Année 2019/2020 N°

Mémoire de Diplôme d'études spécialisées

spécialité Biologie Médicale

tenant lieu de thèse d'exercice

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Sébastien Charles Raymond EYMIEUX

Né le 10/01/1991 à Tours (37000)

Mise au point de modèles innovants d'étude du virus de l'hépatite B : élaboration d'une nouvelle lignée cellulaire infectable *in vitro*

Présentée et soutenue publiquement le 27/09/2019 devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Philippe ROINGEARD, Biologie cellulaire, Faculté de Médecine - Tours

Membres du Jury :

Professeur Catherine GAUDY-GRAFFIN, Bactériologie-Virologie-Hygiène hospitalière, Faculté de Médecine - Tours

Professeur Gilles THIBAULT, Microbiologie-Immunologie-Bioépidemiologie, Faculté de Pharmacie, Tours

Docteur Louis D'ALTEROCHE, Hépatologie, PH, CHU Tours

Docteur Fanny DUJARDIN, Anatomie et cytologie pathologique, PH, CHU Tours

Directeur de thèse : Professeur Christophe HOURIOUX, Biologie cellulaire, Faculté de médecine – Tours

Résumé

Mise au point de modèles innovants d'étude du virus de l'hépatite B : élaboration d'une nouvelle lignée cellulaire infectable *in vitro*

Le virus de l'hépatite B (VHB) est un agent infectieux d'importance majeure en pathologie humaine. Du fait de la persistance d'ADN super-enroulé (ADNccc) dans les hépatocytes infectés, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant une guérison complète et définitive de l'infection. La mise au point de nouvelles thérapeutiques passe par une meilleure compréhension du cycle viral, notamment l'étape de formation de l'ADNccc. L'absence de modèle d'étude optimal *in vitro* a motivé ce projet, qui consistait en la mise au point de lignées cellulaires innovantes au travers de deux stratégies de transduction par un vecteur lentiviral : la première par l'immortalisation d'hépatocytes primaires humains via les oncogènes C-myc et h-TERT, la seconde par l'élaboration de cellules FLC4 exprimant le récepteur NTCP du VHB afin de les rendre infectables par le virus. L'obtention d'hépatocytes primaires humains via l'activité de chirurgie hépatique a été permise grâce à la mise en place du protocole « Hepaprim ».

La complexité de la procédure d'isolement des hépatocytes, ainsi que leur grande fragilité lors des étapes de transduction, se sont révélées des facteurs limitants pour l'obtention de cellules immortalisées. L'obtention d'hépatocytes primaires humains lors de notre première tentative confirme cependant la faisabilité de ce protocole au CHRU de Tours.

Notre seconde stratégie a permis la mise au point d'une lignée FLC4-NTCP. La caractérisation de cette lignée, notamment par la détection du génome du virus en intracellulaire après infection *in vitro*, a confirmé sa capacité à être infectée par le VHB. Les valeurs des paramètres d'infection mesurés étaient supérieures, en termes de rendement et de cinétique, à celles obtenues sur la lignée standard HepG2-NTCP. L'obtention d'une nouvelle lignée infectable par le VHB représente une avancée significative vers une meilleure compréhension de son cycle.

Mots clés : VHB, modèles cellulaires, foie, hépatocytes primaires humains, C-myc, h-TERT, FLC4, NTCP, lentivirus, immortalisation, infection *in vitro*

Abstract

Development of innovative hepatitis B virus study models: establishment of a new cell line sensitive to *in vitro* infection

Hepatitis B virus (HBV) is an infectious agent of major importance in human pathology. Due to the persistence of super-coiled DNA (cccDNA) in infected hepatocytes, there is currently no treatment for a complete and definitive cure of the infection. The development of new therapeutics requires a better understanding of the viral cycle, in particular of the cccDNA formation stage. This project was motivated by the absence of optimal *in vitro* model which led to the development of innovative cell lines through two transduction strategies using a lentiviral vector. The first strategy consisted in immortalizing primary human hepatocytes via the C-myc and h-TERT oncogenes. The second aimed at developing a FLC4 cell line expressing constitutively the HBV NTCP receptor in order to make it prone to infection by this virus. The development of the "Hepaprim" protocol allowed us to obtain primary human hepatocytes from hepatic surgery activity.

The complexity of the hepatocyte isolation procedure, as well as their great fragility during the transduction stages, were two limits on the path to obtain immortalized cells. However, the fact we obtained primary human hepatocyte on our first attempt confirms the feasibility of this protocol at the University Hospital of Tours.

Our second strategy resulted successfully in the obtention of a FLC4-NTCP cell line. Its characterization, in particular by the detection of the intracellular genome of the virus after the *in vitro* infection stage, has confirmed its ability to be infected with HBV. The values of the infection parameters measured were better, in terms of efficiency and kinetic, than those obtained on the HepG2-NTCP standard cell line. This new cell line, susceptible to HBV *in vitro* infection, represents a significant step towards a better understanding of its cycle.

Keywords: HBV, cellular models, liver, primary human hepatocyte, C-myc, h-TERT, FLC4, NTCP, lentivirus, immortalization, *in vitro* infection

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN
Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN
Pr Henri MARRET

ASSESSEURS
Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, *Moyens – relations avec l'Université*
Pr Clarisse DIBAO-DINA, *Médecine générale*
Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Pr Patrick VOURC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE
Mme Fanny BOBLETER

****

DOYENS HONORAIRES
Pr Emile ARON (†) – *1962-1966*
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Pr Georges DESBUQUOIS (†) - *1966-1972*
Pr André GOUAZE - *1972-1994*
Pr Jean-Claude ROLLAND – *1994-2004*
Pr Dominique PERROTIN – *2004-2014*

PROFESSEURS EMERITES
Pr Daniel ALISON
Pr Philippe ARBEILLE
Pr Catherine BARTHELEMY
Pr Gilles BODY
Pr Jacques CHANDENIER
Pr Alain CHANTEPIE
Pr Pierre COSNAY
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr. Dominique GOGA
Pr Alain GOUDEAU
Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ
Pr Gérard LORETTE
Pr Roland QUENTIN
Pr Elie SALIBA

PROFESSEURS HONORAIRES
P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P.BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUAZE – J.L. GUILMOT – N. HUTEN – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINE – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – D. ROYERE - A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian.....Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis .....Cardiologie
AUPART Michel.....Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique .....Cardiologie
BAKHOS David.....Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas.....Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle.....Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe .....Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora .....Pharmacologie clinique
BERNARD Anne .....Cardiologie
BERNARD Louis .....Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle ....Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique .....Physiologie
BRILHAULT Jean.....Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent .....Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck.....Urologie
BUCHLER Matthias.....Néphrologie
CALAIS Gilles.....Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent.....Psychiatrie d'adultes
COLOMBAT Philippe.....Hématologie, transfusion
CORCIA Philippe.....Neurologie
COTTIER Jean-Philippe .....Radiologie et imagerie médicale
DE TOFFOL Bertrand .....Neurologie
DEQUIN Pierre-François.....Thérapeutique
DESOUBEAUX Guillaume.....Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe .....Anatomie
DIOT Patrice.....Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague .....Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri .....Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
DUMONT Pascal.....Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
EL HAGE Wissam.....Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan .....Réanimation
FAUCHIER Laurent .....Cardiologie
FAVARD Luc.....Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand .....Gériatrie
FOUQUET Bernard.....Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick.....Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle .....Anatomie & cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe .....Rhumatologie
GRUEL Yves.....Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice .....Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUYETANT Serge .....Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel.....Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier.....Urologie
HALIMI Jean-Michel.....Thérapeutique
HANKARD Régis.....Pédiatrie
HERAULT Olivier .....Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis .....Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....Biologie cellulaire
LABARTHE François .....Pédiatrie
LAFFON Marc .....Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique .....Bactériologie-virologie
LAURE Boris.....Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry.....Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel.....Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude .....Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent .....Dermato-vénéréologie
MAILLOT François .....Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain .....Pneumologie
MARRET Henri .....Gynécologie-obstétrique

MARUANI Annabel .....Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent .....Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine .....Pédiatrie
MORINIERE Sylvain.....Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa .....Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis.....Rhumatologie
ODENT Thierry.....Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi .....Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna.....Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles .....Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric .....Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Dominique.....Réanimation médicale, médecine d'urgence
PERROTIN Franck .....Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean.....Ophtalmologie
PLANTIER Laurent.....Physiologie
REMERAND Francis.....Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe.....Biologie cellulaire
ROSSET Philippe.....Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel.....Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline.....Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem.....Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab .....Dermatologie-vénéréologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria .....Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre .....Pédiatrie
TOUTAIN Annick.....Génétique
VAILLANT Loïc.....Dermato-vénéréologie
VELUT Stéphane.....Anatomie
VOURC'H Patrick.....Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé .....Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DIBAO-DINA Clarisse
LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien.....Soins palliatifs
POTIER Alain.....Médecine Générale
ROBERT Jean.....Médecine Générale

PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine.....Anglais

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

BARBIER Louise.....Chirurgie digestive
BERHOUET Julien .....Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNAULT Paul .....Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès .....Biostat., informatique médical et technologies de communication
CLEMENTY Nicolas.....Cardiologie
DENIS Frédéric.....Odontologie
DOMELIER Anne-Sophie .....Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane .....Biophysique et médecine nucléaire
ELKRIEF Laure.....Hépatologie – gastroentérologie
FAVRAIS Géraldine .....Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie.....Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe.....Néphrologie
GOUILLEUX Valérie.....Immunologie
GUILLON Antoine.....Réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie.....Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille .....Immunologie

IVANES Fabrice .....Physiologie
LE GUELLEC Chantal.....Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEFORT Bruno.....Pédiatrie
LEMAIGNEN Adrien .....Maladies infectieuses
MACHET Marie-Christine .....Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste.....Radiologie pédiatrique
PIVER Éric.....Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille.....Médecine légale
ROUMY Jérôme .....Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte .....Thérapeutique
TERNANT David.....Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure.....Génétique
ZEMMOURA Ilyess .....Neurochirurgie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....Neurosciences
BOREL Stéphanie.....Orthophonie
MONJAUZE Cécile .....Sciences du langage – orthophonie
NICOGLOU Antonine .....Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald.....Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile .....Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

RUIZ Christophe.....Médecine Générale
SAMKO Boris.....Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ Ayache .....Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
CHALON Sylvie .....Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
COURTY Yves .....Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY Hugues .....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
ESCOFFRE Jean-Michel.....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
GILOT Philippe.....Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice .....Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7001
GOMOT Marie.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice.....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric .....Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 1253
MAZURIER Frédéric.....Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
MEUNIER Jean-Christophe .....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
PAGET Christophe .....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William .....Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
SI TAHAR Mustapha .....Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie
DELORE Claire .....Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie.....Praticien Hospitalier

Pour l'Ecole d'Orthoptie
MAJZOUB Samuel.....Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale
BIRMELE Béatrice.....Praticien Hospitalier

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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.

Remerciements

Je remercie le **Professeur Philippe Roingeard** pour son soutien de longue date à mon projet de carrière hospitalo-universitaire, et pour la confiance qu'il m'a accordée dès le départ. Sa vision globale de la biologie fondamentale et de la médecine, son optimisme et sa bienveillance forment ensemble une source d'inspiration quotidienne. Je le remercie de m'avoir fait l'honneur d'être président de ce jury et de me permettre d'exercer ma profession, avant tout au service du patient, dans son unité de recherche et son unité hospitalière.

Au Professeur Christophe Hourioux
Je le remercie de m'avoir encadré depuis la réalisation de mon master 1, au cours de mon master 2 et finalement dans le cadre de cette thèse d'exercice de médecine. Je le remercie pour sa patience, sa disponibilité, sa bienveillance et ses précieux conseils tout au long de ce parcours. C'est par lui que j'ai appris les bases du raisonnement scientifique, et son approche originale de la biologie cellulaire appliquée à la virologie m'a fait aimer le monde de la recherche et incité à poursuivre dans cette voie.

Au Professeur Catherine Gaudy-Graffin
Je la remercie de m'avoir appris la pratique de la virologie hospitalière, et de m'avoir accordé sa confiance en m'impliquant dans de nombreux projets en rapport avec l'enseignement, la qualité et la recherche clinique. Je la remercie également d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Au Professeur Gilles Thibault, Aux Docteurs Fanny Dujardin et Louis D'Alteroche
Merci d'avoir accepté d'être membres de ce jury, et de me faire l'honneur de juger ce travail, dans lequel l'interdisciplinarité tient une place importante.

Je remercie également le **laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique** du CHRU de Tours pour sa participation au protocole HepaPrim.

Au Professeur Ephrem Salamé, au Docteur Louise Barbier et à toute l'équipe du service de chirurgie hépato-biliaire et digestive du CHRU de Tours
Merci de leur soutien pour la mise en place du protocole HepaPrim, et de m'avoir permis d'être directement en contact avec leurs patients dans le cadre de ce projet de recherche fondamentale.

Je remercie le **Docteur Sophie Guyetant** du Centre de Ressources Biologiques pour son aide essentielle concernant les aspects éthiques et administratifs du protocole HepaPrim.

Au Professeur Emmanuelle Blanchard-Laumonnier
Merci de m'apprendre la pratique de la microscopie électronique hospitalière, de faire preuve de patience et d'être présente pour répondre à mes nombreuses interrogations. Je la remercie également d'avoir accepté de m'encadrer dans mon projet à venir de réaliser une thèse de science.

Au Professeur Francis Barin
Je le remercie pour toutes les connaissances qu'il m'a transmises, pour ses précieux conseils et sa grande expérience concernant la virologie hospitalière. Je le remercie également pour sa bienveillance et pour m'avoir fait aimer cette discipline.

A toute l'équipe de l'unité de recherche INSERM U1259 « Morphogénèse et antigénicité du VIH et des virus des hépatites »
Merci d'avoir permis la réalisation du versant fondamental de ce projet, par vos conseils, et le temps consacré à transmettre la maîtrise de nouvelles techniques, dans une ambiance aussi agréable que studieuse. C'est un vrai plaisir de travailler à vos côtés.

Je remercie plus particulièrement **Charline Herrscher** pour l'aide précieuse qu'elle m'a apporté concernant la technique d'infection des cellules, et qui a permis l'aboutissement de ce projet. Merci Charline pour ta grande disponibilité, ta patience et pour la persévérance dont tu fais preuve.

Je remercie également **Florentin Pastor** pour les nombreuses techniques que j'ai apprises grâce à lui et le temps qu'il m'a accordé.

Je remercie **Amélie Dumans**, **Marianne Maquart**, **et Clara Visdeloup** pour leur aide, leur disponibilité et leurs conseils, en particulier concernant l'utilisation des lentivirus.

Je remercie **Alain Moreau et Florian Seigneuret** pour leurs conseils concernant la biologie moléculaire, et **Elodie Beaumont** pour son expérience concernant la culture cellulaire.

Je remercie **Romuald Patient, Hugues De Rocquigny et Philippe Chouteau** pour leur expérience et leurs nombreux conseils.

Enfin je remercie **Jade, Stéphanie, Virgile, Yannick, Aurélie, Julie et Elsa** pour leur bonne humeur et les bons moments partagés dans le monde de la recherche, encore nombreux à l'avenir je l'espère.

A toute l'équipe de l'unité hospitalière de Biologie cellulaire et Microscopie du CHRU de Tours
Merci de m'accompagner dans l'apprentissage de cette nouvelle discipline qu'est la microscopie électronique, dans cette ambiance chaleureuse et accueillante.

Je remercie plus particulièrement **Julien Gaillard et Pierre-Ivan Raynal** pour leur aide apportée concernant les techniques de microscopie.

A toute l'équipe de l'unité hospitalière de Virologie du CHRU de Tours
Merci pour ces dernières années d'internat où j'ai appris la virologie grâce à vous. Votre passion pour cette discipline est communicative et votre dévouement au rendu de résultat des patients est inspirant.

Je remercie en particulier **Karl Stefic** et **Julien Marlet**, dont la rigueur, le professionnalisme et la grande bienveillance représentent pour moi une source d'inspiration pour le début de ce parcours hospitalo-universitaire.

Je remercie également les membres du **service d'hématologie-hémostase**, de jour et de nuit, pour ces trois années de gardes très formatrices que je n'oublierai pas.

A tous mes co-internes, anciens et actuels
Merci pour ces années d'internat qui me laissent d'innombrables souvenirs, sur le plan personnel et professionnel.
Je garde un attachement très fort à notre promotion de quatre internes médecins et quatre internes pharmaciens de l'année 2014, dont **Jean-Baptiste et Luc** faisaient partie. Rien n'est plus gratifiant que ce sentiment de former une équipe, et de progresser ensemble. J'aurai grand plaisir à continuer de travailler avec vous.
Merci également pour toutes ces soirées partagées dans notre belle ville de Tours

Je remercie **Adélaïde** pour ces deux années de représentation partagées, et pour tous ces bons souvenirs biochimiques.

Je remercie **Caroline et Eve-Anne** pour leur gentillesse et leur bonne humeur communicative.

Je remercie **Clémence** pour ces très bons moments consacrés à l'apprentissage de la microbiologie.

Je remercie **Coralie** pour ces derniers semestres d'internat, là encore sous le signe d'une passion commune pour la microbiologie.

Au Docteur Thierry Lepetit
Je le remercie pour ses conseils et son soutien, notamment au cours de mes années d'externat de médecine, et dont l'humanité dont il fait preuve vis-à-vis de ses patients m'a toujours inspiré.

A mes ami(e)s

Je remercie **Agathe et Camille**, qui m'ont accompagné depuis nos jeunes années, et qui ont également étaient présentes au cours de ces années d'études de médecine. Merci aussi pour ces discussions philosophiques et votre gentillesse.

Je remercie **Kévin et Romain**, ainsi que **Mathilda et William,** eux aussi présents depuis tant d'années, et que je considère comme des membres de ma famille. Merci pour ces innombrables fous rires.

Je remercie aussi **Johanna et Jean-Grégoire** pour leur soutien et pour tous ces souvenirs partagés.

A ma famille

Je remercie **Pascale et Denis**, des beaux-parents en or que j'admire pour leur immense gentillesse, pour tous ces bons moments passés en leur compagnie.

Je remercie **Françoise, Martine, Patrick et Alain**, mes très chers oncles et tantes, ainsi que ma super cousine **Frédérique**, qui ont toujours cru en moi et soutenu dans mon parcours de mes premiers pas à aujourd'hui. Merci aussi pour ces si bons moments passés en votre compagnie.

Je remercie **Yolande, Jeanne, Raymond et Charles**, mes quatre grand-parents qui m'ont entouré de leur affection et m'ont transmis leur curiosité pour le monde qui nous entoure. Je n'aurai pas entrepris ce parcours s'ils ne m'avaient pas montré la voie. Je pense fort à eux.

Je remercie **Robin**, mon frère, que j'ai vu grandir, dont je suis très fier, et avec qui je partage tant de choses. Merci pour cette joie que tu m'apportes à chacune de nos conversations.

Maman, Papa, c'est grâce à vous que je me trouve là aujourd'hui. Vous êtes les meilleurs parents que l'on puisse souhaiter avoir et m'avez toujours entouré de votre amour. Papa, tu m'as transmis ton intérêt pour l'enseignement et ta passion pour les sciences. Maman, tu m'as transmis ton imagination et ton esprit littéraire. Je vous remercie de m'avoir fait découvrir le monde, et d'avoir été toujours présents, dans les bons moments comme dans les moments difficiles.

Enfin, je remercie l'amour de ma vie, **Anne-Cécile**. Je suis si fier de partager ta vie, de ton parcours et de ton esprit créatif. Merci de me rendre heureux chaque jour que je passe à tes côtés. Merci de m'avoir tenu la main tout au long de ce parcours. J'ai passé dix ans de bonheur avec toi et suis impatient d'en vivre tant d'autre. Je t'aime chérie.

Table des matières

Résumé…….. 3
Abstract…….. 4
Remerciements…….. 10
Table des matières……..... 14
Liste des figures……... 16
Liste des tableaux……..... 17
Abréviations…….. 18

I. INTRODUCTION 22

A. LE VIRUS DE L'HEPATITE B 22
1. Caractéristiques virales et phylogénie.....22
2. Génome viral et transcrits viraux 22
3. Structure et fonction des protéines virales.....24
4. Cycle viral et morphogenèse 28
B. INFECTION PAR LE VHB ET CARCINOME HEPATOCELLULAIRE 30
1. Historique.....30
2. Épidémiologie.....32
3. Génotypes et variants 36
4. Physiopathologie.....39
a) Organe cible du VHB : le foie 39
b) Cellule cible du VHB : l'hépatocyte primaire humain 43
c) Hépatite virale B : inflammation et fibrose 45
d) CHC et transformation cellulaire 49
5. Clinique et histoire naturelle 51
6. Dépistage, diagnostic et prévention.....55
a) Marqueurs virologiques et biochimiques 55
b) Diagnostic histologique 57
c) Biomarqueurs pronostiques et prédictifs 60
7. Prophylaxie.....60
8. Thérapeutique 63
9. Populations spécifiques.....68
a) Patients immunodéprimés 68
b) Patients co-infectés 68
C. MODELES D'ETUDE DU VHB.....70
D. OBJECTIFS 74

II. MATERIEL ET METHODES 76

A. CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES.....76
B. PRODUCTION DES PARTICULES LENTIVIRALES 77
C. QUALIFICATION DES PARTICULES LENTIVIRALES 80
D. ISOLEMENT DES HEPATOCYTES PRIMAIRES HUMAINS ET PROTOCOLE HEPAPRIM 81
E. CULTURE CELLULAIRE ET TRANSDUCTION 83
F. CARACTERISATION DES LIGNEES CELLULAIRES TRANSDUITES 85
1. Contrôle de l'expression de la protéine d'intérêt 85
2. Évaluation de la susceptibilité vis-à-vis de l'infection par le VHB.....86
a) Production des lots de virus sur cellules en culture 86
b) Infection in vitro par le VHB..... 86
c) Détection de l'ARN prégénomique sur lysats cellulaires 86

III. RESULTATS 88

A. CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES.....88

B. PRODUCTION DES PARTICULES LENTIVIRALES 88
C. QUALIFICATION DES PARTICULES LENTIVIRALES 88
D. ISOLEMENT DES HEPATOCYTES PRIMAIRES HUMAINS ET PROTOCOLE HEPAPRIM 90
E. CULTURE CELLULAIRE ET TRANSDUCTION 96
1. Hépatocytes primaires humains 96
2. Lignée FLC4 97
F. CARACTERISATION DES LIGNEES CELLULAIRES TRANSDUITES 97
1. Contrôle de l'expression de la protéine d'intérêt 97
2. Évaluation de la susceptibilité vis-à-vis de l'infection par le VHB 98

IV. DISCUSSION 101

Bibliographie 105

Liste des figures

Figure 1: Relations phylogénétiques des Hepadnaviridae en fonction de l'hôte.....23
Figure 2 : Carte des trajets de diffusion du génotype A du VHB à l'échelle mondiale.....23
Figure 3: Structure du génome viral et des ARN viraux transcrits du VHB.....25
Figure 4 : Représentation schématique de la particule virale mature du VHB.....25
Figure 5 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe du VHB.....27
Figure 6 : Représentation schématique et micrographie en coloration négative des particules virales et sous-virales circulantes du VHB.....27
Figure 7 : Cycle du virus de l'hépatite B.....29
Figure 8 : Modèle de la morphogenèse des particules sous-virales du VHB.....31
Figure 9 : Chronologie des principales découvertes scientifiques en rapport le VHB.....31
Figure 10 : Chronologie d'apparition et structure moléculaire des traitements médicamenteux validés dans le cadre de l'infection par le VHB.....33
Figure 11 : Prévalence de l'antigène HBs au niveau mondial en 2016.....35
Figure 12 : Incidence des cancers du foie au niveau mondial en 2012.....35
Figure 13 : Relations phylogénétiques des génotypes du VHB.....37
Figure 14 : Distribution des génotypes du VHB au niveau mondial.....37
Figure 15 : Structure du foie du niveau anatomique au niveau histologique.....40
Figure 16 : Organisation fonctionnelle du foie au niveau histologique.....42
Figure 17 : Zonation métabolique du lobule hépatique.....42
Figure 18 : Microenvironnement hépatocytaire.....44
Figure 19 : Organisation ultrastructurale de l'hépatocyte primaire humain.....46
Figure 20 : Polarité structurale et fonctionnelle de l'hépatocyte primaire humain.....46
Figure 21 : Mécanismes immunologiques de l'hépatite virale B.....48
Figure 22 : Rôle du couple cellule endothéliale sinusoïdale - cellule stellaire hépatique dans la fibrogénèse au cours d'une hépatopathie chronique.....50
Figure 23 : Cinétique des marqueurs virologiques et biochimiques lors des phases successives de l'infection chronique par le VHB.....52
Figure 24 : Profils de réplication et devenir des patients infectés chroniquement par le VHB.....54
Figure 25 : Marqueurs virologiques : de l'hépatocyte infecté vers le sérum.....56
Figure 26 : Stades histologiques selon le score METAVIR.....58
Figure 27 : Évolution de la couverture vaccinale anti-VHB à l'échelle mondiale de 1989 à 201762
Figure 28 : Répartition de la couverture vaccinale anti-VHB au niveau mondial en 2016.....62
Figure 29 : Objectifs du traitement de l'infection par le virus de l'hépatite B.....64
Figure 30 : Cascade mondiale du traitement de l'infection par le virus de l'hépatite B.....67
Figure 31 : Évolution des modèles d'étude animaux et cellulaires du VHB.....71
Figure 32: Caractéristiques des modèles cellulaires vis-à-vis de l'infection par le VHB.....71
Figure 33 : Structure et fonction du co-transporteur sodium-taurocholate (NTCP).....73
Figure 34 : Fonctionnement du vecteur lentiviral intégratif et non réplicatif utilisé.....78
Figure 35 : Schéma récapitulatif des étapes de production des particules lentivirales et de transduction.....79
Figure 36 : Représentation schématique du système d'isolement d'hépatocytes primaires humains par perfusion d'une pièce de résection hépatique avec une solution de collagénase.....82
Figure 37 : Schéma récapitulatif des étapes d'isolement des hépatocytes primaires humains par centrifugation et enrichissement sur gradient de Percoll®.....84
Figure 38 : Schéma récapitulatif de l'analyse cinétique de l'infection sur cellules HepG2-NTCP et FLC4-NTCP par technique de qRT-PCR.....87
Figure 39 : Profil de restriction du vecteur pLenti-puro linéarisé et de l'insert NTCP obtenus après digestion enzymatique par BamHI et XhoI.....89

Figure 40 : Analyse au microscope à épifluorescence de l'expression de la protéine C-myc en cellules Huh7 transduites avec une gamme croissante de lentivirus 89
Figure 41 : Analyse au microscope à épifluorescence de l'expression de la protéine h-TERT en cellules Huh7 transduites 91
Figure 42 : Analyse au microscope à épifluorescence de l'expression de la protéine NTCP sur cellules FLC4 transduites 91
Figure 43 : Photographie du montage utilisé pour l'isolement d'hépatocytes primaires humains à partir de fragments de résection hépatique 94
Figure 44 : Photographies du fragment de résection hépatique issu de l'hépatectomie du patient 1-12010618 94
Figure 45: Photographie du culot brun constitué d'hépatocytes obtenu après digestion des tissus du prélèvement n°1 par la collagénase et étapes de centrifugation 95
Figure 46 : Observation en microscopie optique des hépatocytes primaires isolés à partir du prélèvement n°1 après 24 heures de culture en flasque coatée au collagène 95
Figure 47 : Analyse en immunoblot de l'expression du récepteur NTCP en cellules FLC4 99
Figure 48: Analyse au microscope à épifluorescence (A) et au microscope confocal (B) de l'expression du récepteur NTCP en cellules FLC4 99
Figure 49 : Cinétique d'apparition et quantification de l'ARN prégénomique du VHB mesurées par qRT-PCR en cellules HepG2-NTCP et FLC4-NTCP infectées 100

Liste des tableaux

Tableau 1 : Score METAVIR 58
Tableau 2 : Liste récapitulative et compositions des solutions de perfusion utilisées pour l'isolement d'hépatocytes primaires humains 82
Tableau 3 : Séquences des amorces nécessaires à l'amplification de l'ARN prégénomique du VHB par qRT-PCR 87
Tableau 4 : Séquences des amorces nécessaires à l'amplification du gène HPRT par qRT-PCR 87
Tableau 5 : Quantification de la production de particules lentivirales par le dosage en ELISA de la protéine p24 (kit « Innotest HIV antigen mAB ») 89
Tableau 6 : Caractéristiques clinico-biologiques des patients inclus dans le protocole HepaPrim 93

Abréviations

aa : acides aminés

AASLD : American Association for the Study of Liver Diseases

ADCC : Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

ADN: Acide DesoxyriboNucléique

ADNccc: ADN Circulaire Clos de façon Covalente

ADNrc : ADN Circulaire Relâché

ALAT : Alanine AminoTransférase

APASL : Asian Pacific Association for the Study of the Liver

ARN : Acide Ribonucléique

ARNpg : ARN prégénomique

ASAT : Aspartate AminoTransférase

BCP : Basal Core Promoter

BHBV: Bat Hepatitis B Virus

BSA : Bovine Serum Albumin

C-myc : C-myelocytomatosis protein

Cas9 : CRISPR associated protein 9

CD : Cluster of Differentiation

CHC : Carcinome HépatoCellulaire

CHRU : Centre Hospitalier Régional et Universitaire

CIP : Calf Intestinal Phosphatase

CLIA : Chemiluminescence ImmunoAssay

CNIL : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés

CREB : C-AMP Response Element-Binding protein

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Ct : Cycle threshold

D-PBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DAA : Directly Acting Antivirals

DAMPs : Damage-Associated Molecular-Patterns

DAPI : 4',6-Diamidino-2-Phénylndole

DDB1 : DNA Damage-Binding protein 1

DHBV : Duck Hepatitis B Virus

DMEM : Dulbecco Modified Eagle's minimal Essential Medium

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

EASL : European Association for the Study of Liver

ECL : Enhanced ChemiLuminescent

EGR-1 : Early Growth Response protein 1

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPO : érythropoïétine

ERGIC : ER-Golgi Intermediate Compartment

FAS : Fatty Acid Synthase

FLC4 : Functional Liver Cell 4

GFP : Green Fluorescent Protein

h-TERT : human Telomerase Reverse Transcriptase

HEK-293T : Human Embryonic Kidney 293T

HHBV: Human Hepatitis B Virus

HMM : Hepatocyte Maintenance Medium

HNF-4α : Hepatocyte Nuclear Factor-4 alpha

HPRT : Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransférase

Hsp : Heat Shock Proteins

HSPG : Heparan Sulfate ProteoGlycan

HTLV : Human T-Lymphotropic Virus

IFN: interferon

IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1

IgG : immunoglobuline G

IgM : immunoglobuline M

IL : InterLeukine

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ISG : Interferon-Stimulated Gene

IUT : International Unit of Transduction

JAK : Janus Kinase

kb : kilobase

kPa : kilopascal

LB : Lysogeny Broth

LTR : Long Terminal Repeats

mA: milliampère

mL : millilitre

MOI : Multiplicity Of Infection

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

ng : nanogramme

NIH : National Institute of Health

NK : Natural Killer

nm : nanomètre

NTCP : Na+-Taurocholate Cotransporting Polypeptide

NUCs: Nucleoside analogs

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF: Open Reading Frame

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : Polyéthylène Glycol

PEG-IFNα-2a : interferon alpha-2 pégylé

pg : picogramme

pH : potentiel hydrogène

PBH: Ponction Biopsie Hépatique

PHH : Primary Human Hepatocyte

PI3k : Phosphoinositide 3-kinase

PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride

PNGase F : Peptide:N-glycosidase F

PTH : Primary Tupaia Hepatocytes

PVDF : PolyVinyliDene Fluoride

Ras : Rat sarcoma

RE: Réticulum endoplasmique

RIPA : RadioImmunoPrecipitation Assay buffer

RNase: Ribonucléase

RT-qPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

SCL10A : Solute Carrier Family 10A

siARN : small interfering RNA

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TAF : Ténofovir AlaFénamide

TDF : Ténofovir Disoproxil Fumarate

TDM : TomoDensitoMétrie

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TP : Taux de Prothrombine

TP domain : Terminal Protein domain

TPO : thrombopoïétine

UI : Unités Internationales

VHA : Virus de l'Hépatite A

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHD : Virus de l'Hépatite Delta

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WHBV: Woodchuck Hepatitis B Virus

WHO : World Health Organization

WMHBV: Woolly Monkey Hepatitis B Virus

µg : microgramme

µL : microlitre

I. Introduction

A. Le virus de l'hépatite B

1. Caractéristiques virales et phylogénie

Les *Hepadnaviridae* sont une famille de virus enveloppés à capside de symétrie icosaédrique mesurant environ 42 nm de diamètre, très homogène sur le plan de l'organisation génétique. Le support du génome viral est un ADN partiellement double-brin, et leur cycle comporte une étape de rétrotranscription via un intermédiaire ARN. Cette famille virale est probablement issue d'un processus de coévolution vieux de plusieurs millions d'années chez plusieurs classes d'animaux vertébrés, marqué par de nombreux événements de transmission croisée inter-espèces (**Figure 1**) (1,2). C'est cette histoire évolutive qui explique la présence de virus de l'hépatite B proches phylogénétiquement chez les oiseaux (*Avihepadnavirus*) dont le canard (DHBV), et chez certains mammifères (*Orthohepadnavirus*) dont la marmotte (WHBV), le singe (WMHBV), la chauve-souris (BHBV) et l'homme (HHBV). Du fait d'une transcriptase inverse sujette aux erreurs lors de la réplication, le virus de l'hépatite B humain est lui-même caractérisé par une importante hétérogénéité génétique, dont est issue une division en 9 génotypes (A à I) (3). Celle-ci présente une répartition géographique et ethnique complexe à l'échelle du globe, ainsi que des différences en termes de pathogénicité. L'origine de cette répartition, révélatrice de la longue histoire coévolutive entre l'être humain et le virus, est étudiée par certaines études paléogéographiques (4). Cette dernière est en grande partie expliquée par les mouvements de populations humaines, qu'ils soient anciens (« Out of Africa » paléolithique) ou plus récents (colonisation depuis l'Europe et commerce triangulaire de l'Afrique vers l'Amérique) (**Figure 2**).

2. Génome viral et transcrits viraux

Le génome du virus de l'hépatite B (VHB) est formé d'un ADN circulaire partiellement bicaténaire dont la longueur est d'environ 3,2 kb (5). Ce génome code pour un nombre très limité de protéines, les cadres de lecture codant ces protéines se recouvrent largement, ce qui conduit à une compacité remarquable du génome. Du fait de cette compacité, mais aussi du petit nombre de protéines codées par le virus, il est généralement admis que le VHB possède une forte dépendance vis à vis des cellules qu'il infecte. Ceci permet de mieux comprendre pourquoi le VHB possède une haute spécificité d'infection, d'une part vis à vis de l'hôte infecté (le HHBV ne peut par exemple infecter que les humains, le DHBV uniquement le canard…), et d'autre part vis-à-vis des cellules infectées avec un tropisme strictement hépatocytaire (6).

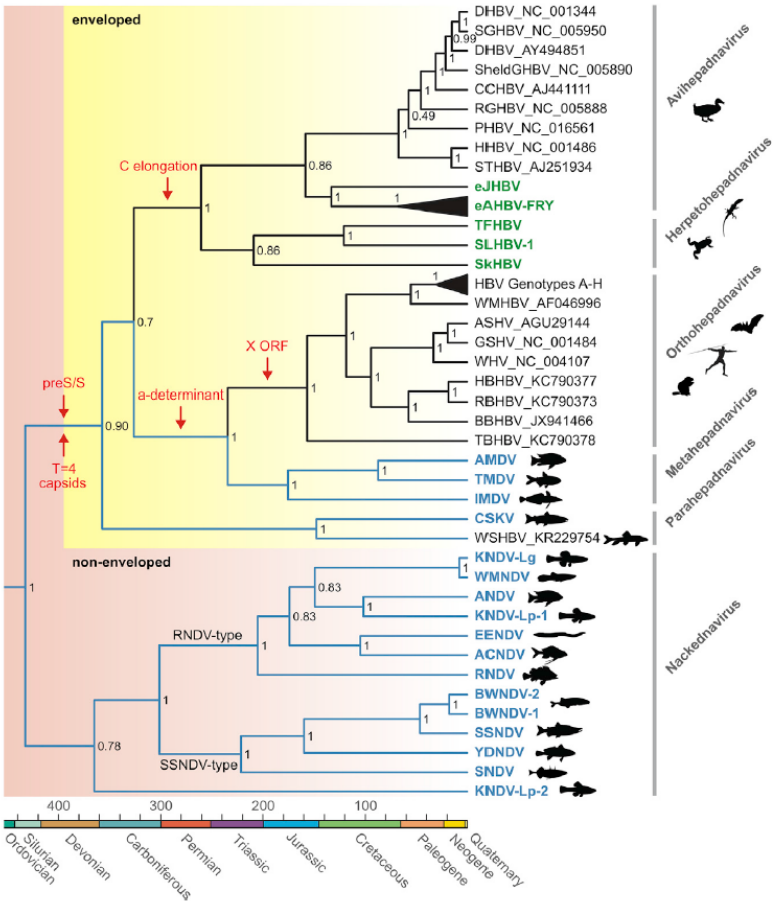

Figure 1: Relations phylogénétiques des Hepadnaviridae en fonction de l'hôte

L'arbre présente les relations de coévolution au sein de différentes espèces de vertébrés ainsi que les composants viraux innovants issus de cette évolution. La présence d'un ORF codant pour la protéine X est par exemple spécifique au genre mammalien des *Orthohepadnavirus* et absent chez les virus aviaires. (Source : Lauber *et al.* Cell Host Microbe. 2017 Sep 13;22(3):387-399.e6.)

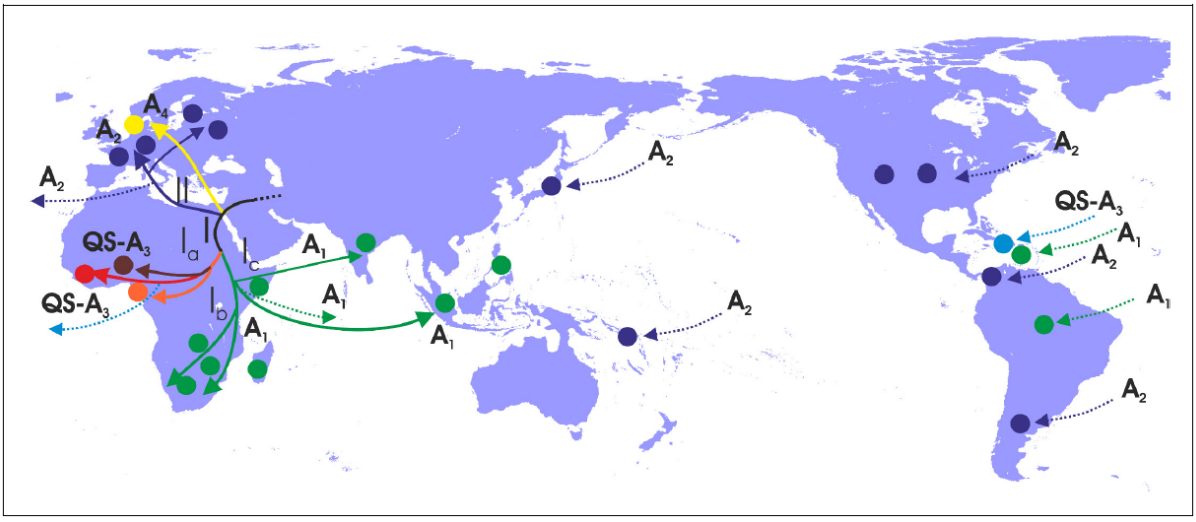

Figure 2 : Carte des trajets de diffusion du génotype A du VHB à l'échelle mondiale

L'origine supposée du génotype A est localisée au Moyen-Orient/Asie centrale. Les flèches en trait plein représentent les itinéraires de dispersion anciens des sous-génotypes A, les flèches en pointillés les itinéraires de dispersion récents. Les cercles colorés représentent les zones où chaque sous-génotype est le plus répandu.

(Source: Kostaki *et al.* eLife. 2018 Aug 7;7:e36709.)

Notre étude s'intéressera uniquement au virus de l'hépatite B humain, pour lequel l'abréviation « VHB » sera utilisée par souci de simplification.

Le génome viral comporte quatre cadres de lecture (ORF) chevauchants (**Figure 3**) : S, C, P et X. L'ORF S et C comportent plusieurs codons d'initiation précédés de promoteurs au sein de leur séquence, donnant lieu à la traduction de plusieurs protéines apparentées mais distinctes sur le plan fonctionnel. L'ORF S code pour les protéines d'enveloppe du virus, et peut-être divisé en région pré-S1, pré-S2 et S. Ainsi la traduction à partir du domaine pré-S1 conduit à la synthèse de la grande protéine L (pour Large) tandis que la traduction à partir de pré-S2 et S génère respectivement la protéine M (pour Medium) et la protéine S (pour Small). L'ORF C code pour la protéine de capside HBc et l'antigène HBe, selon que la traduction est initiée à partir de la région core ou pré-core respectivement. La séquence pré-core code pour un peptide signal qui adresse le produit de la traduction vers le RE où la protéine sera maturée pour former l'antigène secrété HBe. L'ORF P code pour la polymérase et l'ORF X pour la protéine HBx (7).

A partir du génome viral, quatre ARN viraux sont transcrits. Un ARN prégénomique de 3,5 kb à partir duquel sera synthétisé l'antigène HBe, l'antigène HBc et la polymérase. Il servira également de matrice, une fois encapsidé, pour la synthèse du brin d'ADN génomique complémentaire lors de la maturation de la particule virale. Deux ARN de 2,5 kb et 2,1 kb qui permettront respectivement la synthèse la protéine HBs-L et des deux protéines HBs-M et HBs-S. Enfin, la protéine HBx sera synthétisée à partir d'un petit ARN de 0,7 kb (8).

3. Structure et fonction des protéines virales

Au cours de son cycle viral, le VHB synthétise quatre protéines structurales (la protéine de capside HBc, et les trois glycoprotéines d'enveloppe, S pour Small, M pour Medium, L pour Large) intervenant directement dans la formation de la particule virale (**Figure 4**) et trois protéines non structurales (l'ADN polymérase avec activité de transcriptase inverse, la protéine transactivatrice X et la protéine pré-core HBe).

Concernant les glycoprotéines d'enveloppe du VHB, il a été démontré que les protéines S (226 aa) et L (400 aa) étaient indispensables à la formation et au pouvoir infectieux des particules virales. A l'inverse, le rôle de la protéine M (281 aa) au cours du cycle viral demeure encore mal élucidé à ce jour, et son absence dans les cellules infectées ne semble pas perturber la morphogenèse ou l'infectiosité des virions produits. Ceci suggère que cette protéine a un rôle mineur voire inexistant dans la formation de la particule infectieuse, une hypothèse renforcée également par son absence de production chez les *Avihepadnavirus*. Ces protéines d'enveloppe possèdent deux domaines transmembranaires clairement identifiés, associés à

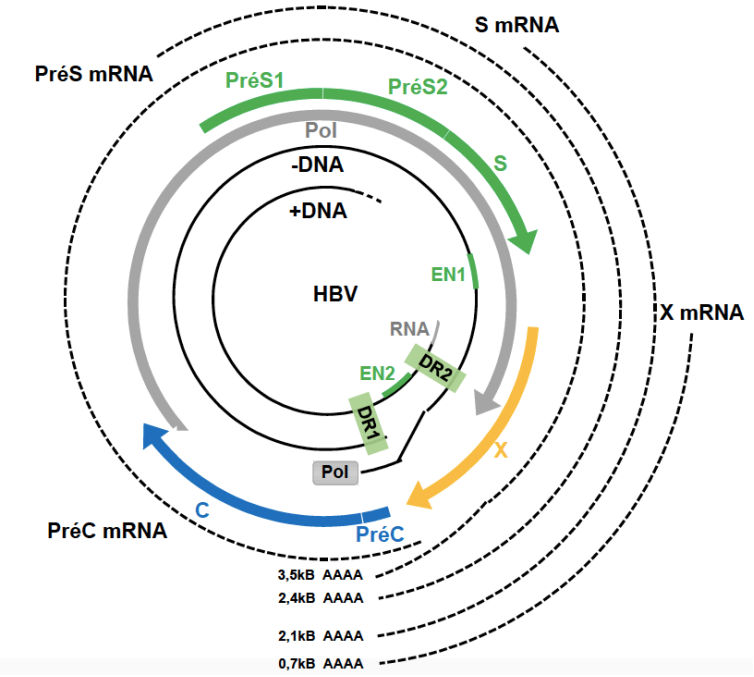

Figure 3: Structure du génome viral et des ARN viraux transcrits du VHB
Le génome viral contient plusieurs éléments fonctionnels d'importance : deux séquences répétées (DR1 et DR2) à l'extrémité 5' du brin sens nécessaire à la synthèse du brin d'ADN antisens lors de la réplication, et deux promoteurs (EN1 et EN2) conférant une expression strictement hépatocytaire des protéines virales. Au sein de la particule virale mature, la polymérase du virus est attachée de manière covalente à l'extrémité 5' du brin négatif. Les transcrits viraux se terminent tous par une séquence poly-adenylée.
(Source : Tarik Asselah, Paris hepatology conference, janvier 2018)

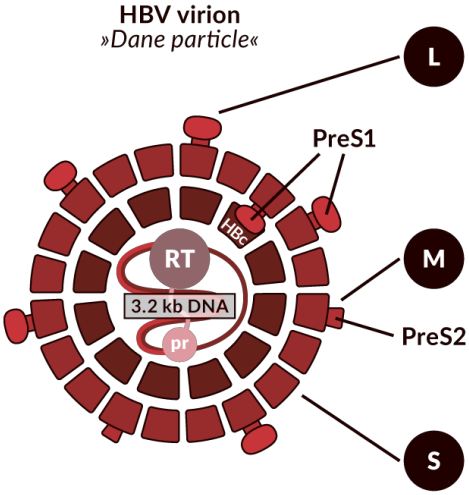

Figure 4 : Représentation schématique de la particule virale mature du VHB
Les deux configurations de la protéine HBs-L sont représentées (cf. figure 5)
(Source : Hepatology, a clinical textbook, 9th edition)

deux domaines prédits comme structurés en hélice alpha (en partie C-terminale de S), dont la topologie membranaire n'est pas encore clairement établie. Si la protéine S constitue l'élément moteur du bourgeonnement viral, la protéine L, qui possède deux topologies membranaires distinctes, est à la fois importante pour l'interaction avec la nucléocapside au cours du bourgeonnement, mais aussi cruciale pour la reconnaissance de l'hépatocyte dans les phases initiales de l'infection (**Figure 5**). De façon tout à fait originale, la sécrétion de virus s'accompagne de particules sous-virales non infectieuses divisées en sphère de 22 nm et filaments de longueur variable, uniquement constitués de protéines d'enveloppe (**Figure 6**). Bien que leur existence soit connue depuis les prémices de la recherche sur le VHB, leur rôle exact dans la pathogenèse de l'infection n'est toujours pas entièrement compris à ce jour. Certaines études émettent l'hypothèse que les particules non infectieuses largement majoritaires joueraient un rôle de leurre pour les anticorps neutralisants du patient (9). Les différentes formes de ces particules s'expliquent par leur contenu différent pour les trois protéines d'enveloppe du VHB. Les trois types de particules (virus, sphères et filaments sous-viraux) contiennent toutes les trois la protéine S, au sein desquelles elle est majoritaire. Les virions et les filaments sont riches en protéine L, laquelle est quasiment absente des particules sphériques sous-virales.
Finalement, la capacité des protéines d'enveloppe à s'auto-assembler pour bourgeonner en particules sous-virales a été exploitée pour le développement de vaccins préventifs. Aujourd'hui, l'expression des protéines d'enveloppe est réalisée en l'absence de tout autre composants viral, par génie génétique (10) le plus souvent en modèle levure.

La protéine de capside (183 à 185 aa selon le génotype) comporte deux domaines : la région N-terminale appelée domaine d'assemblage, suffisante pour l'auto-assemblage des protéines en nucléocapsides, et la région C-terminale (ou domaine protamine) riche en résidus arginines basiques conférant à celle-ci sa charge positive et essentielle pour l'encapsidation de l'ARN prégénomique complexé à la polymérase. Les protéines de capside s'assemblent tout d'abord en dimères, puis en particules virales composées de 120 dimères, mesurant 34 nm de diamètre et obéissant à une symétrie T=4.

La polymérase du VHB (832 à 845 aa selon le génotype) est une enzyme qui possède au moins trois activités : ADN-polymérase ARN dépendante, RNAase H, et ADN-polymérase ADN dépendante. Dans un premier temps, l'activité ADN polymérase ARN-dépendante permet la synthèse du brin d'ADN génomique négatif à partir de l'ARN prégénomique. La synthèse de l'ADN est permise par le domaine TP N-terminal de la polymérase qui reconnaît une structure tige-boucle de l'ARNpg. Cette reconnaissance liée à la présence d'une tyrosine très conservée du domaine TP, va ensuite permettre l'initiation de la synthèse du brin d'ADN viral négatif. Une fois la matrice ARN dégradée par son domaine RNase H,

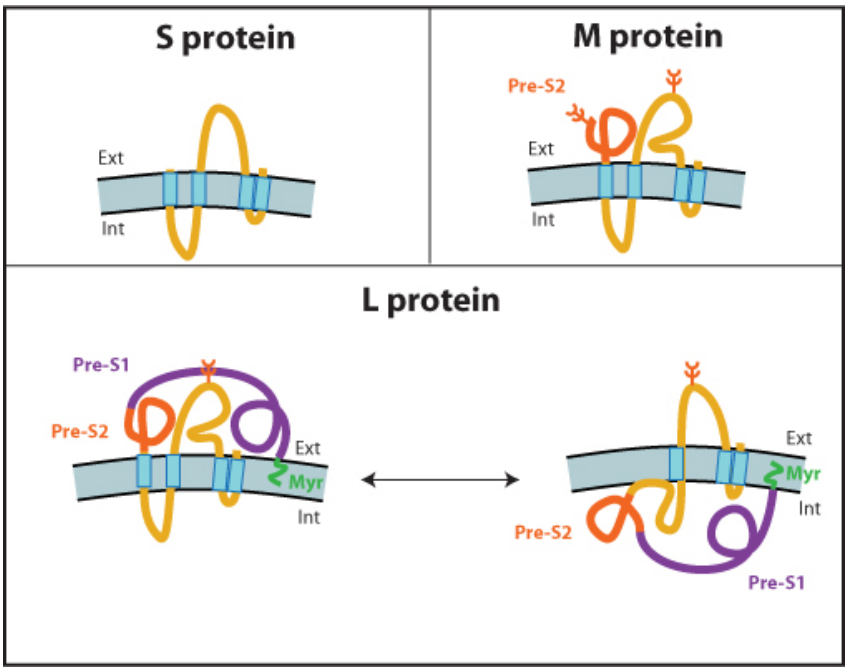

Figure 5 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe du VHB
Les deux configurations de la protéine L sont représentées : la forme i-préS cytosolique (à droite) interagissant avec la nucléocapside lors de l'assemblage, et la forme e-préS luminale (à gauche) interagissant avec la surface des cellules lors de la phase d'attachement.
Myr: myristoylation N-terminale
(Source : https://viralzone.expasy.org)

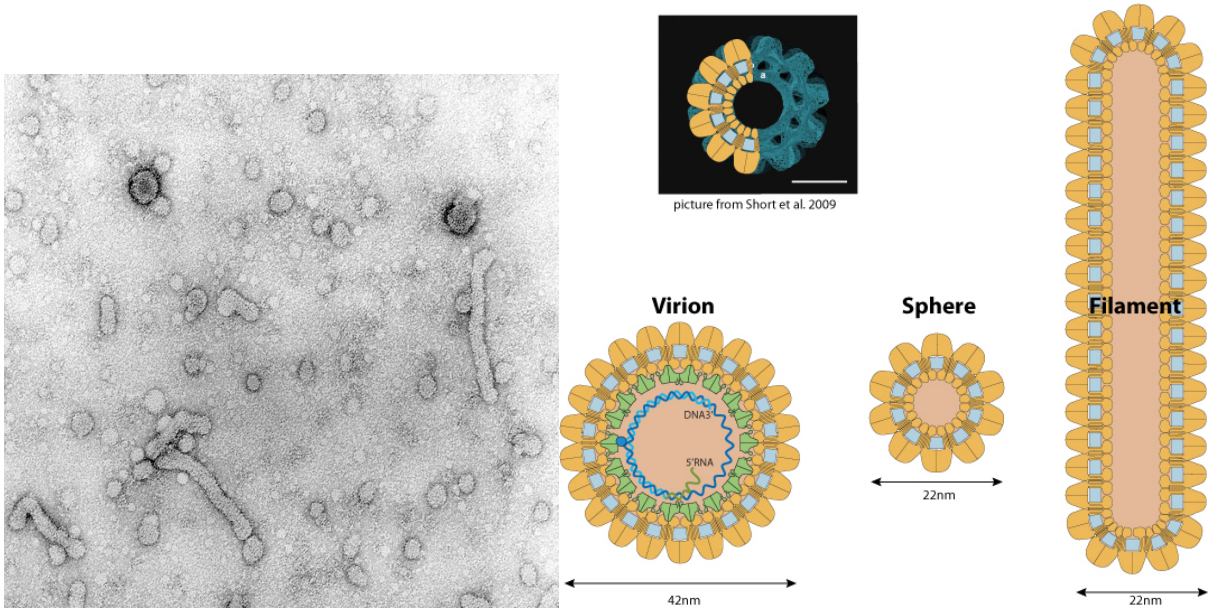

Figure 6 : Représentation schématique et micrographie en coloration négative des particules virales et sous-virales circulantes du VHB
(Sources : Patient *et al.,* https://viralzone.expasy.org)

l'enzyme utilise alors son activité ADN polymérase ADN-dépendante afin de synthétiser le brin d'ADN génomique positif.

La protéine X mesure 154 acides aminés. Sa séquence ne comporte aucune homologie avec un gène connu, et sa structure demeure mal élucidée du fait de la difficulté à la produire en quantités suffisantes *in vitro* (11). Malgré de nombreuses études, le rôle précis de cette protéine au cours de l'infection demeure lui aussi mal élucidé, principalement du fait de l'absence de modèle d'étude pertinent, ou de résultats publiés qui peuvent parfois être contradictoires selon les études. Il est cependant établi que cette protéine possède un rôle transactivateur de nombreux gènes, et module une large variété de processus impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose ou les mécanismes de réparation de l'ADN. Il a été montré qu'elle interférait avec les grandes voies de la signalisation cellulaire (p53, NF-κB, Ras/MAPK…), notamment via la modulation du calcium cytosolique (12) ou l'induction de facteurs liés à l'hypoxie (13). En outre, la protéine X intervient très probablement dans le processus multifactoriel de transformation maligne des hépatocytes au cours des hépatites chroniques, aboutissant à l'émergence d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) au bout de quelques décennies.

4. Cycle viral et morphogenèse

Le VHB est, au même titre que les autres virus hépatotropes, un virus de petite taille (< 100 nm), prérequis indispensable pour passer dans les pores de l'endothélium hépatique fenêtré, traverser l'espace de Disse et atteindre sa cellule cible : l'hépatocyte primaire humain. La phase initiale d'attachement du VHB à la surface de l'hépatocyte met en jeu l'interaction de faible affinité de la région pré-S1 de la protéine L d'enveloppe et des molécules glycosylées en surface de l'hépatocyte comme les HSPG (Heparan Sulfate ProteoGlycan), résultant en une augmentation localisée de la concentration en virion (14) (**Figure 7**). Les virions vont reconnaître secondairement le NTCP (sodium taurocholate co-transporting polypeptide, un transporteur de composants biliaires spécifique du foie), identifié comme un récepteur majeur d'entrée du VHB (15). Une fois la capside relarguée dans le cytoplasme, elle est ensuite adressée vers un pore nucléaire, où elle sera désassemblée afin de libérer le génome viral dans le noyau. Une étape cruciale du cycle du VHB est la formation de l'ADNccc (covalently closed circular DNA) à partir de l'ADNrc (relaxed circular DNA), par un mécanisme moléculaire qui reste à élucider. Ce dernier met en jeu de nombreux facteurs cellulaires dont certains impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN, ainsi que des facteurs viraux (principalement la protéine de capside et la protéine X) (16). Une fois synthétisé, l'ADNccc se complexe aux

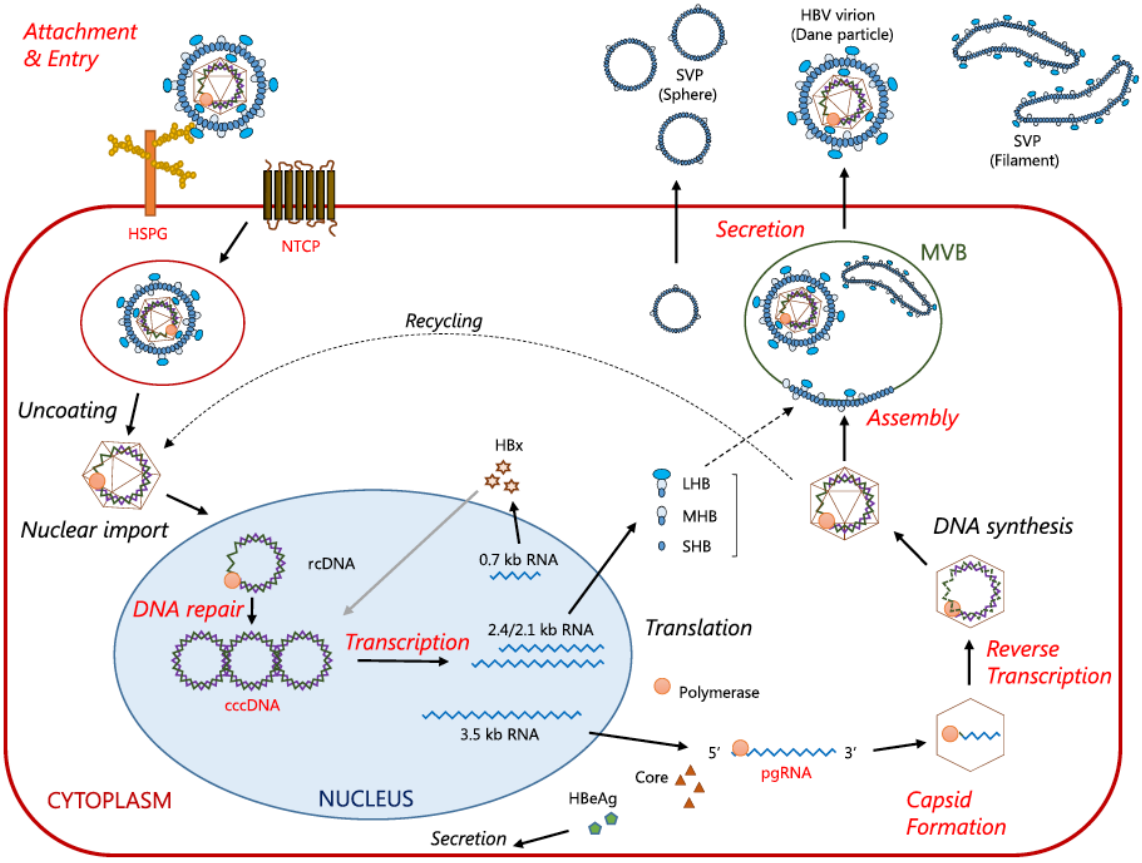

Figure 7 : Cycle du virus de l'hépatite B

MVB : MultiVesicular Body

(Source : Morikawa *et al.* Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology. 2016;46(9):871–7.)

histones de l'hôte pour former une structure apparentée à un mini-chromosome, responsable de la persistance du virus dans la cellule (et l'organisme), et contre lequel les traitements antiviraux actuels sont inopérants. L'ADNccc sert ensuite de matrice pour la synthèse des différents ARN viraux. Parmi ces ARN, l'ARN prégénomique complexé à la polymérase virale constitue l'acide nucléique qui est incorporé au sein de la nucléocapside en formation. Par la suite, la polymérase virale assure la formation par transcription inverse du brin d'ADN viral négatif, puis la synthèse du brin d'ADN viral positif formant l'ADNrc. Les nucléocapsides néoformées suivent ensuite deux voies : soit elles vont constituer de nouveaux virions par acquisition de leur enveloppe au niveau de membranes internes à la cellule, soit elles sont recyclées vers le noyau afin d'amplifier la quantité d'ADNccc disponible (17). Les mécanismes qui régulent l'adressage de la nucléocapside soit vers la production de virion, soit vers le compartiment nucléaire demeurent pour l'instant inconnus. Concernant la morphogenèse des particules sous-virales il a été montré que la protéine S est essentielle et suffisante pour leur bourgeonnement. Ces protéines s'auto-assemblent pour former des filaments dans la lumière du réticulum endoplasmique, ces filaments étant ensuite repliés et stockés sous forme de structures pseudo-cristallines dans des vésicules dérivées du RE (ERGIC) (**Figure 8**). Ces longs filaments sont ensuite progressivement dépliés et fragmentés en filaments plus courts ou en particules sphériques avant d'être sécrétés. Il est aujourd'hui établi que les virions complets et infectieux comportant un génome sous forme d'ADNrc (particule de Dane) représentent une infime partie des particules excrétées par la cellule, au milieu d'un ensemble d'autres particules d'origine virale mais hétérogènes, comme des particules sous-virales d'enveloppe, des virions dépourvus de génome, des virions non matures comportant un ARN prégénomique et des capsides nues et vides (18).

B. Infection par le VHB et carcinome hépatocellulaire

1. Historique

En 1963, Baruch Blumberg, un généticien travaillant au NIH sur le polymorphisme des lipoprotéines observe une réaction inhabituelle en gel d'immunodiffusion, entre le sérum d'un patient hémophile polytransfusé et celui d'un aborigène australien. Il nomme ce nouvel antigène « Australian antigen » (Au) (**Figure 9**) (19). En 1967, le suivi de cohorte de patients suggéra à Blumberg que la présence de l'antigène Au ait un lien avec le développement d'une hépatite virale (20). Peu de temps après, en 1968, Alfred Prince qui travaillait au New York Blood Center isola par immuno-électrophorèse un antigène spécifiquement associé aux hépatites post-transfusionnelles qu'il nomme « Serum Hepatitis antigen » (SH) (21). Il est rapidement établi que l'antigène Au et l'antigène SH ne sont en fait qu'un seul et même antigène. De plus, les

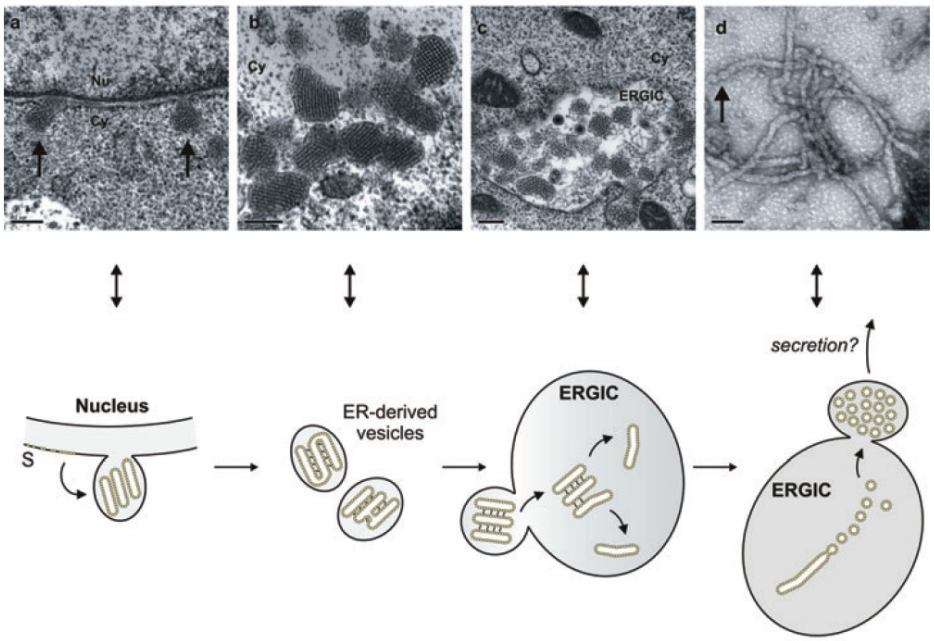

Figure 8 : Modèle de la morphogenèse des particules sous-virales du VHB
(Source : Patient *et al.* Cell Microbiol. 2009 Nov;11(11):1561–70.)

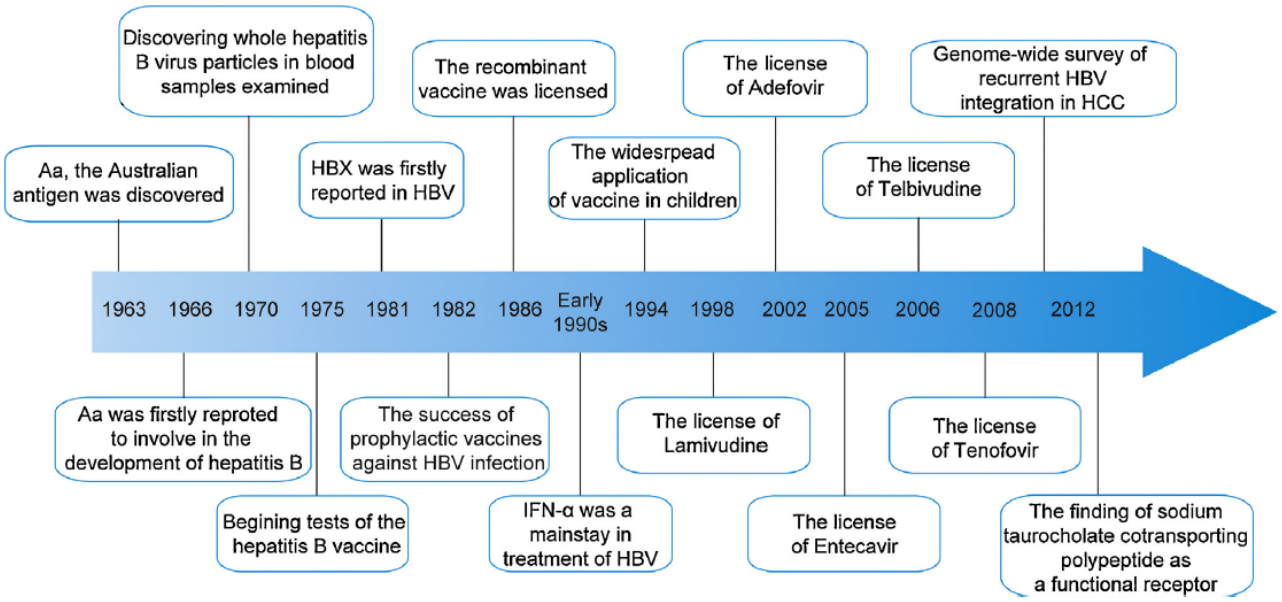

Figure 9 : Chronologie des principales découvertes scientifiques en rapport le VHB
(Source: Liu *et al*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2013 Sep 1;45(9):1987–96.)

sérums de patients dans lesquels ce dernier est détecté présentent des particules d'aspect viral en microscopie électronique. En 1970, David Dane identifie clairement la particule éponyme de 42 nm, le virion du VHB (22). En 1972 au Japon, Okochi met en évidence la corrélation entre la présence de l'antigène Au/SH (qu'il renomme antigène HBs) chez les donneurs de sang et le développement d'une hépatite virale chez les receveurs. Par la suite, le rôle protecteur des immunoglobulines anti-HBs pour la prophylaxie des professionnels de santé est documenté. En 1974, Philippe Maupas, médecin hospitalier et chercheur tourangeau, effectue un stage de six mois dans le service du Professeur Blumberg, où il confirme sur des arguments épidémiologiques et virologiques, la relation étiologique entre le virus de l'hépatite B et le cancer primitif du foie. Dans le même temps, Blumberg émet l'hypothèse qu'un vaccin pourrait être obtenu à partir de plasma de patients porteurs chroniques présentant un titre élevé d'antigène HBs. Dès son retour en France en 1975, Philippe Maupas met ce concept en application pour produire le premier vaccin dirigé contre le VHB, dont l'innocuité et l'immunogénicité sont contrôlées chez le chimpanzé. En octobre de la même année, la vaccination est appliquée à l'homme, notamment chez des patients hémodialysés du CHRU de Tours . En 1976, Blumberg reçoit le prix Nobel de médecine pour sa description du VHB et pour son concept d'un vaccin contre le virus. En 1978, la vaccination contre le VHB est étendue aux jeunes enfants au Sénégal, pays de forte endémie (23). Le vaccin est ensuite proposé pour être ajouté aux programmes élargis de vaccination de l'OMS. En 1981, Philippe Maupas reçoit pour ses travaux, reconnus par l'ensemble de la communauté scientifique, le prix Galien. Les années 1980 voient ensuite l'apparition de vaccins recombinants obtenus par production de l'antigène HBs sur lignées cellulaires de rongeurs en remplacement des vaccins dérivés du sang. En termes de thérapeutique, la plupart des analogues nucléosidiques encore utilisés aujourd'hui ont été validés dans les années 1990 et 2000 (**Figure 10**) (cf.I.B.8).

2. Épidémiologie

Le virus de l'hépatite B (VHB) est un agent infectieux d'importance majeure en pathologie humaine d'une part en termes de morbi-mortalité (du fait des complications de l'infection chronique) et d'autre part du fait de sa forte prévalence dans la population mondiale. Le VHB se transmet via l'exposition au sang et dans une moindre mesure aux fluides corporels (particulièrement le sperme et les sécrétions vaginales), l'allaitement ne semblant pas être un vecteur de transmission (24). Très résistant, il peut survivre de manière prolongée hors de l'organisme, notamment sur le matériel et les surfaces en milieu hospitalier. Au niveau mondial, la plupart des infections sont acquises par transmission périnatale, par transmission horizontale entre enfants en bas âge, et à partir de l'adolescence par voie sexuelle et via les drogues

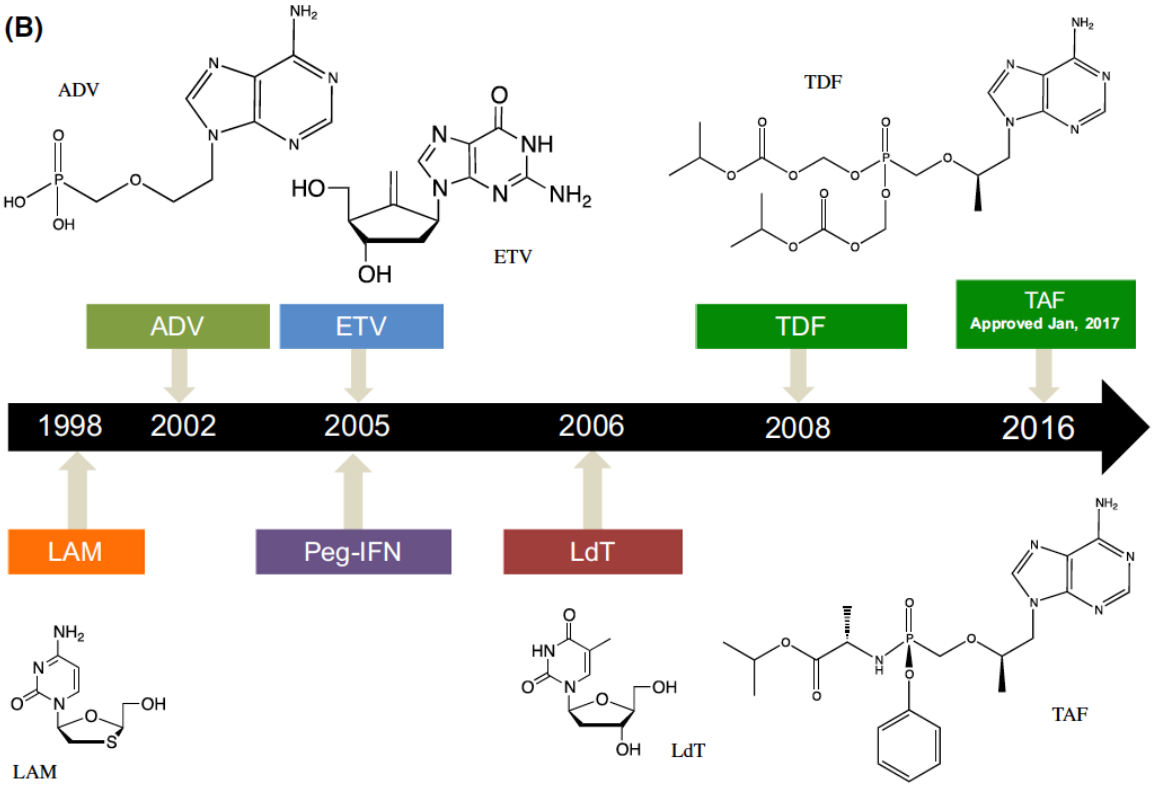

Figure 10 : Chronologie d'apparition et structure moléculaire des traitements médicamenteux validés dans le cadre de l'infection par le VHB

ETV : entecavir, PEG-IFN **:** pegylated-interferon, TDF : tenofovir, LAM : lamivudine, LdT : telbivudine, TAF : tenofovir alafenamide

(Source : Schinazi *et al.* Liver Int. 2018;38 Suppl 1:102–14.)

injectables (25). Les autres modes de transmission, dont la fréquence a fortement diminué grâce au renforcement des mesures de contrôle sanitaire, comprennent la contamination par les produits dérivés du sang et les pratiques médicales non respectueuses des normes d'hygiène. Malgré tout, les infections par le VHB associées aux soins demeurent une préoccupation majeure dans les établissements des pays en voie de développement (26) comme dans les pays développés (27), soulignant le caractère essentiel de la vaccination chez les professionnels de santé et les patients hospitalisés.

L'estimation du nombre de patients chroniquement infectés par le virus oscille entre 240 millions (28) et 350 millions (29), avec un peu plus de 2 milliards d'individus ayant été en contact avec le VHB au cours de leur vie. L'infection chronique par le VHB a été responsable de 786 000 décès au cours de l'année 2010, principalement attribuables au carcinome hépatocellulaire (341 000) et à la cirrhose (312 000), plaçant cette infection au 15ème rang des causes de mortalité toutes pathologies confondues (30). Malgré cela, le groupe de patients chroniquement infectés le plus important est celui des porteurs chroniques inactifs, qui présentent le plus souvent une absence de fibrose hépatique mais dont l'évolution peut malgré tout se faire vers des formes de mauvais pronostic (31).

L'épidémiologie de l'hépatite B peut être décrite en termes de prévalence de l'antigène HBs dans une population (**Figure 11**), définissant des zones de forte (> 8 % AgHBs), intermédiaire (2-7 %) et faible prévalence (< 2 %) (32). Les pays à forte prévalence sont globalement répartis en Afrique subsaharienne et en Asie Pacifique. On estime que 45 % de la population mondiale vit dans une zone de forte prévalence. La plus forte prévalence, supérieure à 12 %, est observée en Afrique subsaharienne (Nigeria, Tchad, RDC…). Dans ces pays, la majorité des individus est infectée à la naissance ou dans l'enfance, un facteur aggravant qui expose à un risque élevé de passage à la chronicité. L'impact de la vaccination à grande échelle et dès la petite enfance est particulièrement important dans ces populations. Les pays à prévalence intermédiaire se situent au Moyen-orient, au Maghreb, en Europe de l'Est et du Sud, ainsi qu'en Amérique latine. Les campagnes de prévention et d'immunisation produisent déjà des effets mesurables, un certain nombre de régions autrefois catégorisées comme à forte prévalence sont aujourd'hui considérées comme à prévalence intermédiaire (33). Les individus vivants dans les pays de faible prévalence représentent seulement 12 % de la population mondiale et sont regroupés en Europe de l'Ouest et du Nord, Amérique du Nord, Australie et au Japon. Dans ces pays, l'incidence de la transmission périnatale et dans l'enfance est faible, la plupart des infections ayant lieu à l'adolescence et à l'âge adulte par transmission sexuelle, injections de drogues et infections liées aux soins. Les catégories de patients particulièrement exposés au risque d'être infectés sont : les détenus, les travailleurs du sexe, les hommes ayant

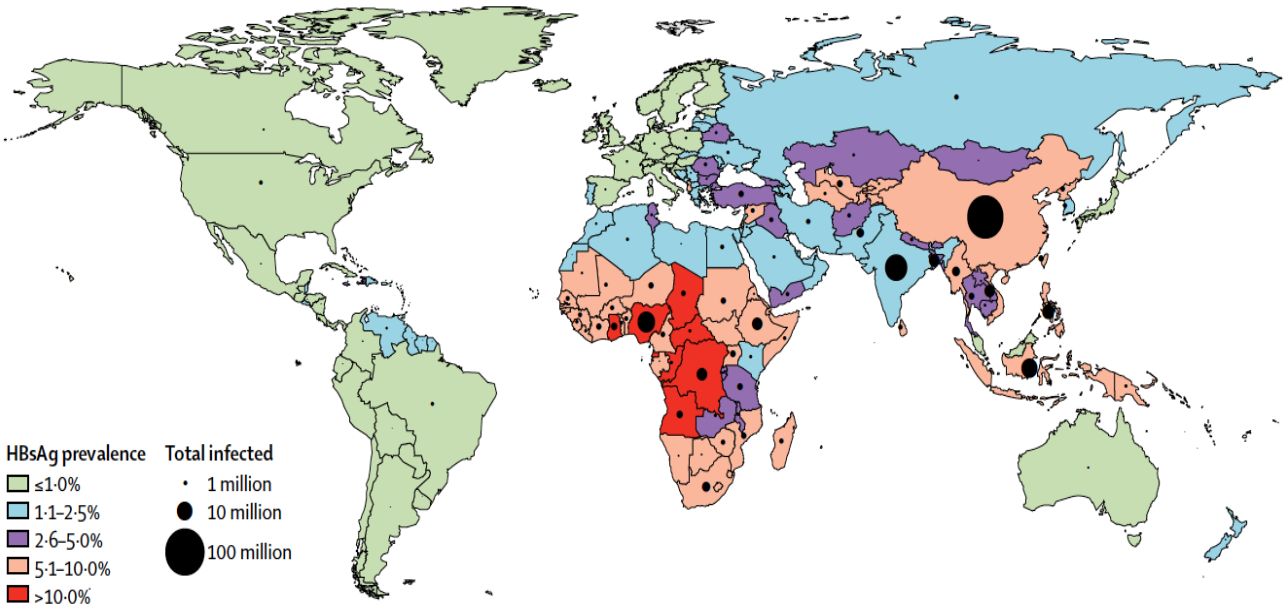

Figure 11 : Prévalence de l'antigène HBs au niveau mondial en 2016
(Source : *Polaris Observatory Collaborators, Lancet Gastroenterol Hepatol. 2018;3(6):383–403.*)

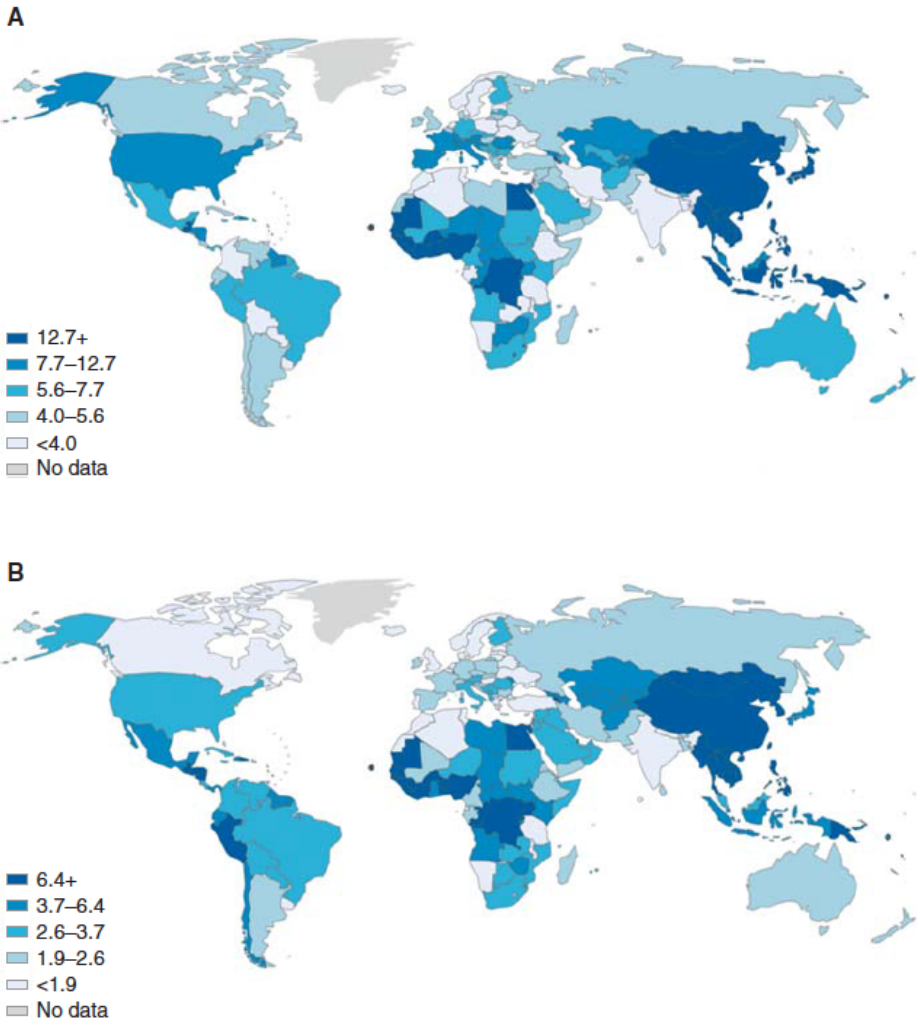

Figure 12 : Incidence des cancers du foie au niveau mondial en 2012
Incidence estimée chez les hommes (A) et chez les femmes (B) exprimée en taux standardisé sur l'âge pour 100 000 habitants (ASR per 100 000)
(Source: Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer)

des relations sexuelles avec des hommes, et les sans-abris (34). Les flux migratoires dirigés des pays de forte prévalence vers des pays de faible prévalence jouent également un rôle dans l'évolution de la prévalence de l'antigène HBs, la majorité des patients infectés chroniquement par le VHB dans les régions de faible prévalence étant souvent nés dans des zones de forte endémie où ils ont été infectés dès leur plus jeune âge (35).

Le carcinome hépatocellulaire est la forme de cancer du foie la plus fréquente, cancer du foie qui représente, toutes étiologies et sexes confondus, la deuxième cause de décès liés à un cancer, soit un décès sur dix (36). Au niveau mondial, les deux tiers des cancers du foie surviennent dans la région du Pacifique occidental (« Western Pacific WHO region »), répartition largement expliquée par la forte incidence de ce cancer en Chine, où survient la moitié des cancers du foie mondiaux (**Figure 12**). Il existe clairement au niveau mondial un lien entre la répartition géographique de la prévalence du VHB et du virus de l'hépatite C (VHC) et celle de l'incidence des cancers du foie, ces deux virus étant responsables de la grande majorité des cas de CHC. La prévalence du VHB influence également les causes de décès liés à l'hépatite B chronique, les patients des pays de forte prévalence décédant majoritairement de CHC et non pas de cirrhose. L'hétérogénéité de l'incidence du CHC à l'échelle mondiale s'explique également par des facteurs non viraux, comme la contamination de végétaux destinés à l'alimentation par l'aflatoxine B1 (mycotoxine aspergillaire qui exerce un effet cancérigène synergique avec celui lié au virus), et des facteurs viraux comme le génotype du VHB. Malgré des progrès importants dans la prise en charge des cancers toutes causes confondues, la mortalité liée au cancer du foie continue à augmenter, même dans les pays développés ayant à leur disposition l'option de la transplantation hépatique. Cela souligne la nécessité d'un dépistage élargi de l'hépatite B et des autres virus hépatotrope, associé à la vaccination des populations (37) et l'accès à une thérapie antivirale adaptée, permettant ainsi de réduire indirectement l'incidence du CHC.

3. Génotypes et variants

Le génotype, reflet de l'hétérogénéité génétique du virus à l'échelle mondiale, est définit arbitrairement pour le VHB par une divergence > 8 % du génome complet entre deux souches virales (**Figure 13**). Ses neuf génotypes, répartis de manière inégale sur la planète (**Figure 14**), revêtent une importance en termes d'épidémiologie, de physiopathologie et de réponse aux traitements (38). L'hétérogénéité génétique est ainsi en partie responsable d'une hétérogénéité de l'évolution de la maladie chez les patients. Le génotype A est plus présent en Europe et en Afrique subsaharienne. Le génotype D prédomine en Europe, Afrique du Nord, Moyen-Orient et Asie centrale. Les génotypes B et C se répartissent en Asie Pacifique. Le génotype E est

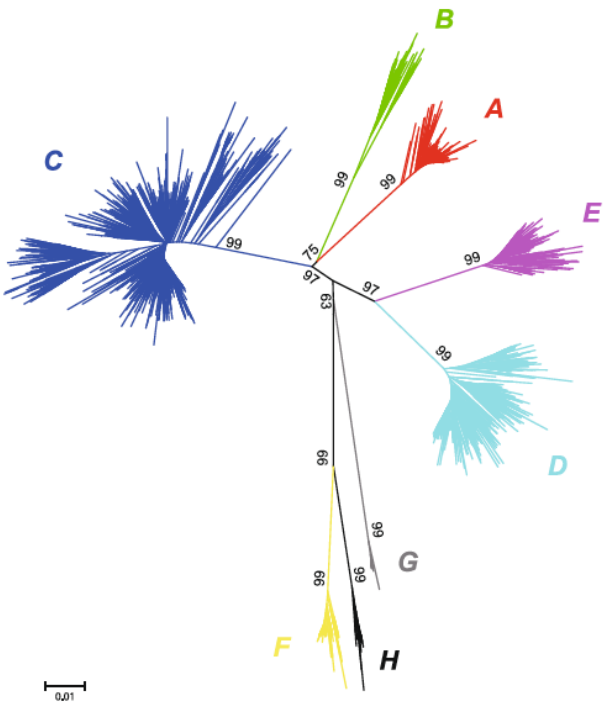

Figure 13 : Relations phylogénétiques des génotypes du VHB
Arbre phylogénétique non enraciné construit à partir de 2992 génomes par méthode de Neighbor-Joining. Les nombres présents sur chaque clade correspondent au nombre de bootstrap réalisé.
(Source : Li *et al.* Sci Rep. 2017 May 16;7(1):1990–1990.)

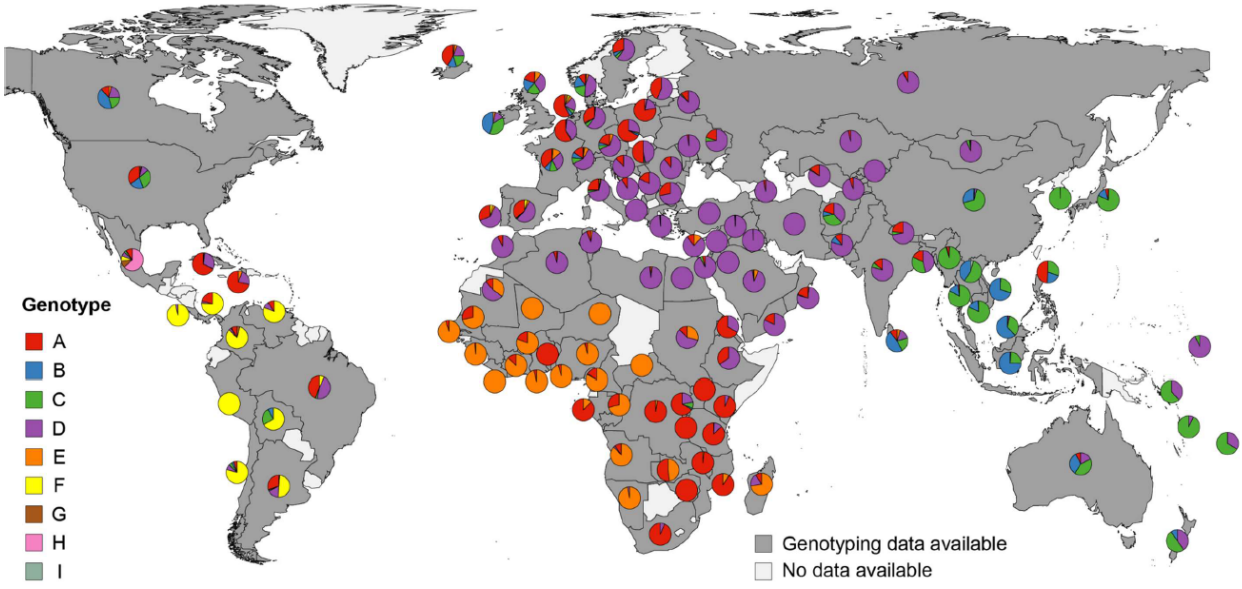

Figure 14 : Distribution des génotypes du VHB au niveau mondial
Les diagrammes circulaires représentent la proportion relative de chaque génotype dans un pays donné.
(Source : Velkov *et al*. Genes (Basel). 2018 Oct 15;9(10):495.)

restreint à l'Afrique de l'Ouest. Le génotype F se limite quant à lui à l'Amérique latine. Les génotypes C et D sont globalement de moins bon pronostic que les génotypes A et B pour plusieurs raisons : un taux de séroconversion HBe plus bas, un risque plus élevé de développer un CHC ou une cirrhose, une fréquence des mutations de mauvais pronostic plus élevée, enfin une moins bonne réponse aux traitements immunomodulateurs. Cette différence s'explique en termes physiopathologiques *in vitro*, en particulier pour le génotype C, par des niveaux d'ADN VHB, d'antigène HBc intracellulaire et d'antigène HBe extracellulaire, plus élevés que d'autres génotypes. L'accumulation de ces composants viraux à des niveaux élevés dans les hépatocytes est probablement à l'origine de lésions hépatiques plus importantes. Une étude récente a également mis en évidence l'impact du génotype sur les caractéristiques des particules sous-virales circulantes, avec une différence en termes de ratio [sphères / filaments] et une sécrétion de filaments augmentée pour les génotypes B et D par rapport aux génotypes A, C et E (39).

Dans le cycle viral, l'apparition de mutations du génome se fait principalement à l'étape de transcription de l'ARN prégénomique (40). Ce taux d'erreur associé à la pression du système immunitaire de l'hôte génère l'apparition de mutants, les trois plus fréquents étant les mutants de la région pré-core, du promoteur basal de la core (BCP) et de la région pré-S. En outre, il est à noter que la pression de sélection liée aux traitements par analogues nucléosidiques est également génératrice de mutations, situées dans la région codant pour la transcriptase inverse, aboutissant à une résistance à ces traitements. La séroconversion HBe est une étape essentielle dans l'histoire naturelle de l'hépatite B chronique, la disparition de l'antigène HBe marquant l'entrée du patient dans la phase de portage chronique inactif. Les mutations des régions pré-core (G1896A) et BCP (A1762T/G1764A) affectent toutes deux la production de l'antigène HBe. Ainsi, les patients infectés par ces mutants présentent des niveaux d'antigène HBe sériques très faibles voire indétectables mais une réplication virale persistante associée à un risque de progression de leur hépatopathie vers des formes de mauvais pronostic. L'apparition de ces mutants semble donc liée à une sélection lors de l'étape de séroconversion HBe, et constitue un mécanisme d'échappement au système immunitaire. Du fait du chevauchement des cadres de lecture, les mutations du BCP n'affectent pas seulement la synthèse de l'antigène HBe mais également la séquence de la protéine HBx. Il est établi que la protéine X du VHB joue un rôle majeur dans la transformation des hépatocytes favorisant l'apparition d'un CHC. Chez les patients infectés par un mutant BCP, il a été suggéré que des mutations induites dans la séquence de la protéine X augmentent le risque de développer un CHC (41). Les protéines de surfaces du VHB comportent des épitopes majeurs reconnus par les lymphocytes T et B, et représentent la cible des immunoglobulines vaccinales. Il n'est donc pas étonnant que la pression du système immunitaire, augmentée par la pression vaccinale, soit génératrice

de mutations spontanées dans la séquence codant pour les trois protéines de surface du VHB, survenant le plus fréquemment dans les régions pré-S1 et pré-S2. Là encore du fait de cadres de lecture chevauchants, certaines mutations de la séquence de la transcriptase inverse sélectionnées par les traitements ont également un impact sur la séquence codant pour les protéines de surface. Ces mutations ont pour conséquence la diminution de l'expression des protéines S et M en faveur de l'expression de la protéine L. Cela aboutit à une accumulation intracellulaire de cette protéine, source de dégâts plus importants dans les hépatocytes infectés, et donc à un risque d'évolution accru vers des formes de mauvais pronostic (42). Les autres conséquences des épitopes modifiés chez les mutants pré-S peuvent être un échappement à la réponse vaccinale humorale ou une mise en défaut de la détection de l'antigène HBs par les tests sérologiques usuels (risque de sous-estimation voire de faux négatif). Ces mutations pré-S semblent également jouer un rôle dans la survenue d'une hépatite B occulte (cf. I.B.5.).

4. Physiopathologie

a) Organe cible du VHB : le foie

Le VHB est un virus possédant un tropisme strictement hépatocytaire. A ce titre, les principales conséquences d'une infection par ce virus seront d'ordre hépatique. Le foie est un organe abdominal de l'appareil digestif à l'origine de fonctions vitales pour l'organisme. La vascularisation afférente comprend l'artère hépatique propre, apportant le sang artériel oxygéné, et la veine porte, issue du drainage du tube digestif apportant un sang veineux riche en nutriments (**Figure 15**). Associés au canal biliaire hépatique commun, qui assure le transport de la bile du foie vers le duodénum via le cholédoque, ces trois entités anatomiques forment ensemble le pédicule hépatique, situé à la face inférieure du foie. La vascularisation efférente correspond aux veines hépatiques situées sur sa face supérieure, et qui drainent le sang veineux du foie vers la circulation systémique via la veine cave inférieure. Enfin, le foie est enveloppé dans une capsule de tissu conjonctif principalement constitué de collagène de type IV, la capsule de Glisson, qui s'invagine à l'intérieure du parenchyme hépatique et sert de support à la vascularisation afférente. Au niveau anatomique et fonctionnel, le foie peut être divisé en segments, chaque segment vascularisé par une branche de la circulation veineuse. Au niveau histologique, l'unité structurale du foie est le lobule hépatique, un foie humain comportant environ 10^6 lobules. Le lobule est un prisme à section plus ou moins hexagonale d'un diamètre de 1 mm. Au milieu de chaque lobule se trouve une veine centro-lobulaire, connectée à la circulation efférente. Chaque sommet de l'hexagone comporte une triade portale associant une artériole interlobulaire, une veinule interlobulaire et un conduit biliaire,

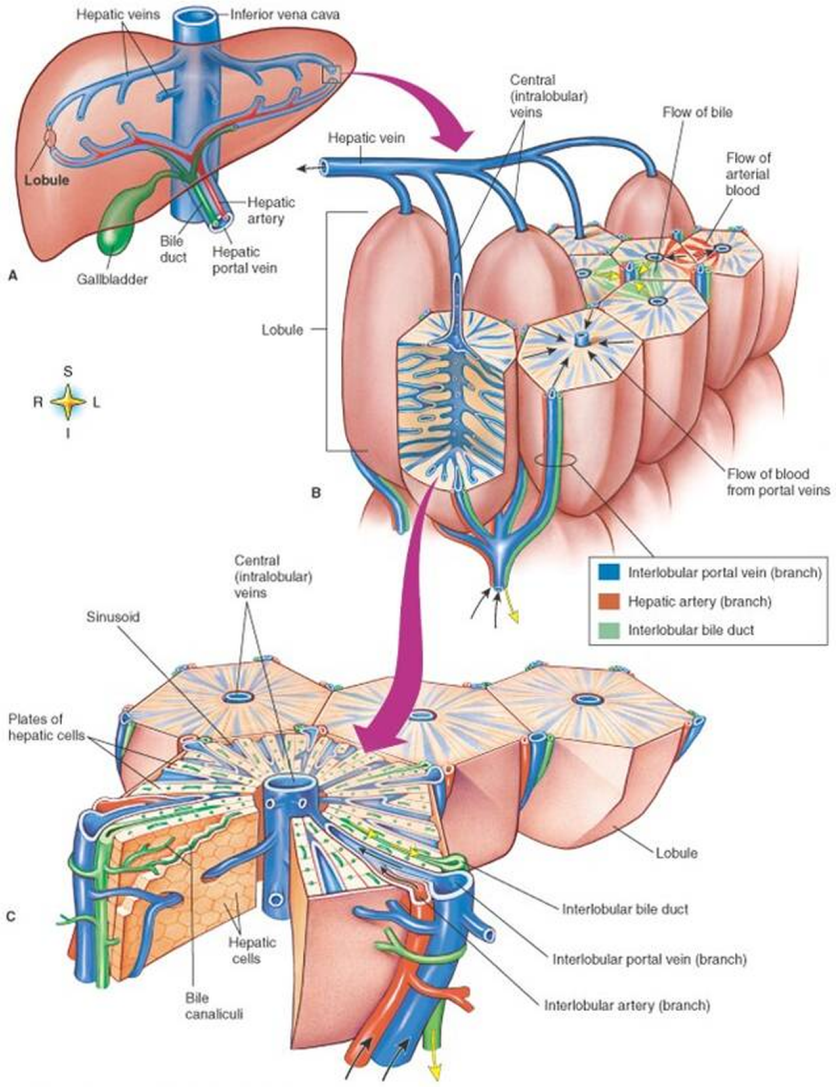

Figure 15 : Structure du foie du niveau anatomique au niveau histologique

ramifications des gros vaisseaux du pédicule hépatique. Les triades portales circulent dans une fine gaine de tissu conjonctif qui délimite le lobule. L'hexagone est rempli de travées hépatocytaires, d'épaisseur monocellulaire, qui irradient depuis la veine centrale vers la périphérie. On trouve entre chaque travée un capillaire sinusoïde veineux, qui relie une veinule porte à la veine centrolobulaire. Les deux unités fonctionnelles du foie sont le lobule portal et l'acinus hépatique, qui se superposent à l'organisation structurale (**Figure 16**). Un lobule portal est un bloc triangulaire de parenchyme hépatique centré par une triade portale et dont chaque sommet comporte une veine centrolobulaire. Au sein de ce lobule, la bile secrétée par les hépatocytes via les canalicules biliaires puis les canaux de Hering circule des sommets du triangle vers le conduit biliaire en son centre. Un acinus hépatique possède une structure ellipsoïde dont le grand axe relie deux veines centrolobulaires, et dont le petit axe relie deux triades portales. Au sein de l'acinus, les sangs artériel et veineux mêlés circulent au sein des sinusoïdes de la triade portale vers la veine centro-lobulaire. Le sens de la microcirculation génère un gradient décroissant d'oxygène et de nutriments, définissant trois zones métaboliques : la zone 1 périportale, la zone 2 médiolobulaire, et la zone 3 péricentrale (43). Les hépatocytes périportaux sont les premiers à recevoir l'oxygène artériel et les nutriments digestifs, ils contiennent plus de mitochondries et moins de RE lisse que les hépatocytes péricentraux, et sont le siège de processus oxydatifs (cycle de Krebs, phosphorylation oxydative, néoglucogenèse, cycle de l'urée, synthèse protéique…) (**Figure 17**). Les hépatocytes péricentraux sont quant à eux le siège de processus réducteurs (glycolyse, synthèse de la glutamine, synthèse lipidique, biotransformation des xénobiotiques, catabolisme de l'hème…). La zonation métabolique du foie revêt une importance en termes physiologiques. Elle est également utile dans la compréhension de certains processus pathologiques toxicologiques (44) (la zone périportale étant souvent la première touchée car située en première ligne sur le réseau veineux) ou néoplasiques (45) (l'agressivité du cancer étant en partie liée au phénotype hépatocytaire initial et donc à sa localisation).

D'un point de vue fonctionnel, le foie joue un rôle dans de nombreuses fonctions métaboliques : la régulation de l'homéostasie interne de l'organisme (régulation du pH via le métabolisme de l'urée) ; la prise en charge des nutriments d'origine digestive, notamment au travers du stockage et de la libération de l'énergie, via le métabolisme et le catabolisme des protéines, des lipides et des glucides ; la transformation de certaines hormones et vitamines ; la détoxification de composés exogènes et endogènes. Il remplit également une fonction exocrine par la production de bile, nécessaire pour la digestion des lipides au niveau intestinal et l'excrétion de molécules biotransformées dans les selles, notamment la bilirubine issue du catabolisme de l'hémoglobine. On lui associe aussi une fonction endocrine par la production de

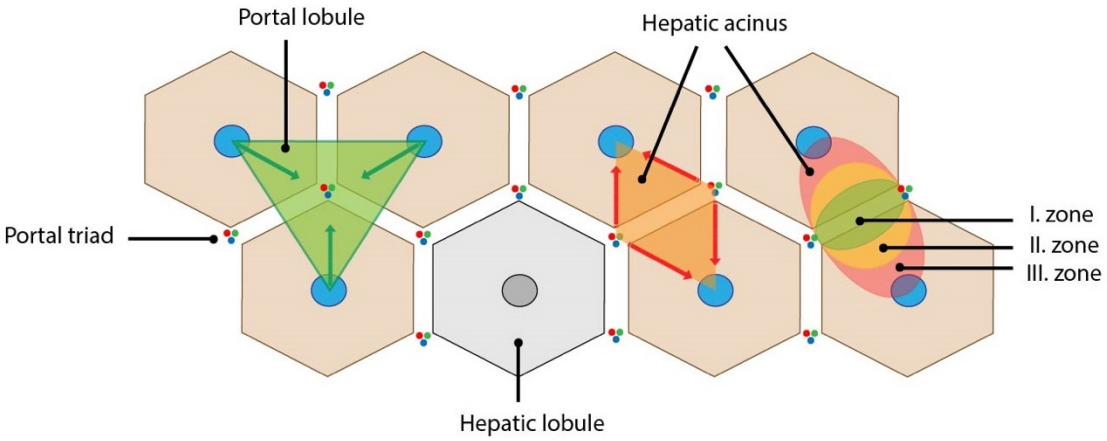

Figure 16 : Organisation fonctionnelle du foie au niveau histologique

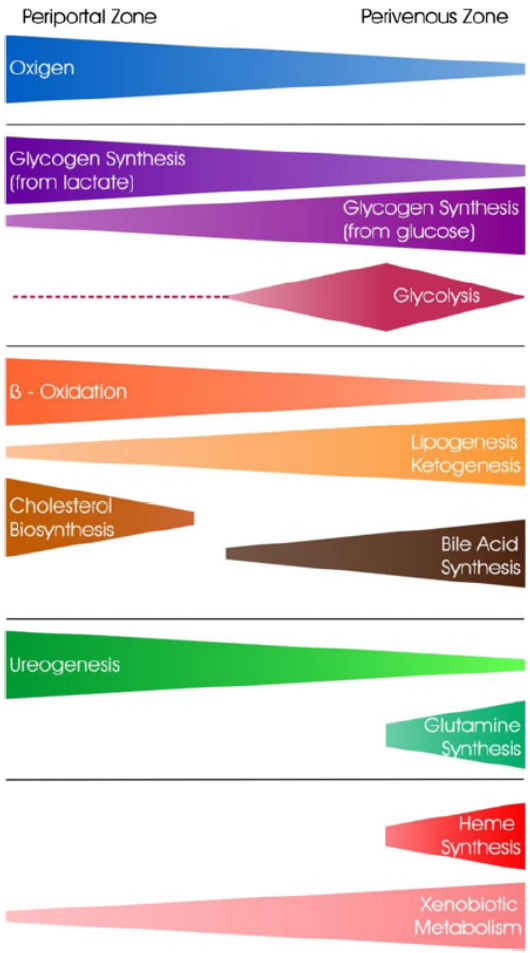

Figure 17 : Zonation métabolique du lobule hépatique
(Source: Arch Toxicol. 2013 Aug;87(8):1315–530.)

l'IGF-1, de l'angiotensinogène, de l'hepcidine, ou encore de l'EPO et de la TPO en association avec le rein. Il est à l'origine de la synthèse de la plupart des protéines plasmatiques, notamment de l'albumine, de l'alpha-foetoprotéine, des facteurs de la coagulation (thrombine, fibrinogène…), d'anti-protéases (alpha-2-macroglobuline, alpha-1-antitrypsine…) et des apolipoprotéines. Enfin, le foie est impliqué dans une grande variété de processus immunitaires par le biais de ses cellules résidentes (cellules de Kupffer, macrophages…). La destruction du parenchyme hépatique lors d'une infection par le VHB, qu'elle soit brutale lors d'une hépatite fulminante ou progressive du fait de l'évolution fibrosante d'une hépatite chronique, entraînera la perte partielle ou totale de ces fonctions vitales, on parle alors d'insuffisance hépatocellulaire.

b) Cellule cible du VHB : l'hépatocyte primaire humain

D'un point de vue cellulaire, le foie est composé à 60 % de cellules parenchymateuses épithéliales (i.e. les hépatocytes), et pour 40 % de cellules non parenchymateuses spécialisées, formant un microenvironnement dans lequel est inclus l'hépatocyte primaire humain (PHH) (**Figure 18**).

Au sein du lobule hépatique, les parois des sinusoïdes veineux sont formées par les cellules endothéliales sinusoïdales dont la structure est fenêtrée par des pores de 0,1 µm traversant la cellule de part en part. Cet endothélium fenêtré constitue une barrière à la fois hautement perméable et protectrice, à l'interface des échanges entre la lumière du vaisseau contenant le sang et l'hépatocyte. Les cellules endothéliales peuvent également fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigène, et à ce titre intervenir dans des mécanismes de tolérance immune (46). L'espace de Disse, où ont lieu ces échanges, est délimité par la cellule endothéliale d'une part et les microvillosités hépatocytaires d'autre part. La perméabilité est également dépendante de l'absence de membrane basale sous la cellule endothéliale, la cohérence de la structure étant assurée par une fine couche de fibronectine. Les cellules de Kupffer appartiennent au système phagocytaire mononucléé et résident dans le foie à l'intérieur de la lumière des sinusoïdes veineux. Elles jouent un rôle de sentinelle du système immunitaire, le foie étant le premier organe filtre du sang drainé depuis le tube digestif, en phagocytant les agents infectieux circulants, en recyclant les hématies âgées, et en captant les composés toxiques (47). Les cellules stellaires hépatiques sont situées dans l'espace de Disse où elles jouent un rôle essentiel dans la synthèse et la dégradation des composants matriciels, ainsi que dans le métabolisme de la vitamine A (48). A l'état physiologique, les cellules endothéliales sinusoïdales exercent une fonction inhibitrice sur les cellules stellaires, régulant ainsi la production de matrice extracellulaire. Les cholangiocytes forment un épithélium cuboïde

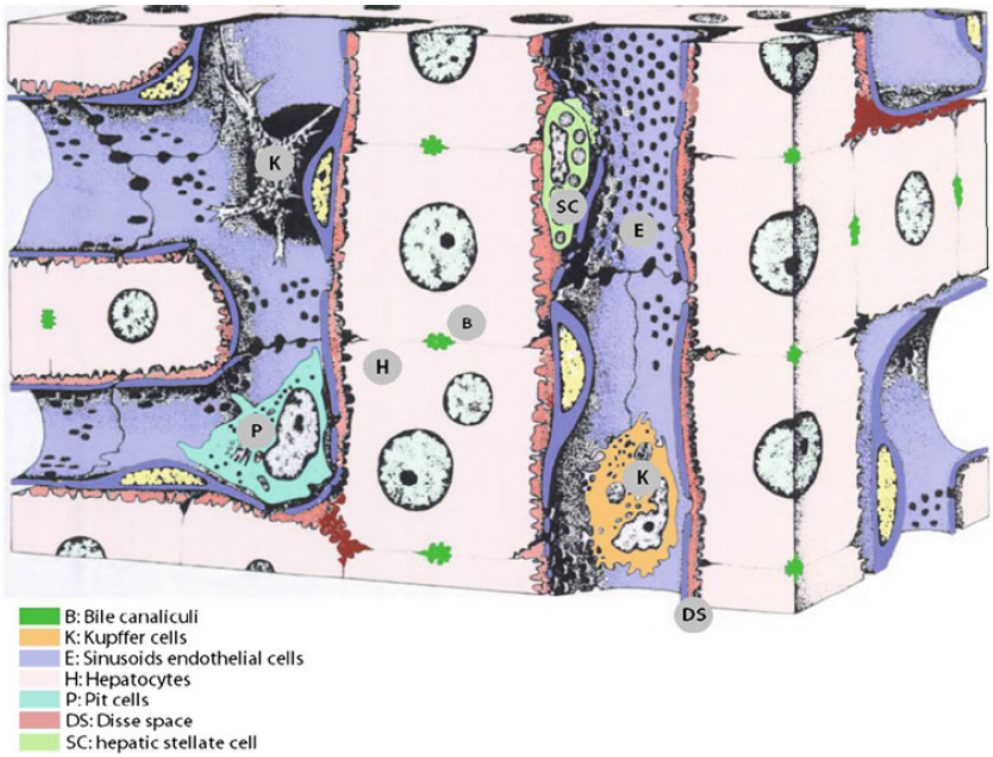

Figure 18 : Microenvironnement hépatocytaire
Pit cells = cellules NK spécifiques du foie
(Source: Arch Toxicol. 2013 Aug;87(8):1315–530.)

constituant la paroi des conduits biliaires en continuité avec les canalicules biliaires hépatocytaires. Enfin, les capacités remarquables de régénération du foie sont notamment assurées par des cellules souches résidentes, probablement situées au niveau des canaux de Hering, entre les cholangiocytes matures et les hépatocytes (49).

L'hépatocyte primaire humain est une cellule épithéliale mesurant de 20 à 30 µm, dont la durée de vie moyenne en conditions physiologiques est de 5 mois. Cette cellule est polarisée mais pas selon la polarité apicale/basolatérale classique. L'équivalent du domaine apical est représenté ici par la membrane plasmique canaliculaire qui forme une structure tubulaire en réseau correspondant aux canalicules biliaires. La composition originale de cette membrane, riche en cholestérol et en sphingomyéline, la rend particulièrement résistante à la solubilisation par les acides biliaires sécrétés par l'hépatocyte (50). Les membranes plasmiques latérales des hépatocytes sont en contact via des desmosomes, et des jonctions communicantes permettant les échanges intercellulaires. Enfin, ils présentent une membrane plasmique basale hérissée de microvillosités sur leurs deux faces externes via lesquelles ils échangent avec le plasma baignant l'espace de Disse. Leur noyau est central, avec une forte proportion de cellules polyploïdes. Ils sont très riches en organites intracellulaires, notamment en RE lisse, et contiennent d'abondants grains de glycogène et gouttelettes lipidiques, témoins d'une grande activité métabolique (**Figure 19**). A la polarisation structurale est couplée une polarisation fonctionnelle illustrée par la répartition des transporteurs membranaires, qui permettent de puiser les composés chimiques nécessaires à la formation de la bile au niveau basolatéral et de sécréter les composants biliaires au niveau canaliculaire (**Figure 20**). A titre d'exemple, le NTCP, identifié comme le récepteur d'entrée du VHB, est situé sur le versant basolatéral de la membrane de l'hépatocyte. C'est un co-transporteur qui permet de réabsorber les sels biliaires présents au niveau du sang, en association avec deux ions sodium.

c) Hépatite virale B : inflammation et fibrose

Afin de comprendre la physiopathologie de l'infection par le VHB, il est nécessaire de s'intéresser aux mécanismes immunologiques à l'œuvre au niveau du foie (**Figure 21**). Le virus de l'hépatite B a pour particularité d'être un virus non directement cytopathique pour les hépatocytes infectés (51) (l'accumulation intracellulaire anormale de certains composants viraux peut cependant avoir un effet cytotoxique indirect à plus long terme). La cytolyse observée lors d'une hépatite virale B aiguë ou chronique est donc essentiellement la conséquence de la réponse immune de l'hôte. D'autre part, le VHB est considéré comme un

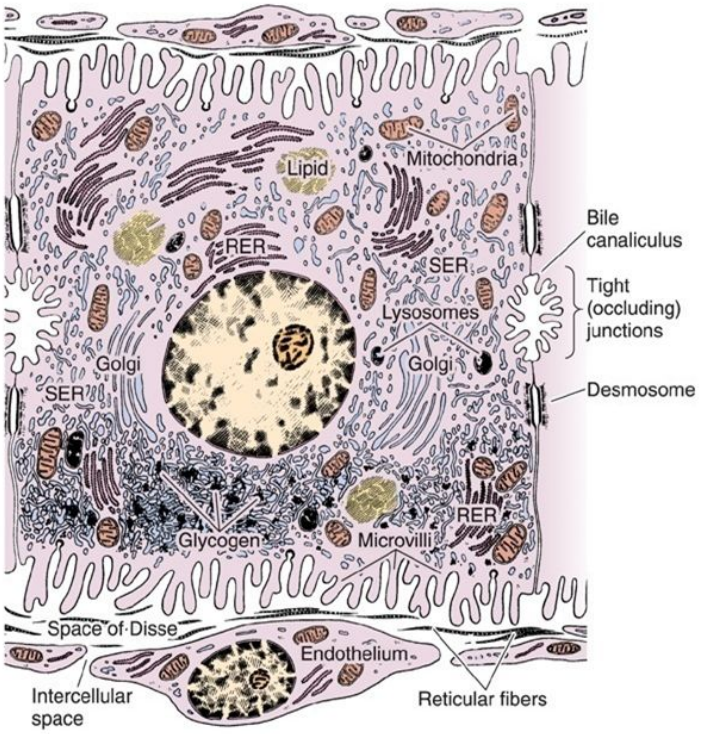

Figure 19 : Organisation ultrastructurale de l'hépatocyte primaire humain
(Source: Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas 15th edition)

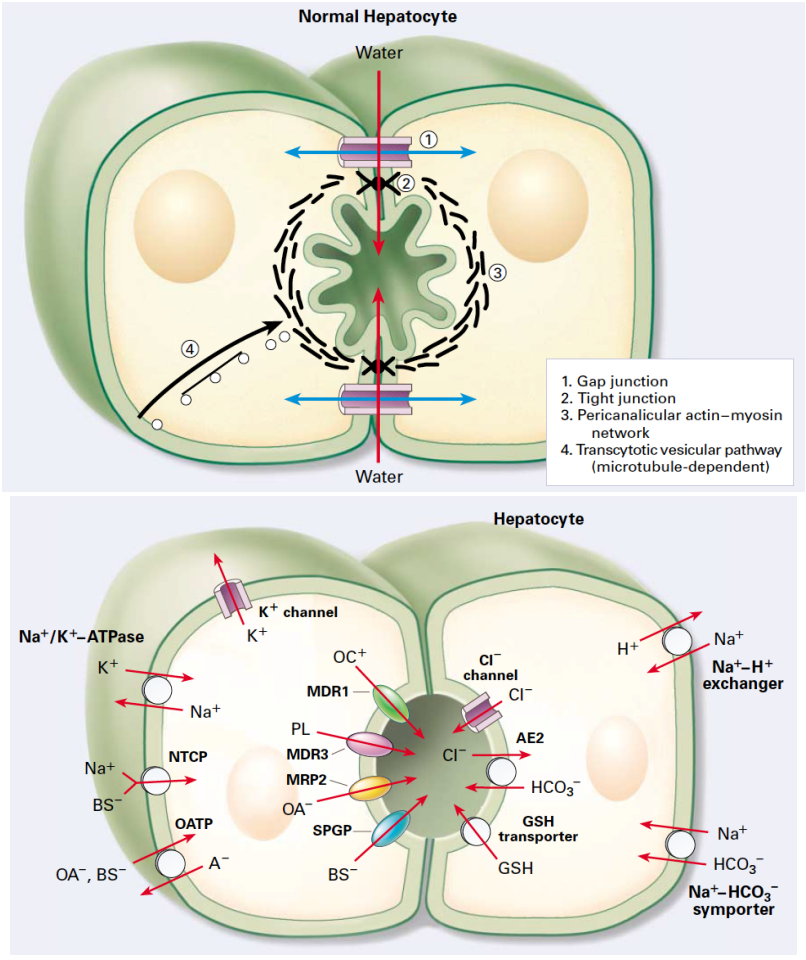

Figure 20 : Polarité structurale et fonctionnelle de l'hépatocyte primaire humain
(Source : Trauner *et al.* N Engl J Med. 1998 Oct 22;339(17):1217–27.)

virus « furtif » vis-à-vis de la réponse immunitaire innée initiale. *A contrario* le VHC, autre virus hépatotrope majeur, déclenche précocement une importante réponse innée (52). A la phase précoce de l'infection, le VHB fait usage de mécanismes de blocage des cellules impliquées dans la réponse innée, grâce à son protéome. L'excès de production d'antigène HBs des particules sous-virales inhibe significativement la réponse des lymphocytes NK et des macrophages, en stimulant la production de l'IL-10 à l'action immunosuppressive (53). Quant à l'antigène HBe il influe particulièrement sur les monocytes et les cellules de Kupffer, en régulant négativement l'expression du TLR-2, des ISG, et des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6, IL-8…) favorisant la persistance virale (54). En outre, cette furtivité du VHB se reflète dans ses modalités de réplication : sa matrice de transcription (ADNccc) est placée à l'abri dans le noyau, ses ARN messagers viraux sont coiffés et polyadénylés pour se rapprocher de la structure des transcrits cellulaires, et les génomes viraux néo-synthétisés dans le cytoplasme sont rapidement dissimulés dans les capsides en formation (55)

Il est aujourd'hui établi que la persistance d'une réplication virale, qui mène à la chronicité de l'hépatite B, est en grande partie liée à l'incapacité du système immunitaire à monter une réponse adaptative efficace et coordonnée de type CD4 et CD8 (56). Cette réponse est forte et multi-spécifique chez les patients présentant une hépatite aiguë de résolution spontanée, et faible chez les patients qui évoluent vers la chronicité. Elle dépend notamment d'un amorçage précoce de la réponse CD4, amorçage d'autant moins efficace que l'inoculum de départ est faible (57). Le principal acteur de la destruction des hépatocytes infectés par le virus est le lymphocyte T cytotoxique CD8+ spécifique du VHB. Il exerce une action cytolytique sur les hépatocytes via deux mécanismes : un effet pro-apoptotique déclenché par le système FAS-FAS ligand et une lyse des cellules par la sécrétion de granzyme/perforine (58). Il exerce en parallèle une action non cytolytique par la sécrétion d'IFNγ, qui va inhiber l'expression des gènes du VHB et la réplication virale, notamment en potentialisant la dégradation de l'ARN prégénomique (59,60). Concernant l'immunité humorale, la production d'anticorps neutralisants dirigés contre l'antigène HBs joue un rôle de blocage de l'entrée du virus en extracellulaire dans les hépatocytes sains (61). Ils peuvent également être endocytés dans les cellules déjà infectées et réduire la sécrétion d'antigène HBs par une interaction au niveau intracellulaire (62). L'apparition relativement tardive de ces anticorps au cours de l'infection indique un rôle secondaire par rapport à l'immunité adaptative cellulaire pour ce qui est de la clairance précoce du virus. Ils peuvent cependant participer à la lyse des cellules infectées par un mécanisme de type ADCC.

La destruction des hépatocytes infectés est salvatrice pour la clairance du virus si elle demeure limitée dans le temps, délétère si elle persiste sur le long terme, aboutissant à des

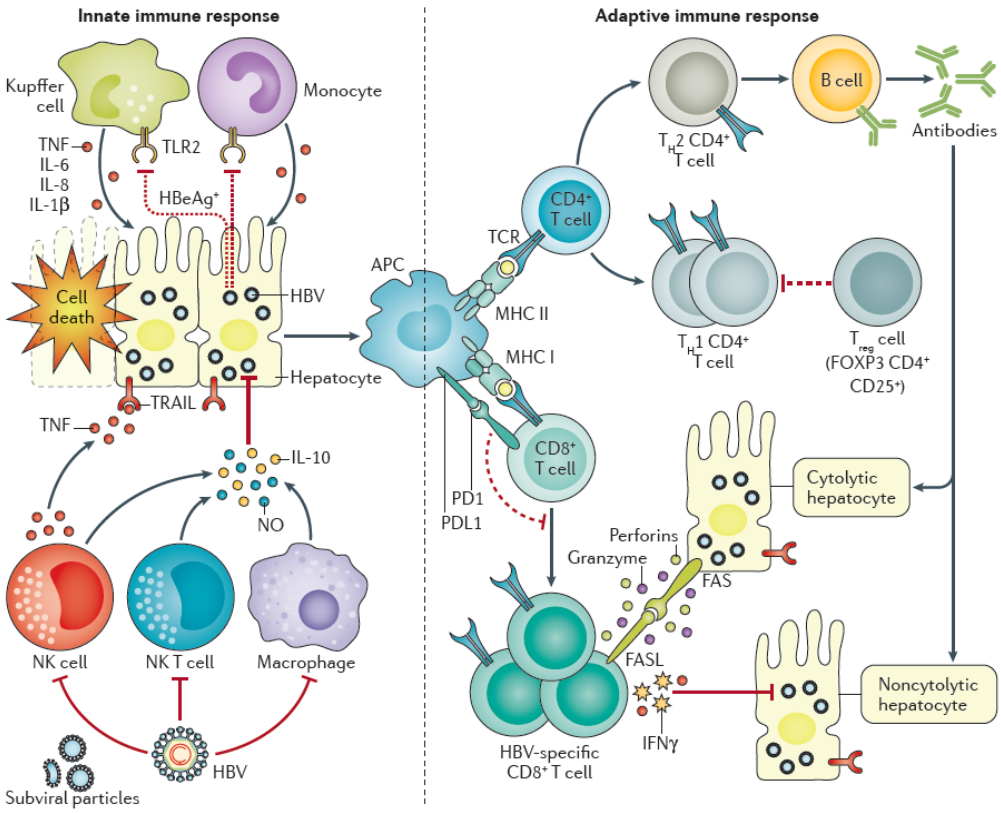

Figure 21 : Mécanismes immunologiques de l'hépatite virale B
Les flèches rouges représentent un effet inhibiteur.
TRAIL: Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand, NO: Nitric Oxide, APC: Antigen-Presenting Cell, PDL1: Programmed Death-Ligand 1, MHC: Major Histocompatibility Complex, TCR: T-Cell Receptor, FOXP3: Forkhead box P3
(Source : Yuen *et al.* Nature Reviews Disease Primers. 2018 Jun 7;4:18035.)

phénomènes de nécroinflammation. La lyse cellulaire prolongée libère en continu des corps apoptotiques et des DAMPs (motifs moléculaires associés aux dégâts). Ces résidus cellulaires induisent la production, par les macrophages activés, de radicaux libres et de médiateurs de l'inflammation (63). Le stress oxydant joue notamment un rôle sur les cellules endothéliales sinusoïdales qui vont se « capillariser » (perte de la structure fenêtrée et apparition d'une membrane basale moins perméable) et perdre leur fonction inhibitrice vis-à-vis des cellules stellaires (**Figure 22**) (64). Les corps apoptotiques vont également jouer un rôle activateur de ces cellules (65). De plus, les cytokines pro-inflammatoires vont induire des signaux de survie dans les cellules stellaires. Les cellules stellaires activées vont alors produire des composants matriciels fibreux en quantité excessive, aboutissant peu à peu au remplacement du parenchyme hépatique lysé au profit d'une structure fibreuse acellulaire non fonctionnelle. Au stade ultime de ce processus, le tissu fibreux entoure des nodules hépatocytaires de régénération, on parle alors de cirrhose.

d) CHC et transformation cellulaire

L'apparition d'un carcinome hépatocellulaire lors d'une infection chronique par le VHB est un processus multifactoriel faisant intervenir des facteurs viraux et des facteurs d'hôtes, aboutissant *in fine* à une prolifération incontrôlée d'hépatocytes transformés. On distingue schématiquement trois groupes de mécanismes : les lésions cellulaires consécutives à l'agression par le système immunitaire, l'intégration de l'ADN du VHB dans le génome des hépatocytes, et l'action directe des protéines virales sur la cellule. Bien que ces mécanismes aient été identifiés on ne connaît pas avec précision l'importance de leurs contributions respectives dans la physiopathologie du CHC.

La destruction prolongée des hépatocytes infectés par le système immunitaire induit une régénération permanente du parenchyme grâce aux capacités de prolifération des cellules souches hépatiques, dans un environnement inflammatoire riche en radicaux libres. Ces molécules vont entraîner des dommages sur l'ADN génomique, source de mutations et d'anomalies chromosomiques. Le risque de survenue de telles anomalies est augmenté par les erreurs de réplication du génome cellulaire induit par la prolifération ininterrompue des hépatocytes, *a fortiori* si les mécanismes de réparation de l'ADN et de détoxification sont aussi impactés. La survenue de ces anomalies au sein de gènes suppresseurs de tumeurs ou de promoteurs d'oncogènes mène à une dérégulation croissante du cycle cellulaire et de la mitose, souvent associée à la perte de fonctions proapoptotiques au profit de fonctions encourageant la survie cellulaire.

Chez les patients développant un CHC au cours d'une infection par le VHB, il est depuis longtemps établi que l'ADN tumoral contient de nombreuses séquences clonales intégrées

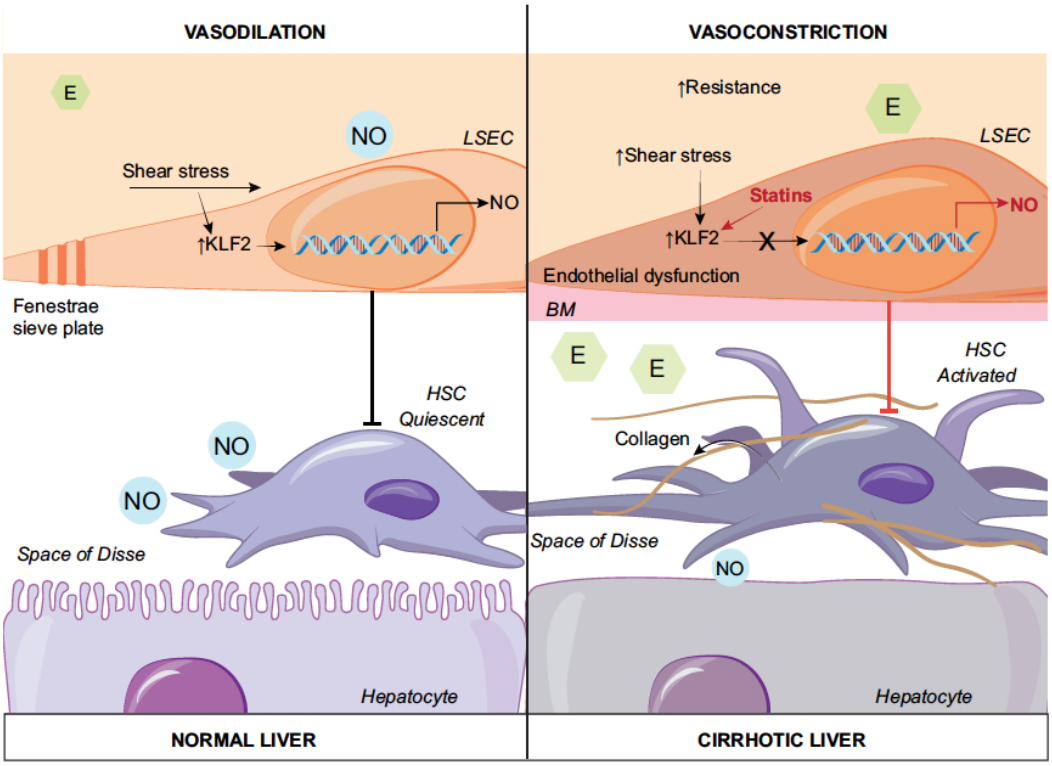

Figure 22 : Rôle du couple cellule endothéliale sinusoïdale - cellule stellaire hépatique dans la fibrogénèse au cours d'une hépatopathie chronique
LSEC: Liver Sinusoidal Endothelial Cell, HSC: Hepatic Stellate Cell, BM: Basal Membrane, NO: Nitric Oxide, E: endothelin, KLF2: Kruppel-Like Factor 2
(Source : Poisson *et al.* J Hepatol. 2017;66(1):212–27.)

d'ADN du VHB, la plupart du temps flanquées de micro-délétions de l'ADN cellulaire. Cette intégration ne semble pas aléatoire, mais affecte préférentiellement certaines régions du génome, notamment les sites chromosomiques rares et fragiles, les îlots CpG (66) et les séquences codant pour la télomérase reverse-transcriptase. Ces phénomènes d'intégration contribuent à augmenter l'instabilité génomique des cellules infectées, la probabilité d'intégration étant augmentée par le turnover important des hépatocytes lors de la régénération du parenchyme.

La protéine X du VHB semble jouer un rôle clef dans le processus de transformation des cellules, avec un rôle transactivateur de gènes associés au contrôle de la croissance cellulaire (Jun-fos, NF-κB) (67). Elle interfère également avec nombre de facteurs de transcription (Egr1, CREB…) de systèmes de réparation de l'ADN (p53, DDB1…), de voies de signalisation (Jak-STAT, PI3k, Ca2+…), de régulateurs du protéasome (PSAM1) et de protéines chaperonnes (Hsp60) (68). En outre, la présence d'une protéine HBx délétée en C-terminal est fortement associée au développement d'un CHC (69), une telle protéine ayant une capacité accrue à interagir avec les oncogènes ras et myc. Les protéines de surface HBs-L et HBs-M semblent également jouer un rôle transactivateur (70). Enfin, l'accumulation excessive de HBs-L en intracellulaire exerce un effet cytotoxique *in vitro* qui s'ajoute probablement à la destruction cellulaire médiée par le système immunitaire (71).

5. Clinique et histoire naturelle

L'histoire naturelle de l'infection par le VHB est caractérisée par sa grande complexité. C'est un processus dynamique influencé par de nombreux facteurs : viraux (génotype, mutations virales, niveau de réplication) ou d'hôte (âge au moment de l'infection, sexe, statut immunitaire, co-infection par un autre virus hépatotrope, éthylisme chronique).

L'infection aiguë par le virus de l'hépatite B peut être asymptomatique ou se manifester par des signes non spécifiques en rapport avec l'atteinte hépatique : fièvre, asthénie, ictère, douleur de l'hypochondre droit, hépatomégalie… L'âge au moment de la primo-infection est déterminant pour le risque de passage à la chronicité. Il est particulièrement élevé, environ 90 %, en cas de transmission périnatale, modéré en cas de transmission horizontale dans la petite enfance (25-30 %) et plus faible en cas de transmission horizontale tardive (5-7 %) (72).

L'infection chronique est classiquement décrite en trois phases, mais recouvre en réalité un large spectre clinique selon le profil du patient (**Figure 23**) (73). Une première phase d'immunotolérance (ou d'infection chronique HBe positive) caractérisée par la présence des antigènes HBs et HBe dans le sang associée à une réplication élevée. Durant cette phase, le patient présente un niveau normal ou peu élevé d'alanine aminotransférase (ALAT) et une

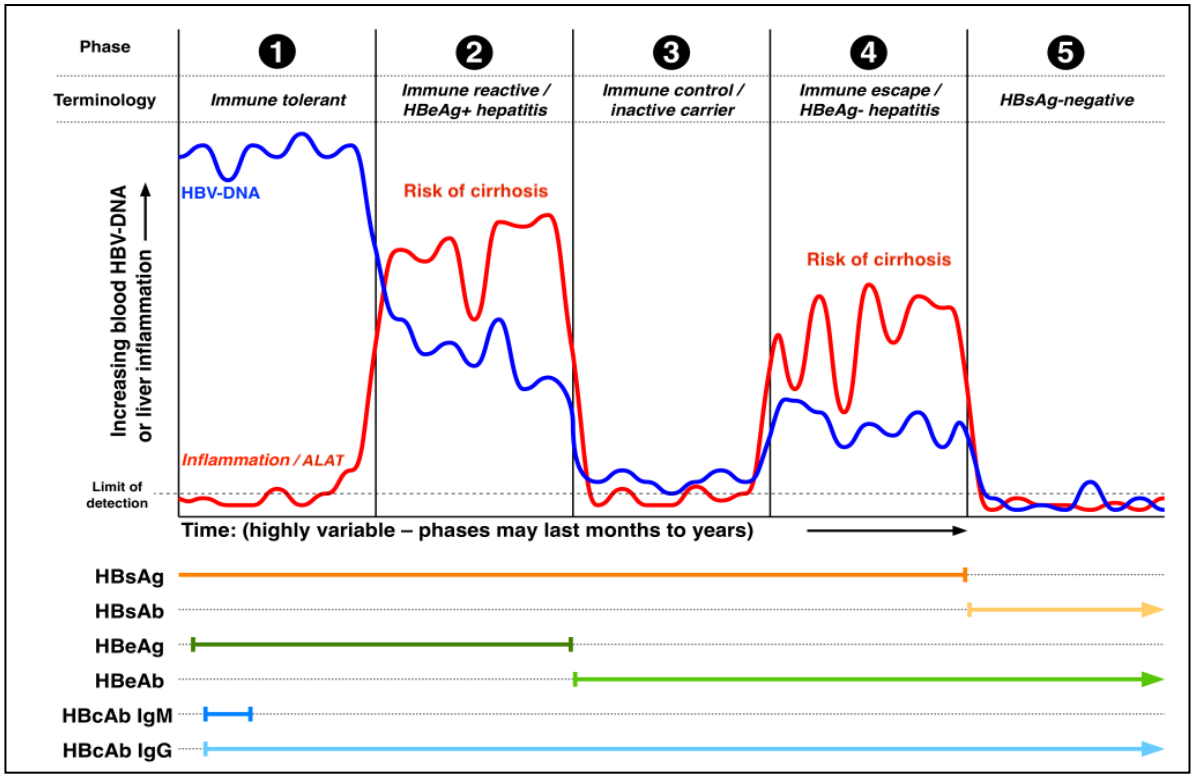

Figure 23 : Cinétique des marqueurs virologiques et biochimiques lors des phases successives de l'infection chronique par le VHB
(Source: d'après European Association for the Study of the Liver 2017 guidelines)

activité histologique hépatique minime, reflet d'une réponse immune très faible contre les hépatocytes. Cette phase est souvent rencontrée chez les patients infectés en périnatal et peut durer plusieurs décennies. La disparition de l'effet tolérogène marque l'entrée dans la seconde phase dite immunoactive (ou hépatite chronique HBe positive), avec une diminution significative de la réplication virale, une augmentation des ALAT et de l'activité histologique dans le foie, témoignant de la lyse des hépatocytes par le système immunitaire. Cette phase est d'une durée variable, de plusieurs mois à plusieurs années. Enfin, la séroconversion HBe (disparition de l'AgHBe au profit d'anticorps anti-HBe) marque l'entrée dans la troisième phase non réplicative de contrôle immunitaire (ou infection chronique HBe négative), avec une charge virale très faible voire indétectable, une normalisation du bilan hépatique et la résolution des phénomènes de nécroinflammation et de fibrose au niveau du foie. Les patients sont alors considérés comme porteurs chroniques inactifs de l'antigène HBs (« HBsAg inactive carriers »), et constituent le plus vaste groupe de patients chroniquement infectés avec environ 300 millions d'individus au niveau mondial (74).

Bien que la majorité des patients présente une rémission biochimique et histologique durable, 20 à 30 % d'entre eux sont susceptibles de subir une ou plusieurs réactivations spontanées de leur hépatite B, parfois asymptomatiques, chaque épisode occasionnant des dommages tissulaires hépatiques grevant le pronostic (**Figure 24**) (75), on parle alors d'hépatite chronique HBe négative. Ce risque de réactivation est présent chez tout patient ayant déjà rencontré le virus, même ceux ayant évolué favorablement et acquis les anticorps immunisant anti-HBs. Il est lié à la persistance de l'ADNccc dans les cellules infectées, et survient le plus souvent lors d'un épisode d'immunodépression. Certains patients peuvent présenter une cirrhose inactive si celle-ci s'est développée préalablement pendant la phase chronique active. De plus, le risque de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) est très faible mais bien réel. Une fraction minime des porteurs chroniques (0,05 à 2 % par an selon l'âge au moment de l'infection) peut spontanément évoluer vers une séroconversion HBs, une forme de bon pronostic avec des patients identifiés comme ayant évolué favorablement, bien que le risque de développer un CHC persiste là encore (76). La surveillance prolongée des porteurs chroniques inactifs est donc essentielle compte tenu de l'évolution imprévisible de ces patients vers des formes de mauvais pronostic.

Hormis les complications liées à l'atteinte hépatique, les patients infectés chroniquement par le VHB sont également à risque de présenter des manifestations extra-hépatiques dont le mécanisme est immunologique et indirect. Les plus fréquemment rencontrées sont la périartérite noueuse, une glomérulonéphrite, une cryoglobulinémie ou une neuropathie périphérique.

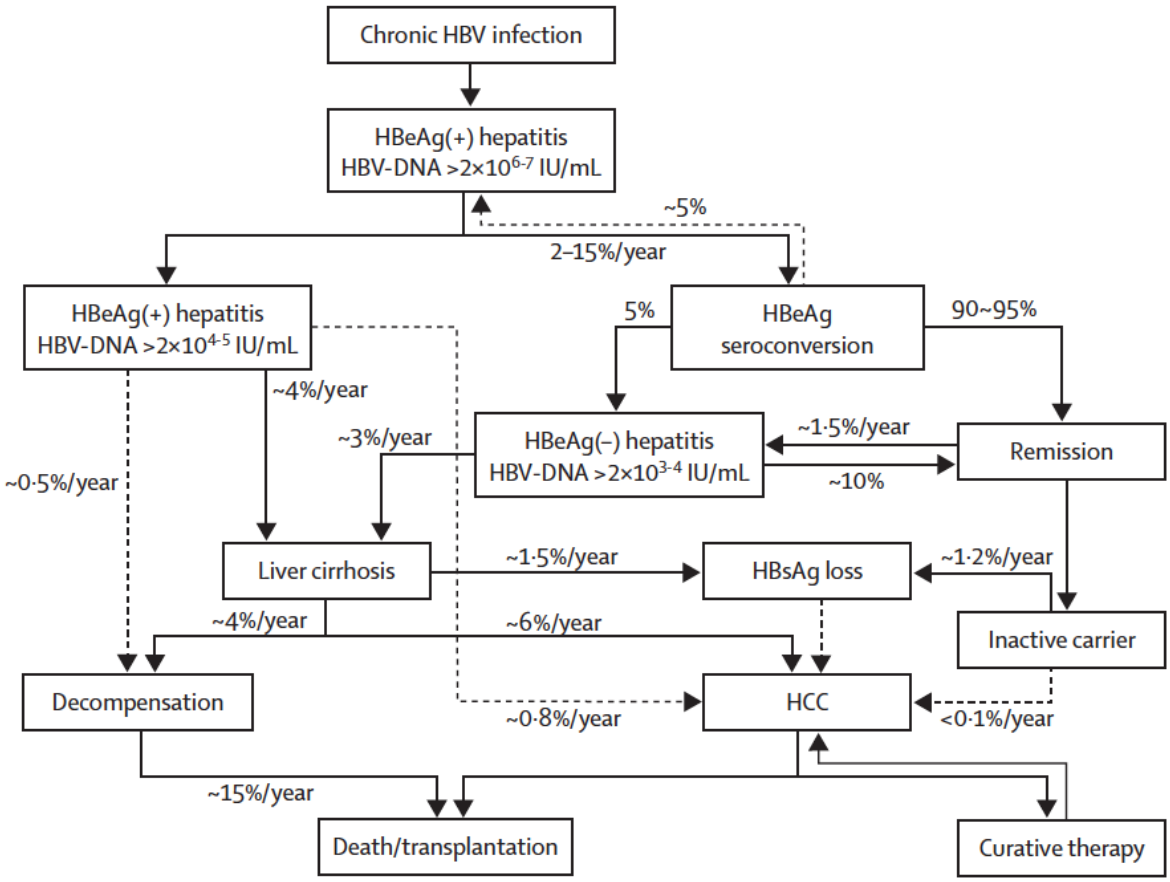

Figure 24 : Profils de réplication et devenir des patients infectés chroniquement par le VHB
(Source : Liaw *et al.* Lancet. 2009 Feb 14;373(9663):582–92.)

L'hépatite B occulte est une entité particulière définie par la présence d'ADN du VHB dans le sérum et/ou dans le foie d'un patient dont l'antigène HBs n'est pas détectable par les tests sérologiques usuels. La physiopathologie à l'œuvre est encore largement méconnue. Elle combine certainement la persistance de l'ADNccc dans les hépatocytes infectés avec des mécanismes de suppression de l'expression des gènes viraux, d'origine cellulaire ou virale dans le cadre d'une co-infection VHC, VHD ou VIH (77) (à titre d'exemple, les protéines du virus de l'hépatite delta sont connues pour exercer un fort effet inhibiteur sur l'expression des gènes du VHB). La grande hétérogénéité des séries publiées dans la littérature concernant l'hépatite B occulte rend difficile une estimation précise de sa prévalence, vraisemblablement hétérogène au regard de la zone géographique et de la population étudiée. La très grande sensibilité des techniques actuellement disponibles (PCR en temps réel) en permet cependant la détection fiable (78). Le dépistage de ces patients est nécessaire du fait de quatre conséquences cliniques : la réactivation virale dans les situations de forte immunosuppression, la transmission virale à l'occasion de dons de sang ou d'organes (principalement de foie), le possible mais non prouvé cofacteur d'aggravation des lésions de fibrose en cas d'hépatopathie chronique associée et, surtout, son rôle promoteur d'un développement futur du CHC, sur foie non cirrhotique comme sur foie cirrhotique.

6. Dépistage, diagnostic et prévention

a) Marqueurs virologiques et biochimiques

Les transaminases (ALAT et ASAT), sont des enzymes physiologiquement contenues dans les hépatocytes. Leur dosage dans le sang, par méthode enzymatique permet d'objectiver une cytolyse hépatique, qu'elle soit d'étiologie virale ou non. L'augmentation sanguine de la phosphatase alcaline et de la γ-glutamyltransférase est le témoin d'une cholestase, liée à un trouble de l'excrétion biliaire par atteinte du parenchyme fonctionnel.

La détection de l'antigène HBs circulant (**Figure 25**) (protéines de surface contenues dans les particules de Dane et sous-virales) par méthode immuno-enzymatique est le marqueur sérologique clef permettant de diagnostiquer une infection par le VHB. L'infection chronique par le VHB est biologiquement définie par la persistance de l'antigène HBs dans le sérum sur deux tests à 6 mois d'intervalle. A l'inverse, dans le cas d'une infection aiguë par le VHB ayant évolué favorablement, l'antigène HBs devient indétectable. La concentration de l'antigène HBs varie en fonction de la phase considérée, elle est en règle générale plus élevée chez les patients positifs pour l'antigène HBe. L'antigène HBs demeure détectable chez les patients dont la charge virale diminue et même si celle-ci devient indétectable. La séroconversion de l'antigène

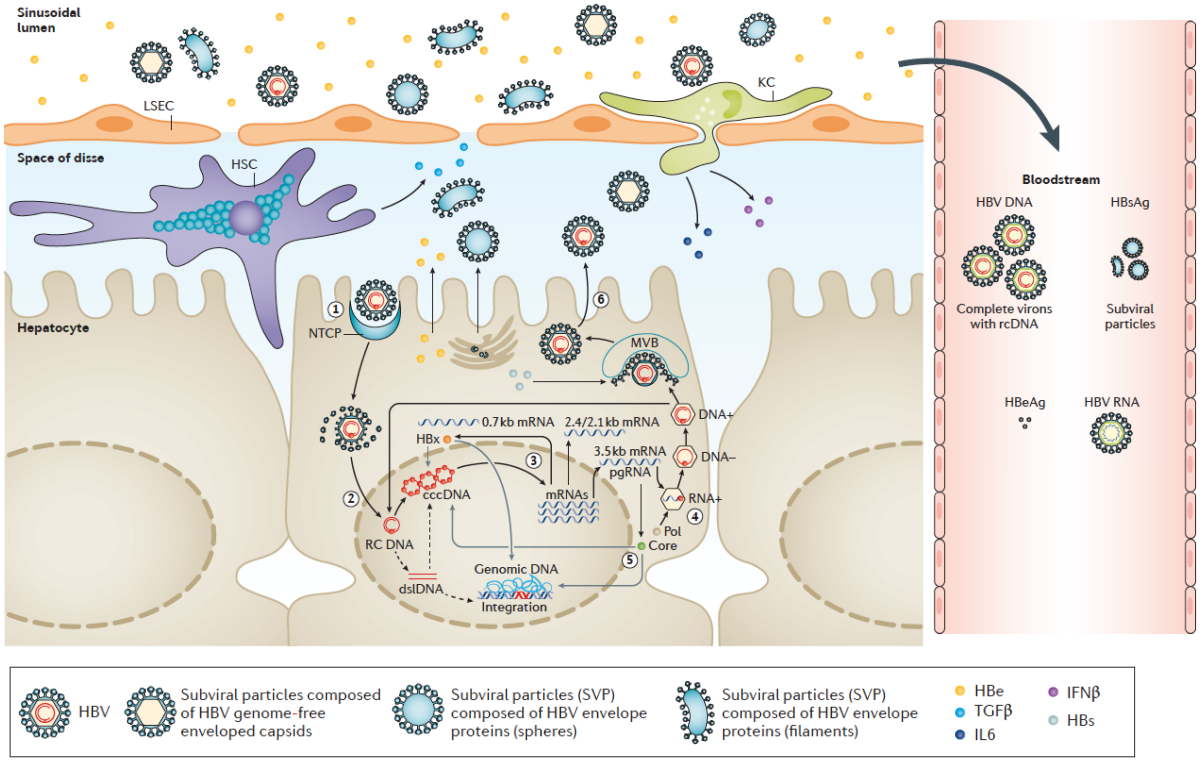

Figure 25 : Marqueurs virologiques : de l'hépatocyte infecté vers le sérum

(Source : d'après Yuen *et al.* Nature Reviews Disease Primers. 2018 Jun 7;4:18035. et Revill *et al.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2016;13(4):239–48.)

HBs peut, dans de rare cas survenir spontanément (0,1 à 2 % par an) auquel cas il devient indétectable au profit de l'apparition d'anticorps anti-HBs (anti-protéines de surface). La détection et la quantification de l'anticorps anti-HBs par méthode immuno-enzymatique sont réalisées afin de confirmer la présence d'une immunité protectrice chez les patients vaccinés. Les anticorps anti-protéine de capside (anti-HBc) apparaissent dès la phase aiguë de l'infection, d'abord de classe IgM puis IgG, ils persisteront sur le long terme quelle que soit l'évolution de l'hépatite B, et ce même en l'absence de réplication. Ils sont donc le témoin d'un contact, récent ou ancien, avec le virus et attestent d'un risque potentiel de réactivation. Au cours d'un hépatite B fulminante, les IgM anti-HBc sont souvent le seul marqueur détectable.

Il est nécessaire de compléter le bilan des patients dépistés positifs pour l'antigène HBs par la mesure de la charge virale, réalisée via la quantification de l'ADN du VHB circulant par technique de PCR. Là où la détection de l'antigène HBs prend en compte la totalité des particules virales et sous-virales circulantes, la détection de l'ADN du VHB prend uniquement en compte les particules infectieuses comportant une copie du génome, elle est donc un meilleur reflet de la réplication virale dans les hépatocytes. L'importance de la charge virale représente un critère de mise sous traitement, dont l'efficacité sera attestée par sa décroissance. L'augmentation de la charge virale sous traitement par analogues nucléosidiques doit mener à rechercher une mutation de résistance dans le gène de la polymérase par méthode de séquençage. La détection de l'antigène HBe et de son anticorps associé par méthode immuno-enzymatique permet de caractériser plus finement une hépatite B chronique, en différenciant les patients en phase de clairance des patients en phase de contrôle immunitaire.

b) Diagnostic histologique

La démarche diagnostique d'une infection chronique par le VHB implique nécessairement d'évaluer la sévérité des lésions hépatiques qui lui sont associées. L'objectif de cette évaluation est d'une part pronostique, et s'intègre d'autre part dans les critères d'initiation d'un traitement antiviral. Elle permet également la recherche de pathologies associées ou la présence de complications (une cirrhose ou un CHC). Le *gold standard* demeure l'analyse anatomopathologique d'une biopsie hépatique obtenue par ponction (PBH). Les classifications actuellement utilisées visent à quantifier les lésions histologiques en établissant un score numérique basé sur le degré d'activité inflammatoire et de fibrose présent dans le foie. Le score le plus utilisé en France, validé dans un premier temps dans le cadre de l'hépatite C puis de l'hépatite B chronique, est le score METAVIR (79), qui permet de quantifier le grade et le stade de l'atteinte hépatique (**Tableau 1**) (**Figure 26**). Le grade est le reflet de l'atteinte nécrotico-inflammatoire de l'infection et par conséquent de son activité (A0 à A3). Le stade détermine

Activité nécro-inflammatoire : A			
Nécrose périportale	Nécrose intra-lobulaire		
	Absente ou minime	Modérée	Sévère
Absente	A0	A1	A2
Minime	A1	A1	A2
Modérée	A2	A2	A3
Sévère	A3	A3	A3
Absence d'activité nécro-inflammatoire			A0
Activité nécro-inflammatoire minime			A1
Activité nécro-inflammatoire modérée			A2
Activité nécro-inflammatoire sévère			A3
Fibrose : F			
Absence de fibrose portale et périportale			F0
Fibrose portale et périportale sans *septa*			F1
Fibrose portale et périportale avec de rares *septa* fibreux			F2
Fibrose portale et périportale avec de nombreux *septa* fibreux			F3
Cirrhose			F4

Tableau 1 : Score METAVIR
(Source : HAS, Évaluation des méthodes non invasives de mesure de la fibrose hépatique dans l'hépatite B chronique - Rapport d'évaluation Juin 2014)

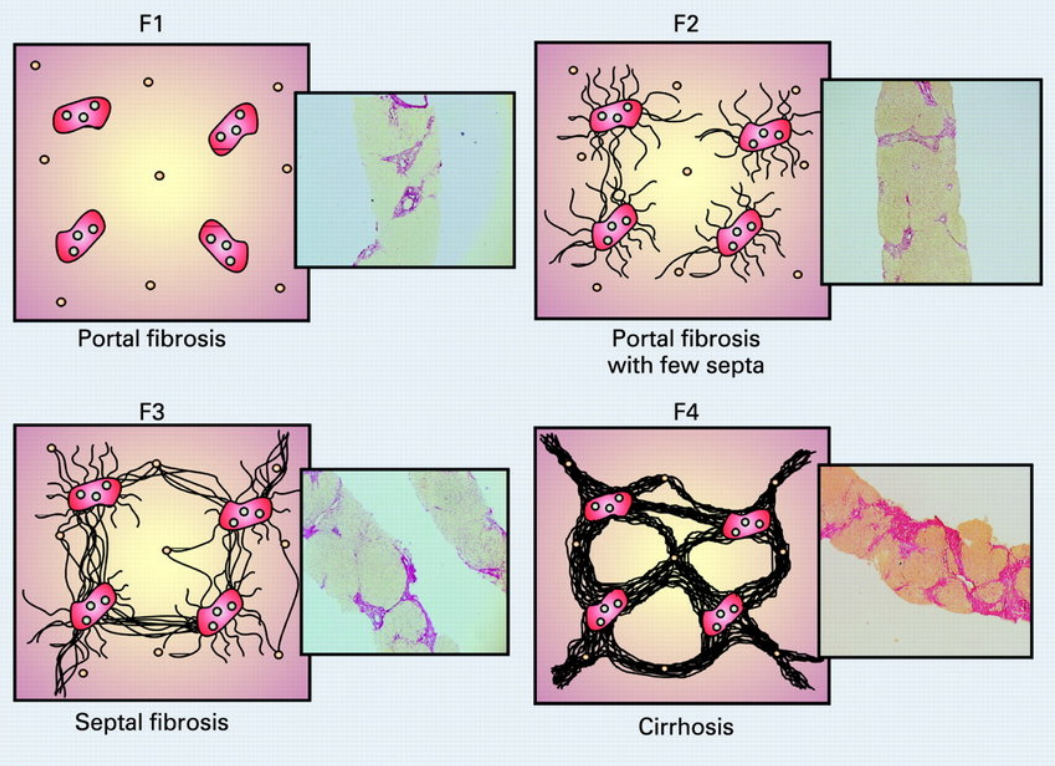

Figure 26 : Stades histologiques selon le score METAVIR
(Source : Asselah *et al.* Gut. 2009 Jun 1;58(6):846–58.)

l'importance et l'extension de la fibrose et est difficilement réversible (F0 à F4). Les limites de la PBH sont : la nécessité de réaliser un bilan prébiopsie, ses contre-indications (troubles hémorragiques, patient non compliant, ascite abondante…), ses complications (hématome intra-hépatique, hémorragie intra-péritonéale, infections…), son coût, et les contraintes pratiques qu'il engendre (nécessité d'une courte hospitalisation, acceptabilité de la part du patient…). De ce fait, on observe un recours croissant à des méthodes non invasives d'évaluation de la fibrose, dans la mesure où celles-ci ont été validées dans le cadre d'une hépatite B chronique. Les plus usitées sont de deux types : les méthodes d'élastographie impulsionnelles ultrasonores (ex : Fibroscan®) et les score biocliniques composites comprenant le dosage de marqueurs spécifiques (ex : Fibromètre®). Ces deux méthodes sont dans la plupart des cas bien corrélées au score METAVIR, il existe cependant des discordances, le résultat anatomopathologique primant sur ceux des tests non invasifs. Le Fibroscan® s'appuie sur l'augmentation du paramètre d'élasticité du tissu hépatique (autrement dit sa rigidité, exprimée en unité de pression, le kilopascal) en cas de fibrose, qu'il mesure par le biais des ultrasons. Dans le cadre d'une fibrose consécutive à une hépatite B chronique, le seuil pathologique est fixé à 7 kPa, avec une valeur le plus souvent supérieure à 11 kPa en cas de cirrhose. Cette technique comporte certaines limites : aspect opérateur-dépendant ; mesure biaisée par la congestion hépatique des patients insuffisants cardiaques, une cholestase importante ou un stéatose évoluée ; diminution du signal chez les patients obèses ou présentant une ascite volumineuse (80).

Le Fibromètre® est un score composé d'éléments appartenant à trois catégories : les caractéristiques cliniques du patient (sexe et âge), les marqueurs indirects et les marqueurs directs de fibrose. Les marqueurs indirects reflètent les altérations de la fonction hépatique (TP, alpha-2-macroglobuline, plaquettes, ALAT, ASAT, urée, γ-glutamyltransférase, bilirubine) les marqueurs directs sont le reflet sérique de la formation et de la dégradation de la matrice extracellulaire (acide hyaluronique) (81). Le résultat est délivré sous la forme d'un score dont la valeur est comprise entre 0 et 1, à titre d'exemple, un score inférieur à 0,2 est corrélé à un METAVIR F0-F1, un score supérieur à 0,8 à un METAVIR F3-F4. En cas de score élevé au Fibromètre®, un second score adapté au foie cirrhotique est réalisé (Cirrhomètre®). Ces scores biocliniques sont susceptibles d'être modifiés par un certain nombre d'états physiologiques ou pathologiques : grossesse, syndrome inflammatoire, hépatite aiguë ou insuffisance rénale.

c) Biomarqueurs pronostiques et prédictifs

Afin d'améliorer la prise en charge des patients chroniquement infectés, certains biomarqueurs présentant une valeur pronostique ont été identifiés ces dernières années.

Un certain nombre de publications réalisées à partir de cohortes de patients asiatiques a montré une corrélation entre la survenue d'un CHC et le niveau élevé de la charge virale hépatite B (82). A l'inverse, il a été montré qu'un faible niveau de réplication du virus était prédictif de la survenue d'une séroconversion HBe (83). De même, une concentration sérique faible en antigène HBs est un facteur prédictif de la survenue d'une séroconversion HBs chez les porteurs chroniques HBe négatifs (84). La concentration sérique en antigène HBs peut également être utilisée comme un facteur prédictif de survenue d'un CHC, indépendamment de la charge virale (85). La mesure de la charge virale hépatite B et la quantification sérique de l'antigène HBs apparaissent donc comme deux marqueurs complémentaires afin de prédire l'évolution de l'hépatopathie. De nombreuses études suggèrent également une influence du génotype du VHB sur le pronostic à long terme de l'infection chronique comme nous l'avons déjà décrit précédemment, avec des génotypes C et D de moins bon pronostic

Certaines mutations dans le génome viral (BCP A1762T/G1764A)(86) ou de l'hôte (SNP rs12979860 dans la région intronique de l'interféron λ-4, S267F dans le gène du récepteur NTCP) (87) ont aussi été identifiées comme associées à une plus grande survenue de formes de mauvais pronostic.

Très récemment, une étude a montré que la quantification de la protéine L par Western-blot dans le sérum des sujets chroniquement infectés par le VHB pourrait constituer un biomarqueur d'une évolution active de l'infection chronique B (88). Cependant, ce test ne permet pas de faire la différence entre la protéine L des virus et celle des filaments sous-viraux.

7. Prophylaxie

La prévention de l'infection par le VHB repose actuellement sur plusieurs éléments : l'immunisation active des populations, la mise en place de mesures d'hygiène en milieu hospitalier, le dépistage des produits dérivés du sang et la prise en charge de la transmission mère-enfant.

L'immunisation active est obtenue par la vaccination. Le vaccin contre l'hépatite B est un vaccin sous-unité contenant de l'antigène HBs sous forme de particules sous-virales non infectieuses. Il est aujourd'hui recombinant, obtenu par insertion du gène du VHB codant la protéine d'enveloppe virale dans des cellules de levures. Il existe sous forme monovalente (ex :

Engerix B®), sous forme bivalente (VHA-VHB, Twinrix®) et sous forme hexavalente (Diphtérie-Tétanos-Coqueluche-Poliomyélite-Haemophilus-VHB, Infanrix hexa®). Le schéma complet de primovaccination chez l'enfant ou chez l'adulte comprend trois injections à 0, 1 et 6 mois. La vaccination des nourrissons par le vaccin hexavalent comprend, d'après le calendrier vaccinal, une injection à 2, 4 et 11 mois de vie. Dans la majorité des cas le sujet est répondeur et acquiert une immunité mémoire qui persistera à vie. Il n'est donc pas recommandé de réaliser une injection de rappel si le schéma a été correctement suivi. Chez certains patients, notamment les patients immunodéprimés, la réponse vaccinale peut être fortement diminuée. Il est alors possible d'évaluer l'immunité par le titrage immuno-enzymatique de l'anticorps anti-HBs, un titre supérieur à 10 UI/mL étant considéré comme protecteur. Des injections de rappel sont possibles afin de maintenir une immunité suffisante chez les patients présentant un titre trop faible. Depuis 1992, les programmes de l'OMS visent la vaccination universelle des enfants, en particulier dans les régions à forte prévalence de l'antigène HBs (**Figure 27**). En France, la vaccination contre le VHB est devenue obligatoire pour tous les enfants nés à partir du 1er janvier 2018. Elle est également obligatoire pour le personnel de santé et de laboratoire, la vérification du statut vaccinal par la médecine du travail est également obligatoire au moment de la prise de fonction. Elle vise d'autres populations à risque, notamment les patients hémodialysés. Fin 2016, 186 pays avaient introduit à l'échelle nationale le vaccin contre l'hépatite B (89). La couverture mondiale des individus recevant 3 doses de vaccin anti-hépatite B est estimée à 84 % et évaluée aux environs de 92 % dans la région du Pacifique occidental (**Figure 28**).

La prévention de la transmission mère-enfant est basée sur l'association d'une immunisation passive par l'injection d'immunoglobulines anti-hépatite B et d'une immunisation active par la sérovaccination contre l'hépatite B dès la naissance. Cette association permet de faire chuter le taux de transmission de manière drastique (90). En 2016, 101 pays ont introduit l'administration d'une dose de vaccin anti-hépatite B aux nouveau-nés dans les 24 heures suivant la naissance ; la couverture mondiale des nouveau-nés est estimée à 39 %. Il est important de noter que le risque de transmission mère-enfant est maximal chez les patientes HBe positives et/ou présentant une charge virale élevée. Les recommandations actuelles préconisent la mise en place d'un traitement par analogue nucléosidique (TDF) pendant le troisième trimestre de grossesse chez les patientes présentant une charge virale supérieure à 200 000 UI/mL, afin de la réduire autant que possible avant la fin de la grossesse (91), et de réaliser une césarienne en cas de charge virale toujours élevée au moment de l'accouchement.

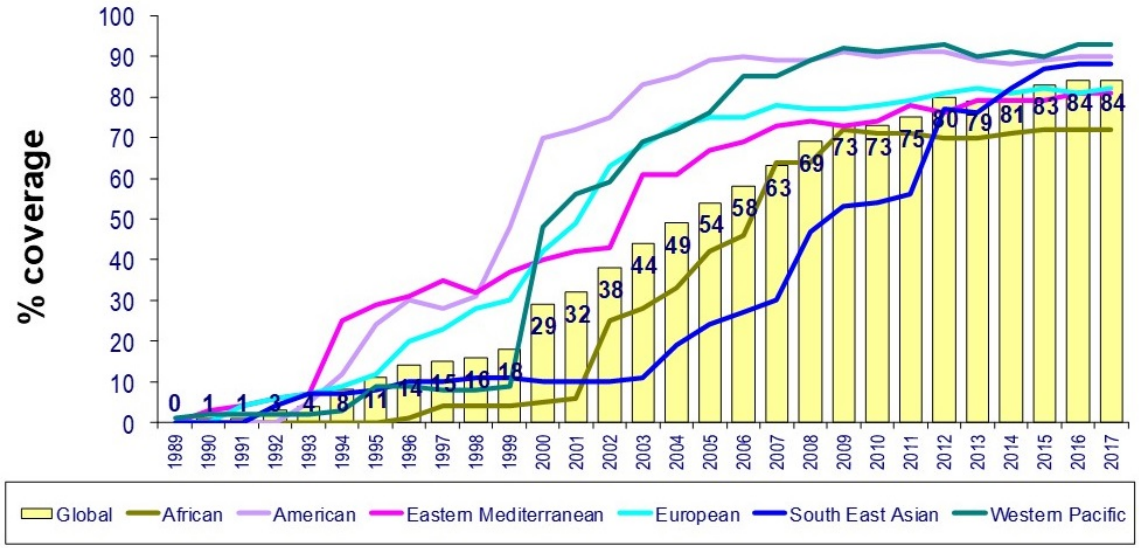

Figure 27 : Évolution de la couverture vaccinale anti-VHB à l'échelle mondiale de 1989 à 2017
L'estimation de la couverture vaccinale se base sur la proportion d'enfants vaccinés avec trois doses de vaccin une année donnée.
(Source: WHO/UNICEF, coverage estimate revision 2017)

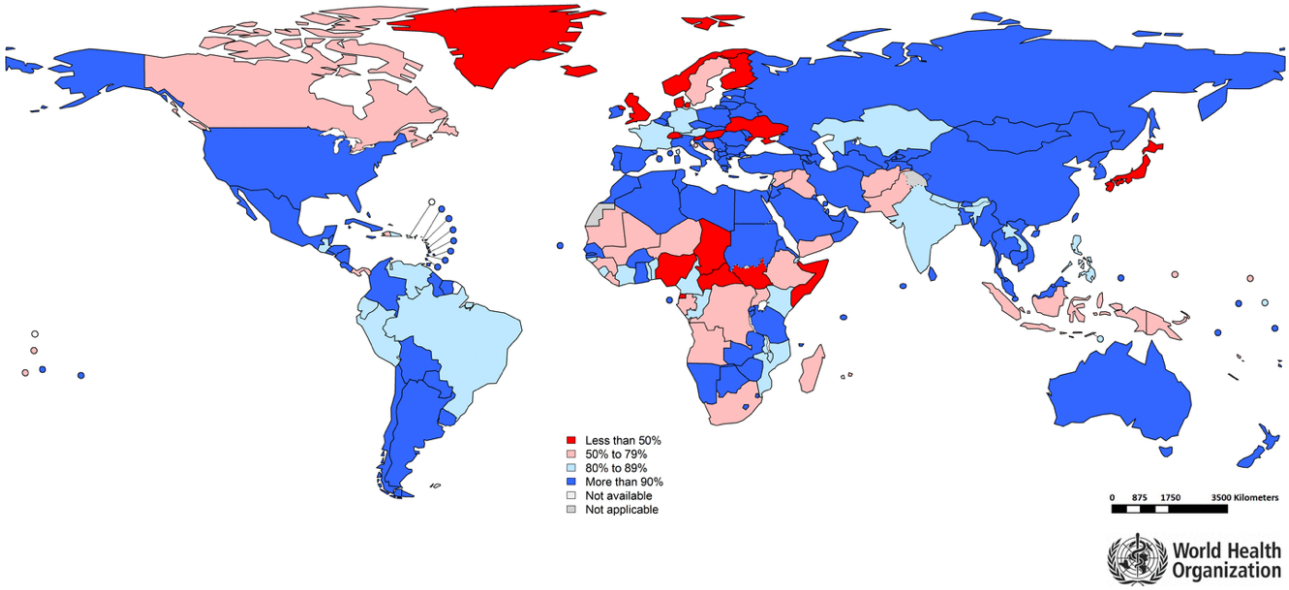

Figure 28 : Répartition de la couverture vaccinale anti-VHB au niveau mondial en 2016
(Source: WHO/UNICEF, coverage estimate revision 2016)

8. Thérapeutique

L'indication à démarrer un traitement médicamenteux dépend principalement de trois facteurs : le niveau de la charge virale, l'augmentation des ALAT et dans une moindre mesure la sévérité de l'atteinte hépatique. Entrent également en ligne de compte : l'âge élevé du patient, les antécédents familiaux de cancer du foie, les comorbidités (obésité ou éthylisme chronique), le risque de transmission du VHB (cf. prophylaxie et grossesse) ainsi que la présence de manifestations extra-hépatiques. Schématiquement, sont concernées par la mise en place d'un traitement les deux phases d'hépatite chronique (HBe positive et HBe négative). Selon la source considérée (EASL, AASLD ou APASL), il est généralement recommandé d'instaurer un traitement chez tout patient ayant une charge virale > 2000 UI/mL (ou > 20 000 UI/mL), et/ou présentant des ALAT supérieure à la normale (92–94). La présence d'une fibrose au minimum modérée peut également être prise en compte dans certains cas, par exemple chez un patient âgé avec un niveau d'ALAT normal ou subnormal. En cas d'infection aiguë par le VHB, le traitement est essentiellement symptomatique, à l'exception de la survenue d'une hépatite fulminante responsable d'une insuffisance hépatocellulaire.

Les objectifs de l'instauration d'un traitement sont multiples, reflétant une fois de plus la complexité de l'histoire naturelle et de la physiopathologie de cette infection (**Figure 29**). La rémission biochimique est définie par la résolution de la cytolyse hépatique, avec un retour à la normale du niveau des ALAT. Un objectif aujourd'hui fréquemment atteint chez les patients traités par NUCs est l'obtention d'une réponse virologique soutenue, associant l'indétectabilité de la charge virale +/- la séroconversion HBe. La séroclairance de l'antigène HBs (ou « cure fonctionnelle ») sous traitement est plus rarement atteinte (3-11 % des patients sous NUCs), celle-ci permet de réduire le risque de survenue de complications chez le patient (95). La mise en place précoce du traitement permet une quasi-disparition du risque d'évolution vers la cirrhose. A l'inverse, le risque de développer un CHC diminue sans pour autant disparaître, nécessitant une surveillance à vie des patients concernant ce risque, en particulier chez les patients de plus de 50 ans. Les traitements disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas d'obtenir la disparition de l'ADNccc présent dans les cellules infectées, prérequis indispensable à la guérison définitive de l'infection (concept de « HBV cure »),

Les molécules validées pour le traitement de l'infection par le VHB appartiennent à deux classes : les agents immunomodulateurs (PEG-IFNα-2a) et les agents antiviraux / analogues nucléosidiques (lamivudine, entecavir, TDF et TAF).

Les traitements basés sur l'utilisation d'interféron alpha pegylé sont administrés à un rythme hebdomadaire par voie sous-cutanée, le plus souvent pour une durée d'un an. Son mode d'action complexe en fait une molécule non spécifique à large spectre avec un impact élevé sur

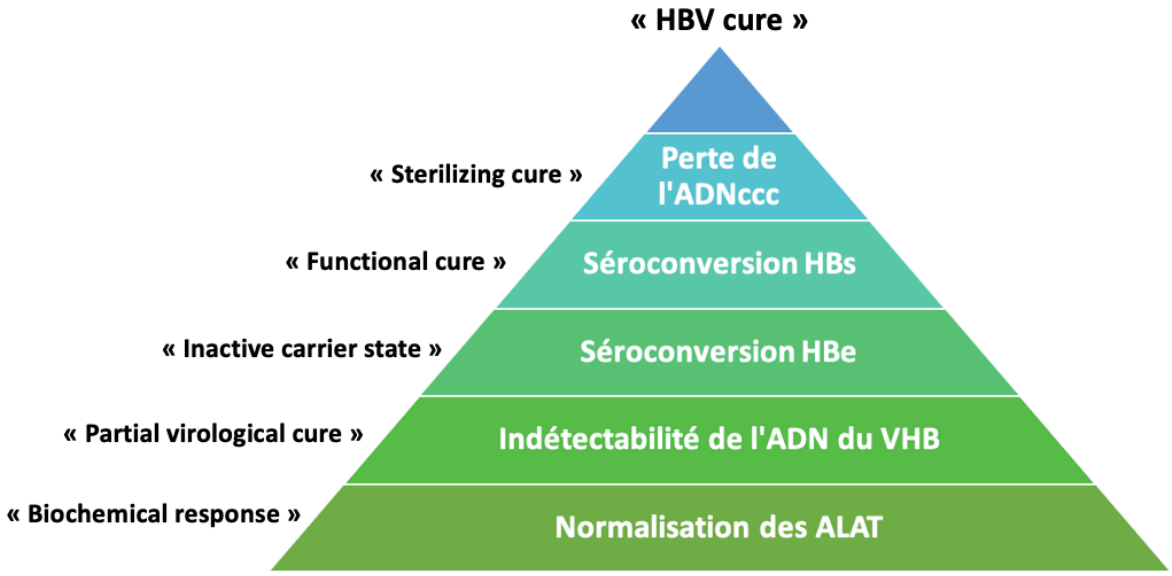

Figure 29 : Objectifs du traitement de l'infection par le virus de l'hépatite B
(Source : d'après Tarik Asselah, Paris hepatology conference, janvier 2018)

le fonctionnement cellulaire. Une fois fixé à la membrane, l'interféron déclenche une séquence complexe de réactions intracellulaires, notamment l'induction de certaines enzymes via les ISG (gènes stimulés par l'interféron). Ce processus est responsable de diverses réponses, telles que l'inhibition de la réplication virale, la suppression de la prolifération cellulaire et des activités immunomodulatrices comme l'augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages, ou l'augmentation de la cytotoxicité spécifique des lymphocytes pour les cellules cibles. Ses indications sont aujourd'hui limitées du fait d'un taux de réponse modeste (environ 30 % des patients traités à 6 mois sont indétectables) et du risque de survenue de nombreux effets indésirables (neutropénie sévère, syndrome pseudo-grippal, malaise, thyrotoxicité, syndrome dépressif…) nécessitant une surveillance clinique et biologique rapprochée (96,97). Le principal avantage de l'interféron est un taux plus élevé de séroconversion HBs sous traitement (environ 11 % des patients à 3-4 ans post-traitement) par rapport à la plupart des analogues nucléosidiques. L'interféron peut par exemple être envisagé comme traitement de première ligne chez un patient jeune sans comorbidité infecté par un génotype A ou B. Il est en revanche contre-indiqué chez les patients présentant une cirrhose décompensée.

Les analogues nucléosidiques ont un mode d'action plus spécifique, par inhibition de la polymérase du VHB. Ils sont de ce fait beaucoup mieux tolérés sur le plan clinique, mais potentiellement impactés par l'émergence de mutations de résistance dans la séquence de cette enzyme, la lamivudine étant particulièrement concerné par ce risque. Le tenofovir disproxil (TDF), tenofovir alafenamide (TAF) et l'entecavir sont les NUCs les plus largement utilisées, respectivement du fait d'un risque de résistance absent pour le tenofovir, ou faible (1,2 % à 7 ans) pour l'entecavir. L'entecavir est indiqué chez les patients naïfs de traitement (98). A contrario, les patients ayant reçu par le passé un traitement par lamivudine sont à risque de développer plus facilement des mutations de résistance à l'entecavir, d'où la nécessité d'utiliser le tenofovir dans ce cas. Le TAF permet d'atteindre une plus forte concentration intra-hépatique de molécule active par rapport au TDF, et donc d'obtenir un même niveau de suppression virale avec une dose plus faible. Ainsi, les patients traités par TAF sont moins sujets aux effets indésirables qu'avec le TDF (déminéralisation osseuse et impact sur la fonction rénale) (99). Bien que les traitements courts par NUCs permettent déjà une forte diminution de la charge virale et une normalisation des ALAT, le bénéfice d'un traitement à long terme (> 5 ans) a été démontré, en particulier concernant le risque d'évolution vers la cirrhose et de développement d'un CHC (100,101).

La combinaison d'un analogue nucléosidique et de PEG-IFNα ne fait pour l'heure pas partie des recommandations. Certaines études ont mis en évidence un taux de séroclairance HBs plus élevé chez les patients ayant reçu un traitement combiné par rapport à une monothérapie

(principalement infectés par un génotype A ou B) (102), quand d'autres études ne mettent pas en évidence de différence significative (103).

Chez les patients présentant un CHC ou une cirrhose décompensée, la transplantation hépatique est une option thérapeutique à considérer. Un risque majeur encouru par les patients transplantés infectés chroniquement par le VHB est celui de la récurrence de l'infection sur le greffon, en particulier en cas de charge virale circulante élevée au moment de la greffe. L'utilisation d'immunoglobulines anti-HBs associée à un NUCs permet de réduire ce risque (104).

Malgré l'existence des NUCs comme traitement de l'infection chronique par le VHB, le faible nombre de patients traités au niveau mondial par rapport au nombre de patients infectés s'explique par le fait qu'une grande partie d'entre eux n'ont pas été diagnostiqués (**Figure 30**). La mise en place de campagnes de dépistage dans les zones à forte prévalence est donc une étape essentielle vers l'éradication de l'infection.

La mise au point de nouveaux traitements de l'infection par le VHB est un domaine en pleine effervescence (105,106). Les analogues nucléosidiques aujourd'hui utilisés ciblent uniquement l'étape de réplication du génome du viral. Le bulevirtide (Myrcludex B), un inhibiteur compétitif du récepteur NTCP, permet de cibler l'étape d'entrée du virus dans la cellule. Une autre famille de molécules à l'étude est celle des inhibiteurs de l'assemblage de la nucléocapside, avec pour cible la protéine core du VHB (HBc), dont la plupart agissent en modifiant sa conformation (modulateurs allostériques). Les agonistes des TLR sont basés sur des mécanismes cellulaires d'immunomodulation, et font principalement appel à la réponse immunitaire innée afin d'augmenter la clairance virale. Enfin, la cible principale des nouvelles molécules mises au point est l'ADNccc présent dans les cellules infectées. Il est possible d'agir sur trois niveaux : l'inhibition de la formation de l'ADNccc, l'inhibition de l'expression des gènes viraux, et la destruction de l'ADNccc. Les inhibiteurs de la formation de l'ADNccc ciblent des mécanismes cellulaires impliqués dans la réparation de l'ADN. Les inhibiteurs de l'expression des gènes viraux font appel à des ARN interférents spécifiques de la séquence à inhiber (siARN). Du fait de l'interaction entre la protéine core et l'ADNccc, les inhibiteurs de la core participent à cibler indirectement ce dernier, au même titre que les inhibiteurs de la protéine HBx. Les options permettant la destruction directe de l'ADNccc sont principalement représentées par les techniques ciblées d'édition du génome, au premier rang desquelles CRISPR-Cas9 (107,108).

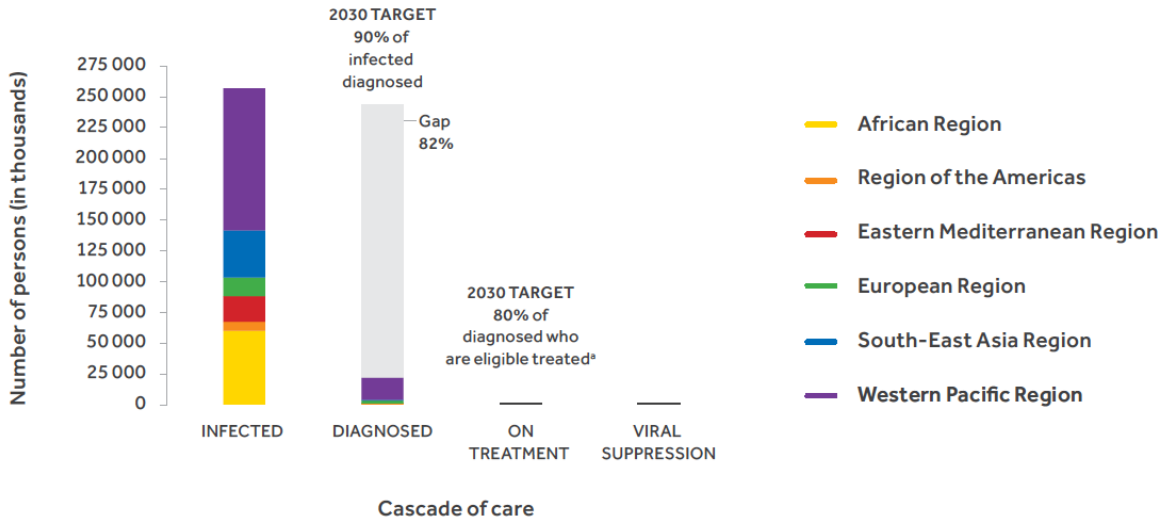

Figure 30 : Cascade mondiale du traitement de l'infection par le virus de l'hépatite B
(Source: WHO, Global hepatitis report 2017)

9. Populations spécifiques

a) Patients immunodéprimés

La réactivation d'une infection par le VHB ayant évolué favorablement est un risque encouru en cas de survenue d'un état d'immunodépression (109). Ce risque concerne : les patients sous chimiothérapie, les patients infectés par le VIH en particulier pendant la phase de reconstitution immune, les patients transplantés d'organe ou de moelle osseuse, les patients sous agent déplétant les lymphocytes B (rituximab), les patients sous inhibiteurs du TNF. Cette réactivation prend la forme d'une reprise brutale ou d'une augmentation majeure de la réplication (i.e. de la charge virale), chez les patients positifs pour l'antigène HBs, voire les patients négatifs pour l'antigène HBs et positif en anti-HBc (contact ancien ayant évolué favorablement). Cliniquement, les dommages hépatiques occasionnés vont de l'hépatite subclinique à l'hépatite sévère, et peuvent rapidement évoluer vers une insuffisance hépatocellulaire fatale. Afin de prévenir ce risque, il est recommandé de mettre en place un traitement antiviral préemptif, ainsi que de contrôler le statut sérologique avant l'immunodépression, voire de monitorer régulièrement la charge virale chez les patients à risque.

b) Patients co-infectés

Le principal agent responsable de co-infection chez les patients chroniquement infectés par le VHB est le virus de l'hépatite delta (VHD) (110). Il s'agit d'un virus à ARN défectif, le support de son génome est un ARN circulaire simple brin de polarité négative de 1,7 kb, qui code seulement deux protéines : le petit (HDAg-S) et le grand (HDAg-L) antigène delta. Ces deux ribonucléoprotéines s'assemblent avec le génome du virus dans le noyau des hépatocytes. Afin de compléter son cycle, le VHD a nécessairement besoin d'une cellule infectée par le VHB, qui lui fournira une enveloppe virale par l'assemblage de ses protéines de surface. On estime, au niveau mondial, que 6 à 8 % des patients chroniquement infectés par le VHB sont co-infectés avec le VHD. L'infection par le VHD peut survenir de manière concomitante, ou à distance de l'infection par le VHB (on parle alors de surinfection). Dans le premier cas la majorité des patients n'évolue pas vers un portage chronique, dans le second cas il existe un risque élevé de développer une hépatite fulminante et d'évoluer vers un portage chronique. La co-infection par le VHD augmente significativement le risque d'évolution vers une hépatite chronique sévère, avec un risque d'évolution vers la cirrhose et le CHC plus important que pour

les patients mono-infectés VHB. Le diagnostic est posé par la réalisation d'une sérologie à la recherche d'anticorps anti-VHD, la réalisation de charges virales delta par technique de RT-qPCR permet la confirmation du diagnostic et le suivi des patients co-infectés. La clairance de l'ARN du VHD est directement dépendante de la clairance de l'antigène HBs. Le traitement repose actuellement sur l'utilisation de PEG-IFNα, aboutissant à l'indétectabilité de la charge virale delta à 6 mois chez seulement 25 % des patients. D'autres traitements sont actuellement à l'étude, notamment le lonafarnib, un inhibiteur de la farnesyltransferase responsable de la prénylation de l'HDAg-L, étape essentielle de l'assemblage des virions (111).

Du fait de modes de transmission communs, notamment par voie sexuelle, les co-infections VHB-VIH constituent un groupe de patients non négligeable, estimé à environ 10 % des patients infectés par le VIH à travers le monde (112). Chez l'adulte, cette co-infection augmente le risque de passage à la chronicité de l'infection par le VHB. La sérologie VHB peut présenter des profils atypiques, avec une forte prévalence de patients négatifs pour l'antigène HBs associé à des anti-HBc isolés malgré un ADN du VHB détectable (cf. hépatite B occulte). Il est recommandé de traiter systématiquement ces patients, quel que soit le niveau de la charge virale VHB ou des ALAT, par le biais de deux molécules actives contre le VHB (TDF/TAF + lamivudine, TDF/TAF + emtricitabine). Ce traitement devra être poursuivi à vie, son interruption pouvant conduire à des phénomènes de réactivation du VHB potentiellement létaux. Ces molécules, également actives sur la polymérase du VIH, ne doivent pas être administrées en monothérapie, facteur favorisant la sélection de variants VIH résistants.

Deux situations plus rarement rencontrées sont : les patients co-infectés VHB-VHC et les patients triplement infectés VHB-VHC-VIH (113). La co-infection VHB-VHC est responsable d'une augmentation des phénomènes de fibroses et accélère l'évolution vers la cirrhose (114). L'infection par le VHB n'altère en rien l'efficacité des antiviraux à action directe (DAAs) anti-VHC, cependant la mise sous DAAs semble favoriser la précocité et l'intensité des réactivations de l'hépatite B sous-jacente (115). Ainsi, il est recommandé de traiter dans un premier temps l'infection par le VHB avant de mettre en place le traitement de l'infection par le VHC. La surveillance régulière de la charge virale VHB et du niveau des ALAT apparaît donc comme essentielle chez ces patients.

C. Modèles d'étude du VHB

Bien que le VHB ait été identifié depuis plus de quarante ans, de nombreuses étapes de son cycle demeurent mal comprises à l'heure actuelle, du fait de l'absence de modèle d'étude optimal *in vivo* comme *in vitro* (**Figure 31**).

Du côté des modèles animaux, le chimpanzé permet l'infection par le VHB humain et l'étude de l'aspect immunitaire, du développement de la pathologie hépatique ainsi que du cycle complet du virus. Indépendamment des problèmes éthiques qu'il pose, ce modèle est lourd et coûteux, ce qui le réserve à de rares laboratoires. Une grande partie des connaissances acquises concernant le cycle l'ont été avec des virus des hépatites B existant chez d'autres modèles animaux, en particulier avec le WHBV ou le DHBV. Toutefois, ces modèles ne reflètent que très partiellement le virus humain. En particulier, on sait que l'infection chronique humaine s'accompagne de phénomènes d'intégration dans les chromosomes, notamment dans les régions promotrices de l'expression de la télomérase, ou à proximité de régions régulatrices de l'expression de certaines cyclines cellulaires (116). Dans le cas du WHBV, les mécanismes sont sensiblement différents, puisque cette intégration se fait de façon préférentielle au voisinage du proto-oncogène myc (117). Ainsi le développement de carcinomes hépatocellulaire chez la marmotte ne mime que très partiellement les événements impliqués dans les carcinomes humains. Chez le canard, le génome du DHBV étant dépourvu de la région HBx, l'infection chronique par le DHBV n'induit pas les mécanismes de dérégulation cellulaire qui conduisent au développement de l'hépatocarcinome viro-induit. Plus récemment, un nouveau modèle animal de propagation du VHB a été obtenu grâce au développement de souris doublement humanisées (foie et système immunitaire), cependant l'obtention de ces souris reste très complexe, ce qui en fait là encore une approche réservée à des laboratoires hautement spécialisés (118).

Concernant les modèles cellulaires, il est nécessaire de définir un certain nombre de termes en rapport avec l'infection par le VHB (**Figure 32**). Une lignée cellulaire est dite permissive si celle-ci permet la réplication virale et la libération de virions infectieux. Elle est dite susceptible à l'infection si elle permet l'entrée d'un virion et la libération de son génome au niveau nucléaire. Si une cellule combine la susceptibilité et la permissivité à l'infection par le virus, ce dernier peut effectuer un cycle complet aboutissant à la libération de nouveaux virions infectieux ayant la capacité d'infecter de nouvelles cellules, on parle alors de modèle cellulaire propagatif. Les lignées dérivées d'hépatocarcinome (Huh7, HepG2…) sont utilisées depuis de très nombreuses années pour répliquer le virus en raison de leur facilité d'utilisation (119,120). Cependant, ces lignées ne permettent pas de mimer une propagation et une sécrétion naturelle du virus, elles se révèlent notamment peu efficaces pour la formation et l'entretien de

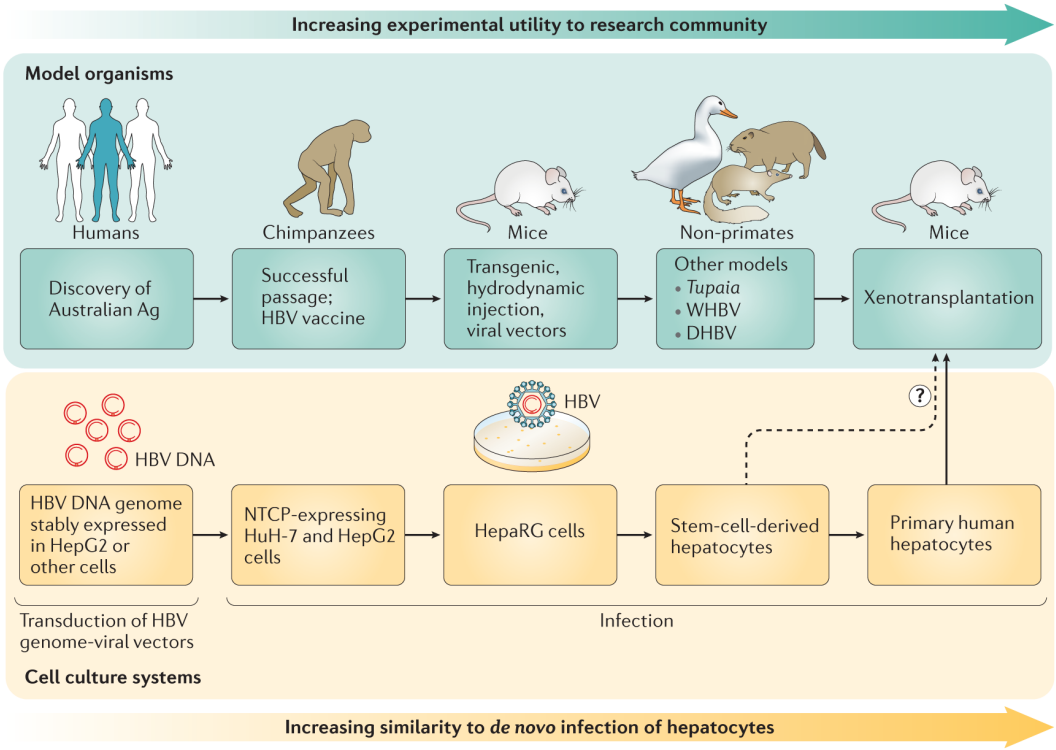

Figure 31 : Évolution des modèles d'étude animaux et cellulaires du VHB
(Source : Thomas *et al.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol; 13(6): 362–374. 2016)

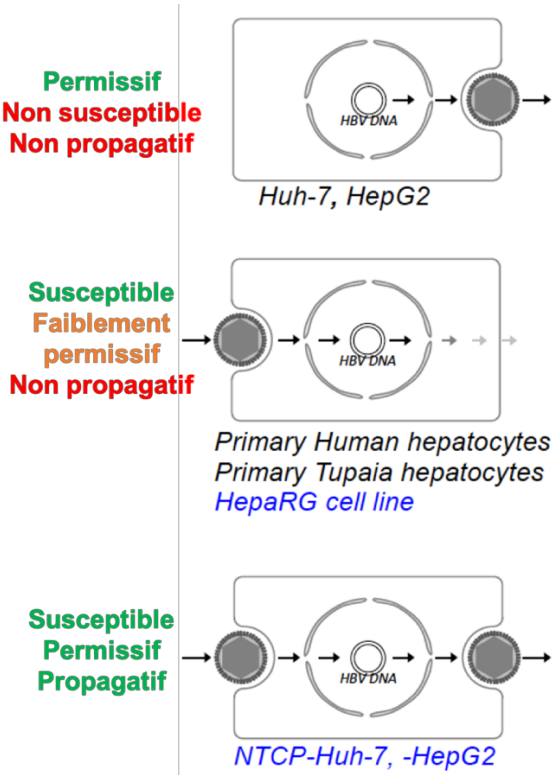

Figure 32: Caractéristiques des modèles cellulaires vis-à-vis de l'infection par le VHB
(Source: d'après Camille Sureau, Mechanism of HBV/HDV entry into hepatocytes)

l'ADNccc, ce qui limite naturellement leur utilité pour l'étude de la persistance virale. De même, leur non-susceptibilité à l'infection par le VHB obligeait à utiliser des techniques artificielles comme la transfection de génomes viraux complets au sein de plasmides, pour initier une réplication virale. Une étape significative a été franchie ces dernières années avec la découverte du récepteur cellulaire spécifique du VHB, le NTCP (**Figure 33**), ce qui a permis la mise au point de lignées dérivées d'hépatocarcinome exprimant ce récepteur, les rendant infectables par des particules virales produites *in vitro*, et donc d'aboutir à un modèle véritablement propagatif. En outre, le protocole permettant l'infection à partir de lots de virus a été mis en place au sein de notre unité. La lignée cellulaire la plus largement utilisée pour étudier l'infection par le VHB *in vitro* est la lignée HepG2 exprimant le récepteur NTCP (121). Cette lignée dérivée d'hépatocarcinome a pour inconvénient d'avoir perdu une grande partie de son phénotype hépatocytaire initial. Les mécanismes observés dans ces cellules concernant les étapes de l'infection par le VHB s'éloignent donc probablement de ce qui se produit réellement dans les PHH *in vivo*. A contrario, la lignée cellulaire FLC4 a été sélectionnée pour ses niveaux d'expression élevés de facteurs spécifiques des hépatocytes, comme l'albumine, le HNF-4α, et certains cytochromes (122,123). Cette lignée a notamment été évaluée dans le cadre d'études toxicologiques. En revanche, l'absence d'expression du récepteur NTCP par ces cellules les rend non infectables par le VHB. La seule évaluation de cette lignée dans le cadre de cette infection consistait en la transfection de plasmides contenant le génome viral (124).

Toujours parmi les lignées hépatocytaires, la lignée HepaRG, occupe une position particulière. Cette lignée cellulaire obtenue il y a plusieurs années peut être différenciée *in vitro* en hépatocytes, devenant ainsi naturellement permissive pour le VHB (125). Ce processus de différenciation est cependant complexe, puisqu'il dure plusieurs semaines, et utilise des milieux de cultures spécifiques contenant notamment de l'hydrocortisone et du DMSO (diméthylsulfoxyde). Ces étapes longues pour obtenir des cellules infectables rendent leur intérêt finalement assez limité pour l'étude du VHB. Enfin, un dernier modèle d'étude du VHB réside en l'utilisation d'hépatocytes primaires. Bien qu'il existe les hépatocytes primaires de *Tupaia belangeri* (PTH), un petit mammifère d'Asie du sud-est, qui sont sensibles à l'infection par le VHB (126), le modèle cellulaire optimal reste l'utilisation d'hépatocytes primaires d'origine humaine (PHH). Après isolement, ces cellules conservent leur état de différenciation pendant plusieurs semaines *in vitro* permettant la production de facteurs cellulaires clés pour la réplication du VHB. Ces divers éléments font que les PHH demeurent la cellule de choix pour l'étude de l'infection naturelle à l'aide de préparations de virus infectieux (127). Cependant, plusieurs facteurs limitent leur utilisation, comme leur absence de division en culture, ou le fait qu'elles perdent progressivement leurs caractéristiques phénotypiques d'hépatocyte. Plusieurs pistes sont à l'étude afin de maintenir ces cellules dans un état

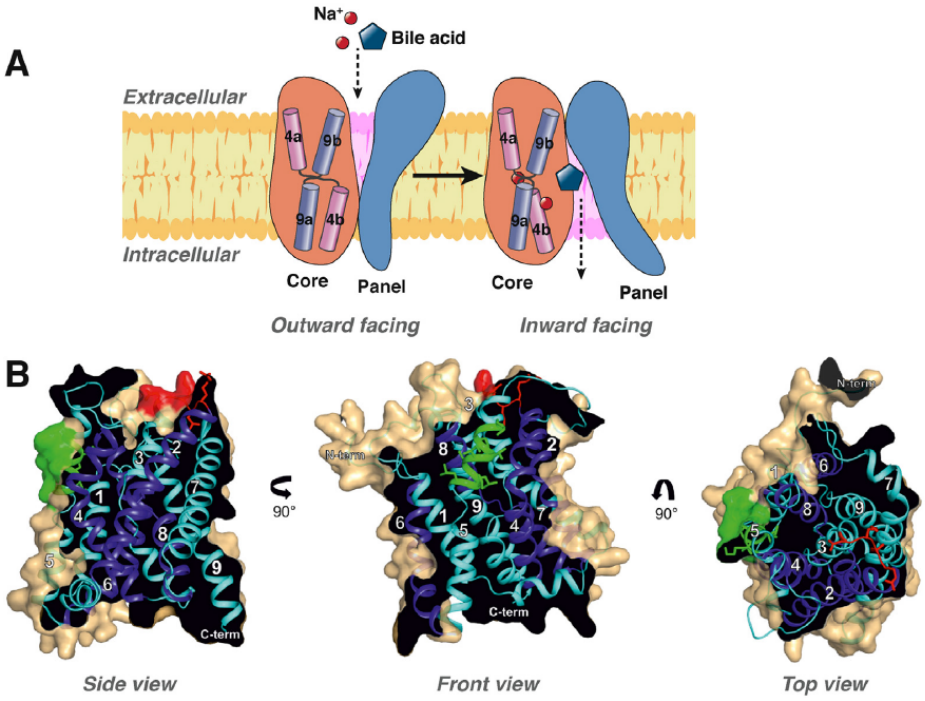

Figure 33 : Structure et fonction du co-transporteur sodium-taurocholate (NTCP)
Dans la première conformation, deux ions sodium et un sel biliaire conjugué se lient à une poche située au niveau du site actif du récepteur. Les ions sodium induisent un changement conformationnel du récepteur entraînant le passage transmembranaire et la libération du sel biliaire dans le cytoplasme. Le site de liaison au myrcludex B est coloré en vert. La zone colorée en rouge correspond à la région variable qui diffère entre le NTCP murin et le NTCP humain, et qui explique la non susceptibilité d'une cellule hépatocytaire murine vis-à-vis du VHB humain.
(Source : Urban *et al.* Gastroenterology. 2014 Jul;147(1):48–64.)

différencié, comme l'utilisation de facteurs chimiques de différenciations dans le milieu de culture (128), la culture en système micro-fluidique simulant la circulation sanguine, et/ou la co-culture en présence de cellules du microenvironnement hépatocytaire (129). En outre, leur obtention est tributaire des activités de chirurgie en lien avec les résections hépatiques larges et leur cryopréservation reste un véritable défi. Enfin, il faut également prendre en compte la variabilité interindividuelle qui peut être importante en fonction des données clinico-biologiques des patients et qui rend difficile la standardisation des protocoles d'étude. Bien que ces hépatocytes primaires restent un modèle à privilégier pour l'étude du VHB, la quantité de virus pour infecter ces cellules (MOI, Multiplicity Of Infection, ratio entre le nombre de cellules et le nombre de particules virales infectieuses) reste élevée, même si l'efficacité d'infection est plus satisfaisante qu'avec des lignées d'hépatocarcinome produisant le récepteur NTCP de façon ectopique.

D. Objectifs

Du fait de l'absence de modèle d'étude optimal concernant le VHB, l'objectif de notre projet a été d'envisager la mise au point de lignées cellulaires innovantes, par le biais de deux stratégies : partir de cellules différenciées non cultivables *in vitro* sur le long terme et les dédifférencier *a minima* pour les immortaliser en réenclenchant leur cycle cellulaire afin d'obtenir une lignée cultivable indéfiniment (approche « descendante »), ou partir de cellules dédifférenciées issues d'une lignée tumorale et leur faire exprimer un facteur de différenciation afin de les rendre infectables par le virus (approche « ascendante »).

La première stratégie (ou approche « descendante ») consistait à s'affranchir des limitations inhérentes à l'utilisation d'hépatocytes primaires humains en ayant recours à leur immortalisation afin d'obtenir une lignée cellulaire stable et cultivable *in vitro* tout en préservant au maximum leur phénotype initial. Afin de se procurer des hépatocytes primaires en quantité suffisante et pendant toute la durée de notre étude, nous avons mis en place le protocole HepaPrim, qui repose sur une collaboration entre notre unité de recherche (INSERM U1259), le service de chirurgie digestive et hépatobiliaire du CHRU de Tours (Pr Ephrem Salame et Dr Louise Barbier), le service d'anatomie pathologique (Dr Fanny Dujardin) et le service de virologie hospitalière (Pr Francis Barin et Pr Catherine Gaudy-Graffin). Ce protocole s'appuie sur l'activité de chirurgie hépatique comme source de tissu hépatique normal (patients présentant une lésion nécessitant une exérèse volumineuse). Sur un plan légal, la conservation des données des patients concernés est enregistrée auprès de la CNIL via le fichier CIL du CHU (n° 2018_040). La récupération et la conservation des fragments de tissu hépatique s'appuie sur

une collection biologique déjà déclarée (dossier DC-2008-308) auprès du Centre de Ressources Biologiques (Dr Sophie Guyetant). Notre protocole a été examiné par le comité d'éthique du CHRU de Tours. Tous les patients ont été informés de la nature de notre étude et donné leur accord libre et éclairé par la signature d'un consentement écrit. Une fois les hépatocytes isolés, l'étape suivante consistait à les immortaliser par le biais d'une stratégie déjà éprouvée par transduction de vecteurs lentiviraux recombinants exprimant soit le proto-oncogène C-myc soit la télomérase reverse-transcriptase humaine, ou par les deux vecteurs en co-expression (130–132). L'objectif de cette stratégie est de préserver au maximum le phénotype hépatocytaire initial. La protéine myc est un facteur de transcription qui active l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et les processus d'apoptose. La télomérase est une enzyme inhibant l'érosion des télomères (extrémités des chromosomes) au cours des divisions successives. De telles lignées hépatocytaires immortalisées ont déjà été utilisées pour des études pharmacologique et de thérapie cellulaire (133), mais peu dans le cadre d'études virologiques.

La seconde stratégie (ou approche « ascendante ») consistait à utiliser une lignée cellulaire exprimant plus de caractères phénotypiques hépatocytaires que la lignée HepG2 classiquement utilisée, à savoir la lignée FLC4. Afin de la rendre infectable par le VHB, notre objectif était de lui faire exprimer constitutivement le récepteur NTCP après transduction par un vecteur lentiviral exprimant la séquence codant pour ce récepteur. De fait, après sélection, l'objectif était de caractériser les lignées obtenues pour leur capacité à être infectées, répliquer et propager le VHB, notamment au travers de la comparaison avec la lignée classique HepG2-NTCP.

II. Matériel et méthodes

A. Constructions plasmidiques

La puromycine et l'hygromycine sont les deux antibiotiques utilisés pour la sélection de cellules transduites par un vecteur lentiviral. Pour des raisons essentiellement liées à leur coût, nous avons fait le choix d'utiliser un vecteur puromycine comportant la séquence codant pour le récepteur NTCP, vecteur que nous avons mis au point.

Le vecteur d'expression lentiviral exprimant un gène de résistance à la puromycine pLenti-puro a été linéarisé par les enzymes de restriction *BamHI* et *XhoI* : 5 µL du plasmide à 1 µg/µL, mis en présence de 2,5 µL de tampon 4 (tous les réactifs de biologie moléculaire proviennent du fournisseur New England Biolabs, sauf si mention spécifique) et de 0,5 µL de chaque enzyme dans un milieu réactionnel de 30 µL, contenant également 2 µL de CIP permettant la déphosphorylation du plasmide afin d'éviter sa recircularisation spontanée, le tout incubé à 37 °C pendant 2 heures.

En parallèle, le vecteur pLenti-hygro-NTCP contenant notre insert, a également été digéré par *BamHI* et *XhoI* afin de le libérer.

Le vecteur d'expression lentiviral linéarisé/déphosphorylé et l'insert ont subi une migration en gel d'agarose 1 %, les fragments correspondants ont ensuite été découpés sur gel et purifiés à l'aide du kit « Gel and PCR clean up » (Macherey-Nagel). Une seconde migration sur gel a permis de quantifier visuellement la quantité d'ADN présente dans les produits de purification afin d'optimiser les conditions de ligation. La ligation a été réalisée en incubant à 16 °C pendant 16 heures : 50 ng de vecteur lentiviral, 50 ng d'insert, 2 µL de tampon T4 DNA ligase et 1 µL d'enzyme T4 DNA ligase dans un volume réactionnel de 20 µL.

Le produit de ligation a ensuite été utilisé pour la transformation de bactéries chimiocompétentes. Les bactéries ont été mises en culture sur gélose LB/Ampicilline pendant 16 heures à 37 °C. Des mini-préparations ont été réalisées pour chaque colonie sélectionnée, la présence de l'insert dans le vecteur d'expression lentiviral a été contrôlée par migration sur gel d'agarose après digestion par *BamHI* et *XhoI.* Une amplification par la réalisation d'une midi-préparation a été effectuée (kit « NucleoBond® Xtra Midi » Macherey-Nagel) à partir de 250 mL de milieu de culture LB/Ampicilline incubés 16 heures à 37 °C sous agitation douce. La quantité d'ADN présente pour notre construction a ensuite été dosée par spectrophotométrie à 260 et 280 nm, puis diluée à la concentration standard de 1 µg/µL. Ce vecteur d'expression lentiviral comportant notre séquence d'intérêt a ensuite été utilisé pour la production de lots de particules lentivirales.

B. Production des particules lentivirales

Un des problèmes majeurs de biosécurité liés à la production de particule lentivirales est l'éventuelle génération de lentivirus compétents et infectieux pouvant se propager de cellules en cellules. Le système de 3ème génération utilisé au laboratoire repose sur l'utilisation de lentivirus intégratifs mais non réplicatifs et auto-inactivés (délétion de la région LTR-5'), produits à partir de trois plasmides devant être co-transfectés simultanément (**Figure 34**). Le premier est le vecteur d'expression lentiviral contenant la séquence d'intérêt s'exprimant dans les cellules transduites associée à un gène de résistance à l'antibiotique de sélection (hygromycine ou puromycine) permettant la génération de l'ARN lentiviral, et comportant un signal d'encapsidation (Psi). Le second est un plasmide d'encapsidation de l'ARN lentiviral contenant les séquences codantes de Gag et Pol (p8.74). Le troisième est un plasmide d'enveloppe codant pour la glycoprotéine d'enveloppe du vésiculovirus (pVSV-G) assurant à la particule un tropisme cellulaire large.

Les quatre vecteurs d'expression suivants ont été utilisés pour la production de lentivirus recombinants (**Figure 35**) :

- le plasmide lentiviral pLenti-puro-NTCP élaboré précédemment comportant un gène de résistance à la puromycine
- un plasmide lentiviral déjà construit codant pour la télomérase Reverse-transcriptase humaine (h-TERT) comportant un gène de résistance à l'hygromycine (pLV-hTERT-IRES-hygro) (134)
- un plasmide lentiviral déjà construit codant pour l'oncogène C-myc comportant un gène de résistance à la puromycine (pCDH-puro-cMyc) (135)
- un plasmide lentiviral codant pour la GFP afin de servir de témoin de transduction

Vingt-quatre heures avant la transfection, des cellules HEK-293T ont été ensemencées à raison de $7{,}5.10^6$ cellules par flasque de 75 cm^2 (une flasque par construction) en milieu DMEM-glutamax (Invitrogen) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine, cultivées à 37 °C sous 5 % de CO2. Une fois à 60 % de confluence, les cellules ont été transfectées par méthode du chlorure de calcium avec une picomole totale d'ADN (quantité standardisée pour le protocole) pour les trois plasmides (pLenti comportant le gène d'intérêt NTCP/h-TERT/C-myc ou la GFP, p8.74 et pVSV-G) et le plasmide codant pour la GFP servant de témoin de transfection. Le milieu de

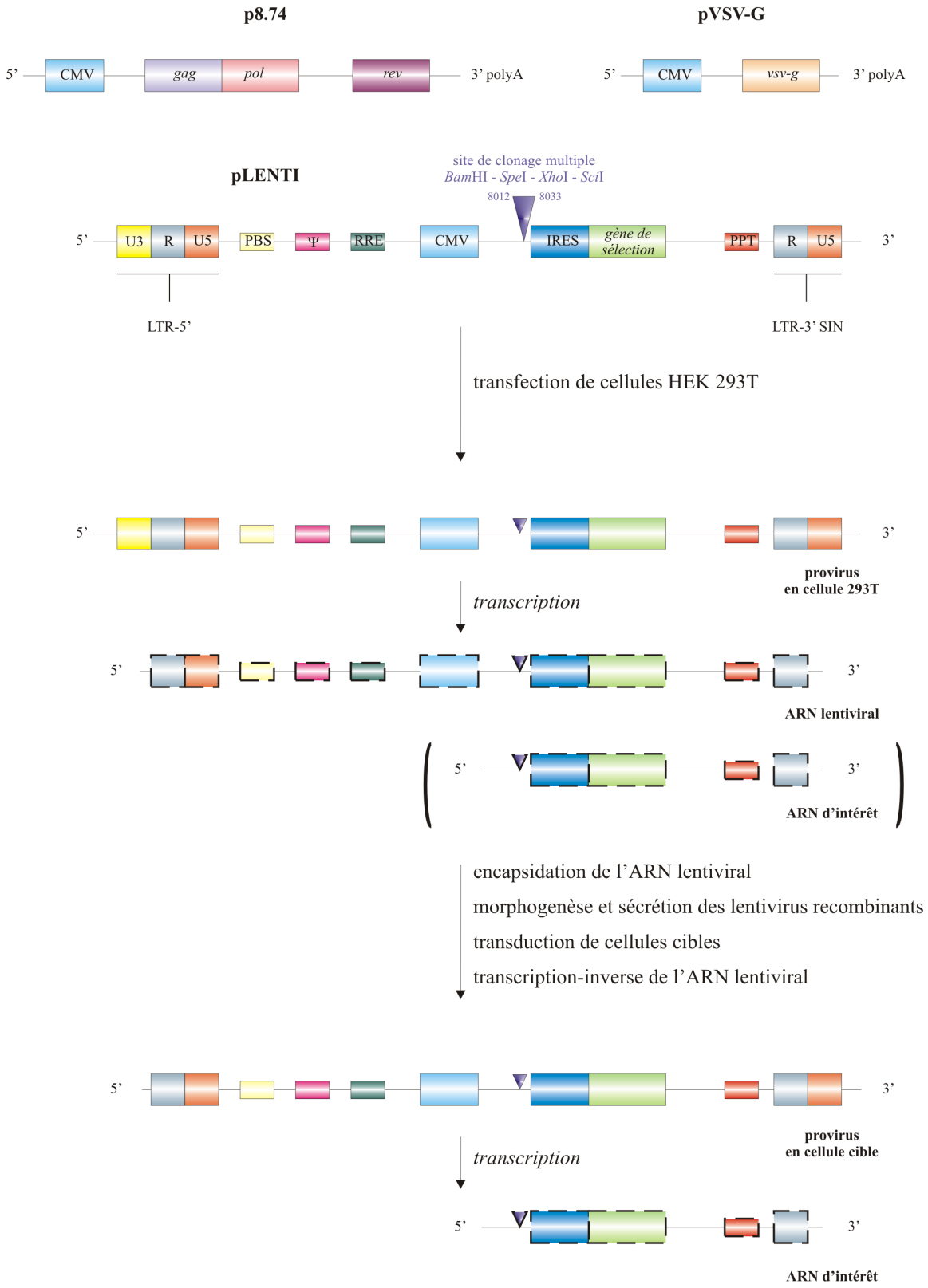

Figure 34 : Fonctionnement du vecteur lentiviral intégratif et non réplicatif utilisé
La séquence codant pour notre protéine d'intérêt est insérée au niveau du site de clonage multiple. Le gène de sélection utilisé dans nos vecteurs conférait une résistance à l'hygromycine ou à la puromycine selon le vecteur considéré.

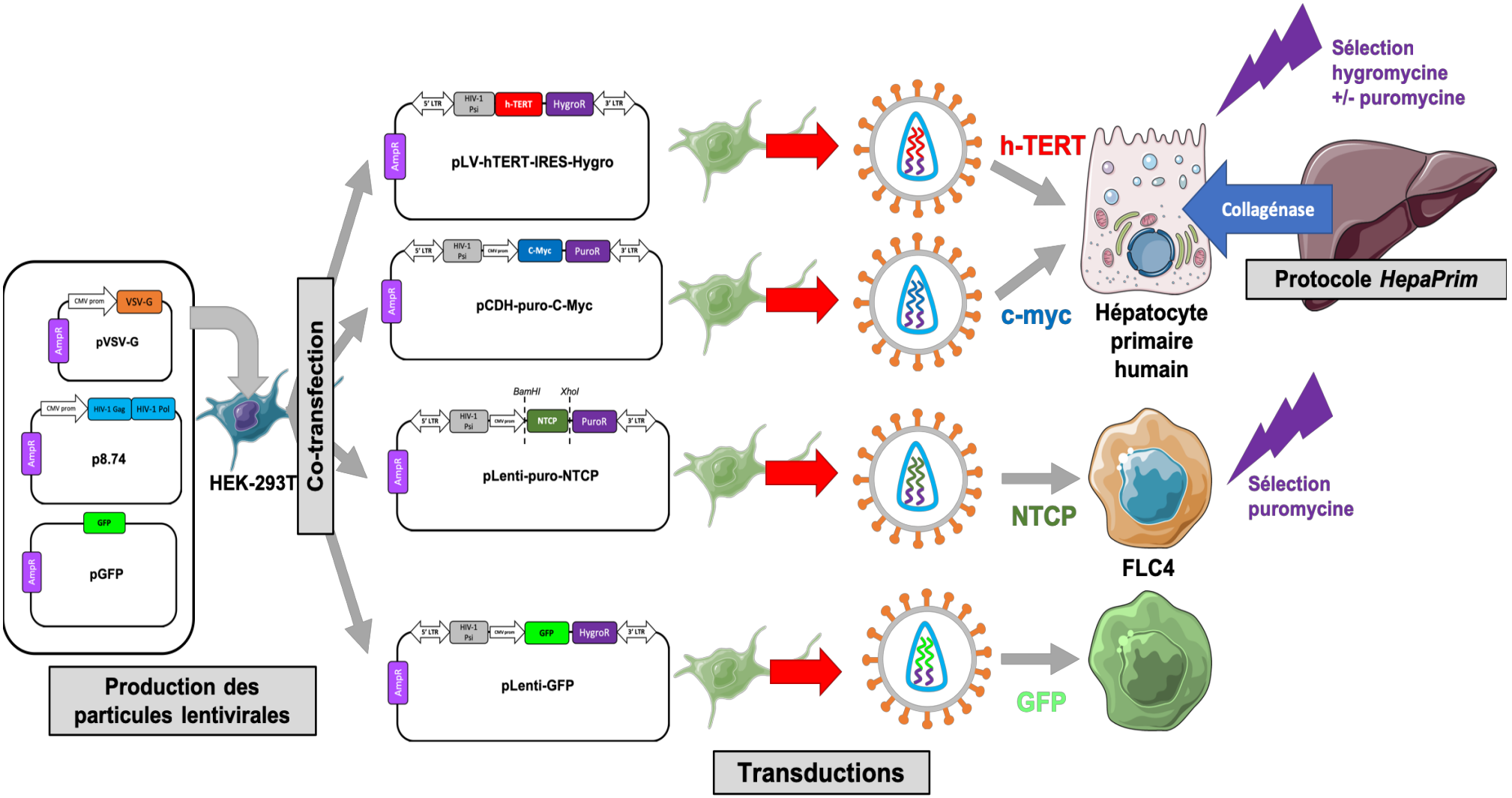

Figure 35 : Schéma récapitulatif des étapes de production des particules lentivirales et de transduction

culture a été changé 24 heures après transfection et la production de GFP a été contrôlée au microscope à épifluorescence. Les milieux ont ensuite été récoltés à 48 heures et 72 heures, filtrés à 0,45 µm, puis concentrés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20 % à 4 °C pendant 90 minutes à 28 000 g. Les culots contenant les lentivirus ont été repris dans 500 µL de tampon phosphate (PBS) puis aliquotés et conservés à -80 °C jusqu'à transduction des cellules. La titration des unités lentivirales de transduction (IUT) de chaque lot de lentivirus a été réalisée par dosage de la protéine p24 par ELISA via le kit « Innotest HIV antigen mAB » selon les recommandations du fabricant, dont la valeur a servi au calcul du nombre d'unités de transduction.

C. Qualification des particules lentivirales

La capacité de nos lots de particules lentivirales à infecter les cellules, à intégrer la séquence d'intérêt dans leur génome, ainsi que l'expression de la protéine d'intérêt par ces cellules transduites, ont été évaluées avant l'obtention d'hépatocytes primaires. En l'absence de ces cellules, les lentivirus recombinants C-myc et h-TERT ont été qualifiés sur cellules Huh7 (lignée dérivée d'hépatocarcinome) par immunofluorescence. Le lentivirus pLenti-puro-NTCP a été directement évalué sur cellules FLC4.

La MOI (Multiplicity Of Infection) est définie comme le ratio entre le nombre de particules lentivirales et le nombre de cellules dans le puits. Les cellules ont été platées à raison de 2.10^5 par puits, au fond desquels des lamelles de verres ont été déposées afin d'obtenir un tapis cellulaire homogène. Le milieu de culture était composé de DMEM-glutamax (Invitrogen) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine, placé à 37 °C sous 5 % de CO2. Elles ont ensuite été transduites avec des MOI croissantes de particules lentivirales (exemple pour C-Myc : MOI 1 ; 2,5 ; 5 et 10) en présence de polybrène (un polymère cationique augmentant l'efficacité de transduction en maintenant les particules lentivirales au contact de la surface des cellules). Le milieu a été changé le lendemain de la transduction, et les cellules maintenues en culture 3 jours afin de leur laisser un temps suffisant pour exprimer les protéines d'intérêt. Les cellules ont ensuite été fixées en paraformaldéhyde 4 % dont l'action a été neutralisée en glycine 0,1 % puis conservées en PBS à 4 °C jusqu'à réalisation de l'immunomarquage.

Une perméabilisation douce des cellules a été réalisée par la saponine 0,05 % en présence de BSA 0,2 % (Bovine Serum Albumine). Le marquage primaire a été réalisé en incubant les cellules pendant 60 minutes avec 50 µL d'anticorps primaire à la dilution adéquate

en saponine/BSA, suivi par un lavage en tampon PBS. Le marquage secondaire a été réalisé dans les mêmes conditions, comprenant une incubation de 50 µL d'anticorps secondaire (couplé à un fluorochrome) à la dilution adéquate en saponine/BSA pendant 30 minutes à l'abri de la lumière, suivi par un second lavage en PBS. Enfin, un marquage des noyaux cellulaires a été réalisé au cours du montage entre lame et lamelle en déposant les lamelles sur du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) en Fluoromount (Thermofischer). Les lames ont ensuite été conservées à 4 °C puis observées au microscope à épifluorescence.

La détection de l'expression de la protéine C-myc en cellules Huh7 a été réalisée grâce à l'anticorps primaire lapin anti-C-myc dilué au 100ème. En parallèle, et sur des puits différents, la détection de l'expression de la protéine h-TERT en cellules Huh7 a été réalisée grâce à l'anticorps lapin anti-TERT dilué au 100ème. La détection du récepteur NTCP en cellule FLC4 a été réalisée grâce à l'anticorps primaire lapin anti-SCL10A dilué au 100ème. Pour ces trois conditions, les anticorps primaires ont été mis en présence d'un anticorps secondaire chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa 488 dilué au 2000ème, fluorochrome émettant une fluorescence verte une fois excité par un laser émettant à 488 nm.

D. Isolement des hépatocytes primaires humains et protocole HepaPrim

Les patients éligibles pour notre protocole ont été sélectionnés en amont de leur chirurgie programmée lors de la réunion de concertation pluridisciplinaire de chirurgie hépatobiliaire. Les critères retenus étaient : l'absence de cirrhose, une chirurgie avec une résection hépatique volumineuse (hépatectomie droite ou gauche) dans un contexte de tumeur primitive du foie ou de métastase hépatique avec des marges larges à distance du tissu tumoral permettant l'obtention d'une quantité suffisante de tissu « sain ». Par ailleurs, la négativité des sérologies vis-à-vis du VIH, VHB, VHC et HTLV a été vérifiée par le laboratoire de virologie hospitalière (sérologies automatisées par technique CLIA sur Architect i1000, Abott).

Une fois le fragment d'exérèse hépatique récupéré, l'isolement des hépatocytes primaires humains a été réalisé en adaptant deux protocoles déjà décrits dans la littérature (136,137). Les solutions de perfusion du fragment tissulaire (**Tableau 2**) ont été préparées la veille de chaque isolement à raison de 1 litre par solution, filtrées stérilement à 0,22 µm puis chauffées à 39 °C au bain-marie 1 heure avant perfusion. Un système de tubulures associé à une pompe péristaltique permettait le pompage séquentiel des solutions chauffées et une perfusion via le système veineux du fragment hépatique (**Figure 36**). Le débit de perfusion a été adapté selon la masse du fragment et le nombre de canules utilisées (le plus souvent 30 mL/min/canule). Une fois les canules en place dans les vaisseaux une première perfusion a permis de laver le prélèvement en éliminant les hématies et les caillots, tout en préservant la

Solution	Constituent	Final Concentration
Solution 1	Sodium chloride	154 mM
	HEPES	20 mM
	Potassium chloride	5.6 mM
	Glucose	5 mM
	Sodium hydrogen carbonate	25 mM
Solution 2	Sodium chloride	152.5 mM
	HEPES	19.8 mM
	Potassium chloride	5.5 mM
	Glucose	5.0 mM
	Sodium hydrogen carbonate	24.8 mM
	EGTA	0.1 mM
To prepare Solution 2, add 10 ml of 100 mM EGTA to 990 ml of Solution 1.		
Solution 3	Sodium chloride	152.5 mM
	HEPES	19.8 mM
	Potassium chloride	5.5 mM
	Glucose	5.0 mM
	Sodium hydrogen carbonate	24.8 mM
	Calcium chloride dihydrate	0.5 µM
To prepare Solution 3, add 10 ml of 0.5 M calcium chloride dihydrate to 990 ml of Solution 1.		
Solution 4	Sodium chloride	152.5 mM
	HEPES	19.8 mM
	Potassium chloride	5.5 mM
	Glucose	5.0 mM
	Sodium hydrogen carbonate	24.8 mM
	Calcium chloride dihydrate	0.5 µM
	Collagenase	See **Table 2**
To prepare Solution 4, add appropriate amount of collagenase to Solution 3.		
Solution 5	Sodium chloride	120 mM
	HEPES	10 mM
	Calcium chloride dihydrate	0.9 mM
	Potassium chloride	6.2 mM
	Albumin	0.1% w/v

Tableau 2 : Liste récapitulative et compositions des solutions de perfusion utilisées pour l'isolement d'hépatocytes primaires humains
(Source : Lee *et al.* J Vis Exp JoVE. 2013 Sep 3;(79))

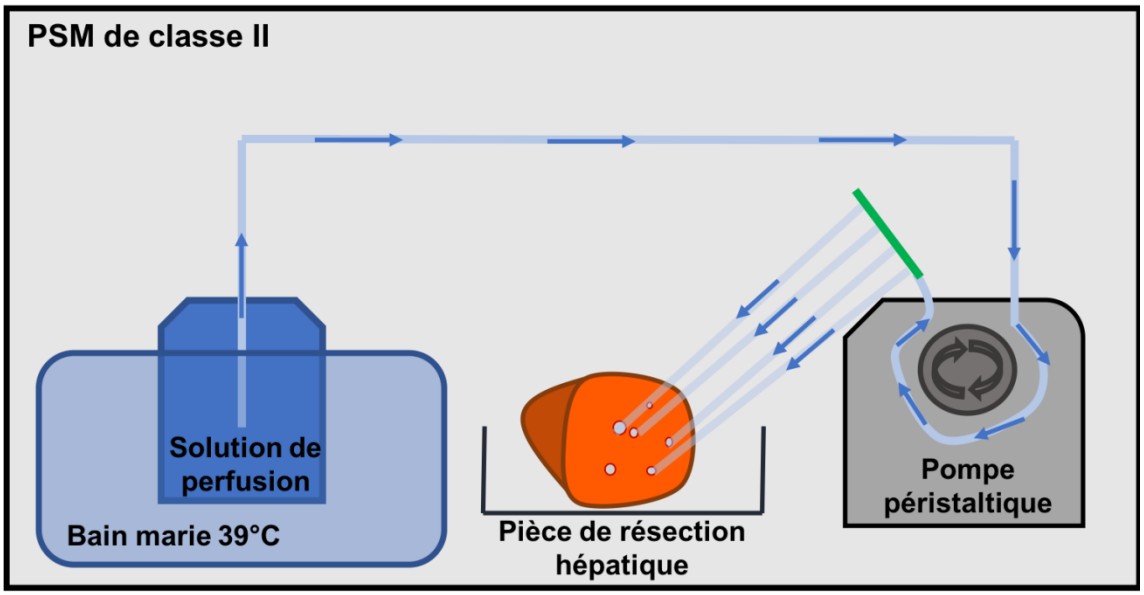

Figure 36 : Représentation schématique du système d'isolement d'hépatocytes primaires humains par perfusion d'une pièce de résection hépatique avec une solution de collagénase

viabilité des hépatocytes (perfusion avec 1 litre de la solution 1, puis 10 minutes avec la solution 2 et enfin avec 500 mL de solution 3). La solution 4 a ensuite été préparée extemporanément en dissolvant la collagénase déshydratée (Liberase® ou Collagenase de Clostridium hystolyticum, Roche) dans le volume approprié de solution 3, puis perfusée à 37 °C pendant 20 minutes afin de laisser le temps à l'enzyme de digérer le prélèvement en dissociant les hépatocytes des liaisons cellule-matrice et cellule-cellule. La Liberase® est un cocktail enzymatique comportant trois enzymes (une collagénase, une protéase et une dispase) qui permet une dissociation optimale des cellules mais est plus coûteuse qu'une simple collagénase. Une fois le fragment ramolli (voire liquéfié), l'action de la collagénase a été stoppée par utilisation de la solution tampon 5 afin de préserver au maximum la viabilité des cellules. Le lysat tissulaire était ensuite filtré à 100 µm afin d'éliminer les agrégats mal dissociés et les résidus vasculaires ou matriciels. Les hépatocytes étaient ensuite isolés des autres types cellulaires (fibroblastes, cellules de Kupffer…) par trois centrifugations de 50 g à 4 °C pendant 5 minutes (les hépatocytes étant plus denses ils forment un culot brun au fond des tubes). Afin d'éliminer les cellules mortes, une purification par centrifugation de 20 à 1250 g sur gradient de Percoll® à 25 % était ensuite effectuée (**Figure 37**). Une fois le culot repris en milieu de culture adapté (Hepatocyte Maintenance Medium, Lonza) un dénombrement des cellules avec estimation de la viabilité sur cellule de Kova® Slide en présence de bleu de trypan a été réalisé, puis les hépatocytes ont été mis en culture en flasque ou plaque multi-puits préalablement coatées avec du collagène (Rat-tail collagen, Thermo Fischer).

E. Culture cellulaire et transduction

L'objectif de notre étude est d'une part l'obtention d'hépatocytes primaires humains exprimant la télomérase humaine et l'oncogène C-myc dans le but de les immortaliser, d'autre part l'obtention de cellules FLC4 exprimant stablement le récepteur NTCP du HBV.

Vingt-quatre heures avant la transduction, les cellules ont été mises en culture en plaque 6 puits à raison de 2.10^5 cellules par puits. Les hépatocytes primaires humains ont été mis en culture à 37 °C sous 5 % de CO2 en milieu HMM supplémenté avec 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules FLC4 ont été mises en culture en milieu DMEM-glutamax (Invitrogen) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine, à 37 °C sous 5 % de CO2. Les cellules ont été transduites avec différentes MOI en présence de polybrène. Pour les PHH, plusieurs conditions ont été testées : C-myc-puro seul (MOI 2,5 et 5), et h-TERT-hygro (MOI 1) combiné à C-myc-puro (MOI 2,5).

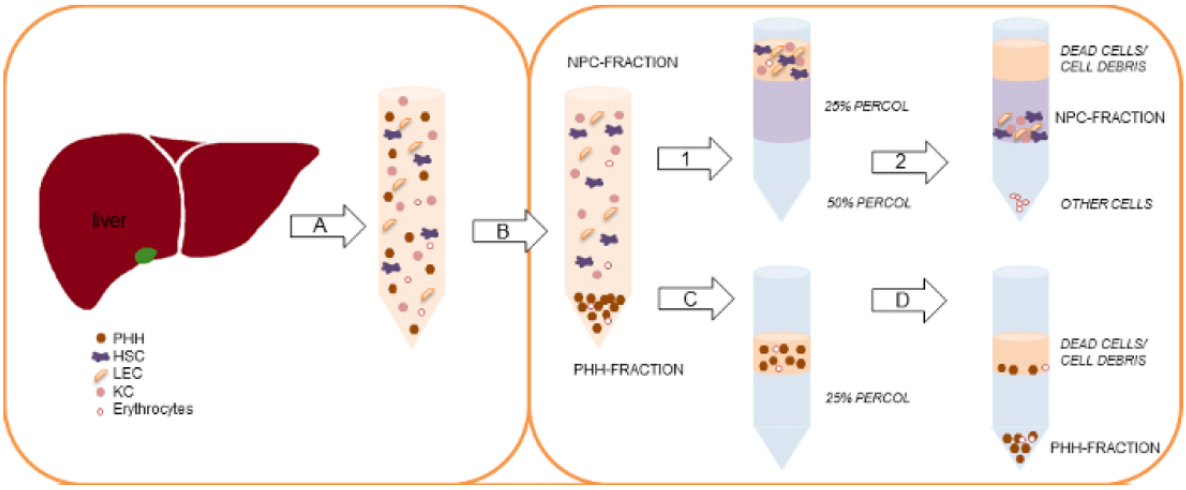

Figure 37 : Schéma récapitulatif des étapes d'isolement des hépatocytes primaires humains par centrifugation et enrichissement sur gradient de Percoll®

Seules les étapes A, B C et D ont été réalisées (les étapes 1 et 2 concernant l'isolement des cellules de la fraction non hépatocytaire).

NPC : Non Parenchymal Cells

(Source: Kegel *et al.* Journal of Visualized Experiments: JoVE, (109), e53069)

Les FLC4 ont été transduites avec le lentivirus NTCP-puro construit précédemment à une MOI de 2,5. Le milieu de culture a ensuite été changé 24 heures après transduction. La sélection des cellules transduites a été effectuée par l'utilisation d'hygromycine ou de puromycine, deux molécules antibiotiques de la famille des aminosides qui inhibent la synthèse des protéines avec une action sur les cellules eucaryotes, et dont le gène de résistance est présent sur le vecteur lentiviral. Une partie des cellules n'a pas été transduite afin de réaliser deux gammes de concentrations croissantes d'hygromycine (Thermofischer) (200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml) et de puromycine (Thermofischer) (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml) afin d'évaluer la mortalité en l'absence de transduction et la concentration optimale pour la sélection. Les cellules transduites ont été mises en présence d'hygromycine et/ou puromycine (selon la combinaison de lentivirus utilisée) quatre jours après transduction, puis les milieux de culture contenant l'antibiotique ont été changés toutes les 48 heures afin de maintenir une pression de sélection optimale tout en éliminant les cellules mortes.

F. Caractérisation des lignées cellulaires transduites

1. Contrôle de l'expression de la protéine d'intérêt

L'expression de la protéine d'intérêt dans la population cellulaire résistante à l'antibiotique a été contrôlée par immunofluorescence et immuno-blot.

L'immunofluorescence a été réalisée selon le protocole détaillé précédemment (cf. II.C), les cellules ont ensuite été observées au microscope confocal.

Pour la réalisation de l'immunoblot, des extraits protéiques ont été réalisés en lysant un culot de 10 millions de cellules dans 200 µL de tampon RIPA auquel a été ajouté extemporanément trois anti-protéases (PMSF, aprotinine, leupeptine). Le lysat a été incubé 1 heure à 4 °C puis centrifugé à 15 000g pendant 15 minutes avec récupération du surnageant contenant les protéines. Le récepteur NTCP étant glycosylé, un prétraitement par l'enzyme PNGase a été réalisé, les différents niveaux de glycosylation étant responsables d'une hétérogénéité de la taille mesurée pour une même protéine et pouvant gêner l'interprétation de l'immunoblot (obtention d'une bande étendue et diffuse au lieu d'une bande nette). Les lysats cellulaires ont été soumis à une électrophorèse en gel d'acrylamide 12 % pendant 1h30 à 50 mA. Un électrotransfert du gel a ensuite été réalisé en tampon TG 1X – méthanol sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène). Cette membrane a ensuite été saturée pendant 15 minutes en tampon de saturation (Lait 5 %, PBS-tween 0,2 %) avant incubation de l'anticorps primaire puis de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation finale a été réalisée par chimioluminescence à l'aide du kit de révélation ECL (GE Healthcare).

2. Évaluation de la susceptibilité vis-à-vis de l'infection par le VHB

a) Production des lots de virus sur cellules en culture

La lignée HepAD38 est une lignée cellulaire hépatocytaire comportant un génome VHB intégré (sérotype ayw, génotype D) dont l'expression est inductible par la tétracycline (120). Pour la production de lots de particules de VHB infectieuses, les HepAD38 ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté avec 2 % de DMSO. Les particules de VHB ont été concentrées à partir des surnageants de culture par une précipitation sur la nuit avec 8 % de PEG 8000 (Euromedex) puis centrifugées à 5000 g à 4 °C pendant 1 heure. Les culots ont ensuite été resuspendus en milieu opti-MEM (Gibco/Invitrogen).

b) Infection in vitro par le VHB

Les lignées cellulaires obtenues ont été comparées à la lignée HepG2-NTCP, fournie par le professeur Urban (Heidelberg University Hospital), cultivée en milieu DMEM-glutamax (Invitrogen) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté à 37 °C sous 5 % de CO2, et entretenue sous pression de sélection par 5 µg/mL de puromycine. Les cellules ont été platées à J0 à raison de 2.10^5 par puits en plaque coatée au collagène, puis maintenues en culture entre 1 et 2 jours jusqu'à atteindre 80 % de confluence. Les particules virales de VHB ont ensuite été ajoutées dans les puits à raison de 50 équivalent génome par cellule en présence de 1 % de DMSO et de 4 % de PEG 8000 en milieu opti-MEM. L'inoculum a été retiré après 2 heures d'incubation à 37 °C, avant de laver le tapis cellulaire trois fois en D-PBS 1X (Gibco/Invitrogen) puis d'ajouter du milieu frais supplémenté par 1 % de DMSO.

c) Détection de l'ARN prégénomique sur lysats cellulaires

La quantification relative de l'expression de l'ARN prégénomique généré en culture a été réalisée à 3, 5 et 10 jours post-infection (**Figure 38**). Les ARN totaux ont été extraits des lysats cellulaires grâce au kit « Nucleospin RNA isolation » (Macherey Nagel) en suivant les recommandations du fabricant. Les ARN ont été rétrotranscrits grâce au kit « Protoscript II cDNA Synthesis » (New England Biolabs). La quantification a été effectuée en utilisant les amorces décrites ci-contre (**Tableau 3**). Les échantillons ont été mesurés en triplicatas et les valeurs ont été normalisées par mesure des niveaux d'expression du gène de ménage de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) avec les amorces décrites ci-contre (**Tableau 4**), les calculs ont été réalisés par la méthode des ΔΔCt décrite précédemment (138).

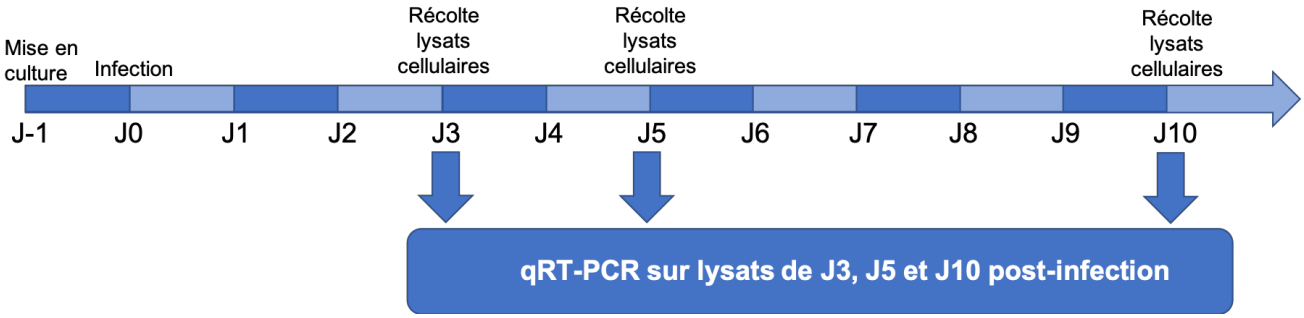

Figure 38 : Schéma récapitulatif de l'analyse cinétique de l'infection sur cellules HepG2-NTCP et FLC4-NTCP par technique de qRT-PCR

HBV Forward	5' -TCTTTCGGAGTGTGGATTCGC- 3'
HBV Reverse	5' -GGAGTTCTTCTTCTAGGGGACC- 3'

Tableau 3 : Séquences des amorces nécessaires à l'amplification de l'ARN prégénomique du VHB par qRT-PCR

L'amorce sens « HBV forward » et l'amorce antisens « HBV reverse » s'hybrident à la fin de la séquence codant pour la protéine HBc et permettent l'amplification d'un fragment d'ADN de 122 paires de bases.

HPRT Forward	5' -TGACCTTGATTTATTTTGCATAC- 3'
HPRT Reverse	5' -CGAGCAAGACGTTCAGTCCT- 3'

Tableau 4 : Séquences des amorces nécessaires à l'amplification du gène HPRT par qRT-PCR

III. Résultats

A. Constructions plasmidiques

Le vecteur pLenti-puro linéarisé et l'insert NTCP ont subi une migration sur gel d'agarose après digestion enzymatique (**Figure 39**).

Les fragments observés sur gel étaient tous compatibles avec les tailles théoriques attendues.

Le vecteur lentiviral et l'insert ont ensuite été utilisés afin de réaliser la réaction de ligation, produit de ligation amplifié par midi-préparation et ayant servi à la production de lentivirus.

B. Production des particules lentivirales

Avant leur transfection en cellule HEK-293T, les vecteurs d'expression lentiviraux pLV-hTERT-IRES-hygro, pCDH-puro-cMyc, pLenti-GFP (témoin de transduction), le plasmide d'encapsidation p8.74, le plasmide d'enveloppe pVSV-G et le plasmide pGFP (témoin de transfection) ont été contrôlés par digestion enzymatique suivi d'une migration sur gel, puis amplifiés par la réalisation de midi-préparations.

Vingt-quatre heures après co-transfection en chlorure de calcium des plasmides permettant la production de lentivirus recombinants, l'efficacité de la transfection a été évaluée par l'observation au microscope optique de la fluorescence verte émise par les cellules ayant incorporé le plasmide témoin pGFP.

Après récupération des surnageants de culture et concentration des particules par ultracentrifugation sur coussin de sucrose, le dosage de l'antigène p24 par ELISA a permis d'estimer la concentration en particules (pg/mL) à partir de la densité optique mesurée, puis de calculer le nombre d'unité de transduction (UT/mL). Les calculs ont été réalisés sur la base des équivalences suivantes : 8.10^{-17} grammes de p24 = 1 Particules lentivirale, 1000 Particules lentivirales = 1 Unité de transduction (**Tableau 5**). Ce résultat a servi de base pour le calcul des MOI au moment de la transduction des cellules.

C. Qualification des particules lentivirales

La réalisation d'une gamme croissante d'infection par les lentivirus sur cellules Huh7 a permis de confirmer l'efficacité de notre lentivirus codant pour la protéine C-myc. L'analyse

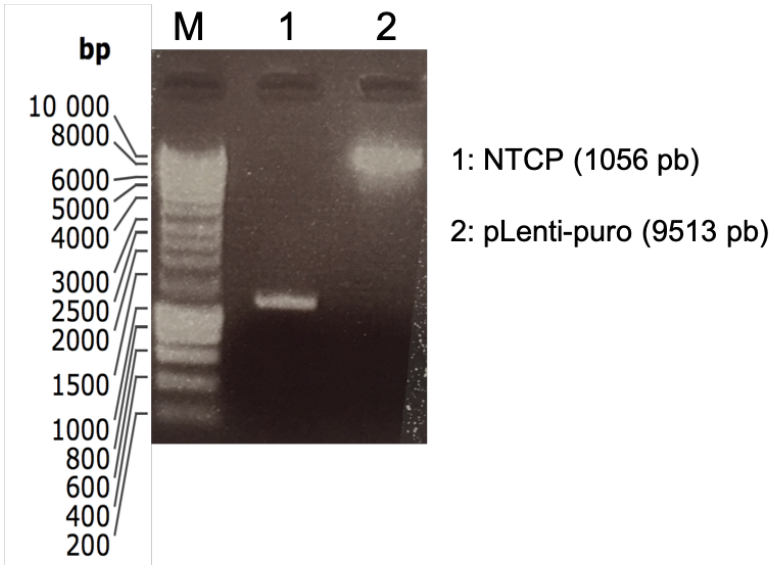

Figure 39 : Profil de restriction du vecteur pLenti-puro linéarisé et de l'insert NTCP obtenus après digestion enzymatique par *BamHI* et *XhoI*
Les tailles théoriques sont indiquées à droite du gel.
M = Marqueur de taille (Smartladder, Eurogentec)

Lentivirus	Antigène p24 (pg/mL)	Particules lentivirales (PP/mL)	Unités de transduction (UT/mL)
C-myc	$3{,}65.10^{6}$	$4{,}57.10^{10}$	$4{,}57.10^{7}$
h-TERT	$7{,}82.10^{4}$	$9{,}77.10^{8}$	$9{,}77.10^{5}$
NTCP	$3{,}53.10^{6}$	$4{,}41.10^{10}$	$4{,}41.10^{7}$
GFP	$2{,}01.10^{6}$	$2{,}51.10^{10}$	$2{,}51.10^{7}$

Tableau 5 : Quantification de la production de particules lentivirales par le dosage en ELISA de la protéine p24 (kit « Innotest HIV antigen mAB »)

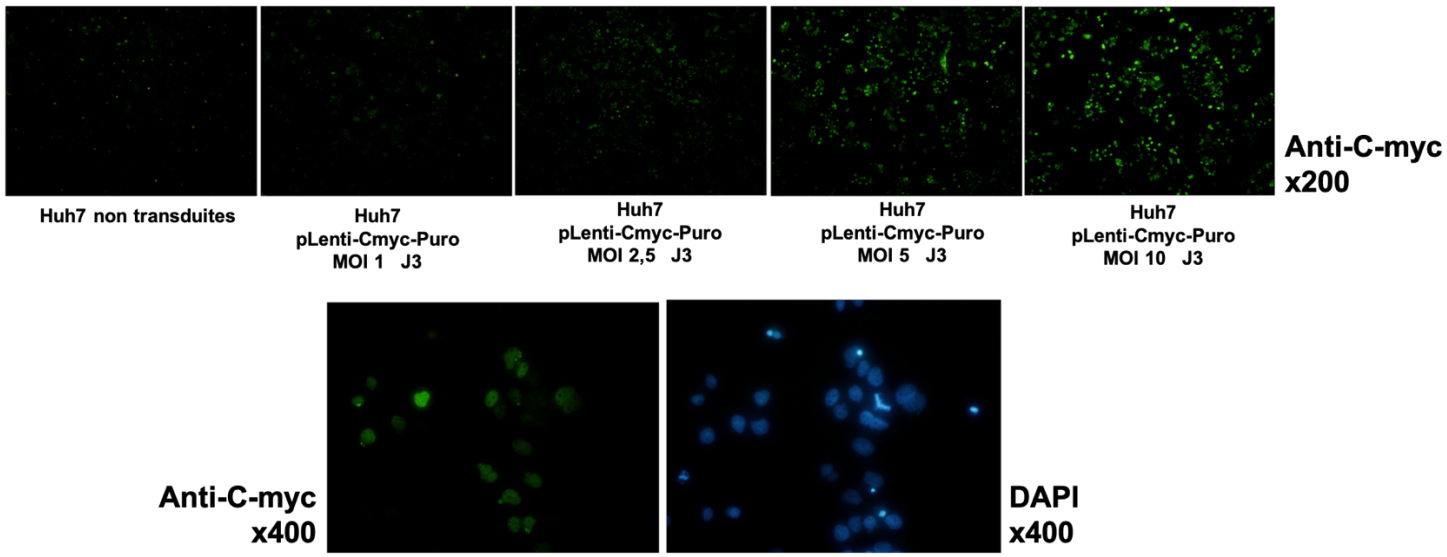

Figure 40 : Analyse au microscope à épifluorescence de l'expression de la protéine C-myc en cellules Huh7 transduites avec une gamme croissante de lentivirus
La détection de C-myc a été réalisée grâce à un marquage primaire utilisant un anticorps lapin anti-C-myc associé à un marquage secondaire utilisant un anticorps chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome vert Alexa 488. Les noyaux de toutes les cellules ont été marqués au DAPI.

des cellules transduites au microscope à épifluorescence après immunomarquage spécifique anti-C-myc, trois jours après transduction, a permis de mettre en évidence une fluorescence localisée au niveau nucléaire d'intensité croissante et corrélée avec la MOI utilisée (**Figure 40**). La concentration plus faible en particules infectieuses mesurée par ELISA p24 pour le lot de lentivirus codant pour h-TERT n'a pas permis de réaliser une gamme complète, cependant la transduction des cellules Huh7 avec une MOI de 5 a permis la détection d'une fluorescence nucléaire spécifique en immunofluorescence (**Figure 41**).

La transduction de cellules FLC4 avec une MOI de 2,5 en lentivirus codant pour le NTCP a permis d'obtenir une fluorescence majoritairement localisée au niveau de la membrane plasmique et dans une moindre mesure dans le cytoplasme (**Figure 42**).

L'ensemble de ces résultats valide l'efficacité de nos lentivirus sur cellules Huh7 (lentivirus C-myc et h-TERT) et FLC4 (lentivirus NTCP).

D. Isolement des hépatocytes primaires humains et protocole HepaPrim

Dans le cadre de la mise en place du protocole HepaPrim, quatre patients (numéros d'anonymat : 1-12010618, 2-16051301, 3-12051301, et 4-16121005) ayant une chirurgie hépatique programmée ont été sélectionnés selon leurs antécédents et leurs données clinico-biologiques (**Tableau 6**). Les trois premiers patients présentaient tous un antécédent d'adénocarcinome colique ayant été traité par radio-chimiothérapie, avec mise en évidence d'une métastase hépatique métachrone (apparue après le traitement du cancer primitif) nécessitant une hépatectomie droite (résection des segments 5, 6, 7 et 8) ou gauche (résection des segments 2,3 et 4) avec un foie sain péri-lésionnel suffisamment volumineux à l'imagerie (TDM ou IRM abdominale). Le quatrième patient présentait un cholangiocarcinome nécessitant une hépatectomie droite. L'absence de cirrhose au niveau du foie sain a été évaluée par des critères d'imagerie et/ou confirmée par des critères histologiques en cas de réalisation d'une biopsie hépatique. Pour les quatre patients, la négativité des sérologies HIV, HBV, HCV et HTLV a été confirmée par le laboratoire de virologie hospitalière avant la chirurgie. Les quatre patients ont signé leur consentement libre et éclairé pour leur inclusion dans le protocole.

Une fois la chirurgie effectuée, le chirurgien a déterminé macroscopiquement la localisation de la lésion cancéreuse et réalisé une recoupe au scalpel du foie sain en respectant au maximum la vascularisation tout en s'assurant de la présence de vaisseaux de calibre suffisant pour la future perfusion. L'anatomopathologiste a ensuite réalisé un second examen macroscopique afin de s'assurer du caractère sain de la recoupe en parallèle du foie comportant

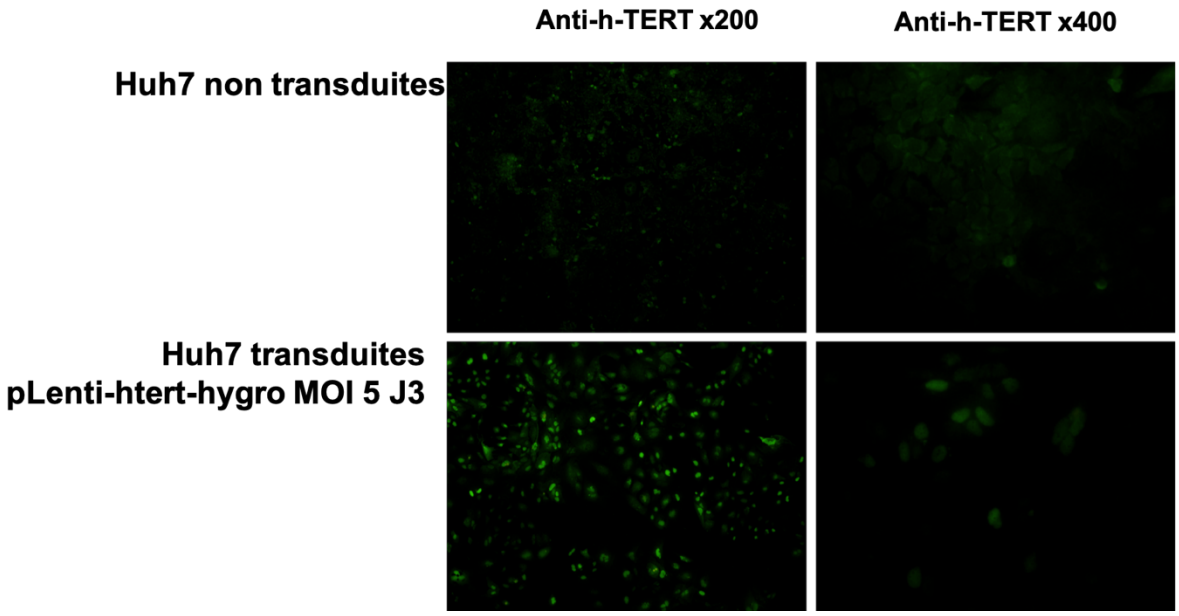

Figure 41 : Analyse au microscope à épifluorescence de l'expression de la protéine h-TERT en cellules Huh7 transduites
La détection de h-TERT a été réalisée grâce à un marquage primaire utilisant un anticorps lapin anti-h-TERT associé à un marquage secondaire utilisant un anticorps chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome vert Alexa 488

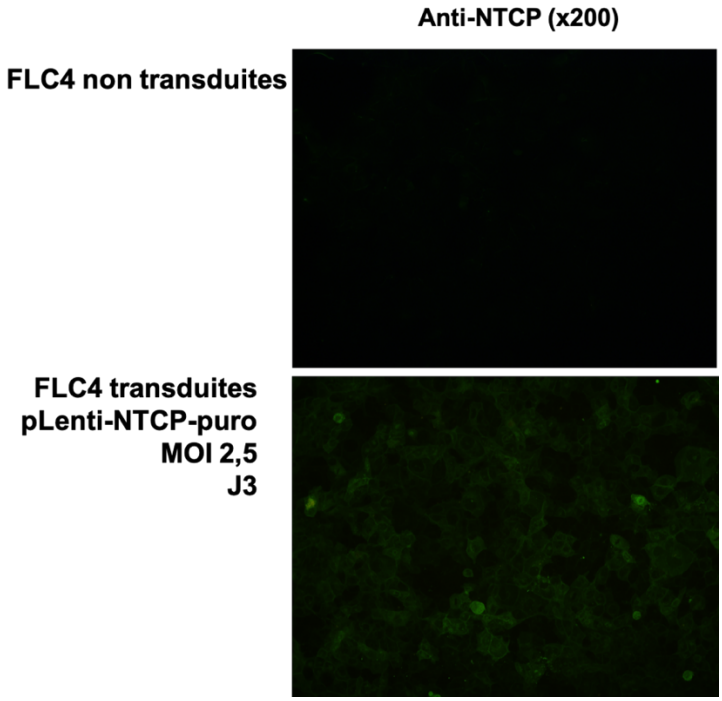

Figure 42 : Analyse au microscope à épifluorescence de l'expression de la protéine NTCP sur cellules FLC4 transduites
La détection du NTCP a été réalisée grâce à un marquage primaire utilisant un anticorps lapin anti-NTCP associé à un marquage secondaire utilisant un anticorps chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome vert Alexa 488

la lésion. D'un point de vue structural, les quatre prélèvements hépatiques comportaient tous une face de résection avec une vascularisation apparente du fait de la recoupe, et une face dont l'intégrité était préservée et rendue imperméable du fait de la conservation de la capsule de Glisson (capsule séreuse constituée de tissu conjonctif enveloppant le parenchyme hépatique). Les délais entre l'heure de fin de la chirurgie au bloc opératoire (début de l'ischémie du prélèvement) et l'acheminement au laboratoire de confinement L2 étaient de 1 heure (+/- 15 minutes) pour les trois prélèvements. La durée moyenne de préparation de la pièce sur le montage était d'environ 15 minutes, suivi par la perfusion par la solution 1. La digestion du prélèvement par la collagénase débutait 2 heures après la fin de la chirurgie pour une durée de 20 minutes. L'isolement proprement dit des hépatocytes primaires par les étapes successives de centrifugation durait environ 2 heures. Toutes étapes cumulées, la mise en culture des hépatocytes en flasques placées à l'incubateur a donc eu lieu environ 5 heures après la fin de la chirurgie.

L'intervention chirurgicale du patient 1-12010618 n'a pas présenté de difficulté majeure et a duré 3 heures entre le début de l'incision par le chirurgien et la résection complète de l'hémi-foie. Le fragment d'exérèse pesait 55 grammes. La procédure d'isolement d'hépatocytes primaires a été effectuée en utilisant la Liberase® (**Figures 43, 44 et 45**). Elle s'est révélée fructueuse pour le premier prélèvement, aboutissant à l'obtention d'environ 40 millions d'hépatocytes primaires dont la moitié a été placée en flasques coatées au collagène (**Figure 46**), et l'autre moitié en flasques non coatées. La présence du collagène dans le milieu de culture apparaissait comme facultative dans les publications méthodologiques sur lesquelles nous nous sommes appuyés, cependant les hépatocytes ensemencés sur collagène ont formé un tapis cellulaire confluent et organisé dès 16 heures après la mise en culture, là où les hépatocytes ensemencés sans collagène restaient désorganisés, formant un tapis cellulaire toujours non confluent même après 48 heures de culture. Les hépatocytes mis en culture ont ensuite servi à la réalisation de lysats cellulaires et de culots avec pour objectif l'étude transcriptomique et protéomique de facteurs strictement hépatocytaires par d'autres membres de l'équipe de recherche. La qualité probablement médiocre des culots et des lysats n'a cependant pas permis l'obtention de données exploitables permettant de caractériser avec précision les hépatocytes primaires isolés. Après discussion avec le Dr Abderrahmane Bengrine (CHU Amiens, membre d'une équipe de recherche possédant une expertise sur les procédures d'isolement des hépatocytes) le rendement nombre d'hépatocytes isolés/masse du prélèvement était cependant assez faible (moins de 1 million de cellules par gramme de foie dans notre cas) et pouvant au regard de son expérience atteindre 10 millions de cellules par gramme de foie en conditions optimales.

						Antécédents						
Patient	**Sexe**	**Age**	**Pathologie**	**Lésion**	**Intervention**	**Surpoids**	**Diabète**	**Hypertension artérielle**	**Dyslipidémie**	**Tabagisme**	**Alcoolisme**	**Pathologie cardio-vasculaire**
1-12010618	F	67 ans	Adénocarcinome colique	Métastase hépatique	Hépatectomie droite	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
2-16051301	M	65 ans	Adénocarcinome colique	Métastase hépatique	Hépatectomie gauche	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui
3-12051301	F	75 ans	Adénocarcinome colique	Métastase hépatique	Hépatectomie droite	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Non
4-16121005	M	63 ans	Cholangiocarcinome		Hépatectomie droite	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non

		Sérologies virales				Bilan hépatique pré-opératoire				Anatomopathologie du foie non tumoral	
Patient	**Traitement medicamenteux**	**VIH**	**VHB**	**VHC**	**HTLV**	**Cytolyse**	**Cholestase**	**Durée de l'intervention**	**Poids du fragment**	**Macroscopie**	**Microscopie**
1-12010618	Non	Négative	Négative	Négative	Négative	Non	Oui	3 heures	55 grammes	Aspect normal	Discrète stéatose
2-16051301	Oui	Négative	Négative	Négative	Négative	Non	Non	6 heures	80 grammes	Aspect normal	Discrète fibrose portale
3-12051301	Oui	Négative	Négative	Négative	Négative	Oui	Oui	3 heures	110 grammes	Aspect normal	Discrète stéatose
4-16121005	Oui	Négative	Négative	Négative	Négative	Oui	Oui	5 heures	70 grammes	Aspect granuleux, marbré	Fibrose portale Dilatations des voies biliaires

Tableau 6 : Caractéristiques clinico-biologiques des patients inclus dans le protocole HepaPrim

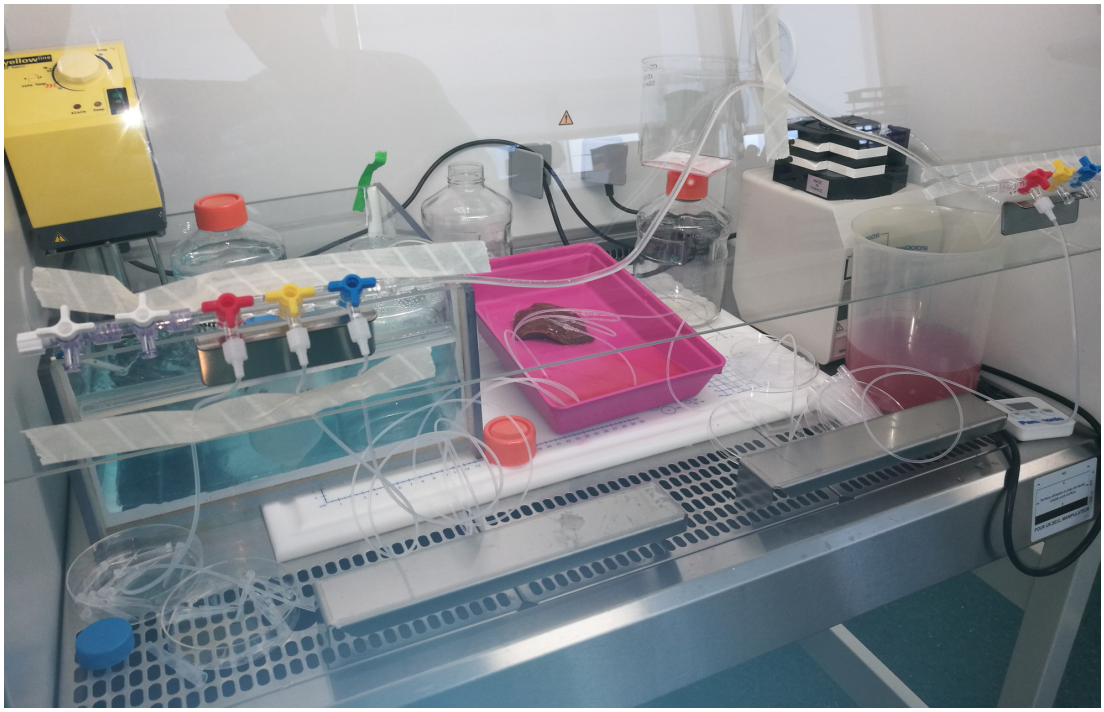

Figure 43 : Photographie du montage utilisé pour l'isolement d'hépatocytes primaires humains à partir de fragments de résection hépatique
Le bain-marie chauffant les solutions de perfusion se situe à gauche, le fragment au centre et la pompe péristaltique à droite du montage, le tout placé sous un PSM de classe II au sein du laboratoire de confinement de niveau 2.

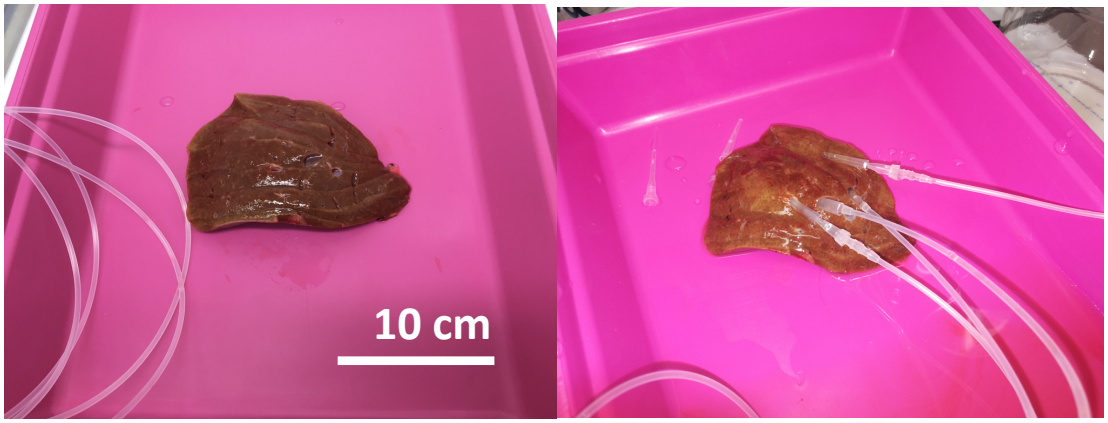

Figure 44 : Photographies du fragment de résection hépatique issu de l'hépatectomie du patient 1-12010618
A droite, les canules ont été placées dans les vaisseaux apparents et le tissu hépatique pâlit du fait de l'élimination des hématies par la perfusion de solution 1.

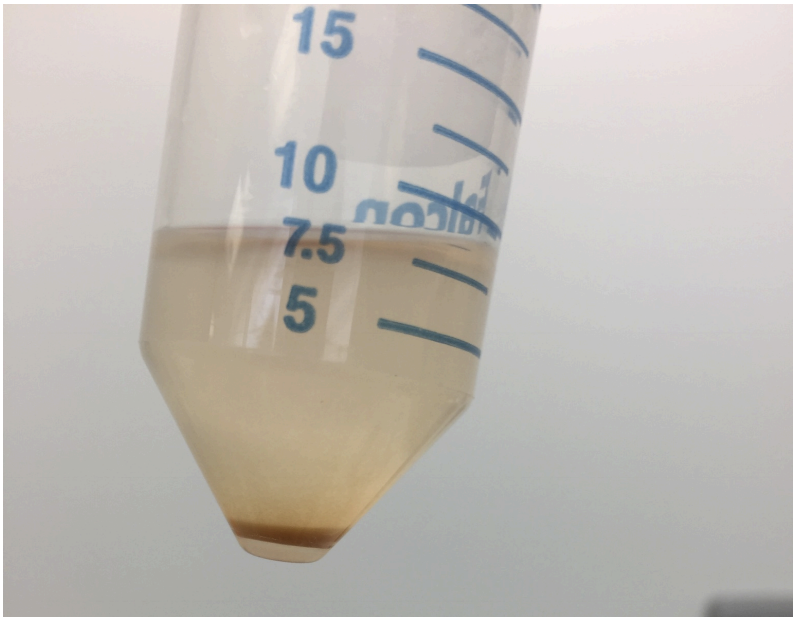

Figure 45: Photographie du culot brun constitué d'hépatocytes obtenu après digestion des tissus du prélèvement n°1 par la collagénase et étapes de centrifugation

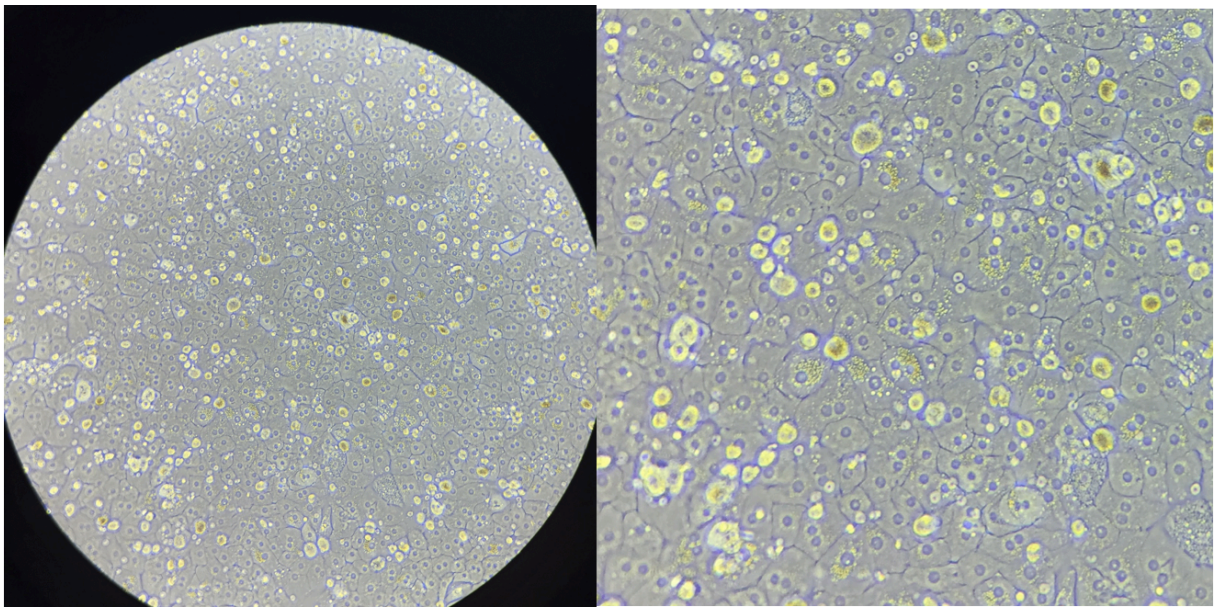

Figure 46 : Observation en microscopie optique des hépatocytes primaires isolés à partir du prélèvement n°1 après 24 heures de culture en flasque coatée au collagène
Les cellules isolées présentent une forme polyédrique et sont parfois binucléées, ce qui correspond bien aux caractéristiques morphologiques classiques de l'hépatocyte primaire en culture.
(grossissement x100)

Du fait d'une lésion métastatique placée près du hile du foie et donc au contact des gros vaisseaux, l'intervention du patient 2-16051301 s'est révélée plus complexe et a duré 6 heures, ce qui a potentiellement altéré la qualité du prélèvement obtenu. Le fragment d'exérèse pesait 80 grammes. La digestion du prélèvement a été effectuée avec la Liberase®. Malgré une digestion satisfaisante du prélèvement, les premières étapes de centrifugation n'ont pas permis la formation d'un culot individualisé semblable à celui obtenu pour le premier prélèvement. Cette deuxième tentative n'a donc pas permis l'isolement d'hépatocytes primaires.

L'intervention chirurgicale du patient 3-12051301 ne présentait pas de difficulté majeure et a duré 2h30. Le fragment d'exérèse pesait 110 grammes. La digestion a été effectuée avec une collagénase simple (Clostridium hystolyticum Collagenase), moins onéreuse que la Liberase®, ce qui a permis d'augmenter le volume de perfusion, probablement au prix d'une dissociation de moins bonne qualité. Ce troisième prélèvement a permis l'isolement d'une faible quantité d'hépatocytes associée à une grande quantité d'hématies, probablement du fait d'une perfusion incomplète du prélèvement lors des étapes de préparation, ce qui n'a pas permis leur développement malgré leur mise en culture. La cause est probablement la cytotoxicité des substances relarguées lors de l'hémolyse et l'encombrement stérique des hématies gênant les contacts cellule-cellule et donc la formation d'un tapis cellulaire viable, homogène et organisé.

Concernant le patient 4-16121005, la digestion incomplète du prélèvement n°3 nous a incité à privilégier un fragment de plus petit volume (70 grammes) et à utiliser de nouveau la Liberase®. La difficulté résidait cette fois dans un choix plus limité de vaisseaux de bon calibre où placer nos canules, difficulté responsable une fois de plus d'une digestion de mauvaise qualité par la collagénase. En outre, bien que le cholangiocarcinome du patient était localisé, la dilatation des voies biliaires constatée lors de l'examen anatomopathologique touchait également le foie sain. Ces anomalies ont pu être à l'origine d'une moins bonne viabilité des hépatocytes en amont de la procédure d'isolement.

E. Culture cellulaire et transduction

1. Hépatocytes primaires humains

Les difficultés rencontrées lors de la procédure d'isolement des hépatocytes n'ont pas permis de répéter plusieurs fois les tentatives de transductions par nos lentivirus immortalisants C-myc et h-TERT. Afin de s'affranchir de l'étape d'isolement des PHH, un essai a cependant été réalisé sur des hépatocytes primaires humains obtenus auprès de la société Biopredic® (spécialisée dans l'isolement et la cryopréservation de cellules hépatocytaires). Bien que les concentrations en antibiotique étaient relativement faibles, l'étape de sélection des hépatocytes

transduits par la puromycine et/ou l'hygromycine a été responsable d'une importante mortalité cellulaire, soulignant une fois encore la grande fragilité de ces cellules en culture, et n'a donc pas permis l'obtention de cellules immortalisées à l'issue de cette procédure.

2. Lignée FLC4

Les cellules FLC4 transduites par le lentivirus pLenti-puro-NTCP à la MOI de 5 ont été placées sous pression de sélection constante pendant 30 jours par la puromcyine à la concentration de 3 µg/mL, permettant l'obtention d'une population cellulaire résistante à l'antibiotique. Ces cellules ont ensuite été cultivées en permanence à la concentration d'entretien plus faible de 1 µg/mL de puromycine afin d'éviter une dérive de la population cellulaire résistante au profit de cellules sensibles à la puromycine ayant perdu le transgène. Il n'a pas été réalisé de sélection clonale, les analyses ultérieures ont donc été effectuées sur une population cellulaire exprimant de manière hétérogène le récepteur NTCP. Une partie des cellules a été congelée dans l'azote liquide en milieu de cryoconservation (90 % SVF, 5 % DMSO, 5 % milieu DMEM complémenté) après avoir vérifié l'absence de contamination par des mycoplasmes.

F. Caractérisation des lignées cellulaires transduites

1. Contrôle de l'expression de la protéine d'intérêt

Les lysats cellulaires de cellules FLC4 résistantes à la puromycine ont été prétraités à la PNGase afin de déglycosyler le récepteur NTCP. Le marquage en immunoblot a mis en évidence une bande à 30 kilodalton, correspondant à la taille théorique attendue pour la protéine NTCP sous sa forme non glycosylée. Cette bande est absente pour les cellules FLC4 non transduites, et clairement présente pour notre population cellulaire de cellules FLC4 transduites et résistantes à la puromycine (**Figure 47**).

L'analyse des cellules au microscope à épifluorescence a permis de réaliser une estimation du nombre de cellules exprimant la protéine d'intérêt : sur 100 cellules marquées au DAPI, 70 cellules présentaient une fluorescence verte avec le marquage anti-NTCP (**Figure 48 A**). Parmi ces cellules, on observe de surcroît une hétérogénéité de l'intensité de fluorescence, et donc de l'expression du récepteur NTCP d'une cellule à l'autre. Ces observations s'expliquent par l'absence de sélection clonale de notre population cellulaire résistante à la puromycine, les niveaux d'expression observés semblaient toutefois suffisants pour réaliser une tentative d'infection. De plus, les cellules n'étant pas synchronisées au niveau de leur cycle cellulaire, il est possible que l'expression du récepteur NTCP varie en fonction de l'étape du

cycle dans laquelle se trouve chaque cellule. Une analyse plus fine au microscope confocal a permis de mettre en évidence une fluorescence majoritairement localisée au niveau membranaire, secondairement localisée au niveau cytoplasmique (**Figure 48 B**), en cohérence avec la localisation théorique d'un récepteur membranaire parfois détecté lors de son transit au sein de la cellule avant son adressage vers la membrane plasmique. L'analyse en immunofluorescence a été répétée au cours du temps, notamment après décongélation des cellules, avec des résultats comparables à ceux décrits précédemment même après plusieurs mois de culture.

L'ensemble de ces données nous a permis de mettre en évidence l'expression constitutive, durable et stable, bien qu'hétérogène, du récepteur NTCP dans la population de cellules FLC4 résistantes à la puromycine, confirmant l'établissement d'une lignée cellulaire FLC4-NTCP.

2. Évaluation de la susceptibilité vis-à-vis de l'infection par le VHB

La mesure de l'expression des ARN prégénomiques du VHB par technique de qRT-PCR en cellules HepG2-NTCP et FLC4-NTCP infectées a été réalisée en présence et en absence de myrcludex B (molécule inhibitrice du NTCP), à 3 jours, 5 jours et 10 jours après l'infection. L'expression des ARN viraux a été normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage HPRT, cette mesure a été répétée sur deux expériences indépendantes.

La quantité d'ARN prégénomique mesurée en cellules FLC4-NTCP était systématiquement plus élevée qu'en cellules HepG2-NTCP, et ce dès 3 jours post-infection. Les niveaux d'expressions en cellules FLC4-NTCP étaient respectivement, pour les trois temps de la cinétique, 5 fois, 2 fois, et 1,7 fois plus élevés que ceux mesurés en cellules HepG2-NTCP (**Figure 49**).

Si ces données confirment la susceptibilité à l'infection par le VHB de la lignée cellulaire FLC4-NTCP mise au point dans le cadre de notre projet, elles sont également en faveur d'un meilleur fitness des cellules FLC4 pour la réplication du VHB, pouvant expliquer une quantité d'ARN prégénomique synthétisée supérieure par rapport aux cellules HepG2-NTCP, un phénomène observé dès les premiers jours après infection.

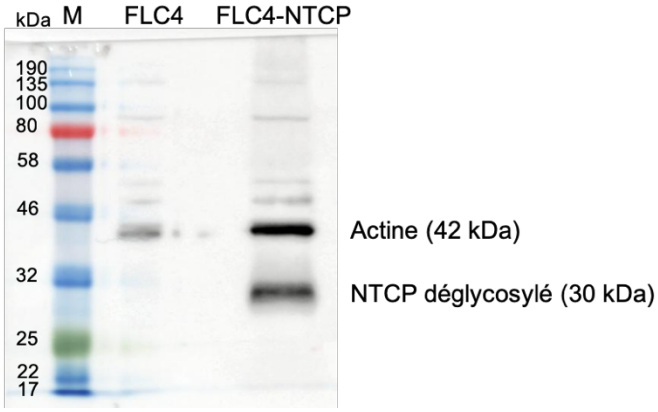

Figure 47 : Analyse en immunoblot de l'expression du récepteur NTCP en cellules FLC4
Le marquage primaire a été réalisé avec un anticorps lapin anti-NTCP, le marquage secondaire avec un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase. La détection de l'actine a permis de s'assurer du dépôt et de la migration correcte de nos lysats cellulaires

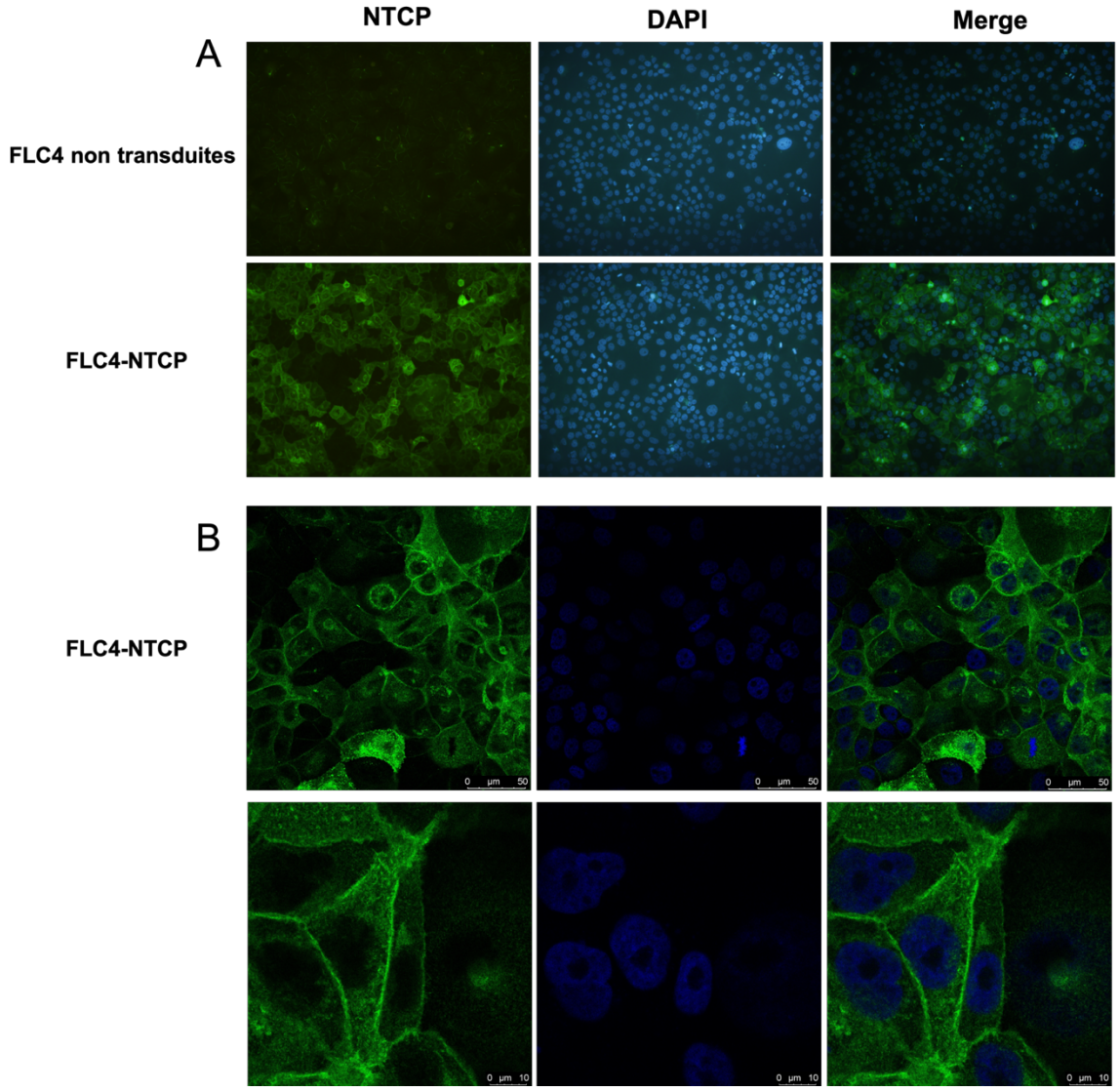

Figure 48: Analyse au microscope à épifluorescence (A) et au microscope confocal (B) de l'expression du récepteur NTCP en cellules FLC4

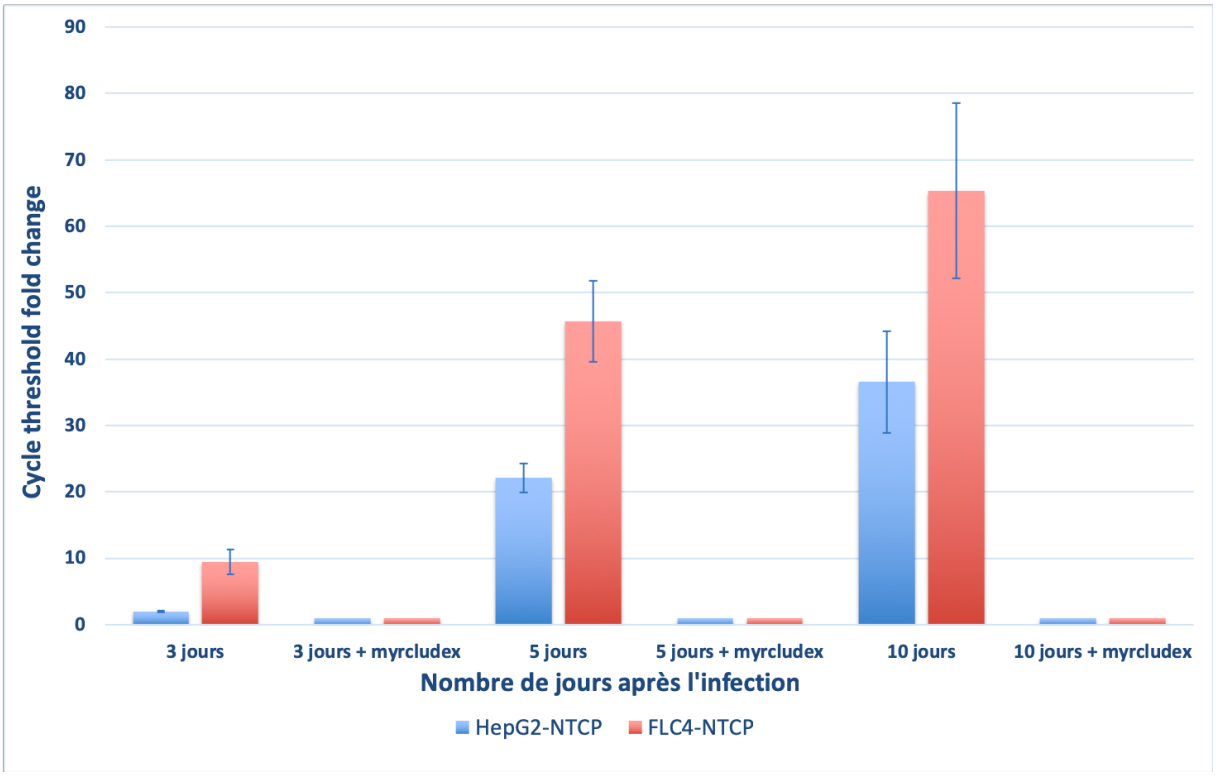

Figure 49 : Cinétique d'apparition et quantification de l'ARN prégénomique du VHB mesurées par qRT-PCR en cellules HepG2-NTCP et FLC4-NTCP infectées

Chaque échantillon a été analysé trois fois : les barres de l'histogramme représentent la moyenne et l'écart-type des valeurs mesurées pour chaque triplicata.

La valeur du « fold change » traduit la différence de niveau d'expression d'un même ARN entre deux conditions. Son calcul a été effectué par la différence entre la valeur du Cycle threshold (nombre de cycles pour franchir le seuil) de l'infection en l'absence myrcludex et la valeur du Ct de l'infection en présence de myrcludex. La valeur du « fold change » de la condition myrcludex a été arbitrairement fixée à 1. Un « fold change » à 4 pour la condition sans myrcludex signifie que l'ARN prégénomique s'exprime 4 fois plus par rapport à la condition avec myrcludex.

IV. Discussion

La mise au point de nouvelles thérapeutiques curatives ciblant le VHB ne sera possible que par une meilleure compréhension des différentes étapes de son cycle cellulaire. Cette méconnaissance persiste à l'heure actuelle du fait de l'absence de modèle d'étude animal ou cellulaire optimal. En particulier, les modèles cellulaires *in vitro* actuels, qu'ils soient utilisés pour des infections ou des transfections de génomes du VHB restent peu efficaces pour répliquer le virus sur de longues périodes (supérieures à quelques semaines). Ceci est directement lié au modèle utilisé dans certains cas (hépatocytes primaires), mais aussi au fait que ces systèmes *in vitro* de propagation ne sont pas optimaux pour la formation de l'ADNccc, un intermédiaire clé de la réplication virale mais aussi de la persistance (139). Bien que cela reste largement méconnu, dans le cas des lignées dérivées d'hépatocarcinome classiquement utilisées (HepG2, Huh7), la perte de différenciation est sûrement liée à la perte de facteurs strictement hépatocytaires clés pour la réplication du virus. L'objectif de notre étude était donc de mettre au point de nouvelles lignées cellulaires d'intérêt conservant un haut degré de différenciation et de ce fait plus aptes pour l'étude de l'infection par le VHB. Deux approches originales ont été développées : d'une part l'utilisation d'hépatocytes primaires humains (PHH) immortalisés ; d'autre part l'élaboration d'une lignée cellulaire FLC4 (certes dérivée d'hépatocarcinome mais présentant des caractéristiques phénotypiques proche d'un hépatocyte) exprimant de manière constitutive le récepteur NTCP.

La mise en place de notre première stratégie de préparation de PHH suivie d'un processus d'immortalisation a permis de mettre en évidence un certain nombre de facteurs limitants la concernant. Bien que décrits avec précision dans la littérature, les protocoles d'isolement des hépatocytes primaires demeurent des approches lourdes et complexes. La qualité comme la quantité de cellules obtenues dépend d'un grand nombre de facteurs comme ceux liés au patient (pathologie métabolique, prise de médicament hépatotoxique…), au prélèvement (état du foie en zone non tumorale, délai de prise en charge après exérèse…) ou à l'efficacité de la procédure de perfusion elle-même. Une première difficulté concerne la taille du prélèvement recoupé par le chirurgien : un fragment trop volumineux ne sera pas digéré entièrement par la collagénase, tandis qu'un fragment plus petit risque de présenter trop peu de vaisseaux de calibre suffisant et devient donc difficile à perfuser efficacement. Pour pallier le volume trop important du prélèvement, la recoupe au scalpel du fragment se heurte au risque de sectionner un gros vaisseau utilisable pour perfuser. Un autre facteur limitant est la qualité de la collagénase utilisée. La Liberase®, un cocktail enzymatique de qualité supérieure à une simple collagénase, se révèle bien plus coûteuse et limite de fait le volume d'enzyme perfusable

et donc le volume de foie à traiter. L'utilisation d'une collagénase simple a permis d'augmenter significativement le volume de la solution de perfusion, probablement au détriment d'une dissociation optimale. Les différentes étapes de perfusion sont également critiques, puisqu'il est difficile d'éviter les fuites et de réaliser une imperméabilisation de la face de résection du fragment. En effet, là où la capsule de Glisson rend imperméable la face postérieure du fragment, la face antérieure réséquée comporte les sections des gros vaisseaux, mais également celles des capillaires situés en distalité. De fait, un volume non négligeable de solution de perfusion, contenant ou non la collagénase dissoute, ne diffuse pas convenablement dans l'ensemble du prélèvement et est de ce fait perdu. L'utilisation d'une colle chirurgicale n'a pas permis de régler entièrement le problème d'étanchéité, son utilisation n'étant de surcroît pas recommandée en raison de la cytotoxicité induite par sa composition. Enfin, l'étape de purification au Percoll® est également apparue critique. Si celle-ci permet l'élimination des cellules mortes, elle réduit significativement la quantité d'hépatocytes isolés. Le fait d'avoir isolé avec succès des PHH lors de notre première tentative prouve cependant la faisabilité de ce protocole au CHRU de Tours. Le succès de sa mise en place, avec des tentatives fructueuses plus fréquentes, réside probablement dans la formation de personnel dédié pour ce type de protocole, ayant acquis une expérience suffisante pour réaliser chaque étape de manière optimale. Concernant l'immortalisation des hépatocytes, l'utilisation de vecteurs lentiviraux s'est révélée particulièrement délicate sur ces cellules d'une grande fragilité, bien que l'efficacité de tels vecteurs ait été vérifiée au préalable sur cellules Huh7. La transduction en elle-même est un processus occasionnant un stress cellulaire important, auquel il faut rajouter l'étape de sélection par antibiotique responsable d'une mortalité cellulaire élevée. Faute d'avoir pu répéter ce processus d'immortalisation, il est difficile d'établir précisément les raisons de cet échec n'ayant pas permis l'établissement de lignées. L'objectif de ces transductions était de court-circuiter les signaux de régulation négative du cycle cellulaire via la télomérase et C-myc, afin de réenclencher le processus de division cellulaire. Les facteurs explicatifs de cet échec sont potentiellement multiples : mauvaise efficacité de la transduction sur PHH par rapport aux Huh7, fragilité des cellules vis-à-vis des antibiotiques ou des lentivirus eux-mêmes, ou encore l'absence de reprise de la division cellulaire malgré une transduction efficace.

En comparaison de la première, notre seconde approche, plus simple dans sa conception, comportait beaucoup moins de variables à prendre en compte. L'efficacité de transduction d'un lentivirus dépend à la fois de la protéine que l'on cherche à exprimer et de la lignée cellulaire à transduire. En l'occurrence, le vecteur lentiviral pLenti-puro-NTCP utilisé sur cellules FLC4 fournissait un taux élevé de transduction, même pour des MOI faibles, ce qui a grandement facilité l'étape de sélection en puromycine et l'obtention d'une population résistante. L'expression constitutive du récepteur NTCP a été confirmée dans cette population

sélectionnée, une expression d'un niveau satisfaisant bien qu'hétérogène au regard de l'absence d'étape de sélection clonale. Cette hétérogénéité d'expression devra faire l'objet d'exploration, toutefois il est probable qu'elle soit en lien, d'une part avec une expression qui varie au cours du cycle cellulaire et d'autre part avec le fait que sans sélection clonale spécifique, les clones constituant notre lignée expriment différents niveaux de NTCP en relation directe avec l'intégration aléatoire des vecteurs lentiviraux dans le génome cellulaire. De plus, il est à noter qu'un niveau élevé d'expression du récepteur NTCP en surface des cellules n'est pas nécessairement prédictif d'une meilleure susceptibilité à l'infection, les quelques particules virales en cours d'entrée utilisant une fraction de la totalité des récepteurs. La maîtrise dans notre unité du protocole complexe d'infection par le VHB s'est justement révélée être une opportunité pour évaluer plus finement la susceptibilité de cette lignée exprimant le NTCP. Ceci a notamment permis d'étudier la propagation du virus dans un contexte plus proche de l'infection naturelle que la technique classique de transfection de plasmide codant pour le génome viral. Pour rappel, il n'existe à l'heure actuelle que deux lignées cellulaires identifiées comme infectables par le VHB *in vitro* : les hépatocytes primaires humains (avec toutes les limites que leur utilisation comporte) et la lignée HepG2-NTCP. Les résultats obtenus en qRT-PCR ont d'une part confirmé la susceptibilité de la lignée FLC4-NTCP à l'infection, d'autre part les niveaux d'expression de l'ARN prégénomique en cellule FLC4-NTCP se sont révélés significativement, et de façon reproductible, plus élevés que ceux obtenus en cellules HepG2-NTCP, laissant présager d'une plus grande susceptibilité à l'infection. La lignée FLC4-NTCP apparaît donc comme particulièrement intéressante, ce qu'il conviendra d'étayer par d'autres analyses. Il pourra notamment être intéressant d'évaluer l'impact dans la mise en place du cycle viral de la production de certains facteurs hépatocytaires produits spécifiquement dans cette lignée FLC4 (140). Si les résultats préliminaires obtenus sur une population hétérogène sont déjà intéressants, la sélection d'un clone cellulaire exprimant très fortement le NTCP pourrait permettre l'obtention d'une lignée particulièrement susceptible au VHB, tout en disposant d'un modèle standardisé assurant une meilleure reproductibilité expérimentale. En outre, la lignée HepG2-NTCP étant clonale, la comparaison des performances des deux lignées n'aura de sens que si l'on étudie un clone FLC4-NTCP. Si la susceptibilité de notre modèle à l'infection a été démontrée, sa capacité à produire et sécréter des virions complets et infectieux reste à confirmer. Ceci sera prochainement évalué par la réinfection de cellules FLC4-NTCP ou HepG2-NTCP naïves à l'aide de surnageants issus d'une première culture de cellules infectées. L'utilisation de virions infectieux à la place de la transfection de plasmide évite d'apporter aux cellules des copies de génome viral qui pourrait persister et interférer avec la détection de l'ADNccc. Rendu possible de ce fait, il sera opportun de quantifier la formation de l'ADNccc de façon comparative avec la lignée HepG2, la mise en évidence d'une différence pourrait

expliquer une réplication virale supérieure dans la lignée FLC4-NTCP. La mise en place de la technique de détection de l'ADNccc au sein de notre laboratoire apparaît donc comme une priorité. Une analyse ultrastructurale des cellules FLC4-NTCP en microscopie électronique à transmission semble également pertinente, elle pourrait permettre de détecter plus facilement des particules en formation dans la cellule infectée, ou faciliter l'étude des étapes d'entrée du virus dans la cellule. Enfin, il pourra être intéressant d'étudier la réplication virale sur le long terme, afin d'évaluer la persistance de l'infection au cours des passages successifs en culture. Ceci permettra également d'étudier un éventuel mécanisme d'adaptation du virus à la lignée FLC4-NTCP, à l'instar de ce que l'on a pu observer dans le passé avec le virus de l'hépatite C (141). Ce modèle de cellules infectées depuis une longue période de temps pourrait alors se rapprocher des hépatocytes chroniquement infectés *in vivo,* et constituer un système opportun dans la recherche de nouvelles approches thérapeutiques. Enfin, il est à noter que la facilité de culture (dissociation cellulaire non nécessaire au moment des passages) et les propriétés optiques des cellules FLC4-NTCP (des cellules fines formant un tapis cellulaire plan et homogène) en font un modèle de choix pour la réalisation d'immunofluorescence permettant une analyse précise de la localisation subcellulaire des composants viraux en microscopie confocale, par opposition aux HepG2-NTCP dont la croissance génère en culture des agglomérats de cellules qui rendent difficiles ces analyses.

L'obtention d'une nouvelle lignée cellulaire FLC4-NTCP infectable *in vitro* représente une avancée significative, dans le contexte actuel de carence en modèles d'étude du VHB. Elle ouvre de nombreuses perspectives en raison de sa simplicité de mise en œuvre et des avancées potentielles qu'elle laisse entrevoir. La mise au point de nouveaux modèles d'étude représente un enjeu majeur de la lutte contre le VHB, pour mieux comprendre son cycle dans la cellule infectée et dans l'optique de la mise au point de thérapeutiques innovantes.

Bibliographie

1. Dill JA, Camus AC, Leary JH, Giallonardo FD, Holmes EC, Ng TFF. Distinct Viral Lineages from Fish and Amphibians Reveal the Complex Evolutionary History of Hepadnaviruses. J Virol. 2016 Sep 1;90(17):7920–33.

2. Lauber C, Seitz S, Mattei S, Suh A, Beck J, Herstein J, et al. Deciphering the Origin and Evolution of Hepatitis B Viruses by Means of a Family of Non-enveloped Fish Viruses. Cell Host Microbe. 2017 Sep 13;22(3):387-399.e6.

3. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. J Med Virol. 2008;80(1):27–46.

4. Kostaki E-G, Karamitros T, Stefanou G, Mamais I, Angelis K, Hatzakis A, et al. Unravelling the history of hepatitis B virus genotypes A and D infection using a full-genome phylogenetic and phylogeographic approach. eLife. 2018 Aug 7;7:e36709.

5. Liang TJ. Hepatitis B: The Virus and Disease. Hepatol Baltim Md. 2009 May;49(5 Suppl):S13–21.

6. Meredith LW, Hu K, Cheng X, Howard CR, Baumert TF, Balfe P, et al. Lentiviral hepatitis B pseudotype entry requires sodium taurocholate co-transporting polypeptide and additional hepatocyte-specific factors. J Gen Virol. 2016 Jan;97(1):121–7.

7. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. N Engl J Med. 2004 Mar 11;350(11):1118–29.

8. Yang C-C, Huang E-Y, Li H-C, Su P-Y, Shih C. Nuclear Export of Human Hepatitis B Virus Core Protein and Pregenomic RNA Depends on the Cellular NXF1-p15 Machinery. Vol. 9. 2014. e106683 p.

9. Rydell GE, Prakash K, Norder H, Lindh M. Hepatitis B surface antigen on subviral particles reduces the neutralizing effect of anti-HBs antibodies on hepatitis B viral particles in vitro. Virology. 2017;509:67–70.

10. Stephenne J. Development and production aspects of a recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine. Vaccine. 1990 Mar;8 Suppl:S69-73; discussion S79-80.

11. Slagle BL, Andrisani OM, Bouchard MJ, Lee CGL, Ou J-HJ, Siddiqui A. Technical standards for hepatitis B virus X protein (HBx) research. Hepatol Baltim Md. 2015 Apr;61(4):1416–24.

12. Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia M-A. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. Pathol Biol (Paris). 2010 Aug;58(4):267–72.

13. Kim C-H. Hidden secret in hepatitis B viral X protein mutation and hypoxia-inducible factor-1α in hepatocarcinoma cancer. Hepatobiliary Surg Nutr. 2014 Jun;3(3):115–7.

14. Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, Heydmann L, Weiss A, Renaud M, et al. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. Hepatol Baltim Md. 2016 Jan;63(1):35–48.

15. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. eLife. 2012 Nov 13;1:e00049–e00049.

16. Ji M, Hu K. Recent advances in the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. Virol Sin. 2017 Dec;32(6):454–64.

17. Patient R, Hourioux C, Roingeard P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. Cell Microbiol. 2009 Nov;11(11):1561–70.

18. Caballero A, Tabernero D, Buti M, Rodriguez-Frias F. Hepatitis B virus: The challenge of an ancient virus with multiple faces and a remarkable replication strategy. Antiviral Res. 2018 Oct;158:34–44.

19. Alter HJ. The road not taken or how I learned to love the liver: a personal perspective on hepatitis history. Hepatol Baltim Md. 2014 Jan;59(1):4–12.

20. Blumberg BS, Alter HJ. A New Antigen in Leukemia Sera. JAMA. 1965 Feb 15;191(7):541–6.

21. Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1968 Jul;60(3):814–21.

22. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet Lond Engl. 1970 Apr 4;1(7649):695–8.

23. Maupas P, Chiron JP, Barin F, Coursaget P, Goudeau A, Perrin J, et al. Efficacy of hepatitis B vaccine in prevention of early HBsAg carrier state in children. Controlled trial in an endemic area (Senegal). Lancet Lond Engl. 1981 Feb 7;1(8215):289–92.

24. Zheng Y, Lu Y, Ye Q, Xia Y, Zhou Y, Yao Q, et al. Should chronic hepatitis B mothers breastfeed? a meta analysis. BMC Public Health. 2011 Jun 27;11:502.

25. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. Hepatol Baltim Md. 2009 Sep;50(3):661–2.

26. Arankalle VA, Gandhi S, Lole KS, Chadha MS, Gupte GM, Lokhande MU. An outbreak of hepatitis B with high mortality in India: association with precore, basal core promoter mutants and improperly sterilized syringes. J Viral Hepat. 2011 Apr;18(4):e20-28.

27. Thompson ND, Perz JF, Moorman AC, Holmberg SD. Nonhospital health care-associated hepatitis B and C virus transmission: United States, 1998-2008. Ann Intern Med. 2009 Jan 6;150(1):33–9.

28. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. Vaccine. 2012 Mar 9;30(12):2212–9.

29. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. J Viral Hepat. 2004 Mar;11(2):97–107.

30. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet Lond Engl. 2012 Dec 15;380(9859):2095–128.

31. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000--summary of a workshop. Gastroenterology. 2001 Jun;120(7):1828–53.

32. Previsani N, Lavanchy D. Hepatitis B. Geneva: Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. Ed Organ WH World Health Organ. 2002;

33. Liang X, Bi S, Yang W, Wang L, Cui G, Cui F, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China--declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination. Vaccine. 2009 Nov 5;27(47):6550–7.

34. Kowdley KV, Wang CC, Welch S, Roberts H, Brosgart CL. Prevalence of chronic hepatitis B among foreign-born persons living in the United States by country of origin. Hepatol Baltim Md. 2012 Aug;56(2):422–33.

35. Marschall T, Kretzschmar M, Mangen M-JJ, Schalm S. High impact of migration on the prevalence of chronic hepatitis B in the Netherlands. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2008;20(12).

36. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394–424.

37. Chang M-H, You S-L, Chen C-J, Liu C-J, Lai M-W, Wu T-C, et al. Long-term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer. Gastroenterology. 2016;151(3):472-480.e1.

38. Lin C-L, Kao J-H. Hepatitis B virus genotypes and variants. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 May 1;5(5):a021436.

39. Peiffer K-H, Kuhnhenn L, Jiang B, Mondorf A, Vermehren J, Knop V, et al. Divergent preS Sequences in Virion-Associated Hepatitis B Virus Genomes and Subviral HBV Surface Antigen Particles From HBV e Antigen-Negative Patients. J Infect Dis. 2018 Jun 5;218(1):114–23.

40. Lau JY, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. Lancet Lond Engl. 1993 Nov 27;342(8883):1335–40.

41. Kao J-H, Chen P-J, Lai M-Y, Chen D-S. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. Gastroenterology. 2003 Feb;124(2):327–34.

42. Fan YF, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT, et al. Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. Hepatol Baltim Md. 2001 Jan;33(1):277–86.

43. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. Annu Rev Nutr. 1996;16:179–203.

44. Allen JW, Khetani SR, Bhatia SN. In vitro zonation and toxicity in a hepatocyte bioreactor. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2005 Mar;84(1):110–9.

45. Désert R, Rohart F, Canal F, Sicard M, Desille M, Renaud S, et al. Human hepatocellular carcinomas with a periportal phenotype have the lowest potential for early recurrence after curative resection. Hepatology. 2017;66(5):1502–18.

46. Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2001;49 Suppl 1:S7-11.

47. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. World J Gastroenterol. 2006 Dec 14;12(46):7413–20.

48. Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Sep;41(8–9):1639–42.

49. Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. Stem/Progenitor Cells in Liver Development, Homeostasis, Regeneration, and Reprogramming. Cell Stem Cell. 2014 May 1;14(5):561–74.

50. Meier PJ, Sztul ES, Reuben A, Boyer JL. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. J Cell Biol. 1984 Mar;98(3):991–1000.

51. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. Science. 1999 Apr 30;284(5415):825–9.

52. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. J Virol. 2005 Aug;79(15):9369–80.

53. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. Gut. 2009 Jul 1;58(7):974–82.

54. Revill P, Yuan Z. New insights into how HBV manipulates the innate immune response to establish acute and persistent infection. Antivir Ther. 2013;18(1):1–15.

55. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 2000 Mar;64(1):51–68.

56. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, et al. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. J Immunol Baltim Md 1950. 1990 Nov 15;145(10):3442–9.

57. Asabe S, Wieland SF, Chattopadhyay PK, Roederer M, Engle RE, Purcell RH, et al. The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. J Virol. 2009 Oct;83(19):9652–62.

58. Lee JY, Chae DW, Kim SM, Nam ES, Jang MK, Lee JH, et al. Expression of FasL and perforin/granzyme B mRNA in chronic hepatitis B virus infection. J Viral Hepat. 2004 Mar;11(2):130–5.

59. Wieland SF, Eustaquio A, Whitten-Bauer C, Boyd B, Chisari FV. Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 12;102(28):9913–7.

60. Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. Characterization of Nuclear RNases That Cleave Hepatitis B Virus RNA near the La Protein Binding Site. J Virol. 2001 Aug;75(15):6874–83.

61. Burton DR, Williamson RA, Parren PW. Antibody and virus: binding and neutralization. Virology. 2000 Apr 25;270(1):1–3.

62. Schilling R, Ijaz S, Davidoff M, Lee JY, Locarnini S, Williams R, et al. Endocytosis of Hepatitis B Immune Globulin into Hepatocytes Inhibits the Secretion of Hepatitis B Virus Surface Antigen and Virions. J Virol. 2003 Aug;77(16):8882–92.

63. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. Hepatol Baltim Md. 2003 Nov;38(5):1188–98.

64. Marrone G, Shah VH, Gracia-Sancho J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. J Hepatol. 2016;65(3):608–17.

65. Zhan S-S, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. Hepatol Baltim Md. 2006 Mar;43(3):435–43.

66. Zhao L-H, Liu X, Yan H-X, Li W-Y, Zeng X, Yang Y, et al. Genomic and oncogenic preference of HBV integration in hepatocellular carcinoma. Nat Commun. 2016 Oct 5;7:12992–12992.

67. Kekulé AS, Lauer U, Weiss L, Luber B, Hofschneider PH. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. Nature. 1993 Feb 1;361(6414):742–5.

68. Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. Cancer Sci. 2006 Oct;97(10):977–83.

69. Iavarone M, Trabut J-B, Delpuech O, Carnot F, Colombo M, Kremsdorf D, et al. Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and non-tumour liver cells using laser capture microdissection. J Hepatol. 2003 Aug;39(2):253–61.

70. Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. Virology. 1996 Nov 1;225(1):235–9.

71. Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, et al. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Oct;84(19):6909–13.

72. McMahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. Semin Liver Dis. 2005;25 Suppl 1:3–8.

73. Sharma SK, Saini N, Chwla Y. Hepatitis B Virus: Inactive carriers. Virol J. 2005 Sep 28;2:82.

74. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000--summary of a workshop. Gastroenterology. 2001 Jun;120(7):1828–53.

75. Hsu Y-S, Chien R-N, Yeh C-T, Sheen I-S, Chiou H-Y, Chu C-M, et al. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatology. 2002;35(6):1522–7.

76. Huo TI, Wu JC, Lee PC, Chau GY, Lui WY, Tsay SH, et al. Sero-clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. Hepatol Baltim Md. 1998 Jul;28(1):231–6.

77. Bréchot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Bréchot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely “occult”? Hepatol Baltim Md. 2001 Jul;34(1):194–203.

78. Raimondo G, Allain J-P, Brunetto MR, Buendia M-A, Chen D-S, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2008 Oct 1;49(4):652–7.

79. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. Hepatol Baltim Md. 1996 Aug;24(2):289–93.

80. Chang PE, Goh GB-B, Ngu JH, Tan HK, Tan CK. Clinical applications, limitations and future role of transient elastography in the management of liver disease. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2016 Feb 6;7(1):91–106.

81. Leroy V, Sturm N, Faure P, Trocme C, Marlu A, Hilleret M-N, et al. Prospective evaluation of FibroTest®, FibroMeter®, and HepaScore® for staging liver fibrosis in chronic hepatitis B: Comparison with hepatitis C. J Hepatol. 2014 Jul 1;61(1):28–34.

82. Chen C-J, Yang H-I, Su J, Jen C-L, You S-L, Lu S-N, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. JAMA. 2006 Jan 4;295(1):65–73.

83. Lin C-L, Kao J-H. Hepatitis B viral factors and treatment responses in chronic hepatitis B. J Formos Med Assoc. 2013 Jun 1;112(6):302–11.

84. Tseng T-C, Liu C-J, Yang H-C, Su T-H, Wang C-C, Chen C-L, et al. Determinants of spontaneous surface antigen loss in hepatitis B e antigen-negative patients with a low viral load. Hepatol Baltim Md. 2012 Jan;55(1):68–76.

85. Lee M-H, Yang H-I, Liu J, Batrla-Utermann R, Jen C-L, Iloeje UH, et al. Prediction models of long-term cirrhosis and hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B patients: risk scores integrating host and virus profiles. Hepatol Baltim Md. 2013 Aug;58(2):546–54.

86. Liu C-J, Chen B-F, Chen P-J, Lai M-Y, Huang W-L, Kao J-H, et al. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. J Infect Dis. 2006 May 1;193(9):1258–65.

87. Hu H-H, Liu J, Lin Y-L, Luo W-S, Chu Y-J, Chang C-L, et al. The rs2296651 (S267F) variant on NTCP (SLC10A1) is inversely associated with chronic hepatitis B and progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. Gut. 2016;65(9):1514–21.

88. Pfefferkorn M, Böhm S, Schott T, Deichsel D, Bremer CM, Schröder K, et al. Quantification of large and middle proteins of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) as a novel tool for the identification of inactive HBV carriers. Gut. 2018 Nov 1;67(11):2045–53.

89. Organization WH. Global hepatitis report 2017. World Health Organization; 2017.

90. Chang M-H, Chen D-S. Prevention of hepatitis B. Cold Spring Harb Perspect Med. 5(3):a021493–a021493.

91. Aslam A, Campoverde Reyes KJ, Malladi VR, Ishtiaq R, Lau DTY. Management of chronic hepatitis B during pregnancy. Gastroenterol Rep. 2018 Nov;6(4):257–62.

92. Lampertico P, Agarwal K, Berg T, Buti M, Janssen HLA, Papatheodoridis G, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2017 Aug 1;67(2):370–98.

93. Terrault NA, Bzowej NH, Chang K-M, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH, et al. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. Hepatol Baltim Md. 2016 Jan;63(1):261–83.

94. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HLY, Chen CJ, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. Hepatol Int. 2016 Jan;10(1):1–98.

95. Kim G-A, Lim Y-S, An J, Lee D, Shim JH, Kim KM, et al. HBsAg seroclearance after nucleoside analogue therapy in patients with chronic hepatitis B: clinical outcomes and durability. Gut. 2014 Aug;63(8):1325–32.

96. Janssen HLA, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, et al. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic

hepatitis B: a randomised trial. Lancet Lond Engl. 2005 Jan 8;365(9454):123–9.

97. Lampertico P, Vigano M, Di Costanzo GG, Sagnelli E, Fasano M, Di Marco V, et al. Randomised study comparing 48 and 96 weeks peginterferon α-2a therapy in genotype D HBeAg-negative chronic hepatitis B. Gut. 2013 Feb;62(2):290–8.

98. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, et al. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. Hepatol Baltim Md. 2009 May;49(5):1503–14.

99. Murakami E, Wang T, Park Y, Hao J, Lepist E-I, Babusis D, et al. Implications of efficient hepatic delivery by tenofovir alafenamide (GS-7340) for hepatitis B virus therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(6):3563–9.

100. Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. Lancet Lond Engl. 2013 Feb 9;381(9865):468–75.

101. Lai C-L, Yuen M-F. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma with antiviral therapy. Hepatol Baltim Md. 2013 Jan;57(1):399–408.

102. Marcellin P, Ahn SH, Ma X, Caruntu FA, Tak WY, Elkashab M, et al. Combination of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Peginterferon α-2a Increases Loss of Hepatitis B Surface Antigen in Patients With Chronic Hepatitis B. Gastroenterology. 2016 Jan;150(1):134-144.e10.

103. Bourlière M, Rabiega P, Ganne-Carrie N, Serfaty L, Marcellin P, Barthe Y, et al. Effect on HBs antigen clearance of addition of pegylated interferon alfa-2a to nucleos(t)ide analogue therapy versus nucleos(t)ide analogue therapy alone in patients with HBe antigen-negative chronic hepatitis B and sustained undetectable plasma hepatitis B virus DNA: a randomised, controlled, open-label trial. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2017;2(3):177–88.

104. Zhou K, Terrault N. Management of hepatitis B in special populations. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2017 Jun;31(3):311–20.

105. Schinazi RF, Ehteshami M, Bassit L, Asselah T. Towards HBV curative therapies. Liver Int Off J Int Assoc Study Liver. 2018;38 Suppl 1:102–14.

106. Seto W-K, Yuen M-F. New pharmacological approaches to a functional cure of hepatitis B. Clin Liver Dis. 2016;8(4):83–8.

107. Kennedy EM, Kornepati AVR, Cullen BR. Targeting hepatitis B virus cccDNA using CRISPR/Cas9. Antiviral Res. 2015 Nov 1;123:188–92.

108. Bloom K, Maepa MB, Ely A, Arbuthnot P. Gene Therapy for Chronic HBV-Can We Eliminate cccDNA? Genes. 2018 Apr 12;9(4):207.

109. Loomba R, Liang TJ. Hepatitis B Reactivation Associated With Immune Suppressive and Biological Modifier Therapies: Current Concepts, Management Strategies, and Future Directions. Gastroenterology. 2017;152(6):1297–309.

110. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. Lancet Lond Engl. 2011 Jul 2;378(9785):73–85.

111. Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, et al. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised,

double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. Lancet Infect Dis. 2015 Oct;15(10):1167–74.

112. Koziel MJ, Peters MG. Viral Hepatitis in HIV Infection. N Engl J Med. 2007 Apr 5;356(14):1445–54.

113. Bonacini M, Louie S, Bzowej N, Wohl AR. Survival in patients with HIV infection and viral hepatitis B or C: a cohort study. AIDS Lond Engl. 2004 Oct 21;18(15):2039–45.

114. Pol S, Haour G, Fontaine H, Dorival C, Petrov-Sanchez V, Bourliere M, et al. The negative impact of HBV/HCV coinfection on cirrhosis and its consequences. Aliment Pharmacol Ther. 2017;46(11–12):1054–60.

115. Chen G, Wang C, Chen J, Ji D, Wang Y, Wu V, et al. Hepatitis B reactivation in hepatitis B and C coinfected patients treated with antiviral agents: A systematic review and meta-analysis. Hepatol Baltim Md. 2017;66(1):13–26.

116. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. Nat Genet. 2015 May;47(5):505–11.

117. Möröy T, Marchio A, Etiemble J, Trépo C, Tiollais P, Buendia MA. Rearrangement and enhanced expression of c-myc in hepatocellular carcinoma of hepatitis virus infected woodchucks. Nature. 1986 Nov 20;324(6094):276–9.

118. Sun S, Li J. Humanized chimeric mouse models of hepatitis B virus infection. Int J Infect Dis. 2017 Jun 1;59:131–6.

119. Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, Acs G. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. J Virol. 1988 Aug;62(8):2836–44.

120. Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, et al. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Aug;41(8):1715–20.

121. Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, et al. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jan 17;443(3):808–13.

122. Laurent T, Murase D, Tsukioka S, Matsuura T, Nagamori S, Oda H. A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the three-dimensional cell shape. J Cell Physiol. 2012 Jul;227(7):2898–906.

123. Kato R, Shigemoto K, Akiyama H, Ieda A, Ijiri Y, Hayashi T. Human hepatocarcinoma functional liver cell-4 cell line exhibits high expression of drug-metabolizing enzymes in three-dimensional culture. Biol Pharm Bull. 2014;37(11):1782–7.

124. Arad U, Axelrod J, Ben-nun-Shaul O, Oppenheim A, Galun E. Hepatitis B virus enhances transduction of human hepatocytes by SV40-based vectors. J Hepatol. 2004 Mar;40(3):520–6.

125. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15655–60.

126. Walter E, Keist R, Niederöst B, Pult I, Blum HE. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. Hepatol Baltim Md. 1996 Jul;24(1):1–5.

127. Thomas E, Liang TJ. Experimental models of hepatitis B and C - new insights and progress. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2016;13(6):362–74.

128. Xiang C, Du Y, Meng G, Soon Yi L, Sun S, Song N, et al. Long-term functional maintenance of primary human hepatocytes in vitro. Science. 2019 Apr 26;364(6438):399.

129. Rennert K, Steinborn S, Gröger M, Ungerböck B, Jank A-M, Ehgartner J, et al. A microfluidically perfused three dimensional human liver model. Biomaterials. 2015 Dec;71:119–31.

130. Eva R, Bram DC, Joery DK, Tamara V, Geert B, Vera R, et al. Strategies for immortalization of primary hepatocytes. J Hepatol. 2014 Oct;61(4):925–43.

131. Gil J, Kerai P, Lleonart M, Bernard D, Cigudosa JC, Peters G, et al. Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. Cancer Res. 2005 Mar 15;65(6):2179–85.

132. Kitani H, Sakuma C, Takenouchi T, Sato M, Yoshioka M, Yamanaka N. Establishment of c-myc-immortalized Kupffer cell line from a C57BL/6 mouse strain. Results Immunol. 2014 Aug 23;4:68–74.

133. Tsuruga Y, Kiyono T, Matsushita M, Takahashi T, Kasai H, Matsumoto S, et al. Establishment of immortalized human hepatocytes by introduction of HPV16 E6/E7 and hTERT as cell sources for liver cell-based therapy. Cell Transplant. 2008;17(9):1083–94.

134. Hayer A, Shao L, Chung M, Joubert L-M, Yang HW, Tsai F-C, et al. Engulfed cadherin fingers are polarized junctional structures between collectively migrating endothelial cells. Nat Cell Biol. 2016 Dec;18(12):1311–23.

135. Cheng Z, Gong Y, Ma Y, Lu K, Lu X, Pierce LA, et al. Inhibition of BET bromodomain targets genetically diverse glioblastoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2013 Apr 1;19(7):1748–59.

136. Lee SML, Schelcher C, Demmel M, Hauner M, Thasler WE. Isolation of human hepatocytes by a two-step collagenase perfusion procedure. J Vis Exp JoVE. 2013 Sep 3;(79).

137. Kegel V, Deharde D, Pfeiffer E, Zeilinger K, Seehofer D, Damm G. Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells. J Vis Exp JoVE. 2016 Mar 30;(109):e53069.

138. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101–8.

139. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. Gut. 2015 Dec;64(12):1972–84.

140. Kosuge M, Takizawa H, Maehashi H, Matsuura T, Matsufuji S. A comprehensive gene expression analysis of human hepatocellular carcinoma cell lines as components of a bioartificial liver using a radial flow bioreactor. Liver Int. 2007 Feb 1;27(1):101–8.

141. Kaul A, Wörz I, Bartenschlager R. Adaptation of the hepatitis C virus to cell culture. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2009;510:361–72.

Vu, le Directeur de Thèse

Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le

Sébastien EYMIEUX

116 pages – 6 tableaux – 49 figures

Résumé :

Le virus de l'hépatite B (VHB) est un agent infectieux d'importance majeure en pathologie humaine. Du fait de la persistance d'ADN super-enroulé (ADNccc) dans les hépatocytes infectés, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant une guérison complète et définitive de l'infection. La mise au point de nouvelles thérapeutiques passe par une meilleure compréhension du cycle viral, notamment l'étape de formation de l'ADNccc. L'absence de modèle d'étude optimal *in vitro* a motivé ce projet, qui consistait en la mise au point de lignées cellulaires innovantes au travers de deux stratégies de transduction par un vecteur lentiviral : la première par l'immortalisation d'hépatocytes primaires humains via les oncogènes C-myc et h-TERT, la seconde par l'élaboration de cellules FLC4 exprimant le récepteur NTCP du VHB afin de les rendre infectables par le virus. L'obtention d'hépatocytes primaires humains via l'activité de chirurgie hépatique a été permise grâce à la mise en place du protocole « Hepaprim ».

La complexité de la procédure d'isolement des hépatocytes, ainsi que leur grande fragilité lors des étapes de transduction, se sont révélées des facteurs limitants pour l'obtention de cellules immortalisées. L'obtention d'hépatocytes primaires humains lors de notre première tentative confirme cependant la faisabilité de ce protocole au CHRU de Tours.

Notre seconde stratégie a permis la mise au point d'une lignée FLC4-NTCP. La caractérisation de cette lignée, notamment par la détection du génome du virus en intracellulaire après infection *in vitro*, a confirmé sa capacité à être infectée par le VHB. Les valeurs des paramètres d'infection mesurés étaient supérieures, en termes de rendement et de cinétique, à celles obtenues sur la lignée standard HepG2-NTCP. L'obtention d'une nouvelle lignée infectable par le VHB représente une avancée significative vers une meilleure compréhension de son cycle.

Mots clés : VHB, modèles cellulaires, foie, hépatocytes primaires humains, C-myc, h-TERT, FLC4, NTCP, lentivirus, immortalisation, infection *in vitro*

Jury :

Président du jury : Professeur Philippe ROINGEARD

Directeur de thèse : Professeur Christophe HOURIOUX

Membres du jury : Professeur Catherine GAUDY-GRAFFIN
Professeur Gilles THIBAULT
Docteur Louis D'ALTEROCHE
Docteur Fanny DUJARDIN

Date de soutenance : 27 septembre 2019