



HAL
open science

Détection et quantification des variants du virus de l'hépatite B résistants à la lamivudine et à l'adéfovir par PCR sélective en temps réel

Julien Lupo

► **To cite this version:**

Julien Lupo. Détection et quantification des variants du virus de l'hépatite B résistants à la lamivudine et à l'adéfovir par PCR sélective en temps réel. Sciences pharmaceutiques. 2006. dumas-01371632

HAL Id: dumas-01371632

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01371632>

Submitted on 26 Sep 2016

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1^{er} exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2006

n° = 7025

**Détection et quantification des variants du virus de
l'hépatite B résistants à la lamivudine et à l'adéfovir par
PCR sélective en temps réel**

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

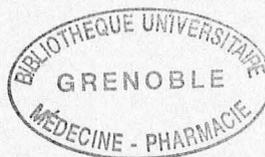
Présentée à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Et soutenue publiquement le 9 juin 2006

Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par **Julien Lupo**

[Données à caractère personnel]



DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président : Monsieur le Professeur A. Favier

Membres : Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin

Monsieur le Docteur P. Morand

Madame le Docteur M.N. Hilleret

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2006

**Détection et quantification des variants du virus de
l'hépatite B résistants à la lamivudine et à l'adéfovir par
PCR sélective en temps réel**

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Et soutenue publiquement le 9 juin 2006

Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par **Julien Lupo**

[Données à caractère personnel]

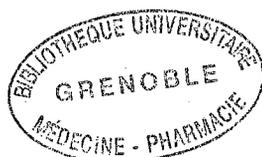
DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président : Monsieur le Professeur A. Favier

Membres : Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin

Monsieur le Docteur P. Morand

Madame le Docteur M.N. Hilleret



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. le Professeur P. DEMENGE
Vice-Doyenne : Mme A. VILLET

PROFESSEURS DE PHARMACIE

BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	(Emérite)
BURMEISTER	Wilhelm	Biophysique
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-Technique
DANEL	Vincent	Toxicologie
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Bio-Inorganique
DEMENGE	Pierre	Physiologie / Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie
FAVIER	Alain	Biochimie / Biotechnologie
GOULON	Chantal	Biophysique
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique
RIBUOT	Christophe	Physiologie / Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacie Galénique

PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie Clinique
----------------	---------	--------------------

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotechn.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie et génie de la formulation
DELETRAZ	Martine	Droit Pharmaceutique Economie
DEMEILLERS	Christine	Biochimie
DESIRE	Jérôme	Chimie Bioorganique
DIJOUX-FRANCA	Marie-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie-Pharmacologie
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Immunologie
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GERMI	Raphaële	Bactériologie
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie - Pharmacologie
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique
GUIRAUD	Pascale	Biologie Cellulaire et Génétique
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie
KRIVOBOK	Serge	Botanique - Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique / Chimie Thérapeutique
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique
RICHARD	Jean-Michel	
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie - Pharmacologie
SEVE	Michel	Ens. Physique / Rech. Biochimie
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Bio-Inorganique
VILLEMMAIN	Danielle	Mathématiques / Informatique
VILLET	Annick	Chimie Analytique
PROFESSEUR AGREGE (PRAG)		
ROUTABOUL	Christel	Chimie Générale

Remerciements

Au président de thèse, Monsieur le Professeur Alain Favier,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être le président de ma thèse. Tout au long de mon cursus, j'ai apprécié la qualité de votre enseignement, riche de la grande expérience que vous avez acquise de la recherche. Je vous remercie pour votre esprit d'ouverture et votre disponibilité auprès des étudiants et des internes.

Monsieur le Professeur Jean-Marie Seigneurin,

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Virologie et de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions sur ma thèse portant sur le virus de l'hépatite B.

Au directeur de thèse, Monsieur le Docteur Patrice Morand,

Je vous suis reconnaissant d'avoir encadré mon travail et soutenu dans la rédaction de ma thèse. J'ai apprécié vos compétences en virologie, vos judicieux conseils et votre bonne humeur pendant toute la période où j'ai travaillé dans le laboratoire de virologie.

Madame le Docteur Marie-Noëlle Hilleret,

Je vous remercie de faire partie de mon jury et de juger mon travail à travers votre regard de clinicien. Merci de m'avoir fait partagé votre expérience et votre contact avec les malades pendant mon passage dans le service d'Hépatogastro-Entérologie.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Zarski,

Je vous remercie de m'avoir accueilli dans le service d'Hépatogastro-Entérologie et permis de travailler sereinement sur ma thèse. Je vous suis reconnaissant de m'avoir fait part de votre grande expérience sur la prise en charge des malades atteints d'hépatites chroniques.

Madame le Docteur Sylvie Larrat,

Je te remercie pour l'intérêt que tu as porté à mon travail, tes conseils et ton aide dans la rédaction de ma thèse. Merci pour ta rigueur scientifique, ton dynamisme, ta disponibilité et ton soutien. Bonne réussite dans ta vie professionnelle.

Monsieur Gérard Barguès,

Je te remercie pour ton aide précieuse sur l'optimisation des techniques de PCR en temps réel et ton soutien dans les moments difficiles. Ta bonne humeur me manquera.

Madame Sandrine Nicod,

Merci pour ton aide concernant les techniques de biologie moléculaire, ta disponibilité et ta gentillesse.

Je remercie tout particulièrement, **Céline Colmant**, toute jeune maman, qui m'a apporté son aide alors que l'outil informatique dont je disposais rendait l'âme. Grand merci aussi à **Anne Signori-Schmuck** pour son aide dans la relecture de la thèse.

Je remercie enfin, Bénédicte Gratacap, Monique Baccard, Odile Genoulaz, Sylvie Aribert, Josette Bourgeat, Martine Décret, Nathalie Muller et Michel Gervasoni pour leur sympathie et leur soutien pendant mon internat et l'élaboration de ma thèse.

Enfin, je remercie ma famille pour leur soutien malgré la distance qui peut nous séparer. A mes amis...

« Personne ne peut désirer être heureux, bien agir et bien vivre, qu'il ne désire en même temps être, agir et vivre, c'est-à-dire exister en acte ».

Spinoza, *l'Ethique*, IV, 21.

SOMMAIRE

Introduction	1
Données bibliographiques	4
1. Biologie du virus de l'hépatite B	5
1. Historique	5
2. Taxonomie	5
3. Structure	6
4. Organisation du génome viral	7
5. Les protéines virales	8
5.1 La polymérase virale	8
5.2 Les antigènes HBc et HBe	9
5.3 Les protéine pré-S1, pré-S2 et Ag HBs	10
5.4 L'antigène HBx	10
6. Les séquences régulatrices	11
7. Le cycle de réplication virale	11
8. La variabilité du génome	13
8.1 La variabilité génotypique	14
8.2 La variabilité phénotypique	15
2. Diagnostic biologique du VHB	19
1. Diagnostic immunologique du VHB par recherche des antigènes et des anticorps	19
1.1 Cinétique des marqueurs au cours des hépatites aiguës	19
1.2 Cinétique des marqueurs au cours de l'infection chronique	20
1.3 Profils sérologiques particuliers	21
2 Quantification de l'ADN du VHB	23
2.1 Cinétique de l'ADN du VHB	23
2.2 Les différentes techniques de quantification disponibles en France	24
2.3 Indications de la quantification de l'ADN du VHB	26
3. Traitement de l'hépatite B chronique	28
1. Indications du traitement	28
1.1 Bases physiopathologiques du traitement	28
1.2 Recommandations pour le traitement de l'hépatite B chronique	30
2. Traitements actuels de l'hépatite B chronique	31
2.1 Interféron- α et interféron- α pégylé	31
2.2 Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques	33
2.2.1 La lamivudine	33
2.2.2 L'adéfovir	35
2.2.3 L'entécavir	36
2.2.4 Les analogues nucléos(t)idiques en cours de développement	37
2.2.5 Les essais de combinaisons de molécules	38
2.2.6 Les perspectives de traitement	39

4. Résistance du VHB aux analogues nucléosidiques et nucléotidiques	40
1. Facteurs impliqués dans la résistance virale	40
2. Mécanismes moléculaires de la résistance aux analogues nucléosidiques et nucléotidiques	42
2.1 Mutations associées à la résistance à la lamivudine et aux L-nucléosides	42
2.2 Résistance aux nucléosides phosphonates acycliques	45
2.3 Résistance aux analogues de la désoxyguanosine	46
2.4 Résistance à plusieurs analogues nucléos(t)idiques	46
3. Implication clinique de la résistance	47
4. Diagnostic de la résistance	52
4.1 Diagnostic phénotypique	52
4.2 Diagnostic génotypique	53
Objectifs de l'étude	57
Matériels et méthodes	59
1. Mise au point de la technique de PCR sélective en temps réel	60
2. Evaluation de la technique de PCR sélective en temps réel	64
2.1 Construction des plasmides par clonage	64
2.2 Comparaison de la PCR sélective avec le séquençage et le test INNO-LiPA	65
3. Application de la PCR sélective à des sérums de patients	67
Résultats	69
1. Validation de la technique de PCR sélective en temps réel	70
2. Comparaison de la PCR sélective avec le séquençage et le test INNO-LiPA	76
3. Recherche des variants chez des patients atteints d'hépatite B chronique	80
Discussion	85
Conclusion	92
Références bibliographiques	95
Annexe	106

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique des particules virales	6
Figure 2 : Organisation du génome viral du VHB	7
Figure 3 : Représentation de la polymérase du VHB	8
Figure 4 : Structure du gène codant pour les protéines HBc et HBe	9
Figure 5 : Amorçage de la synthèse du brin moins d'ADN	12
Figure 6 : Représentation simplifiée du cycle de réplication virale du VHB	13
Figure 7 : Structure du gène codant pour les protéines HBc et HBe et émergence des mutants précocore	16
Figure 8 : Représentation de la structure secondaire du signal d'encapsidation	17
Figure 9 : Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au décours d'une hépatite B aiguë	20
Figure 10 : Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au décours d'une hépatite B chronique	21
Figure 11 : Sensibilité et domaine de linéarité des différentes techniques de quantification de l'ADN du VHB	25
Figure 12 : Algorithme de traitement de l'hépatite B chronique chez les patients non cirrhotiques en fonction du statut Ag HBe, du taux d'ALAT et de la charge virale VHB	30
Figure 13 : Structure chimique des différents analogues nucléosid(t)iques	34
Figure 14 : Localisation moléculaire dans le domaine de la RT du VHB des principales mutations associées à la résistance aux analogues nucléos(t)idiques	43
Figure 15 : Définition de la résistance clinique	49
Figure 16 : Principe de la PCR sélective	60
Figure 17 : Principe de la PCR discriminante en temps réel appliquée à la recherche des mutations de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir	61
Figure 18 : Sélectivité des amorces utilisées dans la PCR sélective en temps réel	62
Figure 19 : Capacité de discrimination de la PCR sélective	72
Figures 20 et 21 : Comparaison des résultats de charge virale donnés par Monitor Amplicor et PCR sélective	75
Figure 22 : Détection de la population minoritaire rtM204V par séquençage et par INNO-LiPA HBV DR v2	77
Figure 23 : Emergence des mutants rtM204I/V et N236T chez les patients P1 à P9	81
Figure 24 : Evolution des charges virales et des ALAT du patient P3 sous traitement à la lamivudine et/ou à l'adéfovir en fonction de l'émergence des variants de résistance rtM204I/V et/ou N236T quantifiés par PCR sélective	82
Figure 25 : Evolution des charges virales et des ALAT du patient P8 sous traitement par adéfovir en fonction de l'émergence du variant de résistance rtN236T quantifié par PCR sélective	84

TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques moléculaires et sérotypiques des différents génotypes du VHB et leur répartition géographique	14
Tableau II : Fréquence des mutations précore et du promoteur BCP en fonction du génotype	18
Tableau III : Profils sérologiques les plus couramment rencontrés dans l'infection au VHB	23
Tableau IV : Efficacité de l'IFN standard et pégylé dans le traitement de l'hépatite B chronique chez les patients Ag HBe positifs et négatifs	32
Tableau V : Résistance phénotypique des différents variants de la transcriptase inverse aux molécules antivirales	48
Tableau VI : Pouvoir de discrimination de la PCR spécifique d'allèles en fonction du mésappariement en 3' terminal	61
Tableau VII : Séquence des amorces et de la sonde utilisées pour la PCR sélective en temps réel	63
Tableau VIII : Optimisation de la PCR sélective	70
Tableau IX : Spécificité de la PCR sélective en temps réel	71
Tableau X : Pouvoir de discrimination de la PCR sélective estimée par l'écart de Ct entre l'amplification du mutant minoritaire à 0,1% et la population virale totale à 10^5 copies	72
Tableau XI : Validation de la PCR sélective	74
Tableau XII : Comparaison du séquençage direct, du test INNO-LiPA et de la PCR sélective en temps réel pour différentes proportions de plasmides mutants mélangées à du plasmide sauvage et pour différentes quantités d'ADN plasmidique total	78
Tableau XIII : Comparaison des sérums de patients par séquençage, PCR sélective et INNO-LiPA	79
Tableau XIV : Caractéristiques cliniques des patients avant traitement	80

TABLE DES ABREVIATIONS

aa	: acide aminé
Ac	: anticorps
Ag	: antigène
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNccc	: ADN circulaire fermé de manière covalente (covalently closed circular)
ADN RC	: ADN circulaire relâché
ADV	: adéfovir
ALAT	: alanine amino transférase
AN	: analogues nucléos(t)idiques
ARMS	: Amplification Refractory Mutation System
ARN	: acide ribonucléique
ARN pg	: ARN pré génomique
CHC	: carcinome hépatocellulaire
Ct	: cycle treshold
cv	: charge virale
CV	: coefficient de variation
ddNTP	: didésoxyribonucléotides
dNTP	: désoxyribonucléotides
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
IFN	: interféron, IFN peg : interféron pégylé
Ig	: immunoglobulines
LAM	: lamivudine
MALDI	: Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization
MEIA	: microparticle enzyme immunoassay
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Polymerase chain reaction
PCRs	: PCR sélective
PNA	: peptide nucleic acid
Pol	: polymérase
RT	: transcriptase inverse (reverse transcriptase)
TOF	: Time of flight
UI	: unités internationales
VHB	: virus de l'hépatite B
VHC	: virus de l'hépatite C
VIH	: virus de l'immunodéficience humaine
WT	: wild type (souche sauvage)
YIDD	: tyrosine, isoleucine, aspartate, aspartate
YMDD	: tyrosine, méthionine, aspartate, aspartate (souche sauvage)
YVDD	: tyrosine, valine, aspartate, aspartate

Introduction

Malgré l'existence d'un vaccin efficace, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) représente un problème majeur de santé publique : l'OMS estime à 350 millions le nombre de porteurs chroniques dans le monde de ce virus responsable de plus d'un million de décès par an (70). En France, une étude réalisée en 2003-2004 sur 15000 sujets de 18-80 ans a estimé la séroprévalence de l'Ag HBs à 0,65%, ce qui représente environ 300 000 personnes infectées chroniquement par le VHB. La séroprévalence des anticorps anti-HBc s'élève à 7,3% et reflète le nombre de personnes qui ont été en contact avec le virus, soit à peu près 3 millions d'individus (96, 119). Dans les pays industrialisés et de faible endémie (< 2% de porteurs chroniques), les principaux modes de transmission sont la voie parentérale (toxicomanie essentiellement) et sexuelle, alors que dans les pays en voie de développement et de forte endémie (8 à 20% de porteurs chroniques), l'infection est acquise très tôt dans l'enfance par transmission verticale et évolue dans la plupart des cas vers la chronicité.

L'histoire naturelle de l'infection par le VHB est caractérisée par un grand polymorphisme clinique déterminé par la qualité de la réponse immune de l'hôte et aussi probablement par des facteurs viraux : l'infection est d'abord aiguë (parfois symptomatique), voire suraiguë (0,1 % d'hépatite fulminante) puis peut passer à la chronicité et entraîner des lésions hépatiques très variables, allant de la cytolyse anictérique à la nécrose aiguë totale du foie, en passant par toute la gamme des hépatites chroniques persistantes, bénignes ou actives, cirrhogènes, pour aboutir au cancer primitif du foie.

Le traitement de l'hépatite B chronique a longtemps reposé sur l'interféron alpha, molécule essentiellement immunomodulatrice. L'efficacité démontrée des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques sur le VHB a permis d'élargir l'arsenal thérapeutique avec de nouveaux antiviraux tels que la lamivudine ou l'adéfovir. Malheureusement, la pression de sélection exercée par ces molécules a conduit à l'émergence de souches résistantes caractérisées par la présence de mutations au niveau de la polymérase virale.

La détection génotypique de la résistance à la lamivudine ou à l'adéfovir peut précéder de plusieurs mois son expression phénotypique qui s'accompagne de l'élévation de l'ADN viral et parfois des transaminases, et voire de l'apparition de symptômes cliniques (62, 79). L'avènement de la biologie moléculaire a permis le développement de nombreuses techniques de génotypage qui diffèrent notamment par leur sensibilité. Une hypothèse vraisemblable suggère que le variant du VHB responsable de la résistance pourrait se trouver initialement minoritaire au sein de la population virale hétérogène de l'individu infecté pour finalement devenir majoritaire et être responsable de l'échec thérapeutique (105). Des techniques

sensibles de génotypage sont nécessaires pour détecter de manière la plus précoce possible l'émergence du variant de résistance.

Ce travail présente la mise au point d'une technique de PCR sélective en temps réel pour étudier la détection et la quantification des variants de résistance du VHB à la lamivudine et à l'adéfovir. Cette méthode de génotypage sera validée par l'utilisation de plasmides construits au laboratoire puis comparée à 2 autres techniques de référence : le séquençage direct et une technique commerciale d'hybridation inverse. La technique ainsi caractérisée a ensuite été utilisée pour analyser des sérums de patients atteints d'hépatite B chronique traités par lamivudine et/ou adéfovir et suivis dans le service d'Hépatogastro-Entérologie du CHU de Grenoble. La dynamique d'émergence du variant de résistance a pu être étudiée chez le patient ainsi que sa disparition après arrêt de la pression de sélection exercée par le traitement.

Données Bibliographiques

1. Biologie du virus de l'hépatite B

1. Historique

En 1963, un nouvel antigène (dit antigène Australia) est détecté dans le sérum d'un aborigène australien par Blumberg qui étudiait le polymorphisme des glycoprotéines humaines (6, 10). Son équipe, avec celle de Prince, montrent que cet antigène est un marqueur d'une hépatite virale post-transfusionnelle, dite hépatite B appelée aussi, en 1947 par Mc Callum, hépatite sérique à incubation longue, par opposition à l'hépatite épidémique A à incubation courte. Dane, en 1970, décrit la morphologie en microscopie électronique de cet antigène (28) dont on sait qu'il correspond aujourd'hui à l'antigène de surface ou d'enveloppe du virus (Ag HBs). En 1976, l'équipe de Maupas, de Tours, publie les premiers résultats d'une vaccination contre le virus de l'hépatite B en utilisant comme source vaccinale l'antigène Australia purifié et inactivé par le formol à partir de plasmas de porteurs chroniques (95). En 1986, le premier vaccin mondial obtenu par génie génétique et commercialisé est un vaccin contre l'hépatite B (42).

2. Taxonomie

Le virus de l'hépatite B est un virus à ADN double brin possédant une transcriptase inverse qui fait partie de la famille des *Hepadnaviridae* (virus hépatotropes à ADN). Cette famille comprend 2 genres. Les virus infectant les mammifères sont regroupés dans le genre *Orthohepadnavirus* dont fait partie le virus de l'hépatite B humaine, ainsi que les virus des rongeurs (*Woodchuck Hepatitis B virus*, [WHB] chez la marmotte, *Ground Squirrel Hepatitis B virus*, [GSHBV] chez les écureuils). Le genre *Avihepadnavirus* rassemble les virus de l'hépatite B du canard de Pékin (*Duck Hepatitis B virus* [DHBV]) et du héron (*Heron Hepatitis B virus*, [HHVB]) (122). Nombre de connaissances sur les Hepadnavirus viennent des modèles WHB/marmotte et DHBV/canard. Les virus appartenant à cette famille infectent de préférence les hépatocytes mais de faibles quantités d'ADN viral peuvent être retrouvées au niveau des reins, du pancréas et des cellules mononucléées du sang. Cependant l'infection à ces sites n'a pas été mise en relation avec des manifestations extra-hépatiques (42, 56).

3. Structure

Le virus de l'hépatite B humaine est de culture difficile mais a pu être mis en évidence très tôt par microscopie électronique grâce à la forte concentration de particules virales dans le sérum des malades. Trois types de particule sont observés (Figure 1). La particule infectieuse ou particule de Dane a un diamètre de 44 nm. Elle est composée d'une nucléocapside icosaédrique ou core renfermant le génome et la polymérase du virus. Cette capsidite est enveloppée par une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées des glycoprotéines de surfaces virales possédant toutes la même spécificité antigénique (antigène de surface HBs). Dans le sérum se trouvent aussi, souvent en large excès, des particules d'enveloppes vides qui peuvent prendre une forme sphérique de 22 nm de diamètre ou une forme en bâtonnets de même diamètre mais de longueur variable (50 à 250 nm). Ces enveloppes vides sont essentiellement constituées de lipides et de l'Ag HBs et peuvent être 1000 à 10 000 fois plus nombreuses que les virions infectieux (42).

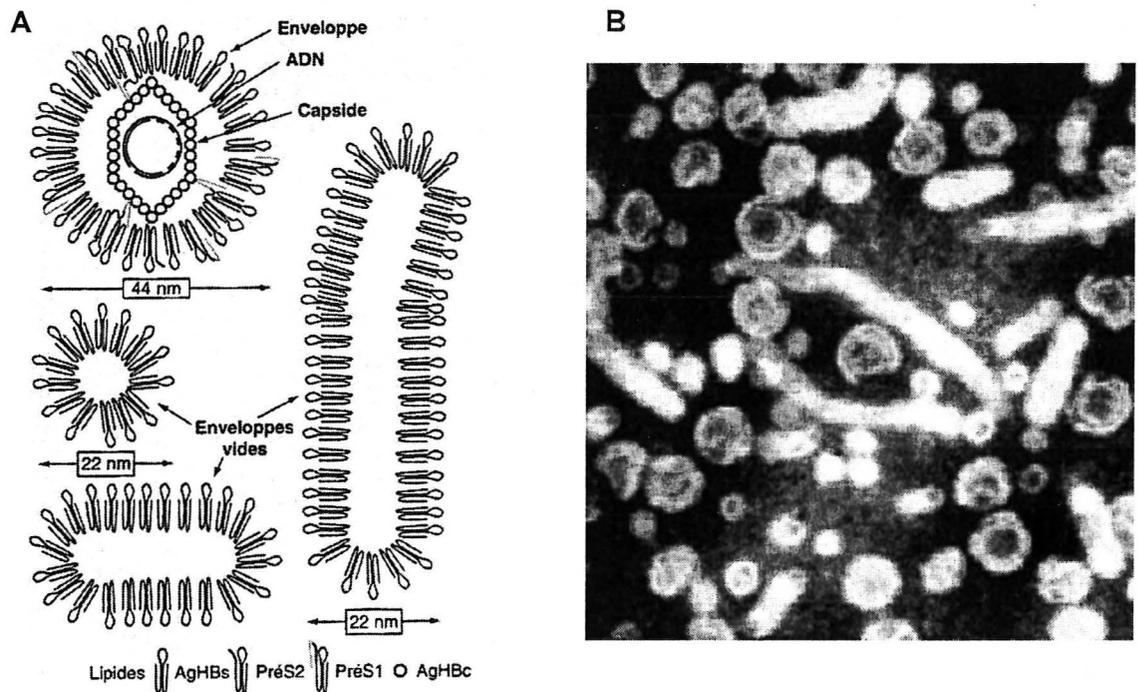


Figure 1 : A. Représentation schématique des particules virales infectieuses et non infectieuses (l'enveloppe est constituée de l'Ag HBs et des protéines pré-S1 et pré-S2, la capsidite de l'Ag HBc) (33). B. Image en microscopie électronique des particules virales (42) (particules infectieuses, sphères, filaments).

4. Organisation du génome viral

Le génome du VHB est constitué par un ADN circulaire, partiellement double brin (un brin - complet et un brin + incomplet), non fermé de manière covalente et de 3200 nucléotides ce qui représente le plus petit génome connu d'un virus animal à ADN (Figure 2). Le brin + chevauche les extrémités du brin -, assurant la circularité du génome. Le brin - est rattaché à son extrémité 5' à une partie de la polymérase virale.

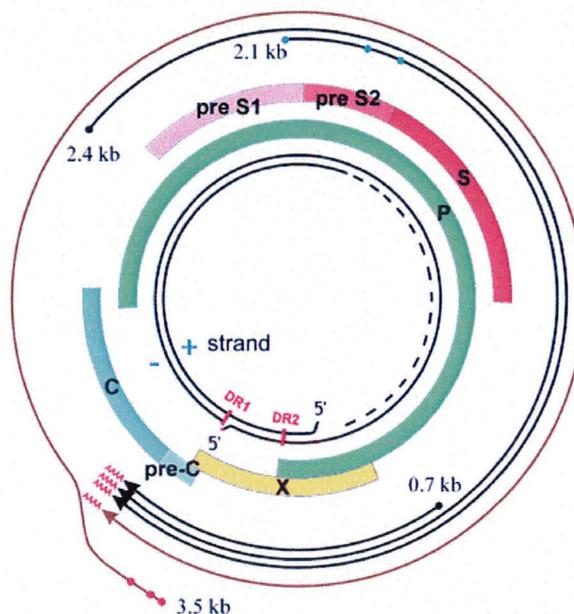


Figure 2 : Organisation du génome viral du virus de l'hépatite B (56). L'ADN peut être appelé ADN circulaire relâché ou ADN RC.

Le génome du VHB possède 4 cadres de lecture ouverts, codant respectivement les protéines de surface (gène pré-S1, pré-S2 et S), les protéines de core ou capsid (gène pré-core ou pré-C et C), l'enzyme de réplication ou polymérase (gène P) et une protéine transactivatrice de la transcription (gène X) soupçonnée d'être impliquée dans l'hépatocarcinogénèse. Les ARN messagers correspondant à ces gènes sont de taille variable, comprise entre 700 et 3500 nucléotides, avec un chevauchement des différents cadres de lecture.

5. Protéines virales

5.1 La polymérase virale

La polymérase virale (Pol) est une protéine d'environ 850 acides aminés qui possède à la fois une activité transcriptase inverse ARN-dépendante et une activité polymérase ADN-dépendante. Elle est constituée de 4 domaines protéiques (Figure 3) :

- le domaine N- terminal ou protéine terminale (TP) (résidus 1 à 177 environ), est lié à la partie 5' du brin – et sert d'amorce à l'initiation de la synthèse de ce brin négatif.
- le domaine « espaceur » ou « charnière » (résidus 178 à 346 environ) qui assure la flexibilité de la polymérase.
- le domaine transcriptase inverse /ADN polymérase (résidus 347 à 690 environ) qui possède certaines homologues de séquence avec les transcriptases inverses des rétrovirus et partage avec ces dernières le même site catalytique : le motif YMDD (tyrosine, méthionine, aspartate, aspartate). La transcriptase inverse (RT) comporte différents domaines (A-E) impliqués dans l'activité enzymatique. La polymérase virale ne possède pas d'activité correctrice (3', 5'-exonucléase) permettant l'excision des bases mal incorporées (activité « proofreading ». Ce phénomène est à l'origine de la grande variabilité du génome.
- le domaine RNase H (résidus 691 à 843 environ) qui possède une activité enzymatique capable de digérer l'ARN qui se trouve dans une hélice mixte ARN/ADN.

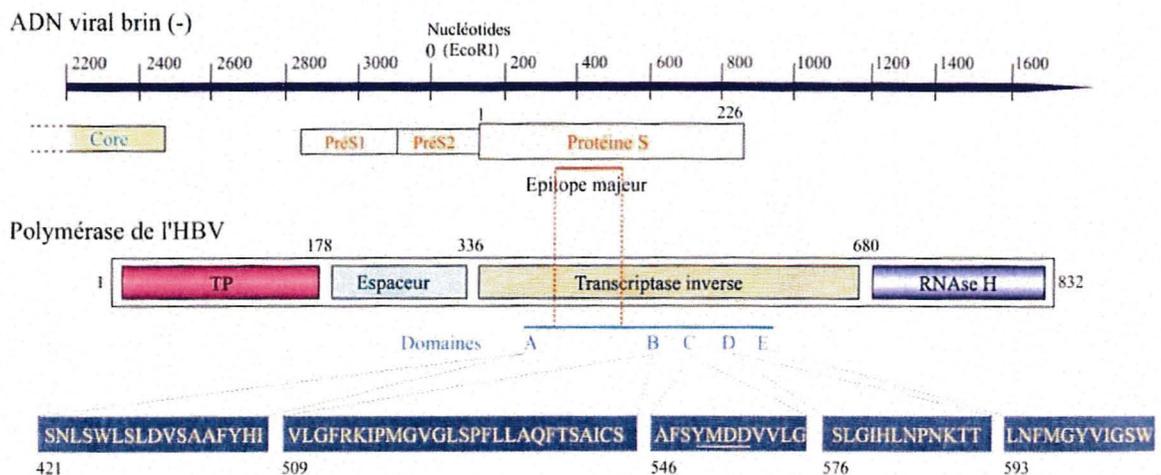


Figure 3 : Représentation schématique de la polymérase du VHB (32). Plus d'un tiers du génome code pour la polymérase et à cause du chevauchement des cadres de lecture, code également pour d'autres protéines telles que les protéines de l'enveloppe (S, pré-S1, pré-S2).

5.2 L'antigène HBc et l'antigène HBe (Ag HBc et Ag HBe)

Les antigènes HBc et HBe sont codés par le cadre de lecture C. L'Ag HBc forme la capsid du virus : c'est une protéine de 183-185 acides aminés de poids moléculaire apparent de 22 kDa. Elle contient des sites de localisation nucléaire, ce qui permet de diriger l'ADN viral vers le noyau lors de l'infection d'un hépatocyte. L'Ag HBc est très immunogène. L'anticorps anti-HBc persiste très longtemps, même après résolution de l'infection. Les anti-HBc ne sont pas neutralisants et leur présence peut donc être le signe d'une infection ancienne résolue, d'une infection aiguë en cours ou d'une infection chronique.

L'Ag HBe est d'abord synthétisé comme une protéine de 25 kDa, comprenant en N-terminal 29 acides aminés codés par la région pré-C, suivi des 183-185 acides aminés de l'Ag HBc. La partie codée par la région pré-C est très hydrophobe et constitue un peptide signal, ciblant l'Ag HBe naissant vers le réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion (97). La protéine de 25 kDa est maturée par l'élimination de la queue basique de la partie HBc et clivage du peptide signal, ce qui aboutit à la sécrétion de l'Ag HBe, protéine de 17 kDa (Figure 4). L'Ag HBe n'est pas essentiel pour le cycle réplcatif du VHB. Il sert plutôt de leurre, protégeant les cellules infectées qui peuvent exprimer des déterminants d'HBc exposés à la surface. L'Ag HBe est utilisé en clinique comme marqueur de réplcation virale et de réponse au traitement (97). La séroconversion vers un état anti-HBe marque, en général, la fin de la réplcation et le début de la résolution de l'hépatite, excepté la survenue d'une mutation pré-core (cf chapitre 8.2.1) ou la possibilité d'une séroréversion.

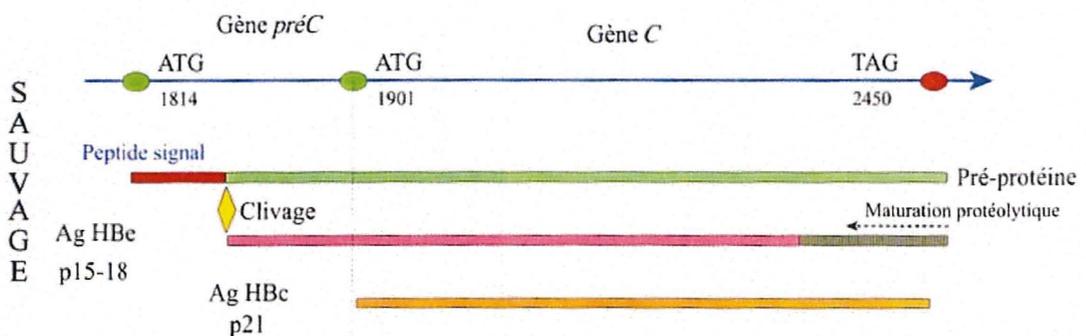


Figure 4 : Structure du gène codant pour les protéines HBc et HBe. Le virus sauvage produit les 2 protéines. La maturation de HBe conduit à l'élimination du peptide signal et de la queue basique commune à HBc (32).

5.3 Les protéines pré-S1, pré-S2 et Ag HBs

Les protéines pré-S1, pré-S2 et Ag HBs sont codées par le cadre de lecture S et elles forment, avec une bicouche lipidique d'origine cellulaire, l'enveloppe des particules virales. L'Ag HBs est le constituant majeur de l'enveloppe. Après l'infection aiguë, la persistance de l'Ag HBs circulant pendant plus de 6 mois est le signe que l'infection évolue vers la chronicité. L'Ag HBs est le constituant principal du vaccin anti-VHB. L'Ag HBs est invariablement de 226 acides aminés. La protéine est formée de 4 régions hydrophobes capables de former des hélices transmembranaires. Les extrémités N- et C-terminales sont exposées à la surface de la particule virale ainsi qu'une région hydrophile majeure (RHM, résidus 100 à 170 environ). Le déterminant « a » (résidus 124 à 147) se trouve dans cette région et est la cible majeure des anticorps anti-HBs neutralisants induits par la vaccination. Au moins une partie de la RHM participe probablement à la reconnaissance des hépatocytes par les virions (122).

La protéine pré-S2 contient toute la séquence de l'Ag HBs additionnée en N-terminal de 55 acides aminés supplémentaires. Elle n'est pas essentielle pour la morphogénèse des particules virales.

La protéine pré-S1 est de longueur variable et contient 100 à 120 acides aminés supplémentaires par rapport à la protéine pré-S2. La protéine pré-S1 est essentielle pour la formation des particules virales infectieuses mais absente des particules d'enveloppes vides : sa détection dans le sérum est un bon indicateur du niveau de particules infectieuses circulantes. Sa partie N-terminale participe à la reconnaissance des hépatocytes par les virions (122).

5.4 L'antigène HBx

L'Ag HBx est une petite protéine de 154 acides aminés, codée par le cadre de lecture X. L'Ag HBx est instable avec une demi-vie très courte. Son existence a été démontrée par la présence d'anticorps anti-HBx chez de nombreux malades. Son rôle n'est pas clairement compris. Des expériences avec le virus de l'hépatite B de la marmotte ont montré que les particules de WHV mutant n'exprimant pas l'Ag HBx ne sont pas infectieuses. L'Ag HBx est un transactivateur de la transcription soupçonné d'être impliqué dans le développement des cancers du foie chez les patients chroniquement infectés (122).

6. Les séquences régulatrices

Le promoteur core régule la transcription de 2 ARN de 3,5 kb. Le premier transcrit sert d'ARNm pour la protéine pré-C et est initié en amont du codon ATG initiateur pour cette protéine. Le deuxième transcrit appelé ARN pré-génomique (ARNpg) est initié en aval de l'ATG initiateur pré-C et sert d'ARNm pour l'Ag HBc et pour la polymérase, et aussi comme matrice pour la synthèse de l'ADN de brin - du génome viral. Les 2 ARN sont plus longs que le génome. En effet, le signal de polyadénylation unique du VHB se trouve dans le gène C, au début des 2 transcrits mais il n'est reconnu qu'au deuxième passage. Les 2 transcrits possèdent donc une redondance terminale. Le promoteur core est constitué d'un noyau appelé promoteur basal du core (PBC). Le PBC contient un site de liaison pour un facteur spécifique du foie capable par lui-même d'initier la transcription des ARN pré-C et pré-génomique (86).

D'autres promoteurs sont présents pour réguler la transcription des ARNm des protéines de l'enveloppe (promoteur pré-S1 et promoteur S) ou de l'Ag HBx (promoteur X) et sont également sous la dépendance de facteurs de transcription.

Comme les rétrovirus, les hepadnavirus possèdent un signal pour l'encapsidation de l'ARN pré-génomique (ϵ). Ce signal peut adopter une structure en tige-boucle (Figure 5). Il existe deux répétitions directes (DR1 et DR2) qui sont impliquées dans la réplication virale. DR1 se trouve immédiatement en 5' du signal d'encapsidation. DR1 et ϵ sont situés entre le site d'initiation et le signal de polyadénylation de l'ARNpg. Ils sont donc présents deux fois aux extrémités 5' et 3' (redondance terminale) (86).

7. Le cycle original de la réplication virale

La réplication virale a pu être étudiée grâce au modèle DHBV/canard (Figure 6). L'absence de système d'infection *in vitro* adapté explique que les premiers événements soient encore en cours d'étude. Le virus circulant du sang s'attache à un hépatocyte par des interactions entre les protéines de l'enveloppe et des corécepteurs cellulaires mal connus. Ensuite, une probable fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire libère la nucléocapside dans le cytoplasme. Après décapsidation dans le cytoplasme, le génome pénètre dans le noyau de la cellule. Le brin positif est complété, ce qui donne naissance à un ADN bicaténaire circulaire fermé de manière covalente et super-enroulé, appelé ADNccc (*covalently closed circular*). L'ADNccc est extrêmement stable et est à l'origine du portage

chronique et des phénomènes de réactivation. Il sert de matrice pour la transcription des ARN viraux. Après transport des ARN vers le cytoplasme, les différentes protéines virales sont synthétisées. L'ARNpg est le messenger pour la synthèse de l'HbC et de la polymérase. Le domaine Protéine Terminal (TP) est le premier à être traduit et reconnaît le signal d'encapsidation en 5' pendant la synthèse des autres domaines. Un complexe ARNpg/polymérase est encapsidé dans une structure icosaédrique formée par l'Ag HbC. La polymérase amorce alors la synthèse du brin - de l'ADN (activité reverse transcriptase) par la polymérisation d'une molécule de dGTP avec le résidu tyrosine 65 du domaine TP puis par l'addition de deux dATP supplémentaires en utilisant la boucle intérieure du signal d'encapsidation comme matrice (Figure 5).

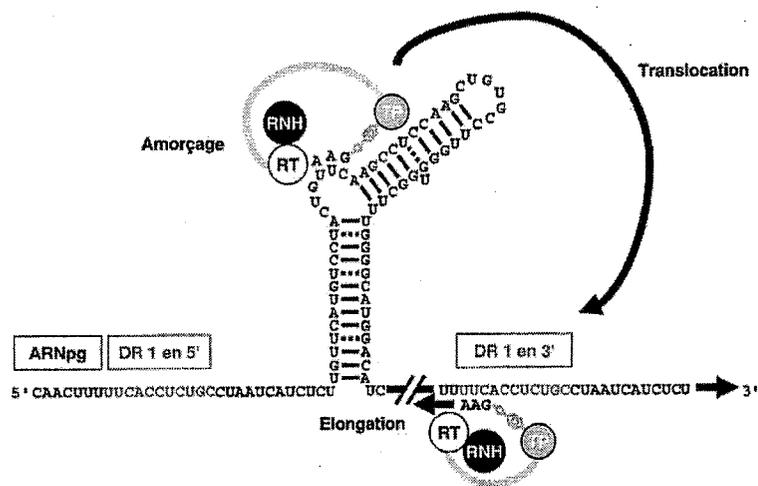


Figure 5 : Amorçage de la synthèse du brin moins d'ADN (33).

L'évènement suivant est une translocation de la polymérase et de la chaîne d'ADN naissante au niveau DR1 en 3' de l'ARNpg. Les trois nucléotides sont complémentaires de la séquence en DR1 et peuvent s'hybrider, permettant à la Pol de continuer la transcription inverse de l'ARNpg en ADN brin moins. Le domaine RNase H dégrade l'ARNpg qui a été répliqué au fur et à mesure que la Pol avance jusqu'à son extrémité 5' (122). Ensuite, la synthèse du brin + est réalisée à partir du brin - pour produire l'ADN circulaire relâché (ADN RC). Cet ADN RC peut être recyclé vers le noyau pour amplifier le stock d'ADNccc ou bien la nuclécapside peut être maturée en préparation de la sécrétion. La nuclécapside maturée acquière les protéines d'enveloppe, préalablement synthétisées, au niveau du réticulum endoplasmique, puis le virion est libéré de la cellule par bourgeonnement, sans la lyser, pour infecter de nouveaux hépatocytes. Le génome viral peut aussi se retrouver sous forme intégrée

dans l'ADN de l'hépatocyte après recombinaison à partir d'un ADN double brin. Cet ADN viral intégré ne sert pas de matrice pour la production d'ARNpg. La présence de cet ADN étranger dans la cellule de l'hôte pourrait favoriser le développement d'un hépatocarcinome (153).

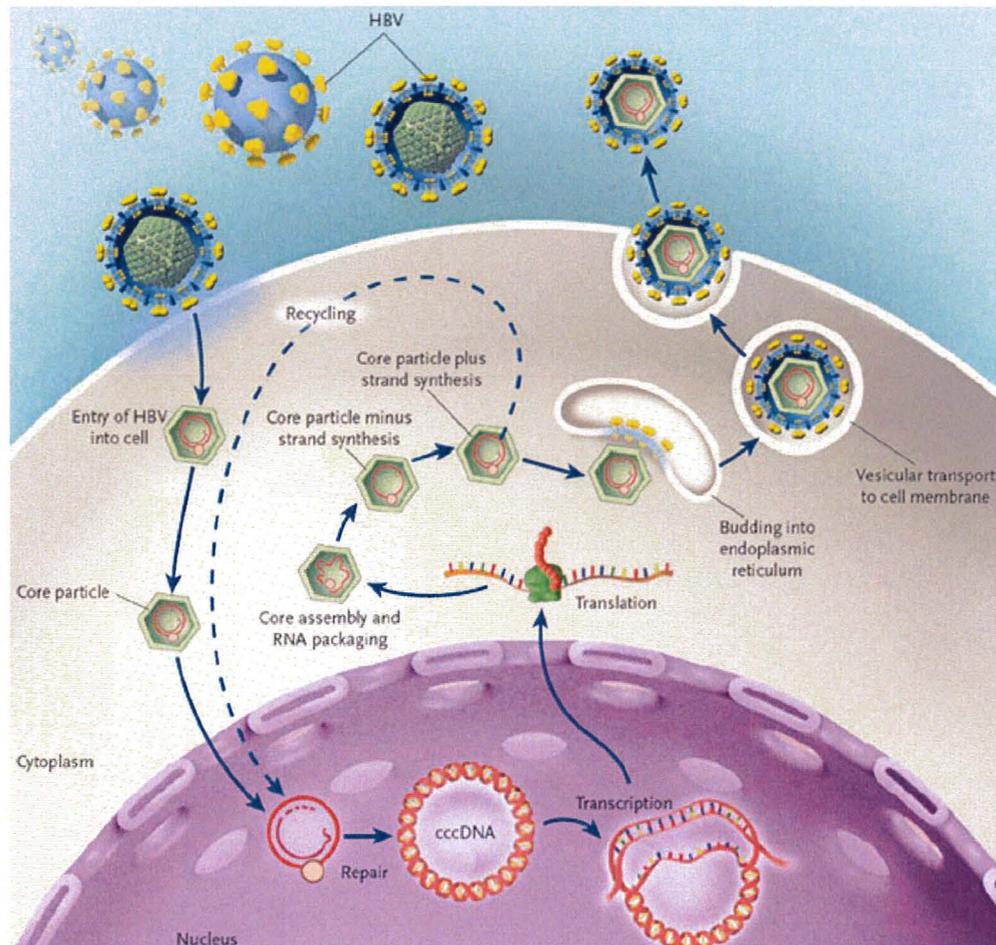


Figure 6 : Représentation simplifiée du cycle de réplication virale du VHB (42).

8. Variabilité du génome

La production quotidienne de virus est de l'ordre de 10^{11} virions. Le taux d'erreur de la RT, estimé à 10^{-4} par base et par cycle de réplication, entraîne une mauvaise incorporation de 10^{10} paires de bases par jour. Le VHB circule chez un malade infecté sous la forme d'un mélange complexe et instable de variants viraux génétiquement distincts, quoique apparentés, définissant une distribution en quasi-espèces. La sélection des particules virales les mieux adaptées se fait sur la base de leur capacité intrinsèque de réplication (« fitness ») et sous

l'action de fortes pressions de sélection exercées par le système immunitaire de l'hôte ou du traitement reçu par le malade.

8.1 La variabilité géotypique

La classification des souches était réalisée dans le passé par sérotypage dans un but essentiellement épidémiologique. Trois déterminants antigéniques majeurs ont été établis. Le déterminant « a » est commun à presque toutes les souches de VHB et est composé d'épitopes immunodominants situés entre les résidus 124 et 147 de l'Ag HBs. Deux autres déterminants « d/y » et « r/w » permettent d'établir des sous-types de l'Ag HBs en fonction de la nature des résidus aux positions 122 et 160. D'autres déterminants mineurs localisés à d'autres positions ont été trouvés pour aboutir à une classification en 9 sous-types (38, 86).

Avec l'évolution des techniques de biologie moléculaire et l'analyse des séquences du génome entier du virus, les souches ont été classées en différents géotypes. La variabilité géotypique est stable et reflète l'évolution des Hepadnavirus. Le géotype prend en compte la totalité du patrimoine génétique du VHB. Un nouveau géotype est défini par une séquence qui diffère de celles des autres géotypes connus par au moins 8%. Huit géotypes sont connus à ce jour (A à H) et ont une répartition géographique particulière (Tableau I). En Europe par exemple, prédominent les géotypes D et A, alors qu'en Asie les géotypes C et D sont les plus nombreux (9).

Géotype	Sérotype	Distribution géographique
A	adw2, ayw1	Europe Nord, Amérique Nord, Afrique subsaharienne
B	adw2, ayw1	Asie du Sud-Est, Chine, Japon
C	adr, ayr, adr _q -, adw2, adr _q +	Asie du Sud-Est, Chine, Corée, Japon, Polynésie, Australie
D	ayw2,3 et 4	Bassin méditerranéen, Inde, Moyen Orient
E	ayw4, adw2	Afrique Centrale
F	adw4q-, adw2, ayw4	Amérique du Sud, Amérique Centrale, Polynésie
G	adw2	France, Etats-Unis
H	adw4	Amérique Centrale



Tableau I : Caractéristiques moléculaires et sérotypiques des différents géotypes du VHB et leur répartition géographique (figure à droite) (9).

La relation entre sérotype et génotype n'est pas directe mais certaines associations sont plus fréquemment retrouvées (Tableau I). De récentes études phylogénétiques ont montré que les génotypes pouvaient être séparés en sous-groupes de génotypes (variabilité < 8%) avec des origines ethniques et géographiques distinctes. Ainsi le génotype A peut être divisé en sous-groupe Aa (Afrique et Asie) et Ae (Europe et Etats-Unis). Le génotype B comprend le sous-groupe Ba (Asie) qui montre une recombinaison avec la région précore/core du génotype C et le sous-groupe Bj (Japon) qui n'a pas subi de recombinaison. De même le génotype C a été divisé en sous-groupe C1 (Asie du Sud-est) et C2 (Asie de l'Est), et le génotype F en sous-groupe F1 (Amérique Centrale) et F2 (Amérique du Sud) (38, 119).

Plusieurs études ont montré que le génotype viral pouvait influencer la sévérité de la maladie (B et A ayant une meilleure évolution que C et D) ou la réponse au traitement par l'IFN- α (20, 51).

8.2 La variabilité phénotypique

8.2.1 Les variants émergeant sous une pression immunologique

Les mutations affectent surtout les gènes C et S qui codent les protéines les plus exposées au système immunitaire ou qui sont cibles de la vaccination.

8.2.1.1 Les mutants affectant l'Ag HBs

Ces mutants sont souvent appelés « mutants d'échappement à la vaccination ». Ils ont été mis en évidence d'une part chez la population vaccinée, et surtout chez des enfants nés de mères VHB positives dans les pays de forte endémie. D'autre part, ils ont été retrouvés chez les patients transplantés hépatiques recevant une prophylaxie par des immunoglobulines spécifiques anti-HBs pour éviter la récurrence de l'infection du greffon par le VHB. Le plus souvent, le mutant incriminé porte la mutation G145R ce qui modifie le déterminant antigénique de la protéine S. D'autres variants de l'Ag HBs ont été décrits parmi la population vaccinée mais sont souvent trouvés en association avec le mutant G145R (38). Ces variants sont peu fréquents mais posent le problème de la formulation future des vaccins, avec incorporation éventuelle d'Ag HBs mutés en position 145. La modification du déterminant antigénique peut aussi remettre en question les tests de détection en laboratoire de l'Ag HBs reposant sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (139).

A ont une double mutation C1858T et G1896A ce qui représente un évènement moins probable qu'une mutation ponctuelle.

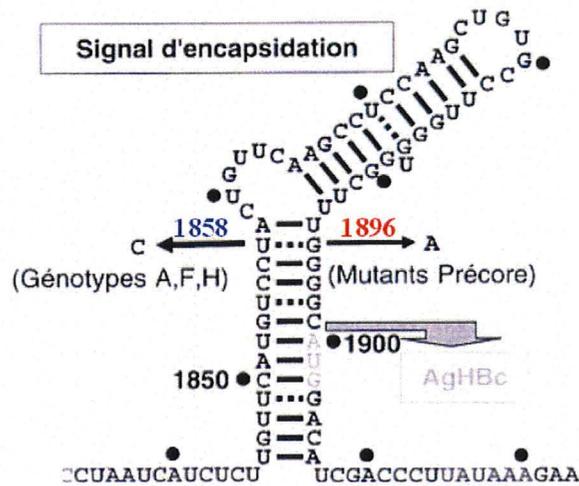


Figure 8 : Représentation schématique de la structure secondaire du signal d'encapsidation. La mutation précore G1896A est plus fréquente pour les génotypes B-E et G (appariement U-A) que pour les génotypes A, F et H pour lesquels une seconde mutation C1858T est nécessaire (33).

Les mutants précore sont donc plus nombreux dans le bassin méditerranéen, en Russie et en Asie (génotypes D, B et C) (Tableau I et II). La mutation précore semble délétère pour la réplication virale : la charge virale d'un patient Ag HBe négatif est 10 à 100 fois moindre que celle d'un patient Ag HBe positif, mais les conséquences des infections Ag HBe – sont toutes aussi néfastes que les infections chroniques Ag HBe + (97).

8.2.1.4 Mutants du promoteur core (PBC)

Le promoteur core contrôle la transcription des ARN précore et prégénomique. La double mutation A1762T et G1764A a pour effet de diminuer l'expression de l'Ag HBe mais d'augmenter la production virale in vitro (86). Le génotype peut aussi influencer sur le type de mutation affectant l'expression de l'Ag HBe. Cependant, un même isolat peut comporter à la fois des mutations BCP et des mutations précore (9) (Tableau II).

Les mutations du BCP sont associées à un risque plus important pour le malade de développer un hépatocarcinome (53, 78).

Génotype	Génome (nt)	Fréquence de mutations retrouvées	
		Précocore G1896A	BCP A1762T/G1764A
A	3221	6,5% (C1858)	45%
B	3215	50% (T1858)	16%
C	3215	50% (T1858) (C1858)	58%
D	3182	43% (T1858)	12%
E	3212	27%	7%
F	3215	16% (C1858) 65% (T1858)	ND
G	3248	100%	ND
H	3215	ND (C1858)	ND

Tableau II : Fréquence des mutations précocore et du promoteur BCP retrouvées en fonction du génotype. La nature du nucléotide en position 1858 influence la fréquence de la mutation précocore et est indiquée entre parenthèse. Les génotypes C et F possèdent à la fois des souches T1858 et C1858. ND =Non Décrit (9).

8.2.2 Mutants de résistance aux traitements anti-polymérase.

La pression de sélection exercée par les analogues nucléosidiques ou nucléotidiques entraîne l'émergence de mutants résistants au traitement, caractérisés par la présence de mutations au niveau de la polymérase virale, site d'action de ces antiviraux. Ce problème sera développé ultérieurement dans le chapitre 4.

2. Diagnostic biologique du VHB

1. Diagnostic immunologique du VHB par la recherche des antigènes et des anticorps

Les principaux marqueurs sériques utilisés pour le diagnostic sont représentés par 3 systèmes principaux : Ag HBs et Ac anti-HBs, Ac anti-HBc, Ag HBe et Ac anti-HBe. Ces marqueurs sont mis en évidence par des techniques immuno-enzymatiques (Microparticle Enzyme Immunoassay, MEIA).

1.1 Cinétique des marqueurs au cours des hépatites aiguës

Dans la grande majorité des cas, l'hépatite aiguë est inapparente et évolue vers la guérison. Après un délai de 1 à 3 mois suivant le contage, l'Ag HBs est le premier marqueur, avec l'ADN VHB, à être détectable dans le sérum. Cette présence précède parfois de 2 à 4 semaines les signes biologiques (élévation des transaminases) ou cliniques (ictère). L'Ag HBs persiste généralement 1 à 2 mois, disparaissant plusieurs semaines après normalisation des transaminases. Les Ac anti-HBc apparaissent 2 à 4 semaines après l'Ag HBs. Leur présence révèle une réponse de l'organisme à l'infection et persiste durant toute la vie de l'individu. Les IgM anti-HBc apparaissent durant la primo-infection et peuvent être détectées dans 70% des cas jusqu'à un an. La présence de l'Ag HBe signe la réplication virale. Il disparaît avant l'Ag HBs.

L'évolution favorable est annoncée par la normalisation des transaminases, par la disparition de l'Ag HBs et de l'Ag HBe, enfin par l'apparition successive des anticorps anti-HBe et anti-HBs (16).

Dans de rares cas (0,1% à 1% des formes aiguës), l'hépatite aiguë se présente sous la forme d'une hépatite fulminante. L'hépatite fulminante peut survenir lors du stade aigu de l'infection par le VHB, et plus fréquemment en cas de co-infection avec le virus de l'hépatite delta (VHD), ou chez des porteurs chroniques après réactivation spontanée ou chimio-induite, ou lors d'une surinfection par le VHD. Dans les hépatites fulminantes survenant dans le contexte d'hépatite aiguë, la présence d'IgM anti-HBc est quasi constante. En revanche, les Ag HBs, les Ac anti-HBs et l'ADN du VHB ne sont pas constamment trouvés.

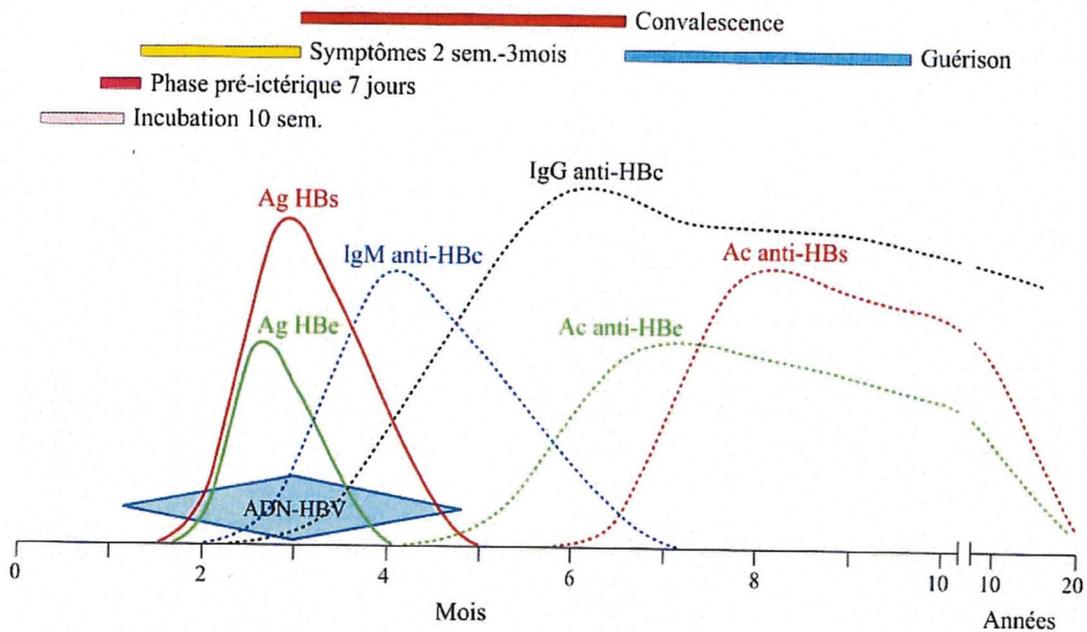


Figure 9 : Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au décours d'une hépatite B aiguë. La possibilité d'une fenêtre sérologique entre la disparition de l'Ag HBs et l'apparition des anticorps anti-HBs oblige à rechercher les IgM anti-HBc pour le diagnostic d'infection aiguë (32).

1.2 Cinétique des marqueurs lors de l'infection chronique

La plupart des hépatites aiguës sont spontanément résolutes avec apparition de marqueurs de guérison. Certaines évoluent vers la chronicité (5-10% des adultes infectés). L'hépatite chronique est définie par la persistance de l'Ag HBs au delà d'une durée de 6 mois.

Les profils sérologiques montrent alors une persistance de l'Ag HBs, de l'Ag HBe (exception faite d'un mutant précore) et des Ac anti-HBc. Parallèlement, les transaminases demeurent anormalement élevées. Après quelques années de portage chronique du VHB, le système immunitaire de l'individu peut sélectionner des mutants précore qui ont perdu la capacité à produire l'Ag HBe.

Occasionnellement dans 5 à 10 % des cas (42), l'Ag HBe peut disparaître, phénomène suivi de l'apparition d'Ac anti-HBe : c'est la première séroconversion (ou séroconversion « e ») du porteur chronique. Elle ne s'accompagne pas toujours de la disparition de l'ADN viral circulant (cf mutants précore). Une seconde séroconversion (séroconversion « s ») peut intervenir toutefois après plusieurs années chez 0,5 à 1% des porteurs chroniques avec disparition de l'Ag HBs, voire même la détection d'Ac anti-HBs à des titres faibles (148).

Chez ces patients, les IgG anti-HBc persistent quasi indéfiniment. Les profils de sérologie les plus communs sont représentés dans le tableau III.

Le portage chronique de l'Ag HBs évolue parfois de manière asymptomatique et une définition du portage inactif (ou portage sain) inclut la notion de transaminases normales à plusieurs reprises, la présence d'Ac anti-HBe sans Ag HBe, une réplication virale $< 10^{4-5}$ copies/ml et l'absence de lésions histologiques. Des réactivations virales sont néanmoins possibles chez les sujets répondant à cette définition avec parfois la réapparition d'IgM anti-HBc et l'émergence de mutants précoces (16). La présence des marqueurs de réplication virale, Ag HBe ou ADN viral, coïncide généralement avec les signes biochimiques et histologiques d'une réplication virale active.

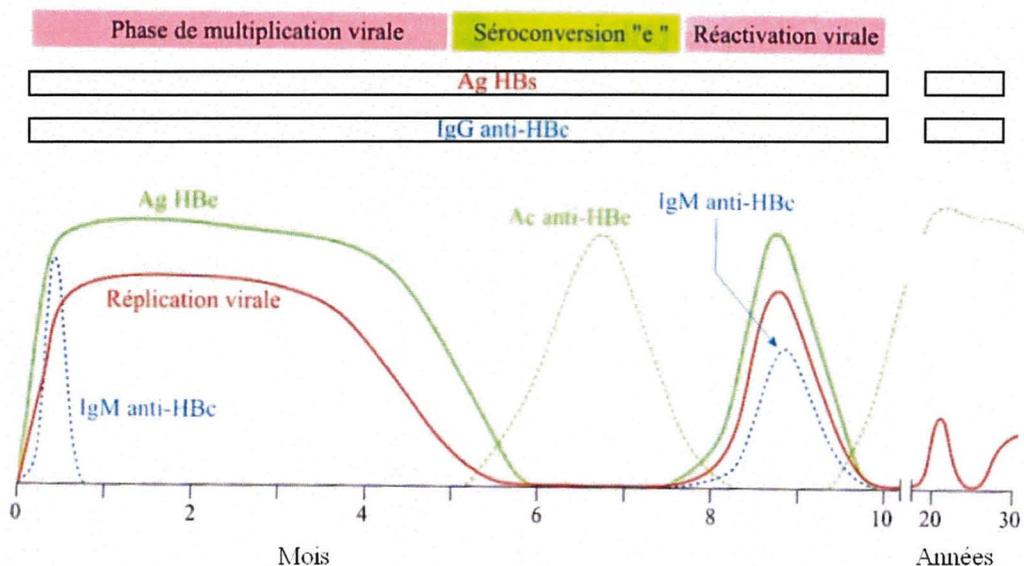


Figure 10 : Cinétique des marqueurs virologiques dans le sérum au cours d'une hépatite B chronique. L'hépatite B chronique est définie par la persistance au delà de 6 mois de l'Ag HBs (32).

1.3 Profils sérologiques particuliers

1.3.1 Mutants précoces

Les mutants précoces sont rencontrés soit en phase aiguë lorsque le variant est transmis lors de la contamination, soit en phase chronique après sélection naturelle d'un variant précoce. L'Ag HBe n'étant pas synthétisé, le seul marqueur de réplication virale est l'ADN VHB qui permet de différencier un portage chronique sans réplication virale et une séroconversion anti-

HBe, d'une infection chronique par un virus mutant pré-C qui se réplique (cf mutants précore au paragraphe 8.2.1.3 page 26).

1.3.2 Mutants « s »

Des mutations au niveau du déterminant « a » de l'enveloppe du virus peuvent mettre à défaut certains tests commercialisés pour la détection de l'Ag HBs (cf mutants affectant l'Ag HBs au chapitre 8.2.1).

1.3.3 IgM anti-HBc

Leur présence ne signe pas toujours une infection aiguë car dans de nombreux cas de réactivation virale au cours de l'infection chronique, ce marqueur sérologique est également présent.

1.3.4 Hépatites B occultes

Les hépatites B occultes sont définies par la détection de l'ADN du VHB en l'absence d'Ag HBs dans le sérum des patients. L'absence de détection des antigènes HBs est selon les cas due à un faible taux d'expression des antigènes viraux, parfois à des mutations localisées dans le déterminant antigénique de l'Ag HBs. Ces hépatites B occultes impliquent la recherche de l'ADN du VHB par des techniques très sensibles.

1.3.5 Sujets vaccinés

Les sujets vaccinés répondeurs fabriquent des Ac anti-HBs, les taux supérieurs à 10 UI/ml étant considérés comme protecteurs. Chez un sujet ayant correctement répondu à la vaccination, l'infection par le VHB n'entraîne en général aucune modification du profil sérologique. Néanmoins, elle peut toutefois provoquer une montée du titre des Ac anti-HBs, ou alors, après une phase d'antigénémie HBs transitoire, entraîner l'apparition d'Ac anti-HBc (33). D'autre part, il est possible de détecter dans les jours qui suivent la vaccination, et de manière temporaire, de l'Ag HBs vaccinal.

1.3.6 Patients recevant des immunoglobulines

Les patients recevant des immunoglobulines spécifiques (anti-HBs) ou polyvalentes peuvent présenter de manière transitoire des Ac anti-HBs.

	Marqueurs sérologiques						ADN
	Ag HBs	Ac anti-HBs	Ag HBe	Ac anti-HBe	Ac anti-HBc		
					IgG	IgM	
Hépatite aiguë	+	-	+	-	+	+	+
Hépatite guérie	-	+/-	-	+/-	+	-	-
Hépatite chronique							
Porteur inactif	+	-	-	+	+	-	-
Séroconversion « e »	+	-	-	+	+	-	-
Mutant précocore	+	-	-	+	+	-	+
Réactivation	+	-	+	-	+	+/-	+

Tableau III: Profils sérologiques les plus couramment rencontrés dans l'infection au VHB.

2. Quantification de l'ADN du VHB

Bien que non utilisée en pratique courante, la mise en évidence du virus (particule de Dane) et de ses antigènes d'enveloppe est relativement aisée dans le sérum par microscopie électronique ou immuno-microscopie électronique. Les concentrations maximales retrouvées dans le sérum atteignent 10^{14} /ml pour les billes/bâtonnets et 10^9 pour les nucléocapsides.

La quantification de l'ADN du VHB dans le sang, ou charge virale VHB, est le meilleur marqueur de la réplication virale. Les progrès de la biologie moléculaire ont conduit au développement de techniques plus sensibles qui contribuent à améliorer la prise en charge des malades.

2.1 Cinétique de l'ADN VHB

2.1.1. Cinétique virale pendant la phase aiguë.

Lors de l'infection aiguë, le pic d'ADN viral intervient 127 ± 47 jours après l'infection : la charge virale atteint des valeurs de l'ordre de 10^{10} copies/ml. La production globale de virions est estimée à ce stade à 10^{13} par jour ou de 200 à 2000 par hépatocyte infecté (107). Pendant cette phase de réplication active du virus, en l'absence d'activité correctrice de la polymérase, les virions se diversifient en quasi-espèces, créant la variété nécessaire à l'émergence ultérieure des souches résistantes aux antiviraux.

2.1.2. Cinétique virale pendant l'infection chronique.

La charge virale demeure assez stable pendant chaque phase de l'infection chronique. La phase d'immunotolérance est associée à des charges virales $> 10^8$ copies/ml et à de faibles lésions hépatiques. Les charges virales comprises entre 10^4 et 10^8 sont généralement associées à la phase immunoactive de l'hépatite B chronique et à des lésions d'hépatite chronique active. Une virémie inférieure à 10^4 copies/ml est souvent corrélée à des lésions hépatiques minimales et correspond au portage inactif du virus (98).

2.1.3. Cinétique virale au cours du traitement

Les études décrivant la cinétique de la charge virale au cours du traitement sont peu nombreuses. Des modèles mathématiques suggèrent une élimination biphasique des particules virales pour la lamivudine et l'adéfovir: d'abord une élimination rapide avec une demi-vie ($t_{1/2}$)= 1 jour puis une élimination lente avec $t_{1/2} = 20$ jours. L'administration de lamivudine, adéfovir ou entécavir a pu être associée à un blocage de la réplication de 95%. La décroissance de la charge virale peut être différente selon les individus en raison, certainement, de facteurs immunologiques liés à l'hôte (73). La baisse de la charge virale en dessous de 10^4 ou 10^5 copies/ml est associée à une amélioration des lésions histologiques. Lors de l'utilisation d'analogues de nucléosides, il est recommandé d'obtenir les charges virales les plus basses possibles et en tout cas inférieures à 10^3 copies/ml pour limiter le risque de développement de résistance (84). Aucun consensus n'est encore établi pour déterminer quelle charge virale est à atteindre, mais l'expérience du VHC et du VIH laisse penser que le but du traitement pourrait être une indétectabilité du virus au niveau du plasma évaluée par des techniques sensibles de quantification. (98).

2.2 Les différentes techniques de quantification disponibles commercialement en France

Les techniques existantes de mesure de l'ADN VHB reposent soit sur l'hybridation moléculaire de la cible suivie d'une amplification du signal (ADN branché, capture d'hybrides) ou soit sur l'amplification de la cible (PCR quantitative, PCR en temps-réel) (108).

En pratique, la diversité des standards de quantification et des unités utilisés (mEq/ml, copies/ml, pg/ml) gêne considérablement l'interprétation des résultats obtenus avec les différentes méthodes. Récemment, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini un

standard de quantification VHB égal à 1 000 000 UI/ml. La charge virale doit maintenant s'exprimer en UI/ml et sous forme logarithmique afin d'uniformiser le rendu des résultats entre les différentes techniques (84).

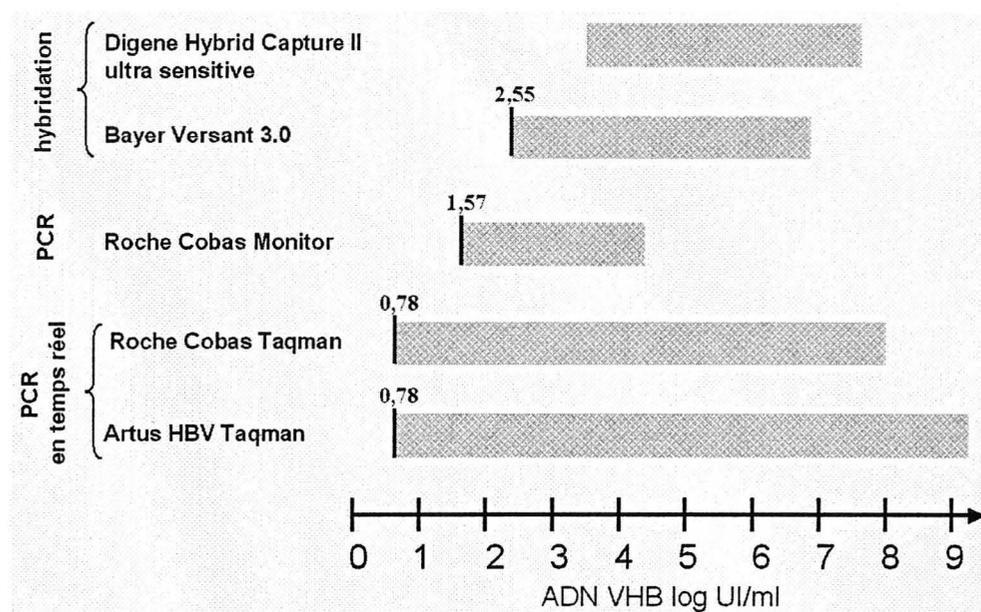


Figure 11: Sensibilité et domaine de linéarité des différentes techniques actuelles de quantification de l'ADN du VHB. La sensibilité de la technique « capture d'hybride » est de 4700 copies/ml (pas de facteur de conversion en UI/ml disponible, pas de marquage CE).

Les techniques disponibles sur le marché diffèrent entre elles par leur sensibilité et leur domaine de linéarité. Les techniques basées sur l'amplification de signal (Digen Hybrid-Capture ou Bayer Versant bDNA) ont une sensibilité moins importante que les techniques d'amplification par PCR (Roche Cobas Amplicor Monitor, Roche Cobas Taqman, Abbott-Artus Real Art). Les techniques de PCR en temps réel (Cobas Taqman et Real Art Taqman) ont une excellente sensibilité (5 à 15 UI/mL) et un domaine de linéarité très important (30 à 10^{8-9} UI/ml) ce qui permet d'éviter les dilutions pour la mesure des charges virales hautes contrairement aux techniques de PCR classique dont le domaine de linéarité est limité (Cobas Amplicor). Les techniques de PCR en temps réel nécessitent cependant une prise d'essai plus importante par rapport aux techniques moins sensibles. Grâce à leur sensibilité et leur domaine important de linéarité, les techniques de PCR en temps réel sont les techniques les plus adaptées au suivi des hépatites B. Plusieurs études ont montré leur excellente corrélation avec les tests de PCR actuels et leur excellente reproductibilité (118). Les écarts obtenus entre les techniques par hybridation et celles par amplification de cible justifient la recommandation

de suivre un patient avec une technique unique au cours du temps (84, 118). Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer la capacité à quantifier correctement les différents génotypes.

2.3 Indications de la quantification de l'ADN du VHB

2.3.1. Diagnostic de l'infection par le VHB

La quantification de l'ADN VHB n'est pas nécessaire lors de l'infection aiguë dont le diagnostic repose sur des tests sérologiques.

Dans les infections chroniques, la détermination de la charge virale permet d'évaluer la réplication virale. Chez les patients Ag HBe positifs, la quantification de l'ADN VHB ne s'impose pas (108) en raison de la présence de l'Ag HBe qui est un marqueur de réplication virale. Chez les patients Ag HBe négatifs, la charge virale permet de différencier un porteur inactif de l'Ag HBs (ADN VHB $< 10^{4-5}$ copies/ml) d'un patient en phase de réplication active (ADN VHB $> 10^{4-5}$ copies/ml). Le seuil de 10^{4-5} copies/ml a une valeur seulement indicative et l'évaluation de l'activité de l'hépatite doit prendre en compte les critères histologiques et biochimiques (107).

2.3.2. Evaluation de la sévérité de la maladie et valeur pronostique

La persistance d'une réplication virale importante est associée à un risque évolutif significatif vers la cirrhose ou le développement d'un hépatocarcinome. Ce risque est faible en l'absence de réplication virale (49, 78).

2.3.3. Traitement de l'infection par le VHB

La décision de traiter repose sur des critères histologiques, biochimiques et de charge virale. Une charge virale $> 10^5$ copies/ml est un indicateur de traitement (103, 144). Une charge virale très élevée ($> 10^{9-10}$ copies/ml) est un facteur prédictif de mauvaise réponse à l'interféron (22, 26, 110).

Le choix du traitement peut être influencé par la détermination de la charge virale. Les patients avec une charge virale faible sont susceptibles d'avoir une meilleure réponse à l'IFN- α , tandis que les patients avec une charge virale haute répondent mieux aux analogues nucléosidiques ou nucléotidiques (144).

La mesure de la charge virale permet d'évaluer l'efficacité du traitement, le suivi à long terme d'un patient ayant répondu au traitement, et de suspecter l'apparition de mutations de

résistance aux analogues nucléos(t)idiques. Ces derniers points seront développés dans les chapitres 3 et 4 concernant le traitement et la résistance.

A côté des techniques utilisées en routine, de quantification dans le plasma de l'ADN du VHB, des méthodes de quantification de l'ADNccc résiduel dans les hépatocytes ont été développées (143). L'ADNccc pourrait représenter un marqueur très significatif de l'activité des antiviraux (140) mais sa mesure paraît peu applicable en pratique courante.

3. Traitement de l'hépatite B chronique

L'objectif du traitement est de diminuer la réplication du VHB afin de réduire l'activité de l'hépatite chronique et ainsi de prévenir la progression de la fibrose. L'arrêt de la progression de la fibrose permet de prévenir l'évolution vers la cirrhose et ses complications, en particulier le carcinome hépatocellulaire (CHC) (1, 42, 89).

L'ADN du VHB persiste dans les hépatocytes sous forme d'ADNccc qui sert de matrice pour la transcription virale et qui est responsable des réactivations virales lorsque le traitement est interrompu. Les traitements actuels n'ont pas ou peu d'effet sur l'ADNccc (110). L'efficacité thérapeutique est jugée sur différents critères (« *surrogate markers* ») : la diminution de l'ADN viral dans le sérum, la normalisation des transaminases (ALAT, alanine amino transférase), la séroconversion anti-HBe (virus sauvage) et éventuellement la séroconversion anti-HBs (103, 144, 150). La séroconversion anti-HBe peut être d'interprétation délicate : elle peut n'être que transitoire et aboutir à une séroréversion (reprise d'un phénotype Ag HBe + et Ac anti-HBe-) ou correspondre à l'émergence d'un mutant précocore avec réplication persistante.

1. Indications du traitement

La persistance du VHB chez le malade nécessite en général une longue durée de traitement (voire indéfinie). La décision de traiter doit être argumentée par un rapport bénéfice/risque favorable. Le risque de morbidité liée à la maladie hépatique du malade doit être supérieur à la mortalité du malade en cas de réponse maintenue au traitement (103).

1.1 Bases physiopathologiques du traitement

L'histoire naturelle de l'infection chronique B est caractérisée par différentes phases qui influencent la mise en route du traitement (148).

La première phase dite d'immunotolérance, de durée variable et plus fréquente chez les personnes contaminées en période périnatale, est marquée par une multiplication active du virus ($> 10^8$ copies/ml), avec des transaminases normales signant l'absence de retentissement hépatique. Une séroconversion HBe spontanée ou induite par le traitement ne survient que

rarement (< 5%) pendant cette phase. Le traitement n'est donc pas recommandé mais un suivi régulier des ALAT tous les 3-6 mois est nécessaire (26).

La deuxième phase, dite d'immunoélimination, est caractérisée par une réplication virale moins importante (10^{4-5} - 10^8 copies/ml), des transaminases élevées et des lésions histologiques modérées à sévères. A ce stade, la fibrose évolue rapidement avec un risque élevé de constitution d'une cirrhose. L'évolution peut se faire d'un seul tenant ou avec des épisodes d'exacerbation. La durée de la phase de clairance immune, ainsi que la fréquence et la sévérité des exacerbations, sont corrélées avec le risque de cirrhose et de CHC (148). Les patients Ag HBe + possédant une clairance immunitaire efficace peuvent obtenir une séroconversion spontanée dans les 3 à 6 mois et avant toute atteinte conséquente sur le foie (103, 144). Pour les patients Ag HBe + avec des ALAT > 2N (limite supérieure de normalité de = 30-40 UI/l) et un ADN VHB > 10^5 copies/ml, le critère de fin de traitement est la séroconversion HBe maintenue sur plusieurs mois. Celle-ci est associée à une éradication virale prolongée dans 60 à 90 % des cas. Les facteurs associés à la séroconversion HBe sont un âge élevé, des taux élevés d'ALAT, un génotype viral B plutôt que C. La suppression virale sans séroconversion HBe est associée invariablement à une rechute virale si le traitement est interrompu (26).

Après la séroconversion HBe, environ 2/3 des patients entrent dans une troisième phase, le portage inactif de l'Ag HBs. Ces patients sont Ag HBe négatifs avec des transaminases normales et des charges virales indétectables ou < 10^4 copies/ml. Le traitement n'apporte aucun bénéfice aux porteurs inactifs, mais une surveillance régulière des transaminases doit être réalisée car plus de 20% de ces patients vont réactiver leur hépatite (103, 144).

Les patients Ag HBe négatifs caractérisés par une charge virale élevée (> 10^4 copies/ml) et des transaminases élevées sont considérés avoir « une hépatite B chronique à Ag HBe négatif ». Comparés aux patients Ag HBe +, les patients Ag HBe - sont à un stade plus avancé de leur maladie. La réplication virale est en général de plus faible intensité et fluctuante dans le temps. Les transaminases fluctuent aussi avec des périodes d'exacerbation suivies de phases de rémission spontanées. Ces patients Ag HBe - ont été infectés d'emblée par un mutant précore, ou alors il s'agit de patients Ag HBe + qui ont sélectionnés au cours de leur maladie un mutant précore après ou non une phase de portage inactif. Chez ces patients, le traitement vise à obtenir une suppression virale prolongée et une normalisation des transaminases. Le traitement permet dans 60 à 90% des cas la suppression du virus, mais la rechute est quasi-constante s'il est interrompu. Le critère de fin de traitement n'est pas encore bien défini mais la plupart des patients reçoivent leur traitement indéfiniment (analogues nucléosidiques) (103).

1.2 Recommandations pour le traitement de l'hépatite B chronique

Les recommandations de traitement issues en 2004 de l'AASLD (American Association for the Study of Liver Disease) sont basées sur le statut HBe, le taux d'ALAT, la quantification de l'ADN VHB et les résultats de la biopsie hépatique (Figure 12). La prise en charge des patients aux taux d'ALAT normaux combinés à une charge virale élevée, ou aux taux d'ALAT subnormaux, est sujette à controverse. Dans ces cas, les résultats de la ponction biopsie hépatique est utile pour décider de la mise en route d'un traitement (144).

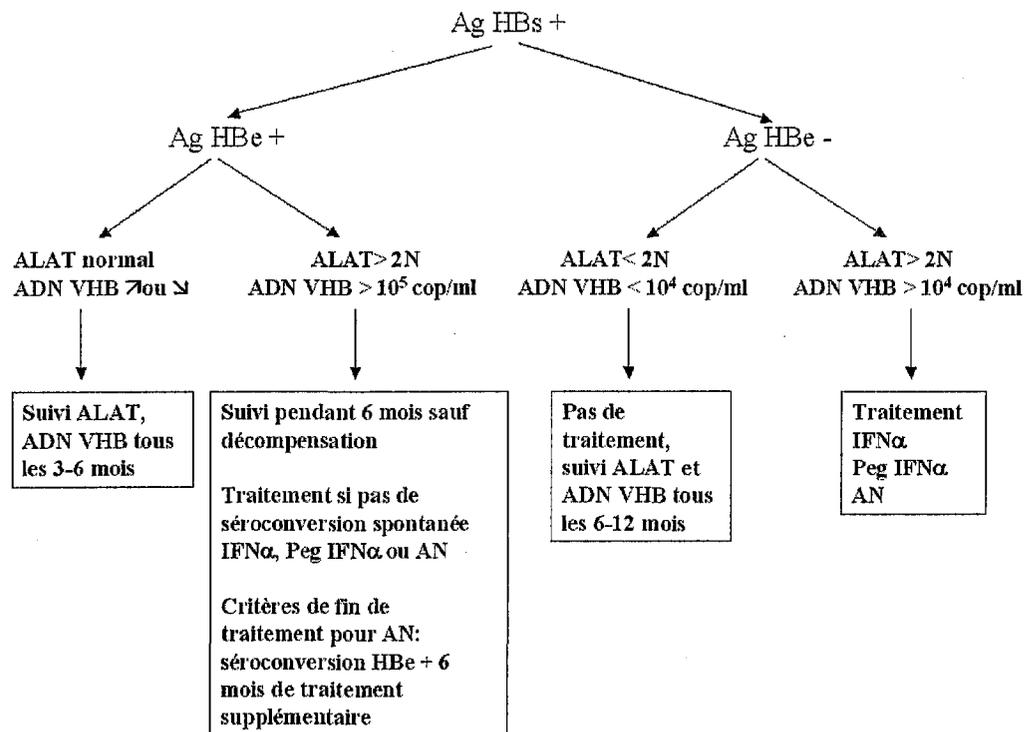


Figure 12 : Algorithme de traitement de l'hépatite B chronique chez les patients non cirrhotiques en fonction du statut Ag HBe, du taux d'ALAT et de la charge virale du VHB (103). N : limite supérieure de normalité des ALAT. AN : analogues nucléos(t)idiques. ADN VHB ↗ ou ↘ : charge virale quel que soit son niveau.

2. Traitements actuels de l'hépatite B chronique

Le traitement de l'hépatite B chronique repose sur deux stratégies thérapeutiques différentes. Le traitement immunomodulateur par l'interféron- α (IFN- α) vise une réponse prolongée après la fin du traitement. Les avantages du traitement à l'interféron- α sont liés à la courte période de traitement qui permet dans 30 à 40% des cas la séroconversion HBe, mais cette molécule est coûteuse et provoque de nombreux effets indésirables. Les analogues nucléosidiques ou nucléotidiques, molécules virustatiques, sont bien tolérés en général et moins coûteux, mais leur efficacité implique une longue durée de traitement et peut être compromise par l'émergence de virus résistants (110).

2.1 Interféron- α et interféron- α pégylé (2a et 2b)

2.1.1 Mécanisme d'action

Le mode d'action de l'interféron- α n'est pas clairement élucidé (131). L'IFN- α a une activité antivirale en inhibant les ARN viraux par activation de la 2'5' oligadénylate-synthétase, de la protéine kinase 67000 et de la protéine Mx. D'autre part, l'IFN- α a une action immunomodulatrice en augmentant l'expression des antigènes HLA de classe I et II à la surface des cellules infectées par le VHB et en stimulant l'activité des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules Natural Killer. Ainsi l'IFN- α peut-il être responsable d'une réponse cytolytique parfois sévère 6 semaines après le début du traitement. Enfin, l'IFN- α possède des propriétés antifibrosantes, antiprolifératives et antioncogéniques.

L'interféron pégylé (IFN peg) est constitué d'un interféron standard conjugué au polyéthylène glycol (PEG) ce qui permet d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques de la molécule : la demi-vie est augmentée par diminution de la clairance rénale de l'IFN. Cette forme pégylée améliore le confort du malade : l'IFN peg permet une seule injection par semaine contrairement à l'IFN standard qui nécessite 3 injections par semaine. Deux IFN pégylés existent : l' IFN- α 2b (linéaire, 12 kDa, PEG Intron® Schering Plough) et l' IFN- α 2a (branché, 40 kDa, Pegasys® Roche Pharmaceutical) (91).

2.1.2 Efficacité

Pour les patients Ag HBe positifs, la durée du traitement est de 4 à 6 mois pour l'IFN standard et de 12 mois pour la forme pégylée. Pour les patients Ag HBe négatifs, la durée du

traitement est de 12 mois pour les 2 types d'IFN. L'efficacité de l'IFN peg est retrouvée au moins comparable à l'IFN standard (27) (Tableau IV).

Les résultats des suivis à long terme sont connus pour l'IFN standard. Deux ans après l'arrêt du traitement, la perte de l'Ag HBe intervient chez plus de 50% des patients traités par l'IFN standard (101). Une séroconversion HBe dans l'année qui suit le début du traitement à l'IFN entraîne chez 65% des malades une élimination de l'AgHBs dans les 10 années suivantes (136). Le risque d'apparition de CHC diminue significativement chez les patients Ag HBe négatifs traités par IFN (19). Chez les patients Ag HBe négatifs, la réponse virologique et biochimique est associée à une meilleure survie à long terme (65).

L'avantage du traitement à l'IFN est son utilisation de courte durée, sans apparition de résistance. Les inconvénients de l'IFN sont liés à ses effets indésirables qui comprennent, entre autres, des symptômes pseudo-grippaux, des troubles psychiatriques (irritabilité, dépression), une toxicité hématologique (thrombopénie, neutropénie) et des désordres thyroïdiens. La tolérance à l'IFN peg est comparable à l'IFN standard. L'IFN est contre-indiqué chez les patients qui ont une cirrhose décompensée en raison du risque d'exacerbation de l'hépatite et du risque d'infections. Il doit être utilisé avec précautions dans les cirrhoses compensées en raison du risque de décompensation si le traitement est prolongé. Les analogues nucléos(t)idiques sont généralement préférés chez les patients avancés dans leur maladie (144).

	Perte de l'Ag HBe	HBe séroconversion	Perte de l'Ag HBs	Réponse virologique	Réponse biochimique	Réponse histologique
Ag HBe +						
IFN- α (89, 101)	33%		12%	37%		
IFN- α peg 2a (68)	34%	32%	3%	32%	41%	38%
IFN- α peg 2b (51)	36%	29%	7%	27%	32%	
Ag HBe -						
IFN- α (65)			4,5-13%	28	29%	
IFN- α peg 2a (93)			4%	43%	59%	48%

Tableau IV : Efficacité de l'IFN standard et pégylé dans le traitement de l'hépatite B chronique chez les patients Ag HBe positifs et négatifs. Les résultats correspondent au pourcentage de patients répondeurs 6 mois après l'arrêt du traitement.

2.1.3 Facteurs prédictifs de réponse à l'IFN- α

Chez les patients Ag HBe positifs et Ag HBe négatifs, les facteurs prédictifs principaux de réponse à l'IFN- α (et à l'IFN peg) sont une charge virale faible, des taux d'ALAT élevés, une activité nécrotico-inflammatoire élevée à la ponction biopsie hépatique (26). D'autre part, les patients infectés par un génotype B ou A sont plus susceptibles de répondre au traitement que ceux infectés par les génotypes C ou D (51, 119). Le rôle des mutations précore et du promoteur core (BCP) dans la réponse à l'IFN- α reste encore à démontrer (39, 87).

2.2 Les analogues nucléotidiques et nucléosidiques

Un analogue nucléosidique, la lamivudine, et un analogue nucléotidique, l'adéfovir, sont actuellement commercialisés en France pour le traitement de l'hépatite B chronique. L'entécavir a été approuvé récemment par la FDA aux Etats-Unis (2005) et est disponible sous forme d'une A.T.U en France avant son autorisation prochaine de mise sur le marché. D'autres analogues ont été développés et sont encore en essais cliniques. Ces traitements ont en général peu d'effets indésirables, sont disponibles par voie orale et sont moins chers que les traitements immunomodulateurs. Cependant, leur utilisation impose une longue durée de traitement sous peine de rechute quasi-certaine et un long traitement par analogue nucléos(t)idique est souvent associé à l'apparition de mutations de résistance. Ces nouveaux traitements en cours d'évaluation permettent d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la combinaison de plusieurs molécules actives sur le VHB (151).

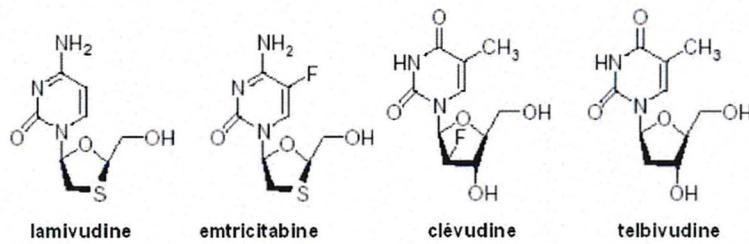
2.2.1 La lamivudine (Zeffix®)

2.2.1.1 Structure et mécanisme d'action

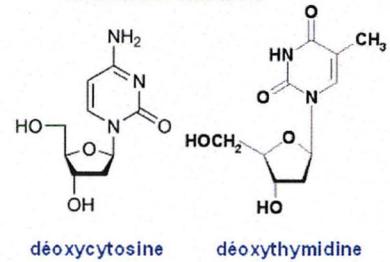
La lamivudine ou β -L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3-TC) (Figure 13) est un analogue de la didéoxycytidine (ddC) et a été le premier analogue nucléosidique approuvé pour le traitement de l'hépatite B chronique (la lamivudine est aussi utilisée aussi dans le traitement du VIH). La posologie usuelle est de 100 mg/j. L'énantiomère L a une plus grande efficacité antivirale et possède moins de toxicité mitochondriale que l'énantiomère D naturel (55). La molécule est métabolisée dans les hépatocytes sous la forme triphosphate active. La molécule ne contient pas de groupement hydroxyle en 3' du sucre, contrairement au substrat naturel (fonction sulfure à la place d'une fonction alcool), ce qui ne permet pas la formation d'une

liaison 3'-5' phosphodiester nécessaire à la synthèse de l'ADN en cours de polymérisation. La lamivudine inhibe donc l'activité de la transcriptase inverse du VHB. Le médicament est un inhibiteur compétitif du substrat naturel et s'incorpore à sa place pendant l'élongation du brin moins de l'ADN viral, puis il agit comme un terminateur de chaîne en empêchant l'addition d'un nucléotide supplémentaire au niveau du brin d'ADN en formation (55).

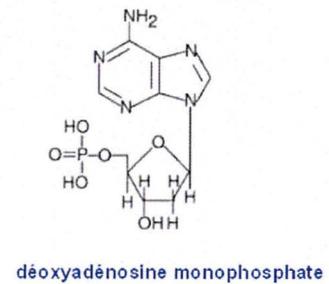
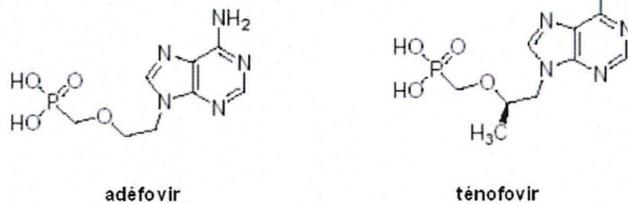
L-nucléosides



Substrats naturels



Nucléosides acycliques phosphonates



Analogues de la déoxyguanosine

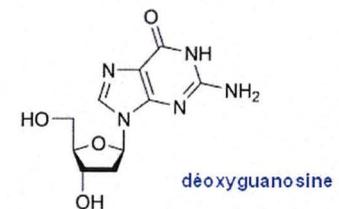
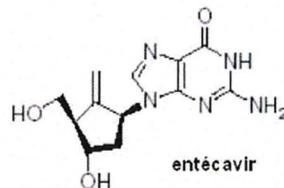


Figure 13: Structure chimique des différents analogues nucléosidiques et nucléotidiques avec leur homologie avec le substrat naturel de la polymérase virale (124).

2.2.1.2 Efficacité

Chez les patients Ag HBe positifs, la séroconversion HBe survient chez 16% des malades après un an de traitement et l'amélioration histologique est retrouvée chez 49-56% des patients. Une longue durée de traitement permet d'augmenter la probabilité de séroconversion HBe (26). La lamivudine induit dans les 3 mois une réduction de la charge virale de 3 à 4 log (35). Une réactivation virale est fréquente si le traitement est arrêté après un an : 37,5% et 49,2% des patients rechutent respectivement 1 an et 2 ans après la fin du traitement (125).

Chez les patients Ag HBe négatifs traités 1 an, une réponse virologique et biochimique est observée chez 70 à 96% des malades. L'amélioration histologique varie entre 20 et 96%. Cependant plus de 90% des patients rechutent si le traitement est arrêté. La perte de l'Ag HBs est anecdotique pour les 2 groupes de patients (26). Ces données incitent donc à donner le traitement indéfiniment. Cependant cette stratégie de traitement au long cours est limitée par l'émergence fréquente de mutants résistants à la lamivudine : la résistance atteint 14% des patients au bout d'un an et culmine à 70% après 4 ans de traitement (62). Malgré l'apparition de résistance, le traitement au long cours à la lamivudine a démontré son efficacité dans la prévention de la progression de la maladie et son effet sur la réduction de l'incidence du CHC (75).

2.2.2 L'adéfovir dipivoxil (Hepsera®)

2.2.2.1 Structure et mécanisme d'action

L'adéfovir dipivoxil ou bis-pivaloyloxyméthyl-9-(2-phosphonyl-méthoxyéthyl) adénine (Figure 13) est une prodrogue de l'adéfovir. Il est utilisé à la posologie de 10 mg/j dans l'infection au VHB ce qui limite sa néphrotoxicité (la dose de 30 mg/j testée dans l'infection par le VIH s'était révélée trop toxique pour commercialiser le médicament dans cette indication). L'adéfovir dipivoxil est métabolisé par les estérases du malade en adéfovir (PMEA). Ce dernier est un analogue acyclique de la déoxyadénosine monophosphate (dAMP). Cette molécule nécessite deux phosphorylations supplémentaires dans les hépatocytes pour être active. L'adéfovir agit au stade initial de la réplication virale au niveau de l'amorçage de la polymérisation : il s'incorpore à la place des dATP au niveau du signal d'encapsidation utilisé comme matrice pour la synthèse de l'amorce (153). D'autre part, il inhibe l'élongation du brin moins du virus et agit comme un terminateur de chaîne (30).

2.2.2.2 Efficacité

Après 48 semaines de traitement, l'adéfovir entraîne la réduction de l'ADN VHB de 3,52 et 3,91 log copies chez les patients HBe positifs et HBe négatifs respectivement, avec une amélioration histologique et biochimique. La séroconversion HBe augmente avec la durée du traitement pour atteindre 43% des malades après 3 ans de traitement (92). Chez les patients Ag HBe négatifs, 48 semaines de traitement aboutissent à une amélioration histologique pour 64% des patients, un ADN indétectable (ADN VHB < 400 copies/ml) pour 51% des malades, et une normalisation des ALAT pour 72% d'entre eux. Après 2 ans de traitement, l'ADN

VHB est indétectable pour 71% des patients. Les bénéfices du traitement sont perdus si l'adéfovir est arrêté à 48 semaines contrairement aux patients traités 144 semaines pour lesquels le bénéfice est maintenu (45, 46). Contrairement à la lamivudine, la résistance à l'adéfovir est différée et moins fréquente : elle atteint 2% des patients après 2 ans de traitement et 28% après 5 ans. Ces données sont issues d'études effectuées chez des patients naïfs pour la lamivudine. En général, l'adéfovir est efficace contre les virus résistants à la lamivudine (109, 111) et réciproquement les virus résistants à l'adéfovir sont sensibles à la lamivudine (7).

2.2.3 L'entécavir (Baraclude®)

2.2.3.1 Structure et mécanisme d'action

L'entécavir ou 1S-(1 α ,3 α ,4 β)-2amino-1,9-dihydro-9-[4-hydroxy-3-(hydroxyméthyl)-2-méthylène-cyclopentényl]-6H-puri-6-one (Figure 13) est un analogue carbocyclique de la déoxyguanosine. Des études ont montré que l'entécavir triphosphate inhibe la réplication virale à 3 niveaux : amorçage de la réplication, synthèse du brin moins, synthèse du brin plus. Il est un inhibiteur compétitif du substrat naturel, la déoxyguanosine triphosphate (dGTP) dans le brin d'ADN en formation. L'entécavir se fixe aussi avec une très haute affinité à la polymérase virale. Son incorporation dans l'ADN en formation, à la place du dGTP, engendre un effet terminateur de chaîne 2 ou 3 nucléotides plus loin (152).

2.2.3.2 Efficacité clinique

Des études récentes ont comparé l'efficacité clinique de l'entécavir à la lamivudine. Chez les patients Ag HBe positifs et Ag HBe négatifs, l'efficacité de l'entécavir a été trouvée significativement supérieure à celle de la lamivudine au niveau de la réponse histologique, biochimique et virologique (ADN VHB < 300 copies/ml) après 48 semaines de traitement (23, 64). Aucune mutation de résistance n'a été détectée pendant cette période, les patients étant naïfs aux autres analogues nucléosidiques. Cependant, des cas de résistance ont été rapportés chez des patients traités auparavant par lamivudine (129). Une posologie d'entécavir de 1 mg/jour à la place de 0,5 mg/j est préconisée pour traiter les patients avec des virus résistants à la lamivudine.

2.2.4 Les analogues nucléos(t)idiques en cours de développement pour le VHB

Ces molécules sont pour la plupart en essais cliniques de phase III et doivent faire leur preuve au niveau de leur sécurité d'utilisation.

2.2.4.1 Le ténofovir disoproxyl fumarate (Viread®)

Le ténofovir disoproxyl fumarate est une prodrogue du ténofovir ou 2-phosphonylmethoxypropyl adénine (PMPA) (Figure 13). La structure chimique du ténofovir, nucléotide acyclique, est très proche de celle de l'adéfovir. Après deux phosphorylations successives par des kinases cellulaires, le ténofovir s'incorpore à la place de son substrat naturel, le dAMP, au niveau de l'extrémité 3' de la chaîne virale d'ADN en formation et agit comme un terminateur de chaîne. Une action au niveau de la phase d'initiation de la polymérisation est aussi retrouvée (30). Le ténofovir est actif à la posologie de 300 mg/j contre le VIH et dispose d'une A.M.M dans cette indication.

L'efficacité du ténofovir a été comparée à celle de l'adéfovir sur des patients résistants à la lamivudine. La réponse virologique (ADN VHB < 400 copies/ml) est plus importante pour le ténofovir, égale à 78 et 100% après 24 et 48 semaines de traitement, contre 33 et 44% pour l'adéfovir (135).

2.2.4.2 L'emtricitabine (Emtriva®)

L'emtricitabine (FTC) ou β -L-3'-thia-2'-3'-didéoxy-5-fluorocytidine (Figure 13) est le dérivé fluoré de la lamivudine et possède le même mécanisme d'action. Ce médicament dispose d'une A.M.M pour l'infection au VIH (200 mg/j).

Son efficacité semble comparable à la lamivudine (77) mais la fréquence d'apparition des mutations de résistance semble moindre (18% de mutations à 2 ans) (44).

2.2.4.3 La telbivudine

La telbivudine (LdT) est la β -L-2'-déoxythymidine (Figure 13). Son mode d'action n'est pas tout à fait compris. Elle semble inhiber préférentiellement la synthèse du brin plus ADN dépendante (43). Cette molécule a une activité puissante, sélective et spécifique des Hepadnavirus.

La telbivudine permet une réduction de l'ADN VHB plus importante de 1,5 log que la lamivudine. L'apparition de la résistance est de 5 % après 1 an de traitement, donc moins importante que pour la lamivudine. La monothérapie à la telbivudine est plus efficace que la combinaison de la molécule avec la lamivudine, ou la lamivudine en monothérapie (63). La

réponse virologique (ADN VHB < 200 copies/ml) et biochimique (normalisation des transaminases) est de 61 et 86%, respectivement après 1 an de traitement. La séroconversion HBe est obtenue pour 31% des patients traités par la telbivudine, contre 22 et 15% pour les malades traités par la lamivudine ou la bithérapie lamivudine–telbivudine, respectivement (63).

2.2.4.4 La clévodine

La clévodine (L-FMAU) ou 1-(2-fluoro-5-méthyl-β-L-arabinosyluracil) est un analogue nucléosidique de la déoxyuridine (Figure 13). Cette molécule semble inhiber de préférence la phase de synthèse du brin plus qui est ADN dépendante, et ne semble pas un terminateur de chaîne (123).

Peu de données sont disponibles à ce jour, mais la clévodine entraîne après 24 semaines de traitement une réduction de 4,64 log de l'ADN VHB. La réponse biochimique atteint 70% des patients après 4 semaines de traitement (43, 94).

2.2.5 Les essais de combinaisons de molécules

Aucune étude n'a pu montrer un bénéfice supérieur de l'association IFN peg-lamivudine par rapport à l'IFN peg seul en monothérapie (51, 93). Cependant, l'administration séquentielle d'IFN peg puis de lamivudine a révélé une efficacité supérieure, sur le plan virologique, par rapport au traitement par la lamivudine en monothérapie, sans période d'induction préalable par l'IFN peg (21). Une récente étude n'a pas pu démontrer l'intérêt d'associer l'IFN-α 2b à la ribavirine par rapport à l'IFN seul chez des patients Ag HBe positifs (80).

Par l'expérience acquise dans le cadre du traitement de l'infection par le VIH, la combinaison de plusieurs analogues nucléos(t)idiques aux mécanismes d'action différents semble une stratégie rationnelle pour obtenir une meilleure inhibition de la réplication virale (115, 151). Cette efficacité a pu être démontrée sur des modèles animaux. En revanche, les essais cliniques chez l'homme sont encore décevants et aucune amélioration virologique n'a été apportée par les associations lamivudine-adéfovir (111) ou telbivudine-lamivudine (63) comparées à la monothérapie. Récemment, la combinaison emtricitabine-clévodine a été testée et semble plus efficace que la clévodine en monothérapie 24 semaines après la fin du traitement (76). D'autres stratégies de combinaison sont encore à étudier avec des molécules aux profils de résistance différents.

2.2.6 Les perspectives de traitement

La meilleure connaissance du cycle viral du VHB a permis le développement de nombreux concepts thérapeutiques qui ont été évalués sur des modèles expérimentaux. Plusieurs étapes du cycle viral ont été ciblées (153): l'entrée du virus dans les hépatocytes avec des peptides compétitifs analogues des protéines pré-S1 myristilées, l'encapsidation de l'ARNpg avec des dérivés de la phénylpropénamide ou l'interférence par APOBEC3G (133), la formation de la capsid avec des composés de la famille des hétéroaryldihydropyrimidines, la maturation des virions avec des inhibiteurs de la glycosylation des protéines d'enveloppe. D'autres approches, de concept plus récent, ciblent des régions du génome viral essentielles pour la réplication en utilisant des oligonucléotides anti-sens (116), des acides peptidiques nucléiques (*Peptide Nucleic Acid*, PNA) (117) ou des siRNA (*short interfering RNA*) (145). Ces futurs agents thérapeutiques non dépendants de la transcriptase inverse pourraient avoir des implications cliniques importantes dans le traitement ou la prévention de la résistance aux analogues nucléosidiques.

4. Résistance du VHB aux analogues nucléosidiques et nucléotidiques

1. Facteurs impliqués dans la résistance virale

Les facteurs viraux sont en grande partie responsables de la résistance aux analogues nucléos(t)idiques, mais des mécanismes moins connus, impliqués dans le catabolisme des nucléosides, pourraient aussi moduler l'action de ces antiviraux.

1.1 Facteurs cellulaires associés à la résistance

Avant que les analogues nucléosidiques n'inhibent la polymérase virale, ils doivent être transportés dans l'hépatocyte où ils subissent des phosphorylations pour être actifs. La phosphorylation dépend de différentes kinases cellulaires. La première phosphorylation est en général l'étape la plus lente, est substrat-spécifique et soumise à une forte régulation. Le génome des mammifères code pour 4 kinases spécifiques des déoxynucléosides qui varient suivant leur spécificité, leur distribution cellulaire, leur localisation dans la cellule et leur dépendance au cycle cellulaire. Les kinases intervenant dans les 2^{ème} et 3^{ème} phosphorylation sont relativement non substrat-spécifiques. Les analogues nucléotidiques (adéfovir et ténofovir) ne sont pas concernés par la première étape limitante de phosphorylation (85).

Récemment, différents mécanismes de résistance cellulaire aux analogues nucléosidiques ou nucléotidiques ont été identifiés et semblent liés à une augmentation de l'expression de 2 familles de protéines impliquées dans les systèmes d'efflux: les glycoprotéines P et les protéines associées à la multirésistance (MRP 1-9). MRP4 et MRP5 ont été reconnues *in vitro* pour exporter l'adéfovir et le ténofovir en dehors de la cellule. D'autres protéines sont capables d'exciser en terminaison de la chaîne d'ADN des analogues nucléosidiques en série β -D ou β -L. La protéine suppressive de tumeur (p53) et la 3'-5' exonucléase cytosolique démontrent une activité pour les β -D ou β -L analogues nucléosidiques alors que l'exonucléase apurique/apyrimidique (APE1) est spécifique de la conformation β -L. Tous ces enzymes impliqués dans le catabolisme des nucléosides ou nucléotides peuvent être à l'origine de la résistance aux antiviraux (85).

1.2 Dynamique de la réplication virale et erreurs de la polymérase virale

Le virus de l'hépatite B se réplique intensément entraînant la production de 10^{11} particules virales par jour ce qui est 100 fois plus important que la production virale du VIH ou du VHC. La fréquence de mutations introduites par la polymérase a été estimée entre 1,4 et $3,2 \times 10^{-5}$ substitutions de nucléotides par site par an (82). Ce taux est 10 fois plus important par rapport aux autres virus à ADN. Chez un individu qui est en phase de réplication intense, les erreurs d'incorporation de la polymérase virale entraînent une mauvaise incorporation de 10^{10} paires de bases par jour. Le génome comprenant 3200 nucléotides, toutes les mutations possibles peuvent être produites chaque jour (82, 83). Toutes les mutations ne sont pas viables pour le virus et limitées par la structure du génome et le chevauchement de ces gènes. Par exemple, certaines mutations intervenant dans la région de la transcriptase inverse du virus peuvent induire des modifications importantes et létales dans la structure des protéines de l'enveloppe : ces mutations ne seront donc pas pérennisées (132).

1.3 Capacité répliquative du virus et pression de sélection

Avant traitement, le virus circule vraisemblablement sous la forme d'un mélange complexe et instable de variants génétiquement distincts, définissant ainsi une distribution en quasi-espèces. Ces variants peuvent comporter une ou deux mutations potentiellement responsables de la résistance à un médicament. Cependant, quand une mutation viable survient, l'émergence de cette souche mutante dépend des conséquences fonctionnelles de cette mutation. En l'absence de pression de sélection exercée par le système immunitaire ou le traitement, la sélection des particules virales les mieux adaptées se fait sur la base de leur capacité intrinsèque de réplication ou « fitness » (81). Le traitement antiviral inhibe la réplication du virus sauvage mais la pression de sélection ainsi exercée peut conduire à l'émergence de mutants résistants qui maintiennent une réplication même si elle est déficiente. Les mutants résistants peuvent acquérir dans un second temps des mutations compensatoires qui restaurent partiellement la capacité répliquative leur permettant finalement de devenir la souche dominante au sein de la population virale du patient (105).

1.4 Espace de réplication

L'espace de réplication est représenté par le potentiel du foie à acquérir de nouvelles infections par l'ADNccc. Le turnover des hépatocytes est lent dans un foie normal avec une demi-vie égale à 100 jours et peut être réduit à 10 jours lors de la présence d'une activité nécrotico-inflammatoire. Le nombre de molécules d'ADNccc pouvant infecter le noyau de

chaque hépatocyte est limité (30-50 copies d'ADNccc). Lors de la pression de sélection exercée par le traitement antiviral, le remplacement de la souche sauvage par les mutants de résistance se fait progressivement et dépend de la création de « nouveaux espaces de réplication ». La génération de nouveaux ADNccc se fait par la croissance de nouveaux hépatocytes, le turnover hépatocytaire ou la perte d'hépatocytes infectés contenant des ADNccc de type sauvage (81, 153).

2. Mécanismes moléculaires de la résistance aux analogues nucléosidiques et nucléotidiques

Les mutations de résistance aux analogues nucléosid(t)iques sont retrouvées au niveau de la transcriptase inverse du virus de l'hépatite B et plus particulièrement au niveau des domaines B, C et D qui sont impliqués dans l'activité enzymatique. La sélection des mutations de résistance entre les différentes molécules est plus ou moins structure-spécifique. Ainsi les molécules apparentées sur le plan structural auront en général le même profil de mutations de résistance. Les analogues nucléosid(t)iques peuvent être séparés suivant leur structure chimique en trois principaux groupes (cf 3 paragraphe 2.2, Figure 13) : les analogues L-nucléosidiques (lamivudine, emtricitabine, telbivudine, clévodine), les nucléosides phosphonates acycliques ou nucléotides acycliques (adéfovir, ténofovir) et les analogues de la déoxyguanosine où le ribose est remplacé par un cyclopentane (entécavir) (124).

2.1 Mutations associées à la résistance à la lamivudine et aux autres L-nucléosides

2.1.1. Mutations principales de résistance à la lamivudine

La fréquence d'apparition de la résistance à la lamivudine augmente de 15 à 20% par année de traitement (62). Les mutations principales sont localisées au niveau du motif YMDD du site actif de la transcriptase inverse du virus. La méthionine en position 204 de la transcriptase inverse (RT) peut être substituée par 2 acides aminés principaux, l'isoleucine ou la valine (5). Récemment, des études ont également montré aussi l'importance clinique de la substitution par un acide aminé sérine mais cette mutation est beaucoup moins fréquente (17). Ces mutations sont notées, en accord avec la nouvelle nomenclature qui uniformise la numérotation indépendamment du génotype, rtM204I, rtM204V et rtM204S (Figure 14)

(127). Les virus possédant ces mutations sont appelés communément « mutants YMDD » pour désigner l'ensemble des mutants affectant le motif YMDD, ou bien ils sont nommés séparément mutant YIDD (rtM204I), mutant YVDD (rtM204V) et mutant YSDD (rtM204S). Ces mutations suffisent pour conférer un haut niveau de résistance à la lamivudine (diminution > 1000 fois de la sensibilité à la lamivudine). La mutation rtM204I peut être retrouvée de manière isolée mais les mutations rtM204V/S sont toujours associées à d'autres mutations dont certaines sont compensatoires, en particulier les mutations rtL180M/C, rtV173L et rtL80I/V (31, 81, 104, 124).

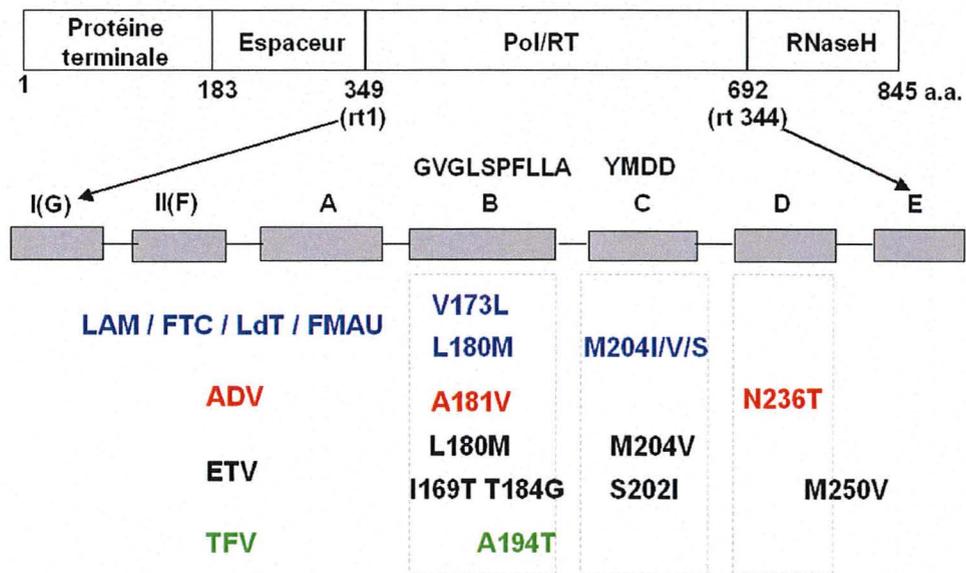


Figure 14: Localisation moléculaire dans le domaine de la transcriptase inverse du VHB (RT) des principales mutations associées à la résistance aux analogues nucléosidiques et nucléotidiques (LAM : lamivudine, FTC : emtricitabine, LdT : telbivudine, FMAU : clévidine, ADV : adéfovir, ETV : entécavir, TFV : ténofovir)

La modélisation moléculaire de la RT du VHB n'ayant pas été pour l'instant résolue, l'étude des interactions entre les analogues nucléos(t)idiques et leur cible est réalisée par analogie avec la résolution cristallographique de la RT du VIH. Les mutations rtM204I/V/S engendrent un choc stérique et une modification de la charge électrostatique au niveau de la poche de liaison des dNTP de la polymérase. Ces mutations provoquent d'une part une diminution de l'affinité de la lamivudine pour sa cible et d'autre part un repositionnement de l'antiviral au niveau du site actif, induisant une très mauvaise incorporation de la lamivudine dans le brin d'ADN en construction. Ces mutations n'affectent pas avec le même degré la

liaison avec le substrat naturel, le dCTP, parce que le cycle déoxyribose est en configuration D (29). La mutation rtL180M/C ne suffit pas à elle seule pour conférer la résistance mais des études phénotypiques ont montré son importance pour accroître la réplication et la résistance des mutants rtM204I/V/S. La modélisation moléculaire montre que la mutation rtL180M/C interagit en augmentant l'électronégativité autour du site de liaison des déoxyriboses des nucléotides. Cette modification entraîne une diminution d'affinité du cycle oxathiolane de la lamivudine triphosphorylée pour sa cible, contrairement au substrat naturel, le dCTP, qui conserve son affinité.

2.1.2 Autres mutations associées à la résistance à la lamivudine

D'autres mutations sont plus fréquemment retrouvées associées à la résistance à la lamivudine. Une partie de ces mutations sont des mutations compensatoires qui restaurent partiellement le pouvoir répliatif du mutant YMDD (25). Certaines mutations affectant les protéines d'enveloppe s'avèrent être aussi des mutations compensatoires pour le mutant YMDD en raison du chevauchement des gènes codant pour l'enveloppe et la polymérase. Ainsi le mutant sG145R (s pour Ag de surface ou d'enveloppe) ou rtW153S d'échappement à la vaccination a un rôle positif sur la réplication des mutants rtM204I/V. La mutation sP120T peut être sélectionnée chez un patient transplanté hépatique qui a reçu en immunoprophylaxie des Ig spécifiques anti-VHB. Lors d'un traitement à la lamivudine post-transplantation, le variant rtT128N ou sP120T/rtL180M/rtM204V émerge avec un potentiel répliatif augmenté (13). Les mutations précore (G1896A) ou du promoteur (A1762T et G1764A) augmentent la réplication et la résistance des mutants de résistance à la lamivudine (128).

2.1.3 Mutations associées à la résistance à la lamivudine et à la résistance à d'autres analogues nucléos(t)idiques

La mutation compensatoire rtL80V/I est suspectée d'engendrer une plus faible réponse à l'adéfovir (71). Les mutations rtA181T/V, rtV214A et rtQ215S altèrent l'allostérie du site actif de la polymérase et contribuent ainsi à diminuer l'affinité à la fois de la lamivudine et de l'adéfovir. Les mutations rtI169T et rtI84S/G associées à la résistance à la lamivudine contribuent aussi à la résistance à l'entécavir (124). Ces résistances croisées montrent l'influence du traitement initial sur le choix des options thérapeutiques ultérieures (124).

2.1.4 Mutations aux autres L-nucléosides

Les essais phénotypiques montrent que la résistance à la lamivudine confère une résistance aux autres analogues L-nucléosidiques incluant, entre autres, l'emtricitabine (FTC), la telbivudine (LdT) et la clévidine (L-FMAU). Les premiers essais cliniques ont révélé que la résistance primaire aux analogues L-nucléosidiques était due aux mutations rtM204I/V (124).

2.2 Résistance aux nucléosides phosphonates acycliques

2.2.1 Résistance à l'adéfovir

Contrairement à la lamivudine, la résistance à l'adéfovir émerge lentement avec une incidence cumulée à 1 an <1%, de 3% à 2 ans, de 11% à 3 ans, de 18% à 4 ans et de 29% à 5 ans (15, 43). Cependant de récentes études ont montré une incidence plus élevée chez des patients non naïfs, précédemment résistants à la lamivudine et de génotype D (22% de résistance à 2 ans) (41). L'incidence cumulée de la résistance à l'adéfovir a été trouvée chez des patients initialement résistants à la lamivudine à 6,4% à 1 an et 25,4% à 2 ans, avec une technique sensible de génotypage (147).

Les mutations les plus connues associées à la résistance à l'adéfovir sont les mutations rtN236T et/ou rtA181V/T. Ces mutations sont indépendantes l'une de l'autre mais peuvent se retrouver associées. La mutation rtN236T est située dans le domaine D de la polymérase et au niveau de la poche de liaison au dNTP. Cette mutation n'affecte pas de manière significative la liaison du substrat naturel, le dATP, mais diminue plus considérablement l'affinité de l'adéfovir pour sa cible (146).

Comparées à la lamivudine, ces mutations confèrent un faible niveau de résistance avec une diminution de la susceptibilité à l'adéfovir seulement de 10 fois par rapport à la souche sauvage. Néanmoins, elles sont suffisantes pour entraîner une résistance clinique (40). Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer ce faible niveau de résistance : la structure de l'adéfovir, proche du substrat naturel, la flexibilité de la molécule qui peut s'adapter aux changements de conformation de la polymérase, son indépendance vis à vis de la première phosphorylation induisant une meilleure disponibilité cellulaire et enfin sa meilleure efficacité sur la réplication virale et l'ADNccc (149).

Une étude récente a montré que la mutation rtI233V était responsable d'une diminution de la sensibilité à l'adéfovir. Cette mutation a été retrouvée chez des patients avant traitement à l'adéfovir sans présence des mutations rtN236T et/ou rtA181V/T. Elle ne semble pas, par ailleurs, avoir été sélectionnée par le traitement antérieur à la lamivudine (120). D'autres mutations ont été décrites comme pouvant être impliquées dans la résistance à l'adéfovir (et parfois à la lamivudine) : rtL80V/I, rtV84M, rtS85A, rtV214A, rtQ215S, rtP237H et rtN238T/D. Ces mutations peuvent apparaître seules ou en conjonction avec rtN236T/rtA181V/T (124).

2.2.2 Résistance au ténofovir

La résistance au ténofovir est associée à la mutation rtA194T qui a été mise en évidence chez un patient co-infecté par le VHB et le VIH. Le résidu A194 est situé à la fin du domaine B de la polymérase au niveau d'une boucle qui contient une hélice alpha interagissant avec la matrice d'acide nucléique. La mutation rtA194T affecte l'efficacité de la polymérisation : elle induit une modification allostérique qui entraîne un mauvais alignement entre la matrice et le site de liaison des dNTP (124). La mutation rtN236T de résistance à l'adéfovir est associée in vitro à une diminution de la sensibilité au ténofovir de 4,5 fois (faible résistance). De récentes études ont montré l'efficacité clinique du ténofovir sur des patients résistants à l'adéfovir (40, 113, 134).

2.3 Résistance aux analogues de la désoxyguanosine

La résistance à l'entécavir a été décrite uniquement chez des patients précédemment résistants à la lamivudine. La résistance est occasionnée par la conjonction de plusieurs mutations : la présence du profil rtM204V + L180M associée à la résistance à la lamivudine additionnée des paires de mutations rtM250V + rtI169T ou rtS202I + rtT184G. Les analyses de modélisation moléculaire montrent que les résidus rtM250 et rtI169 interagissent au niveau de l'amorce ou de la matrice d'acide nucléique tandis que rtT184 et rtS202 altèrent la géométrie autour de la poche de liaison aux dNTP (129).

2.4 Résistance à plusieurs analogues nucléos(t)idiques (multirésistance)

La résistance simultanée à plusieurs analogues nucléos(t)idiques de structure différente semble rare à part les cas de résistance entécavir/lamivudine. L'exposition à long terme et d'emblée à la bithérapie lamivudine-adéfovir n'a été associée à l'émergence d'aucun variant

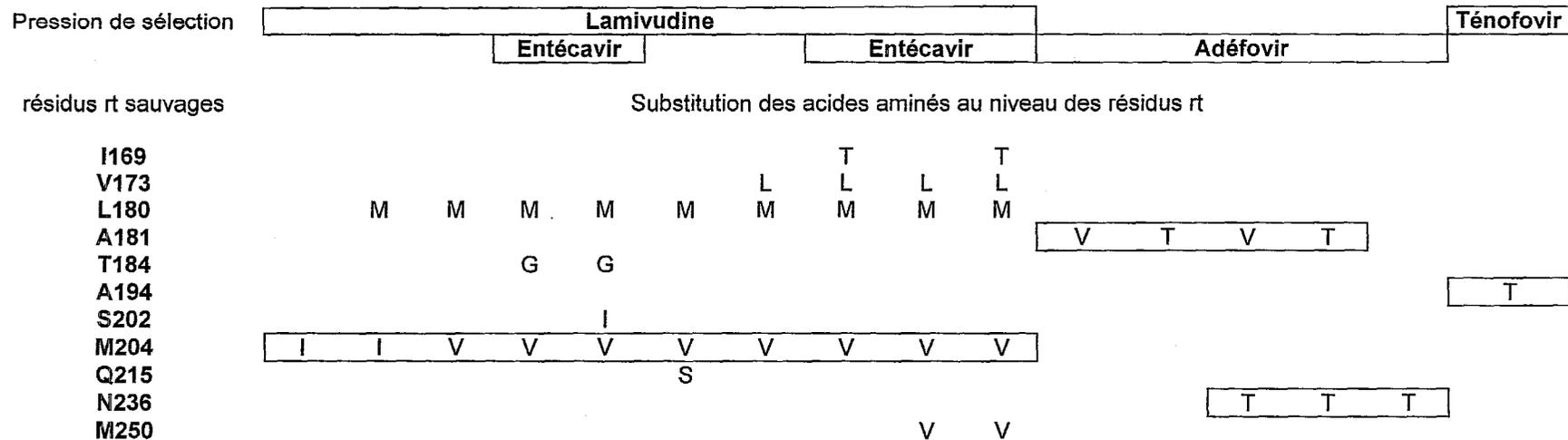
résistant (66). In vitro, la fabrication d'un virus arborant les mutations rtL180M + M204V + N236T montre que cette association entraîne une résistance à la lamivudine et à l'adéfovir mais avec une capacité répliquative diminuée (18). In vivo, ce variant n'a jamais été retrouvé pour l'instant, probablement (entre autres) en raison de l'inefficacité de sa répllication. En revanche, une étude récente a mis en évidence dans le sérum d'un patient transplanté hépatique ayant reçu de la lamivudine, de l'adéfovir et des Ig spécifiques anti-VHB, un mutant multirésistant responsable de l'échec au traitement. Ce variant comprenait les mutations rtV173L + L180M + A181V + N236T, une combinaison de mutations de résistance pour les 2 médicaments, et la mutation sP120S d'échappement aux Ig anti-VHB (138). D'autres variants multirésistants ont été décrits : les variants arborant les mutations rtN236T + A181T + (M250I + I233V) ou (S85A + N238D) (8) ainsi que ceux portant les mutations A181S + M204I (54) sont associés à la résistance à la fois à la lamivudine et à l'adéfovir.

Des études phénotypiques de sensibilité aux antiviraux des différents variants sélectionnés par les régimes thérapeutiques du patient sont indispensables pour comprendre l'implication clinique des différentes mutations intervenant au niveau de la RT. Le tableau V résume les profils de résistance principaux aux molécules actives sur le VHB.

3. Implications cliniques de la résistance

3.1 Définition clinique de la résistance

La réponse initiale au traitement est évaluée dans les 3 premiers mois de traitement par une réduction ≥ 1 log UI/ml de l'ADN VHB par rapport à la charge virale initiale. L'échec secondaire à un traitement survient après une réponse initiale au traitement, et est défini par un rebond confirmé de l'ADN VHB ≥ 1 log UI/ml par rapport au nadir de l'efficacité de l'antiviral (84). Des techniques sensibles et spécifiques de quantification de l'ADN du VHB sont nécessaires pour mettre en évidence la rechute le plus tôt possible (Figure 15). La démonstration de la résistance primaire ou secondaire nécessite l'élimination des autres causes d'échec thérapeutique, comme par exemple l'arrêt du traitement qui s'accompagne d'une augmentation de la répllication du virus sauvage, ou l'existence de problèmes pharmacocinétiques ou d'interférences médicamenteuses avec la molécule administrée.



Changement du log CE₅₀ en fonction de la substitution de la rt

L-nucléosides																
Lamivudine	R	>2	R	R	R	R	R	R	R	R	0,3	0,3	0,2	0,3	0,7	0,1
Emtricitabine	R	R	R	R	R		R	R	R	R	0,8	0,7	0,3	0,6	0,6	0
Telvudine	>2	>2	>2	>2	>2		>2	R	R	R						
Clévudine	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R						
Analogues désoxyguanosine																
Entécavir	<2	0,5	1,8	2	2,6		1	1,8	R	R	0,7	0,4	0,3	0,2	0,3	0
Nucléosides phosphonates acycliques																
Adéfovir	-0,5	0,3	0,5		0,3		-0,1	-0,3	-0,1		0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,1
Ténofovir	-0,3	0,3	0,8		0,8		0,2	0,2	0,8		0,2	0,6	0,5	0,4	0,6	0,7

Tableau V: Résistance phénotypique des différents variants de la transcriptase inverse (rt) aux molécules antivirales. La résistance est exprimée par le log du facteur de résistance, c'est à dire le log du rapport de CE 50 mutant/ CE 50 souche sauvage. CE 50 : concentration efficace capable d'inhiber 50% de la réplication virale. Un niveau élevé de résistance est associé à un rapport >1, un niveau faible à un rapport < 0,7. R= résistance (rapport >3) (124).

En plus des tests virologiques, les conséquences de la résistance peuvent être évaluées par la remontée des transaminases (ALAT) qui, en général, est différée par rapport à la remontée de la charge virale (84) et qui signe une reprise de l'activité de l'hépatite. Le diagnostic de la résistance doit anticiper l'exacerbation de l'activité de l'hépatite qui est délétère pour la progression de la maladie du patient. La confirmation de la résistance peut être réalisée par des tests génotypiques lorsque la mutation de résistance associée à l'antiviral est connue, ou des tests phénotypiques qui permettent d'étudier la résistance associée aux nouvelles mutations.

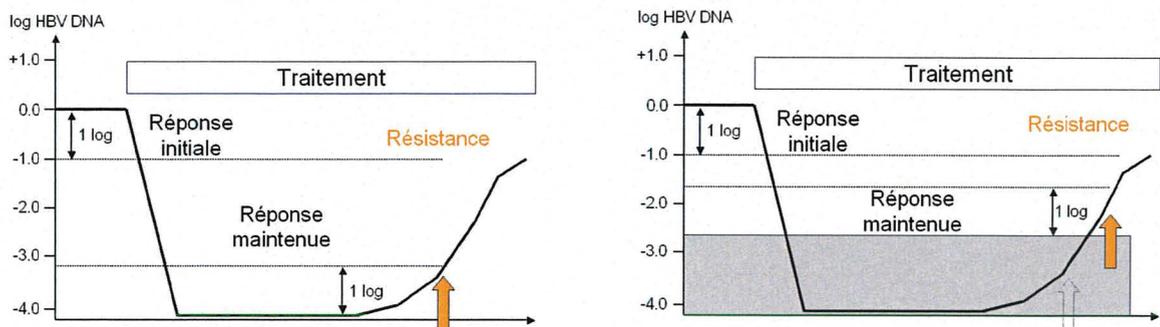


Figure 15 : Définition de la résistance clinique au traitement. Une technique sensible de quantification de l'ADN du VHB (à gauche) permet un diagnostic plus précoce par rapport à une technique moins sensible (à droite). Les charges virales comprises dans la zone grise ne sont pas détectées par la technique moins sensible (84).

3.2 Facteurs prédictifs de résistance aux analogues nucléos(t)iques

Certains facteurs prédictifs pré-thérapeutiques ont été identifiés dans la survenue de la résistance à la lamivudine : un index de masse corporel élevé, sexe masculin, une charge virale élevée et un index d'activité nécrotico-inflammatoire élevé à la biopsie hépatique. Un niveau élevé d'ALAT en pré-thérapeutique serait également en faveur du développement de la résistance (26, 110). Cependant une étude récente montre des résultats contradictoires avec un taux de mutations plus élevé chez les patients possédant un taux d'ALAT avant traitement < 5 fois la limite supérieure de la normalité. Cette étude a aussi montré plus de mutations chez les patients Ag HBe positif (22).

La durée du traitement est un facteur jouant aussi sur l'émergence de virus résistants à la lamivudine. D'autre part, une répllication virale restant à un niveau élevé sous traitement est associée au développement rapide de mutations de résistance (62). Une étude a montré que le

maintien d'un ADN VHB $> 10^2$ - 10^3 UI/ml après 6 mois de traitement était corrélé à l'émergence de la résistance. L'importance de la suppression de l'ADN viral semble donc prédire le risque de développement de la résistance (84).

L'impact du génotype viral est controversé mais, comme les mutations précore ou du promoteur core, il ne semble pas influencer la résistance à la lamivudine en monothérapie. (3, 154). Certaines études évoquent le rôle du sous-génotype dans la survenue de la résistance (4).

Les facteurs prédictifs de résistance à l'adéfovir ont été moins étudiés. La résistance est plus fréquente chez les patients d'un âge avancé, qui ont précédemment développé une résistance à la lamivudine, et suivi un traitement par l'adéfovir en monothérapie. Le génotype D a été retrouvé plus fréquemment associé à la résistance à l'adéfovir mais ce résultat demande des investigations supplémentaires en raison de la taille limitée de l'échantillon étudié (41).

3.3 Evolution des patients développant la résistance aux analogues nucléosid(t)iques

L'apparition de la résistance à la lamivudine peut s'accompagner dans un délai variable d'une exacerbation aiguë des ALAT, d'une possible décompensation hépatique et d'une détérioration histologique au long cours (62, 88). Une étude histologique sur 3 ans montre que le développement de mutants YMDD diminue considérablement l'impact favorable de la lamivudine : 44% d'amélioration contre 77 % en l'absence de mutants, 15 % d'aggravation contre 5 % dans le groupe sans mutation (34). Chez les patients à un stade avancé de leur maladie ou chez les transplantés hépatiques, la survenue de mutants de résistance est corrélée à une aggravation de leur maladie qui peut leur être fatale. Une étude prospective sur 5 ans a montré que la résistance à la lamivudine qui concerne près de 2/3 des patients est associée à un risque accru de complications hépatiques et en particulier d'hépatocarcinome en comparaison avec les patients qui maintiennent un contrôle de leur répllication virale (84).

Avant la disponibilité d'autres analogues nucléosid(t)iques actifs contre les mutants rtM204I/V/S, la prise en charge de la résistance à la lamivudine était controversée (84). Le traitement par la lamivudine était maintenu dans le but de prévenir la réapparition de la souche sauvage dont la capacité répllicative est plus élevée que les mutants YMDD. Certaines études ont montré que les patients, malgré la présence de mutants YMDD, conservaient des niveaux de charge virale et d'ALAT inférieurs par rapport à leur niveau pré-thérapeutique, et que certains réussissaient à faire une séroconversion HBe (24). Cependant, la survenue de

mutations compensatoires restaurant le « fitness » du virus pouvait compromettre cette stratégie. D'autres études, en revanche, étaient favorables à l'arrêt du traitement et ne montraient pas de bénéfice à continuer la lamivudine chez des patients porteurs de mutations YMDD, surtout s'ils n'étaient pas à un stade avancé de leur maladie (74).

L'arrivée sur le marché de l'adéfovir a permis d'envisager de nouvelles options pour la prise en charge de la résistance à la lamivudine. L'adéfovir est, en général, actif *in vitro* sur les mutants rtM204I/V/S et son efficacité clinique a été prouvée (sauf dans le cas des variants multirésistants cf paragraphe 2.1.3 et 2.4). Lors de la survenue de mutants YMDD, l'adéfovir peut remplacer la lamivudine ou être prescrit en bithérapie avec la lamivudine. A court terme, la monothérapie semble aussi efficace que la bithérapie chez les patients avec une maladie hépatique compensée. La bithérapie lamivudine-adéfovir semble cependant diminuer le risque de sélectionner des virus résistants à l'adéfovir (66) : cette stratégie doit être préférée chez les patients dont la maladie est plus sévère (111, 137). Le risque de la bithérapie est la sélection de mutants multirésistants. Des études de coût-efficacité sont entreprises pour permettre une meilleure évaluation de chaque stratégie (52). L'utilisation de l'entécavir, à une posologie de 1 mg, au lieu de la posologie de 0,5 mg recommandée pour les patients naïfs à la lamivudine, a montré aussi son efficacité (23) mais le risque de développement de résistance à l'entécavir est présent. Le ténofovir est également actif sur les mutants de résistance à la lamivudine et son efficacité sur la suppression virale semble supérieure par rapport à l'adéfovir en monothérapie (134).

Les conséquences cliniques de l'apparition des mutants de résistance à l'adéfovir sont moins connues. Même si la résistance à l'adéfovir est de plus faible niveau par rapport à la lamivudine, les mutants rtN236T ou A181V peuvent être responsable d'une rechute virale et d'une décompensation hépatique pouvant être fatale chez des patients à un stade avancé de leur maladie (40). La lamivudine est en général active sur les mutants rtN236T ou A181V (excepté les cas de variants multirésistants) de même que l'entécavir et le ténofovir. Les options thérapeutiques peuvent comprendre un remplacement par la lamivudine, l'entécavir ou le ténofovir, ou une bithérapie par lamivudine-adéfovir (40, 113). Le choix de la meilleure alternative thérapeutique doit prendre en compte les éventuelles mutations préexistantes sélectionnées par le traitement antérieur (124).

4. Diagnostic de la résistance

4.1 Diagnostic phénotypique

4.1.1. Définition et intérêts du phénotypage

Le génotypage identifie des mutations connues. Son interprétation peut être rendue difficile en cas de profil de mutations complexe (présence de mutations compensatoires ou de multirésistance). Les études phénotypiques sont importantes lorsque des mutations nouvelles sont identifiées, afin de prouver leur responsabilité dans la résistance virale et d'étudier la sensibilité à d'autres molécules antivirales. Avec le développement de nouvelles molécules et la probabilité grandissante pour un patient de recevoir des combinaisons de traitement ou des successions de molécules différentes, les profils de mutations de résistance sont susceptibles de devenir de plus en plus complexes. L'approche phénotypique est donc appelée à jouer un rôle de plus en plus important dans le diagnostic de la résistance (36, 124).

Les tests phénotypiques déterminent *in vitro* la sensibilité de la souche du patient à un médicament en comparant la concentration de l'antiviral nécessaire pour inhiber la réplication de sa souche avec celle nécessaire pour inhiber la réplication d'une souche sauvage de référence. Le rapport entre la concentration inhibitrice (CI) nécessaire pour le virus du patient et celle nécessaire pour le virus sauvage permet de déterminer un facteur de résistance.

4.1.2 Principe des tests phénotypiques

Les tests phénotypiques appliqués au HBV reposent sur la mesure de la réplication virale en présence de concentrations inhibitrices d'antiviral. Les tests de réplication sont réalisés à partir de lignées cellulaires d'hépatomes (HepG2 et Huh7) transfectées par du matériel génétique du VHB. Le génome entier du VHB est transféré à la cellule par l'intermédiaire de vecteurs viraux ou plasmidiques, ou directement à partir des amplicons de PCR. La détection et la mesure de l'ADN du VHB dans les lignées cellulaires transfectées est réalisée par analyse du Southern blot ou par PCR en temps réel (36).

4.1.2.1 Tests phénotypiques sans vecteurs

Les génomes entiers des variants HBV sont amplifiés par PCR. Des sites de restriction ont été introduits dans les amplicons grâce aux amorces ce qui permet, après coupure, la circularisation des brins d'ADN du VHB dans les lignées cellulaires transfectées. Ces amplicons circularisés servent de matrice à la transcription, à l'image de l'ADNccc dans le

cycle naturel du virus. Cependant par cette technique, la quantité d'ADN intracellulaire synthétisée peut s'avérer faible (mutants défectifs) (36).

4.1.2.2 Tests phénotypiques utilisant des vecteurs

Une méthode récente décrit la construction d'un vecteur baculovirus comprenant 1,1 unité de génome du VHB, ce qui correspond à la taille de l'ARNpg. La transfection dans les cellules Huh7 est produite à partir d'un clone ou d'un mélange de clones. La synthèse de l'ARNpg puis des brins d'ADN du VHB est soumise au contrôle d'un promoteur hétérologue de mammifère placé dans le vecteur. Ce promoteur introduit dans chaque clone permet un haut niveau de synthèse d'ADN. Cette méthode permet donc le clonage du génome entier du VHB d'un patient et apparaît appropriée pour étudier le phénotype engendré par toutes les mutations du génome (37).

Ces études phénotypiques ne peuvent être réalisées que dans des laboratoires spécialisés et expérimentés : les techniques mises en oeuvre sont lourdes et coûteuses et demandent à être standardisées entre laboratoires.

4.2 Diagnostic génotypique

4.2.1 Dynamique virale de la résistance à la lamivudine

La dynamique d'émergence des virus résistants à la lamivudine a été étudiée récemment par clonage et séquençage. Les variants responsables de la résistance préexistent vraisemblablement avant traitement même si leur mise en évidence est rare car elle nécessite des techniques extrêmement sensibles (58, 59). Les mutants de résistance émergent progressivement, représentent d'abord une population minoritaire au sein de la population virale totale puis, par acquisition de mutations compensatoires, remplacent la souche sauvage existante (105). La transition d'une population minoritaire de résistance à la prédominance d'une souche résistante prend entre 2 et 6 mois. Dès que la proportion de mutants est suffisante (5 fois plus de mutants que de souches sauvages), la rechute virale sous traitement a une probabilité très élevée de se produire (69). Plusieurs études ont démontré que, par des techniques sensibles de génotypage, la mise en évidence d'une quasi-espèce minoritaire portant des mutations de résistance à la lamivudine pouvait anticiper de plusieurs mois le rebond viral (47, 48, 58, 99, 105). Le diagnostic précoce de la résistance par la détection des

quasi-espèces minoritaires est important, surtout pour les patients à haut risque de progression de leur maladie hépatique, depuis que des alternatives thérapeutiques existent.

Différentes techniques de génotypage ont déjà été décrites pour la recherche des mutations de résistance à la lamivudine. Certaines de ces techniques ont été adaptées pour l'étude de la résistance à l'adéfovir. Ces méthodes diffèrent par leur capacité à détecter les populations minoritaires et leur praticabilité en routine hospitalière. Seront décrites succinctement les techniques les plus couramment utilisées, les plus sensibles et les plus récentes.

4.2.2 Les techniques de routine utilisées dans les laboratoires

Le séquençage direct post-PCR représente la technique de référence pour la détection des mutations de résistance aux antiviraux. Elle consiste à amplifier par PCR puis séquencer la région d'intérêt du virus, en l'occurrence la transcriptase inverse. Cette méthode permet de détecter à la fois les mutations de résistance, les mutations compensatoires et les mutations de polymorphisme. La sensibilité de caractérisation des mutants est dépendante de celle de la PCR qui permet d'amplifier le fragment recherché (en général, la sensibilité est de l'ordre de 1000 copies/ml). Cependant, avec cette technique, les populations minoritaires du VHB ne sont pas, en général, détectées si leur proportion est inférieure à 25-50% de la population virale totale (106).

Le clonage des produits de PCR suivi du séquençage des différents clones permet d'améliorer la capacité de détection des populations minoritaires, mais cette technique est lourde et coûteuse : la capacité à mettre en évidence le maximum de populations minoritaires dépend du nombre de clones analysés par séquençage (105).

Le kit INNO-LiPA HBV DR v2 (société Innogenetics) permet la détection des mutants de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir par une méthode d'hybridation différentielle, ou dot blot inverse. Les produits de PCR sont déposés sur des sondes immobilisées sur des bandes de nitrocellulose et spécifiques d'un polymorphisme donné : le produit de PCR biotinylé ne s'hybride qu'avec son complémentaire strict. La technique impose une charge virale totale supérieure à 1000 copies/ml mais ce seuil peut être diminué si une 2^{ème} PCR (nichée) est réalisée. La limite de détection de la souche minoritaire est de l'ordre de 5-10% de la population virale totale (57, 90, 126). Cette technique demande cependant une actualisation à chaque fois qu'une nouvelle mutation de résistance est décrite.

La technologie de la PCR en temps réel du Light Cycler a été utilisée pour détecter les variants YMDD de résistance à la lamivudine: l'analyse des courbes de fusion permet de donner la température d'hybridation (T_m ou melting curve) de la sonde avec son ADN

complémentaire. La valeur du T_m est spécifique de la qualité d'appariement de la sonde avec l'ADN cible. Cette méthode reproductible et rapide permet la mise en évidence de populations mixtes. Cependant, l'interprétation reste difficile si une population minoritaire est présente dans une proportion inférieure à 25 % de la population virale totale (141).

4.2.3 Les techniques de recherche :

Le génotypage des variants de résistance à la lamivudine a pu être mis au point grâce à la technologie des puces à ADN. Ce procédé présente l'avantage de pouvoir étudier plusieurs polymorphismes à la fois : chaque sonde d'ADN spécifique de la mutation à détecter est déposée sur le support et mise en contact avec l'ADN cible préalablement amplifié par PCR et marqué par un fluorophore. L'intérêt de cette technologie réside dans sa capacité à traiter un maximum d'échantillons en un minimum de temps. De plus, cette technique offre la perspective de séquencer le génome viral en entier par une méthode beaucoup moins lourde que celle utilisée actuellement. Cependant, le coût du matériel est important et la technologie n'est pas encore assez optimisée pour permettre l'usage courant en diagnostic. D'autre part, la sensibilité de la technique est limitée à des charges virales ≥ 1000 copies/ml et le seuil de détection de la population minoritaire est de l'ordre de 10% (50).

Dans l'étude de Hong en 2004 (47), le génotypage de résistance à la lamivudine est réalisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'ADN est amplifié par PCR grâce à des amorces qui permettent d'introduire des sites de restriction au niveau du motif YMDD. La digestion enzymatique par 2 endonucléases différentes permet d'obtenir 2 oligonucléotides de 13 et 7 mer marqueurs du polymorphisme YMDD. L'analyse du spectre de masse est spécifique de la nature du codon présent en position 204. Cette technique est sensible : elle peut détecter des charges virales de 100 copies/ml et les quasi-espèces minoritaires peuvent être mises en évidence jusqu'à des proportions égales à 1% de la population totale. Cependant, la disponibilité d'un spectromètre de masse est limitée à certains laboratoires. Cette technique a récemment été adaptée pour la détection des mutants rtN236T et A181V de résistance à l'adéfovir (147).

L'étude de Kirishima et al. (58) utilise la propriété des acides nucléiques à squelette peptidique (PNA) pour amplifier préférentiellement les quasi-espèces minoritaires résistantes à la lamivudine. Le PNA est choisi pour être exactement complémentaire du motif YMDD de la souche sauvage. En présence de la souche sauvage, le PNA bloque l'amplification par PCR, le duplex PNA-ADN étant plus stable qu'un duplex ADN-ADN (amorce-ADN cible). En présence de la mutation, le PNA étant plus déstabilisé par le mésappariement que

l'hybride ADN-ADN correspondant, l'amplification de la souche mutée se produit. Une 2^{ème} PCR (PCR-nichée) permet de détecter les différents mutants grâce à l'introduction de sites de restriction spécifiques pour chacune des mutations. Cette technique permet de mettre en évidence 10 copies de plasmides mutants dans un bruit de fond de 10⁵ plasmides sauvages soit une limite de détection de la population minoritaire égale à 0,01%. Cette sensibilité peut être augmentée à 0,001% pour un bruit de fond de 10⁹ plasmides sauvages. Cependant le coût d'un PNA limite son utilisation courante.

Dans notre travail expérimental, nous avons mis au point une technique de PCR sélective en temps réel sensible basée sur la stratégie ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (100) pour détecter les mutants de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir. Cette technique offre un bon compromis entre sensibilité, facilité d'utilisation et coût : elle sera décrite dans la partie Matériels et Méthodes.

Objectifs de l'étude

Le traitement actuel de l'hépatite B repose sur l'interféron- α et les analogues nucléosidiques et nucléotidiques. Les analogues nucléosid(t)iques ont fait preuve de leur efficacité clinique, sont bien tolérés et peu coûteux. Actuellement, en France, seuls la lamivudine et l'adéfovir disposent d'une A.M.M, mais d'autres molécules sont en cours de développement et seront prochainement commercialisées. L'utilisation des analogues nucléosid(t)iques impose une longue durée de traitement qui peut être compromise par l'émergence de virus résistants. La survenue de ces virus résistants est souvent délétère pour l'histoire de la maladie du patient. Les mutations principales associées à la résistance sont la rtM204I/V pour la lamivudine et la rtN236T et/ou la rtA181V/T pour l'adéfovir. La détection génotypique de ces variants de résistance par des techniques sensibles peut précéder de quelques mois l'expression phénotypique de la résistance caractérisée par un rebond significatif de la charge virale du VHB du patient. L'émergence des variants de résistance à la lamivudine est en général progressive, le variant est d'abord minoritaire puis après quelques mois, devient majoritaire au sein de la population virale totale. Le diagnostic précoce de la résistance est important, surtout chez les patients à un stade avancé de leur maladie, et demande donc des méthodes sensibles, capables de détecter les variants de résistance même lorsqu'ils représentent une population minoritaire.

Le but de ce travail a consisté à mettre au point une technique sensible de génotypage capable de détecter et quantifier les variants minoritaires de résistance du VHB à la lamivudine et à l'adéfovir. Une technique de PCR sélective en temps réel a été développée pour étudier les mutations de résistance rtM204I/V et N236T. 1) Cette technique a été initialement évaluée grâce à des plasmides construits par clonage dans le laboratoire. 2) La méthode a été comparée à deux autres techniques de référence qui sont le séquençage direct et le test commercial INNO-LiPA HBV DR v2, en utilisant à la fois des plasmides et des sérums de patients. 3) D'autre part, nous avons examiné par ces 3 techniques un ensemble de patients pour lesquels nous disposons d'un suivi depuis l'initiation du traitement. 4) Enfin, nous avons, de manière rétrospective, recherché la préexistence de mutants rtM204I/V avant traitement chez des patients développant ensuite une résistance à la lamivudine et des patients ne la développant pas.

Matériel et Méthodes

1. Mise au point de la technique de PCR sélective en temps réel

1.1 Principe de la PCR sélective en temps réel

L'étude des duplexes amorce-ADN cible a révélé deux caractéristiques importantes :

- en cas de mésappariement du duplex en 3', l'extension du duplex est considérablement ralentie par rapport à un duplex sans mésappariement en 3' si une Taq polymérase sans activité de correction 3'-5' exonucléasique est utilisée.
- un mésappariement en 3' déstabilise considérablement le duplex.

Le principe de la technique de PCR sélective nommée aussi PCR spécifique d'allèles ou Amplificatory Refractory Mutation System (ARMS) découle de ces propriétés fondamentales (100). En prenant l'exemple de l'étude de la mutation de 2 allèles d'un gène, nous pouvons considérer deux amorces P1 et P2 complémentaires chacune d'un des allèles étudiés, respectivement 1 et 2. L'amorce P1 formera un mésappariement pour l'allèle 2 tandis que l'autre amorce P2 sera parfaitement complémentaire de cet allèle. Le même principe s'applique pour l'amorce P2 (Figure 16).

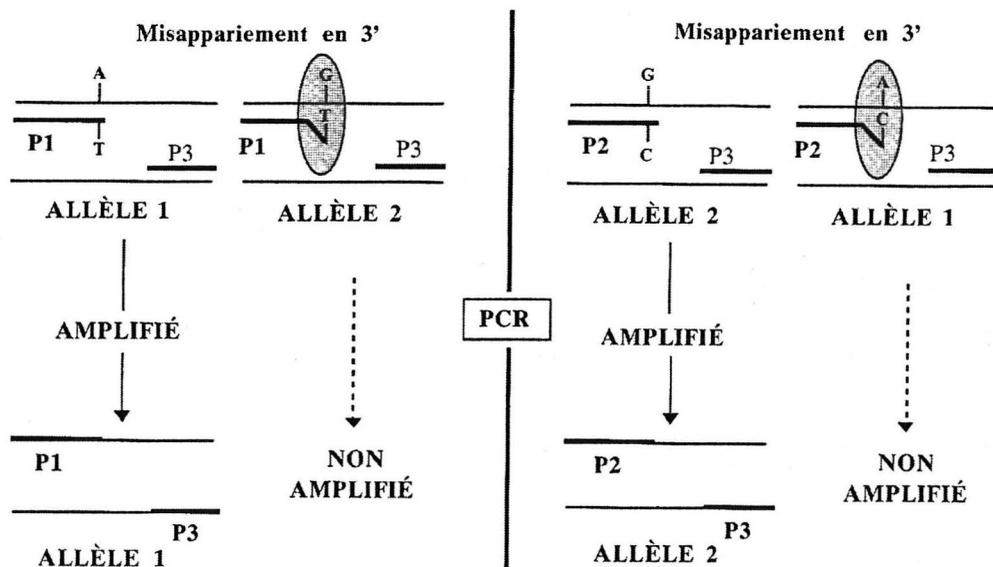


Figure 16 : Principe de la PCR sélective. Les amorces P1 et P2 diffèrent en 3'. L'amorce P1 ne permettra pas l'extension de l'allèle 2 et l'amorce P2 ne permettra l'extension de l'allèle 1. L'amorce P3 est commune aux deux allèles (14).  mésappariement.

Dans ces conditions, en absence de mésappariement, l'allèle cible sera amplifié et, en cas de mésappariement, l'allèle ne sera pas amplifié ou le sera très faiblement.

Les conditions pour une extension optimale dépendent de plusieurs facteurs qui sont, entre autres, le type de mésappariement en 3' terminal de l'amorce (Tableau VI), la température d'hybridation et la concentration en $MgCl_2$.

		Base en 3' de l'amorce			
		T	C	G	A
ADN cible	T	+	+/-	+	1,0*
	C	+	+++	1,0*	+
	G	+	1,0*	+++	+++
	A	1,0*	+	+++	+++

Tableau VI : Pouvoir de discrimination de la PCR spécifique d'allèles en fonction de la nature du mésappariement en 3' terminal. * : 100% d'efficacité de la PCR ; +++ aucune amplification (pouvoir discriminant excellent) ; + : pas d'amplification (mais parfois signal faible, bon pouvoir discriminant) ; +/- un signal faible peut être observé (faible pouvoir discriminant) (61, 142).

Le principe de la PCR spécifique d'allèles peut être appliqué à l'étude des mutations de la transcriptase inverse du VHB (Figure 17). La discrimination entre les différents polymorphismes repose donc sur la spécificité des amorces en 3' terminal : l'extrémité 3' des amorces se situe au niveau du site de la mutation à caractériser. L'amorce exactement complémentaire d'une mutation amplifiera préférentiellement le mutant et sera « réfractaire » à l'amplification de la souche sauvage pour laquelle un mésappariement existe en 3' terminal.

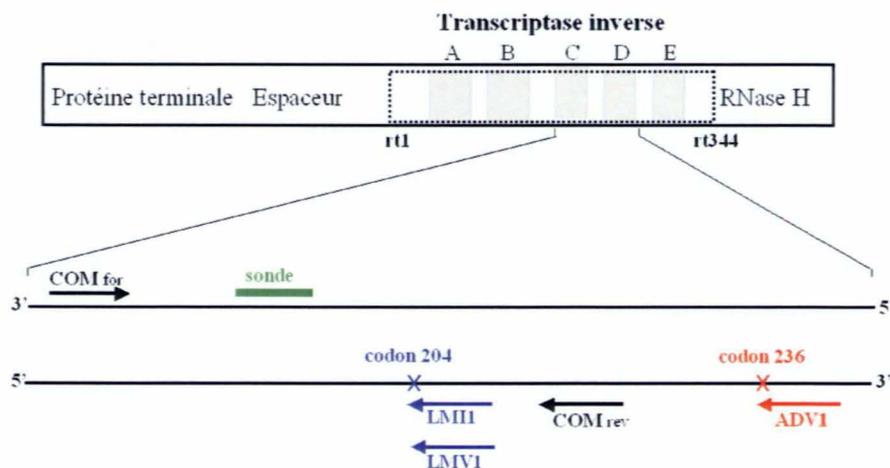


Figure 17: Principe de la PCR discriminante en temps réel appliquée à la recherche des mutations de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir. Les amorces COM for/rev sont des amorces communes pour tous les virus (mutants et sauvages) ; LAMI1, LAMV1 et ADV1 sont des amorces sélectives de l'amplification des variants rtM204I/V (lamivudine) et N236T (adéfovir).

1.2 Choix des amorces sélectives et quantification des variants rtM204I/V et N236T

La méthode de PCR sélective en temps réel a déjà été décrite pour l'étude des mutations principales de résistance à la lamivudine (112, 142). L'amorce LMI1 est spécifique du mutant YIDD (la méthionine est substituée par l'isoleucine) et présente donc un « mismatch » avec la souche sauvage en 3' terminal (A/G). Pour l'amplification du mutant YVDD (la méthionine est substituée par la valine), l'amorce LMV1 présente un mésappariement volontaire en n-1 (G/T) à la fois pour le mutant et la souche sauvage, de façon à renforcer le pouvoir de discrimination entre ces 2 populations (112) (Figure 18).

La technique a été développée dans le laboratoire pour étudier aussi les mutations de résistance à l'adéfovir et plus particulièrement la mutation rtN236T. L'amorce a été choisie exactement complémentaire au mutant rtN236T. L'amorce ADV1 présente un mésappariement G/A en 3' terminal pour la souche sauvage rtN236 (Figure 18).

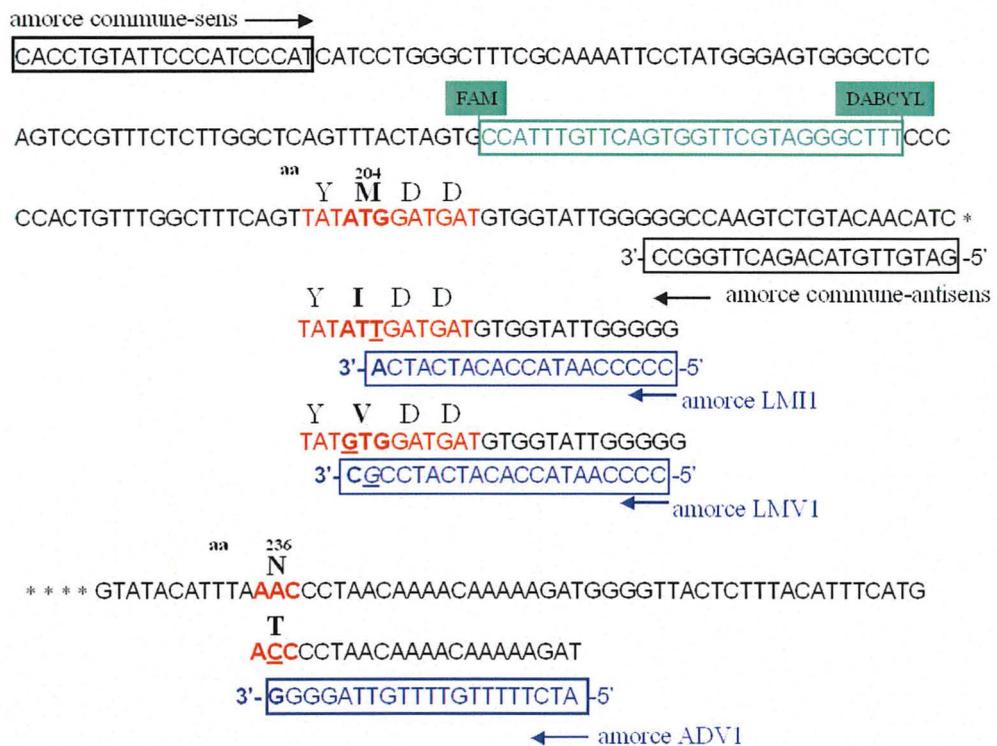


Figure 18 : Sélectivité des amorces utilisées dans la PCR sélective en temps réel. La sélectivité d'amplification des variants de résistance repose sur la spécificité des amorces en 3' terminal (LMI1, LMV1 et ADV1 en bleu). Les amorces communes COM for et rev sont représentées en noir et la sonde d'hybridation « molecular beacon » en vert. *** : troncature du gène ; aa : acides aminés.

La détection et la quantification des mutants rtM204I/V et N236T est toujours réalisée grâce à la même amorce commune sens (COM for), les amorces anti-sens variant en fonction

du mutant à amplifier. Une amorce commune anti-sens (COM rev) permet, associée à COM for, d'amplifier à la fois les variants de résistance et les souches sauvages et donc de déterminer une charge virale totale du VHB.

La sonde utilisée pour la PCR en temps réel est une sonde de type « molecular beacon » comportant un fluorophore en 5' (FAM) et un quencher en 3' (Dabcyl) (112, 142). La proximité du fluorophore et du quencher est favorisée par la structure en épingle à cheveux de la sonde avant son hybridation sur l'ADN cible, ce qui inhibe l'émission de fluorescence. Une fois la sonde hybridée, le fluorophore est libéré de son quencher, la fluorescence peut alors être émise après excitation. Son intensité est proportionnelle à la quantité de produits de PCR formés donc du nombre de molécules d'ADN de départ. Chaque cinétique de PCR en temps réel obtenue est caractérisée par une valeur Ct (Cycle threshold) qui correspond au nombre de cycles à partir duquel l'amplification de l'ADN cible s'accroît de manière exponentielle. La valeur du Ct est liée à la concentration de la cible de départ.

Les sites d'hybridation des amorces et de la sonde appartiennent à des régions de la transcriptase inverse assez conservées entre les différents génotypes.

1.3. Conditions opératoires de la PCR en temps réel:

Les séquences des amorces et de la sonde utilisées sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Amorce/sonde	Séquences	Spécificité (séquence du codon)	Numérotation des nucléotides (EcoR1)
COM for*	5'-CAC CTG TAT TCC CAT CCC AT-3'	Charge virale VHB	595-615
COM rev	5'-GAT GCT GTA CAG ACT TGG CC-3'		758-778
LMI1*	5'-CCC CCA ATA CCA CAT CAT CA-3'	rtM204I (ATT)	740-760
LMV1*	5'-CCC CAA TAC CAC ATC ATC CGC-3'	rtM204V (GTG)	738-759
ADV1	5'-ATC TTT TTG TTT TGT TAG GGG-3'	rtN236T (ACC)	836-856
Sonde*	5'-GT CCC ATT TGT TCA GTG GTT CGT AGG GCT TTG GGA CC-3' (5' FAM, 3'Dabcyl)		687-724

Tableau VII : Séquences des amorces et de la sonde utilisées pour la PCR sélective en temps réel. La spécificité des amorces pour chaque mutant est indiquée avec la séquence du codon correspondant à la mutation. * d'après (112, 142).

La PCR en temps réel est réalisée sur un appareil Light Cycler (Roche Diagnostic, Meylan, France). L'amplification est réalisée dans un capillaire de 20 µl contenant 2 à 5 mM de MgCl₂, 400 nM d'amorce commune sens (COM for), 400 nM d'amorces anti-sens spécifique du mutant à rechercher (LMI1 et LMV1 pour rtM204I/V et ADV1 pour rtN236T) ou 400 nM d'amorce commune anti-sens (COM rev) pour la quantification totale du VHB, 400 nM de sonde « molecular beacon », 2µl de Light Cycler Fast Start DNA Master Hybridation Probes (Roche Diagnostics) et 10 µl de matrice d'ADN du VHB (plasmide ou extrait).

Les conditions de température sont identiques pour la quantification de l'ADN total du VHB et la quantification des mutants rtM204I/V ou rtN236T : étape d'activation 10 min à 95°C suivie de 45 cycles d'amplification (10s d'activation à 95°C, 20s pour l'hybridation testée pour des températures variant de 45 à 60°C et 15s d'élongation à 72°C). La charge virale du patient ainsi que sa quantification en variants de résistance peuvent donc être déterminées en même temps : un premier capillaire contient l'extrait du patient avec la paire d'amorces communes (charge virale, cv) et le deuxième capillaire contient le même extrait avec l'amorce sens commune et l'amorce anti-sens spécifique du mutant à quantifier. Le résultat de la quantification en mutants de résistance (m) est rendue en pourcentage de la charge virale (= $m/cv \times 100$).

2. Evaluation de la technique de PCR sélective en temps réel

2.1 Construction des plasmides par clonage

Quatre plasmides ont été construits : mutant rtM204I (codon ATT), mutant rtM204V (codon GTG), mutant rtN236T (codon ACC) et un plasmide sauvage rtM204 + rtN236 (codon ATG et AAC en position 204 et 236 respectivement). Les souches virales mutantes et la souche sauvage ont été amplifiées à partir de sérums de patients préalablement séquencés en utilisant l'amorce sens 5'-AGA CTC GTG GTG GAC TTC TCT-3' (nucléotides 250-271) et l'amorce anti-sens 5'-CGA GCA AWA CAA GCK GCT AGG A-3' (nucléotides 1257-1280). L'amplification a été réalisée dans un puits de réaction de 50 µl contenant 5 µl de tampon 10X, 4,5 mM de MgCl₂, 500 nmoles de chaque amorce sens et anti-sens, 400 µM de chaque dNTP, 1,5 unités de Hot Start Taq Polymerase (Qiagen, Allemagne) et 5 µl d'extrait d'ADN. Les cycles thermiques ont été effectués sur thermocycleur 9600 Perkin : une étape initiale de

dénaturation à 95°C, suivie de 40 cycles d'amplification (30s à 94°C, 30s à 55°C et 40s à 72°C), puis un cycle final de 10 min à 72°C. La présence des produits de PCR est vérifiée par électrophorèse (95-100V) sur gel d'agarose à 2% (tampon Tris Borate EDTA 1X). La migration a été suivie visuellement par addition à l'échantillon de bleu de bromophénol et de xylène cyanol. L'incorporation d'un agent intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium, fluorescent sous UV, a permis la mise en évidence des produits de PCR sur le gel d'agarose, ainsi que la détermination de la taille des amplicons grâce à la migration en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire (SmartLadder, Eurogentec, Belgique).

Ensuite, les produits de PCR ont été ensuite ligués dans un vecteur plasmidique (pCR[®] 2.1 Vector-3931 pb) et transformés par choc thermique dans les bactéries compétentes One Shot[®] (*Escherichia coli*) en utilisant le kit TOPO TA Cloning suivant les instructions du fabricant (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les bactéries transformées ont été incubées 16h à 37°C sur milieu gélosé Luria Bertani (LB) contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), de l'IPTG (50 µM) et de l'X-gal (80 µg/ml). Après incubation, 5 colonies positives (incolores) ont été recueillies et mises individuellement en culture sur 3,5 ml de milieu liquide LB (contenant 100 µg/ml d'ampicilline) pendant 16h à 37°C et sous agitation. Deux ml de chaque milieu liquide ont été centrifugés pendant 15 min à 6000g. Les plasmides ont été extraits du culot bactérien en utilisant le kit High Pure Plasmid Isolation (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les différents plasmides extraits ont été testés en PCR en temps réel avec les amorces COM rev et COM for suivant le protocole décrit précédemment, puis séquencés pour vérifier la présence de la mutation d'intérêt. Enfin, les plasmides ont été dosés par spectrophotométrie puis dilués avec de l'eau stérile.

2.2. Comparaison de la PCR sélective avec le séquençage et le test INNO-LiPA

2.2.1 Le séquençage direct

Principe de la technique de Sanger:

Le séquençage comprend d'abord une amplification de l'ADN d'intérêt par une PCR conventionnelle, la purification des produits de PCR par filtration sur membrane, et enfin les réactions de séquence par PCR. Le brin sens et le brin anti-sens de l'ADN sont séquencés dans des milieux réactionnels différents (amorce sens et anti-sens). Dans les milieux réactionnels se trouvent la Taq Polymérase, des dNTP en grand nombre et une faible proportion de didéoxynucléotides (ddNTP) qui diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement hydroxyle en 3'. Ces ddNTP sont marqués par des fluorophores qui diffèrent

pour chaque base ACTG. Au cours de la polymérisation, l'incorporation d'un ddNTP entraîne l'arrêt de la synthèse du brin en formation par la polymérase. L'absence du groupement hydroxyle en 3' fait que la liaison phosphodiester ne peut se former entre les nucléotides. L'incorporation des ddNTP est aléatoire et entraîne statistiquement à la fin des réactions de séquence la formation de fragments d'ADN de toutes les tailles différentes possibles.

Les produits de séquence sont ensuite purifiés par filtration et déposés dans le séquenceur où ils subissent une migration par électrophorèse en capillaire. L'échantillon est soumis à une électrophorèse en condition dénaturante sur un gel de polyacrylamide. Une haute tension (supérieure à 100 V/cm) est appliquée entre les deux extrémités du capillaire : plus le fragment est de petite taille, plus la migration est rapide. Avant leur sortie à l'autre extrémité du capillaire, les brins d'ADN sont excités par un laser et la fluorescence émise, de longueur d'onde différente pour chaque nucléotide marqué, est détectée par une barrette de diodes. Le traitement informatisé des signaux transmis permet de reconnaître les séquences d'ADN correspondantes.

Mode opératoire :

L'échantillon (plasmide ou extrait d'ADN) est amplifié avec l'amorce sens P1 : 5'-CTA GAC TCG TGG ACT-3' (nucléotides 255-272) et l'amorce anti-sens P2 : 5'-AGA AAG GCC TTG TAA GTT GG-3' (nucléotides 1102-1121) suivant les mêmes conditions opératoires que celles décrites pour le clonage. Les produits de PCR sont purifiés en utilisant des plaques Montage PCR96 (Millipore, Saint Quentin en Yvelines). Les réactions de séquence sont réalisées grâce aux amorces HBVIS, 5'-GGA TGTGTC TGC GGC GTT T-3' (375-393) et HBVIAS2, 5'-GCA AAD CCC ARA AGA CCC ACA AT -5' (975-997). Chaque puits de réaction de 20 µl contient 1,5 µM d'une amorce sens ou anti-sens, 4 µl de DTCS (kit CEQ DTCS Quick Start, Beckman Coulter, Roissy, France) et 1 à 5 µl de produits de PCR purifiés. Les conditions thermiques de PCR (thermocycleur Perkin 9600) sont les suivantes : dénaturation 20s à 96°C, hybridation de l'amorce 20 s à 50°C, élongation 4 min à 60°C et pendant 30 cycles. HBVIS et HBVIAS2 peuvent aussi servir d'amorces dans les PCR nichées pour augmenter la sensibilité de la 1^{ère} amplification par P1 et P2. Les produits de séquence sont purifiés par filtration sur gel de Sephadex G50 (Millipore) et analysés par le séquenceur automatique (CEQ 2000XL DNA analysis System, Beckman Coulter).

2.2.2 Méthode d'hybridation inverse ou test INNO-LiPA HBV DR v2

Le test commercialisé INNO-LiPA HBV DR v2 (Innogenetics, Gent, Belgique) est un test d'hybridation moléculaire sur bandelette pour la détection simultanée de séquences sauvages ou mutées et de polymorphisme au niveau des codons 80, 173, 180, 181, 204 et 236 du gène de la polymérase du VHB. Le produit de PCR biotinylé hybride spécifiquement des sondes oligonucléotidiques immobilisées en lignes parallèles sur bandelettes. Après hybridation, est ajoutée de la phosphatase alcaline marquée à la streptavidine qui se fixe aux hybrides biotinylés précédemment formés. L'incubation d'un chromogène entraîne un précipité brun/violet (cf chapitre résultats partie 2.1). Pour notre étude, les tests ont été pratiqués suivant les instructions du fabricant.

3. Application de la technique de PCR sélective à des sérums de patients

3.1 Les patients

Les 9 patients choisis ont une hépatite B chronique prouvée sur le plan sérologique, virologique et histologique et sont suivis dans le département d'Hépatologie du Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble (Pr J.P. Zarski). Les patients ont été choisis rétrospectivement selon les critères suivants : hépatite B chronique, sérologies VHC et VIH négatives, traitement à la lamivudine et/ou à l'adéfovir aux posologies habituelles, suspicion de résistance évoquée par une augmentation significative de leur charge virale (≥ 1 log) à un moment donné de leur traitement. La recherche et la quantification des mutants de résistance à la lamivudine ou à l'adéfovir par la technique de PCR sélective en temps réel ont été réalisées pour ces 9 patients, soit 68 sérums au total. L'étude de l'émergence des variants de résistance a pu être réalisée tous les 3 mois, de la date de la mise sous traitement jusqu'au pic du rebond viral. Pour 2 patients, la dynamique des variants a pu être étudiée sur une longue période permettant d'apprécier aussi le devenir des variants après le pic du rebond viral et l'instauration d'un nouveau traitement.

En parallèle, la recherche de variants rtM204I/V a été réalisée de manière rétrospective sur 14 patients avant traitement à la lamivudine. Parmi ces patients, 6 ont développé une résistance à la lamivudine dont 4 avant 18 mois de traitement et 2, entre 18 mois et 3 ans de traitement. Les 8 autres patients n'ont pas développé de résistance à la lamivudine après 3 ans de traitement.

3.2 Extraction de l'ADN viral des sérums des patients

L'ADN a été extrait en utilisant le kit Qiagen QIAmp[®] DNA (Qiagen, Courtaboeuf, France) à partir de 200 µl de sérum. L'extraction comportait les étapes suivantes : lyse du virus, dénaturation des complexes nucléoprotéiques, inactivation des nucléases endogènes. L'ADN précipité par l'éthanol absolu a été fixé sur une colonne de gel de silice et après 2 étapes de lavage successives, l'ADN a été élué par 50 µl de tampon d'éluion et stocké à -80°C.

3.3. Quantification de l'ADN du VHB par la technique Cobas Amplicor Monitor

La charge virale a été mesurée par le système de référence Cobas Amplicor HBV Monitor[™] de Roche (extraction Cobas). Ce procédé est basé sur une PCR compétitive avec co-amplification d'une région conservée du virus (région précore) et d'un standard interne qui est un plasmide comportant des séquences proches de l'ADN cible. La limite de sensibilité de la technique est de 200 copies/ml. Le protocole d'extraction et de détermination de la charge virale a été réalisé selon les recommandations du fournisseur (Roche Diagnostics, Meylan, France).

3.4 Quantification des mutants de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir

La quantification des variants rtM204I/V et rtN236T a été réalisée comme décrit précédemment dans le paragraphe 1.3. La charge virale obtenue par les amorces Com for/rev de la PCR sélective a été comparée avec les résultats de la charge virale mesurée par la technique de référence, Amplicor Monitor.

Résultats

1. Validation de la technique de PCR sélective en temps réel

1.1 Optimisation de la PCR sélective

Deux facteurs principaux ont été étudiés pour optimiser la PCR sélective : la température d'hybridation et la concentration en $MgCl_2$. La température d'hybridation des amorces et de la sonde a été étudiée entre 45 et 60°C. La sélectivité d'amplification, par leur amorce respective LMI1 et LMV2, des plasmides mutants rtM204I/V par rapport au plasmide sauvage rtM204 augmente avec l'élévation de la température d'hybridation. Cependant, ceci entraîne une diminution de l'intensité des courbes de fluorescence. De même, en faisant varier la concentration en $MgCl_2$ de 2 à 5 mM, les plasmides mutants rtM204I/V sont préférentiellement amplifiés pour des concentrations faibles en $MgCl_2$, mais la diminution de la concentration en $MgCl_2$ affecte aussi l'intensité de la fluorescence (Tableau VIII). Pour l'ensemble de nos expériences, les conditions opératoires permettant le meilleur compromis, entre sélectivité et obtention de courbes de fluorescence sans équivoque pour l'interprétation des résultats, ont été choisies c'est à dire, une température d'hybridation fixée à 50°C et une concentration en $MgCl_2$ égale à 3 mM. Les mêmes conditions ont été adoptées pour l'étude de la mutation N236T à l'adéfovir.

Conditions opératoires	Amorce LMI1			Amorce LMV1		
	M204I (10^3)	M204 (10^6)	M204I (10^3) + M204 (10^6)	M204V (10^3)	M204 (10^6)	M204V (10^3) + M204 (10^6)
MgCl₂ = 3mM						
T = 45°	32,09	34,04	31,98	32,73	32,07	31,34
T = 50°	31,82	34,57	31,61	31,55	32,04	30,84
T = 55°	31,92	34,83	31,27	31,64	32,75	31
T = 60°	31,05	35,53	31,27	32,28	32,11	31,06
T = 50 °C						
MgCl ₂ = 2mM	31,17	34,85	31,85	31,57	33,18	31,46
MgCl ₂ = 3mM	32,08	34,92	31,74	32,33	32,21	31,21
MgCl ₂ = 4mM	32,07	33,80	31,72	32,33	31,10	30,47
MgCl ₂ = 5mM	32,05	33,18	31,62	32,69	31,04	30,65

Tableau VIII : Optimisation de la PCR sélective. Les chiffres représentent les valeurs de Ct (Cycle threshold = cycle où commence l'amplification de l'ADN) observées suivant les variations des conditions opératoires pour les plasmides rtM204I (10^3 copies), rtM204V (10^3 copies) et rtM204 (10^6 copies) seuls ou en mélange. La souche sauvage M204 est moins bien amplifiée pour une T= 60° et une concentration en $MgCl_2$ égale à 2mM, contrairement aux mutants M204I/LMI1 et M204V/LMV1.

1.2 Spécificité des amorces LMI1, LMV2 et ADV1

La spécificité de chaque amorce a été testée vis à vis des différents plasmides (Tableau IX). L'amplification non spécifique de la souche sauvage est retardée en moyenne d'au moins 10 cycles par rapport à l'amplification du mutant d'intérêt, ce qui équivaut à une amplification 1000 fois moins importante. L'amorce COM rev permet de vérifier que la quantité des différents plasmides est la même.

Amorces	Plasmide rtM204I 10 ⁵ copies	Plasmide rtM204V 10 ⁵ copies	Plasmide rtN236T 10 ⁵ copies	Plasmide sauvage 10 ⁵ copies
LMI1	23,96 ± 0,16	32,34 ± 0,37		36,93 ± 0,26
LMV1	36,74 ± 0,32	24,09 ± 0,18		34,22 ± 0,30
ADV1			24,18 ± 0,28*	34,55 ± 0,33*
COMrev	24,35 ± 0,22	24,15 ± 0,39	24,40 ± 0,21*	24,53 ± 0,40

Tableau IX: Spécificité de la PCR sélective en temps réel. La moyenne des valeurs de Ct ± l'écart type est donnée pour les différents plasmides à 10⁵ copies avec les différentes amorces (n=10 mesures sauf *, n= 5 mesures).

1.3 Sensibilité de la technique de PCR sélective en temps réel

La sensibilité de la technique a été estimée grâce à la dilution des différents plasmides et a été déterminée comme étant la dernière dilution pouvant être détectée de manière répétée et différente d'un blanc (H₂O). L'expérience a été renouvelée au moins 6 fois à des moments différents pour chaque plasmide et son amorce correspondante. La sensibilité a été trouvée égale à 10 copies de plasmides / capillaire de réaction pour l'ensemble des amorces sélectives LMI1, LMV1 et ADV1.

1.4 Estimation de la limite de sélectivité de la technique

Pour estimer la sélectivité de la technique, des plasmides mutants ont été mélangés dans différentes proportions à du plasmide sauvage. Les plasmides mutants se trouvaient mélangés dans des proportions égales à 100%, 20%, 1%, 0,1% et 0%. La quantité totale de plasmides par mélange était identique pour tous et égale à 10⁵ copies. La limite de détection du plasmide mutant a été établie en fonction du seuil en dessous duquel il était impossible de différencier l'amplification du plasmide mutant minoritaire de celle du bruit de fond composé du plasmide sauvage. La technique était capable de détecter 100 copies de mutants dans une population totale de plasmides égale à 10⁵ copies, sans risque de confondre leur amplification respective

(Figure 19 et Tableau X). La limite de détection a donc été évaluée à 0,1% pour les amorces spécifiques des mutants rtM204I, M204V et N236T. Le même résultat a été trouvé pour des bruits de fond équivalents de 10^4 à 10^8 copies de plasmide sauvage.

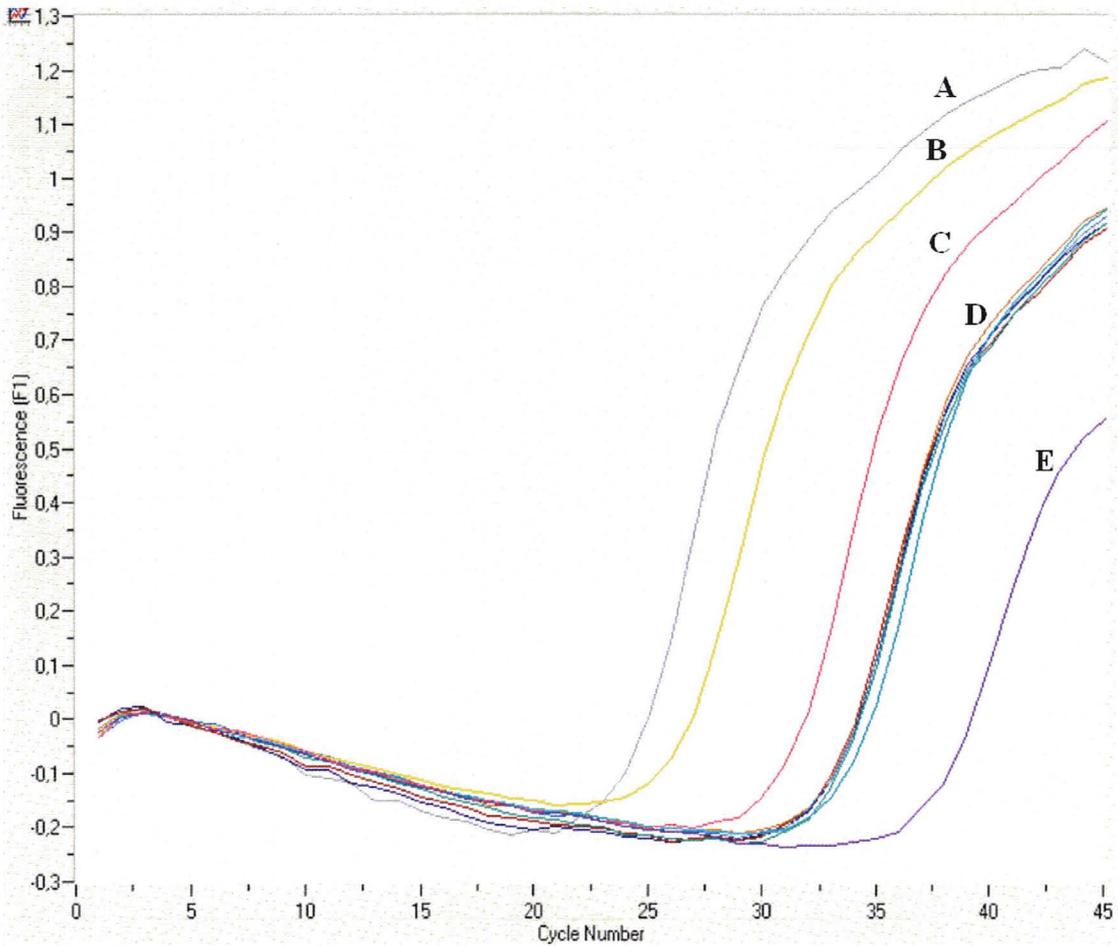


Figure 19 : Capacité de discrimination de la PCR sélective. Le plasmide rtM204I est mélangé au plasmide sauvage dans différentes proportions : **A** : 100% de M204I ; **B** : 20% de M204I ; **C** : 1% de M204I ; **D** : 0,1% de M204I (n=6) ; **E** : 0% M204I ou 100% de plasmide sauvage.

	rtM204I/LMI1	rtM204V/LMV1	rtN236T/ADV1
100 copies de plasmides mutants dans 10^5 copies de plasmides sauvages : moyenne Ct \pm écart type (n=6)	32,45 \pm 0,36	32,59 \pm 0,25	32,17 \pm 0,42
10^5 copies de plasmides sauvages : moyenne Ct \pm écart type (n=6)	36,93 \pm 0,26	34,22 \pm 0,30	34,55 \pm 0,33
Δ Ct	4,48	1,63	2,38

Tableau X : Pouvoir de discrimination de la PCR sélective estimé par l'écart de Ct (Δ Ct) entre l'amplification du mutant minoritaire à 0,1% et la population virale totale à 10^5 copies. Les écarts de Ct sont $> 1,5$ ce qui est statistiquement suffisant (risque $\alpha < 0,05$) pour ne pas confondre l'amplification de la population minoritaire de l'amplification du bruit de fond composé de plasmide sauvage.

1.5 Répétabilité et reproductibilité de la quantification par PCR sélective en temps réel à partir de mélanges de plasmides.

Des mélanges de 20%, 1% et 0,1% de plasmides mutants dilués avec du plasmide sauvage ont été réalisés pour ces essais de répétabilité et de reproductibilité. La quantité totale de plasmides était de 10^5 copies. Pour les essais de répétabilité, les échantillons ont été analysés 6 fois dans le même programme de PCR. Pour les essais de reproductibilité, les échantillons ont été analysés 6 fois dans 6 expériences différentes. Pour chacun des mélanges, la quantification des mutants de résistance dépendait de 2 PCR : une correspondant à la quantification de l'ADN total et une autre correspondant à la quantification spécifique du mutant de résistance. La validation prend en compte la variabilité issue des 2 PCR (Tableau XI).

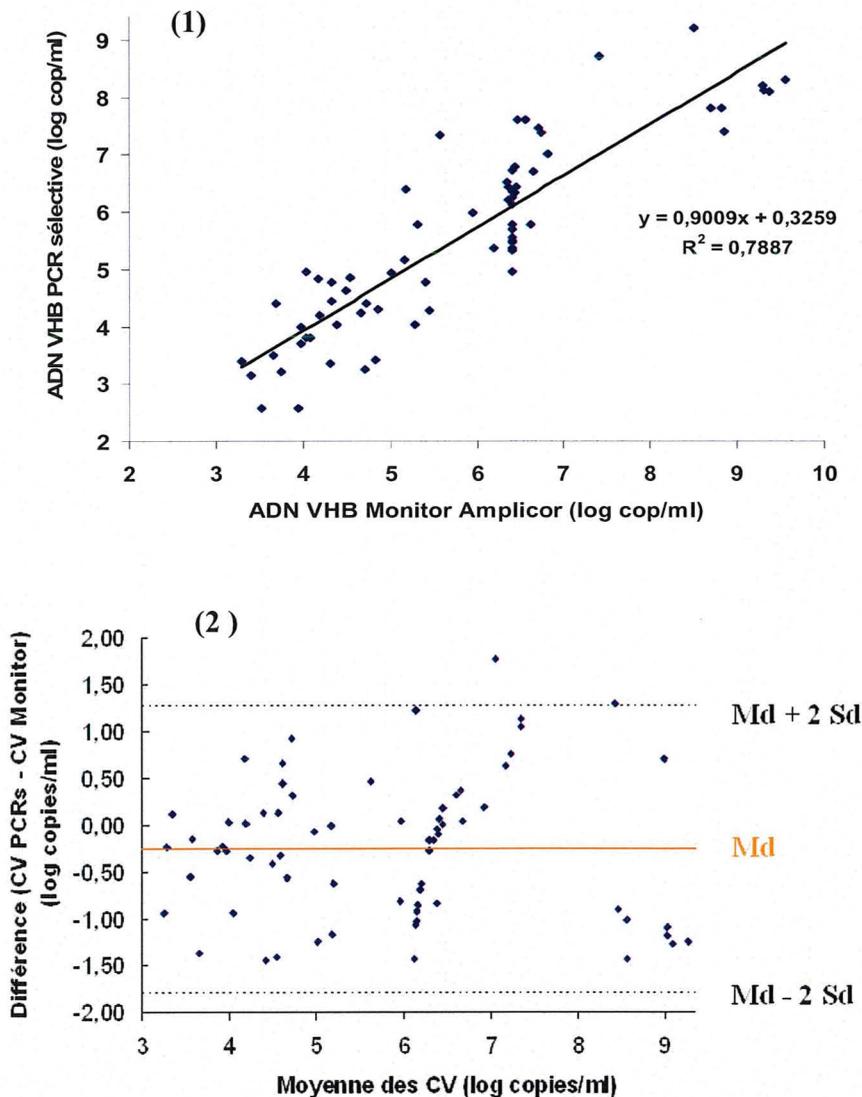
Pour les essais de répétabilité, les coefficients de variation (CV) correspondant à la quantification des mutants rtM204I aux proportions 20, 1 et 0,1% étaient respectivement de 15, 10 et 20%. Pour les mutants rtM204V, les CV étaient de 15, 11 et 15% respectivement pour les mêmes concentrations. Concernant les essais de reproductibilité, les CV étaient de 18, 32 et 42% pour le plasmide M204I, et de 18, 22 et 27% pour le plasmide M204V aux proportions respectives de 20, 1 et 0,1% (Tableau XI). La validation n'a pas été réalisée pour le plasmide rtN236T.

		Répétabilité			Reproductibilité			
		(n = 6)			(n = 6)			
		m	s	CV %	m	s	CV %	
Plasmide M204I dilué dans 10 ⁵ copies de plasmide sauvage dans différentes proportions	20%	ADN total (cop/cap) amorce COM for-rev	73347	5919	8	75792	11488	15
		PCR Selective (cop/cap) amorce LMI1	12457	990	8	13594	1720	13
		Mutant / ADN total (%)	17	2,6	15	18	3,3	18
	1%	ADN total (cop/cap) amorce COM for-rev	57886	3933	7	71761	12383	17
		PCR Selective (cop/cap) amorce LMI1	439	16	4	538	123	23
		Mutant / ADN total (%)	0,8	0,07	10	0,8	0,25	32
	0,1%	ADN total (cop/cap) amorce COM for-rev	88080	4320	5	66241	12638	19
		PCR Selective (cop/cap) amorce LMI1	81	15	19	119	34	28
		Mutant / ADN total (%)	0,10	0,02	20	0,19	0,08	42
Plasmide M204V dilué dans 10 ⁵ copies de plasmide sauvage dans différentes proportions	20%	ADN total (cop/cap) amorce COM for-rev	105315	3574	3	87249	19314	22
		PCR Selective (cop/cap) amorce LMV1	18649	2591	14	20790	4429	21
		Mutant / ADN total (%)	18	2,7	15	24	4,43	18
	1%	ADN total (cop/cap) amorce COM for-rev	62178	3440	6	70357	16503	23
		PCR Selective (cop/cap) amorce LMV1	715	53	7	690	131	19
		Mutant / ADN total (%)	1,2	0,12	11	1,0	0,22	22
	0,1%	ADN total (cop/cap) amorce COM for-rev	64752	8103	21	59965	10276	17
		PCR Selective (cop/cap) amorce LMV1	368	39	11	236	91	38
		Mutant / ADN total (%)	0,57	0,08	15	0,38	0,10	27

Tableau XI : Validation de la PCR sélective : résultats des essais de répétabilité et de reproductibilité de la quantification des plasmides mutants rtM204I/V dilués à 20, 1 et 0,1% dans 10⁵ copies de plasmide sauvage par la technique de PCR sélective en temps réel (m= moyenne, s= écart type estimé, CV= coefficient de variation, cop/cap= copies/capillaire ou réaction).

1.6 Comparaison des résultats de charge virale obtenus par la technique de PCR sélective et le système Cobas Amplicor Monitor sur 68 sérums de patients

La quantification de l'ADN VHB par les amorces COM for et COM rev est corrélée de manière significative avec la détermination de la charge virale par le système Cobas Amplicor Monitor : le coefficient de corrélation est égal à 0,88 (coefficient de corrélation de Spearman). La comparaison des résultats des charges virales (cv) obtenues par les 2 techniques est représentée dans les graphiques ci-dessous (Figures 20 et 21).



Figures 20 et 21 : Comparaison des résultats de charge virale (cv) donnés par Monitor Amplicor et PCR sélective (n=68). Figure 20 : Droite de régression entre la cv Monitor Amplicor et la cv par PCR sélective (1). Le coefficient de régression linéaire R^2 est égal à $\approx 0,79$. Figure 21 : Accord entre les mesures obtenues par Monitor Amplicor et les mesures obtenues par PCR sélective (2). Md = moyenne des différences ; $Md \pm 2Sd$ = intervalle de confiance à 95% de Md.

La pente de la droite de régression linéaire ($y = 0,9009x + 0,3259$, $R^2 = 0,7887$) a été testée à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0 ce qui permet de conclure à l'égalité des mesures par les 2 méthodes ($Y=X$ avec le risque $\alpha = 5\%$). L'accord entre les résultats de cv donnés par le système Cobas Amplicor Monitor et les résultats de cv donnés par PCR sélective est satisfaisant : plus de 95% des points appartiennent à l'intervalle de confiance de la moyenne des différences (12) (Figure 20).

2. Comparaison de la technique de PCR sélective avec le séquençage et le test INNO-LiPA HBV DR v2.

2.1 Comparaison de la sensibilité et de la sélectivité des techniques en utilisant les plasmides

Pour comparer la technique de PCR sélective avec les autres méthodes de génotypage, des mélanges de plasmide sauvage avec des plasmides mutants présents dans les proportions de 50, 20, 10, 5, 1 et 0,1% ont été effectués. Tous les échantillons ont été testés pour 3 populations totales de plasmides différentes, 10^5 , 500 et 100 copies. Chaque mélange a été analysé à la fois par séquençage direct, par INNO-LiPA et par PCR sélective en temps réel.

Le séquençage direct a permis de détecter le mutant minoritaire jusqu'à une proportion de 10% pour des quantités totales d'ADN plasmidique égales à 10^5 et 500 copies (Figure 22). Pour une population totale de plasmides de 100 copies, le séquençage ne permet la détection du mutant que dans l'échantillon où il représente 50% de la population plasmidique totale. Ce résultat est en relation avec la sensibilité de la PCR qui précède le séquençage.

Les résultats obtenus par le test INNO-LiPA HBV DR v2 sont similaires quelle que soit la population d'ADN plasmidique totale analysée. L'échantillon contenant 5% de plasmides mutants a été détecté pour les populations totales de 10^5 , 500 et 100 copies de plasmides (Figure 22).

La technique de PCR sélective en temps réel perd sa haute capacité à détecter le mutant minoritaire dès que la population totale d'ADN décroît. Pour 10^5 copies de plasmides, la dernière dilution détectée est celle comportant 0,1% de mutants. Pour 500 et 100 copies de plasmides, la PCR sélective détecte au mieux les échantillons contenant, respectivement, 5% et 10% de plasmides mutants. Ces résultats sont conformes à nos attentes étant donné la

sensibilité de la technique qui est de 10 copies de plasmides/réaction. La comparaison des performances des 3 techniques est représentée dans le Tableau XII.

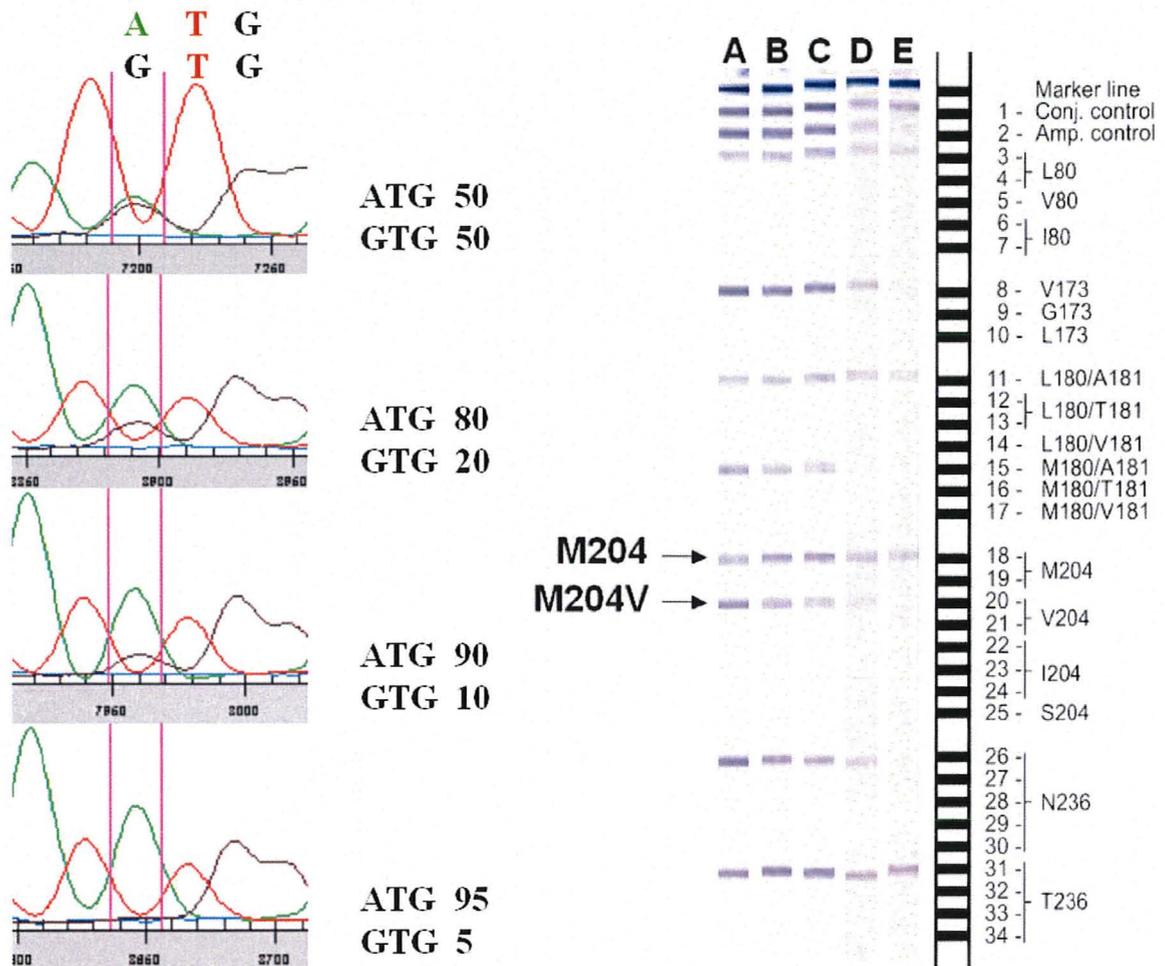


Figure 22 : Détection de la population minoritaire rtM204V par séquençage direct (à gauche) et par INNO-LiPA HBV DR v2 (à droite) dans une population totale d'ADN plasmidique de 10^5 copies. Le mutant rtM204V (codon GTG) peut être détecté jusqu'à une proportion égale à 10% en mélange avec le plasmide sauvage présent à 90% (codon ATG). Cinq bandes sont représentées à droite avec les proportions suivantes de plasmides rt M204V mélangés à du plasmide sauvage M204: A : 50%, B : 20%, C : 10%, D : 5%, E : 1%. La bande D est positive pour M204V, mais faiblement. Le plasmide sauvage arbore, par ailleurs, les marqueurs moléculaires, visibles sur la bande, suivants : L80, V173, L180, N236T et le plasmide M204V les marqueurs L80, V173, L180M, N236.

La comparaison a été réalisée avec les plasmides mutants rtM204I et rtM204V et les résultats obtenus sont identiques pour les 2 types de plasmides. La comparaison n'a pas pu être effectuée avec le plasmide rtN236T.

	ADN total = 10 ⁵ copies			ADN total = 500 copies			ADN total = 100 copies		
	séquençage direct	INNO-LiPA	PCR sélective	séquençage direct	INNO-LiPA	PCR sélective	séquençage direct	INNO-LiPA	PCR sélective
50%	WT/V	WT/V	V	WT/V	WT/V	V	WT/V	WT/V	V
20%	WT/V	WT/V	V	WT/V	WT/V	V	WT	WT/V	V
10%	WT/V	WT/V	V	WT/V	WT/V	V	WT	WT/V	V
5%	WT	WT/V	V	WT	WT/V	V	WT	WT/V	-
1%	WT	WT	V	WT	WT	-	WT	WT	-
0,1%	WT	WT	V	WT	WT	-	WT	WT	-

Tableau XII : Comparaison du séquençage direct, du test INNO-LiPA et de la PCR sélective en temps réel pour différentes proportions de plasmides mutants (50%, 20%, 10%, 5%, 1% et 0,1%) mélangées à du plasmide sauvage et pour différentes quantités d'ADN plasmidique total (10⁵, 500 et 100 copies). WT (wild type) : plasmide sauvage détecté, V (variant) : plasmide mutant détecté, - : plasmide mutant non détecté.

2.2 Comparaison des résultats de la PCR sélective, du séquençage et du test INNO-LiPA sur des sérums de patients

Vingt-six sérums de patients ont été analysés par PCR sélective, séquençage direct et par INNO-LiPA HBV DR v2 (Tableau XIII). La comparaison entre le séquençage et la PCR sélective a révélé 10 résultats discordants dans lesquels la PCR sélective détectait un variant que le séquençage ne détectait pas. Les variants non détectés par le séquençage ont été retrouvés par INNO-LiPA pour 8 échantillons sur 10, confirmant les résultats de la PCR sélective. Tous les variants non détectés par séquençage étaient minoritaires, représentant entre 1 et 18% de la population virale totale. La majorité des variants rtM204I/V non détectés (sérums 16-22 et 25) par séquençage a été retrouvée chez un patient après arrêt du traitement par lamivudine. Dans les sérums 1 et 2, le variant rtM204I n'a pas été détecté mais coexistait avec le variant rtM204V majoritaire qui, lui, a été détecté par séquençage.

sérum	Séquençage direct		PCR sélective		INNO-LiPA DR vr2		Charge virale (log cop/ml)
	Codon 204	Codon 236	Codon 204	Codon 236	Codon 204	Codon 236	
1	V	N	V 67% / I 12%	-	Non amplif	Non amplif	4,83
2	V	N	V 80% / I 10%	-	V	N	7
3	M	N	Variant nd	-	M	N	9,29
4	M	N	Variant nd	-	M	N	5,89
5	M/V/I	N	V 48% / I 24%	-	V/I	N	6,87
6	M/V/I	N	V 45% / I 21%	-	V/I	N	8,84
7	M/V/I	N	V 58% / I 20%	-	V/I	N	9,37
8	M/V/I	N	V 50% / I 20%	-	V/I	N	9,55
9	M/V/I	N	V 25% / I 10%	-	V/I	N	6,65
10	M/V/I	N	V 67% / I 20%	-	V/I	N	5,88
11	M/V/I	N	V 43% / I 20%	-	V/I	N	5,57
12	M/V/I	N	V 51% / I 25%	-	V/I	N	5,31
13	M/V/I	N	V 49% / I 25%	-	Non amplif	Non amplif	4,86
14	M/V/I	N	V 19% / I 15%	-	M/V/I	N	4,94
15	M/V	N	V 22% / I 12%	-	Non amplif	Non amplif	4,16
16	M	N	V 7% / I 10%	-	M	N	4,04
17	M	N	V 8% / I 18%	-	M/I/V	N	3,98
18	M	N	V 8% / I 17%	Variant nd (T 4% [§])	M/I/V	N/T	3,29
19	M	N/T	V 8% / I 10%	T 21%	M/I/V	N/T	4,08
20	M	N/T	V 2%	T 34%	M	N/T	4,86
21	M	N/T	I 13%	T 29%	M/I/V	N/T	3,74
22	M	N/T	V 14%	T 27%	M/V	N/T	3,65
23	M*	N*	Non amplif	Non amplif	Non amplif	Non amplif	2,31
24	I	N	I 20%	-	Non amplif	Non amplif	5,57
25	M	N	I 1%	-	I	N	9,30
26	M	N	Variant nd	-	M	N	8,81

Tableau XIII : Comparaison de sérums de patients par séquençage, PCR sélective et INNO-LiPA. La charge virale indiquée en log copies/ml correspond à la mesure donnée par la technique de référence Amplicor Monitor. Cinq sérums n'ont pas pu être amplifiés pour le test INNO-LiPA et 1 pour la PCR sélective (Non amplif). Les sérums 2, 5-15 ont été analysés dans la même série où un manque de sensibilité de la PCR d'amplification du test INNO-LiPA est suspecté : ces échantillons n'ont pas encore pu être re-testés. * Le sérum 23 a été amplifié après une PCR nichée. [§] Sérum quantifié a posteriori avec un autre protocole d'extraction (M : M204 ; V : M204V ; I : M204I ; N : N236 ; T : N236T ; nd : non détecté ; - non testé).

La comparaison entre la PCR sélective et le test INNO-LiPA a montré 5 résultats discordants. Pour 3 sérums, la PCR sélective a détecté un variant minoritaire M204I/V, dans des proportions comprises entre 2 et 10%, qui n'a pas été trouvé par le test INNO-LiPA ou le séquençage : 2 sérums correspondent à un suivi de patients après arrêt du traitement à la lamivudine (sérum 16 et 20), et un sérum à l'émergence du variant M204I en coexistence avec le variant M204V majoritaire et détecté par les 3 techniques (sérum 2). Dans 2 cas où la charge virale des sérums était faible (sérums 18 et 21), le test INNO-LiPA a mis en évidence un variant qui n'a pas été détecté par les autres méthodes. La détection dans le sérum 18 du variant N236T par le test INNO-LiPA intervient dans un contexte d'émergence de la résistance et a donc une importance clinique. Ce variant n'a pas pu initialement être détecté par PCR sélective. Un autre protocole d'extraction partant d'un volume de sérum plus important a permis, a posteriori, de détecter ce variant minoritaire à 4%. Un variant minoritaire M204I estimé à 1% par PCR sélective (sérum 25) a également été détecté par le test INNO-LiPA, malgré la faible proportion retrouvée. La charge virale pour ce sérum était très élevée (9,3 log copies/ml). Le sérum 23 a pu être amplifié pour le séquençage direct après une PCR nichée. Ce protocole n'a pas été mis en oeuvre pour le test INNO-LiPA.

3. Recherche des variants chez des patients atteints d'hépatite B chronique

3.1 Caractéristiques cliniques des patients avant traitement

Les caractéristiques cliniques des patients avant traitement sont représentées dans le tableau XIV.

Caractéristiques cliniques des patients (P) avant traitement						
	Sexe	Age (années)	Génotype	Ag HBe	Charge virale (log cop/ml)	ALAT
P1	M	52	E	-	4,7	1,4N
P2	M	67	nr	-	7,3	3N
P3	M	50	D	-	9,3	6N
P4	M	43	D	-	4,3	2N
P5	M	42	A	+	9,4	5N
P6	M	43	nr	-	4	1,4N
P7	M	42	D	-	6,7	2N
P8	F	54	D	-	3,3	3,2N
P9	M	42	D	-	6,5	2N

Tableau XIV. Caractéristiques cliniques des patients (P1-9) avant traitement. Le génotype n'a pas été déterminé pour P2 et P6. La charge virale a été déterminée par le système Cobas Amplicor Monitor. N= limite supérieure de normalité des ALAT (3-30 UI/l). nr =non réalisé.

3.2 Etude de l'émergence des variants rtM204I/V et rtN236T par PCR sélective

L'émergence des variants de résistance a été étudiée pour 9 patients (P1-P9). Pour 2 patients (P6 et P9), aucun variant n'a été détecté malgré un rebond viral significatif. Ces résultats ont été confirmés par séquençage (Figure 23).

Pour 5 patients (P1, P2, P4, P5 et P7), la détection génotypique des mutants rtM204I/V était contemporaine de la remontée significative de la charge virale (≥ 1 log). En revanche, pour le patient P3, la détection du variant N236T précédait de 6 mois la remontée de plus de 1 log de l'ADN du VHB. A l'inverse, le rebond viral précédait la détection du variant N236T pour le patient P8). Une réactivation de l'hépatite (augmentation des ALAT > 2 fois la limite supérieure de normalité) est survenue chez 5 patients (P1, P3, P4, P7 et P8). Elle était dans la plupart des cas différée d'au moins 3 mois par rapport à la rechute virale, sauf pour la résistance à l'adéfovir chez le patient P3 où l'exacerbation de l'hépatite était contemporaine du rebond viral.

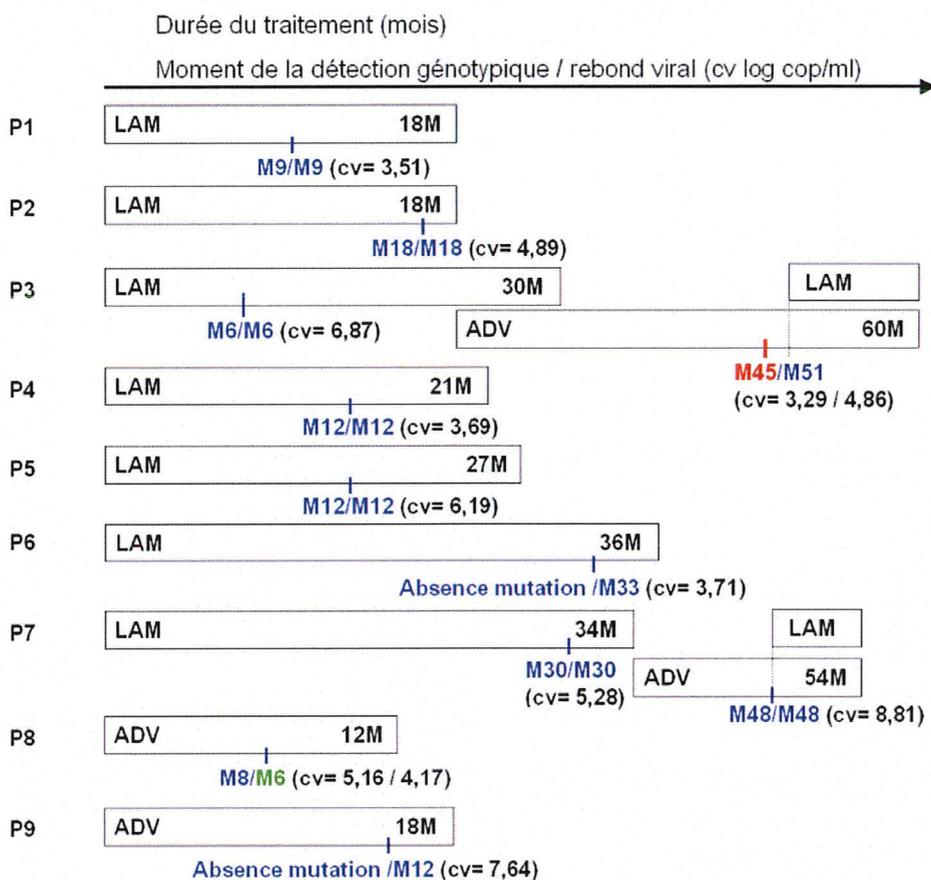


Figure 23 : Emergence des mutants rtM204I/V et N236T chez les patients P1 à P9. La durée du traitement est indiquée avec le moment de la rechute virale et de la détection du variant de résistance à la lamivudine (LAM, rtM204I/V) ou à l'adéfovir (ADV, N236T) par PCR sélective. Aucun variant n'a été détecté chez P6 et P9. La détection génotypique était souvent contemporaine du rebond viral sauf pour P3 où le variant N236T a été retrouvé 6 mois avant (M45 en rouge) et pour P8 où la rechute virale (M6 en vert) a précédé la détection génotypique. M = mois.

La cinétique d'émergence des variants rtM204I/V, ainsi que leur disparition après instauration de l'adéfovir ou de la bithérapie lamivudine-adéfovir, a été étudiée pour les patients P3 (Figure 24) et P7. La dynamique des variants de résistance rtN236T pour le patient P8 est représentée en figure 25. Les résultats des cinétiques concernant les autres patients sont présentés en annexe 1 et 2.

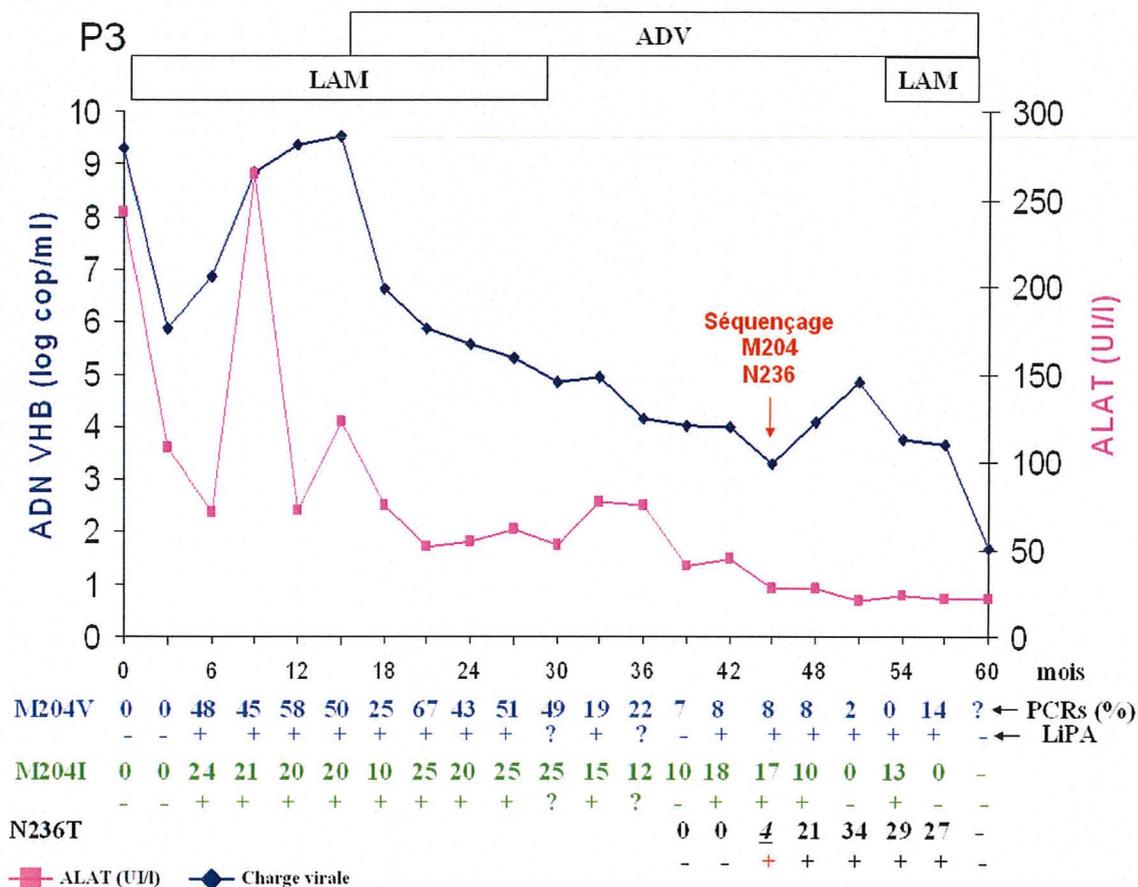


Figure 24 : Evolution des charges virales (bleu) et des ALAT (rose) du patient P3 sous traitement par lamivudine et/ou adéfovir en fonction de l'émergence de variants de résistance rtM204I/V et/ou N236T quantifiés par PCR sélective. Le sérum à M60 a été amplifié par séquençage et LiPA après une PCR nichée (? , non amplifié, - résultat négatif ou + positif par INNO-LiPA ; 4 variant quantifié à 4% grâce à une technique d'extraction plus sensible).

Le patient P3 a développé une résistance à la lamivudine après 6 mois de traitement (Figure 24) : elle était caractérisée par une augmentation de 1 log de la charge virale et par la détection d'une population mixte de variants rtM204V à 48% et M204I à 24% par PCR sélective. La présence du virus sauvage a également été révélée par séquençage. La réactivation de l'hépatite est survenue au 9^{ème} mois et était caractérisée par une augmentation de 8 fois la limite supérieure de normalité des ALAT. L'adjonction de l'adéfovir au 15^{ème} mois, alors que la charge virale était revenue à son niveau initial pré-thérapeutique, a permis

une diminution significative de la charge virale (jusqu'à -6 log au mois 45). L'adéfovir a été efficace sur les mutants de résistance à la lamivudine, la diminution de l'ADN VHB correspondant à la diminution des variants dans le sérum du patient. Au mois 33, les variants rtM204V/I étaient toujours présents mais n'étaient plus majoritaires : ils ont été remplacés par du virus sauvage ce qui est confirmé par le séquençage et la technique INNO-LiPA. A partir du mois 48, la charge virale du patient a ré-augmenté et une résistance à l'adéfovir a alors été suspectée. L'analyse du sérum au mois 45 a permis la détection d'une population minoritaire de variants N236T à 4% par PCR sélective. La mise en évidence du variant avait été réalisée initialement par le test INNO-LiPA, puis a posteriori par PCR sélective. En raison de la charge virale faible de ce sérum (3,29 log copies/ml), un protocole d'extraction permettant de sensibiliser la détection par la PCR sélective a été appliqué. Le séquençage n'a pas permis de détecter ce variant minoritaire. A partir du moment où la pression de sélection par le traitement a été maintenue, le variant N236T s'est répliqué et a pris progressivement une part plus importante au sein de la population virale. Les variants minoritaires rtM204I/V ont encore été détectés par PCR sélective ou INNO-LiPA au moment de l'émergence du variant N236T. L'adjonction de la lamivudine a permis une diminution de la charge virale du patient en dessous du seuil de détectabilité de la technique de quantification (le dernier point a été analysé par l'appareil Cobas Taqman : seuil 1,5 log copies/ml). La bithérapie lamivudine-adéfovir a été efficace à la fois sur les variants rtN236T et M204I/V.

Le patient P8 était traité par adéfovir et a pu être suivi mensuellement contrairement aux autres patients (suivi trimestriel). La remontée de la charge virale était significative au 6^{ème} mois mais le génotypage par séquençage ou PCR sélective n'a détecté aucun variant de résistance (Figure 25). Pendant cette période, le patient était en aplasie médullaire dans le cadre du traitement de sa leucémie aiguë lymphoïde par allogreffe de moelle osseuse. Aux mois 8 et 9, la PCR sélective a détecté le variant minoritaire N236T à 2 et 5%, respectivement. Le séquençage a mis en évidence le variant au mois 10, soit 2 mois après la PCR sélective. La réactivation de l'hépatite est survenue au mois 11, soit 1 et 3 mois après la détection par le séquençage et la PCR sélective, respectivement. L'adjonction de la lamivudine à l'adéfovir a permis encore ici de faire chuter l'ADN du VHB jusqu'à le rendre indétectable en Cobas Taqman.

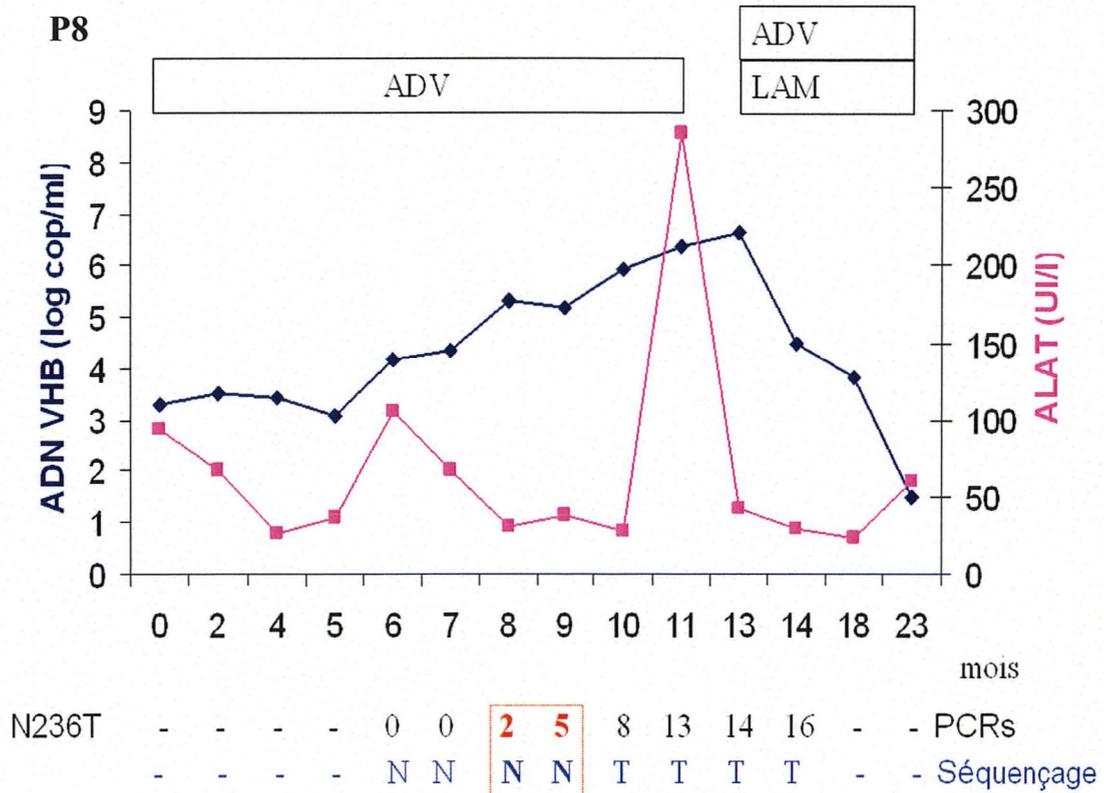


Figure 25 : Evolution des charges virales (bleu) et des ALAT (rose) du patients P8 sous traitement par adéfovir en fonction de l'émergence du variant de résistance rtN236T quantifié par PCR sélective (- non réalisé)

■ ALAT (UI/l) ◆ Charge virale

3.3 Mise en évidence des variants en pré-thérapeutique

La recherche des variants minoritaires rtM204I/V a été réalisée en pré-thérapeutique chez 6 patients développant une résistance rapide ou plus tardive à la lamivudine : 4 patients sont devenus résistants avant 18 mois de traitement et 2 patients, entre 18 mois et 3 ans de traitement. La recherche des mutants rtM204I/V a également été effectuée chez 8 autres patients traités par la lamivudine mais qui n'ont pas développé de résistance après 3 ans de traitement. Aucune mutation rtM204I/V n'a pu être détectée en pré-thérapeutique par PCR sélective chez les patients qui ont développé une résistance à la lamivudine et chez ceux ne l'ayant pas développé après 3 ans de traitement.

Discussion

Ce travail présente la mise au point d'une technique de PCR sélective en temps réel basée sur le principe ARMS (Amplificatory Refractory Mutation System) (100) et optimisée pour détecter et quantifier les mutants de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir. La méthode avait été décrite précédemment pour l'étude des variants de résistance à la lamivudine (112, 142). Cette technique a été optimisée dans le cadre de ce travail en adaptant la température d'hybridation des amorces et de la sonde, et en faisant varier la concentration en $MgCl_2$ du mélange réactionnel. De plus, nous avons mis au point une méthode de mesure de la charge virale VHB totale avec le même système. Ainsi, la quantification des virus mutants par rapport à la population virale totale dépend de 2 PCR réalisées en même temps et dans les mêmes conditions opératoires, ce qui permet d'optimiser la précision des résultats.

Cette technique a ensuite été adaptée à la recherche de la mutation principale de résistance à l'adéfovir, la rtN236T, ce qui n'avait jamais été réalisé à notre connaissance par PCR sélective en temps réel.

La technique de PCR sélective en temps réel ainsi mise au point a été ensuite validée grâce à des plasmides construits au laboratoire, contenant les différentes mutations recherchées. La reproductibilité et la répétabilité de ce type de méthode (ARMS) n'ayant encore jamais été décrites, nous avons évalué ces 2 paramètres pour notre technique. La validation de la méthode a pris en compte la variabilité issue de la PCR déterminant la charge virale VHB totale et la variabilité de celle quantifiant le variant de résistance. Les coefficients de variations (CV) trouvés sont tout à fait satisfaisants pour les essais de répétabilité (CV < 20%). Les essais de reproductibilité donnent des CV plus variables (20-40%), surtout pour les concentrations de variants les plus faibles, mais ces résultats sont acceptables étant donné qu'ils dépendent de la variabilité de 2 PCR.

La sensibilité de la méthode ainsi que son pouvoir de discrimination ont ensuite été investigués. Au final, la technique mise en place au laboratoire permet de détecter les variants minoritaires de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir dans la limite où ils représentent au moins 0,1% de la population virale totale, lorsque celle-ci est supérieure à 10^4 copies de plasmides/réaction. Ce seuil permet, avec un niveau de confiance de 95%, de discriminer l'amplification de la population minoritaire de l'amplification de la population virale totale. Ce résultat est comparable à ceux des autres études basées sur des techniques de PCR sélective (11, 142). Cependant, la limite de détection de la population minoritaire obtenue par cette technique est souvent meilleure que celle des autres techniques de génotypage (124). Le seuil de sensibilité a été évalué à 10 copies/ capillaire. De ce fait, lorsque la quantité totale

d'ADN du VHB passe sous le seuil de 10^4 copies, la capacité de discrimination se trouve limitée par la sensibilité de détection de la technique : pour 100 copies de plasmides/réaction, le variant minoritaire présent en dessous du seuil de 10% n'est plus détecté. La technique de PCR sélective développée a donc une très bonne capacité à détecter les variants minoritaires lorsque la population virale totale est importante (soit $> 10^4$ copies).

La méthode de PCR sélective ainsi caractérisée a été comparée à 2 techniques de référence de génotypage : une technique de séquençage direct mise au point antérieurement au laboratoire et utilisée en routine, et le test commercialisé INNO-LiPA HBV DR v2. Cette comparaison a été réalisée à partir de plasmides et de sérums de patients.

Peu d'études sont disponibles concernant les performances du séquençage dans la détection des populations minoritaires du VHB : une étude évoque un seuil de 50% pour la limite de détection de la population minoritaire YMDD (106). Cependant d'autres travaux portant sur le séquençage du VIH ou du VHC ont conclu que des populations minoritaires représentant entre 10 et 25% de la population virale totale pouvaient être détectées de manière reproductible (67, 72, 102, 121). Notre technique de séquençage peut détecter la présence de variants minoritaires du VHB jusqu'à un seuil de 10% pour une population virale totale supérieure à 500 copies/réaction. Ceci est comparable aux meilleures limites de détection rapportées précédemment. Conformément à ce qui est attendu, ce résultat n'est pas retrouvé pour des faibles quantités d'ADN du VHB, du fait du manque de sensibilité de la première PCR d'amplification.

Le test commercialisé INNO-LiPA HBV DR v2 a été validé dans de nombreuses études pour la détection des variants de résistance à la lamivudine (90, 126) ou à l'adéfovir (48). Les variants minoritaires peuvent être détectés jusqu'à des seuils de 5-10% (57, 106). Notre étude comparative met en évidence un seuil de détection du variant minoritaire de 5% pour l'INNO-LiPA. Ce résultat confirme les études précédemment citées. De plus, cette bonne capacité à détecter les mutants minoritaires est confirmée dans nos essais pour des quantités totales d'ADN plasmidique faibles (100 copies de plasmides/réaction). Une bonne sensibilité de détection des variants minoritaires résistants à la lamivudine chez les patients ayant une faible charge virale avait déjà été évoquée (2). Le test INNO-LiPA DR v2 semble donc plus adapté que la PCR sélective et le séquençage pour détecter les variants minoritaires dans le contexte des faibles charges virales.

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les dilutions de plasmides, 26 sérums ont été analysés par PCR sélective, séquençage et INNO-LiPA. Les populations minoritaires des

variants rtM204V/I ou rtN236T ne sont pas détectées par séquençage en dessous du seuil de 10% déterminé par la PCR sélective. Ce seuil est égal à 20% quand la charge virale est $< 4-5$ log copies/ml. Ces résultats confirment ceux obtenus avec les mélanges de plasmides.

Une bonne corrélation est observée entre les résultats de PCR sélective et ceux d'INNO-LiPA. Cependant, conformément à ce qui avait été observé sur les mélanges de plasmides, la détection de variants minoritaires par PCR sélective peut être mise en défaut pour les sérums dont la charge virale est faible (< 4 log copies/ml). De plus, la détection par INNO-LiPA d'un variant minoritaire rtM204I $< 5\%$ par PCR sélective chez un patient ayant une charge virale très élevée (> 9 log copies/ml) laisse penser que la limite de détection du test INNO-LiPA est certainement meilleure que 5% lorsque la quantité d'ADN viral totale est très élevée. De tels niveaux de charge virale n'ont pas été testés dans notre étude. En revanche, trois variants minoritaires quantifiés entre 2 et 10 % par PCR sélective, et pour lesquels les charges virales étaient moyennes (4-7 log copies/ml), n'ont pas été détectés par le test INNO-LiPA. D'autres essais seraient nécessaires pour confirmer les résultats des échantillons discordants et apprécier au mieux les limites de chaque méthode.

Grâce à notre technique, qui a l'avantage et la particularité d'être quantitative, nous avons ensuite évalué l'aptitude de la PCR sélective à suivre les cinétiques d'émergence et de disparition des variants de résistance à la lamivudine et à l'adéfovir chez 9 patients. Une suspicion de résistance avait été évoquée par une augmentation ≥ 1 log copies/ml de leur charge virale. Chez deux d'entre eux, aucune mutation de résistance n'a pu être mise en évidence. Ces résultats ont été confirmés par séquençage et font craindre un problème de mauvaise observance de la part du patient. Chez la plupart des autres patients, la détection des virus résistants a été contemporaine du rebond viral et a précédé l'exacerbation de l'activité de l'hépatite dont la survenue n'a pas été systématique (5 patients / 7). Au moment de la rechute virale, la proportion de variants résistants était toujours \geq à 20%, et dans plus de la moitié des cas, très largement majoritaire. Dans le cas du patient P3, le rebond viral a pu être prédit par la détection d'un variant minoritaire plus de 3 mois avant la remontée significative de la charge virale. Ce variant arborait la mutation rtN236T de résistance à l'adéfovir et a été détecté au départ uniquement par le test INNO-LiPA. Il a été mis en évidence a posteriori par PCR sélective, avec une procédure sensibilisée basée sur une extraction à partir d'un volume plus important de sérum (1 ml au lieu de 200 μ l). Le variant rtN236T a ainsi été quantifié à 4% chez ce patient dont la charge virale était faible (3,29 log copies/ml). Dans un autre cas de résistance à l'adéfovir (P8), la PCR sélective a permis de mettre en évidence le variant

minoritaire 2 mois avant le séquençage (le test INNO-LiPA n'a pas pu être réalisé pour ce patient). Le variant N236T était d'abord très minoritaire (<10%) puis, 3 mois après la première détection génotypique, était présent en proportion plus importante dans la population virale totale (>10%). Pour ce patient, un suivi mensuel avait été réalisé, ce qui a permis de mieux apprécier la dynamique d'émergence du variant rtN236T.

Trois patients (P3, P7 et P8) ont développé une résistance à l'adéfovir : la résistance est apparue dans la première année de traitement pour le patient naïf à la lamivudine (P8), ce qui est assez rare (15), et après la première année pour les patients initialement résistants à la lamivudine (P3 et P7). Par ailleurs, la résistance est survenue pour les 3 patients quand l'adéfovir était donné en monothérapie. Ce résultat va dans le sens de récentes études qui ne montrent pas d'apparition de résistance sous bithérapie adéfovir-lamivudine (66).

Pour 2 patients (P3 et P7), la dynamique de disparition des variants rtM204V/I de résistance à la lamivudine après changement thérapeutique a été étudiée. Les variants rtM204I/V ont disparu rapidement pour le patient P7 qui a bénéficié d'une monothérapie par adéfovir après le rebond viral. En revanche, la détection des variants rtM204I/V par PCR sélective a été possible très longtemps (pendant au moins 2 ans) chez le patient P3 qui a bénéficié, dans un premier temps, d'une bithérapie lamivudine-adéfovir après la remontée de sa charge virale sous monothérapie par lamivudine. Quand la bithérapie lamivudine-adéfovir a été arrêtée au profit de l'adéfovir en monothérapie, le virus sauvage a remplacé les variants M204V/I qui ont subsisté seulement sous la forme d'une population extrêmement minoritaire (<10%).

Enfin, notre technique de PCR sélective s'étant montrée particulièrement bien adaptée à la détection de très faibles quantités de variants minoritaires au sein d'une population virale élevée, l'hypothèse de la préexistence avant traitement de variants minoritaires sélectionnés ensuite par le traitement a été testée (114, 115). Six sérums pré-thérapeutiques de patients développant une résistance génotypique rapide ou plus tardive à la lamivudine, et 8 sérums pré-thérapeutiques de patients ne développant pas la résistance après 3 ans de traitement ont été analysés dans ce but. Cependant, la mutation rtM204V/I n'a pu être mise en évidence pour aucun d'entre eux. La détection des variants de résistance avant traitement n'a pas permis d'être envisagée comme un facteur prédictif de résistance au traitement. Des techniques plus sensibles sont nécessaires pour mettre en évidence les variants de résistance en pré-thérapeutique (58, 59).

Le développement de techniques très sensibles de quantification de l'ADN du VHB (seuil de détection < 2 log copies/ml) permet désormais au clinicien d'évoquer une résistance

au traitement pour de faibles charges virales chez le patient. Dans le cadre du diagnostic précoce de la résistance, la technique utilisée pour rechercher les mutations doit pouvoir concilier une bonne sensibilité pour les faibles charges virales, et une bonne capacité à détecter les variants minoritaires de résistance. Parmi les 3 méthodes de génotypage étudiées dans ce travail, le séquençage est la seule technique permettant l'étude de l'ensemble des mutations de la transcriptase inverse du virus. La technique de séquençage mise au point au laboratoire permet une détection des populations minoritaires dans des proportions acceptables. Le test INNO-LiPA semble, en revanche, la méthode la plus sensible dans un contexte d'émergence de mutations de résistance au sein d'une population virale peu élevée. Cependant la sensibilité de la PCR sélective et du séquençage peut être améliorée en procédant à des étapes supplémentaires d'amplification par PCR. Une PCR nichée intervenant à la suite de la première PCR d'amplification a permis le séquençage d'un prélèvement dont la charge virale était $< 3 \log$ copies/ml. D'autre part, une étape d'amplification précédant la technique de PCR sélective a été décrite pour étudier les variants des sérums avec une faible charge virale (112). Un autre moyen permettant de sensibiliser la technique de génotypage est d'intervenir au niveau de l'extraction en partant d'un volume initial de sérum plus important. Ce procédé a d'ailleurs permis dans notre étude de quantifier les variants minoritaires dans un sérum de faible charge virale. Enfin, de nouveaux appareils de PCR en temps réel, disposant de capillaires de réaction plus volumineux, permettent de travailler avec des quantités d'extraits plus importantes ce qui représente encore un moyen supplémentaire de sensibiliser la technique de PCR sélective.

En conclusion, nous avons mis au point et validé une technique de PCR sélective en temps réel adaptée à la recherche et à la quantification des variants de résistance du VHB à la lamivudine (rtM204V/I) et à l'adéfovir (rtN236T). Cette technique semble particulièrement adaptée à la détection de population (très) minoritaires au sein d'une population virale assez importante et demande une étape supplémentaire d'optimisation afin de permettre une aussi bonne discrimination des variants minoritaires pour des charges virales plus faibles.

Avec la mise sur le marché prochaine d'autres analogues nucléos(t)idiques susceptibles de posséder des profils de résistance croisés avec d'autres molécules, la PCR sélective semble une technique appropriée pour détecter des variants préexistants sélectionnés par les traitements antérieurs reçus par le malade. A l'image de l'expérience obtenue à partir du traitement du VIH, l'hypothèse de la présence de mutants minoritaires, « archivés » chez le malade au cours de ses années de traitement par des molécules différentes, pourrait guider le choix de la thérapeutique future à donner au malade (124). D'autre part, dans la situation de la

transmission de virus résistants (130), ou dans le cas d'un arrêt de prise du médicament par le patient, le variant de résistance peut très vite disparaître au profit de la souche sauvage : la PCR sélective peut apporter une contribution au diagnostic de la résistance dans ce contexte de charge virale élevée.

Conclusion

Thèse soutenue par : Julien LUPO

Titre : Détection et quantification des variants du virus de l'hépatite B résistants à la lamivudine et à l'adéfovir par PCR sélective en temps réel

Le traitement de l'hépatite B chronique a été radicalement modifié par l'apparition des analogues nucléos(t)idiques, tels que la lamivudine ou l'adéfovir. L'efficacité de ces molécules peut être remise en cause par l'émergence de mutants résistants. De nombreuses études suggèrent que le diagnostic précoce de la résistance à la lamivudine ou à l'adéfovir peut être amélioré par des techniques sensibles de génotypage, capables de détecter les virus mutés alors qu'ils ne sont encore que minoritaires au sein de la population virale totale. Une technique sensible de PCR sélective en temps réel basée sur la stratégie ARMS (Amplificatory Refractory Mutation System) a été développée pour étudier les mutations rtM204I/V et rtN236T associées à la résistance à la lamivudine et à l'adéfovir.

La sensibilité de la méthode a été estimée grâce à des dilutions de plasmides mutés dans du plasmide sauvage. La sensibilité a été trouvée égale à 10 copies de plasmides /réaction. La PCR sélective peut détecter le plasmide muté rtM204I/V ou rtN236T lorsqu'il est présent dans un rapport de 1/1000 (0,1%) dans une population d'ADN totale de 10^4 copies ou plus. La répétabilité et la reproductibilité de la technique ont été testées pour des mélanges de plasmides sauvages et mutés contenant respectivement 20, 1 et 0,1% de plasmides mutés. Les résultats obtenus pour la répétabilité et la reproductibilité donnent des coefficients de variation $< 20\%$ et $< 40\%$, respectivement.

La PCR sélective a été ensuite comparée à 2 méthodes de référence, le séquençage direct et une technique d'hybridation inverse (INNO-LiPA). Des mélanges contenant les proportions de 50, 20, 10, 5, 1 et 0,1% de plasmides rtM204I/V dans du plasmide sauvage ont été analysés par les 3 techniques pour 3 populations d'ADN total : 10^5 , 500 et 100 copies de plasmides. Le séquençage détecte la population minoritaire présente à 10% dans 10^5 et 500 copies d'ADN total, mais seulement le mélange à 50% quand l'ADN total est égal à 100 copies. Le test INNO-LiPA détecte l'échantillon à 5% pour les 3 quantités d'ADN total testées. Concernant la PCR sélective, la limite de détection est égale à 0,1% pour 10^5 copies d'ADN total, 5% pour 500 copies et 10% pour 100 copies. La PCR sélective représente donc la technique la plus adaptée pour détecter les populations minoritaires quand l'ADN plasmidique total est > 500 copies. En revanche, le test INNO-LiPA garde une bonne capacité à détecter les populations minoritaires sur les échantillons dont la quantité d'ADN totale est < 500 copies.

La comparaison des 3 techniques a aussi été réalisée à partir de 26 sérums de patients. La comparaison séquençage-PCR sélective donne 8 résultats discordants dans lesquels la mutation rtM204I/V ou N236T détectée par PCR sélective ne l'est pas par séquençage : la quantification de ces sérums donnait des variants minoritaires présents dans des proportions < 20%. La comparaison INNO-LiPA et PCR sélective a révélé 3 échantillons discordants. Pour 2 sérums, des variants minoritaires quantifiés < 10% par PCR sélective n'ont pas été détectés par INNO-LiPA. Pour un sérum à charge virale faible, l'INNO-LiPA a détecté un variant non retrouvé par PCR sélective, en suivant la procédure normale.

La méthode de PCR sélective a permis de suivre 9 patients traités par lamivudine et/ou adéfovir qui ont eu une remontée significative de leur charge virale. Dans un cas, l'émergence d'un variant minoritaire rtN236T dans un sérum de faible charge virale (3,29 log copies/ml), a pu être détectée 3 mois avant le rebond viral par INNO-LiPA et PCR sélective (virus variant à 4%), avec un protocole d'extraction sensibilisant la technique. Dans un autre cas, la PCR sélective a permis d'anticiper le diagnostic de résistance à l'adéfovir de 2 mois par rapport au séquençage (variant rtN236T quantifié à 2%). Pour un patient, la PCR sélective a montré que les variants rtM204I/V pouvaient persister longtemps après l'arrêt de la lamivudine (> 2 ans).

Par ailleurs, la recherche des variants rtM204I/V en pré-thérapeutique a été réalisée chez 6 patients développant une résistance rapide ou tardive à la lamivudine et chez 8 patients ne développant pas la résistance après 3 ans de traitement. La préexistence des variants n'a pu être mise en évidence dans aucun des groupes et n'a donc pas permis d'être envisagée comme un facteur prédictif d'apparition de la résistance à la lamivudine.

En conclusion, la PCR sélective est une technique capable de détecter et quantifier la présence de très faibles proportions de variants résistants quand la charge virale est élevée. Dans les situations de faible charge virale, la technique doit être sensibilisée. Avec le développement de nouveaux antiviraux susceptibles de posséder des profils de résistance croisée, la PCR sélective semble appropriée pour détecter des variants minoritaires sélectionnés par les traitements antérieurs reçus par le malade, et donc guider le choix d'une nouvelle thérapie.

VUS et PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

16 mai 2006

LE DOYEN
(P. DEMENGE)



LE PRESIDENT DE THESE
(A. FAVIER)

Références bibliographiques

1. 2003. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). *J Hepatol* **38**:533-40.
2. **Aberle, S. W., J. Kletzmayr, B. Watschinger, B. Schmied, N. Vetter, and E. Puchhammer-Stockl.** 2001. Comparison of sequence analysis and the INNO-LiPA HBV DR line probe assay for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus strains in patients under various clinical conditions. *J Clin Microbiol.* **39**:1972-4.
3. **Akuta, N., and H. Kumada.** 2005. Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies. *J Antimicrob Chemother.* **55**:139-42.
4. **Akuta, N., F. Suzuki, M. Kobayashi, A. Tsubota, Y. Suzuki, T. Hosaka, T. Someya, S. Saitoh, Y. Arase, K. Ikeda, and H. Kumada.** 2003. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol.* **38**:315-21.
5. **Allen, M. I., M. Deslauriers, C. W. Andrews, G. A. Tipples, K. A. Walters, D. L. Tyrrell, N. Brown, and L. D. Condeay.** 1998. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* **27**:1670-7.
6. **Alter, H. J., and B. S. Blumberg.** 1966. Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia antigen). *Blood.* **27**:297-309.
7. **Angus, P., R. Vaughan, S. Xiong, H. Yang, W. Delaney, C. Gibbs, C. Brosgart, D. Colledge, R. Edwards, A. Ayres, A. Bartholomeusz, and S. Locarnini.** 2003. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology.* **125**:292-7.
8. **Bartholomeusz, A., M. Kuiper, P. Angus, A. Ayres, M. Littlejohn, D. Colledge, N. Warner, and S. Locarnini.** 2006. Molecular analysis of HBV polymerase mutations associated with dual adefovir and lamivudine resistance (Abstract 482). *J Hepatol* **44**:S179.
9. **Bartholomeusz, A., and S. Schaefer.** 2004. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol.* **14**:3-16.
10. **Bayer, M. E., B. S. Blumberg, and B. Werner.** 1968. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature.* **218**:1057-9.
11. **Bergroth, T., A. Sonnerborg, and Z. Yun.** 2005. Discrimination of lamivudine resistant minor HIV-1 variants by selective real-time PCR. *J Virol Methods.* **127**:100-7.
12. **Bland, J. M., and D. G. Altman.** 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* **1**:307-10.
13. **Bock, C. T., H. L. Tillmann, J. Torresi, J. Klempnauer, S. Locarnini, M. P. Manns, and C. Trautwein.** 2002. Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation. *Gastroenterology.* **122**:264-73.
14. **Bogard, M., and J. Lamoril.** 1998. *Biologie moléculaire en biologie clinique*, Elsevier ed, Paris.
15. **Borroto-Esoda, K., S. Arterburn, A. Snow, S. Chuck, S. Hadziyannis, S. Locarnini, F. Zoulim, and J. M. Pawlotsky.** 2006. Final analysis of virological outcomes and resistance during 5 years of adefovir dipivoxil monotherapy in HBeAg-negative patients (Abstract 483). *J Hepatol* **44**:S21.
16. **Bowden, S.** 2006. Serological and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis.* **26**:97-103.
17. **Bozdayi, A. M., O. Uzunlimoglu, A. R. Turkyilmaz, N. Aslan, O. Sezgin, T. Sahin, G. Bozdayi, K. Cinar, S. B. Pai, R. Pai, H. Bozkaya, S. Karayalcin, C.**

- Yurdaydin, and R. F. Schinazi.** 2003. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat.* **10**:256-65.
18. **Brunelle, M. N., A. C. Jacquard, C. Pichoud, D. Durantel, S. Carrouee-Durantel, J. P. Villeneuve, C. Trepo, and F. Zoulim.** 2005. Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology.* **41**:1391-8.
 19. **Brunetto, M. R., F. Oliveri, B. Coco, G. Leandro, P. Colombatto, J. M. Gorin, and F. Bonino.** 2002. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. *J Hepatol.* **36**:263-70.
 20. **Buti, M., F. Rodriguez-Frias, R. Jardi, and R. Esteban.** 2005. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *J Clin Virol.* **34**:S79-82.
 21. **Chan, H. L., N. W. Leung, A. Y. Hui, V. W. Wong, C. T. Liew, A. M. Chim, F. K. Chan, L. C. Hung, Y. T. Lee, J. S. Tam, C. W. Lam, and J. J. Sung.** 2005. A randomized, controlled trial of combination therapy for chronic hepatitis B: comparing pegylated interferon-alpha2b and lamivudine with lamivudine alone. *Ann Intern Med.* **142**:240-50.
 22. **Chang, M. L., R. N. Chien, C. T. Yeh, and Y. F. Liaw.** 2005. Virus and transaminase levels determine the emergence of drug resistance during long-term lamivudine therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol.* **43**:72-7.
 23. **Chang, T. T., R. G. Gish, R. de Man, A. Gadano, J. Sollano, Y. C. Chao, A. S. Lok, K. H. Han, Z. Goodman, J. Zhu, A. Cross, D. DeHertogh, R. Wilber, R. Colonno, and D. Apelian.** 2006. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* **354**:1001-10.
 24. **Chen, C. H., C. M. Lee, S. N. Lu, J. H. Wang, H. D. Tung, C. H. Hung, W. J. Chen, and C. S. Changchien.** 2004. Comparison of clinical outcome between patients continuing and discontinuing lamivudine therapy after biochemical breakthrough of YMDD mutants. *J Hepatol.* **41**:454-61.
 25. **Chin, R., and S. Locarnini.** 2003. Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Rev Med Virol* **13**:255-72.
 26. **Conjeevaram, H. S., and A. S. Lok.** 2003. Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* **38**:S90-103.
 27. **Cooksley, W. G., T. Piratvisuth, S. D. Lee, V. Mahachai, Y. C. Chao, T. Tanwandee, A. Chutaputti, W. Y. Chang, F. E. Zahm, and N. Pluck.** 2003. Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* **10**:298-305.
 28. **Dane, D. S., C. H. Cameron, and M. Briggs.** 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* **1**:695-8.
 29. **Das, K., X. Xiong, H. Yang, C. E. Westland, C. S. Gibbs, S. G. Sarafianos, and E. Arnold.** 2001. Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC). *J Virol.* **75**:4771-9.
 30. **De Clercq, E.** 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol.* **30**:115-33.
 31. **Delaney, W. E. t., H. Yang, C. E. Westland, K. Das, E. Arnold, C. S. Gibbs, M. D. Miller, and S. Xiong.** 2003. The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol.* **77**:11833-41.
 32. **Denis, F., V. Thibault, and S. Alain.** 2003. Virus de l'hépatite B, p. 293-305. *In* estem (ed.), *Traité de virologie médicale.* De Boeck Diffusion, Paris.

33. Denis, F., and C. Trepo. 2004. *Virus des Hépatites B et Delta*, Elsevier ed, Paris.
34. Dienstag, J. L., R. D. Goldin, E. J. Heathcote, H. W. Hann, M. Woessner, S. L. Stephenson, S. Gardner, D. F. Gray, and E. R. Schiff. 2003. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* **124**:105-17.
35. Dienstag, J. L., E. R. Schiff, T. L. Wright, R. P. Perrillo, H. W. Hann, Z. Goodman, L. Crowther, L. D. Condreay, M. Woessner, M. Rubin, and N. A. Brown. 1999. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med*. **341**:1256-63.
36. Durantel, D., M. N. Brunelle, E. Gros, S. Carrouee-Durantel, C. Pichoud, S. Villet, C. Trepo, and F. Zoulim. 2005. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol*. **34**:S34-43.
37. Durantel, D., S. Carrouee-Durantel, B. Werle-Lapostolle, M. N. Brunelle, C. Pichoud, C. Trepo, and F. Zoulim. 2004. A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus. *Hepatology*. **40**:855-64.
38. Echevarria, J. M., and A. Avellon. 2006. Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol* **78 Suppl 1**:S36-42.
39. Erhardt, A., U. Reineke, D. Blondin, W. H. Gerlich, O. Adams, T. Heintges, C. Niederau, and D. Haussinger. 2000. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology*. **31**:716-25.
40. Fung, S. K., P. Andreone, S. H. Han, K. Rajender Reddy, A. Regev, E. B. Keeffe, M. Hussain, C. Cursaro, P. Richtmyer, J. A. Marrero, and A. S. Lok. 2005. Adefovir-resistant hepatitis B can be associated with viral rebound and hepatic decompensation. *J Hepatol*. **43**:937-43.
41. Fung, S. K., H. B. Chae, R. J. Fontana, H. Conjeevaram, J. Marrero, K. Oberhelman, M. Hussain, and A. S. Lok. 2006. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*. **44**:283-90.
42. Ganem, D., and A. M. Prince. 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* **350**:1118-29.
43. Gish, R. G. 2005. Clinical trial results of new therapies for HBV: implications for treatment guidelines. *Semin Liver Dis*. **25**:29-39.
44. Gish, R. G., H. Trinh, N. Leung, F. K. Chan, M. W. Fried, T. L. Wright, C. Wang, J. Anderson, E. Mondou, A. Snow, J. Sorbel, F. Rousseau, and L. Corey. 2005. Safety and antiviral activity of emtricitabine (FTC) for the treatment of chronic hepatitis B infection: a two-year study. *J Hepatol*. **43**:60-6.
45. Hadziyannis, S. J., N. C. Tassopoulos, E. J. Heathcote, T. T. Chang, G. Kitis, M. Rizzetto, P. Marcellin, S. G. Lim, Z. Goodman, J. Ma, S. Arterburn, S. Xiong, G. Currie, and C. L. Brosgart. 2005. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. **352**:2673-81.
46. Hadziyannis, S. J., N. C. Tassopoulos, E. J. Heathcote, T. T. Chang, G. Kitis, M. Rizzetto, P. Marcellin, S. G. Lim, Z. Goodman, M. S. Wulfsohn, S. Xiong, J. Fry, and C. L. Brosgart. 2003. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. **348**:800-7.
47. Hong, S. P., N. K. Kim, S. G. Hwang, H. J. Chung, S. Kim, J. H. Han, H. T. Kim, K. S. Rim, M. S. Kang, W. Yoo, and S. O. Kim. 2004. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol* **40**:837-44.

48. **Hussain, M., S. Fung, E. Libbrecht, E. Sablon, C. Cursaro, P. Andreone, and A. S. Lok.** 2006. Sensitive line probe assay that simultaneously detects mutations conveying resistance to lamivudine and adefovir. *J Clin Microbiol.* **44**:1094-7.
49. **Iloeje, U. H., H. I. Yang, J. Su, C. L. Jen, S. L. You, and C. J. Chen.** 2006. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology.* **130**:678-86.
50. **Jang, H., M. Cho, J. Heo, H. Kim, H. Jun, W. Shin, B. Cho, H. Park, and C. Kim.** 2004. Oligonucleotide chip for detection of Lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J Clin Microbiol* **42**:4181-8.
51. **Janssen, H. L., M. van Zonneveld, H. Senturk, S. Zeuzem, U. S. Akarca, Y. Cakaloglu, C. Simon, T. M. So, G. Gerken, R. A. de Man, H. G. Niesters, P. Zondervan, B. Hansen, and S. W. Schalm.** 2005. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet.* **365**:123-9.
52. **Kanwal, F., I. M. Gralnek, P. Martin, G. S. Dulai, M. Farid, and B. M. Spiegel.** 2005. Treatment alternatives for chronic hepatitis B virus infection: a cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med.* **142**:821-31.
53. **Kao, J. H., P. J. Chen, M. Y. Lai, and D. S. Chen.** 2003. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology.* **124**:327-34.
54. **Karatayli, E., S. Karayalcin, H. Kayhan, A. R. Turkyilmaz, F. Sahin, C. Yurdaydin, and A. M. Bozdayi.** 2006. A novel mutation pattern developed during lamivudine treatment shows cross-resistance to adefovir divopoxil treatment (Abstract 484). *J Hepatol* **44**:S180.
55. **Karayiannis, P.** 2003. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother.* **51**:761-85.
56. **Kidd-Ljunggren, K., Y. Miyakawa, and A. H. Kidd.** 2002. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol.* **83**:1267-80.
57. **Kim, H. S., K. H. Han, S. H. Ahn, E. O. Kim, H. Y. Chang, M. S. Moon, H. J. Chung, W. Yoo, S. O. Kim, and S. P. Hong.** 2005. Evaluation of methods for monitoring drug resistance in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy based on mass spectrometry and reverse hybridization. *Antivir Ther.* **10**:441-9.
58. **Kirishima, T., T. Okanoue, Y. Daimon, Y. Itoh, H. Nakamura, A. Morita, T. Toyama, and M. Minami.** 2002. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* **37**:259-65.
59. **Kobayashi, S., T. Ide, and M. Sata.** 2001. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* **34**:584-6.
60. **Kreutz, C.** 2002. Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses. *J Cell Mol Med.* **6**:113-43.
61. **Kwok, S., D. E. Kellogg, N. McKinney, D. Spasic, L. Goda, C. Levenson, and J. J. Sninsky.** 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res* **18**:999-1005.
62. **Lai, C. L., J. Dienstag, E. Schiff, N. W. Leung, M. Atkins, C. Hunt, N. Brown, M. Woessner, R. Boehme, and L. Condreay.** 2003. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* **36**:687-96.



63. **Lai, C. L., N. Leung, E. K. Teo, M. Tong, F. Wong, H. W. Hann, S. Han, T. Poynard, M. Myers, G. Chao, D. Lloyd, and N. A. Brown.** 2005. A 1-year trial of telbivudine, lamivudine, and the combination in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. **129**:528-36.
64. **Lai, C. L., D. Shouval, A. S. Lok, T. T. Chang, H. Cheinquer, Z. Goodman, D. DeHertogh, R. Wilber, R. C. Zink, A. Cross, R. Colonna, and L. Fernandes.** 2006. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. **354**:1011-20.
65. **Lampertico, P., E. Del Ninno, M. Vigano, R. Romeo, M. F. Donato, E. Sablon, A. Morabito, and M. Colombo.** 2003. Long-term suppression of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B by 24-month interferon therapy. *Hepatology*. **37**:756-63.
66. **Lampertico, P., M. Vigano, E. Manenti, E. Del Ninno, and M. Colomb.** 2006. No evidence for ADV resistance in HBeAg-negative lamivudine resistant patients treated with lamivudine-adeфовir combination for 3 years (Abstract 499). *J Hepatol* **44**:S186.
67. **Larder, B. A., A. Kohli, P. Kellam, S. D. Kemp, M. Kronick, and R. D. Henfrey.** 1993. Quantitative detection of HIV-1 drug resistance mutations by automated DNA sequencing. *Nature*. **365**:671-3.
68. **Lau, G. K., T. Piratvisuth, K. X. Luo, P. Marcellin, S. Thongsawat, G. Cooksley, E. Gane, M. W. Fried, W. C. Chow, S. W. Paik, W. Y. Chang, T. Berg, R. Flisiak, P. McCloud, and N. Pluck.** 2005. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. **352**:2682-95.
69. **Lee, C. H., S. O. Kim, K. S. Byun, M. S. Moon, E. O. Kim, J. E. Yeon, W. Yoo, and S. P. Hong.** 2006. Predominance of hepatitis B virus YMDD mutants is prognostic of viral DNA breakthrough. *Gastroenterology*. **130**:1144-52.
70. **Lee, W. M.** 1997. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. **337**:1733-45.
71. **Lee, Y. S., Y. H. Chung, S. H. Ryu, J. A. Kim, and M. H. Choi.** 2005. Hepatitis B virus with RTL80V/I mutation associates with poor response to adefovir dipivoxil therapy (Abstract 965). *Hepatology* **42**:575A.
72. **Leitner, T., E. Halapi, G. Scarlatti, P. Rossi, J. Albert, E. M. Fenyo, and M. Uhlen.** 1993. Analysis of heterogeneous viral populations by direct DNA sequencing. *Biotechniques*. **15**:120-7.
73. **Lewin, S. R., R. M. Ribeiro, T. Walters, G. K. Lau, S. Bowden, S. Locarnini, and A. S. Perelson.** 2001. Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: complex decay profiles observed. *Hepatology*. **34**:1012-20.
74. **Liaw, Y. F., R. N. Chien, and C. T. Yeh.** 2004. No benefit to continue lamivudine therapy after emergence of YMDD mutations. *Antivir Ther*. **9**:257-62.
75. **Liaw, Y. F., J. J. Sung, W. C. Chow, G. Farrell, C. Z. Lee, H. Yuen, T. Tanwandee, Q. M. Tao, K. Shue, O. N. Keene, J. S. Dixon, D. F. Gray, and J. Sabbat.** 2004. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med*. **351**:1521-31.
76. **Lim, S. G., Z. Krastev, T. M. Ng, G. Mechkov, I. A. Kotzev, S. Chan, E. Mondou, A. Snow, J. Sorbel, and F. Rousseau.** 2006. Randomized, Double-Blind Study of Emtricitabine (FTC) plus Clevudine versus FTC Alone in Treatment of Chronic Hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother*. **50**:1642-8.
77. **Lim, S. G., T. M. Ng, N. Kung, Z. Krastev, M. Volfova, P. Husa, S. S. Lee, S. Chan, M. L. Shiffman, M. K. Washington, A. Rigney, J. Anderson, E. Mondou, A. Snow, J. Sorbel, R. Guan, and F. Rousseau.** 2006. A double-blind placebo-controlled study of emtricitabine in chronic hepatitis B. *Arch Intern Med*. **166**:49-56.

78. Liu, C. J., B. F. Chen, P. J. Chen, M. Y. Lai, W. L. Huang, J. H. Kao, and D. S. Chen. 2006. Role of hepatitis B viral load and Basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *J Infect Dis.* **193**:1258-65.
79. Liu, C. J., P. J. Chen, M. Y. Lai, J. H. Kao, and D. S. Chen. 2001. Hepatitis B virus variants in patients receiving lamivudine treatment with breakthrough hepatitis evaluated by serial viral loads and full-length viral sequences. *Hepatology.* **34**:583-9.
80. Liu, C. J., M. Y. Lai, Y. C. Chao, L. Y. Liao, S. S. Yang, T. J. Hsiao, T. Y. Hsieh, C. L. Lin, J. T. Hu, C. L. Chen, P. J. Chen, J. H. Kao, and D. S. Chen. 2006. Interferon alpha-2b with and without ribavirin in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B: A randomized study. *Hepatology.* **43**:742-749.
81. Locarnini, S. 2003. Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis. *J Hepatol.* **39**:S124-32.
82. Locarnini, S. 2005. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis.* **25**:9-19.
83. Locarnini, S. 2004. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis.* **24**:3-10.
84. Locarnini, S., A. Hatzakis, J. Heathcote, E. B. Keeffe, T. J. Liang, D. Mutimer, J. M. Pawlotsky, and F. Zoulim. 2004. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther.* **9**:679-93.
85. Locarnini, S., and W. S. Mason. 2006. Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. *J Hepatol.* **44**:422-31.
86. Locarnini, S., J. McMillan, and A. Bartholomeusz. 2003. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis.* **23**:5-20.
87. Lok, A. S., U. S. Akarca, and S. Greene. 1995. Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. *Hepatology.* **21**:19-24.
88. Lok, A. S., C. L. Lai, N. Leung, G. B. Yao, Z. Y. Cui, E. R. Schiff, J. L. Dienstag, E. J. Heathcote, N. R. Little, D. A. Griffiths, S. D. Gardner, and M. Castiglia. 2003. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* **125**:1714-22.
89. Lok, A. S., and B. J. McMahon. 2001. Chronic hepatitis B. *Hepatology.* **34**:1225-41.
90. Lok, A. S., F. Zoulim, S. Locarnini, A. Mangia, G. Niro, H. Decraemer, G. Maertens, F. Hulstaert, K. De Vreese, and E. Sablon. 2002. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR assay. *J Clin Microbiol* **40**:3729-34.
91. Marcellin, P., T. Asselah, and N. Boyer. 2005. Treatment of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* **12**:333-45.
92. Marcellin, P., T. T. Chang, S. G. Lim, M. J. Tong, W. Sievert, M. L. Shiffman, L. Jeffers, Z. Goodman, M. S. Wulfsohn, S. Xiong, J. Fry, and C. L. Brosgart. 2003. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* **348**:808-16.
93. Marcellin, P., G. K. Lau, F. Bonino, P. Farci, S. Hadziyannis, R. Jin, Z. M. Lu, T. Piratvisuth, G. Germanidis, C. Yurdaydin, M. Diago, S. Gurel, M. Y. Lai, P. Button, and N. Pluck. 2004. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* **351**:1206-17.
94. Marcellin, P., H. Mommeja-Marin, S. L. Sacks, G. K. Lau, D. Sereni, J. P. Bronowicki, B. Conway, C. Trepo, M. R. Blum, B. C. Yoo, E. Mondou, J. Sorbel,

- A. Snow, F. Rousseau, and H. S. Lee. 2004. A phase II dose-escalating trial of clevudine in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. **40**:140-8.
95. Maupas, P., A. Goudeau, P. Coursaget, J. Drucker, and P. Bagros. 1976. Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet*. **1**:1367-70.
 96. Meffre, C., Y. Le Strat, and E. Delarocque-Astagnau. 2006. Prevalence of hepatitis B in France, 2003-2004 (Abstract 44). *J Hepatol* **44**:S21.
 97. Milich, D., and T. J. Liang. 2003. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. **38**:1075-86.
 98. Mommeja-Marin, H., E. Mondou, M. R. Blum, and F. Rousseau. 2003. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: analysis and review of the literature. *Hepatology*. **37**:1309-19.
 99. Nafa, S., S. Ahmed, D. Tavan, C. Pichoud, F. Berby, L. Stuyver, M. Johnson, P. Merle, H. Abidi, C. Trepo, and F. Zoulim. 2000. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology*. **32**:1078-88.
 100. Newton, C. R., A. Graham, L. E. Heptinstall, S. J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J. C. Smith, and A. F. Markham. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* **17**:2503-16.
 101. Niederau, C., T. Heintges, S. Lange, G. Goldmann, C. M. Niederau, L. Mohr, and D. Haussinger. 1996. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. **334**:1422-7.
 102. Odeberg, J., Z. Yun, A. Sonnerborg, M. Uhlen, and J. Lundeberg. 1995. Dynamic analysis of heterogeneous hepatitis C virus populations by direct solid-phase sequencing. *J Clin Microbiol*. **33**:1870-4.
 103. Osborn, M. K., and A. S. Lok. 2006. Antiviral options for the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother* **4**:4.
 104. Pai, S. B., A. M. Bozdayi, R. B. Pai, T. Beker, M. Sarioglu, A. R. Turkyilmaz, J. Grier, C. Yurdaydin, and R. F. Schinazi. 2005. Emergence of a novel mutation in the FLLA region of hepatitis B virus during lamivudine therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. **49**:2618-24.
 105. Pallier, C., L. Castera, A. Soulier, C. Hezode, P. Nordmann, D. Dhumeaux, and J. M. Pawlotsky. 2006. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine. *J Virol*. **80**:643-53.
 106. Pas, S. D., R. A. de Man, E. Fries, A. D. Osterhaus, and H. G. Niesters. 2002. The dynamics of mutations in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene during and after lamivudine treatment as determined by reverse hybridisation. *J Clin Virol* **25**:63-71.
 107. Pawlotsky, J. M. 2003. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *J Hepatol*. **39**:S31-5.
 108. Pawlotsky, J. M. 2002. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*. **122**:1554-68.
 109. Perrillo, R., H. W. Hann, D. Mutimer, B. Willems, N. Leung, W. M. Lee, A. Moorat, S. Gardner, M. Woessner, E. Bourne, C. L. Brosgart, and E. Schiff. 2004. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* **126**:81-90.
 110. Perrillo, R. P. 2006. Therapy of hepatitis B -- viral suppression or eradication? *Hepatology*. **43**:S182-93.
 111. Peters, M. G., H. Hann Hw, P. Martin, E. J. Heathcote, P. Buggisch, R. Rubin, M. Bourliere, K. Kowdley, C. Trepo, D. Gray Df, M. Sullivan, K. Kleber, R.

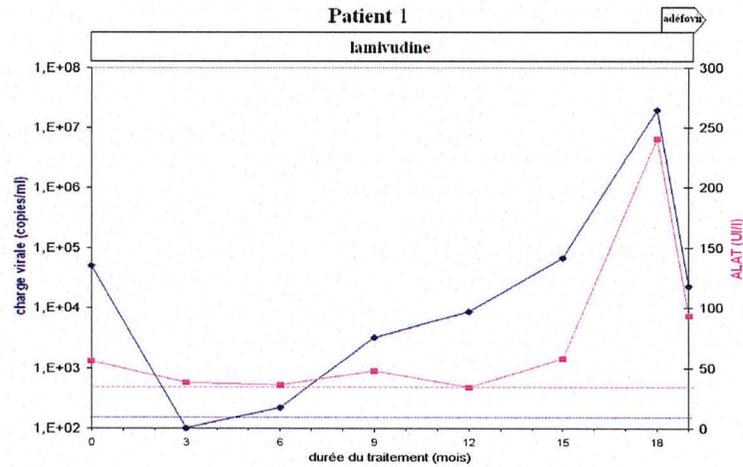
- Ebrahimi, S. Xiong, and C. L. Brosgart. 2004. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. **126**:91-101.
112. Punia, P., P. Cane, C. G. Teo, and N. Saunders. 2004. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *J Hepatol* **40**:986-92.
 113. Ratziu, V., V. Thibault, Y. Benhamou, and T. Poynard. 2006. Successful rescue therapy with tenofovir in a patient with hepatic decompensation and adefovir resistant HBV mutant. *Comp Hepatol*. **5**:1.
 114. Richman, D. D. 2000. The impact of drug resistance on the effectiveness of chemotherapy for chronic hepatitis B. *Hepatology* **32**:866-7.
 115. Richman, D. D. 1996. The implications of drug resistance for strategies of combination antiviral chemotherapy. *Antiviral Res* **29**:31-3.
 116. Robaczewska, M., S. Guerret, J. S. Remy, I. Chemin, W. B. Offensperger, M. Chevallier, J. P. Behr, A. J. Podhajska, H. E. Blum, C. Trepo, and L. Cova. 2001. Inhibition of hepadnaviral replication by polyethylenimine-based intravenous delivery of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides to the liver. *Gene Ther*. **8**:874-81.
 117. Robaczewska, M., R. Narayan, B. Seignerres, O. Schorr, A. Thermet, A. J. Podhajska, C. Trepo, F. Zoulim, P. E. Nielsen, and L. Cova. 2005. Sequence-specific inhibition of duck hepatitis B virus reverse transcription by peptide nucleic acids (PNA). *J Hepatol*. **42**:180-7.
 118. Ronsin, C., A. Pillet, C. Bali, and G. A. Denoyel. 2006. Evaluation of the COBAS AmpliPrep-Total Nucleic Acid Isolation-COBAS TaqMan Hepatitis B Virus (HBV) Quantitative Test and Comparison to the VERSANT HBV DNA 3.0 Assay. *J Clin Microbiol*. **44**:1390-9.
 119. Schaefer, S. 2005. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat*. **12**:111-24.
 120. Schildgen, O., H. Sirma, A. Funk, C. Olotu, U. C. Wend, H. Hartmann, M. Helm, J. K. Rockstroh, W. R. Willems, H. Will, and W. H. Gerlich. 2006. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med*. **354**:1807-12.
 121. Schuurman, R., L. Demeter, P. Reichelderfer, J. Tijnagel, T. de Groot, and C. Boucher. 1999. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol*. **37**:2291-6.
 122. Seeger, C., and W. S. Mason. 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:51-68.
 123. Seignerres, B., C. Pichoud, P. Martin, P. Furman, C. Trepo, and F. Zoulim. 2002. Inhibitory activity of dioxolane purine analogs on wild-type and lamivudine-resistant mutants of hepadnaviruses. *Hepatology*. **36**:710-22.
 124. Shaw, T., A. Bartholomeusz, and S. Locarnini. 2006. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J Hepatol*. **44**:593-606.
 125. Song, B. C., D. J. Suh, H. C. Lee, Y. H. Chung, and Y. S. Lee. 2000. Hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine therapy is not durable in patients with chronic hepatitis B in Korea. *Hepatology*. **32**:803-6.
 126. Stuyver, L., C. Van Geyt, S. De Gendt, G. Van Reybroeck, F. Zoulim, G. Leroux-Roels, and R. Rossau. 2000. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol*. **38**:702-7.
 127. Stuyver, L. J., S. A. Locarnini, A. Lok, D. D. Richman, W. F. Carman, J. L. Dienstag, and R. F. Schinazi. 2001. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* **33**:751-7.

128. **Tacke, F., C. Gehrke, T. Luedde, A. Heim, M. P. Manns, and C. Trautwein.** 2004. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of Lamivudine-resistant mutants. *J Virol.* **78**:8524-35.
129. **Tenney, D. J., S. M. Levine, R. E. Rose, A. W. Walsh, S. P. Weinheimer, L. Discotto, M. Plym, K. Pokornowski, C. F. Yu, P. Angus, A. Ayres, A. Bartholomeusz, W. Sievert, G. Thompson, N. Warner, S. Locarnini, and R. J. Colonna.** 2004. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:3498-507.
130. **Thibault, V., C. Aubron-Olivier, H. Agut, and C. Katlama.** 2002. Primary infection with a lamivudine-resistant hepatitis B virus. *Aids.* **16**:131-3.
131. **Thomas, H., G. Foster, and D. Platis.** 2003. Mechanisms of action of interferon and nucleoside analogues. *J Hepatol.* **39**:S93-8.
132. **Torresi, J.** 2002. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol.* **25**:97-106.
133. **Turelli, P., B. Mangeat, S. Jost, S. Vianin, and D. Trono.** 2004. Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science.* **303**:1829.
134. **van Bommel, F., H. H. Feucht, B. Moller, U. Spengler, and B. Zollner.** 2005. Tenofovir rescue for patients with lamivudine resistant HBV infection with suboptimal virologic response to adefovir (abstract 1000). *Hepatology* **42**:589A.
135. **van Bommel, F., T. Wunsche, S. Mauss, P. Reinke, A. Bergk, D. Schurmann, B. Wiedenmann, and T. Berg.** 2004. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology.* **40**:1421-5.
136. **van Zonneveld, M., P. Honkoop, B. E. Hansen, H. G. Niesters, S. D. Murad, R. A. de Man, S. W. Schalm, and H. L. Janssen.** 2004. Long-term follow-up of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology.* **39**:804-10.
137. **Villeneuve, J. P., D. Durantel, S. Durantel, C. Westland, S. Xiong, C. L. Brosgart, C. S. Gibbs, P. Parvaz, B. Werle, C. Trepo, and F. Zoulim.** 2003. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J Hepatol.* **39**:1085-9.
138. **Villet, S., C. Pichoud, A. Ollivet, J. P. Villeneuve, C. Trepo, and F. Zoulim.** 2005. Sequential antiviral therapy leads to the emergence of multiple drug resistant hepatitis B virus (Abstract 981). *Hepatology* **42**:581A.
139. **Weber, B.** 2006. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. *J Med Virol.* **78**:S59-65.
140. **Werle-Lapostolle, B., S. Bowden, S. Locarnini, K. Wursthorn, J. Petersen, G. Lau, C. Trepo, P. Marcellin, Z. Goodman, W. E. t. Delaney, S. Xiong, C. L. Brosgart, S. S. Chen, C. S. Gibbs, and F. Zoulim.** 2004. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology.* **126**:1750-8.
141. **Whalley, S. A., D. Brown, C. G. Teo, G. M. Dusheiko, and N. A. Saunders.** 2001. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the LightCycler. *J Clin Microbiol* **39**:1456-9.
142. **Wightman, F., T. Walters, A. Ayres, S. Bowden, A. Bartholomeusz, D. Lau, S. Locarnini, and S. R. Lewin.** 2004. Comparison of sequence analysis and a novel discriminatory real-time PCR assay for detection and quantification of Lamivudine-resistant hepatitis B virus strains. *J Clin Microbiol* **42**:3809-12.

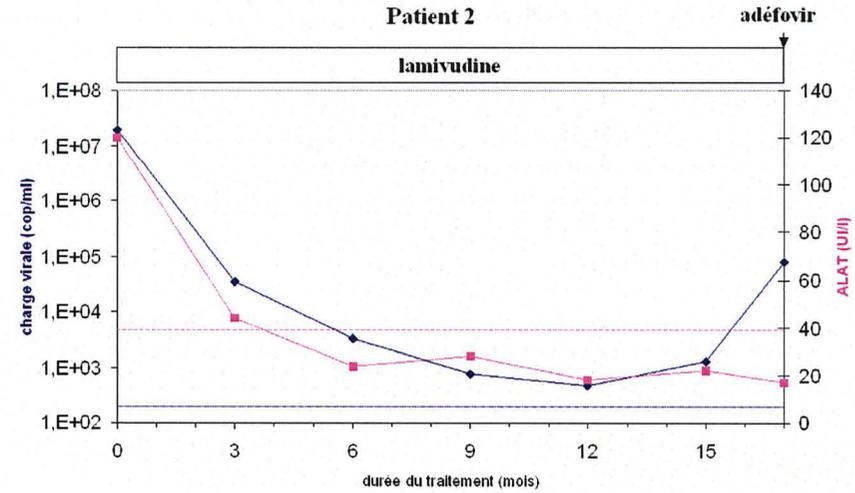
143. **Wong, D. K., M. F. Yuen, H. Yuan, S. S. Sum, C. K. Hui, J. Hall, and C. L. Lai.** 2004. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology*. **40**:727-37.
144. **Wright, T. L., C. Avunduk, J. L. Dienstag, J. W. Freston, I. M. Jacobson, H. J. Nord, and M. Sherman.** 2006. Advancing patient care: integrating new data. *Am J Gastroenterol*. **101**:S32-9.
145. **Wu, H. L., L. R. Huang, C. C. Huang, H. L. Lai, C. J. Liu, Y. T. Huang, Y. W. Hsu, C. Y. Lu, D. S. Chen, and P. J. Chen.** 2005. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology*. **128**:708-16.
146. **Yadav, V., and C. K. Chu.** 2004. Molecular mechanisms of adefovir sensitivity and resistance in HBV polymerase mutants: a molecular dynamics study. *Bioorg Med Chem Lett*. **14**:4313-7.
147. **Yeon, J. E., W. Yoo, S. P. Hong, Y. J. Chang, S. K. Yu, J. H. Kim, Y. S. Seo, H. J. Chung, M. S. Moon, S. O. Kim, K. S. Byun, and C. H. Lee.** 2006. Resistance to adefovir dipivoxil (ADV) in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with ADV. *Gut* **4**:4.
148. **Yim, H. J., and A. S. Lok.** 2006. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*. **43**:S173-81.
149. **Zoulim, F.** 2002. Assessing hepatitis B virus resistance in vitro and molecular mechanisms of nucleoside resistance. *Semin Liver Dis*. **22**:23-31.
150. **Zoulim, F.** 2006. Assessment of treatment efficacy in HBV infection and disease. *J Hepatol*. **44**:S95-9.
151. **Zoulim, F.** 2005. Combination of nucleoside analogues in the treatment of chronic hepatitis B virus infection: lesson from experimental models. *J Antimicrob Chemother*. **55**:608-11.
152. **Zoulim, F.** 2006. Entecavir: a new treatment option for chronic hepatitis B. *J Clin Virol* **36**:8-12.
153. **Zoulim, F.** 2004. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res*. **64**:1-15.
154. **Zoulim, F., T. Poynard, F. Degos, A. Slama, A. El Hasnaoui, P. Blin, F. Mercier, P. Deny, P. Landais, P. Parvaz, and C. Trepo.** 2006. A prospective study of the evolution of lamivudine resistance mutations in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine. *J Viral Hepat*. **13**:278-88.

Annexe

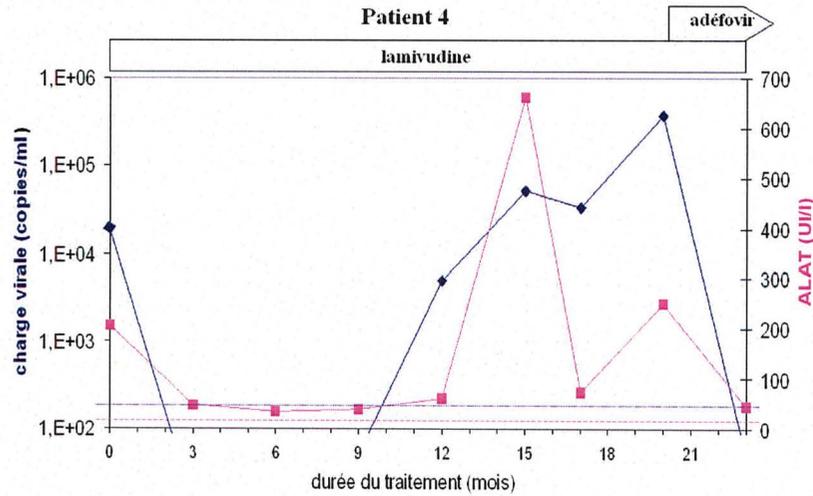
ANNEXE 1 (légende cf annexe 2)



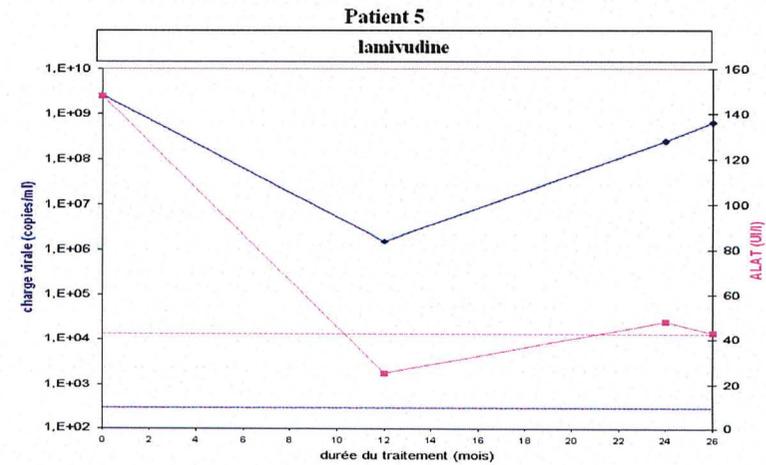
M204V	0	-	-	100	100	67	80
M204I	0	-	-	0	0	12	15
(en %)							



rtM204V	0	0	0	0	0	0	74
rtM204I	0	0	0	0	0	0	25

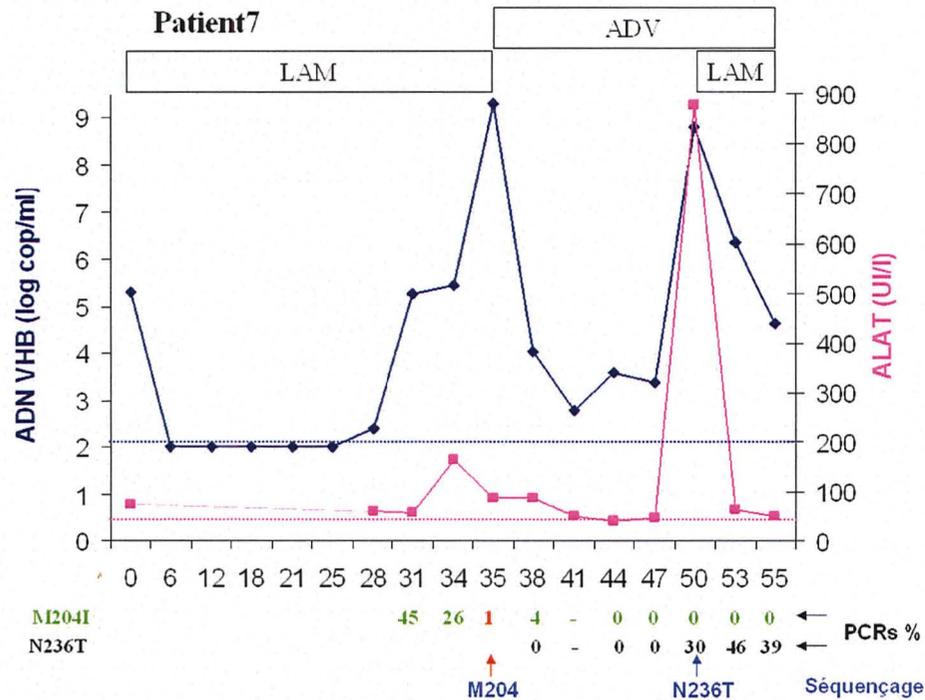


M204V %	0	-	-	0	0	0	0	-
M204I %	0	-	-	30	40	31	21	-

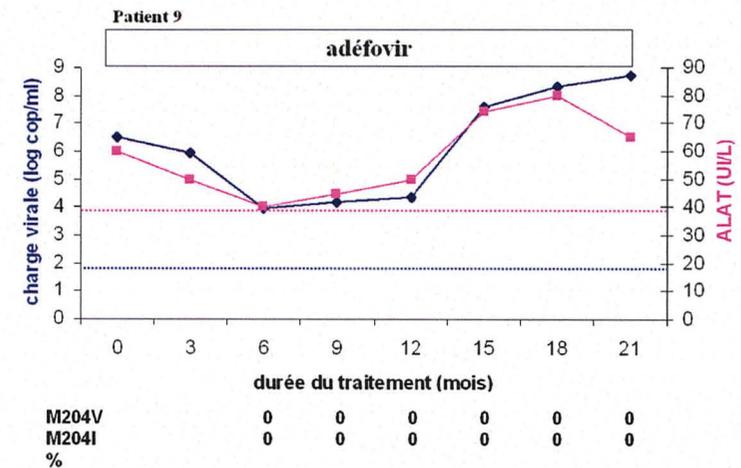
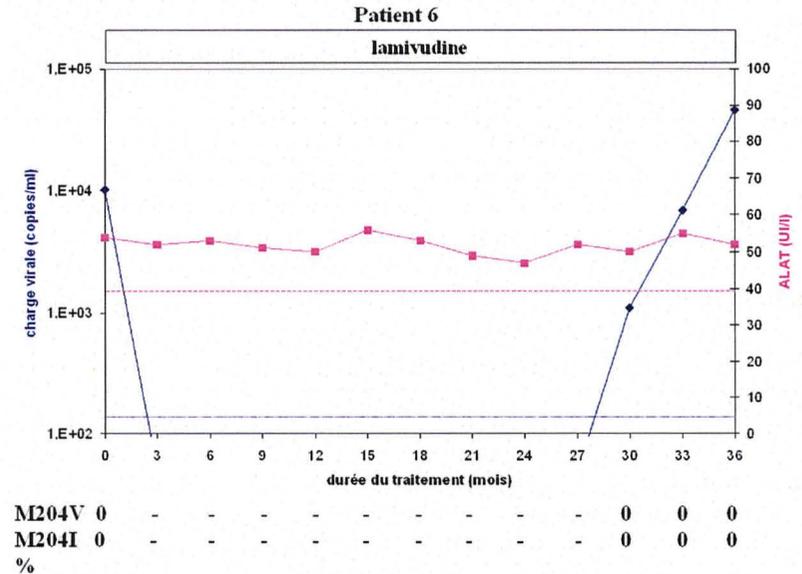
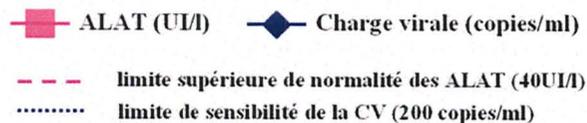


M204V	0	40	100	100
M204I	0	0	0	0
%				

ANNEXE 2



Annexe 1 et 2 : Evolution des charges virales et des ALAT chez les patients P1, P2, P4, P5, P6, P7 et P9 en fonction de l'émergence des variants de résistance au traitement détectés et quantifiés par PCR sélective. Les résultats de P6 et P9 (aucun variant détecté) ont été vérifiés par séquençage. Les résultats de P7 suggèrent un manque d'observance entre les mois 31 et 34. - : non testé (charge virale trop faible).





Serment des Apothicaire

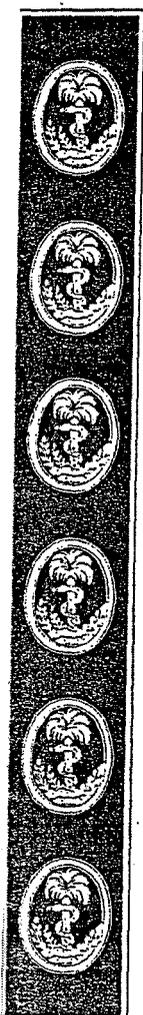
Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



LUPO Julien

Détection et quantification des variants du virus de l'hépatite B résistants à la lamivudine et à l'adéfovir par PCR sélective en temps réel

Résumé

Le traitement de l'hépatite B chronique a radicalement été modifié avec l'apparition des analogues nucléos(t)idiques tels que la lamivudine ou l'adéfovir. L'efficacité de ces traitements peut être remise en cause par l'émergence de virus résistants portant des mutations au niveau du site actif de la polymérase virale. De nombreuses études suggèrent que la dynamique d'émergence des variants de résistance aux analogues nucléosidiques est progressive. Le diagnostic précoce de la résistance à la lamivudine ou à l'adéfovir peut être amélioré par des techniques sensibles de génotypage, capables de détecter les virus mutés alors qu'ils ne sont encore que minoritaires au sein de la population virale totale. Une technique sensible de PCR sélective en temps réel basée sur la stratégie ARMS (Amplificatory Refractory Mutation System) a été développée pour étudier les mutations rtM204I/V et rtN236T associées à la résistance à la lamivudine et à l'adéfovir.

La PCR sélective a été évaluée en travaillant sur des mélanges de plasmides mutés et sauvages construits par clonage au laboratoire, et sur des sérums de patients. Ses performances ont été comparées au séquençage direct et à une technique d'hybridation inverse (INNO-LiPA). La PCR sélective était capable de détecter une population minoritaire présente à 0,1% quand la population plasmidique totale était supérieure à 10^4 copies. Elle a également permis une meilleure détection des populations minoritaires que le séquençage, où le mutant devait représenter au moins 10% de la population virale totale. Le test INNO-LiPA a permis la détection de populations minoritaires représentant 5% de la population virale totale, et a semblé plus adapté pour étudier les variants minoritaires présents dans des sérums de faibles charges virales.

Neufs patients infectés par le VHB et traités par lamivudine et/ou adéfovir ont été suivis en utilisant la technique de PCR sélective. Dans un cas, notre méthode a permis de détecter la mutation rtN236T 3 mois avant la remontée de la charge virale. Dans un autre cas, la PCR sélective a permis d'anticiper le diagnostic de résistance à l'adéfovir de 2 mois par rapport au séquençage. Pour un patient, la PCR sélective a montré que les variants rtM204I/V pouvaient persister longtemps après arrêt du traitement (> 2 ans). Par ailleurs, la recherche des variants rtM204I/V en pré-thérapeutique a été réalisée chez 6 patients développant une résistance à la lamivudine et chez 8 patients ne développant pas la résistance après 3 ans de traitement. La préexistence avant traitement des mutants rtM204I/V n'a pu être mise en évidence dans aucun des 2 groupes.

Mots clés : Hépatite B, Résistance, Lamivudine, Adéfovir, Mutations, PCR

Jury : Monsieur le Professeur A. Favier- Président du jury
Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin
Monsieur le Docteur P. Morand
Madame le Docteur M.N. Hilleret