

Année 2020/2021

N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Tristan FOUCAULT

Né le 04 février 1989 à Tours (37)

Exploration des échecs de traitement de l'hépatite B au ténofovir

Présentée et soutenue publiquement le 19 mai 2021 devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeure Catherine GAUDY-GRAFFIN, Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière, Faculté de Médecine - Tours

Membres du Jury :

Professeur Denys BRAND, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie - Tours

Professeur Christophe HOURIOUX, Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine - Tours

Professeur Gilles PAINAUD, Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique, CHU – Tours

Directeur de thèse : Docteur Julien MARLET, Laboratoire de Microbiologie, AHU, Faculté de pharmacie - Tours

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 VOUREC'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 Gilles BODY
Pr Jacques CHANDENIER
Pr Alain CHANTEPIE
Pr Philippe COLOMBAT
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr Pascal DUMONT
Pr Dominique GOGA
Pr Gérard LORETTE
Pr Dominique PERROTIN
Pr Roland QUENTIN

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – C. BARTHELEMY – 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 – P. COSNAY – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN
– J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUDEAU – J.L. GUILMOT – N. HUTEN
– M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – AM.
LEHR-DRYLEWICZ – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ –
J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – D.
ROYERE – A. SAINDELLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

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
BERHOUE Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
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
BOURGUIGNON Thierry	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
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
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
EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan	Médecine intensive – 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
GUILLON Antoine	Médecine intensive – réanimation
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
HAILLLOT 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 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
ZEMMOURA Ilyess	Neurochirurgie

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

AUDEMARD-VERGER Alexandra	Médecine interne
BARBIER Louise	Chirurgie digestive
BINET Aurélien	Chirurgie infantile
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-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
LEGRAS Antoine.....	Chirurgie thoracique
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

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....	Neurosciences
NICOGLLOU Antonine.....	Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald.....	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile.....	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

BARBEAU Ludivine.....	Médecine Générale
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

Aux membres du Jury :

Je remercie Mme. la Professeure Catherine GAUDY-GRAFFIN, de me faire l'honneur de présider cette thèse. Merci également de m'avoir accueilli dans votre service, j'y ai passé 5 mois enrichissant.

À M. le Professeur Denys BRAND et M. le Professeur Christophe HOURIOUX, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

À M. le Professeur Gilles PAINAUD, je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de ce jury. Merci également de m'avoir accueilli dans votre service.

À M. le Docteur Julien MARLET, je te remercie chaleureusement d'avoir dirigé cette thèse. Ta bienveillance, tes conseils et ta disponibilité, malgré le contexte, a été un moteur pour la rédaction de ce manuscrit. Honnêtement, ce n'était pas gagné !

Je remercie également Mme. la Docteure Marie-Claude GAGNIEU, pour avoir gracieusement participé à ce travail.

À mes co-internes :

À Coco, Brice, les Thomas, OLT, Wayne, Victor, Lisa, Romane, Anne, Joey et Camille, Clément. Ces années d'internat ont été un réel plaisir à vos côtés.
Aux autres internes, plus ou moins jeunes, notamment Nadège.

Mention spéciale pour Hugo, ce 1^{er} semestre a été l'occasion d'une belle rencontre, en dépit de tout le reste ! Passe faire un coucou à notre fils de temps en temps.

À mes amis :

À Baba, Clem', Mot', Lolo et Wass. La place manque pour dire tout le bien que je pense de vous tous. J'espère que vous serez là pour encore longtemps ! Je vous aime mes boloss' !

À la bande de Blois-Ghetto. Nico, Dam's, Mathéo, Farf, Victow, Beubeu, John, Croustimiel, Gab', Cess, Lisa, Pauline. Ces années de jeunesse blésoise ont été bien folles avec vous ! Même si je fais souvent le mort, je pense toujours à vous. Promis, j'essaierai de m'améliorer !

À la bande Tourangelle. Bobo et Emma, JB et Manu, Camille et Simon, Dave et Pauline, Pony, Bendoo, Max, Martin, Quentin et Lothie, Manon, Pierrot, PA, Laurianne (avec 2 n s'il-vous-plait), les Rémi, Vanal'. Que d'années de bamboches et de rigolades entre coupaings ! Passer ce temps ensemble a été un vrai kiff. La douceur tourangelle, c'est grâce à vous !

Et enfin, à Papa et Maman, pour votre soutien et votre confiance inébranlable pendant mes études (et elles furent longues !), les mots me manquent. Vous êtes les meilleurs !

Résumé

Introduction : L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) reste un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale avec une mortalité estimée à 887 000 décès par an. Aujourd'hui, le traitement de référence repose sur l'utilisation d'analogues nucléosidiques ou nucléotidiques (NA) tel l'entécavir (ETV) ou le ténofovir (TFV) en 1^{ère} intention. Concernant le ténofovir, aucune mutation de résistance spécifique n'a été retrouvée à ce jour, pourtant des patients en situation d'échec de traitement ont été rapportés. Nous supposons l'existence de sous-populations virales résistantes au médicament, mais qui ne seraient pas détectées par les techniques de séquençage Sanger. L'objectif de ce travail consiste en une étude rétrospective des patients infectés par le VHB et en situation d'échec thérapeutique par le ténofovir.

Matériel et méthodes : Les patients inclus étaient en échec de traitement avec le ténofovir et avaient bénéficié dans le cadre du soin courant d'un séquençage Sanger de la polymérase du VHB (Pol/RT) à la recherche de mutations de résistance. Rétrospectivement, la diversité virale chez ces patients a été étudiée par séquençage profond avec la technologie MiSeq (Illumina, San Diego, USA) et l'observance a été évaluée par suivi pharmacologique.

Résultats : Sur un total de 110 génotypes de résistances du VHB, 10 échantillons ont été associés à un échec de traitement au ténofovir. Quatre patients ont été exclus à cause d'une mauvaise observance connue et les sept autres ont été inclus. Une évolution de la diversité virale au sein de la polymérase pendant le traitement par ténofovir a été mise en évidence pour deux patients. Une caractérisation phénotypique de ces mutations pourrait permettre d'évaluer leur potentiel impact sur le niveau de résistance au ténofovir.

Mots-clés : Hépatite B (VHB), résistance, génotype, ténofovir.

Abstract

Introduction: Infection by the hepatitis B virus (HBV) is a major health problem worldwide, with around 887 000 deaths each year. The first-line treatment regimen is based on nucleos(t)idic analogs (NUCs) such as entecavir or tenofovir. No mutation conferring a resistance against tenofovir has been observed yet, however there have been reports of patients with tenofovir failure. We hypothesized the existence of quasispecies which are resistant to treatment but are not detected by Sanger sequencing. This work's objective is a retrospective study of patients infected by HBV and experiencing tenofovir treatment failure.

Material and methods: Patients experiencing treatment failure with tenofovir were included. They received routine quantification of HBV viral load and a genotypic resistance testing of the HBV polymerase by Sanger sequencing. Retrospectively, viral diversity was explored using deep sequencing with the MiSeq technology (Illumina, San Diego, USA), and a therapeutic drug monitoring evaluated adherence of the patients.

Results: Of 110 HBV drug resistance sequencing, 10 isolates were tested for treatment failure with tenofovir. Four samples were excluded because of mediocre adherence, and the remaining six were included for deep sequencing. Evolution of the viral diversity was observed for two patients. Phenotypic testing of the mutations discovered could study their impact on tenofovir resistance level.

Keywords: Hepatitis B (HBV), resistance, genotype, tenofovir

Table des matières

Remerciements	7
Résumé.....	9
Abstract.....	10
Table des matières.....	11
Abréviations	13
Liste des figures	15
Liste des tableaux	16
INTRODUCTION.....	17
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	18
1 Taxonomie – épidémiologie.....	19
2 Structure du virus	20
2.1 Cycle viral.....	22
2.2 La polymérase du VHB.....	24
2.3 La réplication du génome du VHB.....	26
3 Antiviraux actifs sur le VHB	28
3.1 Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques	29
3.2 Ténofovir.....	30
3.2.1 Pharmacocinétique.....	31
3.2.2 Interactions avec la Pol/RT.....	34
3.2.3 Activité <i>in vitro</i>	37
3.2.4 Activité <i>in vivo</i>	38
4 Stratégie thérapeutique	39
4.1 Stades de l’infection	39
4.2 Indications de traitement	41
4.3 Populations particulières	41
4.4 Réponse thérapeutique	42
5 Résistance aux antiviraux.....	43
5.1 Mécanismes favorisant l’émergence de la résistance du VHB aux antiviraux.....	43
5.2 Résistance croisée	44
5.3 Barrière génétique	45
6 Les mécanismes de résistance du VHB au ténofovir.....	45
6.1 Mécanismes responsables de la sensibilité diminuée au ténofovir	46
6.2 Mutations de résistance au ténofovir en cours de caractérisation	46
6.3 Observance et ténofovir	47
7 Exploration génotypique de la résistance	47

7.1 Le séquençage Sanger	48
7.2 Le séquençage profond (« <i>next generation sequencing</i> »).....	48
7.3 Exploration phénotypique de la résistance	48
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	49
PARTIE EXPERIMENTALE.....	50
1 Introduction	50
2 Matériel et méthodes.....	50
2.1 Inclusion des patients.....	50
2.2 Séquençage profond du domaine Pol/RT	51
2.3 Suivi pharmacologique du ténofovir	54
3 Résultats	55
3.1 Contexte clinico-biologique des échecs de traitement par ténofovir	55
3.2 Evaluation rétrospective de l’observance	59
3.3 Apport du NGS à la recherche de mutations de résistance.....	60
3.4 Evolution de la diversité virale au cours du traitement	61
4 Discussion.....	64
Annexe.....	69
BIBLIOGRAPHIE.....	71

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNccc : ADN circulaire clos covalent

ADNrc : ADN relâché circulaire

ADV : adéfovir

Ag HBc : antigène HBc

Ag HBe : antigène HBe

Ag HBs : antigène HBs

ARN : acide ribonucléique

ARNpg : ARN pré génomique

CC₅₀ : concentration cytotoxique médiane

CES : carboxylesterase 1

CE₅₀ : concentration efficace médiane

CHC : carcinome hépatocellulaire

CpAM : modulateurs d'assemblage de la capside

EASL : European Association for the Study of the Liver

ETV : entécavir

dGMP : désoxyguanosine monophosphate

HBs : protéine de l'enveloppe virale

HBc : protéine core de l'Ag HBc

HBe : protéine précore de l'Ag HBc

HSPGs : héparanes sulfates protéoglycanes

Kb : kilobase

LAM : lamivudine

LC MS/MS : chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem

NA : analogues nucléos(t)idiques

NTCP : sodium taurocholate cotransporting polypeptide

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

OMS : Organisation mondiale de la santé

PegIFN α : interféron alpha pegylé

Pol/RT : polymérase/transcriptase inverse du virus de l'hépatite B

SSO : oligonucléotide simple brin

TAF : ténofovir alafenamide

TDF : ténofovir disoproxil fumarate

TLR : récepteur *Toll-like*

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des figures

Figure 1 : Distribution des géotypes et prévalence du virus de l'hépatite B	19
Figure 2 : Arbre phylogénétique représentant la famille des <i>Hepadnaviridae</i>	20
Figure 3 : Organisation du génome du VHB	21
Figure 4 : Structure de la particule virale du VHB.....	21
Figure 5 : Cycle viral du VHB.....	23
Figure 6 : Particules virales et sous-particules virales au microscope électronique	24
Figure 7 : Organisation de la polymérase du VHB	25
Figure 8 : Structure de la polymérase du VHB.....	25
Figure 9 : Représentation du cycle de réplication de l'ADN viral.	27
Figure 10 : Principales cibles d'actions des traitements antiviraux directs et indirectes	29
Figure 11 : Mode d'action des différents NA sur la synthèse de l'ADN viral.....	30
Figure 12 : Structures du ténofovir (TFV) et de ses prodrogues	31
Figure 13 : Transformation intracellulaire du ténofovir en ténofovir diphosphate.	31
Figure 14 : Profils concentration-temps du ténofovir dans le sérum après administration de différentes doses de ténofovir disoproxil fumarate chez des adultes VIH à l'état d'équilibre.	32
Figure 15 : Représentation du métabolisme du ténofovir (TFV) et de ses prodrogues, le ténofovir disoproxil fumarate (TDF) et le ténofovir alafenamide (TAF).	34
Figure 16 : Structures de l'adéfovir, du (R)-ténofovir et du (S)-ténofovir.....	36
Figure 17 : Liaison de l'adéfovir et du ténofovir avec la Pol/RT sauvage.	36
Figure 18 : Liaison des désoxyribonucléotides triphosphates avec la Pol/RT sauvage.....	37
Figure 19 : Histoire naturelle de l'infection chronique VHB.....	41
Figure 20 : Réponses virologiques au traitement par analogues nucléos(t)idiques.....	43
Figure 21 : Incidence cumulative de la résistance du VHB aux traitements par des analogues nucléos(t)idiques sur un à cinq ans.	45
Figure 22 : Etapes de séquençage NGS par la méthode Illumina	53
Figure 23 : Scan complet des produits d'ionisation par électronébuliseur positif du ténofovir	55
Figure 24 : Suivi virologique de patients en échec de traitement par le ténofovir	59
Figure 25 : Evolution de la diversité au sein du domaine Pol/RT chez la patiente P18	62
Figure 26 : Evolution de la diversité au sein du domaine Pol/RT chez le patient P20	63
Figure 27 : Suivi virologique du patient P15.....	69
Figure 28 : Suivi virologique du patient P16.....	69
Figure 29 : Suivi virologique du patient P22.....	69
Figure 30 : Suivi virologique du patient P31.....	70

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résistances croisées des mutations rencontrées les plus fréquemment lors des traitements par analogues nucléos(t)idiques.....	44
Tableau 2 : Profils cliniques et virologiques des patients en situation d'échec thérapeutique au ténofovir.....	58
Tableau 3 : Récapitulatif des mutations majoritaires et leur impact sur le VHB.....	60

INTRODUCTION

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale avec une mortalité estimée à 887 000 décès par an (World Health Organization et al., 2017). Aujourd'hui, le traitement de référence repose sur l'utilisation d'analogues nucléosidiques ou nucléotidiques (NA) tel l'entécavir ou le ténofovir en 1^{ère} intention. Concernant le ténofovir, aucune mutation de résistance spécifique n'a été retrouvée à ce jour, pourtant des patients en situation d'échec de traitement ont été rapportés. Nous supposons l'existence de sous-populations virales résistantes au médicament, mais qui ne seraient pas ou mal détectées par les techniques de séquençage Sanger.

L'objectif de ce travail consiste en une étude rétrospective pharmacologique et virologique de patients en situation d'échec thérapeutique au ténofovir. L'observance a été évaluée par un dosage pharmacologique du ténofovir par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC MS/MS). Un séquençage profond du génome viral a permis d'étudier la présence de mutation(s) sélectionné(s) au cours du traitement dans la polymérase virale (Pol/RT) du VHB et sur la partie chevauchante du gène de l'antigène HBs (Ag HBs).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

En 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 257 millions de personnes sont porteurs chroniques VHB, défini par la présence de l'Ag HBs dans le sang pendant plus de six mois, ce portage est associé à une augmentation du risque de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire (CHC) (World Health Organization et al., 2017). La mortalité est estimée à 887 000 décès par an, qu'elle soit due à une hépatite fulminante, ou bien aux séquelles de l'infection chronique. L'OMS vise l'élimination des hépatites virales B et C d'ici 2030, grâce à une vaccination et un dépistage de masse, la réduction des risques de transmission et la prise en charge médicale des patients infectés.

La prévention de l'infection par le VHB repose principalement sur le vaccin, qui est disponible depuis 1982. En France, la vaccination, obligatoire chez toute personne née après le 1^{er} janvier 2018, repose sur un vaccin recombinant contenant l'Ag HBS. Trois doses sont administrées avant 12 mois, ce schéma permettant d'atteindre un taux protecteur et durable d'anticorps chez plus de 90% des vaccinés (Bruce et al., 2016).

Le dépistage consiste à rechercher l'Ag HBs, il est obligatoire lors des dons du sang et chez les femmes enceintes lors du 6^{ème} mois de grossesse. De plus, il est recommandé chez tout adulte au moins une fois dans sa vie.

Les patients éligibles à un traitement reçoivent en première intention un analogue nucléosidique ou nucléotidique (European Association for the Study of the Liver, 2017). L'utilisation de l'interféron alpha pegylé (PegIFN α) peut être envisagé mais ce traitement est soumis à plusieurs contre-indications (cirrhose décompensée, comorbidités, etc...). Actuellement, L'European Association for the Study of the Liver (EASL) recommande l'entécavir, le ténofovir disoproxil fumarate (TDF) ou le ténofovir alafenamide (TAF) en traitement de première ligne pour les patients souffrant d'une hépatite B chronique car ils possèdent un puissant effet antiviral et une haute barrière génétique (Kim et al., 2019; Lam et al., 2017).

En pratique, l'apparition d'une résistance à l'entécavir a été évalué à 1.2% en 5 ans de traitement (Tenney et al., 2009), et aucune résistance n'a été établi au ténofovir (Y. Liu et al., 2017). Cependant, une absence de variant résistant n'équivaut pas forcément à une bonne réponse virologique. Récemment, des cas, rares, de patients sujets à un échec thérapeutique ont été décrits (Cho et al., 2018; Park et al., 2019)

1 Taxonomie – épidémiologie

Au niveau mondial, l'infection par le VHB est répartie de manière inégale et classiquement divisée en trois catégories, comme présentée dans la Figure 1 : les zones de forte endémie avec une prévalence de l'Ag HBs supérieure à 8%, localisées principalement en Asie, en Afrique saharienne et subsaharienne et en Amazonie ; les zones de moyenne endémie où la prévalence de l'Ag HBs est comprise entre 2% et 8%, regroupant le Moyen-Orient, l'Europe de l'Est, l'Asie centrale, le pourtour méditerranéen et certaines régions d'Amérique du Sud ; et les zones de faible endémie, inférieure à 2%, qui regroupent principalement les pays développés (Cassidy et al., 2011).

Le virus de l'hépatite B appartient à la famille des *Hepadnaviridae*, qui comprend des virus à ADN avec un tropisme principalement hépatique (Littlejohn et al., 2016). C'est un virus sphérique et enveloppé. Cette famille regroupe les *Orthohepadnavirus*, qui touchent principalement les mammifères, et les *Avihepadnavirus*, repérés chez les oiseaux. Ces virus possèdent une forte spécificité à leur hôte (Figure 2). A ce jour, 10 génotypes (A-J) de VHB infectant uniquement l'Homme ont été décrits, avec une divergence supérieure à 8% sur l'ensemble du génome (Schaefer, 2007).

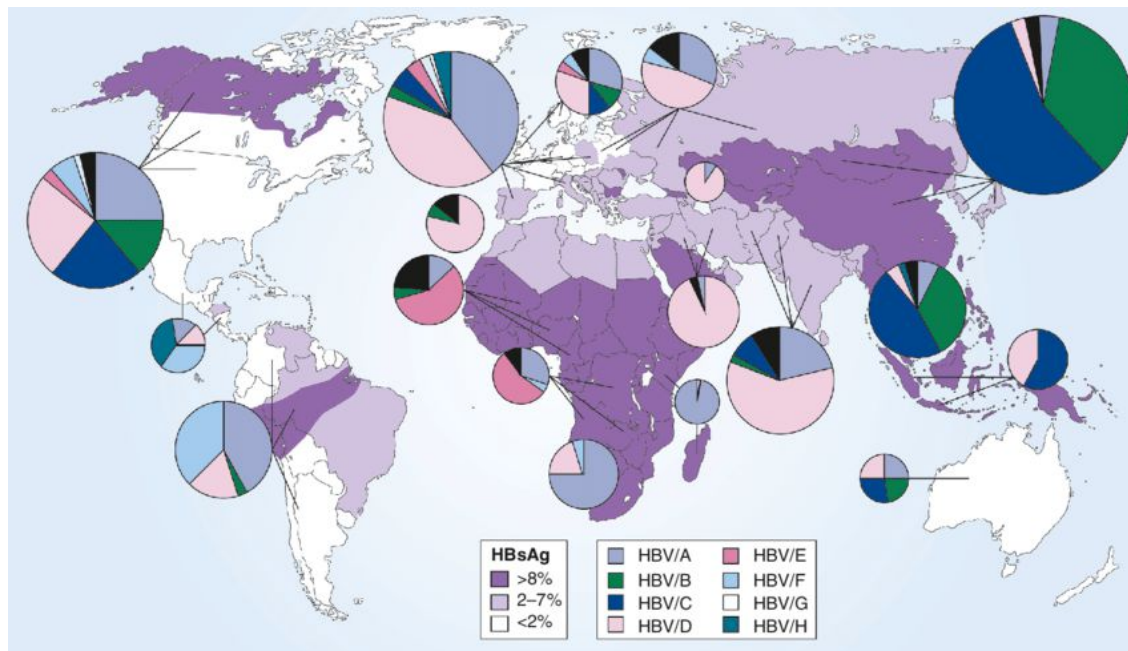


Figure 1 : Distribution des génotypes et prévalence du virus de l'hépatite B

Source : (Cassidy et al., 2011)

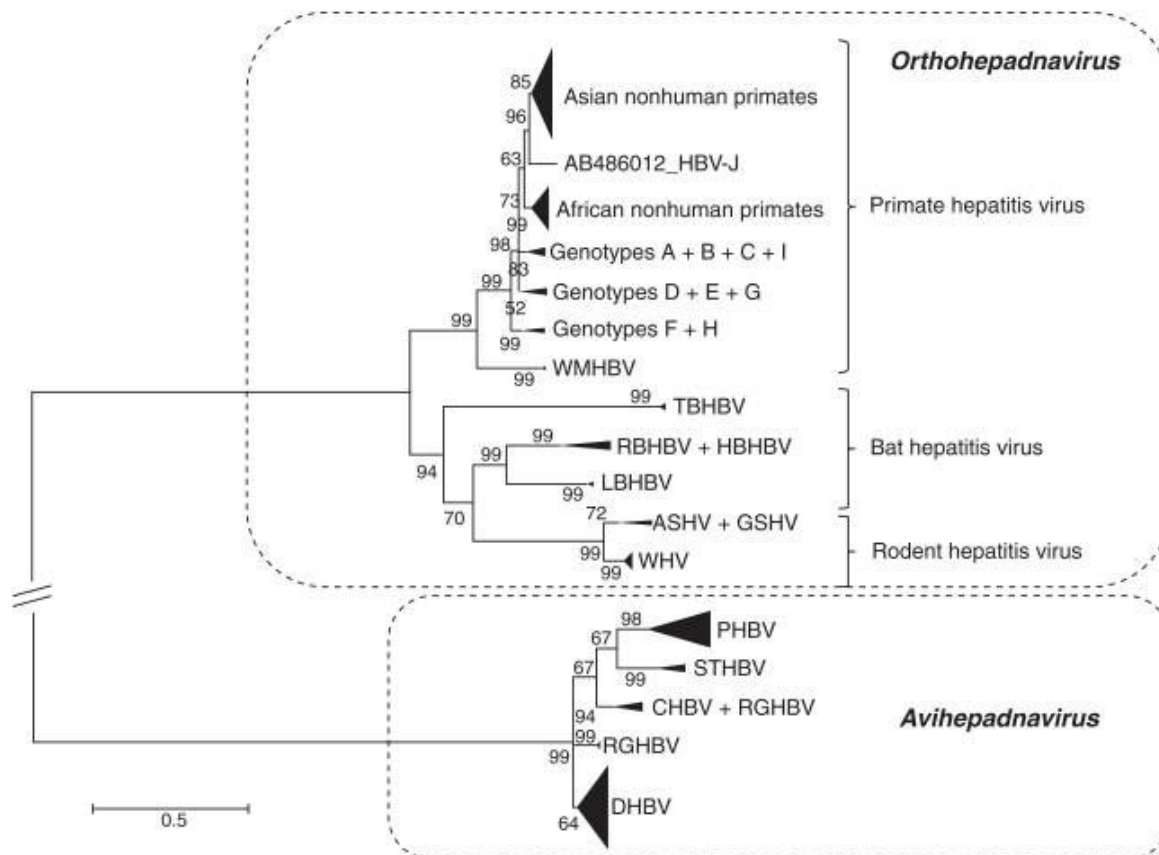


Figure 2 : Arbre phylogénétique représentant la famille des *Hepadnaviridae*

Il comprend les génotypes A à J retrouvés chez l'humain, WMHBV *wooly monkey* HBV : singe laineux, les rongeurs sont représentés par ASHV (*Arctic squirrel*), GSHV (*Ground squirrel*) et WHV (*woodchuck*). Les *bat hepatitis virus* ciblent des chauves-souris. Les séquences VHB *Avihepadnavirus* proviennent du DHBV (canard), RGHBV (oie de Ross), CHBV (grue), HHBV (héron), STHBV (cigogne) et PHBV (perroquet).

Source : (Littlejohn et al., 2016)

2 Structure du virus

Le VHB est le plus petit virus à ADN double brin infectant l'homme connu à ce jour. Son génome est composé d'un ADN de 3.2 kb environ, avec des variations selon le génotype, circulaire, partiellement double brin et relâchée. Il contient quatre cadres de lecture se chevauchant et codant sept protéines (Figure 3) : les protéines d'enveloppe S, M et L de l'Ag HBs, les protéines formant la capsid, l'antigène HBc (Ag HBc) et l'antigène HBe (Ag HBe), une polymérase ayant aussi une activité transcriptase inverse, et la protéine X (Figure 4) (Lamontagne et al., 2016).

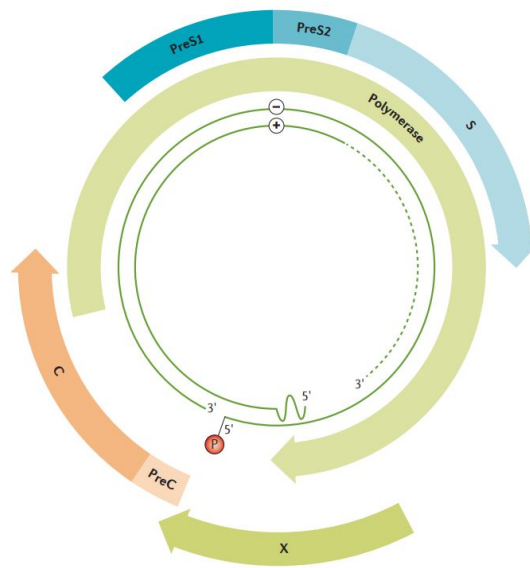


Figure 3 : Organisation du génome du VHB

Les différents blocs colorés représentent les quatre cadres de lecture du génome. Les grandes, moyennes et petites formes de l'Ag HBs sont traduites à partir de PreS1 + PreS2 + S, PreS2 + S et de S respectivement. La polymérase est encodée à partir du cadre de lecture Polymérase. L'Ag HBc est traduit grâce au cadre de lecture C uniquement. L'Ag HBc est le fruit du clivage issu de la traduction de PreC + C. Enfin la protéine HBx est issue du cadre de lecture X.

Source : (Yuen et al., 2018)

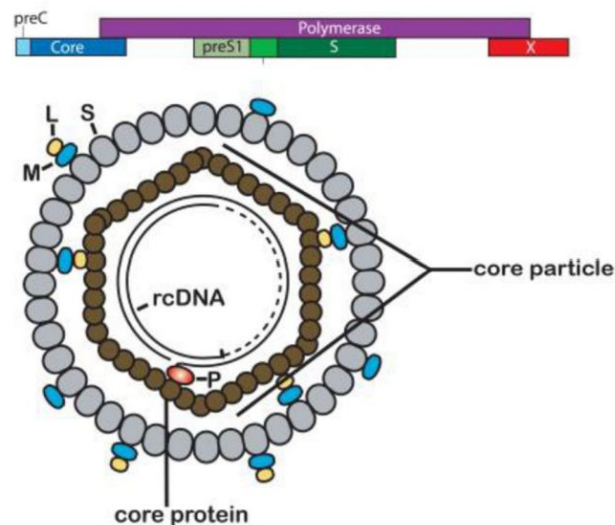


Figure 4 : Structure de la particule virale du VHB

La partie supérieure est une représentation schématique des différents chevauchements des cadres de lectures du gène du VHB. En dessous, le virion VHB mature (particule de Dane) consiste en deux parties principales : une nucléocapside comprenant l'ADN partiellement double brin liée à sa polymérase et encapsulée par des dimères de l'Ag HBc, et une enveloppe virale constituée principalement de S-Ag HBs, une quantité intermédiaire de M-Ag HBs et une petite quantité de L-Ag HBs

Source : (Lamontagne et al., 2016)

2.1 Cycle viral

Le virus se réplique et s'assemble uniquement à l'intérieur des hépatocytes (Figure 5). La pénétration dans l'hépatocyte débute par des liaisons de faibles affinités avec les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs) de la membrane cellulaire. Ces liaisons de type électrostatique s'effectuent entre les HSPGs chargées négativement et les acides aminés Arg122 et Lys141 situés dans le déterminant « a » et chargés positivement (Sureau and Salisse, 2013). Ces interactions stabilisent le virus à la surface de la cellule et permet la liaison de haute affinité par l'intermédiaire du domaine Receptor Binding Site, situé dans la région pré-S1 et le récepteur sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Yan et al., 2012). Il se lie par l'Ag HBs au récepteur sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) de l'hépatocyte, puis pénètre par endocytose et libère la nucléocapside dans le cytoplasme (Tang et al., 2018).

Ce dernier est ensuite amené dans le noyau, puis libère l'ADN relâché circulaire (ADNrc). Après une étape de séparation de la Pol/RT, l'ADNrc sera ensuite réparé et permettra la formation d'ADN circulaire clos covalent (ADNccc), servant de matrice pour la transcription d'ARN viral, d'où son surnom de « mini-chromosome ». Cette forme est d'une grande stabilité et va pouvoir persister indéfiniment dans les hépatocytes, servant de réservoir à la réplication virale. Elle sera aussi entretenue à des niveaux relativement stables par le recyclage de nucléocapsides matures non excrétées et l'infection de nouveaux hépatocytes. Le génome viral peut se retrouver intégré à l'ADN de l'hôte de manière aléatoire.

L'ARN polymérase cellulaire va ensuite permettre la synthèse d'ARN prégénomique (ARNpg) et des ARNm. Cet ARNpg sera en partie traduite en protéines virales, notamment la capside et la Pol/RT, puis l'interaction de l'ARNpg et de la Pol/RT va permettre son encapsidation. L'ARNpg sera ensuite rétro-transcrit en un brin d'ADN de polarité négative (ADN-). Pendant la synthèse d'ADN, la majorité de l'ARNpg sera dégradée par l'activité RNase H de la protéine, les bases restantes servant d'amorce 5' pour le brin d'ADN de polarité positive (ADN+) (Lamontagne et al., 2016).

Les capsides matures contenant l'ADN viral peuvent être dirigées vers le noyau pour entretenir l'ADNccc, ou bien migrer vers le réticulum endoplasmique. L'interaction entre cet organite et les protéines d'enveloppe va permettre leur enveloppement puis leur libération dans le compartiment sanguin. Les protéines HBe et les protéines d'enveloppe produites en excès seront libérées par le même mécanisme (Figure 6).

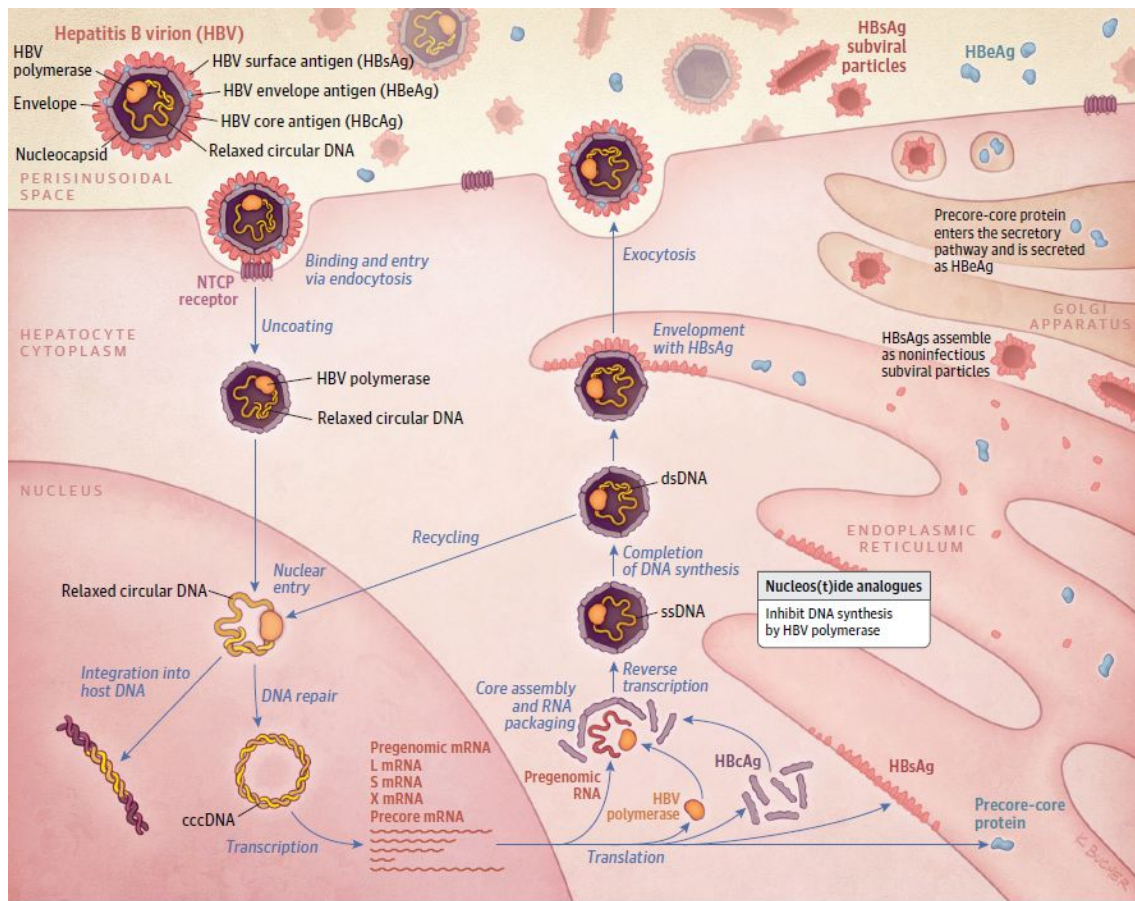


Figure 5 : Cycle viral du VHB

Le VHB est un petit virus à ADN enveloppé, la nucléocapside contenant l'ADN viral est protégée par une enveloppe de lipoprotéines. Le génome viral code pour toutes les protéines virales nécessaires à la réplication. Le virion entre par endocytose dans la cellule par l'intermédiaire du récepteur du sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), puis libère la nucléocapside qui sera transportée jusqu'au noyau. Dans le noyau, l'ADN relâché circulaire est réparé et converti en ADN circulaire clos covalent, qui sera la matrice pour la transcription de l'ARN viral. Cet ADN peut aussi être intégré dans le génome de la cellule hôte. De nouveaux virions matures seront produits à l'aide de la machinerie cellulaire, puis libérés dans la circulation.

Source : (Tang et al., 2018)

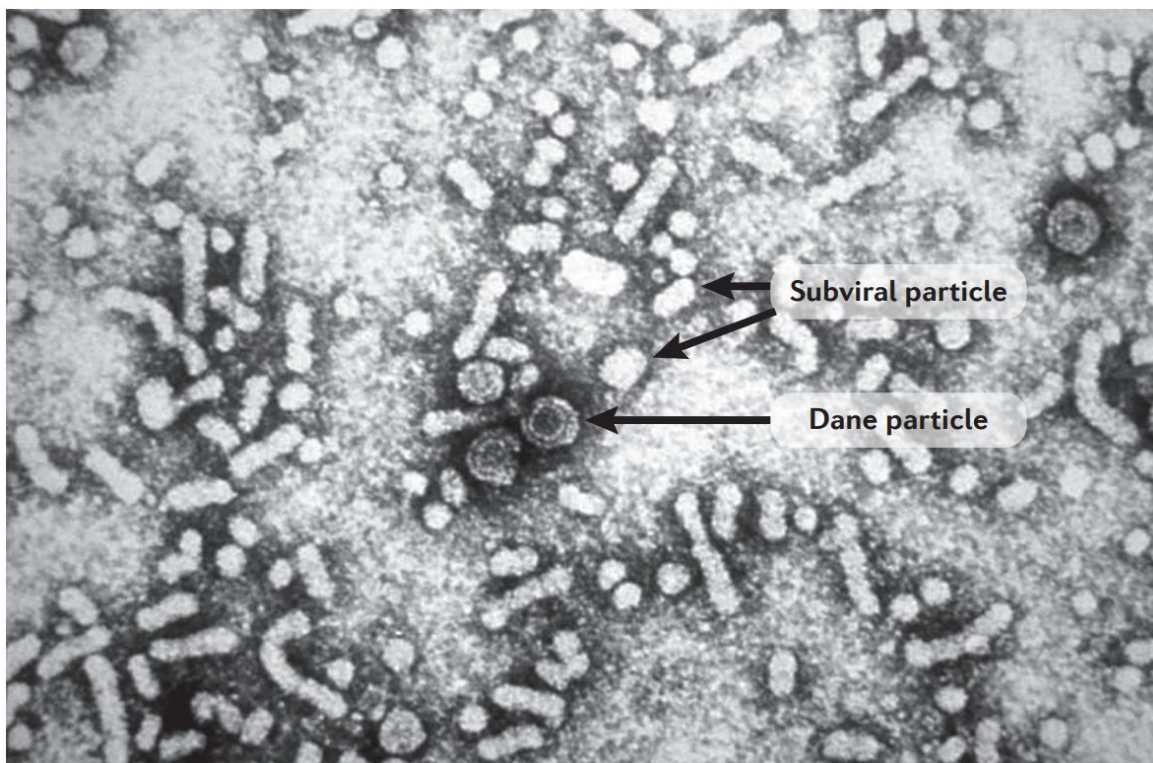


Figure 6 : Particules virales et sous-particules virales au microscope électronique

La particule virale mature (*Dane particle*) avec sa double enveloppe, sa capsid et son ADN viral. Les sous-particules virales, sous forme tubulaire et de petites sphères, ne contiennent pas d'ADN viral. Elles sont uniquement constituées de protéines d'enveloppe.

Source : (Yuen et al., 2018)

2.2 La polymérase du VHB

Le gène P, le plus grand du génome du VHB, code l'ADN polymérase du virus. C'est une enzyme possédant plusieurs activités et composée de 4 domaines protéiques (Figure 7).

La région N-terminale contient le domaine protéine terminale, qui va initier la synthèse du brin (-) de l'ADN et y sera lié de manière covalente. Vient ensuite le domaine « *spacer* », une région présentant régulièrement des mutations, sans que cela ait d'impact sur la réplication virale. Le domaine transcriptase inverse/ADN polymérase ARN dépendant va permettre la synthèse du brin (-) de l'ADN à partir de l'ARN prégénomique (ARNpg), ainsi que la synthèse du brin (+). Le domaine RNase H va dégrader le brin de ARNpg utilisé précédemment, cependant un morceau situé en 5' échappe à cette digestion et sert ensuite à la synthèse du brin (+). La structure de la Pol/RT n'ayant pas encore été élucidée, une modélisation par homologie avec la polymérase du VIH (Bartholomeusz et al., 2004) a été faite pour étudier les interactions entre les analogues nucléos(t)idiques et l'enzyme (Figure 8).

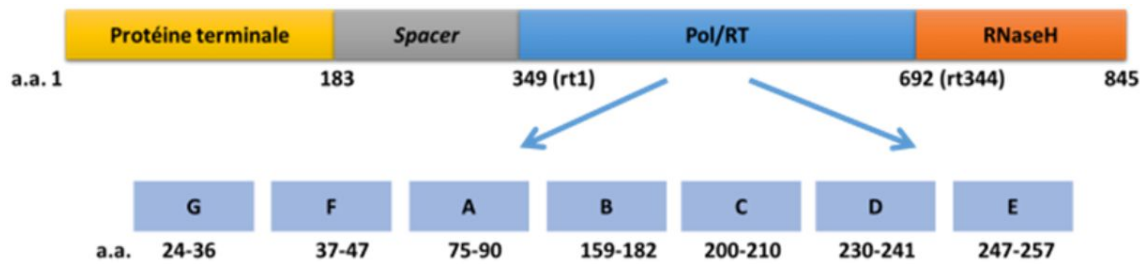


Figure 7 : Organisation de la polymérase du VHB

Les quatre domaines fonctionnels de la polymérase virale sont représentés dans la partie haute et les sept domaines catalytiques sont représentés dans la partie basse.

Source : (Ghany and Liang, 2007)

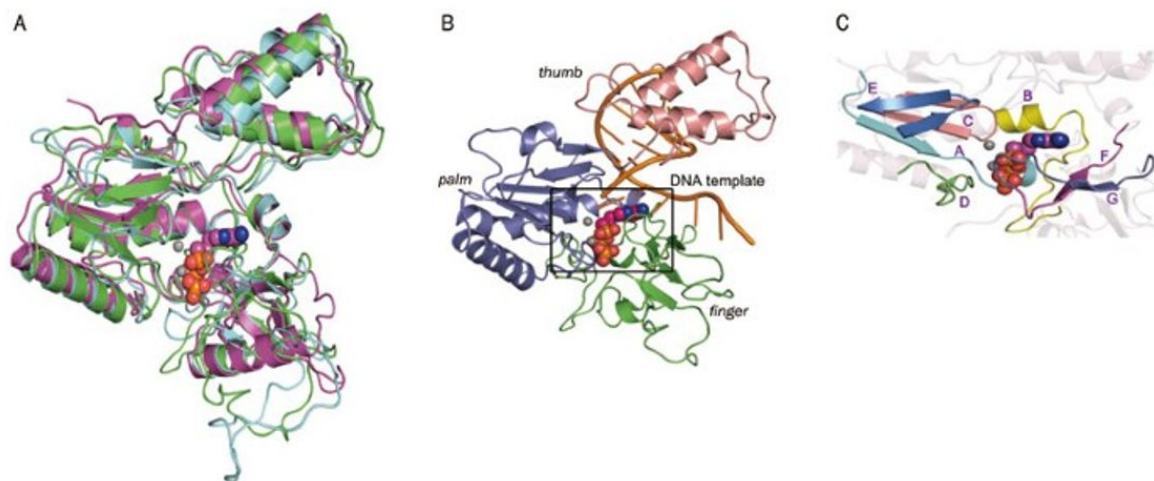


Figure 8 : Structure de la polymérase du VHB

(A) Modélisation de la structure de la polymérase du VHB génotype B (cyan) et C (vert) par homologie avec la polymérase du VIH (rose). (B) Modèle 3D de la polymérase du VHB représentant les domaines doigts, paume et pouce. (C) Représentation des sous-domaines conservés A à G portant l'activité catalytique

Source : (Li et al., 2013).

2.3 La réplication du génome du VHB

La synthèse du génome viral est accomplie en plusieurs étapes par la Pol/RT (Figure 9), et surtout, l'ADN est synthétisé à l'intérieur d'une nucléocapside nouvellement formée. L'ARNpg se lie avec la Pol/RT au niveau du signal d'encapsidation, appelé epsilon, qui est une structure en épingle à cheveux situé en 5'. Cet ensemble va être transporté dans une capsid en formation.

Une fois internalisé, cette interaction va permettre une réaction d'amorçage, pendant laquelle une tyrosine située dans le domaine TP en N-terminal de la Pol/RT va se lier de manière covalente à une dGMP, via un groupement hydroxyle. La Pol/RT ajoute ensuite quelques nucléotides, ce qui correspond à la réaction de polymérisation. Cet oligonucléotide reste lié de manière covalente à la protéine.

Pour continuer la synthèse d'ADN, cette séquence est transférée à l'extrémité 3' de l'ARNpg, où elle s'apparie avec une séquence complémentaire située dans une région appelée DR1. Ensuite, la synthèse du brin d'ADN (-) se poursuit jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARNpg, qui est quasi-intégralement dégradée par l'activité RNase H de la Pol/RT. Les nucléotides restant d'ARNpg en 5' vont servir de séquence d'amorçage pour la synthèse d'ADN (+), permettant la circularisation de l'ADN viral et donnant un ADN relâché circulaire partiellement bicaténaire (Clark and Hu, 2015; Hu and Seeger, 2015; Lamontagne et al., 2016).

La Pol/RT, par ses différentes activités enzymatiques, est devenue la principale cible des traitements antiviraux actuels.

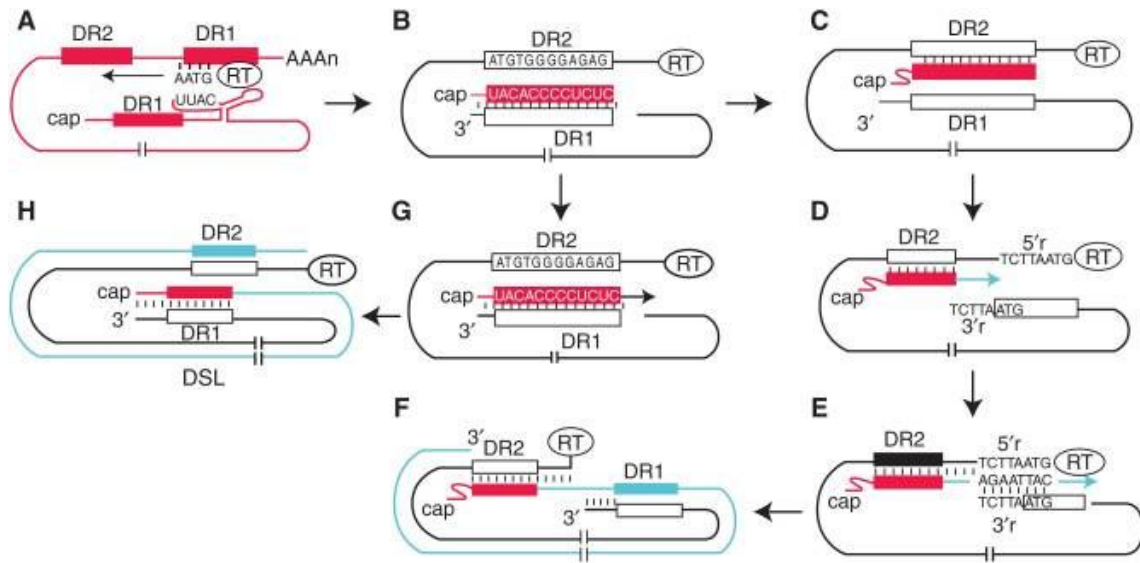


Figure 9 : Représentation du cycle de réplication de l'ADN viral.

Source : (Hu and Seeger, 2015)

3 Antiviraux actifs sur le VHB

Les principaux antiviraux actifs sur le VHB actuellement commercialisés sont des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques ainsi que le PegIFN α . Cette dernière molécule a un effet immunomodulateur et n'est indiquée que chez un nombre limité de patients. Elle ne sera pas développée dans cette thèse car il n'y a pas de résistance virale décrite. De nouveaux antiviraux d'action directe ciblant d'autres étapes du cycle viral sont en développement, ainsi que des composés immunomodulateurs, comme présentée dans la Figure 10. Ces nouveaux traitements vont cibler différentes étapes du cycle de la réplication virale, comme les inhibiteurs d'entrées (Myrcludex), des modulateurs d'assemblage de capsides (CpAM), la production de protéines virales (ARN interférant), la libération d'Ag HBs (Replicor), ou encore le ciblage de l'ADNccc (Naggie and Lok, 2021). Par ailleurs des molécules immunomodulatrices sont aussi étudiées, comme des agonistes au récepteurs *toll-like* (TLR 7-9) ou bien des inhibiteurs du checkpoint immunitaire (anti-PD1).

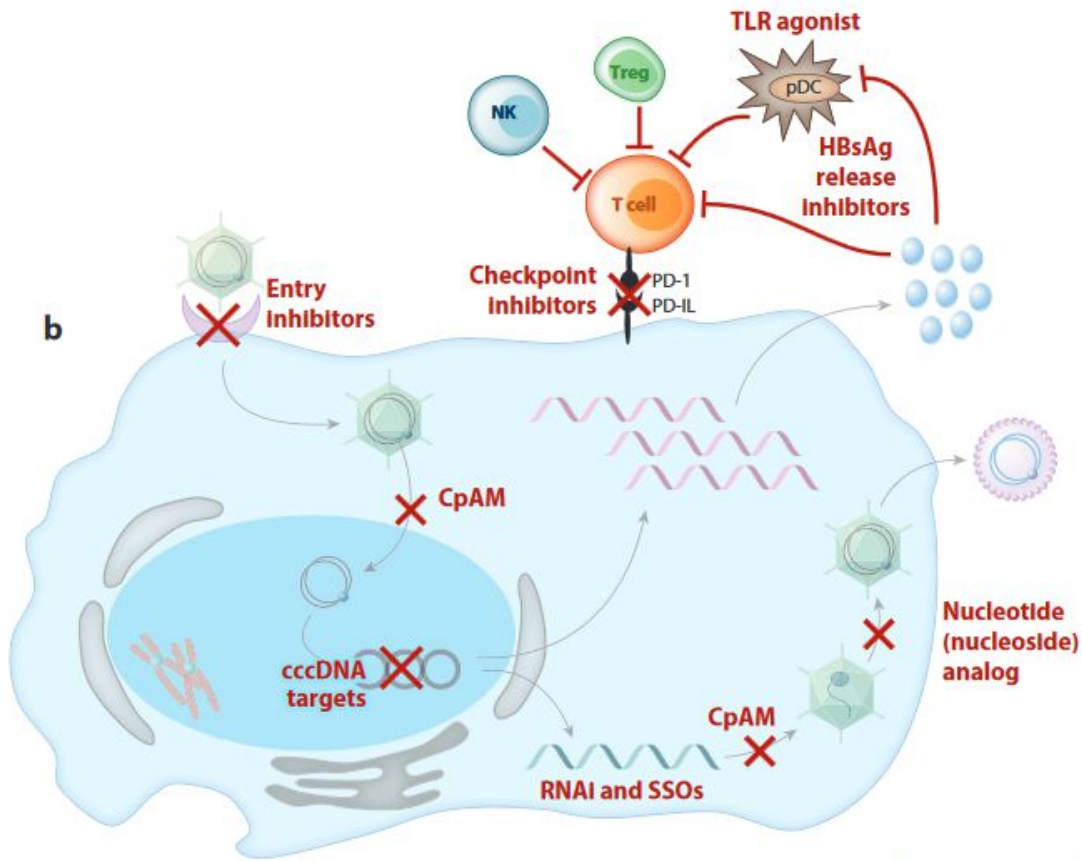


Figure 10 : Principales cibles d'actions des traitements antiviraux directs et indirectes

cccDNA : ADN clos circulaire covalent, CpAM : modulateur d'assemblage de capsid, TLR : récepteur *Toll-like*, RNAi : ARN interférant, SSO : oligonucléotide simple brin

Source : (Naggie and Lok, 2021)

3.1 Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques

Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques sont le traitement de référence de l'hépatite B chronique. Quatre molécules ont été approuvées par les autorités de santé pour le traitement de l'hépatite B chronique. Il s'agit de la lamivudine (cytidine), et l'entécavir (guanosine) pour les analogues nucléosidiques, les analogues nucléotidiques regroupant l'adéfovir (adénosine) et le ténofovir (adénosine). Le ténofovir (disoproxil fumarate ou alafenamide) et l'entécavir sont recommandées en 1^{ère} intention dans cette indication car ils présentent la barrière génétique la plus élevée (cf. page 45).

Ces analogues nucléos(t)iques sont des prodrogues qui nécessitent une conversion par les kinases cellulaires vers leur forme active triphosphate. Une fois activées, elles vont entrer en compétition avec les nucléotides naturels lors de l'incorporation dans

De plus, l'activité transcriptase inverse, et plus spécifiquement l'amorçage protéique, est aussi une cible de ces analogues. L'entécavir interfère par compétition avec le dGTP initial de la séquence protéique, quand l'adéfovir et le ténofovir vont inhiber la synthèse du trinuécléotide dGAA correspondant (Menéndez-Arias et al., 2014).



3.2 Ténofovir

Faculté de Médecine – 10, boulevard Tonnellé – CS 73223 – 37032 TOURS Cedex I – Tél : 02.47.36.66.00 – www.med.univ-tours.fr

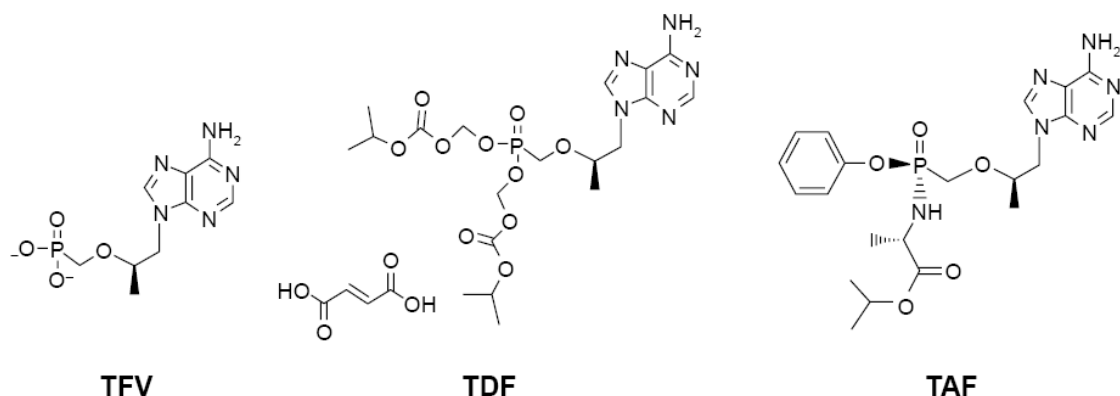


Figure 12 : Structures du ténofovir (TFV) et de ses prodrogues

ténofovir disoproxil fumarate (TDF) et ténofovir alafenamide (TAF).

Source : (Ogawa et al., 2017)

3.2.1 Pharmacocinétique

3.2.1.1 Tenofovir disoproxil fumarate

Lors de l'administration orale du TDF, celui-ci sera rapidement converti dans la circulation sanguine en ténofovir par des estérases. Une fois dans les cellules, il est phosphorylé une première fois en ténofovir monophosphate par l'adénylate kinase, avant d'être rapidement phosphorylé une seconde fois en sa forme active, le ténofovir diphosphate, par une nucléoside diphosphate kinase (Figure 13) (Kearney et al., 2004).

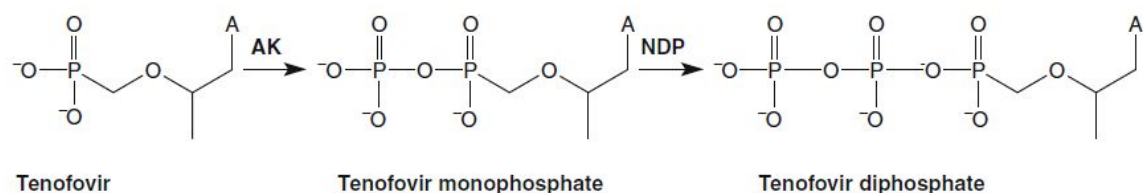


Figure 13 : Transformation intracellulaire du ténofovir en ténofovir diphosphate.

A = adenine ; AK = adénylate kinase ; NDP = nucléoside diphosphate kinase

Source : (Kearney et al., 2004).

Les valeurs moyennes de la C_{max}, de l'AUC et de la C_{min} du ténofovir ont été obtenues auprès de patients infectés par le VIH (Figure 14), et sont respectivement de 326 µg/L, 3324 µg.h/L et 64.4 µg/L. La C_{max} est atteinte au bout d'une heure après l'administration chez des sujets à jeun, et de deux heures si le médicament est pris avec de la nourriture. La biodisponibilité a été évaluée à 25% environ chez des patients à jeun, et il a été observé une augmentation de l'AUC et de la C_{max} de 40% et 14%,

respectivement, lors de la prise du médicament pendant un repas riche en lipides (1000 kcal, 50% lipides). Cependant, un repas léger n'a pas d'influence significative sur les paramètres pharmacocinétiques du ténofovir comparés à des patients à jeun, et le ténofovir peut donc être administré pendant ou hors des repas. Les variations de C_{max} et de l'AUC sont proportionnelles à la dose ingérée pour des posologies comprises entre 75 et 600 mg chez des patients infectés par le VIH (Kearney et al., 2004).

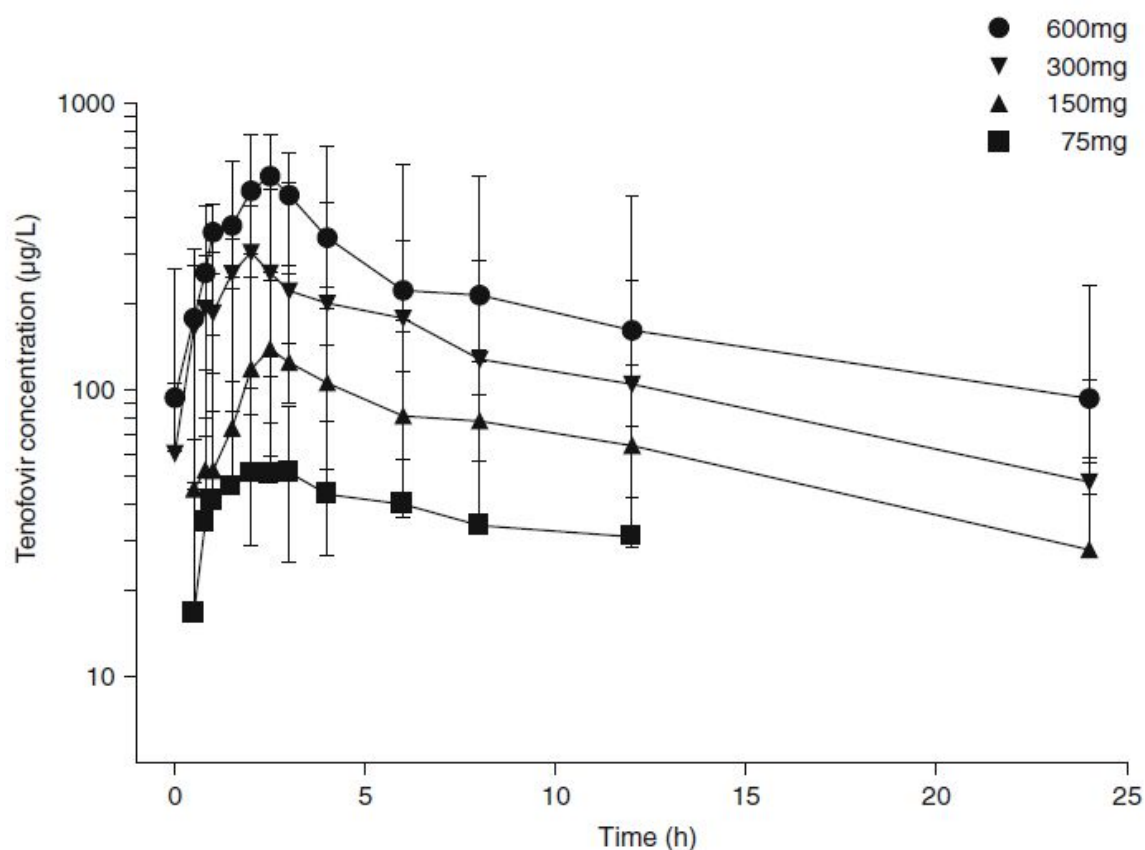


Figure 14 : Profils concentration-temps du ténofovir dans le sérum après administration de différentes doses de ténofovir disoproxil fumarate chez des adultes VIH à l'état d'équilibre.

Source : (Kearney et al., 2004)

Le volume de distribution a été estimé à 800 mL/kg à l'état d'équilibre après administration intraveineuse de 1mg/kg du médicament chez des patients VIH. La liaison *in vitro* du ténofovir aux protéines du sérum ou du plasma est inférieure à 0.7% et à 7%, respectivement. Le TDF diffuse largement dans les tissus. Il semble entrer passivement dans les cellules par une endocytose de phase fluide sans être médié par un transporteur ou un processus saturable. Cependant, la pénétration dans le LCR

est probablement faible à cause des charges anioniques de la molécule à un pH physiologique.

Des études *in vitro* ont montré que le ténofovir et le TDF n'étaient pas des substrats des enzymes du cytochrome p450 ou de la P-gp. Il a été montré que le ténofovir inhibe des protéines de la famille des *multidrug resistance-related proteins* dont la P-gp (Weiss et al., 2007).

La principale voie d'élimination du ténofovir est rénale, 70 à 80% du ténofovir excrété est retrouvé sous forme inchangée dans l'urine dans les 72h suivant l'administration intraveineuse (Deeks et al., 1998). La clairance totale a été estimée à environ 230 mL/h/kg et la clairance rénale à 160 mL/h/kg. Cette élimination s'effectue à la fois par filtration et par transport tubulaire actif, cette voie active correspondrait, selon les études, à un influx dans les cellules tubulaires proximales par le biais des transporteurs hOAT (*human organic anion transporter*) 1 et 3, ainsi que par un efflux dans l'urine par les protéines MRP4 et MRP7. Après administration orale, la demi-vie d'élimination est de 12 à 18h.

3.2.1.2 Ténofovir alafénamide

Le TAF a été développé après la constatation d'un risque significatif de toxicité rénale (syndrome de Fanconi) (Izzedine et al., 2004) ou d'atteinte osseuse chez des patients traités par TDF (Grant and Cotter, 2016; Maggi et al., 2014). Ces effets indésirables pouvaient survenir quelques semaines à quelques années après l'instauration du traitement. Chez des patients traités au long cours pour un VHB et/ou un VIH, le besoin d'un médicament avec un meilleur profil de sécurité s'est donc fait ressentir.

A la différence du TDF, qui est rapidement métabolisé dans le plasma, le TAF reste stable dans le plasma, grâce à un groupement phénol et un ester isopropylique de l'alanine. L'entrée du TAF dans les cellules peut être passive ou médiée par les transporteurs hépatiques OATP1B1 et OATP1B3. Dans la cellule, le TAF est hydrolysé en ténofovir par la Cathepsine A. Cette enzyme est notamment exprimée dans les cellules mononuclées, le rein, le foie, les plaquettes et les testicules. Dans les hépatocytes, le TAF peut aussi être métabolisé en ténofovir par la carboxylesterase 1.

En pratique, une dose de TAF (25mg) permet d'atteindre une concentration de ténofovir dans les cellules périphériques mononuclées sept fois plus élevée qu'une dose de TDF (300mg), assurant ainsi une bonne efficacité virologique (Margot et al., 2016). Cette dose de TAF est associée à une concentration plasmatique de ténofovir

dix fois plus basse qu'après une prise de TDF (300mg), limitant ainsi la toxicité osseuse et rénale.

Le TAF n'interagit pas avec les enzymes du cytochrome 450, il est un substrat de la P-gp. Le TAF n'interagit pas avec les transporteurs rénaux OAT-1 et OAT-3, ce qui limite encore plus sa toxicité rénale (Bam et al., 2014).

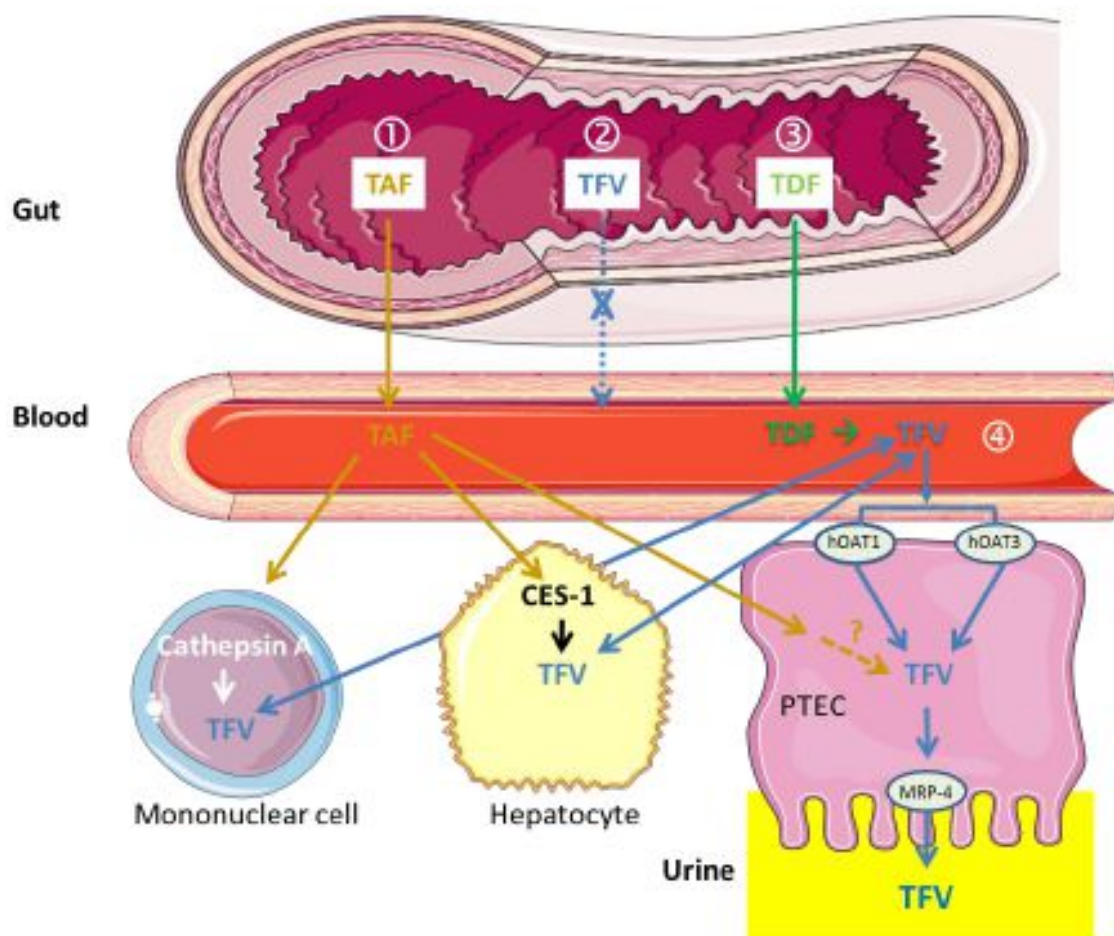


Figure 15 : Représentation du métabolisme du ténofovir (TFV) et de ses prodrogues, le ténofovir disoproxil fumarate (TDF) et le ténofovir alafenamide (TAF).

1 : après une administration orale, le TAF est absorbé dans l'intestin. Il pénètre dans les cellules cibles où il est hydrolysé en TFV par la cathepsine A (lymphocytes) ou par la carboxylesterase 1 (CES, hépatocytes). 2 : le TFV ne traverse pas l'intestin à cause de ses deux charges négatives. 3 : le TDF est rapidement converti en TFV par des estérases dans le plasma. Le TFV plasmatique est ensuite absorbé par les cellules. 4 : la clairance du TFV est assurée par les cellules épithéliales tubulaires proximales (PTEC) et est contrôlée par des protéines de transport membranaires hOAT1 et hOAT3 au pôle basal, et par MRP4 au pôle apical

Source : (Aloy et al., 2016).

3.2.2 Interactions avec la Pol/RT

La structure tridimensionnelle de la Pol/RT du VHB n'a pas encore été élucidée mais elle possède une homologie de séquence avec la polymérase du VIH (Cento et al.,

2013). La structure tridimensionnelle de cette dernière a été élucidée et est utilisée pour modéliser l'interaction entre les analogues nucléosidiques et la polymérase du VHB. Des travaux préliminaires réalisés avec l'adéfovir, un ancien analogue d'adénosine, ont permis de mieux comprendre l'interaction entre le ténofovir (un autre analogue d'adénosine) et la polymérase du VHB.

L'unique différence entre l'adéfovir et le ténofovir tient à la présence, dans le ténofovir, d'un groupement méthyl au lieu d'un simple atome d'hydrogène sur le carbone liant la base nucléique avec les phosphates. Ce changement introduit un centre chiral sur cet atome de carbone. L'isomère R ressemble au stéréoisomère β -D-dNTP survenant naturellement. La majorité des ADN polymérases, dont la Pol/RT du VHB et du VIH, incorpore exclusivement les β -D-dNTP dans la chaîne d'ADN (Semizarov et al., 1997). De fait, les modélisations des interactions entre les isomères du ténofovir et la Pol/RT montrent une très faible affinité du S-ténofovir quand le R-ténofovir a une affinité supérieure aux dNTP naturels (Figure 16 et Figure 18). En pratique les traitements utilisés chez les patients sont purifiés pour ne garder que le R-ténofovir.

D'après les modélisations, l'adéfovir et le ténofovir ne se lient pas de la même façon au site catalytique (Hemert et al., 2014). Le ténofovir posséderait une meilleure affinité avec la Pol/RT sauvage que l'adéfovir. L'adéfovir va se lier préférentiellement dans le grand espace central du motif YMDD, quand le ténofovir se fixe à l'arrière (Figure 17). Cette différence pourrait expliquer l'impact limité des mutations de résistance à l'adéfovir sur la réponse au traitement par ténofovir (Hemert et al., 2014). Une autre explication possible à cette différence de profil de résistance pourrait être la concentration intracellulaire de ces médicaments. En effet, la posologie du ténofovir est 24,5 fois plus élevée (245mg vs 10mg). De plus, les biodisponibilités du TDF et de l'ADV sont de 25% et 59% respectivement. Ces molécules diffusent ensuite de manière équivalente dans la cellule (Delaney et al., 2006). L'ensemble de ces facteurs pourraient être une explication au moindre impact des mutations de résistance à cette de médicament.

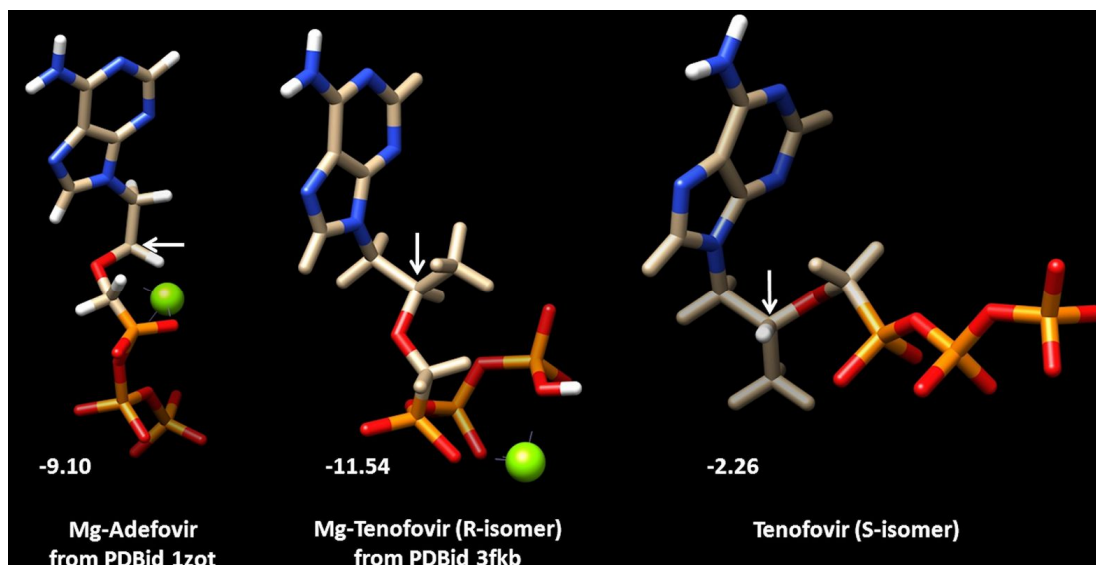


Figure 16 : Structures de l'adéfovir, du (R)-ténofovir et du (S)-ténofovir.

L'ion magnésium près du groupement phosphate est représenté en vert. Les nombres en blanc représentent l'énergie de liaison protéine-ligand (ΔG_{RT} InKD), reflet de l'affinité avec la Pol/RT sauvage

Source : (Hemert et al., 2014).



Figure 17 : Liaison de l'adéfovir et du ténofovir avec la Pol/RT sauvage.

A gauche, l'adéfovir se lie près du motif YMDD (modèle compact) dans le grand espace central de la Pol/RT. Le ténofovir, à droite, se lie dans le petit espace à l'arrière du motif YMDD.

Source : (Hemert et al., 2014)

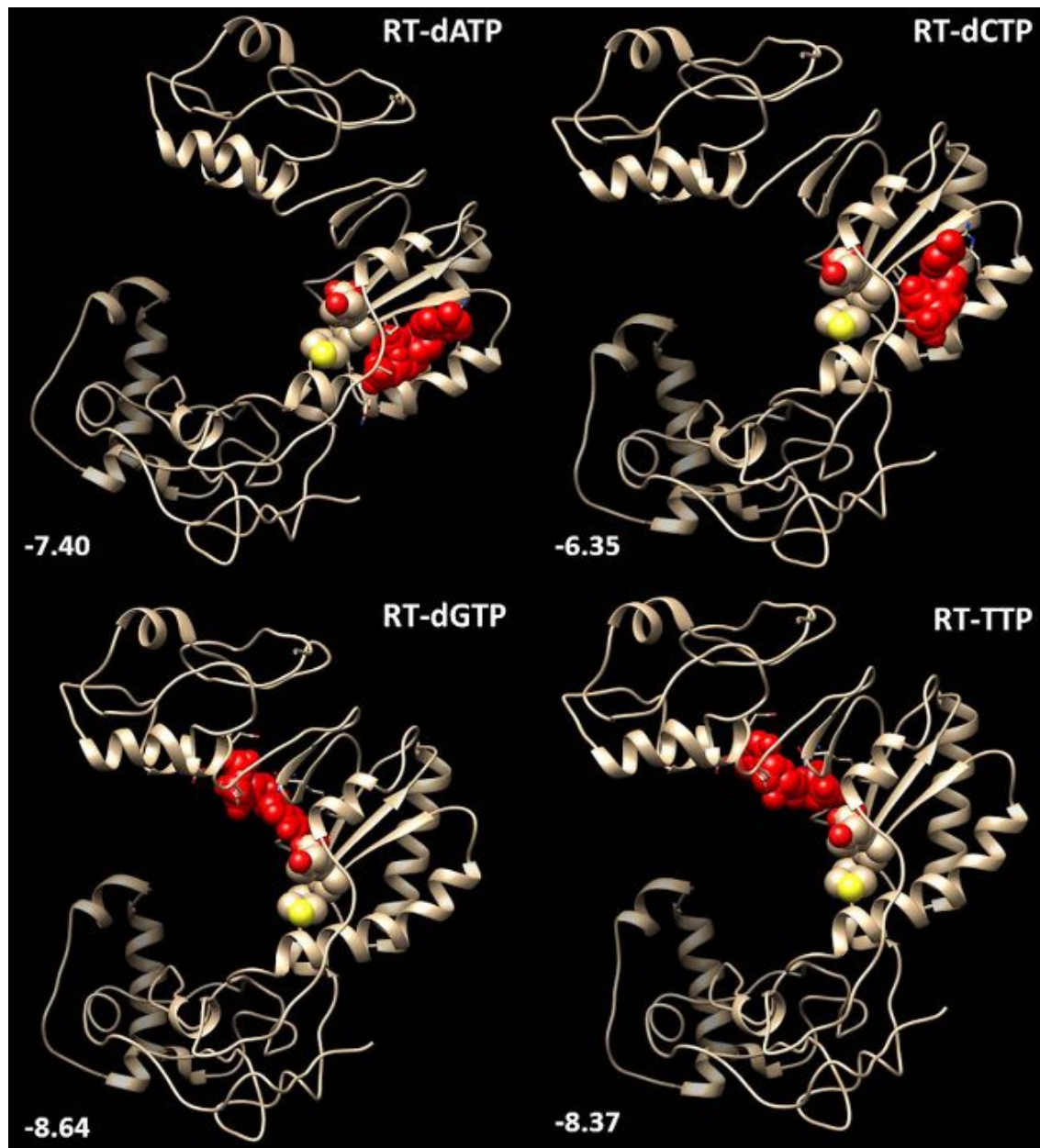


Figure 18 : Liaison des désoxyribonucléotides triphosphates avec la Pol/RT sauvage.

Les Mg-dNTPs sont les sphères rouges. Les autres sphères correspondent au motif YMDD du site catalytique de la Pol/RT. Les nombres en blanc sont les énergies de liaison protéine-ligand, reflète de l'affinité des Mg-dNTPs avec la Pol/RT.

Source : (Hemert et al., 2014)

3.2.3 Activité *in vitro*

L'activité *in vitro* sur le VHB du TDF et du TAF a été évaluée en utilisant la lignée cellulaire HepG2, lignée dérivée d'hépatocarcinome. Cette lignée a été transfectée par un plasmide codant 1,1 unités de génome du VHB, sous le contrôle d'un promoteur fort (CMV). Ce modèle permet la transcription de l'ARNpg du VHB et l'initiation de la

réplication. L'activité antivirale est estimée par calcul de la concentration efficace 50% (CE₅₀), concentration qui inhibe 50% de la réplication virale. La concentration cytotoxique 50% (CC₅₀) correspond à la concentration toxique pour 50% des cellules.

La CE₅₀ des prodrogues du TFV est en général plus basse que celle de la forme libre : 0,02 vs 1,1 µM (TDF vs TFV) (Delaney et al., 2006) et 0,1 vs 14 µM (TAF vs TFV) (Yang Liu et al., 2017). Le TDF a une CE₅₀ plus basse que le TAF : 1,2 vs 98,4 nM (TDF vs TAF) (Ma et al., 2018). Cette différence entre TDF et TAF en partie attribuable à l'hydrolyse du TDF dans le plasma. En effet, la CE₅₀ du TFV-diphosphate (forme active) est comprise entre 0,26 et 0,41 µM, que les cellules soient exposées au TAF ou au TDF (Ma et al., 2018).

Les CC₅₀ de ces molécules sont >100 µM et >44400 nM, respectivement (Delaney et al., 2006; Y. Liu et al., 2017; "Vemlidy 25 mg film coated tablets - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc)," n.d.).

Le TDF et le TAF inhibent efficacement la réplication des différents génotypes de VHB (A à H) et sont actifs sur les isolats résistants à la lamivudine, l'adéfovir ou l'entécavir (Y. Liu et al., 2017). Il a été noté une baisse de sensibilité de bas grade chez les isolats possédant les mutations rtA181V + rtN236T.

3.2.4 Activité *in vivo*

3.2.4.1 Chez les patients naïfs de traitement

Le TDF et le TAF présentent une efficacité similaire pour le traitement de l'infection chronique par le VHB. Ainsi, respectivement 91% et 90% des patients négatifs pour l'Ag HBe ont une charge virale VHB <29 UI/mL au bout de 96 semaines de traitement. Ces taux sont de 75% et 73% chez des patients positifs à l'Ag HBe (Buti et al., 2016, 2015; Kitrinos et al., 2014; Marcellin et al., 2008).

3.2.4.2 Chez les patients en échec de traitement

Pour les patients infectés par un VHB multirésistant, défini par la présence de mutations de résistances à au moins deux groupes d'analogues nucléos(t)idiques (L-nucléoside, phosphonate acyclique et D-cyclopentane) (Zoulim and Locarnini, 2012), le TDF a permis l'obtention d'une réponse virologique complète chez 64% des patients traités après 96 semaines de traitements (Patterson et al., 2011). Dans une autre étude, une réponse virologique complète a été observée chez plus de 79.4% des patients après 144 semaines de traitement (Lim et al., 2019). Chez les sujets explorés

par séquençage de résistance, il n'avait pas été retrouvé de nouvelle mutation pouvant expliquer l'échec thérapeutique. Une forte charge virale à l'introduction du traitement et la détection de l'Ag HBe étaient corrélées à une élimination plus lente du VHB (Lovett et al., 2017).

4 Stratégie thérapeutique

Actuellement, le traitement repose sur 2 classes de médicaments, les analogues nucléosidiques ou nucléotidiques qui vont viser la polymérase du virus, et le traitement par interféron α , aux effets immunomodulateurs. Il n'existe pas encore un médicament permettant l'élimination de l'ADNccc. Ainsi, l'objectif principal pour les patients HBV chroniques est une amélioration de la qualité de vie et de la survie en limitant la progression de la maladie vers la cirrhose et le CHC. L'efficacité du traitement sera déterminée par la disparition de la réplication virale, idéalement associée à une négativation de l'Ag HBs. Le traitement par NA avec une haute barrière génétique est associé à un taux de réponse virologique élevé mais aussi à une perte de l'Ag HBs très faible.

Ainsi, chez les sujets avec un Ag HBe positif, les taux de réponse virologique à l'ETV et au TDF après cinq ans de traitement étaient de 99%, 97% respectivement, et le taux de perte de l'Ag HBs étaient seulement de 2% et 3%.

Chez les patients négatifs à l'Ag HBe, le taux de réponse virologique à l'ETV et au TDF au bout de 5 ans de traitement étaient 98% et 99%, et le taux de négativation de l'Ag HBs était inférieur à 1% dans les deux cas (European Association for the Study of the Liver, 2017).

Concernant le TAF, les résultats intermédiaires à 48 et 96 semaines de traitement sont similaires à ceux du TDF à ces étapes. Le traitement doit donc le plus souvent être prolongé pendant de nombreuses années pour prévenir une réactivation à l'arrêt du traitement.

4.1 Stades de l'infection

Le VHB n'a pas d'action cytopathique directe sur les cellules. Il sera reconnu par les défenses immunitaires qui ciblent et détruisent les hépatocytes infectés, entraînant une inflammation et une nécrose du foie. Ce processus se produit de manière intermittente, parfois plusieurs fois dans la vie d'un patient HBV chronique. Le

traitement sera indiqué lors de ces phases immunologiquement actives pour en limiter les séquelles. L'évolution dans le temps a été divisé en 4 phases, selon les périodes d'immunotolérances, peu symptomatiques voire asymptomatiques, et les stades d'hépatites avec une perturbation des marqueurs biologiques et une symptomatologie plus évocatrice (Figure 19).

- Phase 1 : anciennement phase d'immunotolérance, montre une forte réplication virale avec des concentrations d'ALAT normales et la présence de l'Ag HBe.
- Phase 2 : hépatite B chronique Ag HBe positive, signe l'activation du système immunitaire. On observe une élévation des ALAT, ainsi qu'une inflammation plus ou moins sévère du foie. La charge virale diminue et l'Ag HBe se négative
- Phase 3 : l'infection chronique VHB Ag HBe négative, ce stade peut durer plusieurs années, avec une charge virale faible ou indétectable. Le risque de développer une cirrhose ou un CHC est faible.
- Phase 4 : hépatite B chronique Ag HBe négative, signe une reprise de la réplication virale et une réponse immunitaire fluctuante, avec des signes de nécroinflammation du foie. Les patients présentent régulièrement des variants précore ou dans le promoteur du gène C, associé à progression plus rapide vers une pathologie hépatique.

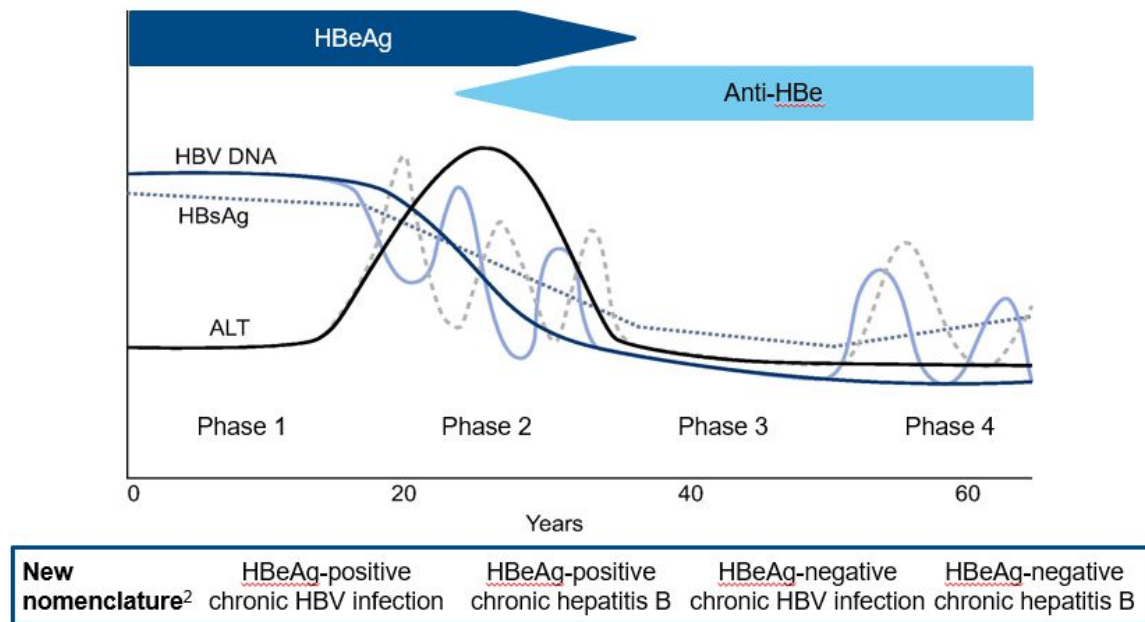


Figure 19 : Histoire naturelle de l'infection chronique VHB

Source : (European Association for the Study of the Liver, 2017)

4.2 Indications de traitement

Le traitement est indiqué chez les patients avec une charge virale supérieure à 2000 UI/mL et des ALAT au-dessus de la normale et/ou une inflammation ou une fibrose hépatique modérée. Sont aussi en indication de traitement, les patients avec une cirrhose compensée ou décompensée quel que soit le niveau de la charge virale et de la cytolysé hépatique. De plus, les individus présentant une charge virale supérieure à 20000 UI/mL et des ALAT supérieure à 2 fois la normale sont en indication de traitement sans attendre d'évaluer le degré de fibrose hépatique. Enfin, une prise en charge peut être indiquée pour une infection chronique VHB avec un Ag HBe positif chez un patient âgé de plus de 30 ans, ou avec des antécédents familiaux de cirrhose ou de CHC.

4.3 Populations particulières

Les patients coinfectés VIH/VHB présentent un risque accru de progression vers une cirrhose ou un CHC, ils doivent recevoir un traitement antiviral contenant du ténofovir sans attendre le nombre de CD4

Les patients infectés par le virus de l'hépatite delta doivent recevoir de l'interféron alpha pendant 48 semaines, ainsi qu'un NA si on constate une réplique VHB.

Cependant le PegIFN α est contre-indiqué chez ceux présentant une cirrhose décompensée et doit faire considérer une transplantation hépatique.

L'élimination du VHC par antiviraux à action directe (DAA) peut provoquer une réactivation du VHB. De ce fait, les patients en indication de traitement doivent recevoir un NA. Chez ceux présentant un Ag HBs positif seul, on peut envisager une prophylaxie de 12 semaines par NA, avec une surveillance resserrée. Pour les patients avec des Ag HBc isolés, une élévation des ALAT doit entraîner une vérification de la charge virale VHB.

Les patients devant recevoir une chimiothérapie ou un immunosuppresseur doivent être dépisté pour le VHB en amont. Ceux présentant des Ag HBc isolés recevront une prophylaxie par entécavir ou ténofovir si le risque de réactivation est considéré comme élevé.

4.4 Réponse thérapeutique

Lors d'une prise en charge par un NA, la réponse virologique est définie par une charge virale VHB indétectable par un test PCR avec une limite de détection de 10 UI/mL (Figure 20). Les échecs au traitement sont classés dans 3 situations :

- La non-réponse primaire, lorsque l'on constate une baisse inférieure à 1 log₁₀ de la charge virale après 3 mois de traitement
- L'échappement est défini par une augmentation de la charge virale de plus d'1 log₁₀ par rapport au nadir pendant le traitement.
- La réponse virologique partielle, où l'on observe une diminution de la charge virale de plus d'1 log₁₀, tout en restant détectable après plus de 12 mois de traitement bien conduit.

Dans tous les cas, il convient d'explorer les causes de cet échec, la première étant l'observance du patient. Les situations d'échec thérapeutique sous traitement bien conduit vont entraîner la recherche de mutation(s) de résistance par analyse du génome du VHB.

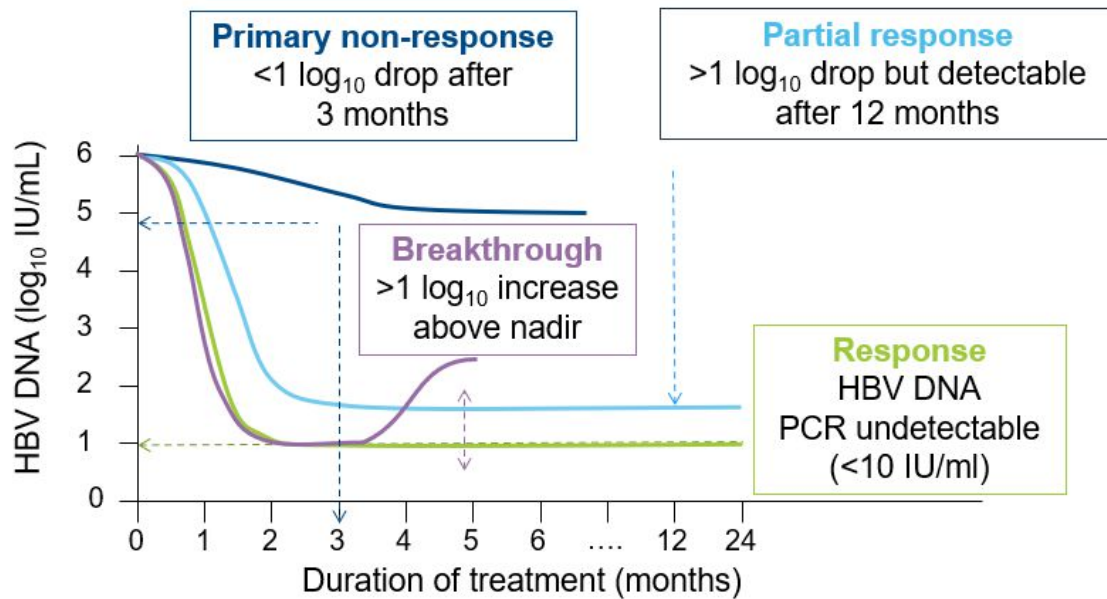


Figure 20 : Réponses virologiques au traitement par analogues nucléos(t)idiques

Source : (European Association for the Study of the Liver, 2017)

5 Résistance aux antiviraux

5.1 Mécanismes favorisant l'émergence de la résistance du VHB aux antiviraux

Habituellement, les virus à ADN ont un taux de mutation plus faible que les virus à ARN. Il est généralement admis que ces taux sont respectivement de 10^{-8} à 10^{-6} et de 10^{-6} et de 10^{-4} substitutions par nucléotide et par cellule infectée (Sanjuán and Domingo-Calap, 2016). Le VHB présente cependant une variabilité élevée, qui peut s'expliquer pour plusieurs raisons.

D'abord, la Pol/RT du VHB, comme toutes les polymérases ARN-dépendantes, ne possède pas de fonctions de correction. On observe ainsi un fort taux d'erreur, environ une toutes les 10^{-4} à 10^{-5} paires de base (Park et al., 2003). De plus, chez les patients infectés par le VHB, on observe fréquemment des charges virales élevées, jusqu'à 10^8 à 10^9 virions/mL de plasma, et on estime la production journalière à environ 10^{11} virions (Locarnini and Zoulim, 2010). Enfin, la persistance dans le temps de l'ADNccc dans les hépatocytes permet l'archivage des mutations sélectionnées dans la quasi-espèce virale.

En théorie, ces trois éléments font du VHB un des virus les plus variables. Cependant, une majorité de ces variants seront soit défectifs et éliminés, soit sans impact sur les structures et les fonctions du VHB. Enfin, l'organisation extrêmement compact de son génome, avec ses cadres de lecture se chevauchant, va probablement limiter l'émergence de nouvelles mutations, notamment si elles diminuent la capacité répliquative (*fitness*) de la particule virale (Kay and Zoulim, 2007). D'autres facteurs limitent l'émergence de résistance, notamment la réponse immune, la bonne observance, le faible niveau de réplication sous traitement et la barrière génétique élevé des nouveaux analogues.

La population virale du VHB est marquée par une grande diversité dès le début de l'infection, ainsi des virus mutants sont déjà en circulation à bas bruit en tant que quasi-espèces. Ces variants minoritaires seront de plus entretenus par l'archivage sous forme d'ADNccc. Certaines souches seront donc résistantes dès le départ au traitement antiviral, et pourront par la suite acquérir des mutations dites compensatoires pour augmenter leur capacité répliquative. On estime qu'environ 25% de patients naïfs de traitement par analogues nucléos(t)idiques présentent des quasi-espèces avec des mutations de résistance (Chevaliez et al., 2019).

5.2 Résistance croisée

Certaines mutations de résistance confèrent une résistance à plusieurs analogues. Ces phénomènes de résistance croisée peuvent expliquer un échec thérapeutique à une molécule, même en l'absence d'exposition préalable à cette dernière. Le Tableau 1 liste l'ensemble des mutations de résistance du VHB décrites dans les dernières recommandations de l'EASL 2017 et permet de visualiser les résistances croisées, notamment entre adéfovir et ténofovir (A181T/V et N236T).

Tableau 1 : Résistances croisées des mutations rencontrées les plus fréquemment lors des traitements par analogues nucléos(t)idiques.

HBV variant	LAM	LDT	ETV	ADV	TDF/TAF ^a
Wild-type	S	S	S	S	S
M204V	R	S	I	I	S
M204I	R	R	I	I	S
L180M + M204V	R	R	I	I	S
A181T/V	I	I	S	R	I
N236T	S	S	S	R	I
L180M + M204V/I ± I169T ± V173L ± M250V	R	R	R	S	S
L180M + M204V/I ± T184G ± S202I/G	R	R	R	S	S

La colonne de gauche montre la substitution observée avec la sensibilité pour chaque médicament. S : sensible, I : intermédiaire, R : résistant, LAM : lamivudine, ADV : adéfovir, ETV : entécavir, TDF : ténofovir disoproxil fumarate, TAF : ténofovir alafenamide.

Source : (European Association for the Study of the Liver, 2017)

5.3 Barrière génétique

Parmi les facteurs impliqués dans la résistance aux antiviraux, la barrière génétique va apprécier le nombre de substitutions d'acides aminés nécessaires à l'acquisition d'une résistance au médicament, tout en gardant une capacité répliquative, ou *fitness*, suffisante pour pouvoir se disséminer chez l'hôte infecté. Ceci permet la classification des médicaments en molécules ayant une faible barrière génétique, c'est-à-dire ne nécessitant que peu de mutations pour devenir résistant (lamivudine, adéfovir, telbivudine) et des molécules ayant une haute barrière génétique (entécavir, ténofovir). La Figure 21 permet d'observer l'incidence des résistances dans le temps des différents analogues nucléos(t)idiques utilisés dans le traitement des patients VHB. La faible prévalence des isolats résistants à l'entécavir ou au ténofovir à 5 ans de traitement illustre la barrière génétique élevée de ces composés.

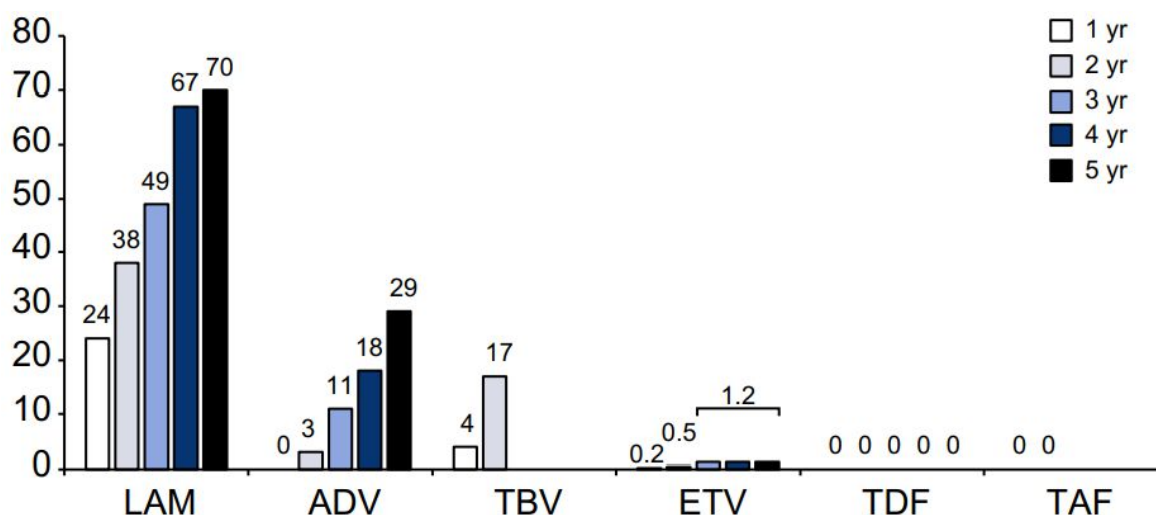


Figure 21 : Incidence cumulative de la résistance du VHB aux traitements par des analogues nucléos(t)idiques sur un à cinq ans.

LAM : lamivudine, ADV : adéfovir, ETV : entécavir, TBV : telbivudine, TDF : ténofovir disoproxil fumarate, TAF : ténofovir alafenamide

Source : (European Association for the Study of the Liver, 2017)

6 Les mécanismes de résistance du VHB au ténofovir

Les analogues nucléosidiques ou nucléotidiques sont les molécules les plus couramment utilisées pour le traitement des hépatites B chroniques, ils ne sont malheureusement pas curatifs et doivent être pris au long cours, ce qui pose le risque de l'apparition de mutations de résistance. De fait, les NA anciennes générations, la

lamivudine et l'adéfovir ne sont maintenant plus recommandés en 1^{ère} intention à cause d'une incidence significative d'apparition de résistance.

L'entécavir et le ténofovir, avec une barrière génétique haute, offre un rapport bénéfice/risque plus satisfaisant.

Cependant, on observe dans la pratique des échecs thérapeutiques à ces molécules et, dans la littérature, des associations de mutations conférant une résistance au ténofovir commencent à être rapportée (Liu et al., 2021; Park et al., 2019).

6.1 Mécanismes responsables de la sensibilité diminuée au ténofovir

La classe des phosphonates acycliques est représentée par l'adéfovir et le ténofovir, analogues de l'adénosine. Les principales mutations de résistance à l'adéfovir retrouvées sont rtA181V/T et rtN236T (Hadziyannis et al., 2006; Villeneuve et al., 2003). Les mutations rtA181V/T et rtN236T multiplient respectivement la CE₅₀ de 2.5 à 5 fois et de 7 à 10 fois par rapport à la CE₅₀ de la souche sauvage du VHB (Bartholomeusz et al., 2004; Qi et al., 2007). Ces mutations n'augmentent que modérément la CE₅₀ du VHB sous adéfovir mais sont à risque d'échec thérapeutique car une augmentation de posologie n'est pas recommandée pour ce médicament, du fait d'une toxicité rénale.

Le ténofovir a un mode d'action similaire à l'adéfovir envers la Pol/RT du VHB, il n'est donc pas surprenant d'observer une baisse de sensibilité de souches du VHB portant les mutations rtA181T/V, rtN236T ou les deux simultanément. La combinaison des deux mutations augmente la CE₅₀ d'un facteur 10 par rapport à la souche sauvage (Qi et al., 2007). *In vivo*, on peut observer une réponse plus tardive au ténofovir chez des patients infectés par un VHB résistant à l'adéfovir (Bömmel et al., 2010). Ces mutations ne sont pas associées à des échappements virologiques ou des non réponses au ténofovir, probablement car la posologie (245mg de TDF/j vs 10mg/j d'adéfovir) permet d'obtenir des concentrations intra-cellulaires plus élevées (Ratzliff et al., 2006).

6.2 Mutations de résistance au ténofovir en cours de caractérisation

Les mutations actuellement référencées dans les recommandations (European Association for the Study of the Liver, 2017) n'ont qu'un impact modéré sur la sensibilité du VHB au ténofovir et n'empêchent pas une prise en charge efficace en monothérapie (Lim et al., 2019). Les cas d'échecs thérapeutiques au ténofovir sont difficiles à trouver car les résistances à ce médicament sont très rares. Ces dernières années, les mutations rtA194T et rtS78T/sC69* ont été rapportés comme pouvant être

responsable d'une diminution de la sensibilité au ténofovir (Amini-Bavil-Olyaei et al., 2009; Shirvani-Dastgerdi et al., 2017), mais les tests phénotypiques effectués sur ces isolats ne montraient pas de d'augmentation significative de la CE₅₀ (Delaney et al., 2006; Shirvani-Dastgerdi et al., 2017). Récemment, deux patients présentant une quadruple mutation (rtS106C, rtH126Y, rtD134E et rtL269I) ont été décrits, cette combinaison semblant liée à un échappement thérapeutique et à une augmentation de la CE₅₀ jusqu'à un facteur 15.3 (Park et al., 2019). L'équipe ayant observée ces échecs a depuis confirmé ces résultats avec de nouveaux test phénotypiques utilisant plusieurs lignées cellulaires différentes (Lee et al., 2021).

6.3 Observance et ténofovir

Le but du traitement par analogues nucléos(t)idiques contre le VHB est d'éviter la progression de la maladie vers une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire. Le ténofovir a montré une réduction du risque de progression vers un CHC (Kim et al., 2015). Pour cela, une bonne observance au traitement est primordiale pour obtenir un bénéfice clinique sur le long terme et éviter l'apparition de résistance au traitement. Cependant, la bonne observance lors d'un traitement au long cours est difficile à obtenir (Chowdhury et al., 2013; Mills et al., 2006). La compliance globale a été estimée à 74.6% dans une revue de la littérature (Ford et al., 2018). Les principales causes de mauvaise observance sont l'oubli d'une prise, un manque de compréhension de l'importance du traitement bien conduit et la modification de la routine journalière. Ainsi, une attention particulière doit être portée à la compliance du patient au traitement, couplée à une bonne éducation thérapeutique. Il a été noté que l'auto-évaluation de l'observance par les patients a tendance à être surévaluée (Sangeda et al., 2014). Lors de l'exploration d'un échec thérapeutique au ténofovir, l'interrogatoire ne suffit pas obligatoirement à l'évaluation de l'observance du patient et un dosage plasmatique de la molécule peut être envisagé pour compléter l'enquête.

7 Exploration génotypique de la résistance

A cause de la persistance du VHB dans les hépatocytes, un traitement long, voire à vie, est nécessaire pour la majorité des patients. Mais, un traitement au long cours entraîne une augmentation du risque d'apparition de mutation de résistance. Ce qui peut amener à un échappement thérapeutique et, éventuellement, une dégradation de l'état clinique du patient. Le suivi des malades suppose un monitoring rigoureux au niveau clinique et virologique. La réapparition ou la persistance d'une charge virale

malgré un traitement bien conduit, va amener à rechercher des mutations de résistance dans le gène Pol/RT (aa1-344) codant la polymérase. Cela est le plus souvent réalisé par séquençage.

7.1 Le séquençage Sanger

Le domaine Pol/RT peut être amplifié et séquençé en utilisant des protocoles publiés et ouverts (Villeneuve et al., 2003), ou bien grâce à des kits commerciaux. Pour améliorer la sensibilité de ces tests, la plupart des kits débutent par une étape de PCR nichée. La séquence obtenue peut ensuite être analysée à l'aide d'outils en ligne, tels que Geno2Pheno (Max Planck Institute), ou bien HBVseq (Stanford University). La méthode de séquençage Sanger ne peut cependant pas détecter de mutations émergentes si ces dernières sont inférieures à 20% (Shaw et al., 2006).

7.2 Le séquençage profond (« *next generation sequencing* »)

Comme évoqué plus haut, près d'un quart des patients VHB portent en eux des quasi-espèces avec des mutations de résistance avant tout traitement antiviral, mais à des niveaux ne permettant pas de les détecter avec les méthodes de séquençage classique (Chevaliez et al., 2019). Pour s'affranchir de cette limite, des méthodes de séquençages profonds ont été développés, notamment par Roche (système 454) ou par Illumina (Miseq). Ces techniques permettent de mettre en évidence des sous-populations très minoritaires avec d'éventuelles mutations de résistance (Chevaliez et al., 2019). L'impact de ces sous-populations sur l'efficacité des traitements est pour le moment peu connu.

7.3 Exploration phénotypique de la résistance

Les tests phénotypiques sont indispensables à l'identification de nouvelles mutations de résistances. Ils vont permettre d'évaluer l'impact de cette mutation sur la molécule, mais aussi de tester d'éventuelles résistances croisées (Zoulim, 2006). Ces tests mesurent la capacité d'une molécule à inhiber la réplication virale en calculant la concentration inhibant de 50% la réplication du VHB (CE_{50}). Le rapport de la CE_{50} d'un isolat clinique sur la CE_{50} d'un isolat sensible permettra de calculer le facteur de résistance, reflet de l'effet des mutations sur l'antiviral. Il sera aussi possible de mesurer la concentration cytotoxique 50% (CC_{50}), c'est-à-dire la concentration diminuant de 50% la quantité de cellules viables.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Parmi les patients traités pour une hépatite B chronique, une minorité présente une réponse virologique partielle, voire une absence de réponse au ténofovir disoproxil fumarate. Ces échecs de traitement restent inexpliqués, ce qui complique l'adaptation thérapeutique et la prise en charge. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces profils de réponse. Premièrement, de nouvelles combinaisons de mutations pourraient conférer une résistance élevée au ténofovir et expliquer ces échecs. Deuxièmement, une mésobservance du patient, non détectée à l'interrogatoire pourrait contribuer aux échecs de traitement.

L'objectif de ce travail de thèse est de décrire, chez ces patients, les facteurs cliniques et virologiques ayant pu contribuer à la non-réponse ou à la réponse virologique partielle au ténofovir. Pour cela, les mutations sélectionnées dans le domaine Pol/RT des isolats cliniques au cours du traitement seront recherchées par séquençage à haut débit. Par ailleurs, l'observance thérapeutique sera évaluée par dosage des concentrations plasmatiques de ténofovir.

Les éventuelles combinaisons de mutations identifiées pourraient être caractérisées par une approche phénotypique dans un futur travail, permettant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes de résistance au ténofovir. Enfin, l'analyse des résultats de dosage pharmacologique pourra contribuer à évaluer l'intérêt de cette approche, en complément de l'interrogatoire ou d'autres méthodes d'évaluation de l'observance.

PARTIE EXPERIMENTALE

1 Introduction

Ce projet a débuté par le constat qu'un certain nombre de patients traités pour une hépatite B chronique et présentaient une réponse virologique partielle voire une absence de réponse au ténofovir disoproxil fumarate. Ces patients ont été identifiés rétrospectivement parmi l'ensemble des génotypes de résistance du VHB réalisés au CHU de Tours (2011-2018), pour des patients provenant de l'ensemble de la région Centre-Val de Loire.

Dix patients en échec inexplicable de traitement par ténofovir ont été identifiés et explorés rétrospectivement par analyse du dossier médical, séquençage à haut débit avant traitement et à l'échec de traitement, et dosage pharmacologique des concentrations plasmatiques de ténofovir.

2 Matériel et méthodes

2.1 Inclusion des patients

Le recueil d'échantillons de plasma s'est effectué à partir de patients testés en routine, entre 2011 et 2020, pour le diagnostic ou le suivi moléculaire du VHB. Ces échantillons ont été conservés à -20°C. Nous avons inclus des patients en échec de traitement par ténofovir, que ce soit une non réponse primaire, un échappement ou une réponse partielle au traitement (European Association for the Study of the Liver, 2017). Le dossier clinique de ces patients a été analysé rétrospectivement à la recherche de comorbidités. L'atteinte hépatique a été évaluée à l'aide de marqueurs non invasifs (Fibromètre ou élastographie impulsométrique) ou par une biopsie du foie. Ces examens ont permis d'évaluer la fibrose et l'inflammation hépatique selon le score Metavir. La charge virale a été réalisée avec la technique RealTime HBV (Abbott). Le génotypage à la recherche de résistance au ténofovir a été effectué dans le cadre du soin courant par l'amplification du domaine Pol/RT (aa rt1-rt344) (Villeneuve et al., 2003).

2.2 Séquençage profond du domaine Pol/RT

L'ADN du VHB a été extrait avec le kit DSP virus (Qiagen) sur le système EZ1 Advanced XL. L'amplification de la région de la polymérase du virus a été effectuée en utilisant les amorces suivantes : OS1 (GCCTCATTTTGTGGGTCACCATA) et P1R (TCACGGTGGTTTCCATGCGA). Cette PCR nécessitait 200 nM de chaque amorce, 5 µL d'extrait d'ADN et 45 µL de Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). La réaction de PCR a été effectuée sur un thermocycleur T3000 (Biometra) avec les paramètres suivants : 2 min à 98°C, puis 38 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 54°C et 3 min à 68°C, avec une étape finale de 10 min à 68°C.

Pour améliorer le rendement, il a parfois été nécessaire de procéder à une PCR « nichée ». 5 µL du produit de PCR précédent ont été amplifiés avec les amorces RT_F (GGAATTCCACTGCCTTCCACCAAGCTC) et RT_R (GGTTCCACGCATGCGCTGATGG), chacune à 200 nM et 45 µL de Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity. Le programme de PCR utilisé a été le suivant : 2 min à 94°C, suivi de 38 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 58°C et 2 min à 68°C, et une étape finale d'élongation de 10 min à 68°C.

Les produits de PCR ont été purifiés par précipitation à l'acétate de sodium 0,3M (1/2 volume) et à l'isopropanol (2 volumes) à -20°C puis centrifugation à 15000 g pendant 20 min. Le culot d'ADN a été rincé avec 1 mL d'éthanol à 70° puis remis en suspension dans 40 µL d'eau. La qualité et la quantité de l'ADN purifié a été évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm et calcul des ratio d'absorbance à 260/280nm et 260/230 nm (Nanodrop, Fischer).

La préparation des bibliothèques d'acides nucléiques a été effectuée avec le kit Nextera XT DNA (Illumina, San Diego, USA) selon les instructions du fabricant. Des « reads » de séquençage paires de 150 paires de bases ont été obtenus avec la plateforme Miseq (Figure 22). Les fichiers contenant les séquences produites ont été analysés avec la plateforme Galaxy après avoir vérifié la qualité des « reads » (FastQC). Les séquences ayant un QC supérieur à 30 et une longueur de plus de 30 nucléotides ont été conservées. L'assemblage *de novo* a été effectué par le programme Trinity et vérifié avec l'outil Blast disponible sur le site du National Center for Biotechnology Institute (NCBI). La séquence consensus ainsi obtenue pour chaque isolat a été comparée aux isolats de même génotype décrits dans la littérature, à l'aide de l'outil Geno2pheno [hbn] v2.0 (Max Planck Institute). Cet outil a permis d'établir la liste des

polymorphismes et mutations de résistance ou d'échappement détectées dans le domaine polymérase/transcriptase inverse (Pol/RT) ou dans l'Ag HBs, respectivement. La souche X02763 (génotype A), avec la numération d'usage, a été utilisée pour l'annotation des mutations. L'ensemble des séquences obtenues pour chaque isolat ont été cartographiées sur la séquence consensus avec l'outil Bowtie2. La diversité des nucléotides a été analysée position par position en utilisant le programme mpileup. Les positions contenant une profondeur supérieure à X100 ont été retenues pour continuer l'analyse. Seules les mutations représentant au moins 1% des quasi-espèces du VHB ont été analysés. La diversité à chaque position dans la séquence en acides aminés de la Pol/RT et de l'Ag HBs a été étudiée et comparée entre les isolats pré et post-traitement.

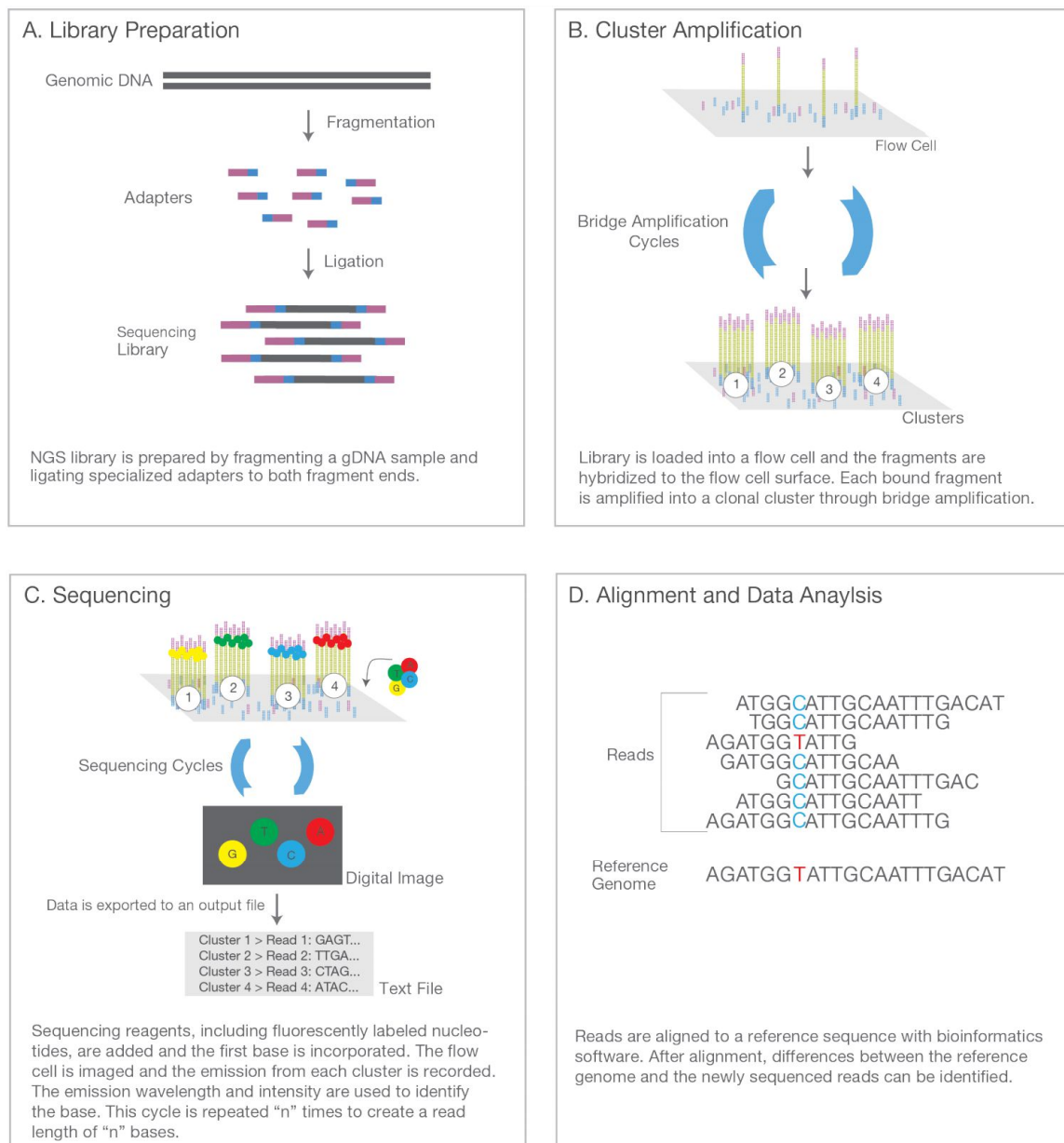


Figure 22 : Etapes de séquençage NGS par la méthode Illumina

A : L'ADN est fragmenté aléatoirement, puis des adaptateurs vont se lier à ces morceaux d'ADN. B : Les fragments d'ADN vont pouvoir se fixer sur la flowcell grâce aux adaptateurs et vont subir une étape d'amplification de proche en proche (en cluster). C : Le séquençage va être effectué à l'aide de nucléotides fluorescents. Une acquisition de la longueur d'onde émise lors de l'incorporation d'un nucléotide va permettre le séquençage complet du fragment d'ADN. D : Les reads sont alignés par rapport à une séquence de référence à l'aide d'outils bioinformatiques, ce qui permet l'identification d'éventuels variants.

Source : Illumina (www.illumina.com) ("An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology," n.d.)

2.3 Suivi pharmacologique du ténofovir

Le dosage du ténofovir a été effectué par une méthode de chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC MS/MS) (Nirogi et al., 2009), à partir de plasma prélevé sur des tubes EDTA. Cette analyse a été réalisée gracieusement par le Dr MC Gagnieu (CHU de Lyon). Du ténofovir-D6 a été incorporé aux échantillons en tant qu'étalon interne, puis ces échantillons ont ensuite été préparés grâce à une extraction sur phase solide avec une colonne Bond Elut C18 (Agilent technologies, Santa Clara, USA). Les extraits secs ont été repris avec de l'eau. La séparation chromatographique est réalisée sur un système UPLC Acquity à l'aide d'une colonne de type CORTECS C18 1.6 μ m. Les analytes sont ensuite détectés grâce à un spectromètre de masse de type Xevo TQMS (Waters Corporation, Milford, USA). Brièvement, en sortie de colonne, les molécules sont ionisées par une source électrospray (ESI) positive, sélectionnées dans un premier quadripôle, fragmentés dans une chambre de collision puis les fragments générés sont de nouveau sélectionnés par un second quadripôle. Les transitions MRM choisies pour l'analyse du ténofovir sont 288.242 – 176.161 pour la quantification et 288.242 – 159.059 comme ion de confirmation (Figure 23). L'étalon interne (ténofovir-D6) est quantifié sur la transition MRM 294.154 – 182.147. Le domaine de mesure de cette s'étend entre 5 ng/mL à 2000 ng/mL.(Garraffo et al., 2018).

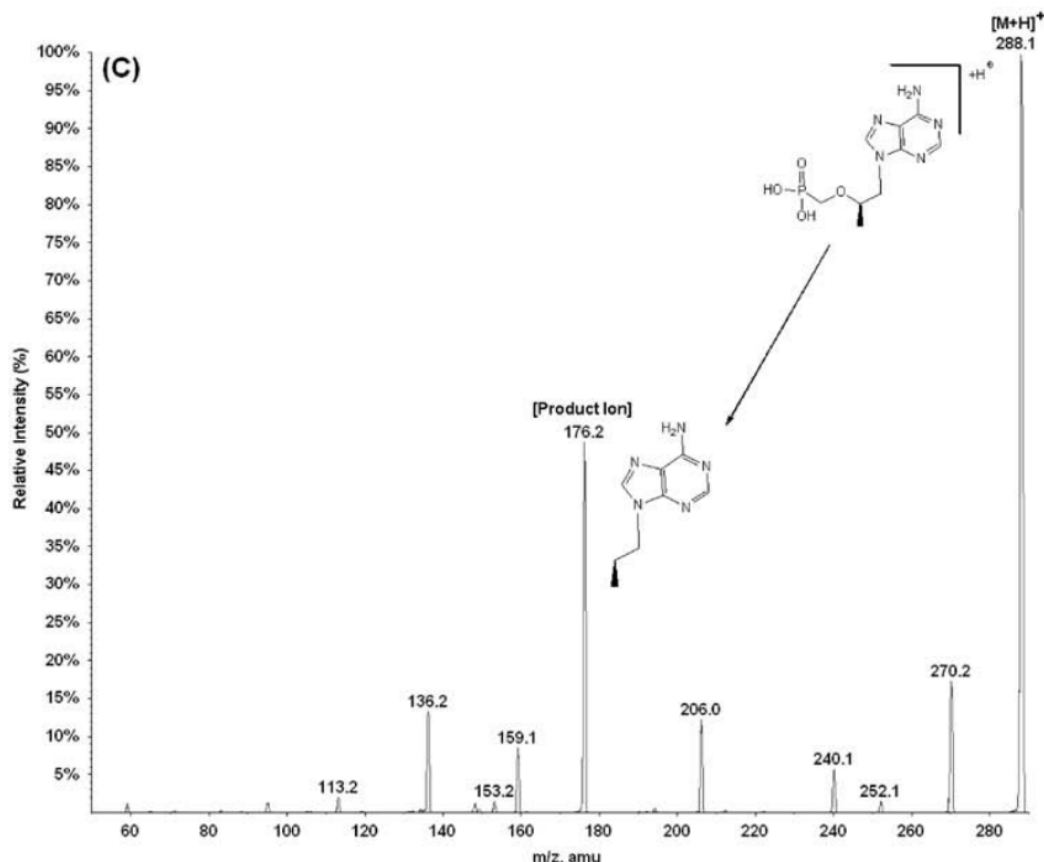


Figure 23 : Scan complet des produits d'ionisation par électronébuliseur positif du ténofovir

Source : (Nirogi et al., 2009)

3 Résultats

3.1 Contexte clinico-biologique des échecs de traitement par ténofovir

Un total de 110 génotypes de résistance du VHB a été effectué sur la période étudiée. Parmi ces échantillons, 10 étaient associés à un échec de traitement au ténofovir, confirmés par la détection et la quantification d'ADN du VHB par la technique Real Time HBV (Abbott) utilisé au laboratoire. Les informations cliniques et virologiques de ces patients sont indiquées dans le tableau 1. Quatre patients (P10, P26, P27, P28) ont été exclus à cause d'une mauvaise observance retrouvée à l'interrogatoire, et les six autres ont été inclus. Parmi ces isolats, quatre étaient associés à des réponses partielles (P15, P16, P18, P22), un à un échappement thérapeutique (P31) et un à une non-réponse primaire au traitement (P20), selon les recommandations de l'EASL. Le suivi thérapeutique et virologique de ces patients est présenté dans la Figure 24 et le Tableau 2 pour les suivis les plus longs (P18 et P20) et en annexe pour les autres.

La patiente P18, née en Thaïlande en 1977, a été diagnostiquée d'une infection chronique par le VHB en 1994. L'hépatite était peu active et la patiente a ensuite été surveillée sans prise en charge médicamenteuse. En 2013, une élévation des transaminases et l'apparition de nodules hépatiques ont été constatés. La biopsie hépatique retrouvait des signes d'activité minime du VHB, avec un score Métavir A1 F0/F1. Devant l'antécédent de CHC chez le père et la charge virale élevée (8.32 log₁₀ UI/mL), il a été décidé l'introduction de TDF en décembre 2013. La charge virale VHB est restée détectable jusqu'en 2016 (réponse virologique partielle) puis est devenue indétectable.

Le patient P20 a été diagnostiqué VIH en 1992, en stade C avec un nadir de CD4 à 2 par mm³. Il a été diagnostiqué la même année une coinfection par le VHB. Ce patient a fait l'objet d'une prise en charge complexe avec la mise en place de nombreuses lignes de traitements. Une insuffisance rénale chronique est apparue en 1997 et le patient est dialysé trois fois par semaine depuis 2004. De plus, il fait preuve d'une compliance aléatoire au niveau de la prise de ses traitements avec une charge virale VHB fluctuante entre 3 et 8 log UI/mL. Cependant, plusieurs dosages plasmatiques du ténofovir durant sa prise en charge ont retrouvé des concentrations élevées en médicament. Une dissociation entre la charge virale VIH (<1,6 log cp/mL) et la charge virale VHB (3 à 7 log₁₀ UI/mL) a été observée pendant une partie du suivi du patient.

La patiente P31 a une histoire particulière, son hépatite B chronique a été traitée efficacement par du TDF entraînant une disparition de l'ADN du VHB dans le plasma à partir de 2018. En février 2020, il a été introduit de l'interféron α pegylé. Une augmentation de la charge virale VHB à 3.57 log₁₀ UI/mL a été observée en mars 2020. L'échec de l'amplification par PCR n'a pas permis d'effectuer un séquençage à la recherche de mutation de résistance. Un prélèvement de contrôle en juin 2020 a retrouvé une charge virale VHB à 3.5 log₁₀ UI/mL, toutefois le séquençage par la méthode Sanger n'a, cette fois encore, pas pu être réalisé. Il est intéressant de noter que durant cette période, l'Ag HBs sous bithérapie a régulièrement diminué.

La recherche de mutation de résistance dans le domaine Pol/RT des dix isolats cliniques inclus n'a retrouvé aucune mutation affectant la sensibilité au ténofovir. L'isolat P22 présentait les mutations rt180M et rt204V entraînant une résistance à la lamivudine et une sensibilité réduite à l'entécavir. Ces mutations ont été associées à une augmentation d'un facteur 2 de la CE₅₀ du ténofovir, considérée comme non significative (Delaney et al., 2006). L'amplification du domaine Pol/RT et la recherche

de mutations de résistance a échouée pour les isolats P18 (inexpliqué) et P31 (possible dégradation des acides nucléiques viraux par effet de l'interferon). Il n'a pas été réalisé pour l'isolat P28 (non-observance).

Tableau 2 : Profils cliniques et virologiques des patients en situation d'échec thérapeutique au ténofovir

Isolat	Sexe	Age (années)	Comorbidités	Metavir	Ag HBe	Traitements antérieurs	Durée traitements (années)	Génotype VHB	Charge virale à l'échec (UI/mL)	Dosage ténofovir (ng/mL)	Mutations de résistance aux analogues
Mésobservance											
P10	M	25	Non	A3-F4	-	Aucun	1	NC	7.93 log10	Non fait*	Non fait*
P26	F	46	NC	NC	NC	Lamivudine	17	E	4.45 log10	Non fait*	Non fait*
P27	M	48	NC	NC	NC	Lamivudine Adéfovir	15	D	5.57 log10	Non fait*	Non fait*
P28	M	31	NC	NC	NC	NC	NC	NC	4.9 log10	<5	Non fait*
Bonne observance											
P15	M	49	NC	NC	NC	NC	2	D	2.03 log10	240**	Sensible
P16	M	61	Psoriasis sous méthotrexate	NC	+	NC	1	B	1.6 log10	160**	Sensible
P18	F	43	Non	A0-F1	+	Aucun	1	C	2.03 log10	108**	Non réalisable
P20	M	63	VIH IRC dialysé	A1/2- F1/2	-	Lamivudine Emtricitabine	25	A	5.94 log10	500	Sensible
P22	F	45	VIH	F0-F1	+	Lamivudine Entécavir	17	E	1.53 log10	165**	LAM-R, ETV-I
P31	M	46	NC	NC	-	Interféron α	>3	A	3.27 log10	76**	Echec

Non fait* = Mésobservant ; **, dosage rétrospectif

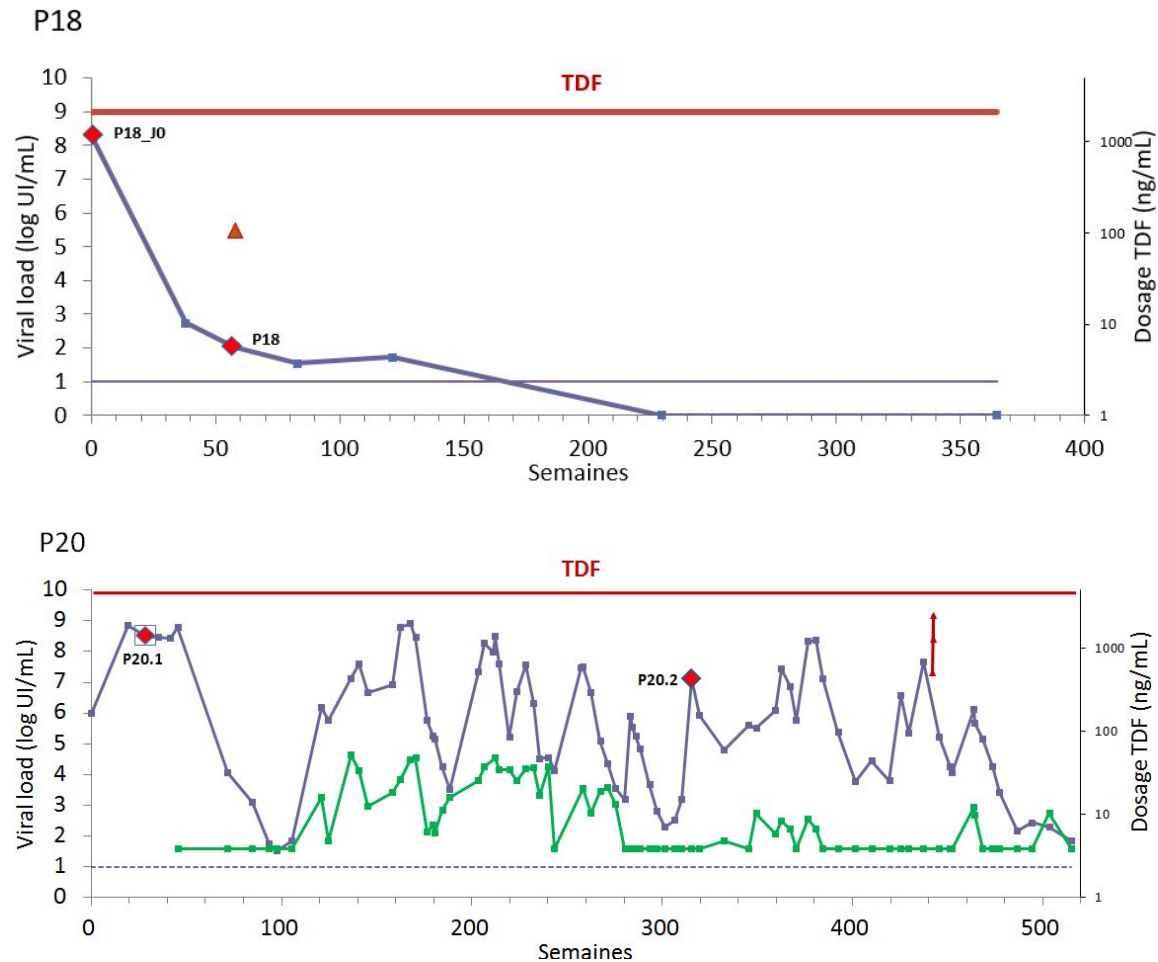


Figure 24 : Suivi virologique de patients en échec de traitement par le ténofovir

La courbe bleue représente la charge virale VHB au cours du temps. La courbe verte chez le patient P20 montre la charge virale VIH au cours du temps. Le point triangulaire représente le dosage rétrospectif du ténofovir plasmatique chez le patient P18, et la courbe rouge chez le patient P20 la cinétique du ténofovir effectué sur une semaine (concentrations plasmatiques résiduelles observées du ténofovir : 40-90 ng/mL).

3.2 Evaluation rétrospective de l'observance

La concentration plasmatique résiduelle observée du ténofovir aux posologies recommandées est située entre 40 et 90 ng/mL (Garraffo et al., 2018). L'analyse rétrospective du ténofovir plasmatique a montré la présence de ténofovir, excepté pour le patient P28 (<5 ng/mL), pour lequel il était suspecté une mésobservance (Tableau 2). Ces résultats semblent cohérents avec l'interrogatoire des patients pour lesquels il n'était pas retrouvé de mauvaise compliance au traitement.

3.3 Apport du NGS à la recherche de mutations de résistance

L'objectif de cette partie du travail était de déterminer si le NGS et le séquençage Sanger aboutissaient à des conclusions comparables concernant la présence de mutations de résistance. Le domaine Pol/RT a été amplifié et analysé pour deux isolats (P18 et P20). Les séquences consensus obtenues ont ensuite été analysées avec l'outil Geno2Pheno (Max Planck Institute). Le domaine Pol/RT n'a pas pu être amplifié pour réalisation du NGS pour les quatre autres isolats en échec inexplicable de traitement par ténofovir (P15, P16, P22 et P31).

Concernant P18, la mutation rtA317S a été détectée par NGS. Cette mutation a été décrite dans des échecs de traitement au ténofovir, mais uniquement en association avec une combinaison de neuf autres mutations (Cho et al., 2018). La mutation I269L, détectée chez ce patient, a aussi été associée à une résistance au ténofovir, mais uniquement dans le cadre de la combinaison de mutations « CYEI » non détectée ici (Park et al., 2019).

Il n'y avait pas de différence d'interprétation entre le séquençage Sanger et le séquençage profond pour l'isolat 20 (Tableau 2). A noter toutefois la détection d'une mutation majoritaire détectée uniquement par NGS dans l'enveloppe (L209V), sans impact clinique connu. On peut aussi noter la détection de la mutation rtL217R, associée, en combinaison avec d'autres mutations, à une augmentation modérée de la CE₅₀ du ténofovir (Lada et al., 2012).

Tableau 3 : Récapitulatif des mutations majoritaires et leur impact sur le VHB

	Pol/RT (+ sensibilité au ténofovir)		S	
	Sanger	NGS	Sanger	NGS
P18	En cours	N13S, P109S, Q267L, I269L, A317S, L336M (sensible)	En cours	S3N, T5A
P20	L217R (sensible)	L217R (sensible)	Aucune	L209V

* Par comparaison à une séquence consensus représentant l'ensemble des autres isolats de ce génotype

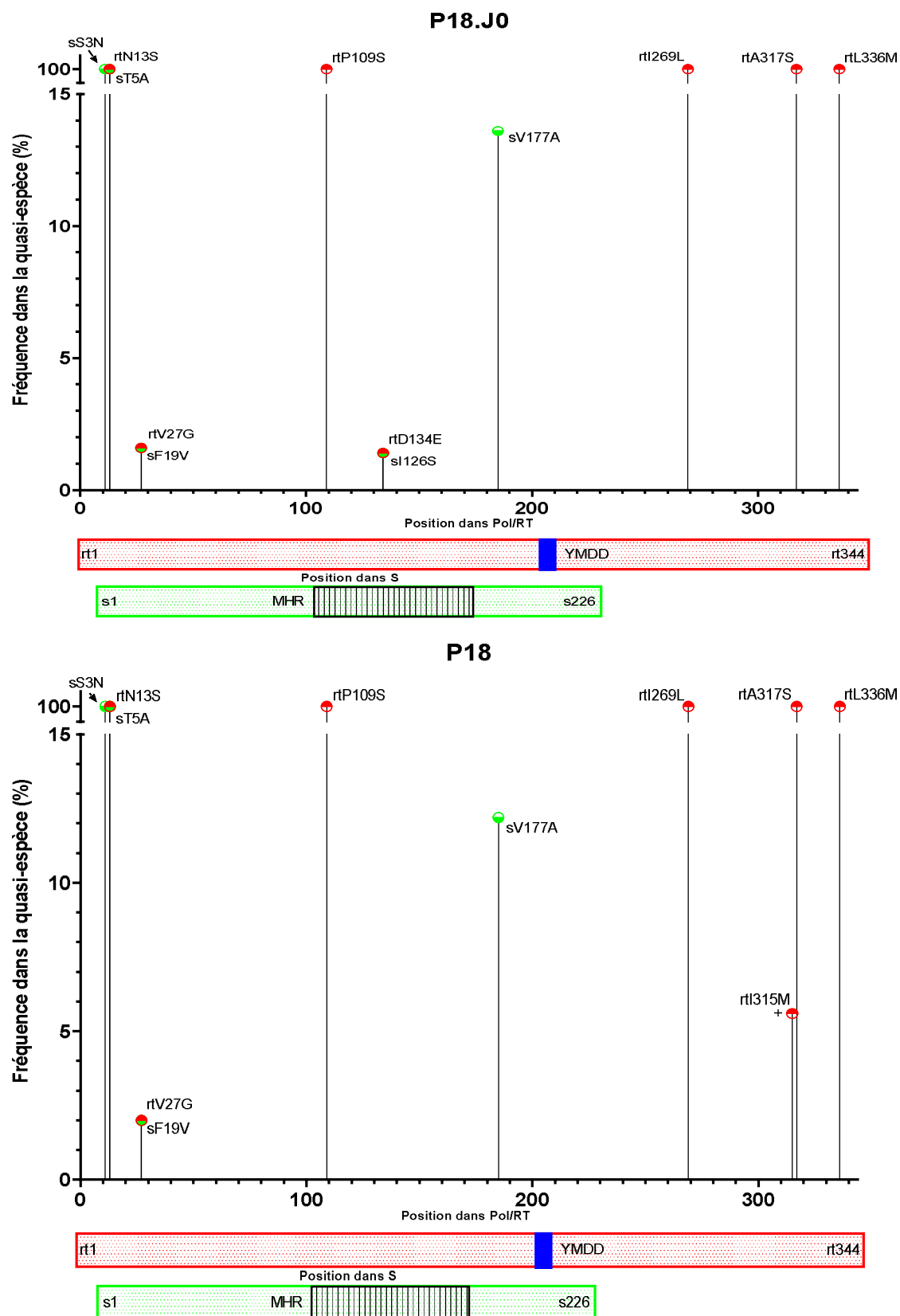
3.4 Evolution de la diversité virale au cours du traitement

L'évolution de la diversité virale au cours du traitement a été étudiée pour les deux patients pour lesquels des isolats séquentiels étaient disponibles (P18 et P20). Pour le patient P18, l'isolat collecté au diagnostic de l'infection par le VHB (P18.J0) a été comparé à l'isolat collecté au moment de l'échec (P18, Figure 24 & Figure 25). Pour le patient P20, le prélèvement au diagnostic n'était plus disponible. Par conséquent, l'évolution de la diversité virale a été étudiée sur une fenêtre de 5 ans au cours de laquelle le patient ne répondait pas au traitement par ténofovir (P20.1 et P20.2, Figure 24 & Figure 26).

Le séquençage profond a permis d'étudier l'évolution des quasi-espèces virales qui pourrait être induite par la pression de sélection du ténofovir au cours du temps. L'objectif était d'observer l'émergence de mutations qui pourraient conférer un avantage envers le ténofovir.

Chez le patient P18, une seule position est associée à une évolution de la diversité >5 %. A cette position, on note l'apparition de la mutation minoritaire rtI315M (0% puis 5% à l'échec). Cette dernière, d'impact inconnu, est retrouvée chez 0,1% des isolats de génotype C. Par ailleurs, on peut noter la disparition au cours du traitement d'une double mutation rtD134E/sI126S (1% puis 0%). La mutation sI126S a été associée des situations d'échappement au vaccin (Avellón and Echevarria, 2006; Lazarevic et al., 2019). De plus, la mutation associée sur le domaine Pol/RT rtD134E a été rapportée récemment dans une combinaison de mutations (absente dans cet isolat) semblant conférer une résistance au ténofovir (Lee et al., 2021; Park et al., 2019). Les autres mutations minoritaires restant stables. Les autres mutations n'étaient pas associées à une résistance aux antiviraux ou à un Ag HBs mutant.

Chez le patient P20, quatre positions étaient associées à une évolution de la diversité >5 %. Les mutations correspondantes, rtS105T, sP178Q, rtS332R et rtK333Q semblent émerger dans la quasi-espèce (+5%). Ces mutations sont retrouvées chez 1,9 ; 0,1 ; 2,3 et 7 % des isolats de génotype A. La mutation rtK333Q a été associée à des échecs de traitement au ténofovir, mais uniquement en combinaison avec neuf autres mutations (Cho et al., 2018). Les trois autres mutations n'ont aucun impact clinique connu. D'autres mutations minoritaires émergent au cours du traitement mais restent <5% de la quasi-espèce (sL22s, sS55F, sR79H, rtN118T/sI110L, rtV173M et rtA342S). Le reste des mutations observées n'étaient pas associées à une résistance aux analogues nucleos(t)idiques ou à une mutation d'échappement de l'Ag HBs.



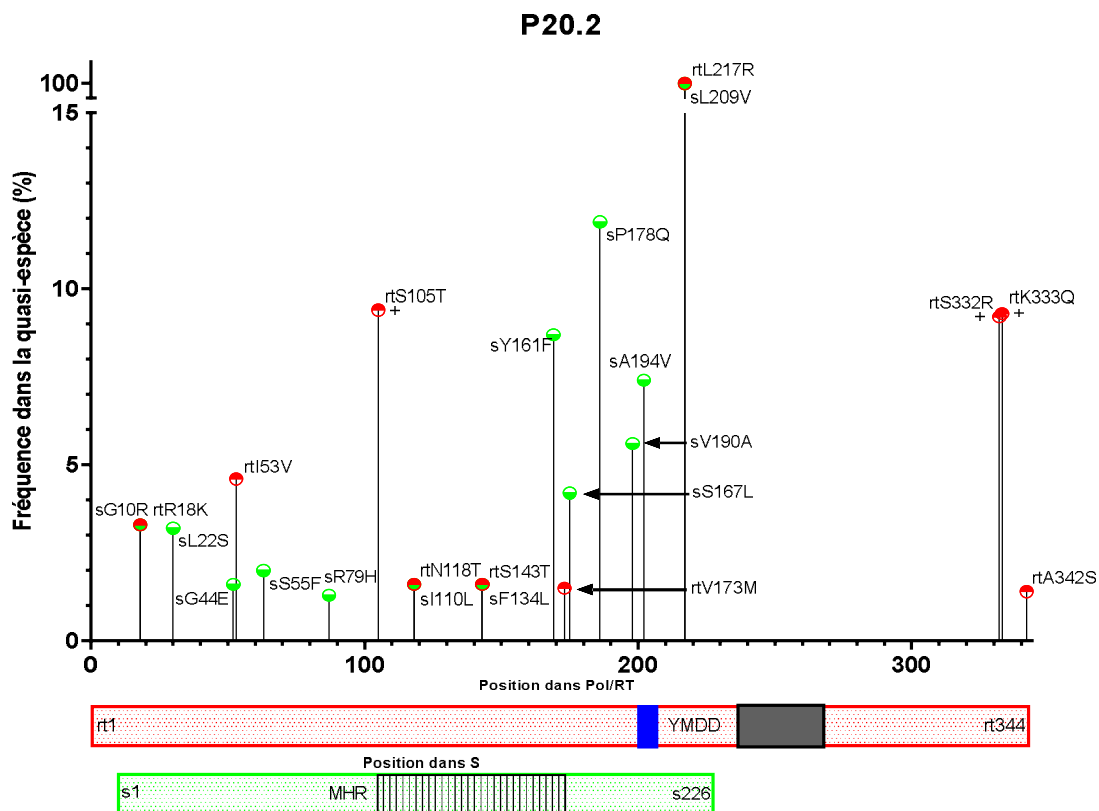
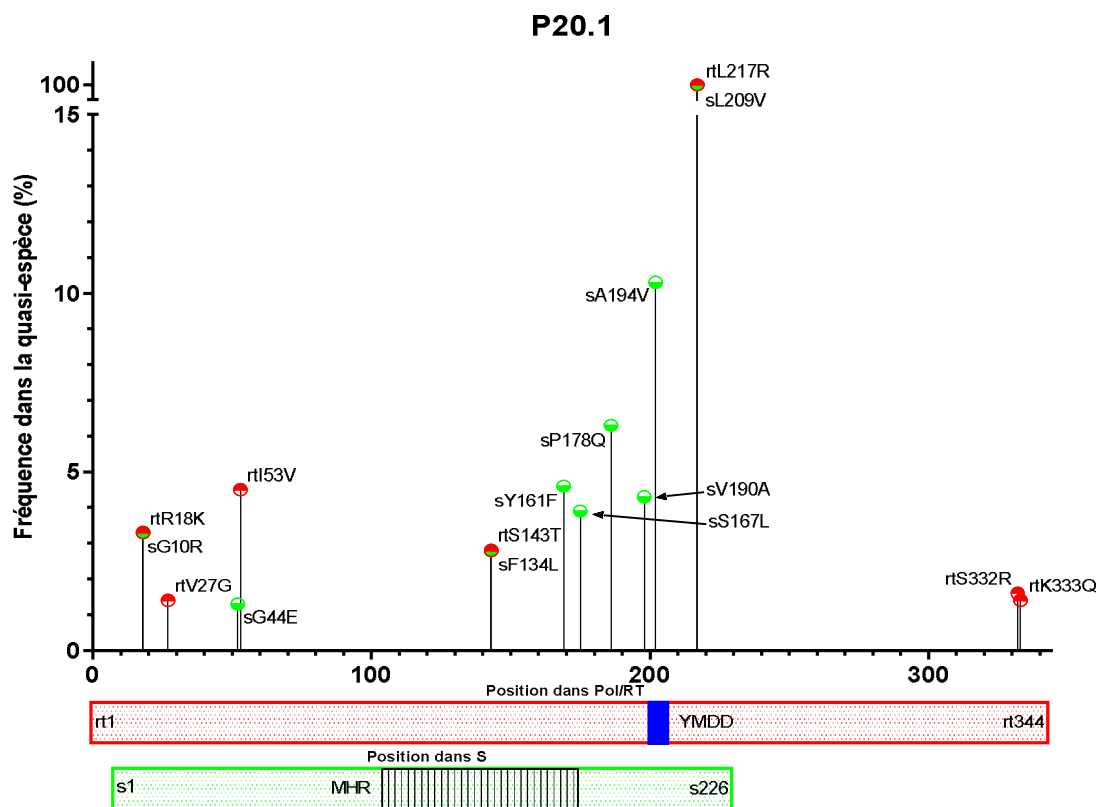


Figure 26 : Evolution de la diversité au sein du domaine Pol/RT chez le patient P20

Les mutations représentées en haut de chaque figure (au 100 %) représentent la diversité par rapport aux autres isolats de même génotype (différence entre la séquence consensus de l'isolat clinique et la séquence consensus des isolats de même génotype). Les mutations représentées en dessous (<100 %) sont celles avec une diversité >1% au sein de l'isolat clinique. Le signe (+) représente les mutations qui varient de plus de 5% entre les deux isolats. La zone grisée dans la figure du bas représente la partie n'ayant pas pu être séquencée dans le domaine Pol/RT.

4 Discussion

Le but de ce travail était de décrire les facteurs cliniques et virologiques ayant pu contribuer à la non-réponse ou à la réponse virologique partielle au ténofovir. Une meilleure compréhension des mécanismes de cet échappement permettrait une meilleure prise en charge de ces patients.

Les échecs thérapeutiques des pathologies infectieuses chroniques sont des phénomènes multifactoriels, impliquant des facteurs viraux, pharmacologiques et d'hôte (Zoulim, 2004). Les facteurs viraux rassemblent les mutations du virus et l'impact sur sa capacité répliquative, la diversité virale représentée par les quasi-espèces, l'éventuel apparition de mutants résistant aux antiviraux ou échappant au système immunitaire, et la durée de vie des hépatocytes infectés entretenant la dissémination virale chez l'hôte. Ensuite, les paramètres pharmacologiques du médicament sont à prendre en compte, tel que la barrière génétique, la puissance d'inhibition de la molécule et sa pharmacocinétique. Enfin les facteurs liés à l'hôte concernent l'efficacité de son système immunitaire, l'espace de réplication disponible (Zhou et al., 1999) et sa compliance au traitement, le tout appliquant une pression de sélection sur le pathogène.

Le séquençage haut-débit ne nous a pas permis d'identifier de mutations de résistance. Des mutations minoritaires ont été observées, dont certaines sont impliquées dans la résistance au ténofovir si elles sont associées en combinaison à d'autres mutations, notamment une (rtD134E) faisant partie de la quadruple mutation CYEI qui a été rapporté récemment. Une analyse de la fréquence des mutations au sein des quasi-espèces sur un grand nombre d'isolats associés à un échec thérapeutique permettrait de mieux comprendre les mécanismes de non-réponse, en association avec une approche phénotypique. Cette approche nécessite toutefois des échantillons pré-traitement et des charges virales supérieures à 3 log UI/mL.

Le séquençage haut-débit, utilisé ici, présente plusieurs avantages pour permettre la détection de mutations minoritaires qui ne seraient pas observées avec le séquençage Sanger, lorsqu'elles sont inférieures à 20% (Mohamed et al., 2014). Cela permet d'estimer la fréquence de quasi-espèces virales, et l'évolution sous la pression sélective d'un médicament de ces quasi-espèces dans le temps. Posséder un échantillon avant l'introduction d'un traitement semble être une bonne approche pour étudier plus finement ces mutations et l'impact sur la résistance. Cependant, il convient de définir un seuil de détection de ces quasi-espèces au-dessus duquel l'impact serait significatif sur l'évolution virologique et/ou clinique des patients infectés par le VHB. La

limite de détection de variants par un séquençage profond a été estimé à 0.25% sur des fragments de 500 pb (Ramírez et al., 2013), ce seuil diminuant à mesure que les fragments de lectures sont courts. L'impact des quasi-espèces sur l'efficacité des traitements antiviraux est peu connu, et un seuil permettant d'apporter une information pertinente au clinicien reste à définir. Des études effectuées sur le VIH ont évalué qu'un mutant présent dans 5% de la population virale permettrait de prédire un échec thérapeutique futur aux médicaments (Trabaud et al., 2017). Dans tous les cas, les mutations associées à une résistance au traitement deviennent majoritaires, au moment de l'échec. La technique de séquençage haut-débit est aussi limitée par des contraintes de longueur de fragments, ne posant pas de problème pour l'évaluation des fréquences de mutations dans une population virale, mais empêchant la détermination des haplotypes au sein de cette population. A titre d'exemple, le domaine Pol/RT du gène de la polymérase possède 1021 pb, il n'est pas possible d'affirmer qu'une mutation minoritaire au début du gène se trouve sur le même brin d'ADN qu'une autre mutation détectée à la fin de ce gène. L'utilisation de techniques permettant de séquencer des fragments de grande taille pourrait améliorer la compréhension et l'impact des combinaisons de mutations *in vivo* sur les résistances aux antiviraux. Enfin, une autre limite des méthodes de séquençage est la nécessité d'obtenir des isolats contenant une charge virale suffisamment élevée pour pouvoir être amplifié correctement. La plupart des patients en situation d'échec thérapeutique concernent des réponses virologiques partielles ou des rebonds (Kitrinos et al., 2014) et présentent alors des charges virales faibles. Il est admis qu'en-dessous d'une charge virale VHB de 1000 UI/mL, 50% des échantillons ne seront pas amplifiés correctement par PCR.

Concernant la pharmacologie du ténofovir, il est reconnu comme ayant une forte efficacité envers le VHB et le VIH, une haute barrière génétique et une excellente tolérance, avec un faible risque de toxicité rénale ou osseuse. Cela le place comme traitement de 1^{ère} ligne dans les dernières recommandations internationales (European Association for the Study of the Liver, 2017; "KASL clinical practice guidelines for management of chronic hepatitis B," 2019; Sarin et al., 2016; Terrault et al., 2018). Cependant on peut observer jusqu'à 10% de patients traités au long cours qui conservent une charge virale VHB détectable (Cathcart et al., 2018; Kittrinos et al., 2014), même si ce taux diminue avec la durée du traitement. Le dosage pharmacologique du ténofovir dans le plasma peut alors se révéler utile lors de l'enquête pour étudier les causes de ces échecs. Un faible niveau de ténofovir orientera généralement le clinicien vers une non-observance du traitement, un problème majeur dans la prise en charge des patient chroniques du VHB (Degertekin

and Lok, 2008). Ce dosage, et l'information qui en découle, nécessite alors un strict respect du temps de prélèvement en résiduel. Ainsi, une hausse de la concentration plasmatique ténofovir a été associée à une diminution de la fonction rénale, ce qui peut entraîner un arrêt du traitement (Rodríguez-Nóvoa et al., 2010). Cette hausse semble être causée par une interaction avec des inhibiteurs de protéases (Kiser et al., 2008), ou à des polymorphismes de gènes codant pour les transporteurs rénaux MRP4 et MRP7 (Calcagno et al., 2016). Cependant, aucun facteur pharmacogénétique n'a été décrit dans la littérature comme étant associé de manière significative à une baisse de l'exposition au ténofovir.

Les traitements anti-VHB par analogues nucléos(t)idiques ne permettent que très rarement d'éliminer complètement l'Ag HBs chez le patient ayant une hépatite B chronique. Les mécanismes expliquant cette clairance ou absence de clairance sont peu connus. L'étude fine du gène S du VHB pourrait aider à éclairer, ne serait-ce qu'en partie, l'évolution de l'infection VHB au niveau de l'Ag HBs. Chez un patient (P20), le 2ème séquençage profond effectué sur un échantillon de 2016 a révélé une augmentation de la fréquence d'une mutation (sY161F) ainsi que l'apparition d'une autre mutation (sI110L) dans le domaine MHR, essentiel à la reconnaissance de l'Ag HBs par le système immunitaire de l'hôte. Dans une étude cherchant à déterminer par séquençage profond des mutations pouvant expliquer l'absence de clairance de l'Ag HBs (Eschlimann et al., 2017), la mutation sY161F avait été retrouvée uniquement chez les patients « non-répondeurs » à l'infection par le VHB. Des tests phénotypiques de ce mutant pourrait révéler des informations sur son impact envers les Ac anti-HBs.

Les tests phénotypiques sont indispensables à la caractérisation des mutations de résistance contre les médicaments anti-VHB, mais nécessitent un minimum de standardisation pour améliorer la reproductibilité des études entre elles. Par ailleurs, une étude récente (Lee et al., 2021) a rapporté une différence surprenante sur la capacité répliquative du VHB en fonction de la lignée cellulaire utilisée lors des tests phénotypiques. L'étude de la machinerie cellulaire de ces lignées pourrait améliorer la compréhension du cycle viral du VHB à l'intérieur des hépatocytes. L'utilisation de ces tests sera d'autant plus utile pour étudier l'impact de variants du VHB sur les nouveaux médicaments en cours d'essai, tels que les modulateurs d'assemblage de la capside et les inhibiteurs d'entrée.

Le patient P20 a suscité un intérêt particulier pendant ce travail. Il a toujours présenté des charges virales VHB, parfois à des valeurs élevées, mais qui coïncidaient avec des périodes où le VIH était indétectable. Son observance était considérée comme médiocre. Cependant, de nombreux dosages ont retrouvé une concentration de

ténofovir élevée dans son plasma. Les traitements combinés dirigés contre les co-infections VHB/VIH sont considérés comme efficaces (de Vries-Sluijs et al., 2010). Cependant, environ 10% de ces patients présentent des charges virales VHB toujours détectables, voire un rebond. Une étude avait identifié la positivité de l'Ag HBe, la détectabilité de l'ARN du VIH et un taux de lymphocytes CD4+ inférieur à 200 cellules/mm³ comme des facteurs de risques de persistance de l'ADN du VHB chez l'hôte (Matthews et al., 2013). Le patient P20 a, au cours de son suivi, présenté deux des facteurs de risque identifiés, la réascension de la charge virale VIH et des taux de CD4+ bas. Sa situation semble montrer l'équilibre délicat des interactions entre le virus du VHB et le système immunitaire de l'hôte, notamment lorsque celui-ci est affecté par une situation immunosuppressive (VIH, greffe, traitements immunosuppresseur). Cette observation rejoint un travail récent par Marlet et al. (Marlet et al., n.d.).

Les patients pour lesquels nous avons suspecté un échappement thérapeutique présentaient pour la plupart une réponse virologique partielle au ténofovir. La fréquence de mauvaise observance rapportée dans ce travail (4/10 patients) est cohérente avec les taux observés dans la littérature (Ford et al., 2018).

Un dosage pharmacologique en vraie résiduelle est recommandé lorsque l'on suspecte un échec thérapeutique à un traitement, mais sa non-détection dans le plasma du patient lors du dosage ne devrait pas exclure la possibilité d'une mutation minoritaire qui ne serait pas détectée par un séquençage Sanger.

5 Conclusion

Au total, dans ce travail, nous avons inclus 10 patients pour lesquels était prescrit un génotypage de résistance VHB dans le contexte d'une suspicion d'échec de traitement par ténofovir. Chez quatre patients, l'interrogatoire ou un dosage pharmaco ont mis en évidence une mésobservance qui explique l'échec. Pour les 6 patients restants, le dosage pharmacologique rétrospectif n'a pas mis en évidence de sous exposition au ténofovir. Le génotypage de résistance par séquençage Sanger n'a pas mis en évidence de résistance. Ce résultat a été confirmé par le séquençage profond. L'étude des mutations minoritaires a mis en évidence l'absence d'émergence de signature de mutations dans la Pol/RT et dans l'Ag HBs au cours du traitement par ténofovir chez ces patients. Les patients qui ont été suivis à distance du génotypage ont répondu au ténofovir de manière retardée (P20) et un patient a atteint une réponse virologique complète (P18). Les causes d'échec de traitement au ténofovir semblent multifactorielles et la résistance au ténofovir, possible en théorie, n'est décrite que dans moins de 0,01% des isolats (Cho et al., 2018; Park et al., 2019).

En conclusion, l'échappement au ténofovir semble associé à une mésobservance. Les réponses virologiques partielles au ténofovir sont probablement le type d'échec à cette molécule le plus fréquent. Les causes de ces échecs semblent multifactorielles avec un rôle prédominant de l'hôte et de son observance. Néanmoins, un suivi épidémiologique des isolats associés à ces échecs de traitement est indispensable pour identifier d'éventuelles nouvelles combinaisons de mutations de résistance émergentes.

Annexe

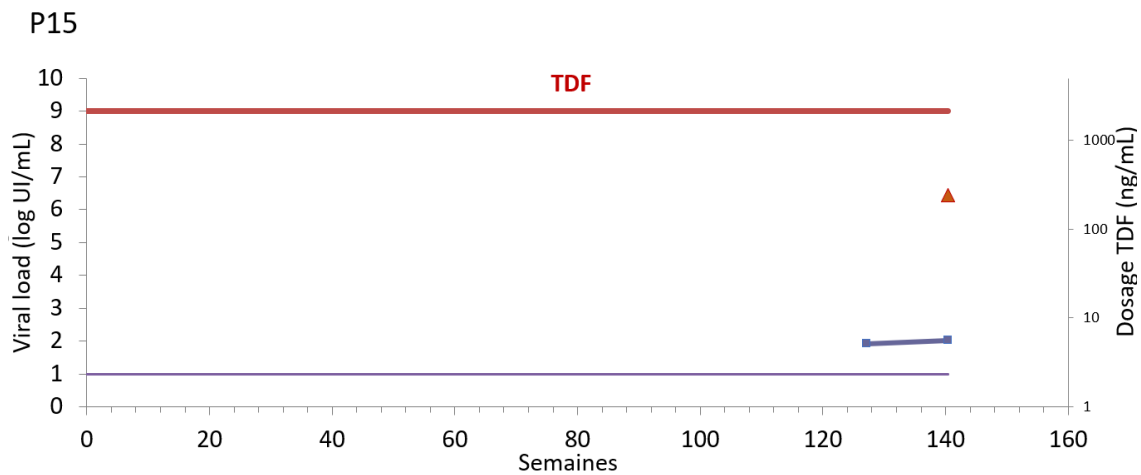


Figure 27 : Suivi virologique du patient P15

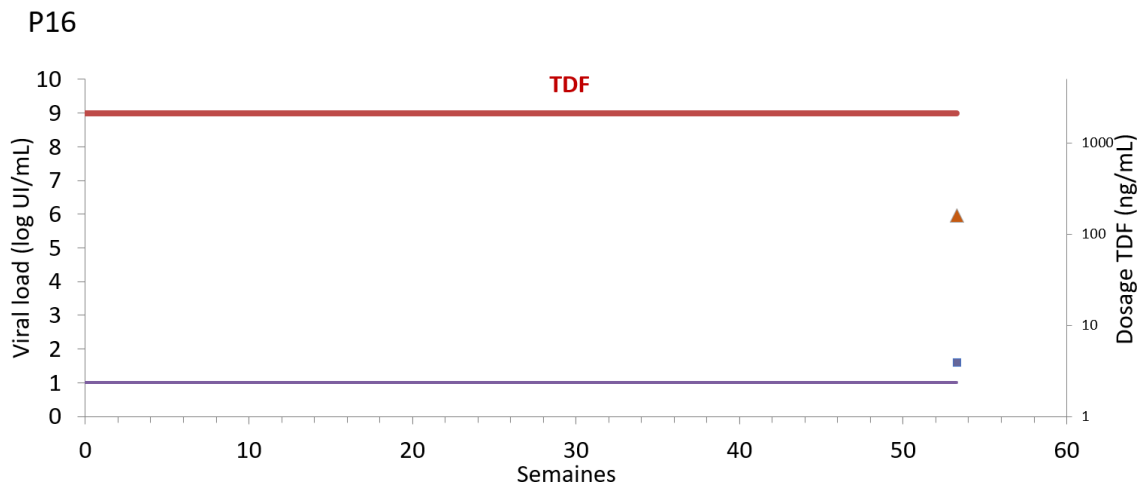


Figure 28 : Suivi virologique du patient P16

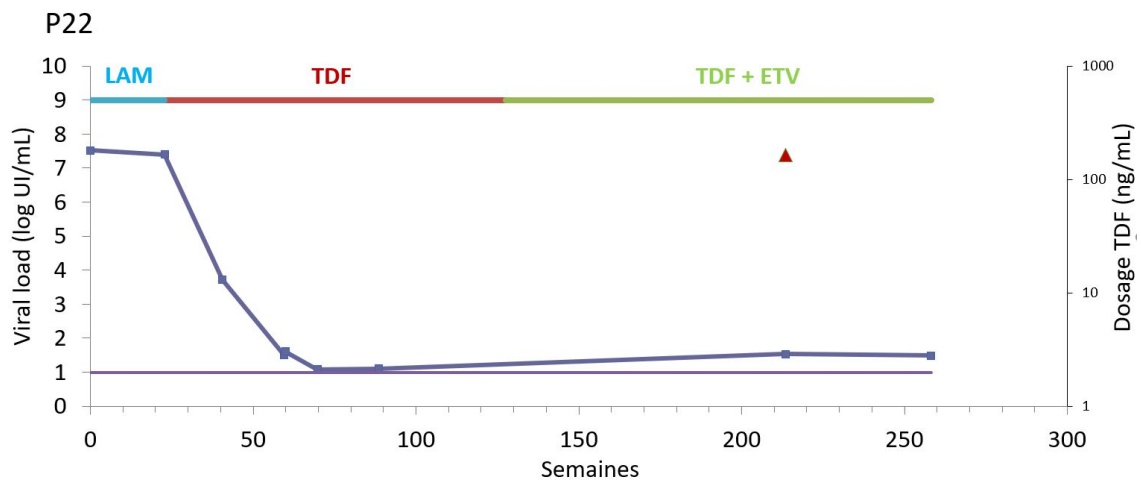


Figure 29 : Suivi virologique du patient P22

P31

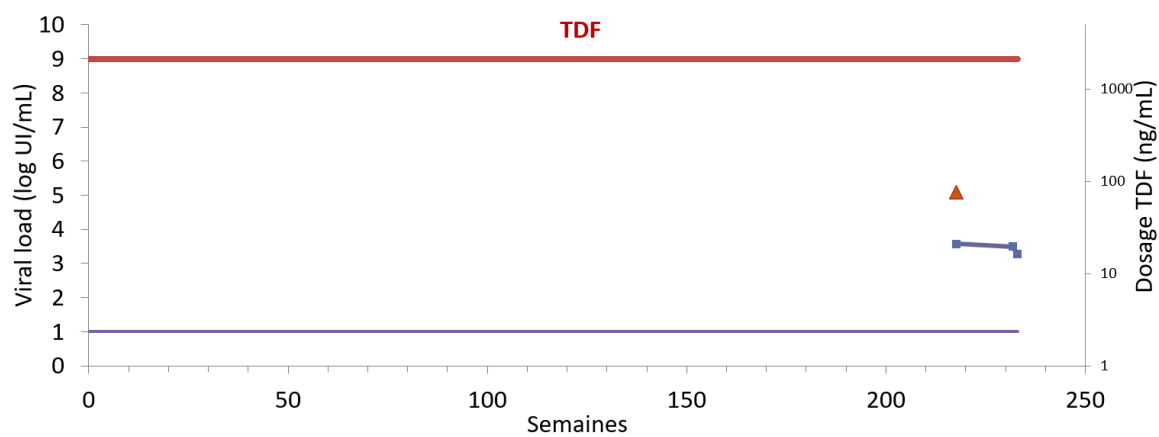


Figure 30 : Suivi virologique du patient P31

BIBLIOGRAPHIE

- Aloy, B., Tazi, I., Bagnis, C.I., Gauthier, M., Janus, N., Launay-Vacher, V., Deray, G., Turret, J., 2016. Is Tenofovir Alafenamide Safer than Tenofovir Disoproxil Fumarate for the Kidneys? *AIDS Rev.* 18, 184–192.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Herbers, U., Sheldon, J., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F., 2009. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatol. Baltim. Md* 49, 1158–1165.
- An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology, n.d. 16.
- Avellón, A., Echevarria, J.M., 2006. Frequency of hepatitis B virus “a” determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J. Med. Virol.* 78, 24–36.
- Bam, R.A., Yant, S.R., Cihlar, T., 2014. Tenofovir alafenamide is not a substrate for renal organic anion transporters (OATs) and does not exhibit OAT-dependent cytotoxicity. *Antivir. Ther.* 19, 687–692.
- Bartholomeusz, A., Tehan, B.G., Chalmers, D.K., 2004. Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations. *Antivir. Ther.* 9, 149–160.
- Bömmel, F. van, Man, R.A. de, Wedemeyer, H., Deterding, K., Petersen, J., Buggisch, P., Erhardt, A., Hüppe, D., Stein, K., Trojan, J., Sarrazin, C., Böcher, W.O., Spengler, U., Wasmuth, H.E., Reinders, J.G.P., Möller, B., Rhode, P., Feucht, H.-H., Wiedenmann, B., Berg, T., 2010. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. *Hepatology* 51, 73–80.
- Bruce, M.G., Bruden, D., Hurlburt, D., Zanis, C., Thompson, G., Rea, L., Toomey, M., Townshend-Bulson, L., Rudolph, K., Bulkow, L., Spradling, P.R., Baum, R., Hennessy, T., McMahon, B.J., 2016. Antibody Levels and Protection After Hepatitis B Vaccine: Results of a 30-Year Follow-up Study and Response to a Booster Dose. *J. Infect. Dis.* 214, 16–22.
- Buti, M., Gane, E., Seto, W.K., Chan, H.L.Y., Chuang, W.-L., Stepanova, T., Hui, A.-J., Lim, Y.-S., Mehta, R., Janssen, H.L.A., Acharya, S.K., Flaherty, J.F., Massetto, B., Cathcart, A.L., Kim, K., Gaggar, A., Subramanian, G.M., McHutchison, J.G., Pan, C.Q., Brunetto, M., Izumi, N., Marcellin, P., 2016. Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 1, 196–206.
- Buti, M., Tsai, N., Petersen, J., Flisiak, R., Gurel, S., Krastev, Z., Aguilar Schall, R., Flaherty, J.F., Martins, E.B., Charuwnon, P., Kitrinos, K.M., Mani Subramanian, G., Gane, E., Marcellin, P., 2015. Seven-Year Efficacy and Safety of Treatment with Tenofovir Disoproxil Fumarate for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Dig. Dis. Sci.* 60, 1457–1464.
- Calcagno, A., Cusato, J., Marinaro, L., Trentini, L., Alcantarini, C., Mussa, M., Simiele, M., D’Avolio, A., Di Perri, G., Bonora, S., 2016. Clinical pharmacology of tenofovir clearance: a pharmacokinetic/pharmacogenetic study on plasma and urines. *Pharmacogenomics J.* 16, 514–518.
- Cassidy, A., Mossman, S., Olivieri, A., De Ridder, M., Leroux-Roels, G., 2011. Hepatitis B vaccine effectiveness in the face of global HBV genotype diversity. *Expert Rev. Vaccines* 10, 1709–1715.
- Cathcart, A.L., Chan, H.L.-Y., Bhardwaj, N., Liu, Y., Marcellin, P., Pan, C.Q., Shalimar, null, Buti, M., Cox, S., Parhy, B., Zhou, E., Martin, R., Chang, S., Lin, L., Flaherty, J.F., Kitrinos, K.M., Gaggar, A., Izumi, N., Lim, Y.-S., 2018. No Resistance to Tenofovir Alafenamide Detected through 96 Weeks of Treatment in Patients with Chronic Hepatitis B Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62.
- Cento, V., Van Hemert, F., Neumann-Fraune, M., Mirabelli, C., Di Maio, V.-C., Salpini, R., Bertoli, A., Micheli, V., Gubertini, G., Romano, S., Visca, M., De Sanctis, G.-M., Berkhout, B., Marino, N., Mazzotta, F., Cappiello, G., Spanò, A., Sarrecchia, C., Ceccherini-Silberstein, F., Andreoni, M., Angelico, M., Verheyen, J., Perno, C.F., Svicher, V., 2013. Anti-HBV treatment induces novel reverse transcriptase mutations with reflective effect on HBV S antigen. *J. Infect.* 67, 303–312.

- Chevaliez, S., Rodriguez, C., Poiteau, L., Soulier, A., Donati, F., Darty-Mercier, M., Pioche, C., Leroy, V., Brodard, V., Zoulim, F., Brouard, C., Larsen, C., Semaille, C., Roudot-Thoraval, F., Pawlotsky, J.-M., Hepatology Reference Centers Laboratories Network for Chronic Hepatitis B Surveillance, 2019. Primary resistance of hepatitis B virus to nucleoside and nucleotide analogues. *J. Viral Hepat.* 26, 278–286.
- Cho, W.H., Lee, H.J., Bang, K.B., Kim, S.B., Song, I.H., 2018. Development of tenofovir disoproxil fumarate resistance after complete viral suppression in a patient with treatment-naïve chronic hepatitis B: A case report and review of the literature. *World J. Gastroenterol.* 24, 1919–1924.
- Chowdhury, R., Khan, H., Heydon, E., Shroufi, A., Fahimi, S., Moore, C., Stricker, B., Mendis, S., Hofman, A., Mant, J., Franco, O.H., 2013. Adherence to cardiovascular therapy: a meta-analysis of prevalence and clinical consequences. *Eur. Heart J.* 34, 2940–2948.
- Clark, D.N., Hu, J., 2015. Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase – Target of Current Antiviral Therapy and Future Drug Development. *Antiviral Res.* 123, 132–137.
- de Vries-Sluijs, T.E.M.S., Reijnders, J.G.P., Hansen, B.E., Zaaijer, H.L., Prins, J.M., Pas, S.D., Schutten, M., Hoepelman, A.I.M., Richter, C., Mulder, J.W., de Man, R.A., Janssen, H.L.A., van der Ende, M.E., 2010. Long-term therapy with tenofovir is effective for patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis B virus. *Gastroenterology* 139, 1934–1941.
- Deeks, S.G., Barditch-Crovo, P., Lietman, P.S., Hwang, F., Cundy, K.C., Rooney, J.F., Hellmann, N.S., Safrin, S., Kahn, J.O., 1998. Safety, pharmacokinetics, and antiretroviral activity of intravenous 9-[2-(R)-(Phosphonomethoxy)propyl]adenine, a novel anti-human immunodeficiency virus (HIV) therapy, in HIV-infected adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2380–2384.
- Degertekin, B., Lok, A.S., 2008. Monitoring antiviral resistance in patients receiving nucleos(t)ide analog therapies for hepatitis B: which method should be used? *J. Hepatol.* 48, 892–894.
- Delaney, W.E., Ray, A.S., Yang, H., Qi, X., Xiong, S., Zhu, Y., Miller, M.D., 2006. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2471–2477.
- Eschlimann, M., Malvé, B., Velay, A., Fenaux, H., Berger, S., Fripiat, J.-P., Zoulim, F., Bensenane, M., Bronowicki, J.-P., Goehringer, F., May, T., Jeulin, H., Schvoerer, E., 2017. The variability of hepatitis B envelope is associated with HBs antigen persistence in either chronic or acute HBV genotype A infection. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 94, 115–122.
- European Association for the Study of the Liver, 2017. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 67, 370–398.
- Ford, N., Scourse, R., Lemoine, M., Hutin, Y., Bulterys, M., Shubber, Z., Donchuk, D., Wandeler, G., 2018. Adherence to Nucleos(t)ide Analogue Therapies for Chronic Hepatitis B Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hepatol. Commun.* 2, 1160–1167.
- Garraffo, R., Peytavin, G., Solas, C., 2018. Commission « Pharmacologie » 27.
- Ghany, M., Liang, T.J., 2007. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 132, 1574–1585.
- Grant, P.M., Cotter, A.G., 2016. Tenofovir and bone health. *Curr. Opin. HIV AIDS* 11, 326–332.
- Hadziyannis, S.J., Tassopoulos, N.C., Heathcote, E.J., Chang, T.-T., Kitis, G., Rizzetto, M., Marcellin, P., Lim, S.G., Goodman, Z., Ma, J., Brosgart, C.L., Borroto-Esoda, K., Arterburn, S., Chuck, S.L., Adefovir Dipivoxil 438 Study Group, 2006. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology* 131, 1743–1751.
- Hemert, F.J. van, Berkhout, B., Zaaijer, H.L., 2014. Differential Binding of Tenofovir and Adefovir to Reverse Transcriptase of Hepatitis B Virus. *PLOS ONE* 9, e106324.
- Hu, J., Seeger, C., 2015. Hepadnavirus Genome Replication and Persistence. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5.
- Izzedine, H., Isnard-Bagnis, C., Hulot, J.S., Vittecoq, D., Cheng, A., Jais, C.K., Launay-Vacher, V., Deray, G., 2004. Renal safety of tenofovir in HIV treatment-experienced patients. *AIDS Lond. Engl.* 18, 1074–1076.
- KASL clinical practice guidelines for management of chronic hepatitis B, 2019. *Clin. Mol. Hepatol.* 25, 93–159.
- Kay, A., Zoulim, F., 2007. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* 127, 164–176.
- Kearney, B.P., Flaherty, J.F., Shah, J., 2004. Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 43, 595–612.

- Kim, S.U., Seo, Y.S., Lee, H.A., Kim, M.N., Lee, Y.R., Lee, H.W., Park, J.Y., Kim, D.Y., Ahn, S.H., Han, K.-H., Hwang, S.G., Rim, K.S., Um, S.H., Tak, W.Y., Kweon, Y.O., Kim, B.K., Park, S.Y., 2019. A multi-center study of entecavir vs. tenofovir on prognosis of treatment-naïve chronic hepatitis B in the Republic of Korea. *J. Hepatol.* 0.
- Kim, W.R., Loomba, R., Berg, T., Schall, R.E.A., Yee, L.J., Dinh, P.V., Flaherty, J.F., Martins, E.B., Therneau, T.M., Jacobson, I., Fung, S., Gurel, S., Buti, M., Marcellin, P., 2015. Impact of long-term tenofovir disoproxil fumarate on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. *Cancer* 121, 3631–3638.
- Kiser, J.J., Carten, M.L., Aquilante, C.L., Anderson, P.L., Wolfe, P., King, T.M., Delahunty, T., Bushman, L.R., Fletcher, C.V., 2008. The effect of lopinavir/ritonavir on the renal clearance of tenofovir in HIV-infected patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 265–272.
- Kitrinos, K.M., Corsa, A., Liu, Y., Flaherty, J., Snow-Lampart, A., Marcellin, P., Borroto-Esoda, K., Miller, M.D., 2014. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 59, 434–442.
- Lada, O., Gervais, A., Branger, M., Peytavin, G., Roquebert, B., Collin, G., Fraqueiro, G., Moucari, R., Leclerc, L., Martinot-Peignoux, M., Matheron, S., Marcellin, P., 2012. Quasispecies analysis and in vitro susceptibility of HBV strains isolated from HIV-HBV-coinfected patients with delayed response to tenofovir. *Antivir. Ther.* 17, 61–70.
- Lam, Y.-F., Seto, W.-K., Wong, D., Cheung, K.-S., Fung, J., Mak, L.-Y., Yuen, J., Chong, C.-K., Lai, C.-L., Yuen, M.-F., 2017. Seven-Year Treatment Outcome of Entecavir in a Real-World Cohort: Effects on Clinical Parameters, HBsAg and HBcrAg Levels. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 8, e125.
- Lamontagne, R.J., Bagga, S., Bouchard, M.J., 2016. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res.* 2, 163–186.
- Lazarevic, I., Banko, A., Miljanovic, D., Cupic, M., 2019. Immune-Escape Hepatitis B Virus Mutations Associated with Viral Reactivation upon Immunosuppression. *Viruses* 11.
- Lee, A.R., Cho, J.-Y., Kim, J.C., Dezhbord, M., Choo, S.Y., Ahn, C.H., Kim, N.Y., Shin, J.J., Park, S., Park, E.-S., Won, J., Kim, D.-S., Lee, J.-H., Kim, K.-H., 2021. Distinctive HBV Replication Capacity and Susceptibility to Tenofovir Induced by a Polymerase Point Mutation in Hepatoma Cell Lines and Primary Human Hepatocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1606.
- Li, J., Du, Y., Liu, X., Shen, Q., Huang, A., Zheng, M., Luo, X., Jiang, H., 2013. Binding sensitivity of adefovir to the polymerase from different genotypes of HBV: molecular modeling, docking and dynamics simulation studies. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 319–328.
- Lim, Y.-S., Gwak, G.-Y., Choi, J., Lee, Y.S., Byun, K.S., Kim, Y.J., Yoo, B.C., Kwon, S.Y., Lee, H.C., 2019. Monotherapy with tenofovir disoproxil fumarate for adefovir-resistant vs. entecavir-resistant chronic hepatitis B: A 5-year clinical trial. *J. Hepatol.*
- Littlejohn, M., Locarnini, S., Yuen, L., 2016. Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a021360.
- Liu, Y., Chang, S., Martin, R., Flaherty, J., Mo, H., Feierbach, B., 2021. Characterization of Hepatitis B virus polymerase mutations A194T and CYEI and tenofovir disoproxil fumarate or tenofovir alafenamide resistance. *J. Viral Hepat.* 28, 30–39.
- Liu, Y., Corsa, A.C., Buti, M., Cathcart, A.L., Flaherty, J.F., Miller, M.D., Kitrinos, K.M., Marcellin, P., Gane, E.J., 2017. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate in HBeAg+ and HBeAg- patients with chronic hepatitis B after 8 years of treatment. *J. Viral Hepat.* 24, 68–74.
- Liu, Yang, Miller, M.D., Kitrinos, K.M., 2017. Tenofovir alafenamide demonstrates broad cross-genotype activity against wild-type HBV clinical isolates and maintains susceptibility to drug-resistant HBV isolates in vitro. *Antiviral Res.* 139, 25–31.
- Locarnini, S., Zoulim, F., 2010. Molecular genetics of HBV infection. *Antivir. Ther.* 15 Suppl 3, 3–14.
- Lovett, G.C., Nguyen, T., Iser, D.M., Holmes, J.A., Chen, R., Demediuk, B., Shaw, G., Bell, S.J., Desmond, P.V., Thompson, A.J., 2017. Efficacy and safety of tenofovir in chronic hepatitis B: Australian real world experience. *World J. Hepatol.* 9, 48–56.
- Ma, B., Barth, A., McHale, C.M., Lai, M.-T., 2018. Establishment of intracellular tenofovir-diphosphate as the key determinant for in vitro-in vivo translation of antiviral efficacy. *Antiviral Res.* 151, 1–3.
- Maggi, P., Montinaro, V., Leone, A., Fasano, M., Volpe, A., Bellacosa, C., Grattagliano, V., Coladonato, L., Lapadula, G., Santantonio, T., Angarano, G., 2014. Bone and kidney toxicity induced by nucleotide analogues in patients affected by HBV-related chronic hepatitis: a longitudinal study. *J. Antimicrob. Chemother.* dku502.

- Marcellin, P., Heathcote, E.J., Buti, M., Gane, E., de Man, R.A., Krastev, Z., Germanidis, G., Lee, S.S., Flisiak, R., Kaita, K., Manns, M., Kotzev, I., Tchernev, K., Buggisch, P., Weillert, F., Kurdas, O.O., Shiffman, M.L., Trinh, H., Washington, M.K., Sorbel, J., Anderson, J., Snow-Lampart, A., Mondou, E., Quinn, J., Rousseau, F., 2008. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 359, 2442–2455.
- Margot, N.A., Liu, Y., Miller, M.D., Callebaut, C., 2016. High resistance barrier to tenofovir alafenamide is driven by higher loading of tenofovir diphosphate into target cells compared to tenofovir disoproxil fumarate. *Antiviral Res.* 132, 50–58.
- Marlet, J., Lier, C., Roch, E., Moreau, A., Combe, B., Handa, L., Lefevre, S., Maugey, M., Elkrief, L., D'Alteroche, L., Potier, P., Brand, D., Gaudy-Graffin, C., n.d. Evolution and phenotypic characterization of whole HBV genome in compliant patients experiencing unexplained entecavir treatment failure. *Antiviral Res.* (en révision).
- Matthews, G.V., Seaberg, E.C., Avihingsanon, A., Bowden, S., Dore, G.J., Lewin, S.R., Sasadeusz, J., Revill, P.A., Littlejohn, M., Hoy, J.F., Finlayson, R., Ruxrungtham, K., Saulynas, M., Locarnini, S., Thio, C.L., 2013. Patterns and causes of suboptimal response to tenofovir-based therapy in individuals coinfecting with HIV and hepatitis B virus. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 56, e87-94.
- Menéndez-Arias, L., Álvarez, M., Pacheco, B., 2014. Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Curr. Opin. Virol.*, *Antivirals and resistance / Virus evolution* 8, 1–9.
- Mills, E.J., Nachega, J.B., Buchan, I., Orbinski, J., Attaran, A., Singh, S., Rachlis, B., Wu, P., Cooper, C., Thabane, L., Wilson, K., Guyatt, G.H., Bangsberg, D.R., 2006. Adherence to antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa and North America: a meta-analysis. *JAMA* 296, 679–690.
- Mohamed, S., Penaranda, G., Gonzalez, D., Camus, C., Khiri, H., Boulmé, R., Sayada, C., Philibert, P., Olive, D., Halfon, P., 2014. Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure. *AIDS Lond. Engl.* 28, 1315–1324.
- Naggie, S., Lok, A.S., 2021. New Therapeutics for Hepatitis B: The Road to Cure. *Annu. Rev. Med.* 72, 93–105.
- Nirogi, R., Bhyrapuneni, G., Kandikere, V., Mudigonda, K., Komarneni, P., Aleti, R., Mukkanti, K., 2009. Simultaneous quantification of a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor emtricitabine and a nucleotide reverse transcriptase inhibitor tenofovir in plasma by liquid chromatography positive ion electrospray tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr. BMC* 23, 371–381.
- Ogawa, E., Furusyo, N., Nguyen, M.H., 2017. Tenofovir alafenamide in the treatment of chronic hepatitis B: design, development, and place in therapy. *Drug Des. Devel. Ther.* 11, 3197–3204.
- Park, E.-S., Lee, A.R., Kim, D.H., Lee, J.-H., Yoo, J.-J., Ahn, S.H., Sim, H., Park, S., Kang, H.S., Won, J., Ha, Y.N., Shin, G.-C., Kwon, S.Y., Park, Y.K., Choi, B.-S., Lee, Y.B., Jeong, N., An, Y., Ju, Y.S., Yu, S.J., Chae, H.B., Yu, K.-S., Kim, Y.J., Yoon, J.-H., Zoulim, F., Kim, K.-H., 2019. Identification of a quadruple mutation that confers tenofovir resistance in chronic hepatitis B patients. *J. Hepatol.* 70, 1093–1102.
- Park, S.G., Kim, Y., Park, E., Ryu, H.M., Jung, G., 2003. Fidelity of hepatitis B virus polymerase. *Eur. J. Biochem.* 270, 2929–2936.
- Patterson, S.J., George, J., Strasser, S.I., Lee, A.U., Sievert, W., Nicoll, A.J., Desmond, P.V., Roberts, S.K., Locarnini, S., Bowden, S., Angus, P.W., 2011. Tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy following failure of both lamivudine and adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B. *Gut* 60, 247–254.
- Qi, X., Xiong, S., Yang, H., Miller, M., Delaney, W.E., 2007. In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents. *Antivir. Ther.* 12, 355–362.
- Ramírez, C., Gregori, J., Buti, M., Tabernero, D., Camós, S., Casillas, R., Quer, J., Esteban, R., Homs, M., Rodríguez-Frías, F., 2013. A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasiespecies using hepatitis B virus infection as a model. *Antiviral Res.* 98, 273–283.
- Ratziu, V., Thibault, V., Benhamou, Y., Poynard, T., 2006. Successful rescue therapy with tenofovir in a patient with hepatic decompensation and adefovir resistant HBV mutant. *Comp. Hepatol.* 5, 1.

- Rodríguez-Nóvoa, S., Labarga, P., D'Avolio, A., Barreiro, P., Albalade, M., Vispo, E., Solera, C., Siccardi, M., Bonora, S., Di Perri, G., Soriano, V., 2010. Impairment in kidney tubular function in patients receiving tenofovir is associated with higher tenofovir plasma concentrations. *AIDS Lond. Engl.* 24, 1064–1066.
- Sangeda, R.Z., Moshia, F., Prosperi, M., Aboud, S., Vercauteren, J., Camacho, R.J., Lyamuya, E.F., Van Wijngaerden, E., Vandamme, A.-M., 2014. Pharmacy refill adherence outperforms self-reported methods in predicting HIV therapy outcome in resource-limited settings. *BMC Public Health* 14, 1035.
- Sanjuán, R., Domingo-Calap, P., 2016. Mechanisms of viral mutation. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4433–4448.
- Sarin, S.K., Kumar, M., Lau, G.K., Abbas, Z., Chan, H.L.Y., Chen, C.J., Chen, D.S., Chen, H.L., Chen, P.J., Chien, R.N., Dokmeci, A.K., Gane, E., Hou, J.L., Jafri, W., Jia, J., Kim, J.H., Lai, C.L., Lee, H.C., Lim, S.G., Liu, C.J., Locarnini, S., Al Mahtab, M., Mohamed, R., Omata, M., Park, J., Piratvisuth, T., Sharma, B.C., Sollano, J., Wang, F.S., Wei, L., Yuen, M.F., Zheng, S.S., Kao, J.H., 2016. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol. Int.* 10, 1–98.
- Schaefer, S., 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* 13, 14–21.
- Semizarov, D.G., Arzumanov, A.A., Dyatkina, N.B., Meyer, A., Vichier-Guerre, S., Gosselin, G., Rayner, B., Imbach, J.-L., Krayevsky, A.A., 1997. Stereoisomers of Deoxynucleoside 5'-Triphosphates as Substrates for Template-dependent and -independent DNA Polymerases*. *J. Biol. Chem.* 272, 9556–9560.
- Shaw, T., Bartholomeusz, A., Locarnini, S., 2006. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J. Hepatol.* 44, 593–606.
- Shirvani-Dastgerdi, E., Winer, B.Y., Celià-Terrassa, T., Kang, Y., Tabernero, D., Yagmur, E., Rodríguez-Frías, F., Gregori, J., Luedde, T., Trautwein, C., Ploss, A., Tacke, F., 2017. Selection of the highly replicative and partially multidrug resistant rtS78T HBV polymerase mutation during TDF-ETV combination therapy. *J. Hepatol.* 67, 246–254.
- Sureau, C., Salisse, J., 2013. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatol. Baltim. Md* 57, 985–994.
- Tang, L.S.Y., Covert, E., Wilson, E., Kottitil, S., 2018. Chronic Hepatitis B Infection: A Review. *JAMA* 319, 1802–1813.
- Tenney, D.J., Rose, R.E., Baldick, C.J., Pokornowski, K.A., Eggers, B.J., Fang, J., Wichroski, M.J., Xu, D., Yang, J., Wilber, R.B., Colonno, R.J., 2009. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatol. Baltim. Md* 49, 1503–1514.
- Terrault, N.A., Lok, A.S.F., McMahon, B.J., Chang, K.-M., Hwang, J.P., Jonas, M.M., Brown, R.S., Bzowej, N.H., Wong, J.B., 2018. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatol. Baltim. Md* 67, 1560–1599.
- Trabaud, M.-A., Icard, V., Ramière, C., Tardy, J.-C., Scholtes, C., André, P., 2017. Comparison of HIV-1 drug-resistance genotyping by ultra-deep sequencing and sanger sequencing using clinical samples. *J. Med. Virol.* 89, 1912–1919.
- Vemlidy 25 mg film coated tablets - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc) [WWW Document], n.d. URL <https://www.medicines.org.uk/emc/product/2314/smpc#ref> (accessed 4.26.21).
- Villeneuve, J.-P., Durantel, D., Durantel, S., Westland, C., Xiong, S., Brosgart, C.L., Gibbs, C.S., Parvaz, P., Werle, B., Trépo, C., Zoulim, F., 2003. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J. Hepatol.* 39, 1085–1089.
- Weiss, J., Theile, D., Ketabi-Kiyanvash, N., Lindenmaier, H., Haefeli, W.E., 2007. Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35, 340–344.
- World Health Organization, World Health Organization, Global Hepatitis Programme, 2017. Global hepatitis report, 2017.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., Li, W., 2012. Sodium

- taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 1, e00049.
- Yuen, M.-F., Chen, D.-S., Dusheiko, G.M., Janssen, H.L.A., Lau, D.T.Y., Locarnini, S.A., Peters, M.G., Lai, C.-L., 2018. Hepatitis B virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* 4, 18035.
- Zhou, T., Saputelli, J., Aldrich, C.E., Deslauriers, M., Condeay, L.D., Mason, W.S., 1999. Emergence of Drug-Resistant Populations of Woodchuck Hepatitis Virus in Woodchucks Treated with the Antiviral Nucleoside Lamivudine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1947–1954.
- Zoulim, F., 2006. In vitro models for studying hepatitis B virus drug resistance. *Semin. Liver Dis.* 26, 171–180.
- Zoulim, F., 2004. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res.* 64, 1–15.
- Zoulim, F., Locarnini, S., 2012. Management of treatment failure in chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* 56 Suppl 1, S112-122.

Vu, le Directeur de Thèse

Marler

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

RESUME

Introduction : L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) reste un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale avec une mortalité estimée à 887 000 décès par an. Aujourd'hui, le traitement de référence repose sur l'utilisation d'analogues nucléosidiques ou nucléotidiques (NA) tel l'entécavir (ETV) ou le ténofovir (TFV) en 1ère intention. Concernant le TFV, aucune mutation de résistance spécifique n'a été retrouvée à ce jour. Pourtant des patients en situation d'échec de traitement ont été rapportés. Nous supposons l'existence de sous-populations virales résistantes au médicament, mais qui ne seraient pas détectées par les techniques de séquençage Sanger. L'objectif de ce travail consiste en une étude rétrospective des patients infectés par le VHB et en situation d'échec thérapeutique par le ténofovir.

Matériel et méthodes : Les patients inclus étaient en échec de traitement avec le ténofovir et avaient bénéficié dans le cadre du soin courant d'un séquençage Sanger de la Pol/RT à la recherche de mutation de résistance. Rétrospectivement, la diversité virale chez ces patients a été étudiée par séquençage profond avec la technologie MiSeq (Illumina) et l'observance a été évaluée par suivi pharmacologique.

Résultats : Sur un total de 110 génotypes de résistances du VHB, 11 échantillons ont été associés à un échec de traitement au ténofovir. Quatre patients ont été exclus à cause d'une mauvaise observance connue et les sept autres ont été inclus. Une évolution de la diversité virale au sein de la polymérase pendant le traitement par ténofovir a été mise en évidence pour deux patients. Une caractérisation phénotypique de ces mutations pourrait permettre d'évaluer leur potentiel impact sur le niveau de résistance au ténofovir.

Mots-clés : Hépatite B (VHB), résistance, génotype, ténofovir.

FOUCAULT Tristan

80 pages – 3 tableaux – 30 figures

Résumé : L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) reste un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale avec une mortalité estimée à 887 000 décès par an. Aujourd'hui, le traitement de référence repose sur l'utilisation d'analogues nucléosidiques ou nucléotidiques (NA) tel l'entécavir (ETV) ou le ténofovir (TFV) en 1^{ère} intention. Concernant le ténofovir, aucune mutation de résistance spécifique n'a été retrouvée à ce jour, pourtant des patients en situation d'échec de traitement ont été rapportés. Nous supposons l'existence de sous-populations virales résistantes au médicament, mais qui ne seraient pas détectées par les techniques de séquençage Sanger. L'objectif de ce travail consiste en une étude rétrospective des patients infectés par le VHB et en situation d'échec thérapeutique par le ténofovir.

Les patients inclus étaient en échec de traitement avec le ténofovir et avaient bénéficié dans le cadre du soin courant d'un séquençage Sanger de la polymérase du VHB (Pol/RT) à la recherche de mutations de résistance. Rétrospectivement, la diversité virale chez ces patients a été étudiée par séquençage profond avec la technologie MiSeq (Illumina, San Diego, USA) et l'observance a été évaluée par suivi pharmacologique.

Sur un total de 110 génotypes de résistances du VHB, 10 échantillons ont été associés à un échec de traitement au ténofovir. Quatre patients ont été exclus à cause d'une mauvaise observance connue et les sept autres ont été inclus. Une évolution de la diversité virale au sein de la polymérase pendant le traitement par ténofovir a été mise en évidence pour deux patients. Une caractérisation phénotypique de ces mutations pourrait permettre d'évaluer leur potentiel impact sur le niveau de résistance au ténofovir.

Mots-clés : Hépatite B (VHB), résistance, génotype, ténofovir.

Jury :

Président du Jury : Professeure Catherine GAUDY-
GRAFFIN

Directeur de thèse : Docteur Julien MARLET

Membres du Jury : Professeur Denys BRAND

: Professeur Christophe HOURIOUX

: Professeur Gilles PAINAUD

:

: Date de soutenance : 19 mai 2021