **100**: 1134–43.
- Liu Y, Zhong Y, Zou Z *et al.* Features and clinical implications of hepatitis B virus genotypes and mutations in basal core promoter/precore region in 507 Chinese patients with acute and chronic hepatitis B. *J. Clin. Virol.* 2010; **47**: 243–7.
- Chu CM, Lin CC, Chen YC, Jeng WJ, Lin SM, Liaw YF. Basal core promoter mutation is associated with progression to cirrhosis rather than hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. *Br. J. Cancer* 2012; **107**: 2010–5.
- Tseng TC, Liu CJ, Yang HC *et al.* Higher proportion of viral basal core promoter mutant increases the risk of liver cirrhosis in hepatitis B carriers. *Gut* 2015; **64**: 292–302.
- Zheng JX, Zeng Z, Zheng YY *et al.* Role of hepatitis B virus base core and precore/core promoter mutations on hepatocellular carcinoma in untreated older genotype C Chinese patients. *J. Viral Hepat.* 2011; **18**: e423–31.
- Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condrey LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000; **31**: 1037–44.
- Li J, Buckwold VE, Hon MW, Ou JH. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J. Virol.* 1999; **73**: 1239–44.
- Baptista M, Kramvis A, Kew MC. High prevalence of 1762(T) 1764 (A) mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers. *Hepatology* 1999; **29**: 946–53.
- Chen CH, Hung CH, Lee CM *et al.* Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* 2007; **133**: 1466–74.

3. Chapitre 3 : Mise au point de la transduction de cellules HepaRG par des vecteurs lentiviraux

Transduction of differentiated HepaRG cells using lentiviral vectors: an original tool for proteins expression. A. Pivert, C. Lefeuvre, C.T. Tran, C. Baillou, D. Durantel, H. Le Guillou-Guillemette, F. Lemoine, F. Lunel-Fabiani, A. Ducancelle. **Article en préparation pour soumission à Scientific Reports**

Il existe actuellement un manque d'outils *in vitro* simples et efficaces pour l'étude des affections hépatiques en lien avec les virus des hépatites. De plus, certains virus hépatotropes comme le VHB, ne sont pas cultivables ce qui complique l'étude de la biologie de ces virus. Récemment, une lignée hépatocytaire non cancéreuse a été développée et a permis de grandes avancées dans la compréhension de certains mécanismes cellulaires en lien avec l'infection virale.

Afin d'améliorer les connaissances sur l'implication des protéines du VHB dans la fibrose hépatique, nous avons mis au point un outil de transduction des HepaRG en utilisant la technologie lentivirale. Dans un premier temps, nous avons validé ce modèle en utilisant le gène de la GFP afin de pouvoir facilement vérifier l'efficacité de la transduction des HepaRG, l'expression de la protéine d'intérêt et la stabilité de la production protéique dans le temps.

Nous avons montré par plusieurs techniques de titration que notre modèle était fonctionnel, notamment en quantifiant l'ADN proviral intégré dans les cellules transduites. Nous avons également pu vérifier en microscopie électronique et en cytométrie en flux que les séquences codantes portées par le vecteur d'expression de la particule lentivirale étaient bien intégrées dans le génome cellulaire et subissaient les deux étapes de transcription et de traduction. Nous avons également montré que l'expression de la GFP était stable sur plusieurs semaines même après le passage des HepaRG.

La transduction des HepaRG par des particules lentivirales est efficace, fonctionnelle et stable dans le temps. Cet outil innovant ouvre la voie à de nouvelles études de productions protéiques dans la lignée HepaRG, notamment dans le cadre de l'étude de la physiopathologie du VHB. Quelques améliorations, notamment au niveau du pourcentage de cellules exprimant le transgène pourront être réalisées afin d'optimiser cette méthode de transduction de cellules hépatocytaires par la technologie lentivirale. Pour cela, l'hypothèse majeure posée est l'augmentation de la MOI (Multiplicity Of Infection).

1 Introduction

2 There is a lack of *in vitro* models relevant for the study of liver diseases or functions. In fact,
3 the experimental models used to investigate the process of viral infection for viruses which
4 are difficult to maintain in cell culture, as HBV, and elucidate the mechanisms of viral
5 replication, have significant limitations. Primary human hepatocytes (PHH) are losing liver
6 functions during culture as drug metabolism or polarity. The method of preparation is time
7 consuming and the human genetic diversity involves heterogeneous material for quality and
8 limited availability. Although many different liver-derived cell lines exist, they do not
9 exhibit all of the *in vivo* liver receptor or functions that are necessary to study the viral cycle.
10 Indeed, transfected hepatic cells lines as HuH7 or HepG2 permit the HBV cycle life, but the
11 virus entry can't be studied because of the lack of specific receptor. By contrast, HepaRG
12 cells do express the membrane receptors, like NTCP and allow HBV entry. Therefore, as
13 previous published, HepaRG cells are the one of major cellular models for studying HBV
14 biology ^{1,2}.

15 HepaRG cells are bi-potent progenitor cells and represent a good example of complete
16 differentiation of liver progenitor cells *in vitro*. This cell line is a well-established hepatic
17 cell system able to differentiate into both hepatocyte-like cell and cholangiocyte-like cells
18 in the presence of dimethylsulfoxide (DMSO) and hydrocortisone ³. HepaRG is an efficient
19 *in vitro* model used for multiples applications: study of absorption, distribution, metabolism
20 and excretion, toxicity testing applications (hepatotoxicity, virology...), BioArtificial Livers
21 and transgenic liver humanized mice. They offer similar molecular characteristics as PHH,
22 including morphology, nuclear receptors, expression of key metabolic enzymes, and drug
23 transporters ^{3,4}. Unlike PHH, HepaRG cells have the advantage of being easily accessible
24 and represent a suitable alternative *in vitro* cell model to PHH.

25 The gene transfer methods related to HepaRG mainly described in the literature use synthetic
26 vectors with lipofection and electroporation techniques ^{5,6}. Most studies of liver cells lines
27 transfection using non-viral strategies (synthetic vectors) with a plasmid containing viral
28 sequences are frequently carried out in order to produce viral proteins, as production of HBV
29 proteins ⁷⁻⁹. Lentiviral technology is an efficient method to mediate gene transfer to a large
30 number of cells types, using vectors usually derived from the human immunodeficiency
31 virus genome and pseudotyping of recombinant particle with the envelope glycoprotein G
32 of the vesicular stomatitis virus (VSV-G). In addition, integration of the transgene into the
33 host genome provides time-prolonged and stable expression of the vector containing protein.
34 Lentiviral expression system is able to overcome the plasmid transfection experimental
35 requirements, such as the cell cycle stage (quiescent or dividing cells) or the transfection
36 permissiveness of each cell type. Furthermore, there is no cytopathogenic effect with this
37 technology ^{10,11}. Thus, lentiviral expression system can efficiently deliver the HBV genome
38 in quiescent hepatocytic cells for instance differentiated HepaRG cells and primary
39 hepatocytes. Since lentiviral transduction of HepaRG is not described in the literature, it is
40 therefore interesting to transduce HepaRG cells using this innovative technology to express
41 proteins. So, this paper describes for the first time the production of lentiviral vectors
42 protocols, titration methods, transduction protocols in differentiated HepaRG cells.

43 **Materials and methods**

44 **Cell Lines**

45 HEK 293T (ATCC® CRL-3216™) cells, used for transfection and transduction, are human
46 embryonic kidney cells transformed with the SV40 T-antigen. HEK 293T cells were
47 maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco®) supplemented with

48 10% fetal calf serum (Fetal Bovine Serum FBS, Gibco®), 2 mM L-glutamine (Gibco®) in
49 a humidified incubator containing 5% CO₂ in air at 37°C.

50 The HepaRG cell line (UMR INSERM 1052 CNRS 5286-Cancer Research Center, Lyon) is
51 maintained in William's Medium E medium (Gibco®) supplemented with 10% FetalClone®
52 II Serum (HyClone™), 2 mM GlutaMAX™ (Gibco®), 5 µg/mL human insulin (Sigma-
53 Aldrich®), 50 µM hydrocortisone (SERB laboratory), 1.8% DMSO (Sigma-Aldrich®) and
54 50U/mL penicillin/streptomycin in a humidified incubator containing 5% CO₂ in air at 37°C.
55 Four weeks minimum culture in this medium is required to obtain differentiated HepaRG
56 cells.

57 **Plasmids used for co-transfection**

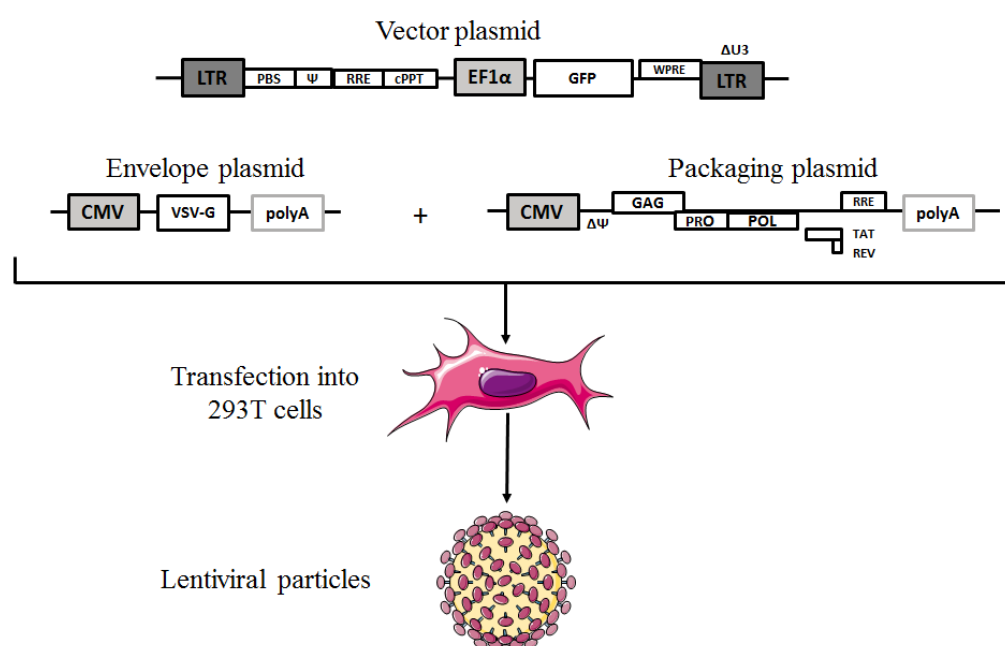
58 Three plasmids are necessary to provide an efficient transfection of HEK 293T and to
59 produce effective viral particles. The first is the vector plasmid, pENG1 EF1α-GFP, which
60 contains the GFP gene and the sequence *cis* expressed for replication and genome
61 integration. The second is the envelope vector presenting the VSV-G gene used to enlarge
62 the tropism of the lentiviral particle. The third is the encapsidation plasmid, pCMV-9 which
63 encodes the necessary genes *trans* expressed for the construction of lentiviral particle. All
64 the vectors have been kindly provided by the team of Pr Lemoine, CIMI Paris.

65 **Production of lentiviral particles**

66 *Transfection of HEK293T*

67 The three plasmids were co-transfected into HEK 293T cells to produce lentiviral particles
68 pseudotyped with the VSV-G envelope: the plasmid vector pENG1 EF1α-GFP (5.6 µg), the
69 encapsidation plasmid pCMV-9 (4.4 µg) and the envelope plasmid VSV- G (2 µg) (**Figure**
70 **1**). 2 x 10⁵ HEK 293T cells were seeded per well in a 24 well plate, 24 h prior to transfection
71 in DMEM medium supplemented without antibiotics. Twelve µg of plasmids were added to

72 a mixture of FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega)/Opti-MEM™ (Gibco®)
 73 according a FuGENE/DNA ratio of 3:1. The whole was incubated for 15 min at room
 74 temperature and then was deposited on the cells. Culture supernatant was harvested 72 h
 75 after transfection, purified by low-speed centrifugation (5 min, 500 g) and filtered through a
 76 0.45µm filter. High-titer viral stocks were prepared by concentrating viral supernatants 100-
 77 200 fold by ultracentrifugation (2 h, 50 000 g) and then stored at -80 °C.



78

79 **Figure 1: Co-transfection of the vector plasmid, packaging plasmid and envelope plasmid**
 80 **into 293T cells.** The envelope plasmid VSV-G expresses the envelope glycoprotein of the
 81 vesicular stomatitis virus (VSV-G) under the control of the CMV promoter. The
 82 encapsidation plasmid pCMV9 expresses the proteins necessary for the formation of the
 83 capsid (gag and pol), of the regulatory elements (tat, rev) under the control of the CMV
 84 promoter and is deleted from the sequence ψ . It expresses the structural and enzymatic
 85 proteins of HIV-1 necessary for the formation of a particle, encapsulating the coding
 86 sequences of the vector plasmid, retro-transcribing it, importing it into the nucleus and
 87 integrating it into the cell genome to express the sequences of interests.

88 HIV-1 Gag (p24) measurement

89 The p24 concentration in viral supernatants was determined by certified p24 immunoassay
 90 ELISA (VIDAS® HIV P24 II, bioMérieux) according to the manufacturer's instructions.

91 Dilutions 10^{-3} and 10^{-4} of the concentrated viral supernatant were tested. The dilutions were
92 carried out in DMEM medium. The titer is expressed in pg p24/mL.

93 *RNA titer*

94 RNA content of viral supernatant was quantified with a RT-qPCR. Viral supernatant (5 μ L)
95 was extracted using NucleoSpin[®] RNA kit (Macherey-Nagel). Purified RNA was
96 resuspended in 60 μ L Rnase-free H₂O. Twelve and half microliters of RNA was mixed with
97 a master mix containing 2.5 μ M Random hexamer (ThermoFischer Scientific), 1 X Reaction
98 Buffer (ThermoFischer Scientific), 20U Rnase inhibitor (ThermoFischer Scientific), 1 mM
99 dNTP, 200U (Eurogentec), RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFischer
100 Scientific). Mastermix and RNA were incubated for 10 min at 25°C, 60 min at 42°C and 10
101 min at 70°C. For real-time PCR, previously described primers FPLV2 and RPLV2 and probe
102 LV2 were used ¹². 5 μ L of cDNA was mixed with a mastermix containing 1X TaqMan™
103 Universal PCR MasterMix (ThermoFisher Scientific), 320 nM of forward (FPLV2) and
104 reverse (RPLV2) primer, 200 nM of the lentiviral probe (LV2). Amplification was
105 performed using one cycle of 95°C for 10 min and 30 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for
106 2 min. The titer is expressed in RNA copies/mL.

107 **Transduction of HEK 293T cells**

108 *GFP titer: flow cytometry*

109 HEK 293T cell transduction was performed with lentiviral particles containing the reporter
110 gene GFP. One hundred thousand HEK 293T cells were seeded per well in a 12-well plate.
111 Twenty-four hours later, cells were counted and dilutions 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} of
112 pENG1 EF1 α -GFP vector supernatants were prepared in DMEM medium supplemented
113 with 10% FBS. Then, 10 μ L of each dilution were added in 500 μ L of DMEM medium
114 supplemented with 10% FBS and 8 μ g/mL Polybrene[®] (Sigma) and incubated with cells.

115 Seventy-two hours after the addition of the viral supernatant, expression of GFP was
116 observed by an inverted fluorescence microscope (Leica DMI6000 B).
117 Then, cells were collected after adding 0.05% trypsin-EDTA, centrifuged for 5 min at 500 g
118 at 4°C and cell pellet is suspended in 1% paraformaldehyde (Sigma) in order to fix cells and
119 inactivate viral particles. A further centrifugation at 500 g for 5 min was carried out and cell
120 pellet was suspended in 1 mL of cold Phosphate Buffered Saline 1X. A sample was analyzed
121 for fluorescence with a FACSCanto™ BD flow cytometer (BD Biosciences). The titer was
122 expressed in TU/mL (Transducing Units, TU) and calculated from the following equation:
123 (number of target cells 24h after seeding) x (virus dilution factor) x (percentage of GFP-
124 positive cells) / (volume of viral supernatant added in mL). GFP titers were calculated an
125 average of FACS values at vector dilutions (in duplicate) corresponding to 1-20% of GFP-
126 positive cells in FACS (Fluorescence Assisted Cell Sorting) analysis. Selecting values in this
127 range decreases the risk of analyzing cells with multiple copies of the vector, which would
128 underestimate titer. Measurement of GFP in FACS after limiting dilution in cell culture
129 provided data of transduction efficiency and the remaining functional viral titer.

130 *DNA titer*

131 For determining DNA titers, genomic DNA from transduced cells was isolated 4 days after
132 transduction using the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel) according manufacturer's
133 recommendations. For real-time PCR analysis, 5 µL of genomic DNA was mixed with 12.5
134 µL of PCR master mix consisting of 2X TaqMan Universal MasterMix (Thermofisher), 320
135 nM of each forward (FPLV2), and reverse (RPLV2) primer, 200 nM of the lentiviral probe
136 (LV2). Five µL of genomic DNA from untransduced cells were used for negative controls.
137 All reactions were carried out in duplicate and amplifications were performed using one
138 cycle of 95°C for 10 min, and 30 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 2 min. Vector plasmid
139 DNA amplification was performed using concentrations ranging from 1.23×10^7 copies/µL

140 to 1.23×10^3 copies/ μL to generate a standard curve. We used the GAPDH gene to normalize
141 the qPCR results. The number of vector DNA molecules in transduced cells was calculated
142 by comparing threshold cycle (Ct) values of samples to that of the plasmid standard curve.
143 Vectors DNA titer was determined by considering the following parameters according to
144 protocol: number of cells plated and infected (number of cells count in day 2), lentiviral copy
145 number per cell, and volume of used lentivirus. Lentiviral copy number per cell was
146 determined by: (copy number LV2) / (copy number GAPDH) x 2. DNA titer (TU/mL) was
147 calculated according to the following formula: (Primary number of cells count in day 2) x
148 (lentiviral copy number per cell) x (dilution factor) / (volume of used lentivirus in mL).

149 **Transduction of differentiated HepaRG cells**

150 After 4 weeks of culture in the presence of DMSO and hydrocortisone, the differentiated
151 HepaRG cells were transduced by lentiviral particles containing the GFP transgene to a
152 Multiplicity Of Infection (MOI) of 2.4. The MOI tested was deduced using the following
153 equation: (viral titer in TU/mL) x (volume of viral supernatant added to cells in mL) /
154 (number of cells seeded). Viral supernatant and 8 $\mu\text{g/mL}$ of Polybrene® were added to the
155 usual medium on approximately $2 \cdot 10^5$ HepaRG cells. After addition of the viral supernatant,
156 the expression kinetics of GFP in the cells was observed by fluorescence microscopy at
157 different times: 48, 72, 96 h and 9 days after transduction. The test was carried out in
158 duplicate. The percentage of GFP-positive cells 9 days after transduction in FACS analysis
159 was determinate.

160 **Results**

161 **Transfection of HEK 293T and viral titration**

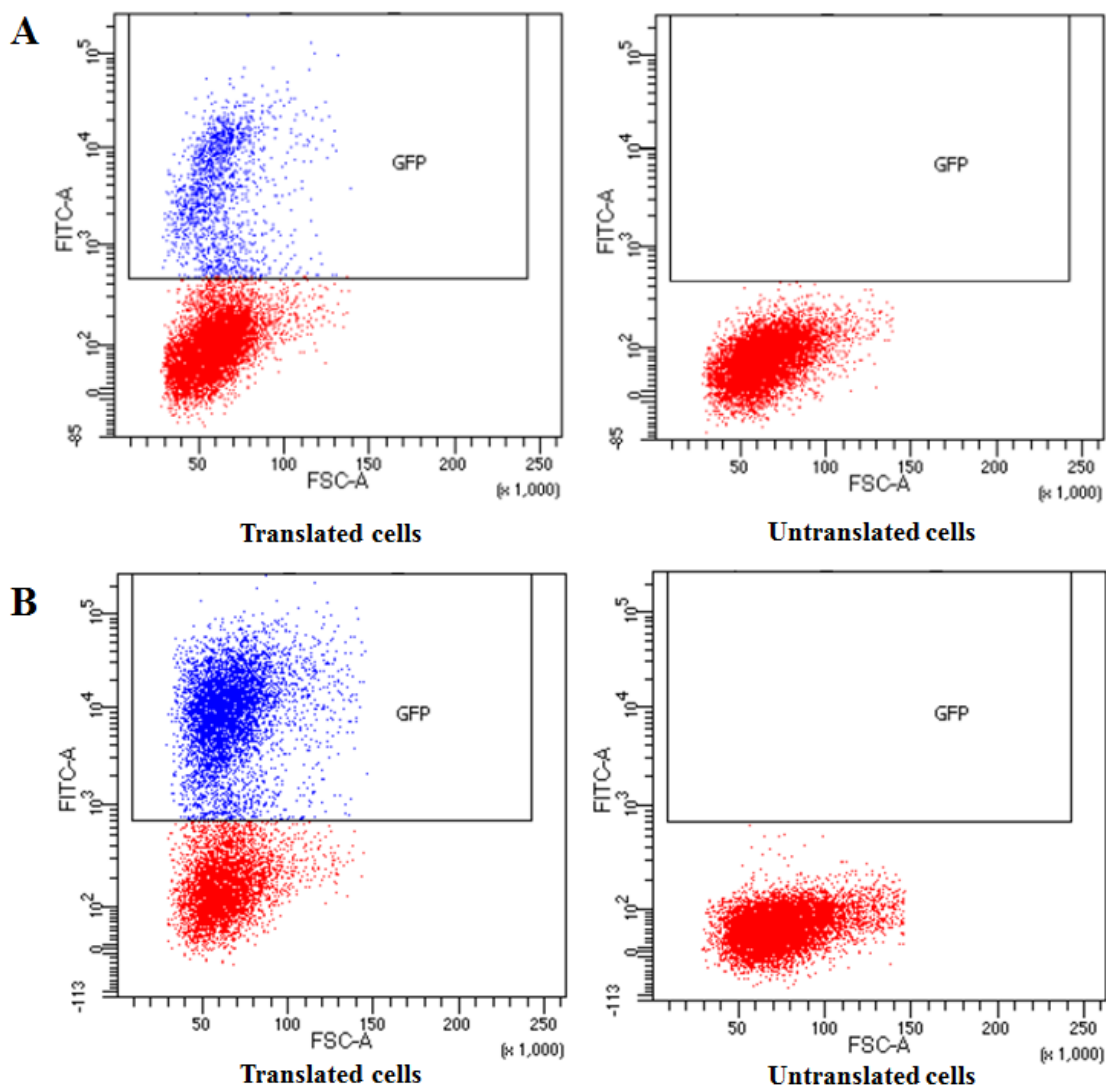
162 Three assays of lentiviral production were performed and p24 Ag was measured after
163 concentration by centrifugation. The mean concentration of p24 in viral supernatants was
164 $5.83 \pm 3.65 \times 10^5$ pg/mL (range 3.24×10^5 to 1×10^6 pg/mL).

165 Each lentiviral supernatant was also quantified for viral RNA. The mean obtained was 7.52
166 $\times 10^{10}$ copies/mL (range 7.95×10^9 to 2.22×10^{11} copies/mL).

167 **Transduction of HEK 293T and functional titration**

168 Twenty-four hours after seeding, approximately 2×10^5 target cells were count. The
169 threshold of fluorescence for FACS results were determined with the negative control which
170 is untransduced cells. The cells expressing GFP showed significant fluorescence for FITC
171 canal. The GFP titer following transduction by lentivirus was 3.2×10^7 TU/mL ($n=1$). The
172 concentrated viral supernatant titer was calculated with an average GFP positive cell count
173 of 15.8%, corresponding to the viral supernatant diluted 10^{-1} (**Figure 2-A**). For the
174 concentrated pure viral supernatant, 53% of the cells produced fluorescence (**Figure 2-B**).
175

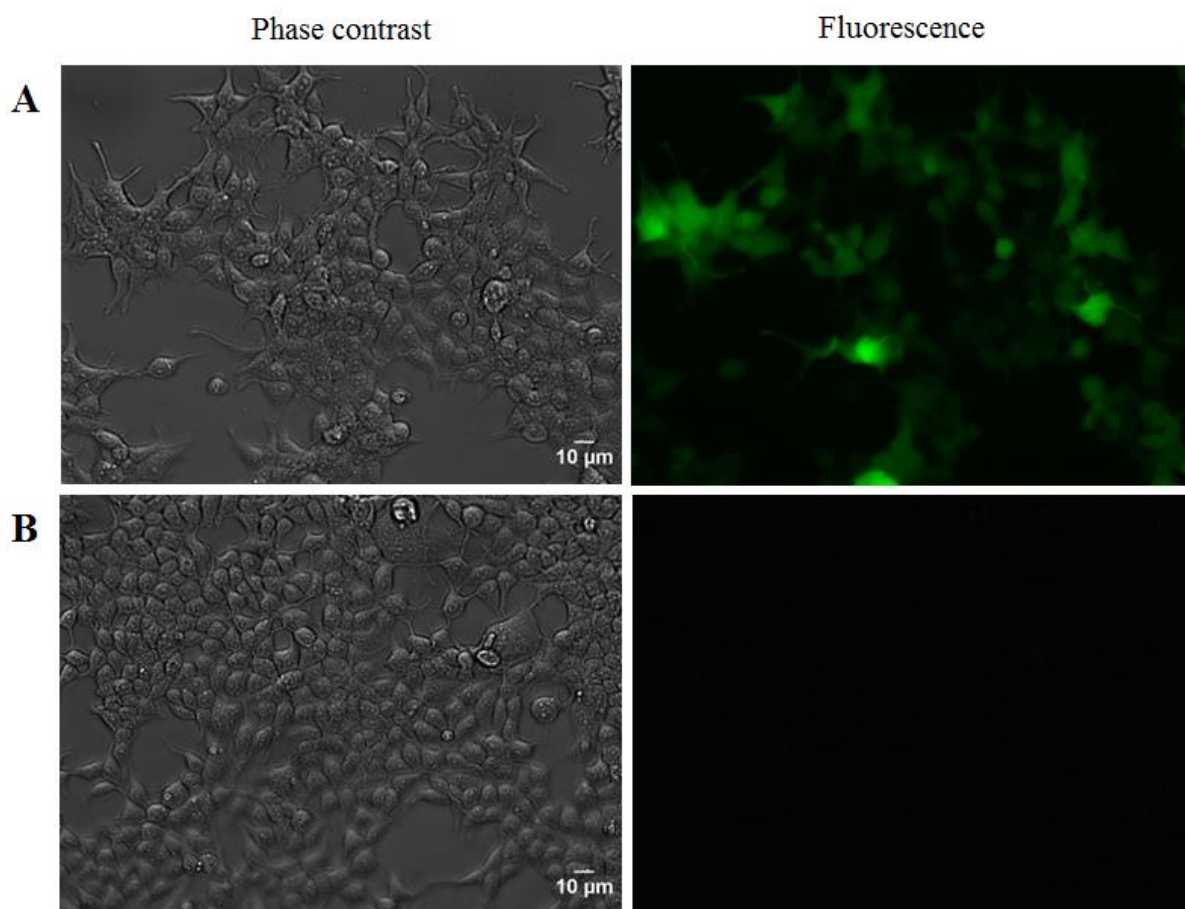
176



177

178 **Figure 2: Quantification of the GFP expression by flow cytometry in the cells 293T**
 179 **following the transduction of these cells by lentiviruses.** The horizontal axis represents the
 180 forward scatter size (FSC-A) where an increased signal may indicate an increase in cell size
 181 or budding. The vertical axis indicates the intensity of the GFP fluorescence (FITC-A). Blue
 182 dots represent the cells expressing GFP. Red dots represent the cells that do not express
 183 GFP. The GFP positivity threshold of the cells is determined according to the negative
 184 control (untranslated cells). The titer of the concentrated viral supernatant is calculated with
 185 an average GFP positive cell count of 15.8%, corresponding to the viral supernatant diluted
 186 10^{-1} (A). With 10 μL of concentrated pure viral supernatant, the percentage of GFP positive
 187 cells is 53% (B).

188 Moreover, expression of GFP observed in fluorescence microscopy confirmed that our
189 lentiviral transduction was effective (**Figure 3**).



190
191 **Figure 3: Phase contrast and fluorescence microscopy of 293T cells expressing GFP**
192 **following the transduction of these cells by lentiviruses containing GFP gene. The cells**
193 **emit fluorescence during the transduction of these cells with 10 μL of concentrated pure**
194 **viral supernatant (A). Without the addition of lentivirus, cells did not emit fluorescence (B).**
195 **The scale bar represents 10μm (A-B).**

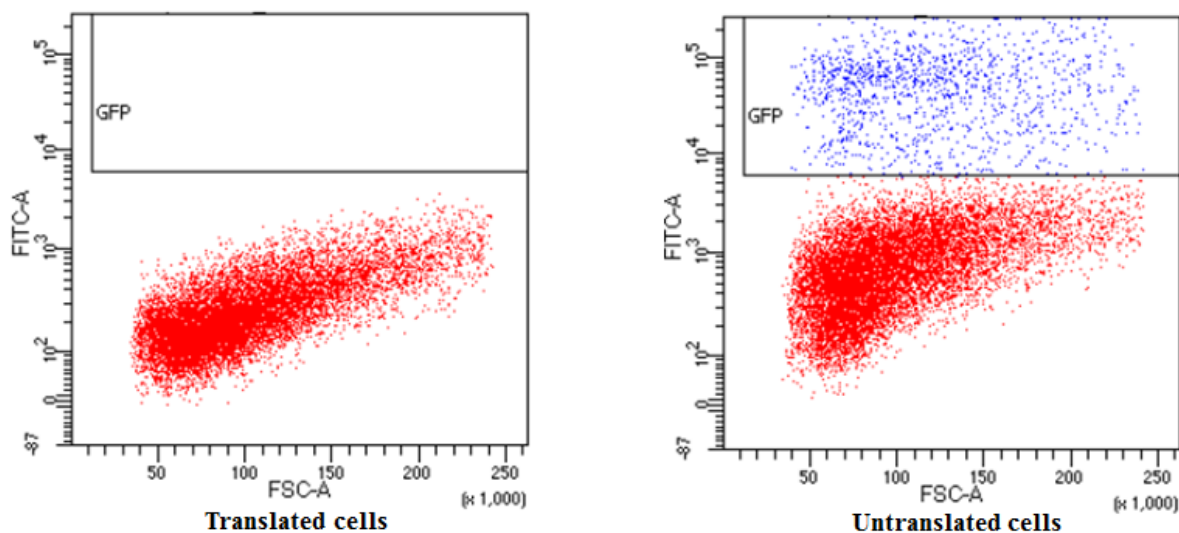
196 Using the qPCR, the quantitation of cells was 67,560 for the well containing 10 μ L of the
 197 dilution 10^{-1} according to the GAPDH detection comparing to the standard curve. 219,200
 198 copies of lentiviral genome were quantified for the same well. DNA titer calculated with
 199 qPCR was 1.3×10^9 TU/mL ($n=1$) (**Table 1**).

200 **Table 1: Determination of lentiviral titers by qPCR.** TU = Titer Units

	Dilutions	
	1	10^{-1}
GAPDH average (copies/extract)	67,560	49,000
LV2 average (copies/extract)	1,184,000	219,200
Lentiviral copy / cell	48.3	6.5
Titer (TU/mL)	9.7×10^8	1.3×10^9

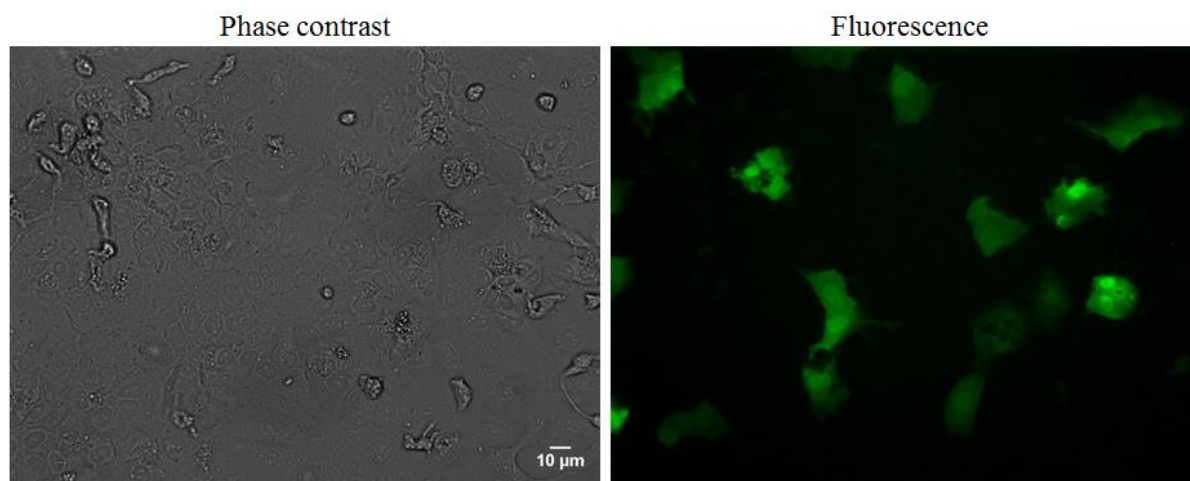
201 **Transduction of differentiated HepaRG cells**

202 Ten days after transduction of HepaRG cells, the percentage of GFP positive cells was 9.6%
 203 when observed in FACS (**Figure 4**). The threshold of fluorescence for FACS results was
 204 determined according to the values observed with negative control which was untransduced
 205 cells. The cells which expressed GFP showed significant fluorescence for FITC canal.
 206 Expression of GFP was also confirmed by microscopy (**Figure 5**).



207

208 **Figure 4: Quantification of the GFP expression by flow cytometry in the cells HepaRG**
 209 **following the transduction of these cells by lentiviruses.** The horizontal axis represent the
 210 forward scatter size (FSC-A) where an increased signal may indicate an increase in cell size
 211 or budding. The vertical axis indicates the intensity of the GFP fluorescence (FITC-A). Blue
 212 dots represent the cells expressing GFP. Red dots represent the cells that do not express
 213 GFP. The GFP positivity threshold of the cells is determined according to the negative
 214 control (untranslated cells). The percentage of GFP positive cells at MOI 2.4 is 9.6%.



215

216 **Figure 5: Phase contrast and fluorescence microscopy of HepaRG cells expressing GFP**
 217 **following the transduction of these cells by lentiviruses containing GFP gene 9 days after**
 218 **transduction.** The cells emit fluorescence during the transduction of these cells at MOI 2.4.
 219 The scale bar represents 10 μ m.

220 Discussion

221 The transduction of HepaRG cells by lentiviruses for the expression and studies of proteins
222 has never been described in the literature. It is important to distinguish the terms "infection"
223 and "transduction". The infection corresponds to the completion of a complete replicative
224 cycle, whereas transduction refers to the entry of a viral vector and the expression of the
225 transgene in a cell. The main difficulties for the proteins production by gene transfer
226 technology are expression rate and long-term stability. Most gene transfer methods that
227 relate to HepaRG use synthetic vectors with lipofection and electroporation techniques. In
228 fact, Laurent *et al.* described that plasmid DNA and formulations with neutral co-lipids, the
229 lipophosphoramidate compounds KLN47 and BSV10, allowed expression of the GFP in
230 ~50% of adherent progenitor HepaRG cells, while electroporation targeted GFP expression
231 in ~85% of both progenitor and differentiated cells in suspension ⁵. Moreover, Demazeau *et*
232 *al.* reported that egg phosphatidylcholine/Diether-NH₂-based liposomes enabled an efficient
233 transfection in both HEK293T and proliferating progenitor HepaRG cells ⁶. The authors
234 established a new efficient lipofection-mediated gene transfer in hepatocyte-like HepaRG
235 cells. Effective transduction of HepaRG cells is also possible with recombinant
236 baculoviruses carrying the genome of interest ¹¹. Furthermore, Zhao *et al.* demonstrated that
237 the adenoviral vector-mediated transduction yields 10-fold higher viral titers than the
238 transient transfection approach ¹³. However, a high cell death rate and laborious development
239 is reported for electroporation method. For lipofection method, reproducibility and low yield
240 of intracellular penetration are unsatisfactory. For recombinant baculoviruses and adeno
241 associated vector, expression of the protein over time is limited because the viral genome
242 does not integrate into the cellular genome, so it's not persistent infection.

243 According to our results in fluorescence microscopy and FACS, lentiviral technology is
244 efficient in differentiating HepaRG cells: GFP expression is stable and time-prolonged.

245 Indeed, expression of the GFP is observed in ~10% of differentiated HepaRG cells after 10
246 days of transduction and this expression is prolonged by 4 weeks after a passage of HepaRG
247 cells (data not shown). The use of lentiviruses may be able to overcome the cell cycle, the
248 cell permissiveness and cytopathogenic effect. Lentiviral vectors are efficient vehicles for
249 stable gene transfer in hepatocytes, and the capacity to transduce a large scale of cells is a
250 real advantage. In our experience, HepaRG cells appeared to be easy to transduce by
251 lentiviral particles, according to the classical constraints of cellular culture. This line didn't
252 present any difficulties for cultivation and maintenance if the recommended reagents were
253 used.

254 Evaluation of lentiviral titer is required in order to determine whether produced lentiviral
255 particles are effective. Various methods of functional and non-functional lentiviral titration
256 have been described in literature, including p24 antigen ELISA, RNA titers, FACS and
257 qPCR. The p24 concentration determination in viral supernatants by ELISA is a simple and
258 rapid method that allows obtaining quickly a titer. Nevertheless, this quantitative analysis
259 overestimates the number of lentiviral particles because it measures both functional particles
260 (p24 protein associated with lentivirus) and non-functional (free p24 protein)¹⁴. The RNA
261 quantification in the viral supernatant is more reliable than the p24 assay because the p24
262 titers are unaffected by the omission of the transfer plasmid. However, as p24 titer, it cannot
263 predict a functional titer due to the inevitable formation of defective particles during the
264 production process. The RNA and p24 titer observed are consistent with those of the
265 literature¹⁴. We show that our lentiviral particle production is reproducible according the
266 weak standard deviation observed between our assays.

267 To upscale the functional titer of our production, FACS analysis was realized, but it was
268 limited to the vectors with expression of fluorescent transgenes or to interest protein with
269 existing fluorescent antibodies.

270 The quantification of the proviral DNA integrated in the transduced 293T cells is likely to
271 provide a more accurate measurement of the viral titer than the quantification of the particles
272 in the culture supernatant. In fact, only viruses competent for transduction will be detected
273 by this method. However, studies have shown that integration events were not necessarily
274 correlated with gene expression because a significant proportion of provirus fits into genome
275 regions that are unlikely to transcribe genes ¹². In order to overcome this inconvenience,
276 Lizée *et al.* developed a real-time quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain
277 Reaction (RT-qPCR) method to rapidly and precisely quantify transgenic mRNA copies
278 following transduction. In addition, studies have shown that quantitative analysis of
279 transgene mRNA levels were well-correlated with GFP fluorescence observed in cytometry
280 ¹⁵.

281 An expression of the GFP protein in differentiated HepaRG cells at an MOI of 2.4 was
282 observed in microscopy and FACS with a weak proportion of cells infected. The MOI may
283 be increase to upscale this proportion and also the efficiency of transduction.

284 So, we conclude that HepaRG transduction by lentiviral technology will subsequently be
285 useful for many applications as studying the hepatic fibrogenesis and producing specific
286 HBV proteins. Indeed, news studies are necessary to explore the relationship between
287 stellate hepatic cells and hepatocyte during the development of fibrosis in hepatitis B
288 infection. The measurement of secreted pro-fibrotic markers by stellate hepatic cells in
289 response to viral infection of hepatocytes can explain several steps of this process. We
290 hypothesize that the development of an innovative tool as transduction of differentiated
291 HepaRG cells is a technological advance for studying HBV *in vitro*.

292

293 **References**

- 294 ¹ Watashi, K., Urban, S., Li, W. & Wakita, T. NTCP and beyond: opening the door to
295 unveil hepatitis B virus entry. *Int J Mol Sci* **15**, 2892-2905, doi:ijms15022892 (2014).
- 296 ² Hayes, C. N. & Chayama, K. HBV culture and infectious systems. *Hepatol Int* **10**, 559-
297 566, doi:10.1007/s12072-016-9712-y (2016).
- 298 ³ Gripon, P. *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl*
299 *Acad Sci U S A* **99**, 15655-15660, doi:10.1073/pnas.232137699 (2002).
- 300 ⁴ Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor
301 for human hepatitis B and D virus. *Elife* **1**, e00049, doi:10.7554/eLife.00049 (2012).
- 302 ⁵ Laurent, V. *et al.* Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: new
303 means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol J* **5**, 314-320,
304 doi:10.1002/biot.200900255 (2010).
- 305 ⁶ Demazeau, M. *et al.* Efficient transfection of Xenobiotic Responsive Element-biosensor
306 plasmid using diether lipid and phosphatidylcholine liposomes in differentiated HepaRG
307 cells. *Int J Pharm* **524**, 268-278, doi:S0378-5173(17)30268-5 (2017).
- 308 ⁷ Bhoola, N. H., Reumann, K., Kew, M. C., Will, H. & Kramvis, A. Construction of
309 replication competent plasmids of hepatitis B virus subgenotypes A1, A2 and D3 with
310 authentic endogenous promoters. *J Virol Methods* **203**, 54-64, doi:S0166-0934(14)00110-4
311 (2014).
- 312 ⁸ Nishitsuji, H. *et al.* Novel reporter system to monitor early stages of the hepatitis B virus
313 life cycle. *Cancer Sci* **106**, 1616-1624, doi:10.1111/cas.12799 (2015).
- 314 ⁹ Zhang, Z. *et al.* In vitro and in vivo replication of a chemically synthesized consensus
315 genome of hepatitis B virus genotype B. *J Virol Methods* **213**, 57-64, doi:S0166-
316 0934(14)00435-2 (2015).

- 317 ¹⁰ Dull, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.
318 *J Virol* **72**, 8463-8471 (1998).
- 319 ¹¹ Lucifora, J. *et al.* Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG
320 cells. *Hepatology* **51**, 63-72, doi:10.1002/hep.23230 (2010).
- 321 ¹² Sastry, L., Johnson, T., Hobson, M. J., Smucker, B. & Cornetta, K. Titering lentiviral
322 vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther* **9**, 1155-
323 1162, doi:10.1038/sj.gt.3301731 (2002).
- 324 ¹³ Zhao, J. H. *et al.* A novel toolbox for the in vitro assay of hepatitis D virus infection. *Sci*
325 *Rep* **7**, 40199, doi:srep40199 (2017).
- 326 ¹⁴ Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z. & Gijssbers, R. Comparison of
327 lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol* **6**, 34, doi:1472-6750-6-34 (2006).
- 328 ¹⁵ Lizee, G. *et al.* Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as
329 a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression. *Hum*
330 *Gene Ther* **14**, 497-507, doi:10.1089/104303403764539387 (2003).

4. Chapitre 4 : Production des particules lentivirales exprimant les protéines HBc et HBe du VHB

4.1. Introduction

Ce dernier volet de la thèse est orienté sur les différentes techniques réalisées pour parvenir à la production de particules lentivirales exprimant les protéines HBc et/ou HBe du VHB. En effet, parallèlement à la mise au point de la transfection des HepaRG avec les particules lentivirales témoins exprimant la GFP, nous avons construit les vecteurs d'expression contenant les séquences du VHB pour produire les protéines HBc et HBe dans les hépatocytes et mesurer l'impact de cette production protéique sur l'induction de la fibrose hépatique. Comme décrit dans la partie Revue Bibliographique (cf 1.2.1 Organisation du génome), le PBC régule la transcription de deux ARNm viraux : l'ARNm PC qui est traduit en protéine HBe et l'ARNpg qui sert de matrice pour la synthèse des protéines HBc et pol. Le mécanisme régulant la transcription de ces deux ARNm reste inconnu. Il est difficile de connaître la proportion relative de la production de ces deux protéines au cours du cycle de réplication virale.

C'est pourquoi nous avons choisi de recourir à trois constructions différentes permettant soit la synthèse concomitante des protéines HBe et HBc soit la production isolée de la protéine HBc (Figure 34) :

- La construction CIF : elle contient la séquence du PBC et les régions PC et C. Elle nous permettra d'évaluer la synthèse des protéines HBc et HBe sous le contrôle du PBC et d'évaluer l'impact du double mutant du PBC sur la production *in vitro* des protéines HBc et HBe ;
- La construction PCC : elle contient les séquences des régions PC et C. Elle nous permettra de synthétiser les protéines HBe et HBc sans l'influence du

PBC et d'évaluer l'impact de leur production sur l'expression des marqueurs pro-fibrotiques ;

- La construction YAP : elle contient la séquence du gène C isolée. Elle nous permettra d'étudier individuellement le rôle de la protéine HBc dans l'induction de la fibrose. La comparaison des mesures réalisées suite à la transduction des hépatocytes par la particule exprimant uniquement la protéine C avec celles réalisées par la construction PCC nous permettra d'appréhender l'impact de la protéine HBe indépendamment du rôle de la protéine HBc.



Figure 34 : Constructions des plasmides d'expression contenant les séquences des régions PBC, PC et C.

La construction CIF contient les trois régions cibles à savoir le PBC et les gènes PC et C. La construction PCC contient les régions PC et C afin de produire les protéines HBe et HBc sous l'influence d'un promoteur fort. La construction YAP contient la région C uniquement afin de ne produire que la protéine HBc.

Un des objectifs du projet Lenticore est de comprendre le rôle des mutants du PBC et de la région PC dans la fibrogénèse hépatique. En effet, l'étude clinique menée chez les patients chroniquement infectés a montré une implication significative du double mutant PBC et de la mutation G1899A dans l'évolution de la fibrose hépatique [109]. Pour apprécier un impact significatif de la présence de mutations sur le génome viral, les génomes mutés dans les régions PBC et PC doivent être comparés à des génomes sauvages. La production de particules lentivirales a donc été réalisée avec les séquences sauvages pour les trois

formats CIF, PCC et YAP. Nous avons également produit des particules lentivirales à partir de séquences mutées aux positions 1762/1764 et 1899 pour les trois constructions CIF, PCC et YAP. Ainsi, nous avons dû produire six vecteurs distincts, dans le but d'étudier uniquement le double mutant du PBC et la mutation G1899A.

Comme décrit dans la Revue Bibliographique (cf 3.2.4.c) Vecteurs lentiviraux), il est nécessaire pour utiliser cette technologie de construire un plasmide d'expression par génie moléculaire. Un vecteur sera construit pour chacune des situations décrites ci-dessus. La production de particules lentivirales sera également réalisée pour chacun des cas présentés.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Cellules

Pour la transfection des plasmides et l'obtention de particules lentivirales, nous avons utilisé les cellules HEK293T (ATCC[®] CRL-3216[™]). Ces cellules ont également été utilisées en transduction pour la détermination du titre viral des vecteurs produits. Le milieu de culture contient du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco[®]) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum FBS, Gibco[®]) et 2 mM de L-glutamine (Gibco[®]). L'incubation des cellules est réalisée dans une étuve à 37°C et sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Pour l'étude de l'impact de la production des protéines HBc et HBe sur les hépatocytes, nous avons choisi d'utiliser des HepaRG (UMR INSERM 1052 CNRS 5286 - Centre de recherche en cancérologie, Lyon). Le milieu de culture est composé de William's Medium E (Gibco[®]) supplémenté avec 10 % de FetalClone[®] II Serum (HyClone[™]), 2mM de GlutaMAX[™] (Gibco[®]), 5µg/ml d'insuline humaine (Sigma-Aldrich[®]), 50µM d'hydrocortisone (SERB laboratoire) et 50U/ml de pénicilline/streptomycine. Après deux semaines de culture, la différenciation de ces cellules est obtenue en quatre semaines par

l'ajout de 1,8 % de DMSO (Sigma-Aldrich®) dans le milieu de culture. Elles sont cultivées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

4.2.2. Obtention des séquences d'intérêt

a) Echantillons sources

Les plasmas utilisés pour obtenir les séquences à intégrer dans nos vecteurs d'expression ont été sélectionnés parmi les patients de l'étude ANRS (2008-2, CSS7 n°1399) (cf Chapitre 2). Plusieurs patients ont été sélectionnés afin de répondre à l'ensemble des phénotypes de mutations aux positions 1762/1764, 1896 et 1899 (Tableau 5). Seules les constructions à partir des patients 1079 et TOL ont été réalisées à ce jour.

Tableau 5 : Plasmas des patients utilisés pour obtenir les séquences d'intérêt.

L'ensemble des profils d'intérêt ont été sélectionnés parmi les patients de l'étude ANRS. Seules les constructions 1079 et TOL ont été réalisées en vecteur d'expression, mais l'ensemble des séquences d'intérêt ont été obtenues.

Identification	1762/1764	1896	1899
1079	Sauvage	Sauvage	Sauvage
845	Mutant	Sauvage	Sauvage
0050	Mutant	Mutant	Sauvage
917	Sauvage	Mutant	Sauvage
TOL	Mutant	Sauvage	Mutant
KOR	Sauvage	Sauvage	Mutant
1475	Sauvage	Mutant	Mutant
1988	Mutant	Mutant	Mutant

b) Extraction de l'ADN du VHB

Les acides nucléiques ont été extraits par une technique automatisée utilisant la silice magnétique sur l'automate easyMAG® (BioMérieux) à partir de 200µl de plasmas conservés à -20°C.

c) Amplification des séquences d'intérêt

La technique d'amplification des séquences d'intérêt par PCR nichée a été développée au laboratoire. Les amorces de première PCR, COF et COR, sont respectivement situées en amont du PBC et en aval du gène C [165]. Le mélange réactionnel de 50µl est composé de 1X de Premix Ex Taq™ (TaKaRa), 250nM de chaque amorce (Tableau 6) et 10µl d'extrait d'acides nucléiques. L'amplification est réalisée par 30 cycles de 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 53°C et 1 minute à 72°C dans le thermocycleur Veriti® (Applied Biosystems™).

Tableau 6 : Amorces utilisées lors de l'amplification des séquences d'intérêt (régions PBC, PC, C) et du séquençage.

La séquence de référence utilisée porte le numéro Genbank X98077. Les amorces des PCR nichées sont bornées en 5' par un site de restriction enzymatique (en bleu) : MluI (ACGCGT) pour les amorces sens, Sall (GTCGAC) pour l'amorce antisens.

Identification de l'amorce	Séquences des amorces	Position sur le génôme
COF	5'-CACTTCGCTTCACCTCTGCAC-3'	1583 - 1603
COR	5'-AGCCCCGTAAAGTTTCCCAC-3'	2492 - 2473
MluI-CIF	5'- ACGCGT GAGGCATACTTCAAAGACTG-3'	1699 - 1718
MluI-PCC	5'- ACGCGT TCTTTGTACTAGGAGGCTGTA-3'	1766 - 1786
MluI-YAP	5'- ACGCGT GCATGGACATTGACCCTTAT-3'	1900 - 1919
Sall-CIR	5'- GTCGAC AGTTTCCCACCTTATGAGTC-3'	2482 - 2463

Trois PCR nichées sont réalisées afin d'amplifier les différents fragments d'intérêt à savoir la séquence complète contenant le PBC et les gènes PC et C, la séquence ne contenant que les gènes codant PC et C et la séquence contenant uniquement le gène C. La séquence complète est nommée « CIF » (783pb), la séquence tronquée du promoteur est nommée « PCC » (717pb) et la séquence contenant uniquement C est appelée « YAP » (583pb), en références aux amorces utilisées en sens. Les amorces utilisées en PCR nichée sont donc spécifiques de chaque fragment ciblé. Les amorces CIF et CIR sont des amorces publiées [165]. Les amorces PCC et YAP ont été définies au laboratoire à l'aide du logiciel Primer3web (version 4.0.0). Les amorces sens présentent à l'extrémité 5' un site de restriction MluI qui permettra de réaliser une restriction enzymatique avant le clonage dans le vecteur d'expression. L'amorce antisens est commune aux trois PCR nichées. Elle est rallongée en 5' d'un site de restriction Sall (Tableau 6). Le mélange réactionnel est composé de 20µl de Premix Ex Taq™ (TaKaRa) et 0,5µM de chaque amorce sous un volume final de 35µl auxquels sont ajoutés 5µl de produit de 1^{ère} PCR. Le même profil de température qu'en première PCR est appliqué. Les fragments obtenus sont vérifiés en gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium.

d) Purification des produits de PCR et quantification

Les produits de PCR sont ensuite purifiés sur colonne (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. L'ADN purifié est ensuite quantifié par lecture spectrophotométrique à 260nm et 280nm au spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Les produits d'amplification sont dilués en eau PPI à 2ng/µl.

e) Vérification des séquences amplifiées

Les amorces de PCR nichée sont utilisées pour réaliser la PCR de séquence selon la technologie Sanger. Le mélange réactionnel est composé de 1X BigDye® Sequencing Buffer (Thermo Fisher Scientific), 1µl de BigDye® Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific), 0,5µM d'amorce (sens ou anti-sens) et 10ng de produit de PCR purifié sous un volume final de 20µl. Le profil de température est composé d'une dénaturation initiale à 96°C pendant 1 minute suivie de 25 cycles de 20 secondes à 96°C, 5 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C.

Les produits de PCR de séquence sont purifiés par précipitation à l'isopropanol. Quatre-vingt microlitres d'isopropanol 75% sont ajoutés au mélange réactionnel de PCR de séquence. Après homogénéisation, les barrettes sont centrifugées à 1800g pendant 45min. Le culot est repris dans 20µl de formamide hautement déminéralisée (Hi-Di Formamide, Thermo Fisher Scientific).

La séparation des produits de séquence est réalisée par migration capillaire en gel de polyacrylamide sur l'automate ABI 3130xl Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific). Les séquences obtenues pour chaque fragment sont analysées à l'aide du logiciel SeqScape® v2.6 (ThermoFisher Scientific).

4.2.3. Clonage dans le plasmide pGEM®-T Easy Vector

Afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel pour intégrer la séquence d'intérêt dans le vecteur d'expression, il est nécessaire de procéder à un pré-clonage dans un vecteur plasmidique classique. Nous utilisons au laboratoire le pGEM®-T Easy Vector (Promega). C'est un plasmide pré-linéarisé qui présente un T à chaque extrémité 3' ce qui permet d'y intégrer des produits de PCR synthétisés par la plupart des enzymes thermostables qui ajoutent un A en fin de séquence. Le fragment d'intérêt est inséré au niveau du MCS qui est situé au milieu du gène lacZ (Figure 35). Ainsi, si l'insertion du fragment d'intérêt

fonctionne, le gène *lacZ* est non opérationnel. Si le plasmide se referme sur lui-même, le gène *lacZ* sera opérationnel. L'utilisation d'un indicateur coloré de dégradation du galactose permettra de discriminer les colonies ayant intégré le plasmide contenant le gène d'intérêt du plasmide seul.

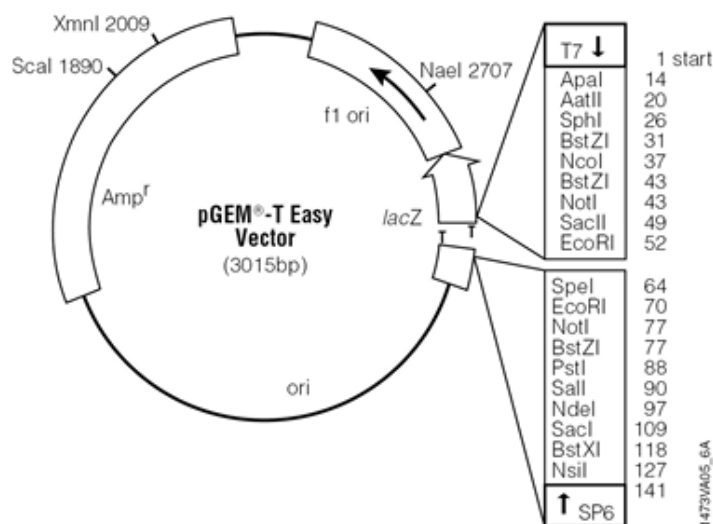


Figure 35 : Carte du plasmide pGEM®-T Easy utilisé pour le pré-clonage (Promega).

Ce vecteur est pré-linéarisé et permet l'insertion du fragment d'intérêt directement après l'amplification par PCR. L'insertion du fragment d'intérêt est possible dans le MCS situé dans le gène *lacZ*. Ce vecteur porte le gène de résistance à l'ampicilline. Les amorces universelles T7 et SP6 bornent le MCS.

La ligation est réalisée pendant une nuit à 4°C en présence de 1X de Rapid Ligation Buffer, 50ng de plasmide, 3U de T4 DNA Ligase. La quantité de produit de PCR ajoutée dépend de la taille du fragment d'intérêt. Dans notre cas, les quantités théoriques ajoutées sont de 40ng pour CIF, 36ng pour PCC et 29ng pour YAP, ce qui représente un ratio produit PCR / vecteur de 3/1. A cette étape, le sens d'intégration du fragment dans le plasmide n'a pas d'importance.

Au lendemain de la ligation, la transformation des cellules compétentes *E. coli* JM109 (Promega) est réalisée par choc thermique (20 minutes dans la glace, 45 secondes à 42°C et 2 minutes dans la glace).Après une pré-culture liquide à 37°C pendant 1 heure sous

agitation, la suspension bactérienne est concentrée par centrifugation puisensemencée en nappe sur des géloses LB (Luria Broth, Thermo Fisher Scientific) en présence de 100µg/ml d'ampicilline (Sigma-Aldrich®) dans la masse, 0,4mM d'IPTG (Isopropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside, Eurobio) et 40mg/µl d'X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, Eurobio) en nappe.

La présence d'ampicilline dans la gélose permet de sélectionner uniquement les bactéries ayant été transformées avec le plasmide. L'IPTG est l'inducteur de la réaction enzymatique permettant à lacZ de catalyser le substrat coloré X-gal. Ainsi, les colonies ayant un gène lacZ opérationnel c'est-à-dire ne contenant pas le fragment d'intérêt seront bleues. Inversement, les colonies blanches contiennent le plasmide ayant intégré l'insert au milieu de lacZ le rendant inutilisable. Des colonies blanches sont repiquées sur une gélose LB + ampicilline.

La vérification de la présence du fragment d'intérêt est réalisée par PCR conventionnelle avec les amorces universelles T7 et SP6 situées sur le plasmide de part et d'autre du MCS (Figure 35). Après purification des produits de PCR, les fragments amplifiés sont séquencés pour vérifier leur intégrité (cf 4.2.2 e) Vérification des séquences amplifiées) : absence d'insertion ou de délétion, phénotype PBC et PC, taille du fragment, présence des sites de restriction MluI et SalI aux extrémités.

Une maxi-prep est réalisée à partir d'un clone intègre à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. Cette étape nous permet d'obtenir une suspension plasmidique à environ 1µg/µl, concentration minimale nécessaire pour l'étape suivante.

4.2.4. Construction des vecteurs d'expression

a) Restriction enzymatique

Pour l'insertion du gène d'intérêt dans le vecteur d'expression, le sens d'insertion est important puisque l'objectif est de produire la protéine à partir de ce gène. Ainsi, il est important de maîtriser cette insertion en utilisant une ligation à bouts cohésifs différents en 5' et 3' d'où l'utilisation de sites de restriction. D'une part le vecteur d'expression, circulaire, et d'autre part le plasmide de pré-clonage contenant le gène d'intérêt, subissent une restriction enzymatique avec MluI et SallI. Les enzymes de restriction ont été définies à l'aide du logiciel ApE –A Plasmid Editor v2.0.47 (biologylabs.utah.edu) en vérifiant l'absence des sites au milieu du fragment d'intérêt.

Le mélange réactionnel est composé de 10U d'enzyme de restriction MluI (Promega), 16U d'enzyme de restriction SallI (Promega), 0,1µg/µL de BSA (Bovine Serum Albumin) acétylée, 1X de tampon de restriction enzymatique (Promega), et 1µg de plasmide. Le volume final est ajusté à 20µl avec de l'eau purifiée. La réaction dure 4 heures à 37°C en thermocycleur.

L'efficacité de la restriction enzymatique est ensuite vérifiée par migration électrophorétique en gel d'agarose 2% grâce au système E-Gel® SizeSelect™ Agarose Gels (Thermo Fisher Scientific) qui permet de récupérer la bande d'intérêt dans un puit présent au milieu du gel (Figure 36). Les fragments d'intérêt sont récupérés et purifiés grâce au kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. Une quantification est réalisée au spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (cf 4.2.2.d) Purification des produits de PCR et quantification).

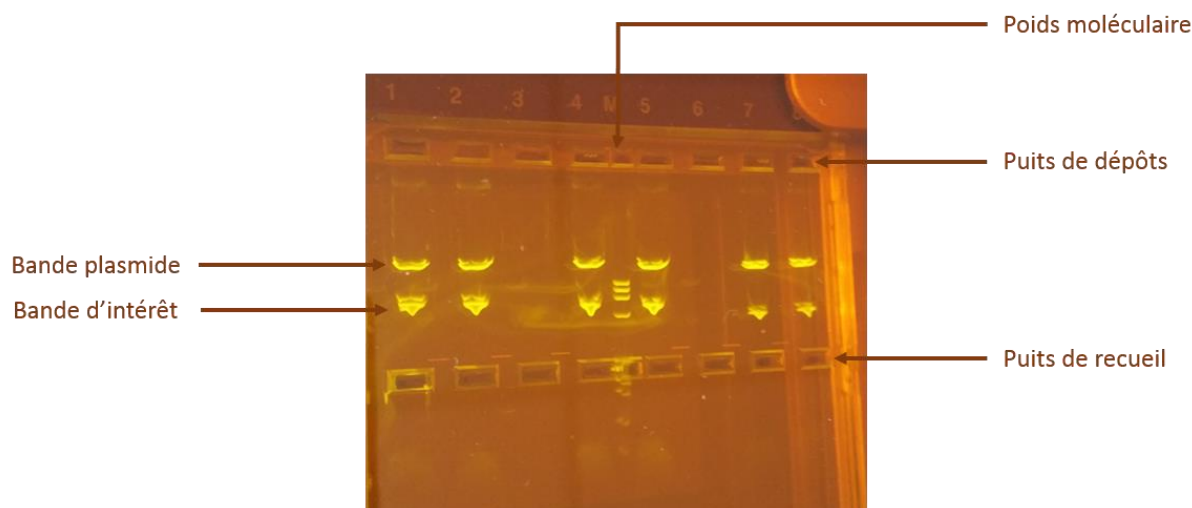


Figure 36 : Photographie du gel de migration E-Gel® SizeSelect™.

Les deux premiers puits correspondent au dépôt du produit de restriction enzymatique du plasmide contenant le fragment CIF (783pb). Les deux suivants correspondent à PCC (717pb) et les deux derniers à YAP (583pb). Les bandes les plus hautes correspondent au plasmide linéarisé (environ 3kb). Les bandes les plus basses correspondent aux fragments d'intérêt. De l'eau purifiée est déposée dans le puits de recueil de manière à ce que le fragment soit en suspension au moment de son passage pour être récupérer.

b) Clonage dans le vecteur d'expression

Le plasmide d'expression pENG1 EF1 α -GFP utilisé nous a été gracieusement fourni par l'équipe du Pr Lemoine (Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, UMR CNR7211 / INSERM UMR1135, Paris). Ce plasmide circulaire contient les séquences LTR en 5' et 3', cette dernière étant déléetée de la partie U3. Les séquences PBS, Ψ , RRE et cPPT sont également présentes en amont du promoteur EF1- α qui va contrôler l'expression du transgène. Enfin, la séquence WPRE est également présente sur ce plasmide. Ces séquences sont nécessaires à la rétro-transcription et à l'encapsidation du transgène (cf 3.2.4.c Vecteurs lentiviraux). L'insertion du gène d'intérêt a lieu dans le MCS dans lequel sont présents les sites de restriction MluI et SalI (Figure 37). Le vecteur présente également un promoteur EF1- α , qui est un promoteur fort non viral qui permettra d'exprimer fortement le transgène, et le gène de résistance à l'ampicilline. Le vecteur pENG1 EF1 α -GFP dans sa conformation initiale contient le gène de la GFP et a été utilisé comme témoin dans la mise

au point de l'outil de transduction (cf 3- Chapitre 3 : Mise au point de la transduction de cellules HepaRG par des vecteurs lentiviraux).

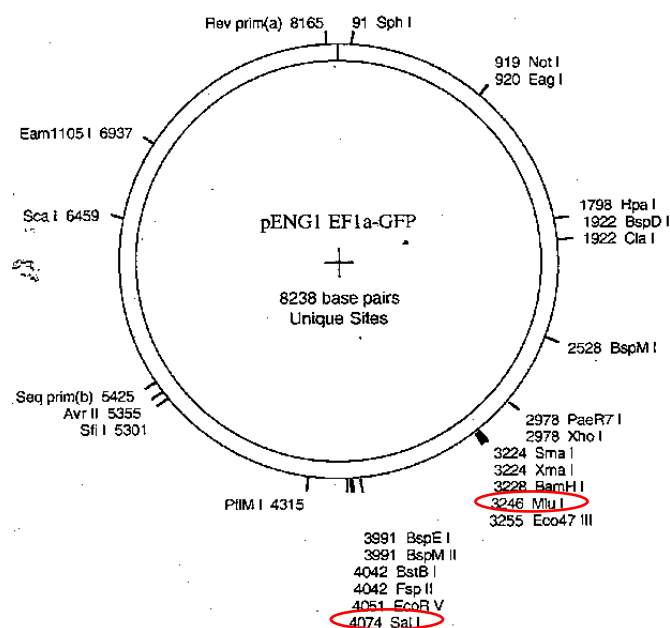


Figure 37 : Carte du plasmide pENG EF1 α -GFP (d'après INSERM UMR1135).

C'est un vecteur circulaire qui subit la restriction enzymatique *MluI* et *Sall* (entourées en rouge) afin d'enlever le gène de la GFP qui sera remplacé par le fragment d'intérêt du VHB. La séquence EF1- α est un promoteur fort non viral.

Ce clonage suit les mêmes étapes que le pré-clonage dans le plasmide pGEM[®]-T Easy Vector (cf 4.2.3 Clonage dans le plasmide pGEM[®]-T Easy Vector) : ligation une nuit à 4°C et transformation par choc thermique en bactéries compétentes JM109. Dans le mélange réactionnel de ligation, 50ng de produit de restriction enzymatique sont ajoutés à 20ng de vecteur pENG linéarisé, 1X de tampon de ligation et 6U de T4 DNA ligase sous un volume final de 20 μ l. La pré-culture liquide est réalisée pendant deux à trois heures à 30°C afin de faciliter la transformation des cellules compétentes avec un plus gros vecteur, puis la suspension estensemencée en gélose LB + 100 μ g/ml d'ampicilline. Les colonies présentes au bout de 18h à 24h de culture à 37°C sont repiquées sur gélose.

Une culture liquide à partir de ces clones est réalisée afin de purifier le plasmide à l'aide du kit NucleoSpin® 8 Plasmid (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant.

Une PCR de séquence est réalisée directement sur la suspension plasmidique avec l'amorce EF1 α (5'-TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC-3'), située au niveau du promoteur EF1 α et en amont de l'insert. Les conditions expérimentales ont été décrites précédemment (cf 4.2.2. e) Vérification des séquences amplifiées). à partir de 10ng de plasmide.

Le séquençage à cette étape nous permet de vérifier que la séquence nucléotidique insérée dans le vecteur d'expression est intègre et permettra la production de la protéine.

Un clone intègre est ainsi sélectionné afin de réaliser une maxi-prep à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. La concentration et la pureté du plasmide sont déterminées par lecture de la densité optique à 260 et 280 nm au NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher Scientific).

4.2.5. Production des particules lentivirales

La production et l'utilisation de vecteurs lentiviraux nécessitent l'obtention d'un agrément délivré par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Pour Lenticore, nous avons obtenu cet agrément pour une durée de cinq ans. Le dossier auprès du Haut Conseil en Biotechnologies porte le n°2941.

a) Co-transfection dans les cellules HEK293T

La production des vecteurs lentiviraux est réalisée au laboratoire par co-transfection transitoire dans les cellules HEK293T en utilisant le réactif FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega). Les plasmides d'enveloppe et d'encapsidation nous ont été fournis par l'équipe du Pr Lemoine (Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, UMR CNR7211 / INSERM UMR1135, Paris). Nous avons reçu deux boîtes de pétri contenant des

colonies bactériennes ayant intégré chaque plasmide. Les colonies ont été individuellement remises en culture liquide afin de réaliser une maxi-prep de chaque plasmide à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. La concentration et la pureté sont déterminées par lecture de la densité optique à 260 et 280 nm au NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher Scientific).

Le plasmide pCMV9 est le plasmide d'encapsulation qui contient les séquences virales nécessaires en *trans* (Figure 38).

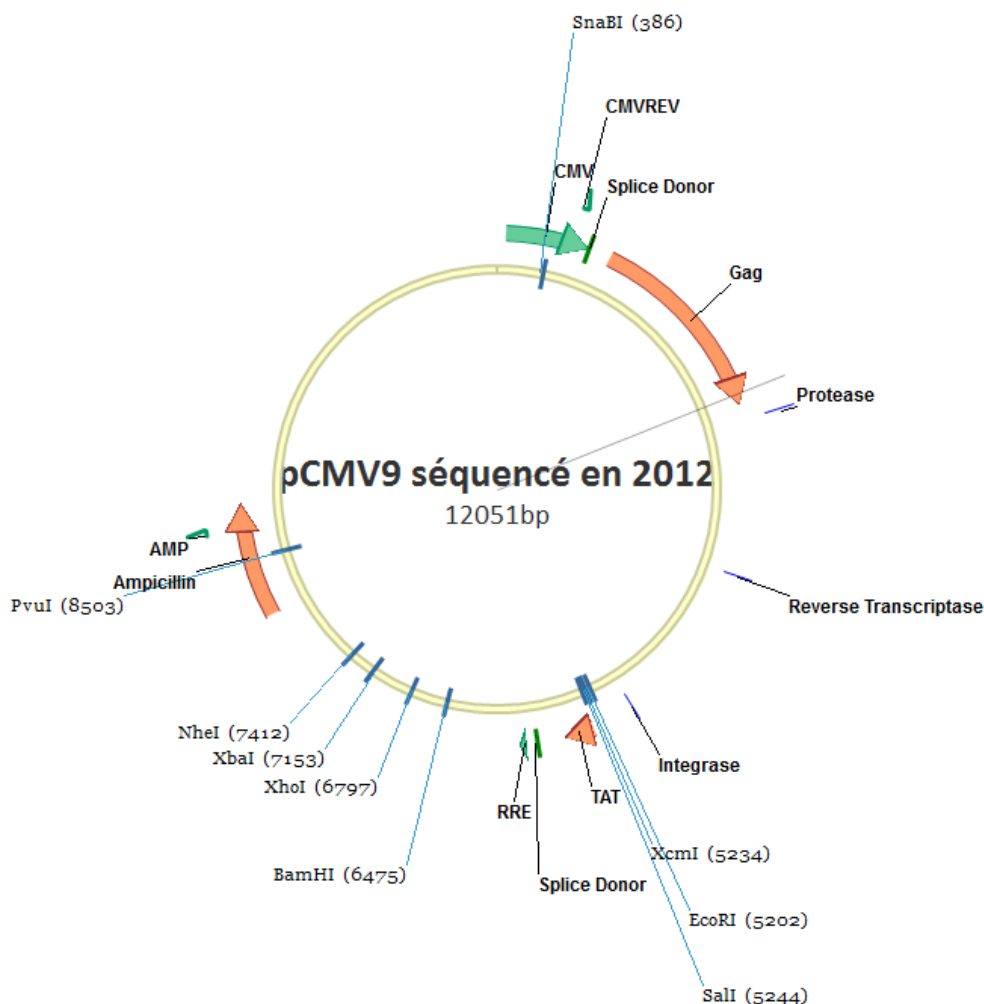


Figure 38 : Carte du plasmide d'encapsulation pCMV9 (d'après INSERM UMR1135).

Le plasmide pCMV9 nous a été gracieusement fourni par le Pr Lemoine du Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (UMR CNR7211 / INSERM UMR1135, Paris). Il contient les séquences gag, pol, pro, tat et rev sous l'influence d'un promoteur CMV. Il porte également le gène de résistance à l'ampicilline.

Le plasmide d'enveloppe VSV-G contient la séquence codant la glycoprotéine G du VSV ce qui confèrera un large tropisme aux particules lentivirales constituées (Figure 39).

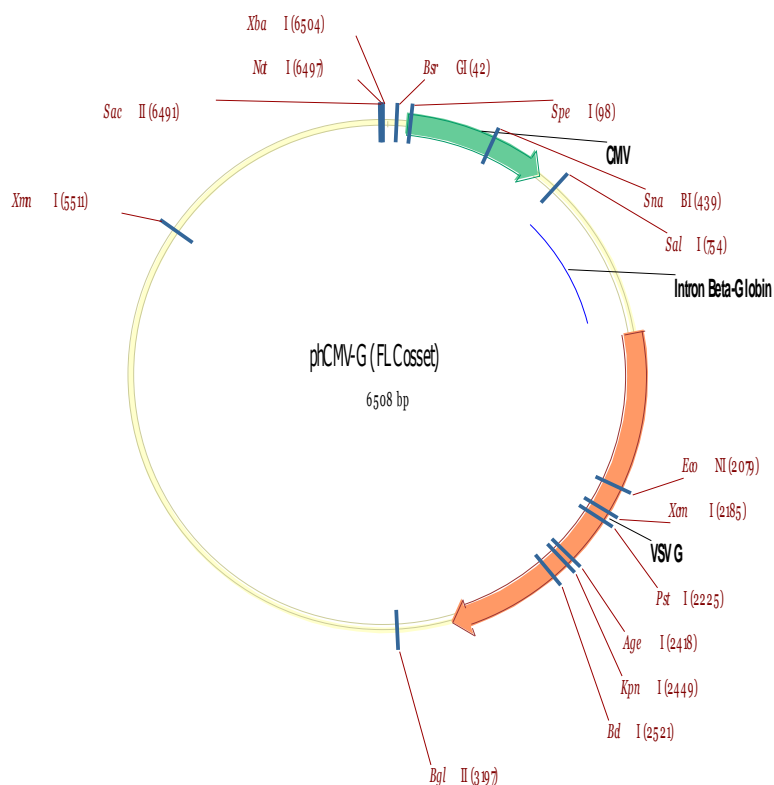


Figure 39 : Carte du plasmide d'enveloppe VSV-G (d'après INSERM UMR1135).

Le plasmide VSV-G nous a été gracieusement fourni par le Pr Lemoine du Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (UMR CNR7211 / INSERM UMR1135, Paris). Il contient la séquence de la glycoprotéine G du VSV sous l'influence d'un promoteur CMV.

Les trois plasmides sont co-transfectés dans des cellules HEK293T (2.10⁵ cellules/puit en plaque 12 puits) à 24h de culture. Le réactif de transfection FuGENE[®] 6 est dilué en milieu Opti-MEM[™] (Gibco[®]) avant d'ajouter les 12µg de plasmides : 5,6µg de vecteur d'expression, 2,2µg de plasmide d'encapsidation et 2µg de plasmide d'enveloppe (ratio FuGENE/ADN : 3/1). Le mélange est déposé goutte à goutte sur les cellulesensemencées la veille (50-80 % de confluence).

Après 24 heures de culture post transfection, le milieu est renouvelé. Le surnageant viral est récupéré 72 heures après la transfection. Afin d'éliminer les cellules restantes, le

surnageant est centrifugé 5min à 500g puis passé sur filtre 0,45µm. Afin d'améliorer la concentration du surnageant viral, une centrifugation pendant 2h à 50 000g est réalisée. Le culot est repris en tampon PBS 1X puis stocké en aliquots à -80°C.

b) Titrage du surnageant viral

Concernant les constructions portant les séquences sauvages et mutées des PBC, PC et C du VHB, nous ne pouvons pas utiliser la microscopie à fluorescence comme pour la GFP. Nous ne pouvons pas non plus utiliser la cytométrie en flux sans avoir recours à un anticorps marqué spécifique de nos protéines.

Quantification de l'Ag p24 du VIH-1

Nous utilisons donc le dosage de l'Antigène p24 du VIH-1 par ELISA dans le surnageant lentiviral. La technique utilisée est automatisée : VIDAS[®] HIV P24 II (BioMérieux). Le surnageant est dilué à 10⁻³ ou 10⁻⁴ en amont du dosage de manière à ne pas saturer la technique et obtenir une quantification fiable. Le titre est exprimé en pg p24/ml.

Quantification de l'ARN viral

Nous avons quantifié l'ARN viral dans la suspension de particules lentivirales afin d'obtenir un titre exprimé en copies/µl. Quelques microlitres de suspension virale ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin[®] RNA (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. Les ARN sont linéarisés à 70°C pendant 10min puis conservés à 4°C. La rétro-transcription a été réalisée à partir de 12,5µl d'extrait ARN ajoutés à 1X de tampon de réaction (ThermoFisher Scientific), 2,5µM de Random hexamers (ThermoFisher Scientific), 20U de RiboLock RNase Inhibitor (ThermoFisher Scientific), 1mM dNTP (Eurogentec) et 200U de RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific). La réaction se déroule pendant 60 minutes à 42°C précédées de 10 minutes à 25°C et suivies de 10 minutes à 70°C dans un thermocycleur Veriti[®] (Applied Biosystems[™]). La qPCR est

réalisée à partir de 5 μ l d'ADNc dans un volume final de 25 μ l de mélange réactionnel contenant : 1X de TaqMan™ Universal MasterMix (ThermoFisher Scientific), 320nM de chaque amorce FPLV2 et RPLV2 et 200nM de sonde d'hydrolyse LV2 marquée par le fluorochrome FAM. Les amorces permettent l'amplification d'un fragment de 142pb dans les régions PBS/ Ψ [152]. Après 10 minutes de dénaturation initiale à 95°C, 40 cycles de 30 secondes à 95°C et 2 minutes à 60°C sont appliqués. La lecture de la fluorescence par l'automate Mx3005P™ (Agilent) est réalisée pendant l'étape à 60°C. La quantification du génome lentiviral est possible grâce à une gamme externe en 5 points contenant $1,23 \cdot 10^3$ à $1,23 \cdot 10^7$ copies/ μ l à laquelle sont comparés les Ct (Cycle threshold) obtenus pour chaque suspension. Le standard de quantification utilisé pour construire cette gamme est une suspension plasmidique purifiée du vecteur d'expression pENG1 EF1 α -GFP. L'analyse des données de qPCR a été réalisée avec le logiciel MxPro QPCR (Agilent).

4.3. Résultats

4.3.1. Quantifications des ADN purifiés

La quantification des suspensions d'ADN est nécessaire pour la réalisation de la ligation, de la restriction enzymatique et de la transfection (Tableau 7). Suite à la maxi-prep, la concentration des suspensions plasmidiques ont été ajustées à environ 1 μ g/ μ l. Les plasmides d'encapsulation et d'enveloppe ont également été préparés en maxi-prep afin de pouvoir par la suite produire les particules lentivirales.

Tableau 7 : Quantifications des suspensions d'ADN.

CMV9 est le plasmide d'encapsulation. VSV-G est le plasmide d'enveloppe. 1079 correspond aux séquences sauvages en PBC et 1899, alors que TOL présente des mutations dans ces positions. CIF est la construction complète PBC, PC et C. PCC est la construction délétée du PBC et YAP ne contient que la région C.

	Quantification du produit de PCR (ng/μl)	Clone pGEM-T sélectionné	Quantification MxPp pGEM-T (ng/μl)	Clone pENG sélectionné	Quantification MxPp pENG (μg/μl)
1079-CIF	30,57	Clone 2		Clone 1	
1079-PCC	33,02	Clone 11		Clone 27	
1079-YAP	34,31	Clone 1		Clone 6	
TOL-CIF	183,95	Clone 66	1,058	Clone 11	1,554
TOL-PCC	146,98	Clone 10	1,014	Clone 14	1,325
TOL-YAP	142,67	Clone 5	0,966	Clone 5	1,147
CMV9					2,45
VSV-G					1,06

4.3.2. Séquences des particules lentivirales

La vérification des séquences est primordiale à chaque étape afin de s'assurer de l'intégrité des protéines qui pourraient être traduites après transduction. Le séquençage a donc été réalisé :

- Après l'amplification par PCR conventionnelle : 1079-x_PCR_MluISaII
- Après le clonage en pGEM-T : 1079-...pGEMT_clonex
- Après la Maxi-Prep de plasmide : 1079-...pGEMT_clonex_MxPp
- Après le clonage en pENG : 1079-...pENG_clonex
- Après la Maxi-Prep de plasmide : 1079-...pENG_clonex_MxPp

Le type de fragment (CIF, PCC, YAP) remplace les « ... ». Le numéro du clone sélectionné remplace le « x ». Pour les constructions réalisées avec les séquences mutées dans les régions PBC et PC, « TOL » remplace « 1079 ».

Dans les alignements ci-après, une légende couleur est utilisée :

- En vert et gras : les codons d'initiation de la traduction
- En rouge et gras : le codon d'arrêt de la traduction

- En bleu et gras : les sites de restriction MluI et Sall
- En orange et gras : les positions 1762 et 1764 pour le double mutant PBC
- En fushia et gras : la position 1896 pour le mutant PC
- En saumon et gras : la position 1899
- Les amorces sont soulignées en noir

a) **Alignement construction CIF, séquence sauvage**

```

1079-CIF_PCR_MluISalI -----TACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAG
1079-CIFpGEMT_clone2 CATGGCGGCCGCGGGATTCGATTACGCGTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAG
1079-CIFpGEMT_clone2_MxPp ---GCGGCCGCGGGAAATTCGATTACGCGTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAG
1079-CIFpENG_clone1 -----ATACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAG
1079-CIFpENG_clone1_MxPp -----CGTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAG
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI ACTGGGAGGAGTTGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGC
1079-CIFpGEMT_clone2 ACTGGGAGGAGTTGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGC
1079-CIFpGEMT_clone2_MxPp ACTGGGAGGAGTTGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGC
1079-CIFpENG_clone1 ACTGGgAgGAGTtGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGC
1079-CIFpENG_clone1_MxPp ACTGGGAGGAGTTGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGC
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI ATAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTG
1079-CIFpGEMT_clone2 ATAAATTGGTCTGCGCATCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTG
1079-CIFpGEMT_clone2_MxPp ATAAATTGGTCTGCGCATCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTG
1079-CIFpENG_clone1 ATAAATTGGTCTGCGCATCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTG
1079-CIFpENG_clone1_MxPp ATAAATTGGTCTGCGCATCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTG
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI TTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGCATGGACAT
1079-CIFpGEMT_clone2 TTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGCATGGACAT
1079-CIFpGEMT_clone2_MxPp TTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGCATGGACAT
1079-CIFpENG_clone1 TTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGCATGGACAT
1079-CIFpENG_clone1_MxPp TTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGCATGGACAT
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI TGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTT
1079-CIFpGEMT_clone2 TGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTT
1079-CIFpGEMT_clone2_MxPp TGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTT
1079-CIFpENG_clone1 TGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTT
1079-CIFpENG_clone1_MxPp TGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTT
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI CTTTCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGA
1079-CIFpGEMT_clone2 CTTTCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGA
1079-CIFpGEMT_clone2_MxPp CTTTCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGA
1079-CIFpENG_clone1 CTTTCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGA
1079-CIFpENG_clone1_MxPp CTTTCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGA
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI GTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCAATTCCTTGTGCGGG
1079-CIFpGEMT_clone2 GTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCAATTCCTTGTGCGGG
1079-CIFpGEMT_clone2_MxPp GTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCAATTCCTTGTGCGGG
1079-CIFpENG_clone1 GTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCAATTCCTTGTGCGGG
1079-CIFpENG_clone1_MxPp GTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCAATTCCTTGTGCGGG
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI GGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGA
1079-CIFpGEMT_clone2 GGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGA
1079-CIFpGEMT_clone2_MxPp GGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGA
1079-CIFpENG_clone1 GGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGA
1079-CIFpENG_clone1_MxPp GGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGA
*****

```

```

1079-CIF_PCR_MluISalI      CCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAAGTTCAGACAACCTCTTGTGGTT
1079-CIFpGEMT_clone2      CCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAAGTTCAGACAACCTCTTGTGGTT
1079-CIFpGEMT_clone2 MxPp CCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAAGTTCAGACAACCTCTTGTGGTT
1079-CIFpENG-clone1       CCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAAGTTCAGACAACCTCTTGTGGTT
1079-CIFpENG_clone1_MxPp  *****

1079-CIF_PCR_MluISalI      TCACATTTCTTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCCGG
1079-CIFpGEMT_clone2      CCACATTTCTTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCCGG
1079-CIFpGEMT_clone2 MxPp CCACATTTCTTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCCGG
1079-CIFpENG-clone1       CCACATTTCTTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCCGG
1079-CIFpENG_clone1_MxPp  CCACATTTCTTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCCGG
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI      AGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTATAGACCACCAAATGCCCCATCCTATCAACACT
1079-CIFpGEMT_clone2      AGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTATAGACCACCAAATGCCCCATCCTATCAACACT
1079-CIFpGEMT_clone2 MxPp AGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTATAGACCACCAAATGCCCCATCCTATCAACACT
1079-CIFpENG-clone1       AGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTATAGACCACCAAATGCCCCATCCTATCAACACT
1079-CIFpENG_clone1 MxPp  AGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTATAGACCACCAAATGCCCCATCCTATCAACACT
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI      TCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
1079-CIFpGEMT_clone2      TCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
1079-CIFpGEMT_clone2 MxPp TCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
1079-CIFpENG-clone1       TCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
1079-CIFpENG_clone1 MxPp  TCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI      TCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATG
1079-CIFpGEMT_clone2      CCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATG
1079-CIFpGEMT_clone2 MxPp CCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATG
1079-CIFpENG-clone1       CCGCAGAcGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATG
1079-CIFpENG_clone1 MxPp  CCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAaGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATG
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI      TAGTATTCCCTGGACTCATAAGGTGG-----
1079-CIFpGEMT_clone2      TAGTATTCCCTGGACTCATAAGGTGGGAAACTGTCGACAACTACTAGTGAATTCGCGGC
1079-CIFpGEMT_clone2 MxPp TAGTATTCCCTGGACTCATAAGGTGGGAAACTGTCGACAACTACTAGTGAATTCGCGGC
1079-CIFpENG-clone1       TAGTATTCCCTGGACTCATAAGGTGGGAAAcTGTGCAaAACTCAACCTCTGGATTACAAA
1079-CIFpENG_clone1 MxPp  TAGTATTCCCTGGACTCATAAGGTGGGAAACTGT-----
*****

1079-CIF_PCR_MluISalI      -----
1079-CIFpGEMT_clone2      CGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGA
1079-CIFpGEMT_clone2 MxPp CGCCTGCAGGTCGACC-----
1079-CIFpENG-clone1       ATTTGTGAAAGat-----
1079-CIFpENG_clone1 MxPp  -----

```

b) Aligement construction PCC, séquence sauvage

```

1079-PCC_PCR_MluISalI      -----TACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATG
1079-PCCpGEMT_clone11      TTACGCGTtcttTGtACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATG
1079-PCCpGEMT_clone11 MxPp TTACGCGTtcttTGtACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATG
1079-PCCpENG-clone27       -----TTGtACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATG
1079-PCCpENG_clone27 MxPp -----GTTCTTTGtACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATG
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      CAaCTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAG
1079-PCCpGEMT_clone11      CAaCTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAG
1079-PCCpGEMT_clone11 MxPp CAaCTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAG
1079-PCCpENG-clone27      CAaCTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAG
1079-PCCpENG_clone27 MxPp  CAaCTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAG
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      CTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGG#CATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACC
1079-PCCpGEMT_clone11      CTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGG#CATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACC
1079-PCCpGEMT_clone11 MxPp CTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGG#CATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACC
1079-PCCpENG-clone27      CTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGG#CATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACC
1079-PCCpENG_clone27 MxPp  CTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGG#CATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACC
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      GTGGAGTTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTCAGTACGAGATCTTCTAGAT
1079-PCCpGEMT_clone11      GTGGAGTTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTCAGTACGAGATCTTCTAGAT
1079-PCCpGEMT_clone11 MxPp GTGGAGTTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTCAGTACGAGATCTTCTAGAT
1079-PCCpENG-clone27      GTGGAGTTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTCAGTACGAGATCTTCTAGAT
1079-PCCpENG_clone27 MxPp  GTGGAGTTACTCTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTCAGTACGAGATCTTCTAGAT
*****

```



```

1079-PCC_PCR_MluISalI      ACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCAT
1079-PCCpGEMT_clone11     ACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCAT
1079-PCCpGEMT_clone11_MxPp ACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCAT
1079-PCCpENG-clone27      ACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCAT
1079-PCCpENG_clone27_MxPp ACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCAT
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      ACTGCACTCAGGCAAGCAATTCTTTGCTGGGGGGAACATAATGACTCTAGCTACCTGGGTG
1079-PCCpGEMT_clone11     ACTGCACTCAGGCAAGCAATTCTTTGCTGGGGGGAACATAATGACTCTAGCTACCTGGGTG
1079-PCCpGEMT_clone11_MxPp ACTGCACTCAGGCAAGCAATTCTTTGCTGGGGGGAACATAATGACTCTAGCTACCTGGGTG
1079-PCCpENG-clone27      ACTGCACTCAGGCAAGCAATTCTTTGCTGGGGGGAACATAATGACTCTAGCTACCTGGGTG
1079-PCCpENG_clone27_MxPp ACTGCACTCAGGCAAGCAATTCTTTGCTGGGGGGAACATAATGACTCTAGCTACCTGGGTG
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      GGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAAT
1079-PCCpGEMT_clone11     GGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAGT
1079-PCCpGEMT_clone11_MxPp GGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAGT
1079-PCCpENG-clone27      GGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAGT
1079-PCCpENG_clone27_MxPp GGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAGT
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      ATGGGCCTAAAGTTCAGACAACCTCTTGTGGTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGAAGA
1079-PCCpGEMT_clone11     ATGGGCCTAAAGTTCAGACAACCTCTTGTGGTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGAAGA
1079-PCCpGEMT_clone11_MxPp ATGGGCCTAAAGTTCAGACAACCTCTTGTGGTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGAAGA
1079-PCCpENG-clone27      ATGGGCCTAAAGTTCAGACAACCTCTTGTGGTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGAAGA
1079-PCCpENG_clone27_MxPp ATGGGCCTAAAGTTCAGACAACCTCTTGTGGTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGAAGA
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      GAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTAT
1079-PCCpGEMT_clone11     GAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTAT
1079-PCCpENG_clone27_MxPp GAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTAT
1079-PCCpGEMT_clone11_MxPp GAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTAT
1079-PCCpENG-clone27      GAAACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTAT
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      AGACCACCAAATGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGA
1079-PCCpGEMT_clone11     AGACCACCAAATGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGA
1079-PCCpGEMT_clone11_MxPp AGACCACCAAATGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGA
1079-PCCpENG-clone27      AGACCACCAAATGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGA
1079-PCCpENG_clone27_MxPp AGACCACCAAATGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGA
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGT
1079-PCCpGEMT_clone11     GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGT
1079-PCCpGEMT_clone11_MxPp GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGT
1079-PCCpENG-clone27      GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGT
1079-PCCpENG_clone27_MxPp GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGT
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      CGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCCCTGGACTCATAAGGTGG-
1079-PCCpGEMT_clone11     CGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCCCTGGACTCATAAGGTGGG
1079-PCCpGEMT_clone11_MxPp CGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTattCctTggACTCATAAGGTGGG
1079-PCCpENG-clone27      CGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAaTGTTAGTATT-----
1079-PCCpENG_clone27_MxPp CGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCCCTGGACTCATAAAGTGGG
*****

1079-PCC_PCR_MluISalI      -----
1079-PCCpGEMT_clone11     AAACTGTCGACAAT-----
1079-PCCpGEMT_clone11_MxPp AAACTGTCGACAATCGAATTCGCCGCGG
1079-PCCpENG-clone27      -----
1079-PCCpENG_clone27_MxPp AAACTGT-----

```

c) Alignment construction YAP, séquence sauge

```

1079-YAP_PCR_MluISalI      -----GACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTTACT
1079-YAPpGEMT_clone1      CGATTACGCGTGCATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTTACT
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp CGATTACGCGTGCATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTTACT
1079-YAPpENG-clone6      AAGAAACGCGTGCATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTTACT
1079-YAPpENG_clone6_MxPp -----CATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACCGTGGAGTTACT
*****

1079-YAP_PCR_MluISalI      CTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGC
1079-YAPpGEMT_clone1      CTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGC
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp CTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGC
1079-YAPpENG-clone6      CTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGC
1079-YAPpENG_clone6_MxPp CTCGTTTTTGCCTTCTGACTTCTTTCCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGC
*****

```

```

1079-YAP_PCR_MluISalI      TCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACCTCAG
1079-YAPpGEMT_clone1      TCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACCTCAG
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp TCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACCTCAG
1079-YAPpENG-clone6       TCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACCTCAG
1079-YAPpENG_clone6_MxPp *****

1079-YAP_PCR_MluISalI      GCAAGCAATTCCTTGTGCGGGGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTT
1079-YAPpGEMT_clone1      GCAAGCAATTCCTTGTGCGGGGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTT
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp GCAAGCAATTCCTTGTGCGGGGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTT
1079-YAPpENG-clone6       GCAAGCAATTCCTTGTGCGGGGAACTAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTT
1079-YAPpENG_clone6_MxPp *****

1079-YAP_PCR_MluISalI      GGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAA
1079-YAPpGEMT_clone1      GGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAA
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp GGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAA
1079-YAPpENG-clone6       GGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGCCTAAA
1079-YAPpENG_clone6_MxPp *****

1079-YAP_PCR_MluISalI      GTTCAGACAACCTCTGTGGTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAACAGTTAT
1079-YAPpGEMT_clone1      GTTCAGACAACCTCTGTGGTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAACAGTTAT
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp GTTCAGACAACCTCTGTGGTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAACAGTTAT
1079-YAPpENG-clone6       GTTCAGACAACCTCTGTGGTTTCACATTTCTGTCTCACTTTTGGGAAGAGAACAGTTAT
1079-YAPpENG_clone6_MxPp *****

1079-YAP_PCR_MluISalI      AGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTATAGACCACAAA
1079-YAPpGEMT_clone1      AGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTATAGACCACAAA
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp AGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTATAGACCACAAA
1079-YAPpENG-clone6       AGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCGTATAGACCACAAA
1079-YAPpENG_clone6_MxPp *****

1079-YAP_PCR_MluISalI      TGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCC
1079-YAPpGEMT_clone1      TGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCC
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp TGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCC
1079-YAPpENG-clone6       TGCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCC
1079-YAPpENG_clone6_MxPp *****

1079-YAP_PCR_MluISalI      TAGAAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATC
1079-YAPpGEMT_clone1      TAGAAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATC
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp TAGAAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATC
1079-YAPpENG-clone6       TAGAAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATC
1079-YAPpENG_clone6_MxPp *****

1079-YAP_PCR_MluISalI      TCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCTTGGACTCATAAG-----
1079-YAPpGEMT_clone1      TCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCTTGGACTCATAAGGTGGGAACTGTTCGAC
1079-YAPpGEMT_clone1_MxPp TCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCTTGGACTCATAAGGTGGGAACTGTTCGAC
1079-YAPpENG-clone6       TCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCTTGGACTCATAAGGTGGGAACTGTTCGAC
1079-YAPpENG_clone6_MxPp TCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCTTGGACTCATAAGGTGGGAACTGT-----
*****

```

d) Aligement construction CIF, séquence mutée

```

TOL-CIF_PCR_MluISalI      -----TACTTCAAAGACTGTGTGTTTAAAG
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp YGGGCGACCGCGGAATTCGATTACGCGTGAGGCATACTTCAAAGACTGTGTGTTTAAAG
TOL-CIF_pGEMT_clone66     -----GCGGATCGATTACGCGTGAGGCATACTTCAAAGACTGTGTGTTTAAAG
TOL-CIF_pENG_clone19      -----CGTGAGGCATACTTCAAAGACTGTGTGTTTAAAG
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp -----CGTGAGGCATACTTCAAAGACTGTGTGTTTAAAG
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI      ACTGGGAGGAGTTTGGGAGGAGAYTAGGTTAATGATYTWGTATTAGGAGGCTGTAGGC
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp ACTGGGAGGAGTTTGGGAGGAGACTAGGTTAATGATTATGTATTAGGAGGCTGTAGGC
TOL-CIF_pGEMT_clone66     ACTGGGAGGAGTTTGGGAGGAGACTAGGTTAATGATTATGTATTAGGAGGCTGTAGGC
TOL-CIF_pENG_clone19      ACTGGGAGGAGTTTGGGAGGAGACTAGGTTAATGATTATGTATTAGGAGGCTGTAGGC
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp ACTGGGAGGAGTTTGGGAGGAGACTAGGTTAATGATTATGTATTAGGAGGCTGTAGGC
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI      ATAAATTTGGTCTGCGCACCATATCATATGCAACTTTTTCACCTTCGCCTAATCATCTCTTG
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp ATAAATTTGGTCTGCGCACCATATCATATGCAACTTTTTCACCTTCGCCTAATCATCTCTTG
TOL-CIF_pGEMT_clone66     ATAAATTTGGTCTGCGCACCATATCATATGCAACTTTTTCACCTTCGCCTAATCATCTCTTG
TOL-CIF_pENG_clone19      ATAAATTTGGTCTGCGCACCATATCATATGCAACTTTTTCACCTTCGCCTAATCATCTCTTG
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp ATAAATTTGGTCTGCGCACCATATCATATGCAACTTTTTCACCTTCGCCTAATCATCTCTTG
*****

```

```

TOL-CIF_PCR_MluISalI          TWCATGTCCCCTACTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGRCATGGACAT
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    TACATGTCCCCTACTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGACATGGACAT
TOL-CIF_pGEMT_clone66         TACATGTCCCCTACTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGACATGGACAT
TOL-CIF_pENG_clone19         TACATGTCCCCTACTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGACATGGACAT
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    * *****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          TGACCCCTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCATTTTTGCCTKBTGACTT
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    TGACCCCTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCATTTTTGCCTTCTGACTT
TOL-CIF_pGEMT_clone66         TGACCCCTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCATTTTTGCCTTCTGACTT
TOL-CIF_pENG_clone19         TGACCCCTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCATTTTTGCCTTCTGACTT
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    TGACCCCTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCATTTTTGCCTTCTGACTT
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          CTATCCTWMCCTCCGAGATCTCCTAGTACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGA
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    CTATCCTAACGTCCGAGATCTCCTAGTACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGA
TOL-CIF_pGEMT_clone66         CTATCCTAACGTCCGAGATCTCCTAGTACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGA
TOL-CIF_pENG_clone19         CTATCCTAACGTCCGAGATCTCCTAGTACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGA
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    CTATCCTAACGTCCGAGATCTCCTAGTACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGA
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          GTCTCCTGAGCATTGTWCACCTACCATAACAGCAMTCAGGCAAGCCATTCTCTGTGGGG
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    GTCTCCTGAGCATTGTTCACCTACCATAACAGCAATCAGGCAAGCCATTCTCTGTGGGG
TOL-CIF_pGEMT_clone66         GTCTCCTGAGCATTGTTCACCTACCATAACAGCAATCAGGCAAGCCATTCTCTGTGGGG
TOL-CIF_pENG_clone19         GTCTCCTGAGCATTGTTCACCTACCATAACAGCAATCAGGCAAGCCATTCTCTGTGGGG
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    GTCTCCTGAGCATTGTTCACCTACCATAACAGCAATCAGGCAAGCCATTCTCTGTGGGG
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          GGAGTTAATGWCTCTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGA
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    GGAGTTAATGTCTCTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGA
TOL-CIF_pGEMT_clone66         GGAGTTAATGTCTCTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGA
TOL-CIF_pENG_clone19         GGAGTTAATGTCTCTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGA
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    GGAGTTAATGTCTCTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGA
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          TCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATAATATGGGCCTAAAGATMAGGCAACTATTGTGGTT
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    TCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATAATATGGGCCTAAAGATCAGGCAACTATTGTGGTT
TOL-CIF_pGEMT_clone66         TCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATAATATGGGCCTAAAGATCAGGCAACTATTGTGGTT
TOL-CIF_pENG_clone19         TCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATAATATGGGCCTAAAGATCAGGCAACTATTGTGGTT
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    TCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATAATATGGGCCTAAAGATCAGGCAACTATTGTGGTT
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          CCATATTTCTTGCCCTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTTCGG
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    CCATATTTCTTGCCCTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTTCGG
TOL-CIF_pGEMT_clone66         CCATATTTCTTGCCCTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTTCGG
TOL-CIF_pENG_clone19         CCATATTTCTTGCCCTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTTCGG
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    CCATATTTCTTGCCCTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTTCGG
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          AGTGTGGATTTCGACTCCTCCCGCCTATAGACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACT
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    AGTGTGGATTTCGACTCCTCCCGCCTATAGACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACT
TOL-CIF_pGEMT_clone66         AGTGTGGATTTCGACTCCTCCCGCCTATAGACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACT
TOL-CIF_pENG_clone19         AGTGTGGATTTCGACTCCTCCCGCCTATAGACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACT
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    AGTGTGGATTTCGACTCCTCCCGCCTATAGACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACT
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          TCCGGAAGACTACTGTTGTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    TCCGGAAGACTACTGTTGTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
TOL-CIF_pGEMT_clone66         TCCGGAAGACTACTGTTGTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
TOL-CIF_pENG_clone19         TCCGGAAGACTACTGTTGTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    TCCGGAAGACTACTGTTGTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCC
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          TCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATG
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    TCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATG
TOL-CIF_pGEMT_clone66         TCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATG
TOL-CIF_pENG_clone19         TCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATG
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    TCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATG
*****

TOL-CIF_PCR_MluISalI          TTAGTATTCCTTGGACTCATA-----
TOL-CIF_pGEMT_clone66_MxPp    TTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGAAACTGTCCGAC-----
TOL-CIF_pGEMT_clone66         TTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGAAACTGTCCGAC-----
TOL-CIF_pENG_clone19         TTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGAAACTGTCCGACCAACCTCTGGATTACAAA
TOL-CIF_pENG_clone19_MxPp    TTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGAAACTGTCCGAC-----
***** * * *

```

e) **Alignement construction PCC, séquence mutée**

```

TOL-PCC_PCR_MluISalI -----TAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTG
TOL-PCC_pGEMT_clone10 GCCGCGGGAATTCGATTAACCGGTTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTG
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp -----TACCGGTTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTG
TOL-PCC_pENG-clone14 -----GTTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTG
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP -----
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI CGCACCATCWTCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTWCATGTCCCACT
TOL-PCC_pGEMT_clone10 CGCACCATCTTATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCCACT
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp CGCACCATCTTATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCCACT
TOL-PCC_pENG-clone14 CGCACCATCTTATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCCACT
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP CGCACCATCTTATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCCACT
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI CTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGACTATGGACATTGACCCCTTATAAAA
TOL-PCC_pGEMT_clone10 CTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGACTATGGACATTGACCCCTTATAAAA
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp CTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGACTATGGACATTGACCCCTTATAAAA
TOL-PCC_pENG-clone14 CTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGACTATGGACATTGACCCCTTATAAAA
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP CTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTGGGACTATGGACATTGACCCCTTATAAAA
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI GAATTTGGAGCTACTGTGGAGTACTCTCATTTTTGCTTCTGACTTCTATCCTWMCCTC
TOL-PCC_pGEMT_clone10 GAATTTGGAGCTACTGTGGAGTACTCTCATTTTTGCTTCTGACTTCTATCCTAACGTC
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp GAATTTGGAGCTACTGTGGAGTACTCTCATTTTTGCTTCTGACTTCTATCCTAACGTC
TOL-PCC_pENG-clone14 GAATTTGGAGCTACTGTGGAGTACTCTCATTTTTGCTTCTGACTTCTATCCTAACGTC
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP GAATTTGGAGCTACTGTGGAGTACTCTCATTTTTGCTTCTGACTTCTATCCTAACGTC
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI CGAGATCTCCTAGATACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGTAGTCTCCTGAGCAT
TOL-PCC_pGEMT_clone10 CGAGATCTCCTAGATACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGTAGTCTCCTGAGCAT
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp CGAGATCTCCTAGATACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGTAGTCTCCTGAGCAT
TOL-PCC_pENG-clone14 CGAGATCTCCTAGATACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGTAGTCTCCTGAGCAT
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP CGAGATCTCCTAGATACCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGTAGTCTCCTGAGCAT
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI TGTTCACCTCACCATACAGCAATCAGGCAAGCCATTCTCTGCTGGGGGGAGTTAATGWCT
TOL-PCC_pGEMT_clone10 TGTTCACCTCACCATACAGCAATCAGGCAAGCCATTCTCTGCTGGGGGGAGTTAATGWCT
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp TGTTCACCTCACCATACAGCAATCAGGCAAGCCATTCTCTGCTGGGGGGAGTTAATGWCT
TOL-PCC_pENG-clone14 TGTTCACCTCACCATACAGCAATCAGGCAAGCCATTCTCTGCTGGGGGGAGTTAATGWCT
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP TGTTCACCTCACCATACAGCAATCAGGCAAGCCATTCTCTGCTGGGGGGAGTTAATGWCT
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI CTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAAT
TOL-PCC_pGEMT_clone10 CTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAAT
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp CTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAAT
TOL-PCC_pENG-clone14 CTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAAT
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP CTAGCCACCTGGGTGGGCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAAT
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI TATGTTAATACTAATAATGGGCCTAAAGATCAGGCAACTATTGTGGTTCCATATTTCTTGC
TOL-PCC_pGEMT_clone10 TATGTTAATACTAATAATGGGCCTAAAGATAAGGCAACTATTGTGGTTCCATATTTCTTGC
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp TATGTTAATACTAATAATGGGCCTAAAGATaAGGCAACTATTGTGGTTCCATATTTCTTGC
TOL-PCC_pENG-clone14 TATGTTAATACTAATAATGGGCCTAAAGATAAGGCAACTATTGTGGTTCCATATTTCTTGC
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP TATGTTAATACTAATAATGGGCCTAAAGATAAGGCAACTATTGTGGTTCCATATTTCTTGC
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI CTTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGC
TOL-PCC_pGEMT_clone10 CTTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGC
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp CTTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGC
TOL-PCC_pENG-clone14 CTTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGC
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP CTTACTTTTGGGAGAGAACTGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGC
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI ACTCCTCCCGCTATAGACCACCAAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAACTACT
TOL-PCC_pGEMT_clone10 ACTCCTCCCGCTATAGACCACCAAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAACTACT
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp ACTCCTCCCGCTATAGACCACCAAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAACTACT
TOL-PCC_pENG-clone14 ACTCCTCCCGCTATAGACCACCAAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAACTACT
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP ACTCCTCCCGCTATAGACCACCAAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAACTACT
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI GTTGTAGACGACGAGGCAAGTCCCTAGAGAAGAAGTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGA
TOL-PCC_pGEMT_clone10 GTTGTAGACGACGAGGCAAGTCCCTAGAGAAGAAGTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGA
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp GTTGTAGACGACGAGGCAAGTCCCTAGAGAAGAAGTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGA
TOL-PCC_pENG-clone14 GTTGTAGACGACGAGGCAAGTCCCTAGAGAAGAAGTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGA
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP GTTGTAGACGACGAGGCAAGTCCCTAGAGAAGAAGTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGA
*****

```

```

TOL-PCC_PCR_MluISalI          TCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCCTTG
TOL-PCC_pGEMT_clone10        TCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCCTTG
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp   TCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCCTTG
TOL-PCC_pENG_clone14         TCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCCTTG
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP     TCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCCTTG
*****

TOL-PCC_PCR_MluISalI          GACTCATAAGG-----
TOL-PCC_pGEMT_clone10        GACTCATAAGGTGGGAAACTGCTCTACAATCACTAGTGAATTCGCGGC-----
TOL-PCC_pGEMT_clone10_MxPp   GACTCATAAGGTGGGAAACTGTCGACAATCACTAGTGAATTCGCGCGCGCTG
TOL-PCC_pENG_clone14         GACTCATAAGGTGGGAAACTGT-----
TOL-PCC_pENG_clone14_MxP     GACTCATAAGGTGGGAAACTGTCGA-----
*****

```

f) Aligement construction YAP, séquence mutée

```

TOL-YAP_PCR_MluISalI          -----KGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTG
TOL-YAP_pGEMT_clone5         CCGCGGGATTCGATTACGCGTGCATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTG
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp    -----ACGCGTGCATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTG
TOL-YAP_pENG_clone5         -----CATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTG
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp     -----CATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTG
*****

TOL-YAP_PCR_MluISalI          TGGAGTTACTCTCATTTTTGCTKKTGACTTCTATCCTTCCGTCCGAGATCTCCTAGATA
TOL-YAP_pGEMT_clone5         TGGAGTTACTCTCATTTTTGCTGGTGACTTCTATCCTTCCGTCCGAGATCTCCTAGATA
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp   TGGAGTTACTCTCATTTTTGCTGGTGACTTCTATCCTTCCGTCCGAGATCTCCTAGATA
TOL-YAP_pENG_clone5         TGGAGTTACTCTCATTTTTGCTGGTGACTTCTATCCTTCCGTCCGAGATCTCCTAGATA
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp     TGGAGTTACTCTCATTTTTGCTGGTGACTTCTATCCTTCCGTCCGAGATCTCCTAGATA
*****

TOL-YAP_PCR_MluISalI          CCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGAGTCTCCTGAGCATTGTWCACCTCACCATA
TOL-YAP_pGEMT_clone5         CCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGAGTCTCCTGAGCATTGTACACCTCACCATA
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp   CCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGAGTCTCCTGAGCATTGTACACCTCACCATA
TOL-YAP_pENG_clone5         CCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGAGTCTCCTGAGCATTGTACACCTCACCATA
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp     CCGCCTCAGCTCTATATCGGGAAGCTCTTGAGTCTCCTGAGCATTGTACACCTCACCATA
*****

TOL-YAP_PCR_MluISalI          CAGCAMTCAGGCAAGCCATTTCTCTGCTGGGGGAGTTAATGWCTCTAGCCACCTGGGTGG
TOL-YAP_pGEMT_clone5         CAGCACTCAGGCAAGCCATTTCTCTGCTGGGGGAGTTAATGACTCTAGCCACCTGGGTGG
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp   CAGCACTCAGGCAAGCCATTTCTCTGCTGGGGGAGTTAATGACTCTAGCCACCTGGGTGG
TOL-YAP_pENG_clone5         CAGCACTCAGGCAAGCCATTTCTCTGCTGGGGGAGTTAATGACTCTAGCCACCTGGGTGG
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp     CAGCACTCAGGCAAGCCATTTCTCTGCTGGGGGAGTTAATGACTCTAGCCACCTGGGTGG
*****

TOL-YAP_PCR_MluISalI          GCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATA
TOL-YAP_pGEMT_clone5         GCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATA
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp   GCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATA
TOL-YAP_pENG_clone5         GCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATA
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp     GCAATAATTTGCAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCAATTATGTTAATACTAATA
*****

TOL-YAP_PCR_MluISalI          TGGGCCTAAAGATMAGGCAACTATTGTGGTTCATATTTCTTGCCTTACTTTTGGGAGAG
TOL-YAP_pGEMT_clone5         TGGGCCTAAAGATCAGGCAACTATTGTGGTTCATATTTCTTGCCTTACTTTTGGGAGAG
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp   TGGGCCTAAAGATCAGGCAACTATTGTGGTTCATATTTCTTGCCTTACTTTTGGGAGAG
TOL-YAP_pENG_clone5         TGGGCCTAAAGATCAGGCAACTATTGTGGTTCATATTTCTTGCCTTACTTTTGGGAGAG
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp     TGGGCCTAAAGATCAGGCAACTATTGTGGTTCATATTTCTTGCCTTACTTTTGGGAGAG
*****

TOL-YAP_PCR_MluISalI          AAACGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCCGCCTATA
TOL-YAP_pGEMT_clone5         AAACGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCCGCCTATA
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp   AAACGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCCGCCTATA
TOL-YAP_pENG_clone5         AAACGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCCGCCTATA
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp     AAACGTACTTGAGTATTTGGTTTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCCGCCTATA
*****

TOL-YAP_PCR_MluISalI          GACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAAACTACTGTTGTTAGACGACGAG
TOL-YAP_pGEMT_clone5         GACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAAACTACTGTTGTTAGACGACGAG
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp   GACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAAACTACTGTTGTTAGACGACGAG
TOL-YAP_pENG_clone5         GACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAAACTACTGTTGTTAGACGACGAG
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp     GACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAAACTACTGTTGTTAGACGACGAG
*****

TOL-YAP_PCR_MluISalI          GCAGGTCCCCTAGAAGAAGAAGACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTC
TOL-YAP_pGEMT_clone5         GCAGGTCCCCTAGAAGAAGAAGACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTC
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp   GCAGGTCCCCTAGAAGAAGAAGACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTC
TOL-YAP_pENG_clone5         GCAGGTCCCCTAGAAGAAGAAGACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTC
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp     GCAGGTCCCCTAGAAGAAGAAGACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGATCTCAATCGCCGCGTC
*****

```

```

TOL-YAP_PCR_MluISaI      GCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCTTGGACTCRTAAGGTGGGA
TOL-YAP_pGEMT_clone5    GCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGA
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp GCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGA
TOL-YAP_pENG_clone5     GCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGA
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp GCAGAAGATCTCAATCTCGGGGATCTCAATGTTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGA
*****

TOL-YAP_PCR_MluISaI      AA-----
TOL-YAP_pGEMT_clone5    AACTGTCGACAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATG
TOL-YAP_pGEMT_clone5_MxPp AACTGTCGAC-----
TOL-YAP_pENG_clone5     AACTGT-----
TOL-YAP_pENG_clone5_MxPp AACTGT-----
**

```

4.3.3. Titrage des surnageants viraux

a) Quantification de l'antigène p24

Les titres viraux en pg d'Ag p24/ml sont reportés dans le Tableau 8 concernant les particules lentivirales exprimant les protéines du VHB. Le titre en Ag p24 ne permet pas de prédire l'efficacité de transduction, puisqu'il mesure à la fois les particules lentivirales fonctionnelles et non fonctionnelles. Le nombre de particules virales est calculé selon l'estimation qu'une particule virale contient entre 1500 et 2000 protéines p24 [166]. Les titres obtenus en Ag p24 pour chacune de nos constructions sont similaires, ce qui montre une bonne reproductibilité de la technique, indépendante du transgène.

Tableau 8 : Résultats des mesures de l'Ag p24 sur les surnageants viraux.

La quantification de l'Ag p24 du VIH-1 est réalisée sur les surnageants purifiés par un test ELISA commercial. 1079 représente les séquences sauvages et TOL les séquences mutées dans le PBC et 1899. CIF = PBC + PC + C. PCC = PC + C. YAP = C. Le nombre de particules virales est calculé pour 1500 à 2000 protéines p24/virus. PV = particules virales.

Identification des particules lentivirales	Titre du surnageant viral concentré (pg Ag p24/ml)	Nombre estimé de particules virales (PV/ml)
1079-CIF	$1,4 \cdot 10^5$	2,1 à $2,8 \cdot 10^8$
1079-PCC	$4,7 \cdot 10^5$	7 à $9,4 \cdot 10^8$
1079-YAP	$9,7 \cdot 10^4$	1,5 à $1,9 \cdot 10^8$
TOL-CIF	$4,7 \cdot 10^5$	7 à $9,4 \cdot 10^8$
TOL-PCC	$1,4 \cdot 10^6$	2,1 à $2,8 \cdot 10^9$
TOL-YAP	$5,2 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^8$ à $1 \cdot 10^9$

b) Quantification de l'ARN viral

Afin de vérifier la pertinence du titre Ag p24, nous avons quantifié l'ARN lentiviral dans les surnageants viraux. Les titres de chaque surnageant sont reportés dans le Tableau 9 et sont exprimés en copies d'ARN/ml. La réalisation du titre ARN permet de s'affranchir de la présence de particules vides qui sont détectées par le test Ag p24. Le titre ARN peut également surestimer le nombre de particules lentivirales puisque des virions contenant plusieurs génomes peuvent exister.

Tableau 9 : Résultats des mesures de l'ARN sur les surnageants viraux.

La quantification du génome lentiviral est réalisée par RT-qPCR en comparant les Ct obtenus avec une gamme externe. Les amorces ciblent des régions PBS/ Ψ du vecteur d'expression. 1079 représente les séquences sauvages et TOL les séquences mutées dans le PBC et 1899. CIF = PBC + PC + C. PCC = PC + C. YAP = C. PV = particules virales.

Identification des particules lentivirales	Titre du surnageant viral concentré (copies ARN/ml)	Nombre estimé de particules virales (PV/ml)
1079-CIF	$7,95 \cdot 10^9$	2,1 à $2,8 \cdot 10^8$
1079-PCC	$5,21 \cdot 10^{10}$	7 à $9,4 \cdot 10^8$
1079-YAP	$2,34 \cdot 10^{10}$	1,5 à $1,9 \cdot 10^8$
TOL-CIF	$7,4 \cdot 10^{10}$	7 à $9,4 \cdot 10^8$
TOL-PCC	$2,22 \cdot 10^{11}$	2,1 à $2,8 \cdot 10^9$
TOL-YAP	$7,19 \cdot 10^{10}$	$7,8 \cdot 10^8$ à $1 \cdot 10^9$

4.4. Conclusions et perspectives

Les particules lentivirales portant les séquences PBC, PC et C du VHB ont été produites via la co-transfection transitoire dans des cellules HEK293T. Les séquences sauvages et mutées dans le PBC et en position 1899 ont été utilisées.

Au cours de la mise en place de la technologie lentivirale au laboratoire, nous avons pu bénéficier du soutien technique de plusieurs équipes de recherche telles que le laboratoire de Morphogénèse et Antigénicité du VIH et des virus des hépatites (MAVIVH) à Tours (Dr Catherine Gaudy-Graffin) et le laboratoire du Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI) à Paris (Pr François Lemoine). Ces différents échanges nous ont permis de maîtriser assez rapidement les techniques de transfection des cellules et la production de particules lentivirales. Une optimisation de la technique en ultra centrifugeant nos surnageants cellulaires nous a permis de les concentrer jusqu'à 120 fois. Concernant la culture cellulaire, les conseils avisés de l'équipe du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL, Dr David Durantel), nous ont permis d'appréhender la culture de cellules HepaRG et d'en réussir la mise en place au laboratoire.

Chaque production lentivirale a été titrée en quantifiant l'Ag p24 du VIH-1 exprimé à la surface des particules, et par RT-qPCR pour quantifier le génome viral. Chacune de ces données permet l'estimation du titre non fonctionnel. En effet, aucune de ces deux méthodes ne peut vraiment prédire l'efficacité de la transduction des cellules, puisqu'elles surestiment le nombre de particules lentivirales qui sont capables de transduire les cellules. Cependant, la facilité d'utilisation de ces deux techniques est un réel avantage. Le titre non fonctionnel est alors utilisable pour transduire des cellules en tenant compte de la surestimation possible.

L'estimation du titre fonctionnel est la solution optimale pour transduire de façon efficace les cellules cibles afin d'étudier le rôle des protéines produites. En effet, il permet d'estimer plus précisément la MOI, qui est le nombre de particules virales nécessaires pour infecter une cellule. Ce titre peut être obtenu en quantifiant l'ADN intégré dans le génome cellulaire suite à la transduction de cellules HEK 293T, comme nous l'avons décrit pour les transgènes qui ne sont pas détectables directement par cytométrie en flux. La quantification de l'ADN viral intégré est une des perspectives de ces travaux afin d'estimer le titre

fonctionnel de chacune de nos productions, mais aussi pour corrélérer ce marqueur fiable à la quantification de l'Agp24 ou de l'ARN viral.

Grâce à nos travaux précédents, nous avons vérifié que la transduction de la lignée HepaRG était possible par la technologie lentivirale (cf Chapitre 3). Nous avons utilisé une MOI équivalente à 2,4 environ, calculée à partir des données de cytométrie en flux après transduction des cellules HEK 293T. Cette condition était suffisante pour obtenir une transduction significative des cellules HepaRG avec une détection de la GFP (Green Fluorescent Protein) en microscopie à fluorescence et en cytométrie en flux. Dans le cadre de la transduction par les particules lentivirales exprimant les protéines du VHB, nous allons utiliser le protocole précédemment mis au point pour transduire les cellules HepaRG et ainsi exprimer les protéines du VHB en lignée hépatocytaire. Pour cela, une estimation du titre fonctionnel de nos particules lentivirales exprimant les protéines du VHB sera réalisée par transduction des cellules HEK293T et quantification de l'ADN intégré dans les suspensions cellulaires. Une première transduction par les particules lentivirales portant la séquence PCC sauvage a été réalisée en cellules HepaRG. L'expression de l'AgHBe a été vérifiée par détection semi-quantitative de la protéine par ELISA, ce qui confirme le caractère fonctionnel de nos particules lentivirales à exprimer la protéine HBe.

Nous pensons néanmoins que la MOI utilisée pour transduire nos particules lentivirales exprimant les protéines du VHB dans les HepaRG devra être revue pour optimiser la production de protéines. En effet, il est nécessaire d'obtenir des taux de production protéique *in vitro* suffisamment importants afin de pouvoir étudier les rôles respectifs des protéines HBe et HBc du VHB dans le développement de la fibrose hépatique. D'autre part, nous pensons que l'utilisation de la protéine GFP en fusion de nos protéines d'intérêt aurait pu être un avantage dans la titration de nos particules lentivirales. En effet, il

est largement décrit que la méthode de titration la plus pertinente est la cytométrie en flux. Cependant, les fournisseurs interrogés pour l'acquisition d'Ac anti-HBe ou anti-HBc utilisables en FACS ne proposent pas ces réactifs. Ainsi, nous ne pourrions utiliser cette méthode de titration pour nos particules lentivirales contenant les séquences PC et C.

CONCLUSIONS

Nous avons mené deux études cliniques dans des populations de patients porteurs chroniques du VHB à différents stades de la maladie hépatique. Ces deux études ont confirmé une forte prévalence des mutants PC, quel que soit le stade de la maladie, hépatite chronique ou infection chronique AgHBe négative. Aucun lien n'a été montré entre la sévérité des lésions hépatiques et la présence de la mutation G1896A. En revanche, le double mutant du PBC, moins prévalent, est significativement lié au risque de fibrose sévère. Nous avons également montré que l'association de la mutation G1899A avec le mutant PBC diminuait la sévérité de l'atteinte hépatique, indépendamment de l'âge, du sexe et du génotype. Peu d'études se sont intéressées à l'impact de la combinaison des mutations PBC et PC sur l'évolution des lésions hépatiques. Nous avons émis l'hypothèse d'un possible rôle antagoniste de la mutation G1899A en présence du double mutant PBC sur l'évolution de la fibrose via une probable modulation de l'expression des marqueurs pro-fibrotiques tels que TGF- β , PDGF, α -SMA1. Un projet est actuellement en cours au laboratoire afin d'observer les taux sériques de telles cytokines dans notre cohorte de patients infectés. Nous avons pu mesurer par la technologie Luminex®, les niveaux d'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires décrites dans l'évolution de la fibrose hépatiques : TGF- β , PDGF, collagène 1, TIMP-1, MMP-1, resistin, TNF- α , M-CSF et les IL-6, 17 et 31. Les données sont en cours d'analyse actuellement afin de déterminer la corrélation entre l'expression de ces cytokines et la présence des mutations dans le PBC et à la position 1899.

Notre hypothèse de départ suggérait un rôle possible de la mutation G1896A dans l'infection chronique AgHBe négative (anciennement phase de portage chronique). Au cours des deux études cliniques menées chez les donneurs de sang et chez les patients infectés chroniquement, nous avons confirmé une prévalence élevée de cette mutation sans pouvoir démontrer de lien significatif avec des lésions hépatiques minimales. Nous proposons également de vérifier que la mutation G1896A apparaissait chez les patients au cours de

l'histoire naturelle de la maladie. En effet, au cours de l'étude chez les patients infectés chroniquement, nous avons collecté des échantillons séquentiels pour les patients, distants d'au moins 6 mois. *A posteriori*, nous nous sommes rendu compte que ce délai était trop restreint pour mettre en évidence une modification du profil des mutations PBC et PC. En effet, l'histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB s'étend sur plusieurs années et il aurait fallu obtenir des sérums séquentiels distants d'au moins cinq à dix ans pour pouvoir observer une évolution au niveau des séquences PBC et PC au cours du temps. La nouvelle cohorte HEPATHER, lancée en 2012 et gérée par l'ANRS, pourrait permettre de réaliser des études longitudinales afin de mieux comprendre l'apparition de ces mutations dans l'histoire naturelle de la maladie.

L'absence de lien démontré entre la présence de la mutation G1896A et la sévérité de la fibrose hépatique explique la réorientation de nos travaux vers l'étude des mutations PBC et G1899A et leurs impacts sur le développement de la fibrose hépatique. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous avons mis au point un outil de production protéique dans une lignée hépatocytaire via la technologie lentivirale permettant ainsi de développer une approche fondamentale dans notre thématique principale de recherche. Dans un premier temps, la transduction de cellules HepaRG différenciées par des particules lentivirales exprimant la GFP nous a permis de valider : (i) la possibilité de transduire cette lignée cellulaire par des lentivirus ; (ii) l'expression de la protéine dont la séquence codante est portée par le vecteur lentiviral ; et (iii) la stabilité de production de la protéine d'intérêt dans le temps. En effet, nous avons montré par plusieurs techniques de titration des particules lentivirales que la transduction des cellules HepaRG était efficace, notamment en quantifiant l'ADN proviral intégré dans les cellules HepaRG transduites. L'expression de la protéine GFP a été vérifiée en microscopie électronique et en cytométrie en flux, ce qui confirme que les séquences codantes étaient correctement intégrées dans le génome cellulaire et qu'elles

ont été soumises aux étapes de transcription et de traduction. Enfin, nous avons montré que la protéine d'intérêt était exprimée à long terme, et même quatre semaines après un passage des cellules, ce qui a confirmé la stabilité de transduction de la technologie lentivirale.

Parallèlement à la mise au point de notre outil de transduction des HepaRG, nous avons produit les particules lentivirales exprimant les protéines HBc et/ou HBe du VHB. Nous souhaitons ainsi exprimer ces protéines dans les HepaRG et étudier l'impact de la production protéique sur la fibrose hépatique. Pour cela, la mise au point d'un modèle de co-culture hépatocytes / CEF basé sur un système Transwell est en cours au laboratoire. Ce système permet de placer des cellules HepaRG dans le compartiment supérieur sur une membrane microporeuse et les CEF dans le compartiment inférieur. Ainsi, les molécules sécrétées par l'un ou l'autre des types cellulaires peuvent circuler librement dans le milieu de culture. Il est alors possible de doser les cytokines produites par les CEF en réponse à une stimulation par les HepaRG. Une fois ce modèle cellulaire validé, nous pourrons transduire les hépatocytes avec les particules lentivirales exprimant les protéines du VHB et confirmer la stimulation des CEF en mesurant la production des cytokines pro-fibrotiques comme le TGF- β , le PDGF ou l' α -SMA1 par qPCR dans les surnageants cellulaires. Dans les perspectives à plus long terme, l'utilisation de particules lentivirales contenant les séquences mutées dans PBC et PC nous permettra d'étudier le retentissement de ces mutations dans l'expression des cytokines pro-fibrotiques et de mesurer ainsi l'impact potentiel des mutants PBC et PC dans la fibrogénèse hépatique.

Au cours de ces deux dernières années, plusieurs appels à projets ont été soumis sans succès. Le manque de résultats préliminaires et l'ambition du projet au vu de l'effectif de notre équipe de recherche étaient des critiques récurrentes. La mise en place de plusieurs collaborations avec des équipes de renommée internationale nous a permis de maîtriser la

technologie lentivirale, de démarrer la mise en place d'un modèle cellulaire d'étude de la fibrose, et d'obtenir les premiers résultats de production des protéines du VHB. Avec l'avancée de nos travaux et la soumission d'un article dans le journal Scientific Reports, nous espérons obtenir un financement lors du prochain appel d'offres de l'ANRS afin de poursuivre nos travaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. WHO: **Global hepatitis report, 2017**. In.: WHO; 2017.
2. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI: **A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis**. *Ann Intern Med* 1967, **66**(5):924-931.
3. Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ: **Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis**. *Hepatoma Res* 2017, **2**:163-186.
4. Purcell RH, Gerin JL: **Hepatitis B subunit vaccine: a preliminary report of safety and efficacy tests in chimpanzees**. *Am J Med Sci* 1975, **270**(2):395-399.
5. Chang MH: **Impact of hepatitis B vaccination on hepatitis B disease and nucleic acid testing in high-prevalence populations**. *J Clin Virol* 2006, **36** Suppl 1:S45-50.
6. Purwono PB, Juniastuti, Amin M, Bramanthi R, Nursidah, Resi EM, Wahyuni RM, Yano Y, Soetjipto, Hotta H *et al*: **Hepatitis B Virus Infection in Indonesia 15 Years After Adoption of a Universal Infant Vaccination Program: Possible Impacts of Low Birth Dose Coverage and a Vaccine-Escape Mutant**. *Am J Trop Med Hyg* 2016, **95**(3):674-679.
7. Ni YH, Chen DS: **Hepatitis B vaccination in children: the Taiwan experience**. *Pathol Biol (Paris)* 2010, **58**(4):296-300.
8. Schaefer S: **Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes**. *World J Gastroenterol* 2007, **13**(1):14-21.
9. Littlejohn M, Locarnini S, Yuen L: **Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus**. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016, **6**(1):a021360.
10. Dane DS, Cameron CH, Briggs M: **Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis**. *Lancet* 1970, **1**(7649):695-698.
11. Ganem D, Prince AM: **Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences**. *N Engl J Med* 2004, **350**(11):1118-1129.
12. Ganem D: **Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles**. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991, **168**:61-83.
13. J.-C. Duclos-Vallée HM, S. Ducloux, F. Capel, S. Dubanchet, M.-A. Petit: **Les différents candidats récepteurs du virus de l'hépatite B**. *Virologie* 2000, **4**(6):473-483.
14. Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R: **Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians**. *J Clin Exp Hepatol* 2012, **2**(4):353-365.
15. Seeger C, Mason WS: **Hepatitis B virus biology**. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, **64**(1):51-68.
16. Tur-Kaspa R, Shaul Y, Moore DD, Burk RD, Okret S, Poellinger L, Shafritz DA: **The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer**. *Virology* 1988, **167**(2):630-633.
17. Heise T, Sommer G, Reumann K, Meyer I, Will H, Schaal H: **The hepatitis B virus PRE contains a splicing regulatory element**. *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(1):353-363.
18. Kay A: **Le virus, sa structure, son cycle**. In: *Hépatites virales B et C*. edn.: John Libbey Eurotext; 2006: 17-31.
19. Pollack JR, Ganem D: **Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis**. *J Virol* 1994, **68**(9):5579-5587.
20. Zlotnick A, Venkatakrishnan B, Tan Z, Lewellyn E, Turner W, Francis S: **Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle**. *Antiviral Res* 2015, **121**:82-93.

21. Wang J, Lee AS, Ou JH: **Proteolytic conversion of hepatitis B virus e antigen precursor to end product occurs in a postendoplasmic reticulum compartment.** *J Virol* 1991, **65**(9):5080-5083.
22. Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE: **The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence.** *J Immunol* 1998, **160**(4):2013-2021.
23. Lepère-Douard Charlotte GP: **Entrée du virus de l'hépatite B.** *Virologie* 2010, **14**(4):269-284.
24. Liu S, Koh SS, Lee CG: **Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis.** *Int J Mol Sci* 2016, **17**(6).
25. Chan C, Thurnherr T, Wang J, Gallart-Palau X, Sze SK, Rozen S, Lee CG: **Global re-wiring of p53 transcription regulation by the hepatitis B virus X protein.** *Mol Oncol* 2016, **10**(8):1183-1195.
26. Hong Y, Zhou L, Xie H, Zheng S: **Innate immune evasion by hepatitis B virus-mediated downregulation of TRIF.** *Biochem Biophys Res Commun* 2015, **463**(4):719-725.
27. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C: **Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(24):15655-15660.
28. Marion M-J, Hantz O, Durantel D: **The HepaRG Cell Line: Biological Properties and Relevance as a Tool for Cell Biology, Drug Metabolism, and Virology Studies.** In: *Methods in molecular biology.* edn.: SpringerLink; 2010: 261-272.
29. Testoni B, Durantel D, Zoulim F: **Novel targets for hepatitis B virus therapy.** *Liver Int* 2017, **37 Suppl 1**:33-39.
30. Chouteau P, Le Seyec J, Cannie I, Nassal M, Guguen-Guillouzo C, Gripon P: **A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus.** *J Virol* 2001, **75**(23):11565-11572.
31. Watashi K, Wakita T: **Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus Entry, Species Specificity, and Tissue Tropism.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015, **5**(8):a021378.
32. Schulze A, Gripon P, Urban S: **Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans.** *Hepatology* 2007, **46**(6):1759-1768.
33. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H *et al*: **Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus.** *Elife* 2012, **1**:e00049.
34. Xiao F, McKeating JA, Baumert TF: **A bile acid transporter as a candidate receptor for hepatitis B and D virus entry.** *J Hepatol* 2013, **58**(6):1246-1248.
35. Kock J, Borst EM, Schlicht HJ: **Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment.** *J Virol* 1996, **70**(9):5827-5831.
36. Cooper A, Paran N, Shaul Y: **The earliest steps in hepatitis B virus infection.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1614**(1):89-96.
37. Liu Q, Somiya M, Kuroda S: **Elucidation of the early infection machinery of hepatitis B virus by using bio-nanocapsule.** *World J Gastroenterol* 2016, **22**(38):8489-8496.
38. Hayes CN, Zhang Y, Makokha GN, Hasan MZ, Omokoko MD, Chayama K: **Early events in hepatitis B virus infection: From the cell surface to the nucleus.** *J Gastroenterol Hepatol* 2015, **31**(2):302-309.

39. Yamada M, Oeda A, Jung J, Iijima M, Yoshimoto N, Niimi T, Jeong SY, Choi EK, Tanizawa K, Kuroda S: **Hepatitis B virus envelope L protein-derived bio-nanocapsules: mechanisms of cellular attachment and entry into human hepatic cells.** *J Control Release* 2012, **160**(2):322-329.
40. Li W, Urban S: **Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications.** *J Hepatol* 2016, **64**(1 Suppl):S32-40.
41. Kann M, Schmitz A, Rabe B: **Intracellular transport of hepatitis B virus.** *World J Gastroenterol* 2007, **13**(1):39-47.
42. 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**(3):581-592.
43. Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, Urban S: **HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications.** *Viruses* 2017, **9**(4).
44. Beck J, Nassal M: **Hepatitis B virus replication.** *World J Gastroenterol* 2007, **13**(1):48-64.
45. Kock J, Rosler C, Zhang JJ, Blum HE, Nassal M, Thoma C: **Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner.** *PLoS Pathog* 2010, **6**(9):e1001082.
46. Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS: **A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact.** *Int J Epidemiol* 2005, **34**(6):1329-1339.
47. Nebbia G, Peppia D, Maini MK: **Hepatitis B infection: current concepts and future challenges.** *QJM* 2012, **105**(2):109-113.
48. Mansour W, Malick FZ, Sidiya A, Ishagh E, Chekaraou MA, Veillon P, Ducancelle A, Brichler S, Le Gal F, Lo B *et al*: **Prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta virus in pregnant women and in patients in Mauritania.** *J Med Virol* 2012, **84**(8):1186-1198.
49. Ducancelle A, Abgueguen P, Birguel J, Mansour W, Pivert A, Le Guillou-Guillemette H, Sobnangou JJ, Rameau A, Huraux JM, Lunel-Fabiani F: **High endemicity and low molecular diversity of hepatitis B virus infections in pregnant women in a rural district of North Cameroon.** *PLoS One*, **8**(11):e80346.
50. Traore F, Gormally E, Villar S, Friesen MD, Groopman JD, Vernet G, Diallo S, Hainaut P, Maiga MY: **Molecular characteristics of Hepatitis B and chronic liver disease in a cohort of HB carriers from Bamako, Mali.** *BMC Infect Dis* 2015, **15**:180.
51. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST: **Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity.** *Vaccine* 2012, **30**(12):2212-2219.
52. **EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection.** *J Hepatol* 2017, **67**(2):370-398.
53. Pol S: **Épidémiologie et histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B.** *Hépatogastro- & Oncologie Digestive* 2008, **14**(5):6-15.
54. Deny P, Zoulim F: **Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment.** *Pathol Biol (Paris)* 2010, **58**(4):245-253.
55. Hessel L, West DJ: **Antibody responses to recombinant hepatitis B vaccines.** *Vaccine* 2002, **20**(17-18):2164-2165.
56. **Guide des vaccinations - Vaccination contre l'hépatite B.** In.: INPES; 2012: 108-122.
57. Cales P: **[Hepatitis B vaccination and serious side-effects: sequence is not consequence].** *Gastroenterol Clin Biol* 2001, **25**(10):859-862.

58. Guthmann JP FL, Collet M, Vilain A, Ragot M, Guignon N, et al.: **Couverture vaccinale hépatite B chez l'enfant en France en 2014: progrès très importants chez le nourrisson, stagnation chez l'adolescent.** In: *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*. vol. 26-27; 2015: 499-504.
59. Karra VK, Chowdhury SJ, Ruttala R, Polipalli SK, Kar P: **Clinical Significance of Quantitative HBsAg Titres and its Correlation With HBV DNA Levels in the Natural History of Hepatitis B Virus Infection.** *J Clin Exp Hepatol* 2016, **6**(3):209-215.
60. Thibault V, Servant-Delmas A, Ly TD, Roque-Afonso AM, Laperche S: **Performance of HBsAg quantification assays for detection of Hepatitis B virus genotypes and diagnostic escape-variants in clinical samples.** *J Clin Virol* 2017, **89**:14-21.
61. Sonneveld MJ, Hansen BE, Piratvisuth T, Jia JD, Zeuzem S, Gane E, Liaw YF, Xie Q, Heathcote EJ, Chan HL *et al*: **Response-guided peginterferon therapy in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels.** *Hepatology* 2013, **58**(3):872-880.
62. Locarnini S, Zoulim F: **Molecular genetics of HBV infection.** *Antivir Ther* 2010, **15 Suppl 3**:3-14.
63. Kramvis A, Kew M, Francois G: **Hepatitis B virus genotypes.** *Vaccine* 2005, **23**(19):2409-2423.
64. Kay A, Zoulim F: **Hepatitis B virus genetic variability and evolution.** *Virus Res* 2007, **127**(2):164-176.
65. Halfon P, Pol S, Bourliere M, Cacoub P: **[Hepatitis B virus genotypes: clinical, epidemiological and therapeutic implications].** *Gastroenterol Clin Biol* 2002, **26**(11):1005-1012.
66. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M: **Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus.** *Hepatol Res* 2010, **40**(1):14-30.
67. Kramvis A: **Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus.** *Intervirology* 2014, **57**(3-4):141-150.
68. Tong S, Revill P: **Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability.** *J Hepatol* 2016, **64**(1 Suppl):S4-16.
69. Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L: **Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV).** *Semin Cancer Biol*, **23**(6 Pt B):561-575.
70. Lin CL, Kao JH: **Hepatitis B virus genotypes and variants.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015, **5**(5):a021436.
71. Tran TT, Trinh TN, Abe K: **New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam.** *J Virol* 2008, **82**(11):5657-5663.
72. Sunbul M: **Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**(18):5427-5434.
73. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M: **A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J.** *J Virol* 2009, **83**(20):10538-10547.
74. Ducancelle A, Pivert A, Bertrais S, Boursier J, Balan V, Veillon P, le Guillou-Guillemette H, Thibault V, Castelain S, Roquebert B *et al*: **Different precore/core mutations of hepatitis B interact with, limit, or favor liver fibrosis severity.** *J Gastroenterol Hepatol*, **31**(10):1750-1756.

75. Pivert A, Servant-Delmas A, Lunel-Fabiani F, Le Guillou-Guillemette H, Laperche S, Ducancelle A: **Correlation between the promoter basal core and precore mutations and HBsAg quantification in French blood donors infected with hepatitis B virus.** *J Med Virol* 2014, **87**(3):529-535.
76. Moriya T, Kuramoto IK, Yoshizawa H, Holland PV: **Distribution of hepatitis B virus genotypes among American blood donors determined with a PreS2 epitope enzyme-linked immunosorbent assay kit.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(3):877-880.
77. Kramvis A, Kew MC: **Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy.** *J Viral Hepat* 2005, **12**(5):456-464.
78. Chan HL, Tse CH, Mo F, Koh J, Wong VW, Wong GL, Lam Chan S, Yeo W, Sung JJ, Mok TS: **High viral load and hepatitis B virus subgenotype ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(2):177-182.
79. Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF: **Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region.** *Hepatology* 2001, **33**(3):751-757.
80. Lim YS: **Management of Antiviral Resistance in Chronic Hepatitis B.** *Gut Liver* 2017, **11**(2):189-195.
81. Coppola N, Onorato L, Minichini C, Di Caprio G, Starace M, Sagnelli C, Sagnelli E: **Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants.** *World J Hepatol* 2015, **7**(27):2729-2739.
82. Tong S, Li J, Wands JR, Wen YM: **Hepatitis B virus genetic variants: biological properties and clinical implications.** *Emerg Microbes Infect* 2013, **2**(3):e10.
83. Torresi J, Earnest-Silveira L, Civitico G, Walters TE, Lewin SR, Fyfe J, Locarnini SA, Manns M, Trautwein C, Bock TC: **Restoration of replication phenotype of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by compensatory changes in the "fingers" subdomain of the viral polymerase selected as a consequence of mutations in the overlapping S gene.** *Virology* 2002, **299**(1):88-99.
84. Weber B: **Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact.** *J Clin Virol* 2005, **32**(2):102-112.
85. Kim H, Lee SA, Kim BJ: **X region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity.** *World J Gastroenterol* 2016, **22**(24):5467-5478.
86. Li J, Buckwold VE, Hon MW, Ou JH: **Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation.** *J Virol* 1999, **73**(2):1239-1244.
87. Tong S: **Mechanism of HBV genome variability and replication of HBV mutants.** *J Clin Virol* 2005, **34 Suppl 1**:S134-138.
88. Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, Chen CL, Yang WT, Tsai CS, Kuo SF, Verbree FC, Su TH, Wang CC *et al*: **Higher proportion of viral basal core promoter mutant increases the risk of liver cirrhosis in hepatitis B carriers.** *Gut* 2015, **64**(2):292-302.
89. Zhong YW, Di FL, Liu C, Zhang XC, Bi JF, Li YL, Wu SQ, Dong H, Liu LM, He J *et al*: **Hepatitis B virus basal core promoter/precore mutants and association with liver cirrhosis in children with chronic hepatitis B virus infection.** *Clin Microbiol Infect* 2015, **22**(4):379 e371-378.
90. Grant J, Agbaji O, Kramvis A, Yousif M, Auwal M, Penugonda S, Ugoagwu P, Murphy R, Hawkins C: **Hepatitis B virus sequencing and liver fibrosis evaluation in HIV/HBV co-infected Nigerians.** *Trop Med Int Health* 2017, **22**(6):744-754.

91. Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Zali MR, Norder H, Magnusius LO: **T1764G1766 core promoter double mutants are restricted to Hepatitis B virus strains with an A1757 and are common in genotype D.** *J Gen Virol* 2005, **86**(Pt 9):2451-2458.
92. Nordin M, Ingman M, Lindqvist B, Kidd-Ljunggren K: **Variability in the precore and core promoter region of the hepatitis B virus genome.** *J Med Virol* 2014, **86**(3):437-445.
93. Bonino F, Hoyer B, Nelson J, Engle R, Verme G, Gerin J: **Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: a marker of active hepatitis B virus replication in the liver.** *Hepatology* 1981, **1**(5):386-391.
94. Lok AS, Akarca U, Greene S: **Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(9):4077-4081.
95. Ducancelle A, Pivert A, Lunel-Fabiani F: **Les mutants précore et du promoteur basal du core du virus de l'hépatite B.** *Virologie* 2011, **15**(2):100-114.
96. Chen CY, Crowther C, Kew MC, Kramvis A: **A valine to phenylalanine mutation in the precore region of hepatitis B virus causes intracellular retention and impaired secretion of HBe-antigen.** *Hepatol Res* 2008, **38**(6):580-592.
97. Laras A, Koskinas J, Avgidis K, Hadziyannis SJ: **Incidence and clinical significance of hepatitis B virus precore gene translation initiation mutations in e antigen-negative patients.** *J Viral Hepat* 1998, **5**(4):241-248.
98. Kremsdorf D, Garreau F, Capel F, Petit MA, Brechot C: **In vivo selection of a hepatitis B virus mutant with abnormal viral protein expression.** *J Gen Virol* 1996, **77** (Pt 5):929-939.
99. Yuan TT, Lin MH, Qiu SM, Shih C: **Functional characterization of naturally occurring variants of human hepatitis B virus containing the core internal deletion mutation.** *J Virol* 1998, **72**(3):2168-2176.
100. Liao Y, Hu X, Chen J, Cai B, Tang J, Ying B, Wang H, Wang L: **Precore mutation of hepatitis B virus may contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis.** *PLoS One* 2012, **7**(6):e38394.
101. Suppiah J, Mohd Zain R, Bahari N, Haji Nawi S, Saat Z: **G1896A Precore Mutation and Association With HBeAg Status, Genotype and Clinical Status in Patients With Chronic Hepatitis B.** *Hepat Mon* 2015, **15**(10):e31490.
102. Yang Y, Sun JW, Zhao LG, Bray F, Xiang YB: **Quantitative evaluation of hepatitis B virus mutations and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis of prospective studies.** *Chin J Cancer Res* 2015, **27**(5):497-508.
103. Wei F, Zheng Q, Li M, Wu M: **The association between hepatitis B mutants and hepatocellular carcinoma: A meta-analysis.** *Medicine (Baltimore)* 2017, **96**(19):e6835.
104. Lapalus M, Laouenan C, Cardoso AC, Estrabaud E, Carvalho-Filho RJ, Zhang Q, Lada O, Appourchaux K, Mouri F, Boyer N *et al*: **Precore/Core promoter variants to predict significant fibrosis in both HBeAg positive and negative chronic hepatitis B.** *Liver Int* 2015, **35**(9):2082-2089.
105. Mendy ME, Kaye S, Le Roux E, Kirk GD, Jeng-Barry A, McConkey S, Cotten M, Kuniholm MH, Leligdowicz A, Hainaut P *et al*: **Application of a novel, rapid, and sensitive oligonucleotide ligation assay for detection of cancer-predicting mutations in the precore and basal core promoter of hepatitis B virus.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**(8):2723-2730.
106. Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG: **Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers.** *Liver Int* 2007, **27**(10):1356-1363.

107. Chen CH, Changchien CS, Lee CM, Hung CH, Hu TH, Wang JH, Wang JC, Lu SN: **Combined mutations in pre-s/surface and core promoter/precore regions of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study.** *J Infect Dis* 2008, **198**(11):1634-1642.
108. Davidson F, Lycett C, Sablon E, Petrik J, Dow BC: **Hepatitis B virus genotypes and precore mutations in Scottish blood donors.** *Vox Sang* 2005, **88**(2):87-92.
109. Ducancelle A, Pivert A, Bertrais S, Boursier J, Balan V, Veillon P, le Guillou-Guillemette H, Thibault V, Castelain S, Roquebert B *et al*: **Different precore/core mutations of hepatitis B interact with, limit, or favor liver fibrosis severity.** *J Gastroenterol Hepatol* 2016, **31**(10):1750-1756.
110. Panassie L, Borentain P, Nafati C, Bernardin G, Doudier B, Thibault V, Gerolami R, Colson P: **Fatal fulminant primary hepatitis B virus infections with G1896A precore viral mutants in southeastern France.** *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012, **36**(1):e1-8.
111. Yang ZT, Huang SY, Chen L, Liu F, Cai XH, Guo YF, Wang MJ, Han Y, Yu DM, Jiang JH *et al*: **Characterization of Full-Length Genomes of Hepatitis B Virus Quasispecies in Sera of Patients at Different Phases of Infection.** *J Clin Microbiol* 2015, **53**(7):2203-2214.
112. Chen LM, Fan XG, Ma J, He B, Jiang YF: **Molecular mechanisms of HBeAg in persistent HBV infection.** *Hepatol Int* 2016, **11**(1):79-86.
113. Lang T, Lo C, Skinner N, Locarnini S, Visvanathan K, Mansell A: **The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway.** *J Hepatol* 2011, **55**(4):762-769.
114. Moradzadeh M, Tayebi S, Poustchi H, Sayehmiri K, Shahnazari P, Naderi E, Montazeri G, Mohamadkhani A: **The Possible Role of TLR2 in Chronic Hepatitis B Patients with Precore Mutation.** *Adv Virol* 2013, **2013**:780319.
115. Akbal E, Kocak E, Koklu S, Ergul B, Akyurek O, Yilmaz FM: **Serum Toll-Like Receptor-2, Toll-Like Receptor-4 Levels in Patients with HBeAg-Negative Chronic Viral Hepatitis B.** *Viral Immunol* 2017, **30**(4):278-282.
116. Zheng JX, Zeng Z, Zheng YY, Yin SJ, Zhang DY, Yu YY, Wang F: **Role of hepatitis B virus base core and precore/core promoter mutations on hepatocellular carcinoma in untreated older genotype C Chinese patients.** *J Viral Hepat* 2011, **18**(10):e423-431.
117. Yin J, Xie J, Liu S, Zhang H, Han L, Lu W, Shen Q, Xu G, Dong H, Shen J *et al*: **Association between the various mutations in viral core promoter region to different stages of hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma.** *Am J Gastroenterol* 2011, **106**(1):81-92.
118. Bedossa P: **[Liver fibrosis in hepatitis B: a dynamic process].** *Gastroenterol Clin Biol* 2010, **34 Suppl 2**:S103-108.
119. Lamireau T, Desmouliere A, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J: **[Mechanisms of hepatic fibrogenesis].** *Arch Pediatr* 2002, **9**(4):392-405.
120. Sawadogo A, Dib N, Calès P: **Physiopathologie de la cirrhose et ses complications.** *Réanimation* 2007, **16**:557-562.
121. Blanc JF, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J: **Cellules étoilées du foie et fibrogénèse hépatique.** *Gastroenterol Clin Biol* 1997, **21**:869-879.
122. Friedman SL: **Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver.** *Physiol Rev* 2008, **88**(1):125-172.
123. Mormone E, George J, Nieto N: **Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches.** *Chem Biol Interact* 2011, **193**(3):225-231.

124. Zhang E, Lu M: **Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune responses in the control of hepatitis B virus (HBV) infection.** *Med Microbiol Immunol* 2015, **204**(1):11-20.
125. Reeves HL, Friedman SL: **Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis.** *Front Biosci* 2002, **7**:d808-826.
126. Chen Z, Li YX, Fu HJ, Ren YL, Zou L, Shen SZ, Chen P, Sun T, Huang CH: **Hepatitis B Virus Core Antigen Stimulates IL-6 Expression via p38, ERK and NF-kappaB Pathways in Hepatocytes.** *Cell Physiol Biochem* 2017, **41**(1):91-100.
127. Wang L, Chen S, Xu K: **IL-17 expression is correlated with hepatitis B related liver diseases and fibrosis.** *Int J Mol Med* 2011, **27**(3):385-392.
128. Yu X, Guo R, Ming D, Deng Y, Su M, Lin C, Li J, Lin Z, Su Z: **The Transforming Growth Factor beta1/Interleukin-31 Pathway Is Upregulated in Patients with Hepatitis B Virus-Related Acute-on-Chronic Liver Failure and Is Associated with Disease Severity and Survival.** *Clin Vaccine Immunol* 2015, **22**(5):484-492.
129. Martin-Vilchez S, Sanz-Cameno P, Rodriguez-Munoz Y, Majano PL, Molina-Jimenez F, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R, Lara-Pezzi E: **The hepatitis B virus X protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells.** *Hepatology* 2008, **47**(6):1872-1883.
130. Guo GH, Tan DM, Zhu PA, Liu F: **Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2.** *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009, **8**(1):59-64.
131. Feng GX, Li J, Yang Z, Zhang SQ, Liu YX, Zhang WY, Ye LH, Zhang XD: **Hepatitis B virus X protein promotes the development of liver fibrosis and hepatoma through downregulation of miR-30e targeting P4HA2 mRNA.** *Oncogene* 2017.
132. Bai Q, An J, Wu X, You H, Ma H, Liu T, Gao N, Jia J: **HBV promotes the proliferation of hepatic stellate cells via the PDGF-B/PDGFR-beta signaling pathway in vitro.** *Int J Mol Med* 2012, **30**(6):1443-1450.
133. Jia B, Guo M, Li G, Yu D, Zhang X, Lan K, Deng Q: **Hepatitis B virus core protein sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor-induced apoptosis by suppression of the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase 7.** *J Virol* 2014, **89**(4):2041-2051.
134. Hosseini SY, Baesi K, Azarpira N, Pakneiat A, Hosseini SA: **The evaluation of fibrotic effects of the hepatitis B virus pre-core in hepatic stellate cells.** *Biomed Rep* 2017, **6**(6):671-674.
135. Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ: **Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies.** *Curr Drug Metab* 2008, **9**(1):1-11.
136. Hayes CN, Chayama K: **HBV culture and infectious systems.** *Hepatol Int* 2016, **10**(4):559-566.
137. Payan C, Pivert A, Kampf G, Ramont C, Cottin J, Lemarie C: **Assessment of new chemical disinfectants for HBV virucidal activity in a cell culture model.** *J Hosp Infect* 2004, **56 Suppl 2**:S58-63.
138. Dhumeaux D, Pawlotsky JM: **Hepatitis B:** EDK Editions; 2009.
139. Sells MA, Chen ML, Acs G: **Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(4):1005-1009.
140. Delaney WEt, Isom HC: **Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus.** *Hepatology* 1998, **28**(4):1134-1146.

141. Lucifora J, Durantel D, Belloni L, Barraud L, Villet S, Vincent IE, Margeridon-Thermet S, Hantz O, Kay A, Levrero M *et al*: **Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector.** *J Gen Virol* 2008, **89**(Pt 8):1819-1828.
142. Allocca M, Tessitore A, Cotugno G, Auricchio A: **AAV-mediated gene transfer for retinal diseases.** *Expert Opin Biol Ther* 2006, **6**(12):1279-1294.
143. Goncalves MA: **Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector.** *Virol J* 2005, **2**:43.
144. Okada T: **Efficient AAV Vector Production System: Towards Gene Therapy For Duchenne Muscular Dystrophy.** In: *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*. edn. Edited by Martin DF: Intech; 2013.
145. Yang D, Liu L, Zhu D, Peng H, Su L, Fu YX, Zhang L: **A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy.** *Cell Mol Immunol* 2014, **11**(1):71-78.
146. Ye L, Yu H, Li C, Hirsch ML, Zhang L, Samulski RJ, Li W, Liu Z: **Adeno-Associated Virus Vector Mediated Delivery of the HBV Genome Induces Chronic Hepatitis B Virus Infection and Liver Fibrosis in Mice.** *PLoS One* 2015, **10**(6):e0130052.
147. Lucifora J, Salvetti A, Marniquet X, Maily L, Testoni B, Fusil F, Inchauspe A, Michelet M, Michel ML, Levrero M *et al*: **Detection of the hepatitis B virus (HBV) covalently-closed-circular DNA (cccDNA) in mice transduced with a recombinant AAV-HBV vector.** *Antiviral Res* 2017, **145**:14-19.
148. Hu GF, Wu XB, Yu SY, Kang Y, Hou YD: **Functional change of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells after recombinant adeno-associated virus type 2-mediated HBsAg gene infection.** *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003, **23**(7):696-698, 701.
149. Cong M, Wang P, Yan ZY, Tang SZ, Wang BE, Jia JD, Liu Y, You H: **[Recombinant adeno-associated virus carrying hepatitis B virus C gene (rAAV-HBV-C) effectively pulses dendritic cells (DC) without affecting their maturity].** *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2005, **13**(1):17-19.
150. Finkelstein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M: **LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(18):7306-7311.
151. Logan AC, Nightingale SJ, Haas DL, Cho GJ, Pepper KA, Kohn DB: **Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors.** *Hum Gene Ther* 2004, **15**(10):976-988.
152. Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, Smucker B, Cornetta K: **Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods.** *Gene Ther* 2002, **9**(17):1155-1162.
153. Geraerts M, Willems S, Baekelandt V, Debyser Z, Gijssbers R: **Comparison of lentiviral vector titration methods.** *BMC Biotechnol* 2006, **6**:34.
154. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D: **In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.** *Science* 1996, **272**(5259):263-267.
155. Meredith LW, Hu K, Cheng X, Howard CR, Baumert TF, Balfe P, van de Graaf KF, Protzer U, McKeating JA: **Lentiviral hepatitis B pseudotype entry requires sodium taurocholate co-transporting polypeptide and additional hepatocyte-specific factors.** *J Gen Virol* 2016, **97**(1):121-127.
156. Dai S, Zhuo M, Song L, Chen X, Yu Y, Zang G, Tang Z: **Lentiviral vector encoding ubiquitinated hepatitis B core antigen induces potent cellular immune responses and therapeutic immunity in HBV transgenic mice.** *Immunobiology* 2016, **221**(7):813-821.

157. Chuai X, Wang W, Chen H, Deng Y, Wen B, Tan W: **Lentiviral backbone-based hepatitis B virus replicon-mediated transfer favours the establishment of persistent hepatitis B virus infection in mice after hydrodynamic injection.** *Antiviral Res* 2014, **101**:68-74.
158. Vivekanandan P, Abraham P, Sridharan G, Chandy G, Shaji RV, Daniel D, Raghuraman S, Daniel HD, Subramaniam T: **High frequency of the 1896 precore mutation in patients and blood donors with hepatitis B virus infection from the Indian subcontinent.** *Mol Diagn* 2004, **8**(1):51-56.
159. Halfon P, Bourliere M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, Renou C, Penaranda G, Saadoun D *et al*: **Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status.** *J Viral Hepat* 2006, **13**(5):329-335.
160. Thibault V, Laperche S, Thiers V, Sayon S, Letort MJ, Delarocque-Astagneau E, Antona D: **Molecular epidemiology and clinical characteristics of hepatitis B identified through the French mandatory notification system.** *PLoS One* 2013, **8**(9):e75267.
161. Trimoulet P, Boutonnet M, Winnock M, Faure M, Loko MA, De Ledinghen V, Bernard PH, Castera L, Foucher J, Dupon M *et al*: **Hepatitis B virus genotypes: a retrospective survey in Southwestern France, 1999-2004.** *Gastroenterol Clin Biol* 2007, **31**(12):1088-1094.
162. Seto WK, Wong DK, Fung J, Huang FY, Liu KS, Lai CL, Yuen MF: **Linearized hepatitis B surface antigen and hepatitis B core-related antigen in the natural history of chronic hepatitis B.** *Clin Microbiol Infect* 2014, **20**(11):1173-1180.
163. Chen EQ, Feng S, Wang ML, Liang LB, Zhou LY, Du LY, Yan LB, Tao CM, Tang H: **Serum hepatitis B core-related antigen is a satisfactory surrogate marker of intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):173.
164. Friedt M, Gerner P, Lausch E, Trubel H, Zabel B, Wirth S: **Mutations in the basic core promoter and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B.** *Hepatology* 1999, **29**(4):1252-1258.
165. Amini-Bavil-Olyaei S, Alavian SM, Adeli A, Sarrami-Forooshani R, Sabahi F, Sabouri E, Tavangar HR, Azizi M, Mahboudi F: **Hepatitis B virus genotyping, core promoter, and precore/core mutations among Afghan patients infected with hepatitis B: a preliminary report.** *J Med Virol* 2006, **78**(3):358-364.
166. Nair A, Xie J, Joshi S, Harden P, Davies J, Hermiston T: **A rapid and efficient branched DNA hybridization assay to titer lentiviral vectors.** *J Virol Methods* 2008, **153**(2):269-272.

Thèse de Doctorat

Adeline PIVERT

Mutations dans la région précore du virus de l'hépatite B et fibrose hépatique : approche épidémiologique et application fondamentale

HBV precore mutations and liver fibrosis: epidemiologic approach and basic research

Résumé

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) reste un problème de santé publique avec plus de 880 000 décès chaque année dans le monde. Au stade chronique de l'infection virale B, des complications peuvent survenir comme la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. L'implication du VHB, de ses protéines ou de sa variabilité génétique dans la fibrose hépatique reste à élucider. Toutefois, des méta-analyses semblent montrer un lien statistiquement significatif entre la présence de la double mutation A1762T/G1764A dans le promoteur basal du core (PBC) du VHB et la fibrose sévère. C'est pourquoi nous avons orienté nos travaux de recherche selon deux axes : l'implication des mutations du PBC et de la région précore (PC) dans la sévérité des lésions hépatiques ainsi que le rôle des protéines HBc et HBe du VHB dans l'induction de la fibrogénèse. Dans un premier temps, deux études cliniques ont permis de confirmer l'association significative du double mutant PBC avec la fibrose sévère indépendamment du génotype viral. Nous avons également démontré un effet antagoniste de la mutation G1899A située dans la région PC vis-à-vis du double mutant PBC dans la sévérité de la fibrose. La deuxième partie de nos travaux a consisté à développer une technique innovante de production de protéines en utilisant la transduction de la lignée HepaRG par des vecteurs lentiviraux contenant la séquence de la protéine GFP (green fluorescent protein). En parallèle, nous avons synthétisé des particules lentivirales contenant les séquences sauvages et mutées du PBC et de la région PC, avec pour objectif de produire les protéines HBc et HBe dans les HepaRG.

Mots clés

Virus de l'hépatite B – Mutations du promoteur basal du core et précore – Technologie lentivirale – HepaRG – Fibrose hépatique

Abstract

The hepatitis B virus (HBV) infection remains a significant public health problem with more than 880 000 deaths every year worldwide. At the stage of chronic HBV infection, complications can occur such as fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The role of HBV, its protein and its genomic variability in fibrosis are still unclear. Meta-analysis seems to indicate a strong link between the double mutation A1762T/G1764A detection in the basal core promoter (BCP) of HBV and the development of fibrosis. In this context, our work aimed to explore: i. the implication of BCP or precore (PC) regions mutations on the severity of fibrosis, and ii. the role of HBc and HBe proteins in fibrosis induction. For the first approach, our studies confirmed the association between the presence of the BCP double mutation and severe fibrosis, independently of the viral genotype. We also showed that the G1899A mutation in the PC region presents an antagonist effect regarding the double BCP mutant for fibrosis severity. In the second part of our work, we developed an innovative technology to produce protein via the transduction of HepaRG cells using lentiviral technology with a plasmid vector containing GFP (green fluorescent protein) sequence. We also obtained lentiviral particles containing the wild and mutated sequences for the BCP and PC regions, in order to produce HBc and HBe protein in HepaRG cells and to explore of the pathogenic role of BCP and PC mutants.

Key words

Hepatitis B virus – Basal core promoter and precore mutations – Lentiviral technology – HepaRG – liver fibrosis