

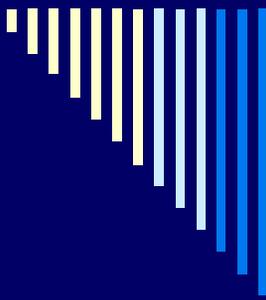
Hépatite chronique B

Moyens thérapeutiques

Dr Olfa BAHRI

Laboratoire de Virologie Clinique

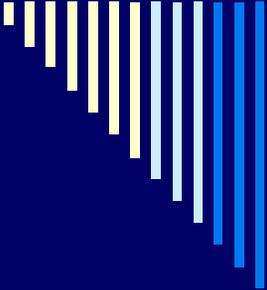
Institut Pasteur de Tunis



INTRODUCTION

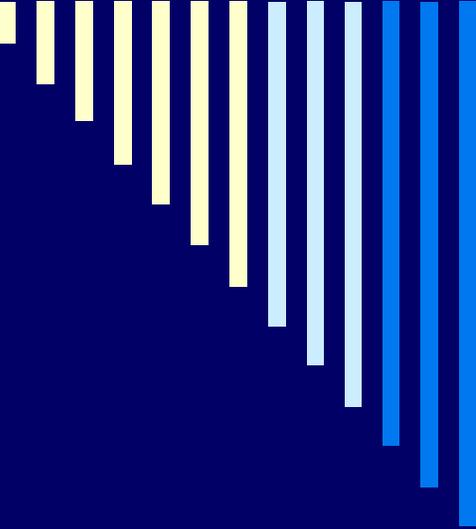
- Plus de 300. 10⁶ porteurs chroniques de VHB dans le monde
- Hépatite chronique active avec risque de complications à type de cirrhose et de CHC

☛ **Importance du traitement**



OBJECTIFS DU TRAITEMENT

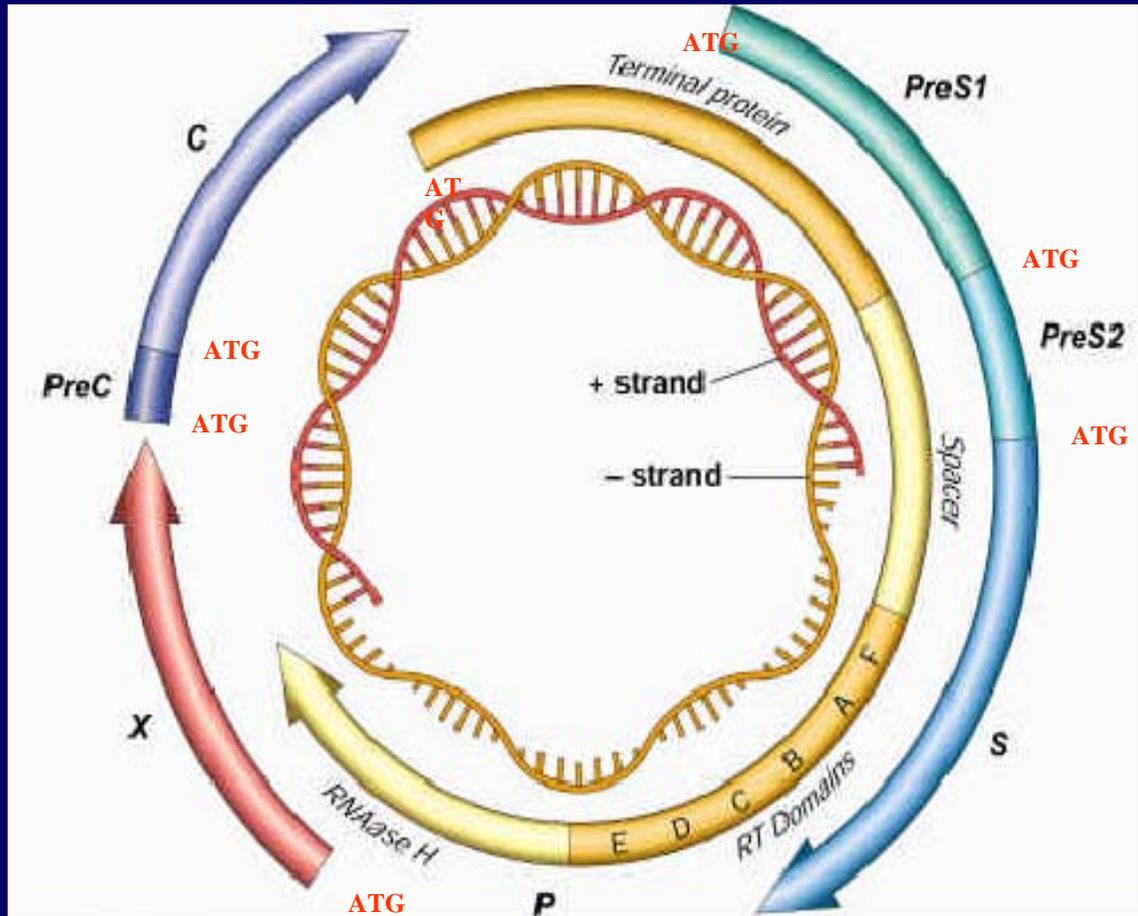
- 1- Obtention d'une suppression durable de la réplication virale**
 - 2- Amélioration des lésions histologiques**
 - 3- Réduction du risque d'évolution vers la cirrhose et le CHC**
-

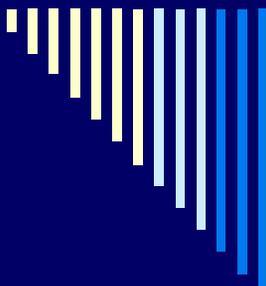


*BIOLOGIE DE
L'INFECTION VIRALE B*

STRUCTURE DU GENOME VIRAL

- 4 gènes chevauchants:
- S: protéines de surface
- C: protéine C et AgHBe
- X: protéine X
- P: polymérase virale





LES ARN DU VHB

- 3 types d'ARNm

- ARN de 3.5Kb

- * ARNm de AgHBe
- * ARNm de capside
- * ARNm Polymérase
- * **ARN pré-génomique**

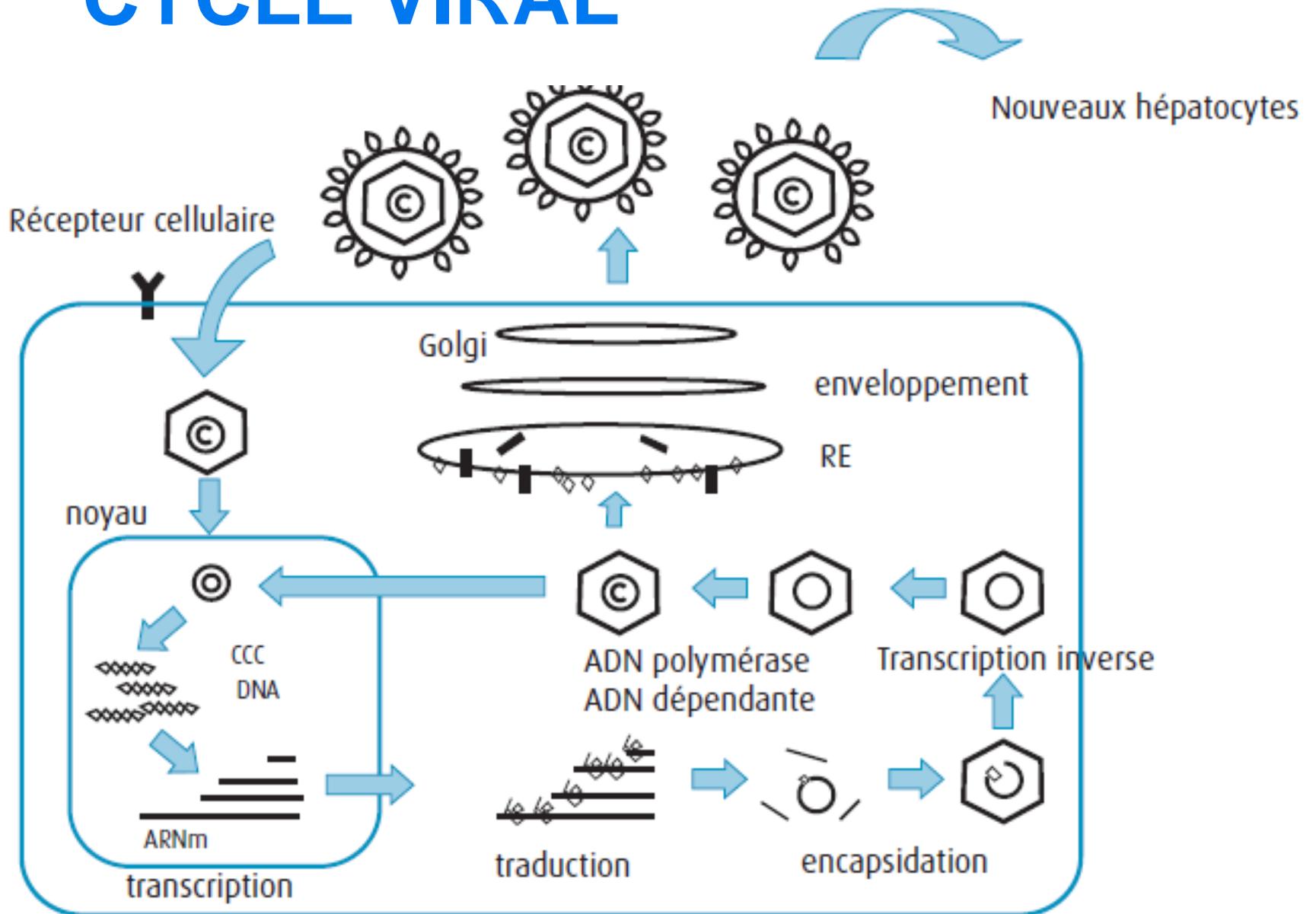
- ARN de 2.4 et 2.1Kb

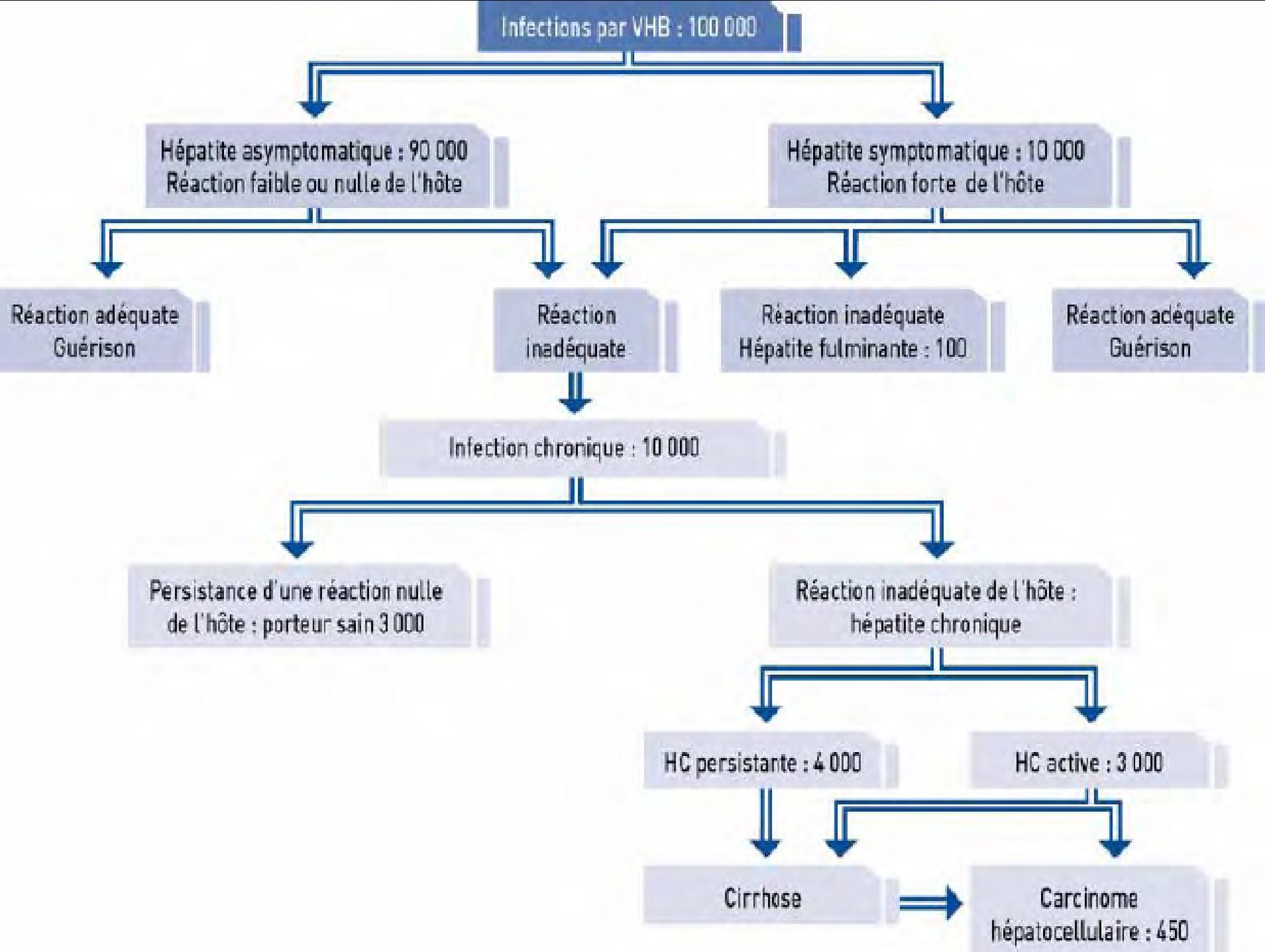
- * ARNm pré-S1, S2, S
- * ARNm pré-S2, S
- * ARNm S

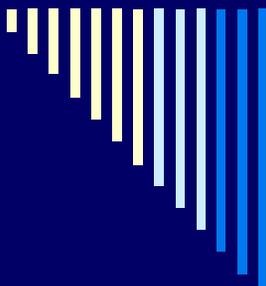
- ARN de 0.7Kb

- * ARNm HBx

CYCLE VIRAL



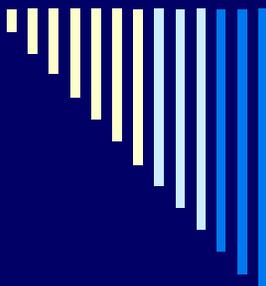




PERSISTANCE DE L'INFECTION CHRONIQUE

FACTEURS VIROLOGIQUES

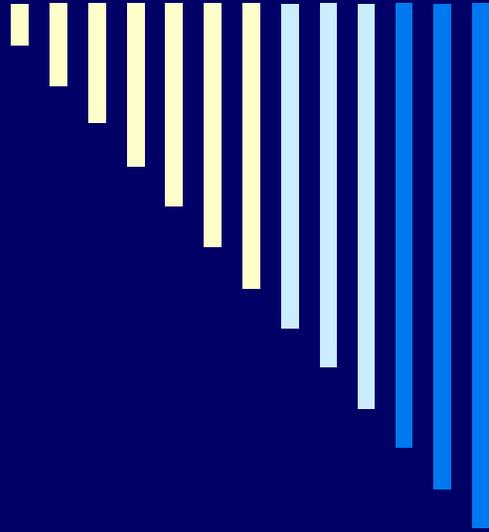
- ❑ Production virale importante
 - ❑ Erreurs de lecture de la transcriptase inverse
 - ❑ Présence d'ADN super-enroulé
-



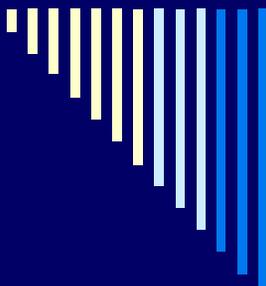
PERSISTANCE DE L'INFECTION CHRONIQUE

FACTEURS IMMUNOPATHOLOGIQUES

- ❑ Faible expression du système HLA classe I
 - ❑ Défaut de production d'interféron alpha
 - ❑ Élimination partielle des hépatocytes infectés
-



*MOLECULES
THERAPEUTIQUES
UTILISEES*



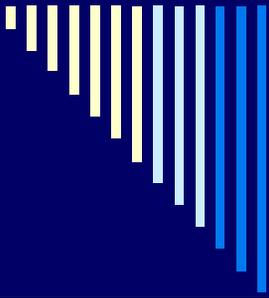
MOLECULES THERAPEUTIQUES DISPONIBLES

IMMUNOMODULATEURS

- IFNa
- IFNpeg
- autres cytokines
- vaccinothérapie

ANTIVIRAUX

- Lamivudine, Adefovir
- Entecavir, Telbivudine
- Tenofovir, Emtricitabine
- Clevudine, Valtorcitabine
- Elvucitabine, Pradefovir



Cytokine

**Analogue
nucléosidique**

**Analogue
nucléotidique**

Cytokine

**Analogues
nucléos(t)idiques**

**IFN
(1992)**

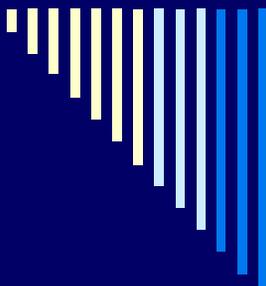
**Lamivudine
(1998)**

**Adéfovir
dipivoxil
(2002)**

**PegIFN
(2005)**

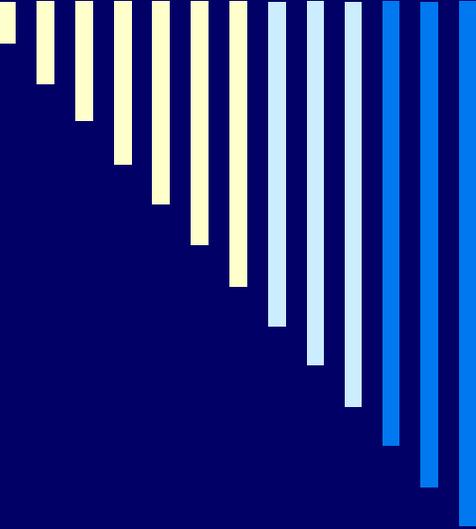
**Entécavir
Telbivudine
(2006)**

**Ténofovir
Clévudine
Emtricitabine
Pradéfovir
mésylate**



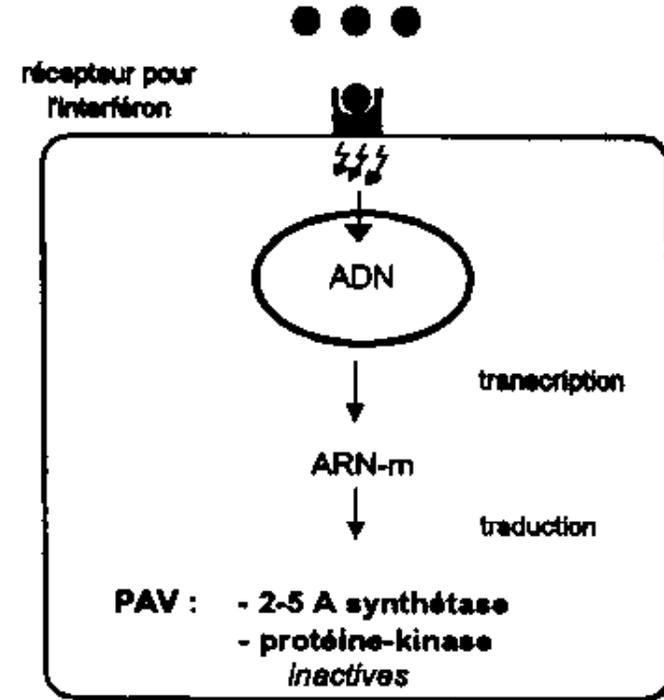
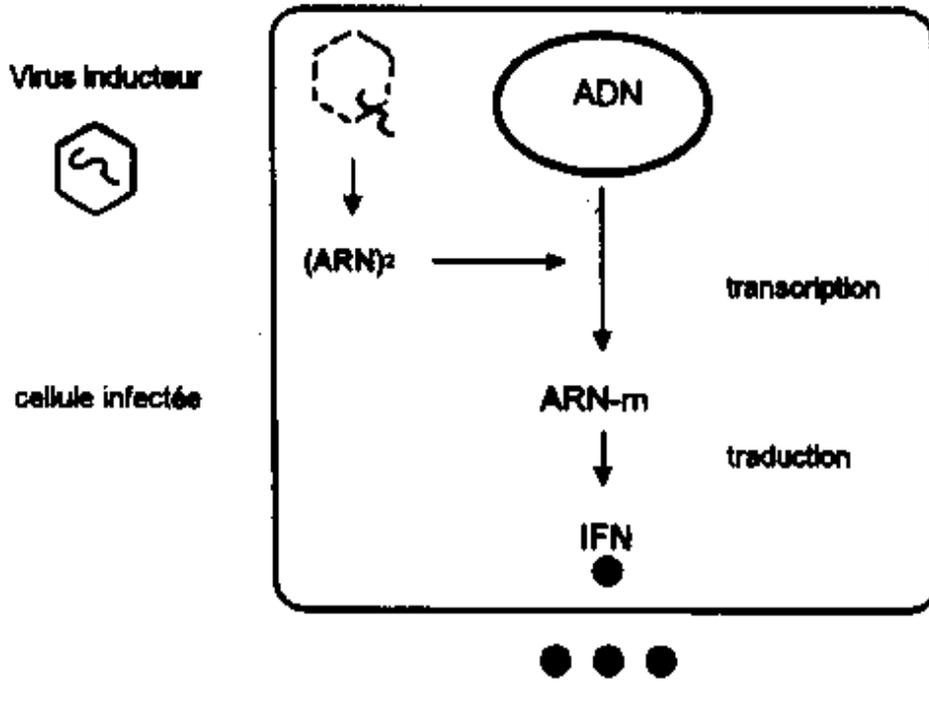
MOLECULES ACTUELLEMENT DISPONIBLES

MOLECULES	NOM COMMERCIAL
INTERFERON alpha 2a et alpha 2b	ROFERON®
PEG-INTERFERON alpha 2a	PEGASYS®
LAMIVUDINE	ZEFFIX®
ADEFOVIR	HEPSERA®
ENTECAVIR	BARACLUDE®
TELBUVIDINE	SEBIVO®
TENOFOVIR	VIREAD®

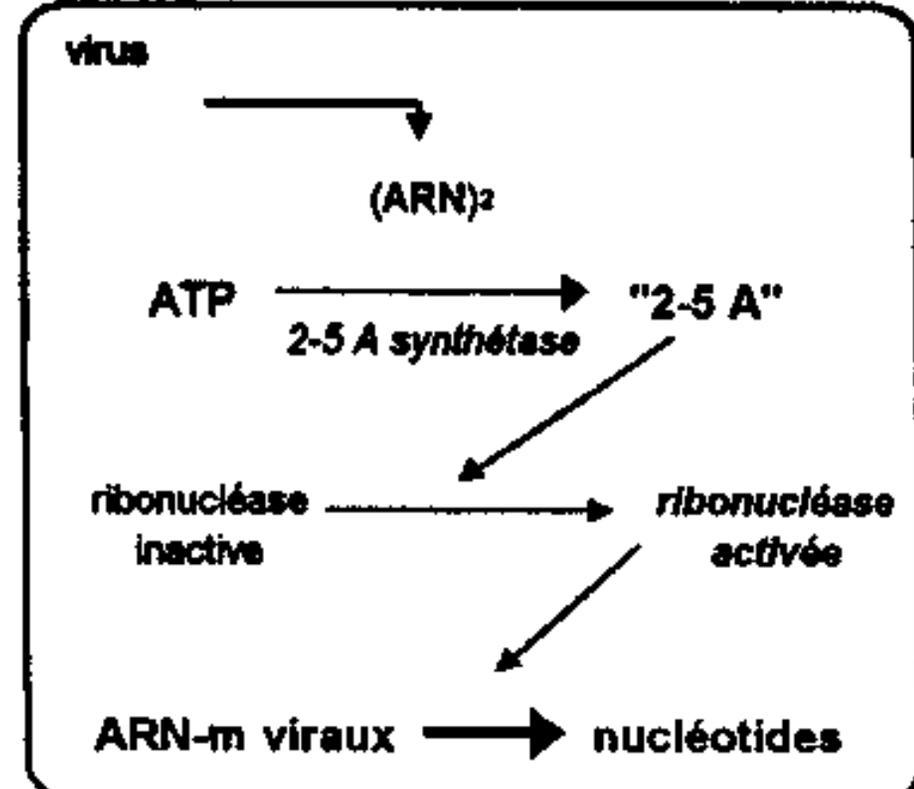
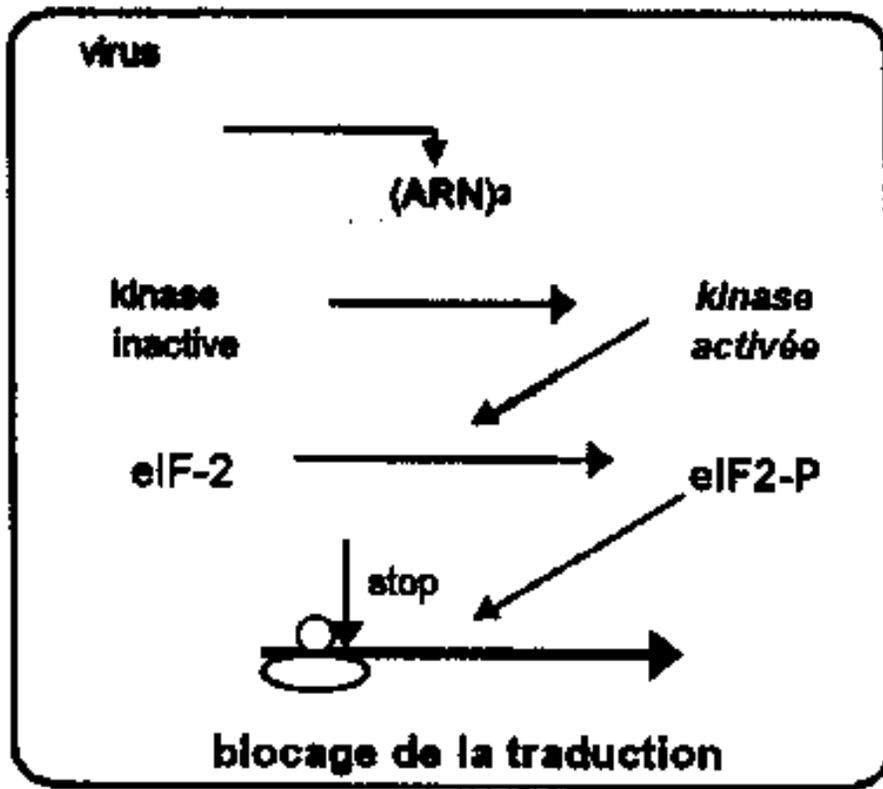


***INTERFERON
ET
PEG-INTERFERON***

- INTERFERON = Cytokine synthétisée en cours d'infection virale
- Signal activateur = ARN bicaténaire

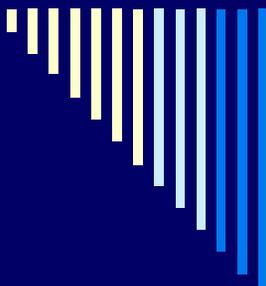


- Deux types d'activité biologique de l'interféron
 - Activité antiproliférative
 - Activité antivirale



Arrêt de la synthèse protéique

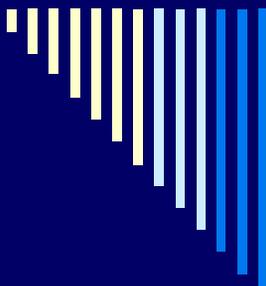
Fragmentation des ARNm



INTERFERON ET HEPATITE B CHRONIQUE

□ Modes d'action

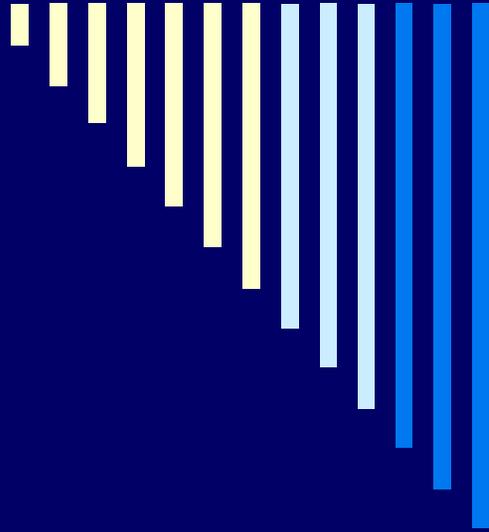
- Inhibition de la réplication virale
- Activation des lymphocytes T cytotoxiques et de cellules NK
- Augmentation de l'expression de HLA I à la surface des cellules infectées
 - ➔ **Meilleure reconnaissance des hépatocytes infectés**



INTERFERON PEGYLE

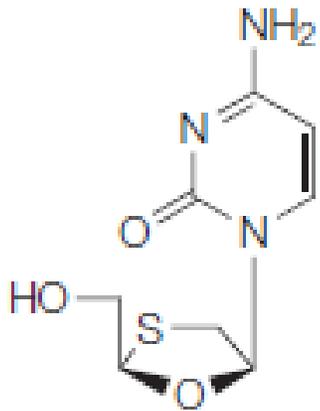
(2005)

- ❑ Interféron couplé au polyéthylène glycol (PEG)
- ❑ Diminution de la clairance rénale de IFN
- ❑ Concentration IFN plasmatique stable et prolongée
- ❑ Injections espacées
- ❑ Meilleure biodisponibilité



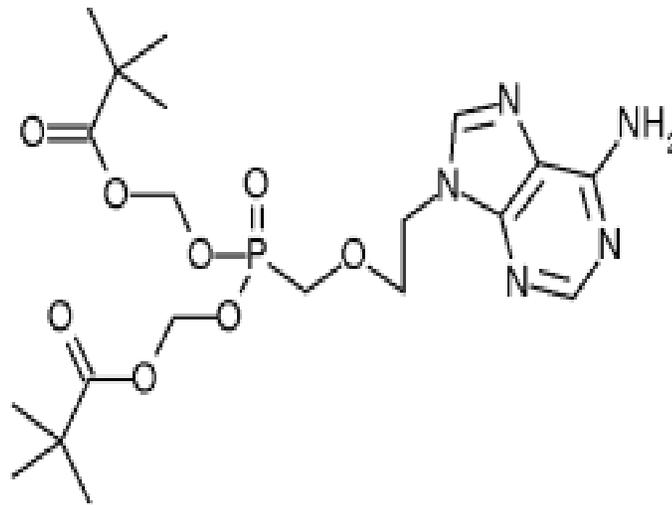
***ANALOGUES
NUCLEOS(T)IDIQUES***

ANALOGUES NUCLEOS(T)IQUES



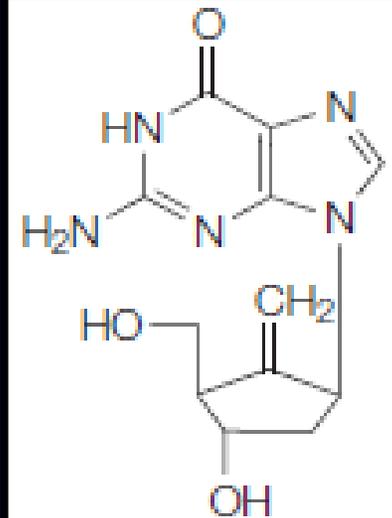
LAMIVUDINE

Analogue de
la didéoxycytidine



ADEFOVIR

Analogue déoxyAdénosine
monophosphonate

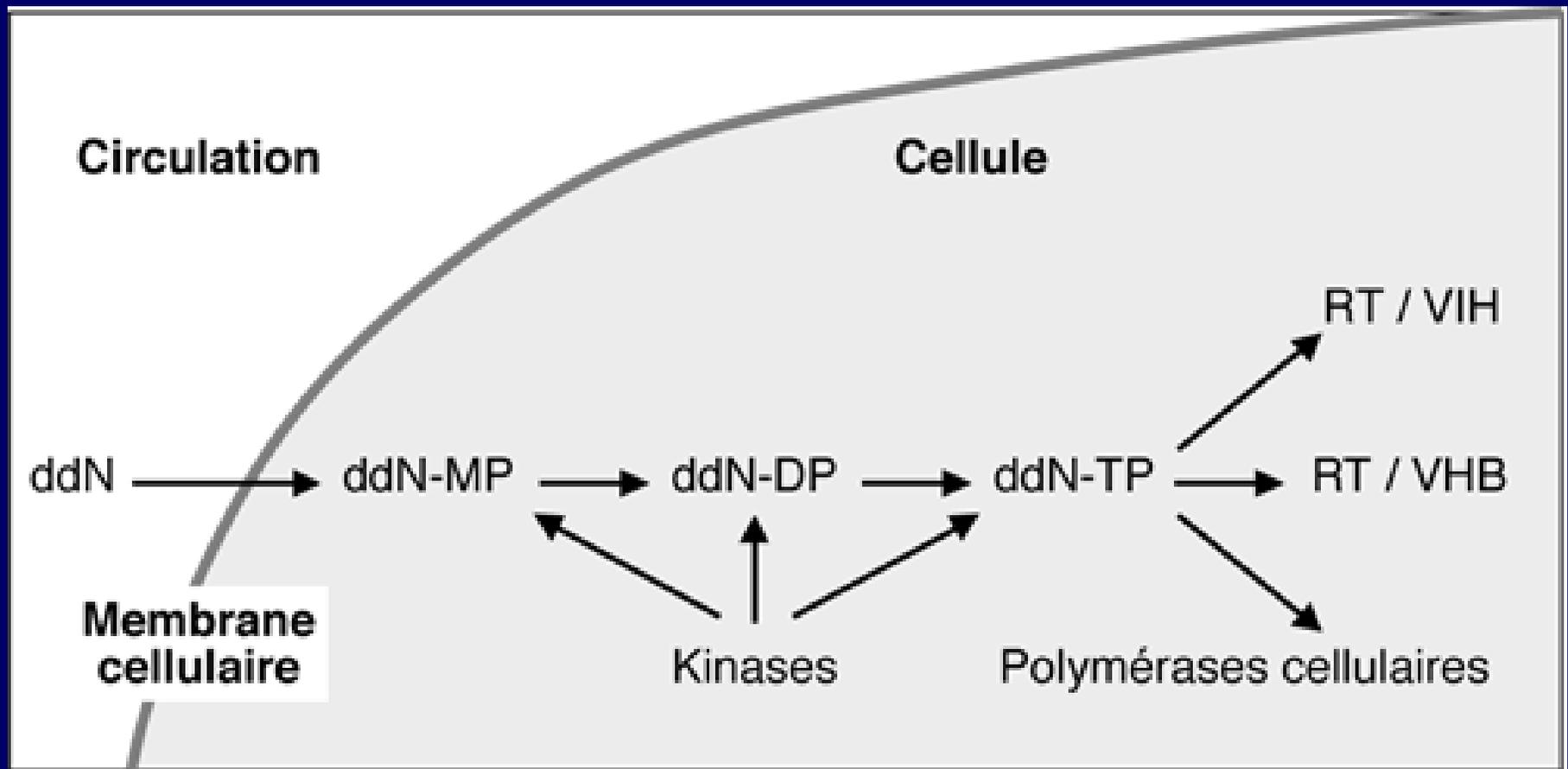


ENTECAVIR

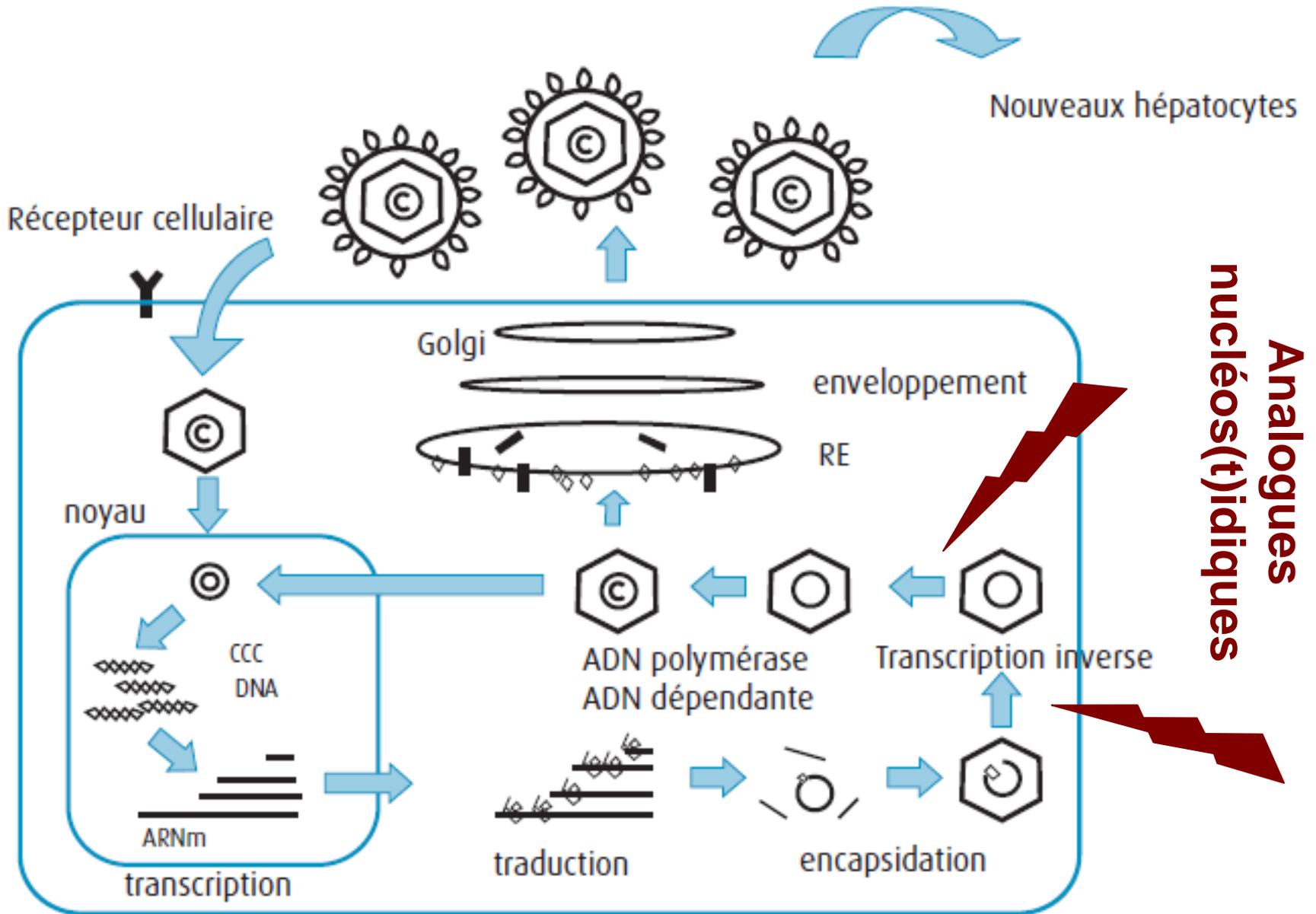
Analogue acyclique
de la Guanosine

ANALOGUES NUCLEOS(T)IQUES

Nécessité d'une triple ou double phosphorylation
pour devenir efficace

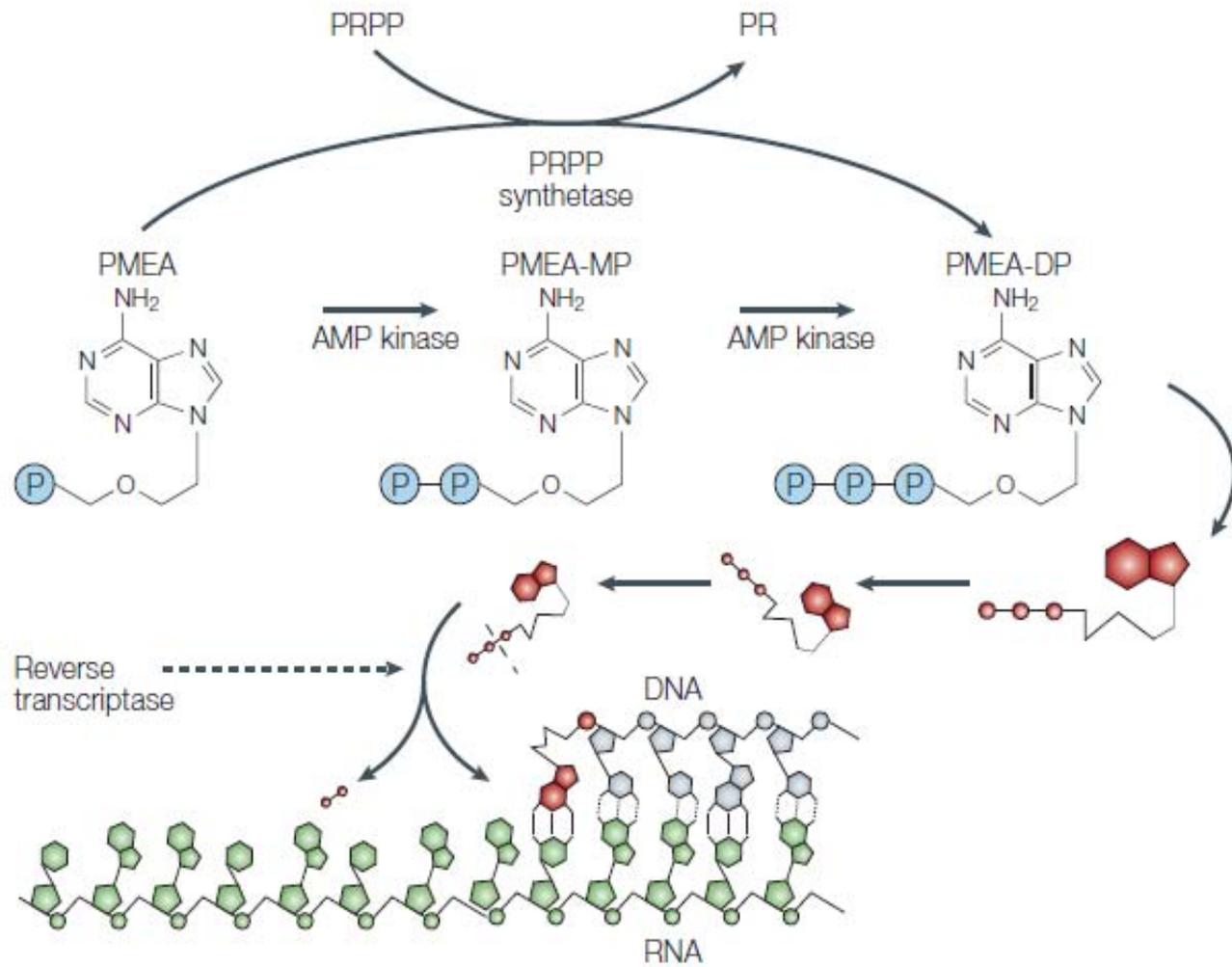


Le cycle de réplication du VHB

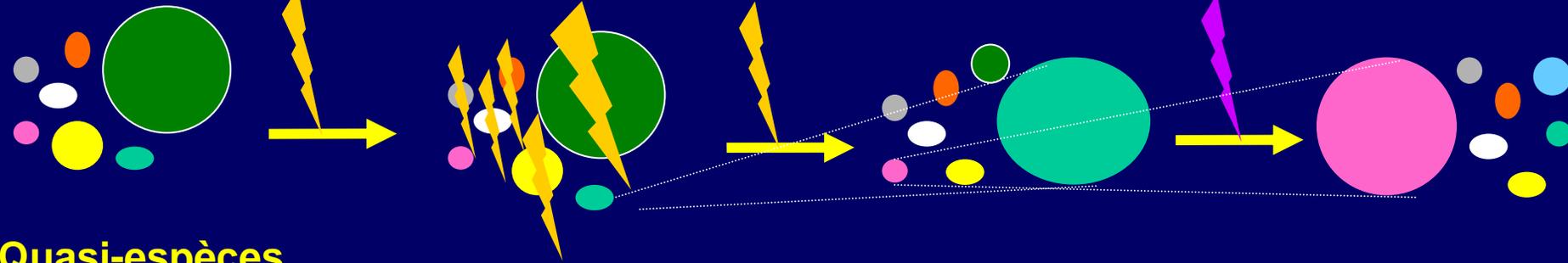
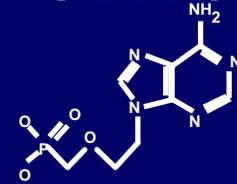
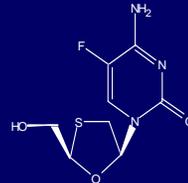


ANALOGUES NUCLEOS(T)IQUES

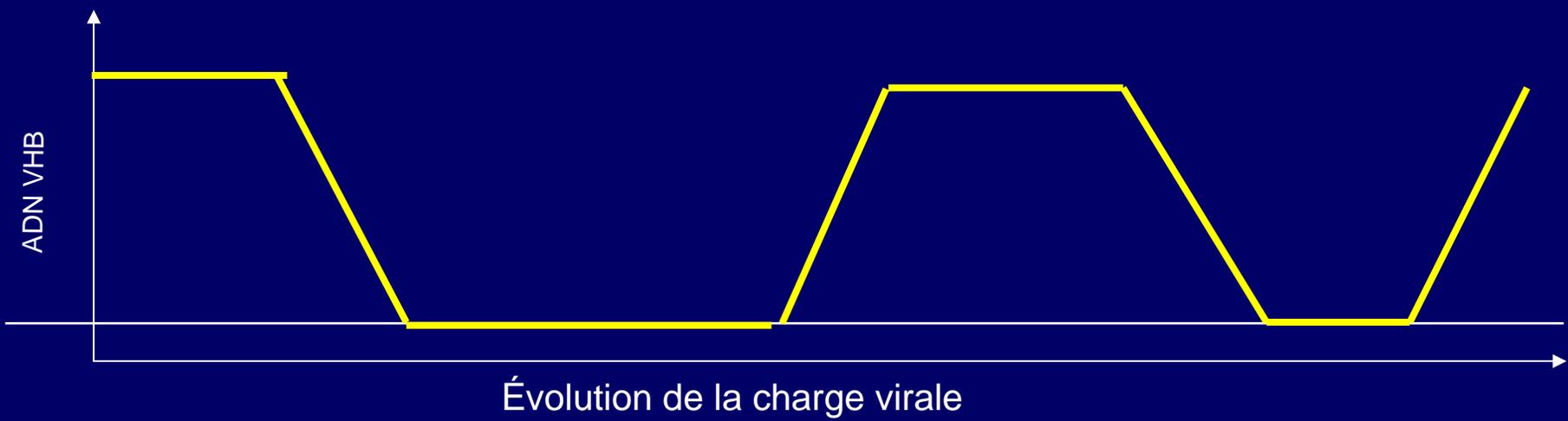
Mode d'action

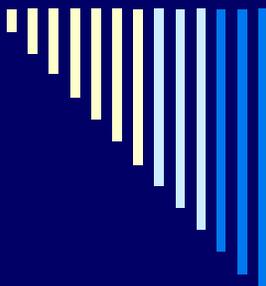


Mécanismes d'apparition des résistances aux traitements



Quasi-espèces





RESISTANCE AUX ANTIVIRAUX

- Suspicion si augmentation de la CV sous traitement ($> 1\log$)
 - **Résistance génotypique**
 - Apparition de mutations de résistance
 - **Résistance phénotypique**
 - Augmentation des transaminases

Résistance à la lamivudine

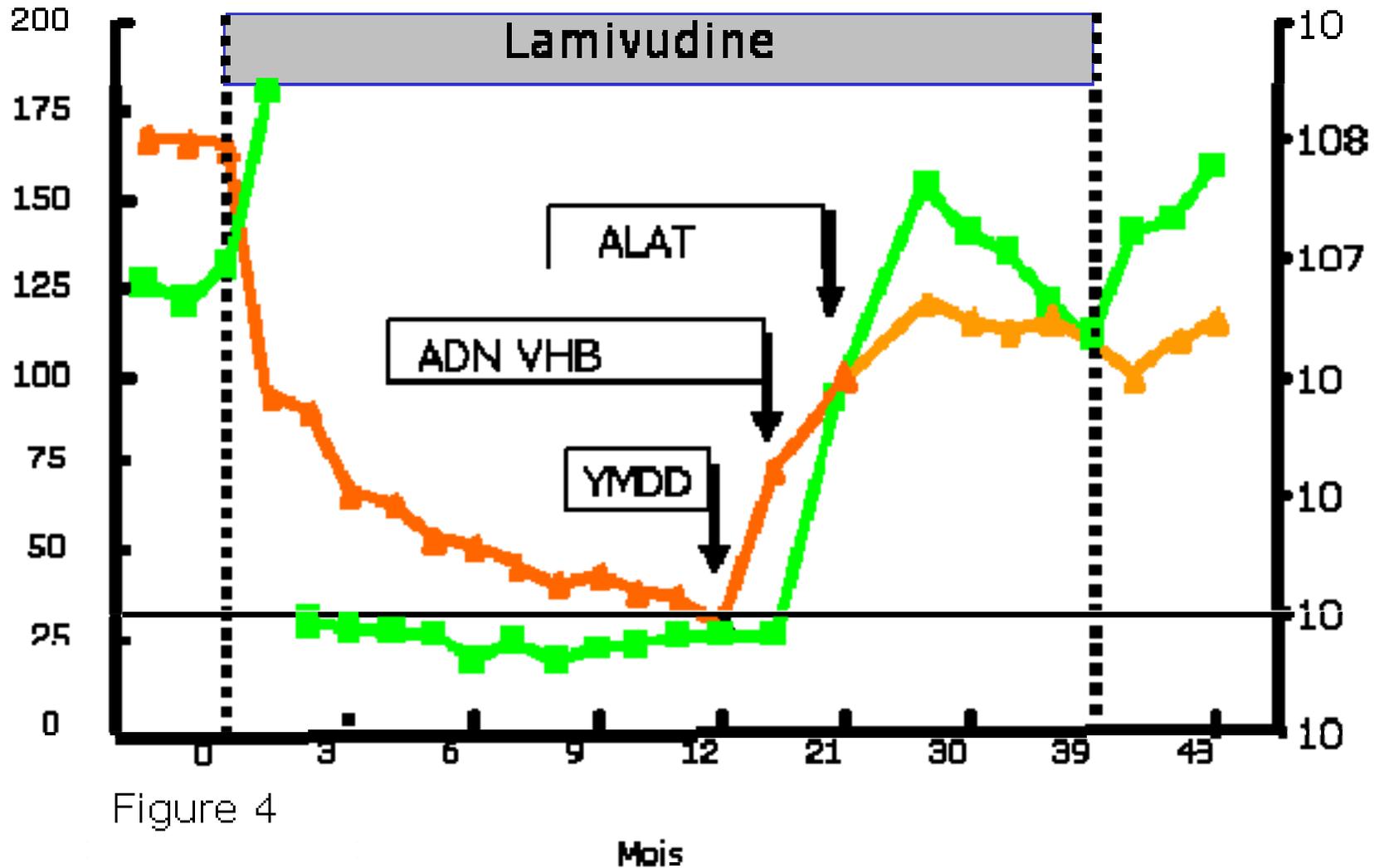
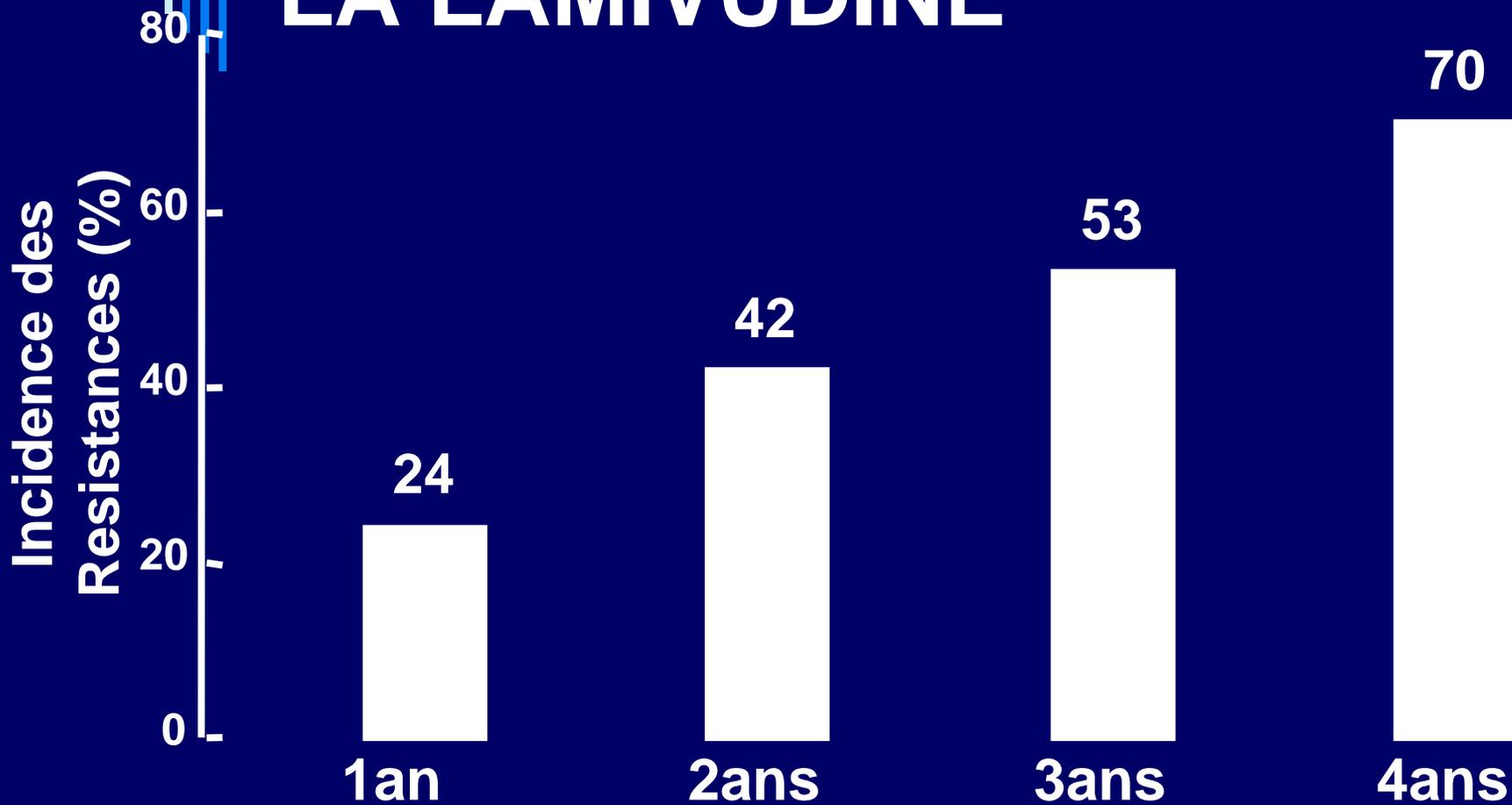
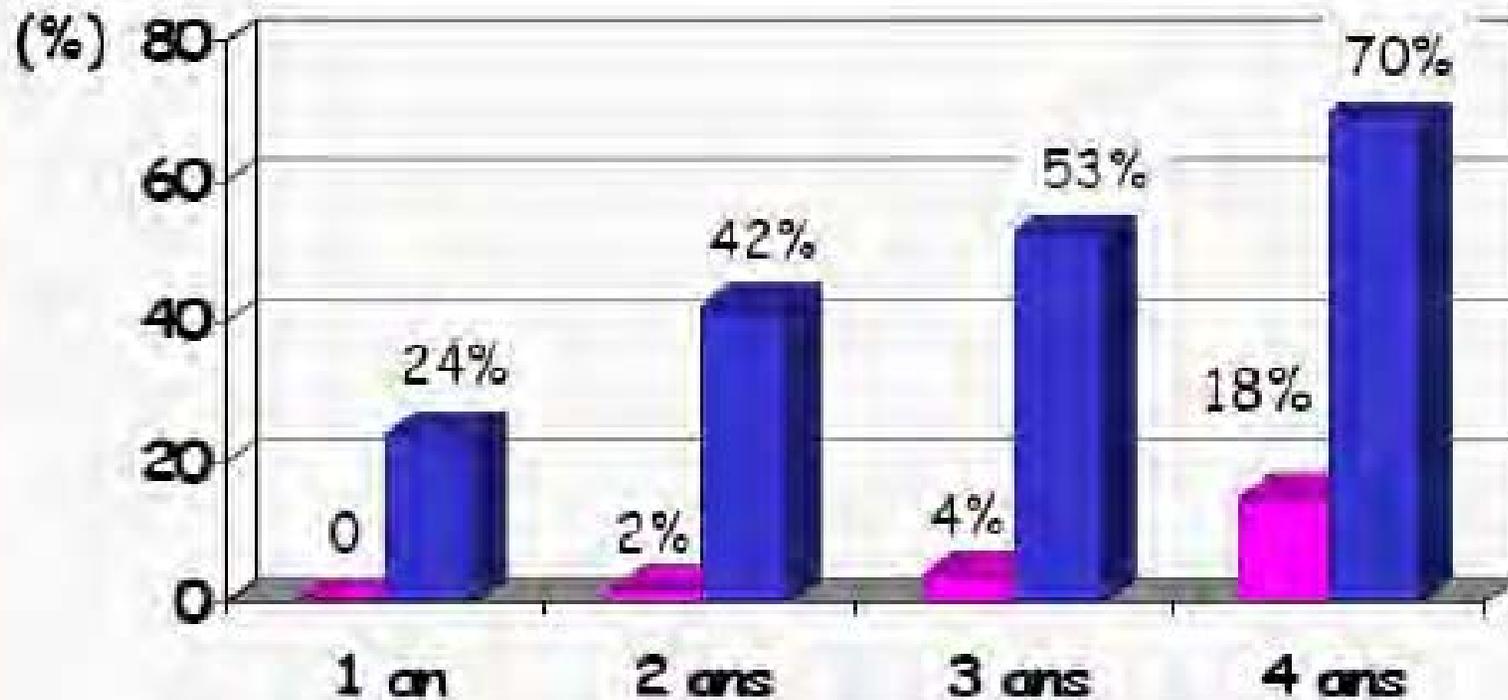


Figure 4

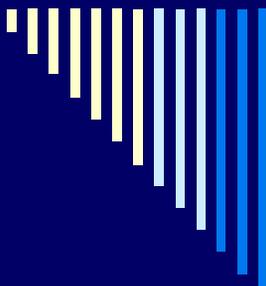
RESISTANCE A LA LAMIVUDINE



RESISTANCE A L'ADEFOVIR



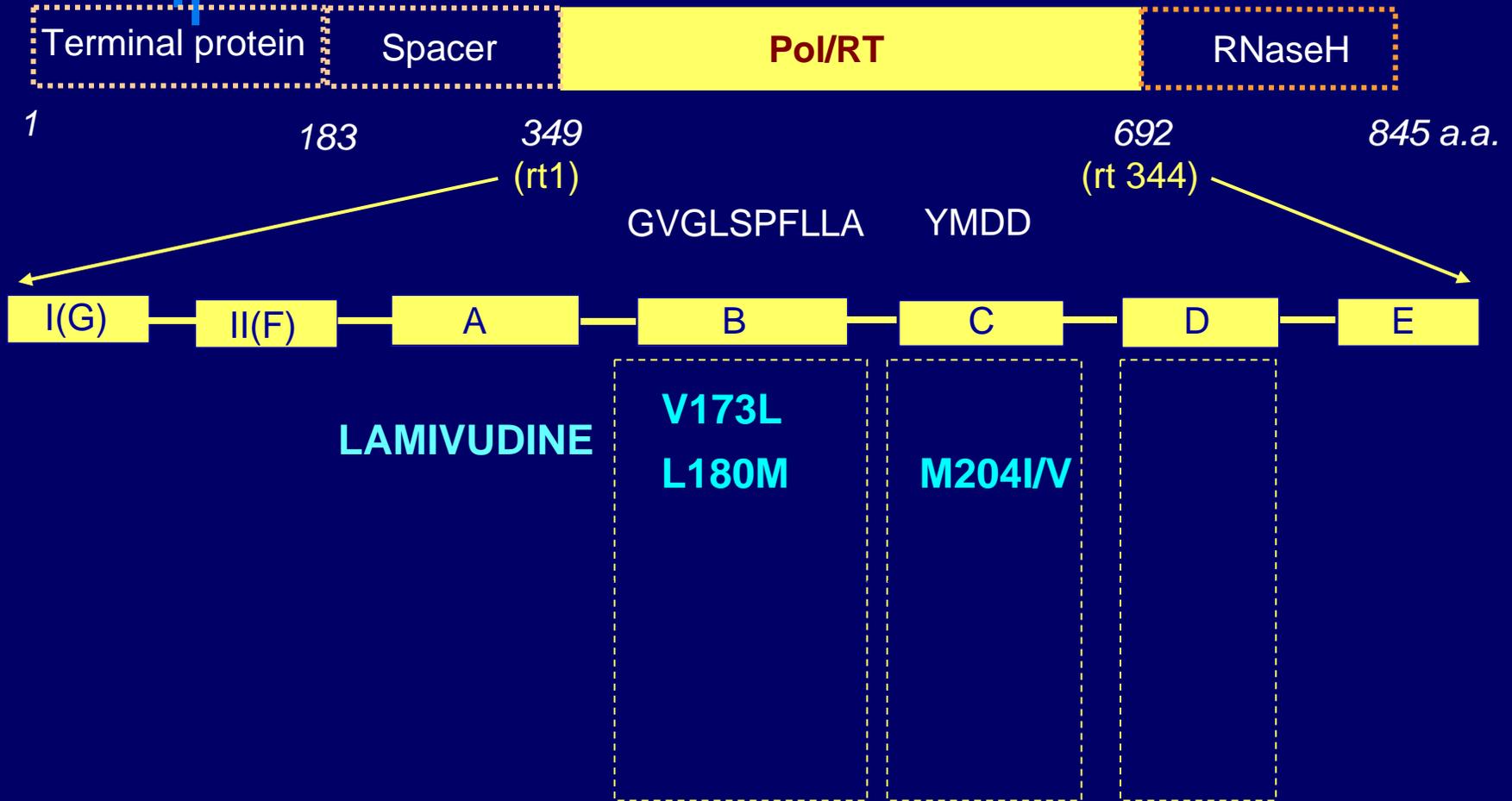
■ Adéfovir ■ Lamivudine

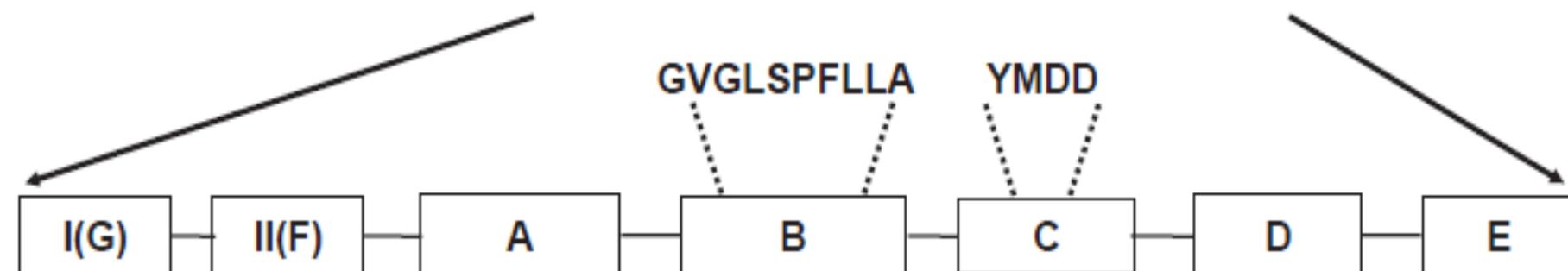
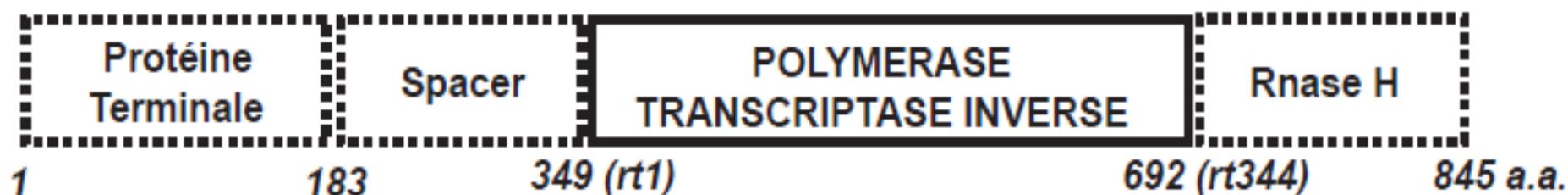


RESISTANCE A L'ENTECAVIR

- Taux de résistance < 1% après 4ans de traitement primaire
- Taux de résistance > 1%, 10, 27 et 39% après 1, 2, 3 et 4ans si résistance à la lamivudine

MECANISME DE RESISTANCE A LA LAMIVUDINE





Résistance lamivudine

rtL180M
rtV173L

rtM204
V/I/S

Résistance adefovir

rtA181V

rtN236T

Résistance entecavir*

rtT184
S/A/I/LT

S202G/C

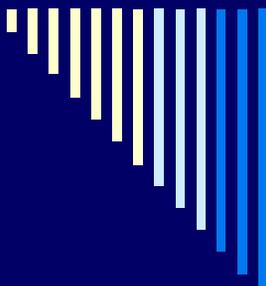
rtM250
I/V

Résistance telbivudine

rtL180M

rtM204I

* Les mutations rtL180M et rtM204V doivent être pré-existantes



Profils de résistance croisée aux antiviraux

Tableau 1 Données de résistances croisées, obtenues in vitro, pour les molécules antivirales disponibles en clinique.

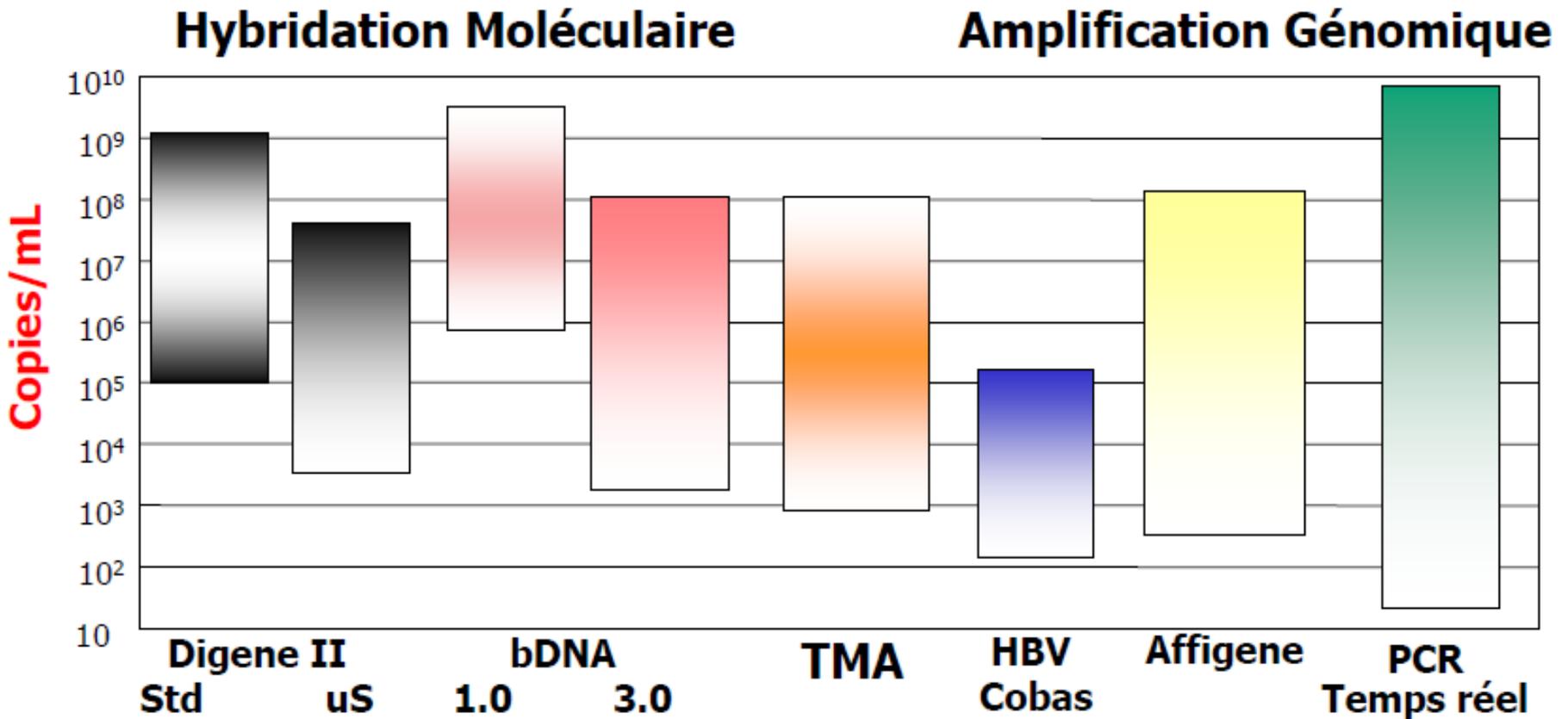
Cross-resistance data, obtained in vitro, for clinically available antivirals.

	Lamivudine	Telbivudine	Entécavir	Adéfovir	Ténofovir
Wild-type	S	S	S	S	S
M204I	R	R	R	S	S
L180M + M204V	R	R	I	S	S
A181 T/V	I	S	S	R	S
N236T	S	S	S	R	I
I169T + V173L + M250V*	R	R	R	S	S
T184G + S202I/G *	R	R	R	S	S

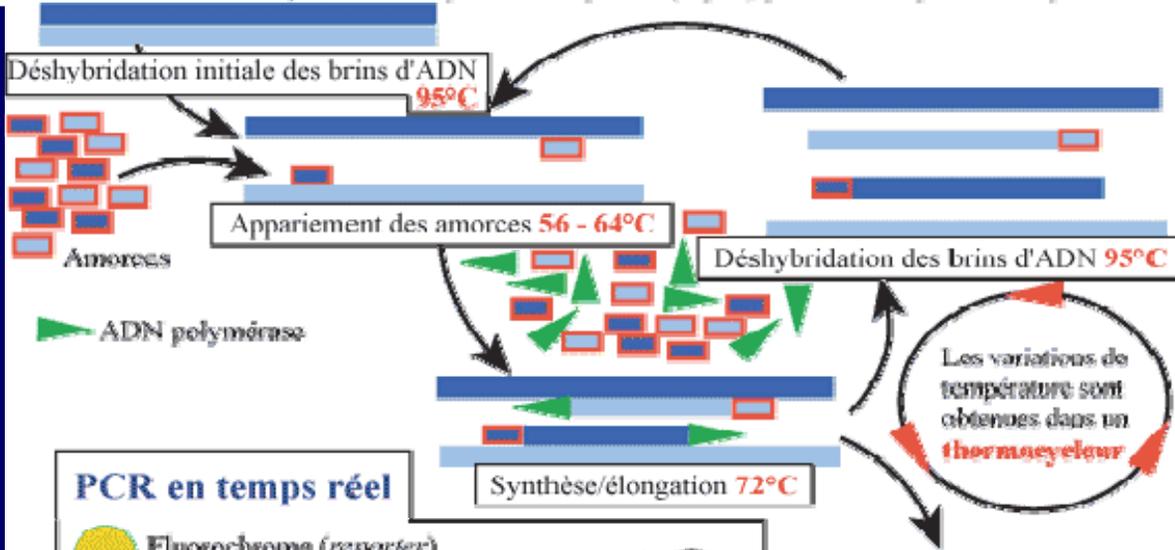
*sur un fond génétique de mutations à la position rtM204

R : résistant ; S : sensible ; I : baisse de susceptibilité

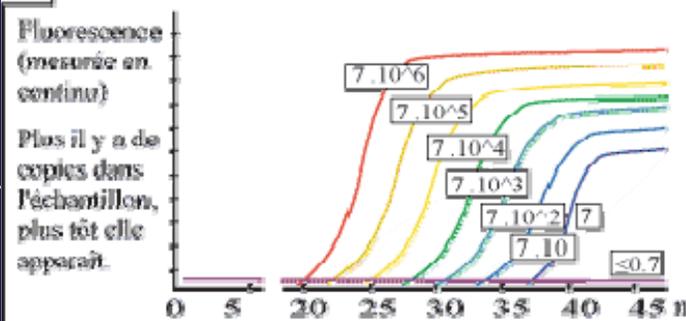
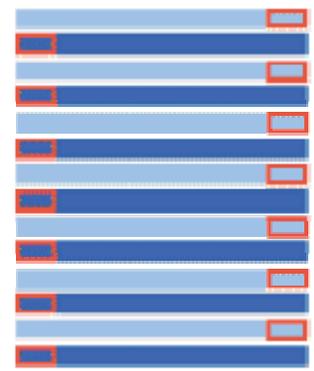
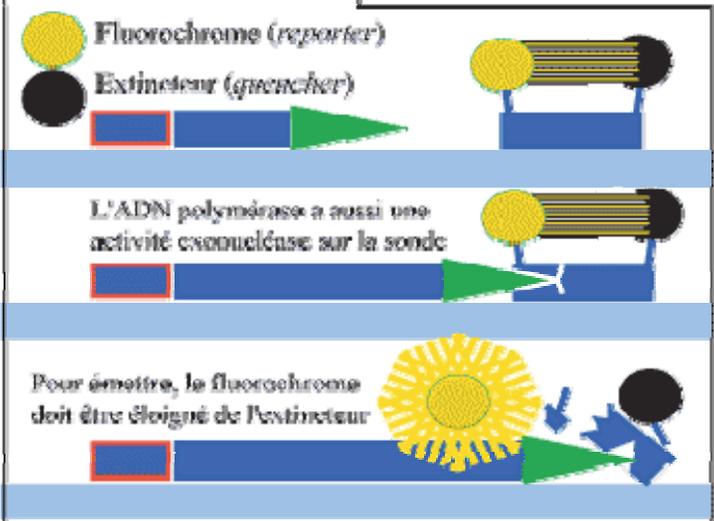
DOSAGE DE L'ADN VIRAL



chromosome est écarté d'un "extincteur" par l'ADN polymérase). De la cinétique (c'est à dire du 1er cycle donnant une fluorescence) on déduit la quantité d'amplifiés (copies) présents au départ dans le prélèvement.



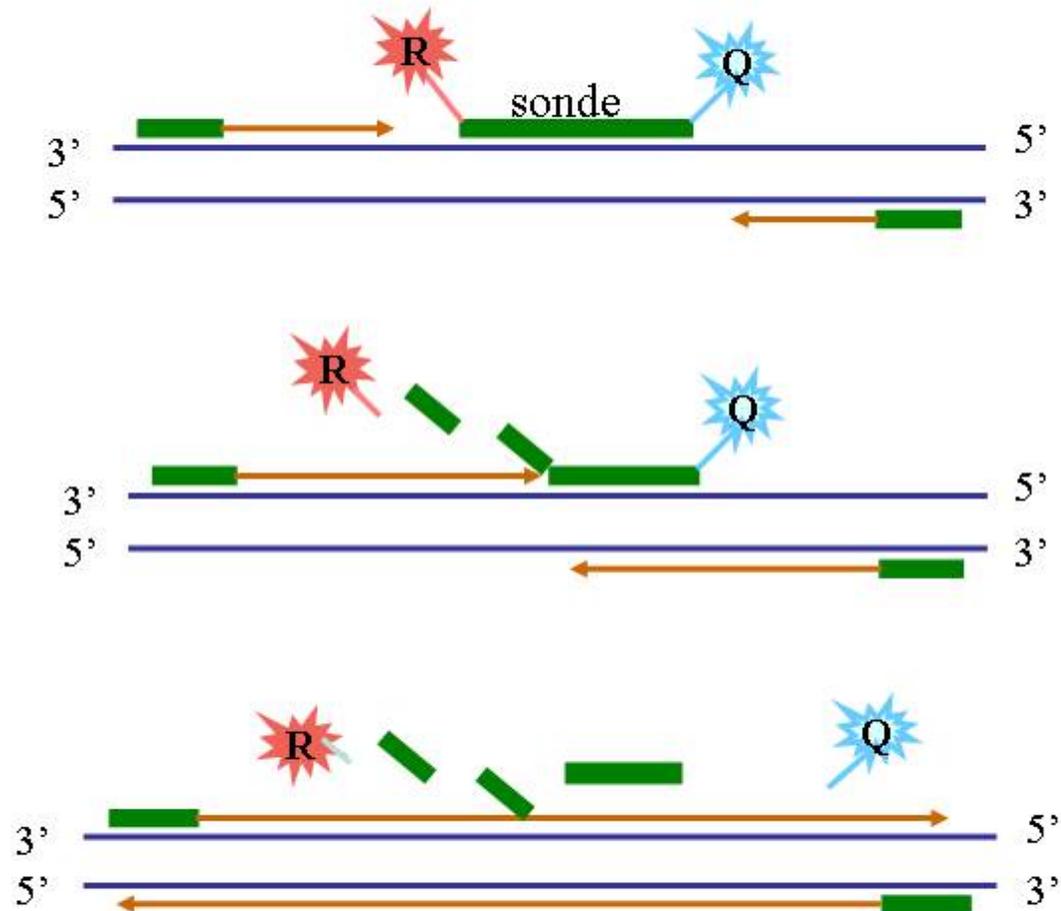
PCR en temps réel

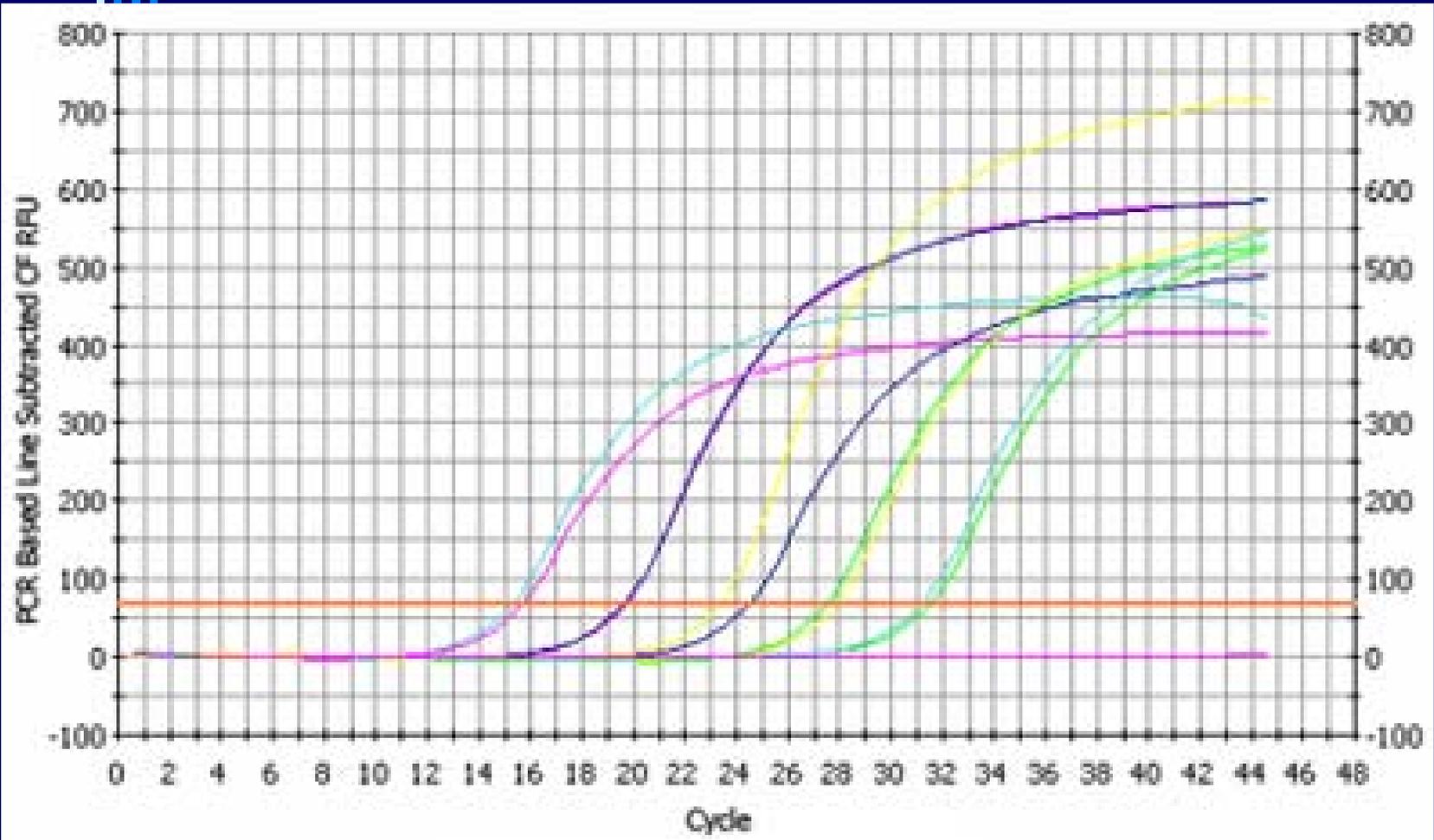
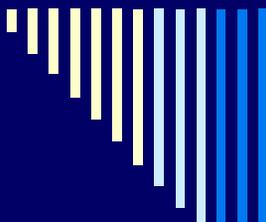


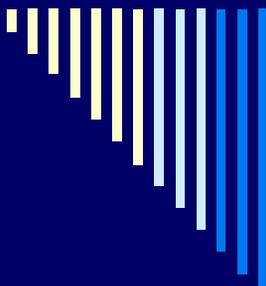
Ici la fluorescence est décelable dès le 20^e cycle pour l'échantillon à $7 \cdot 10^6$ copies, au 33^e cycle pour celui à 70 copies, au 57^e pour celui à 7 copies.

Pour "0.7 copies" ou aucune, pas de fluorescence au terme de 40-45 cycles (nombre habituel de cycles pour une PCR).

PCR quantitative par la méthode TaqMan



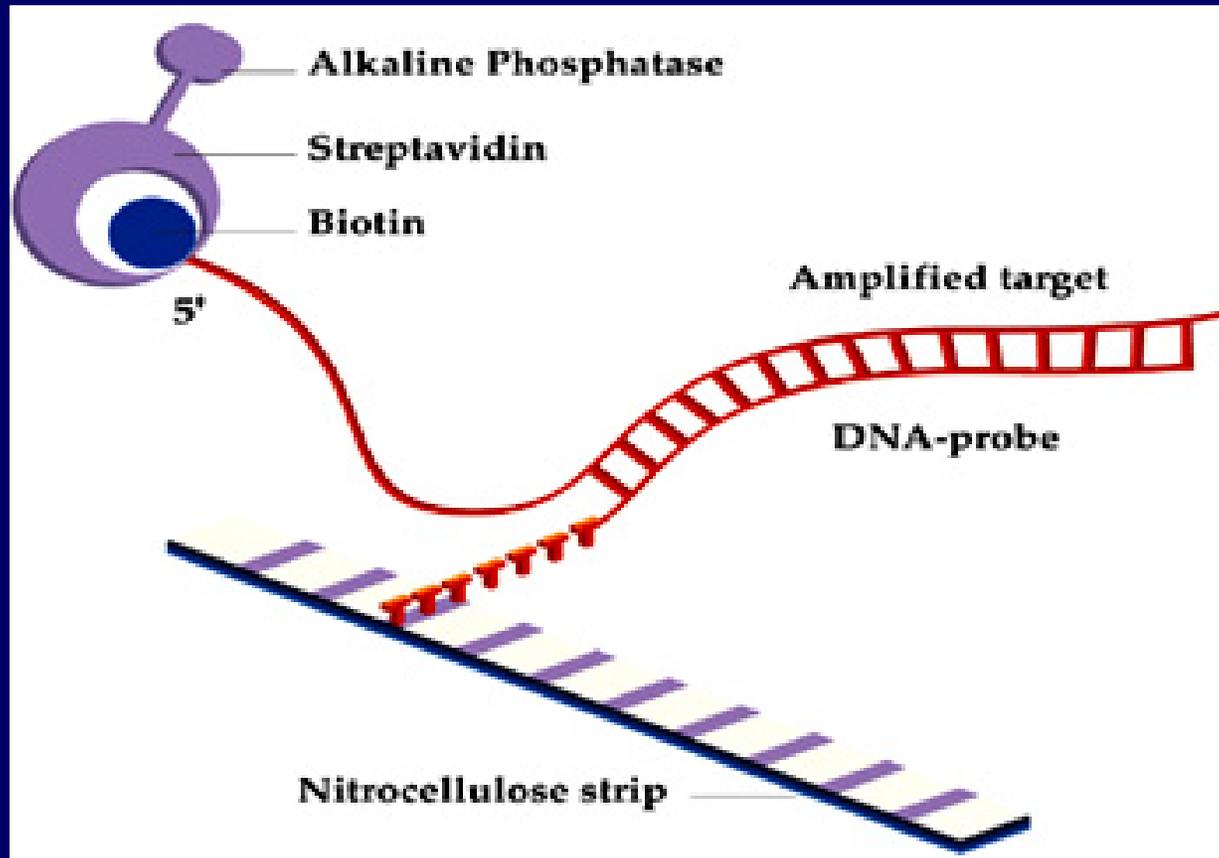




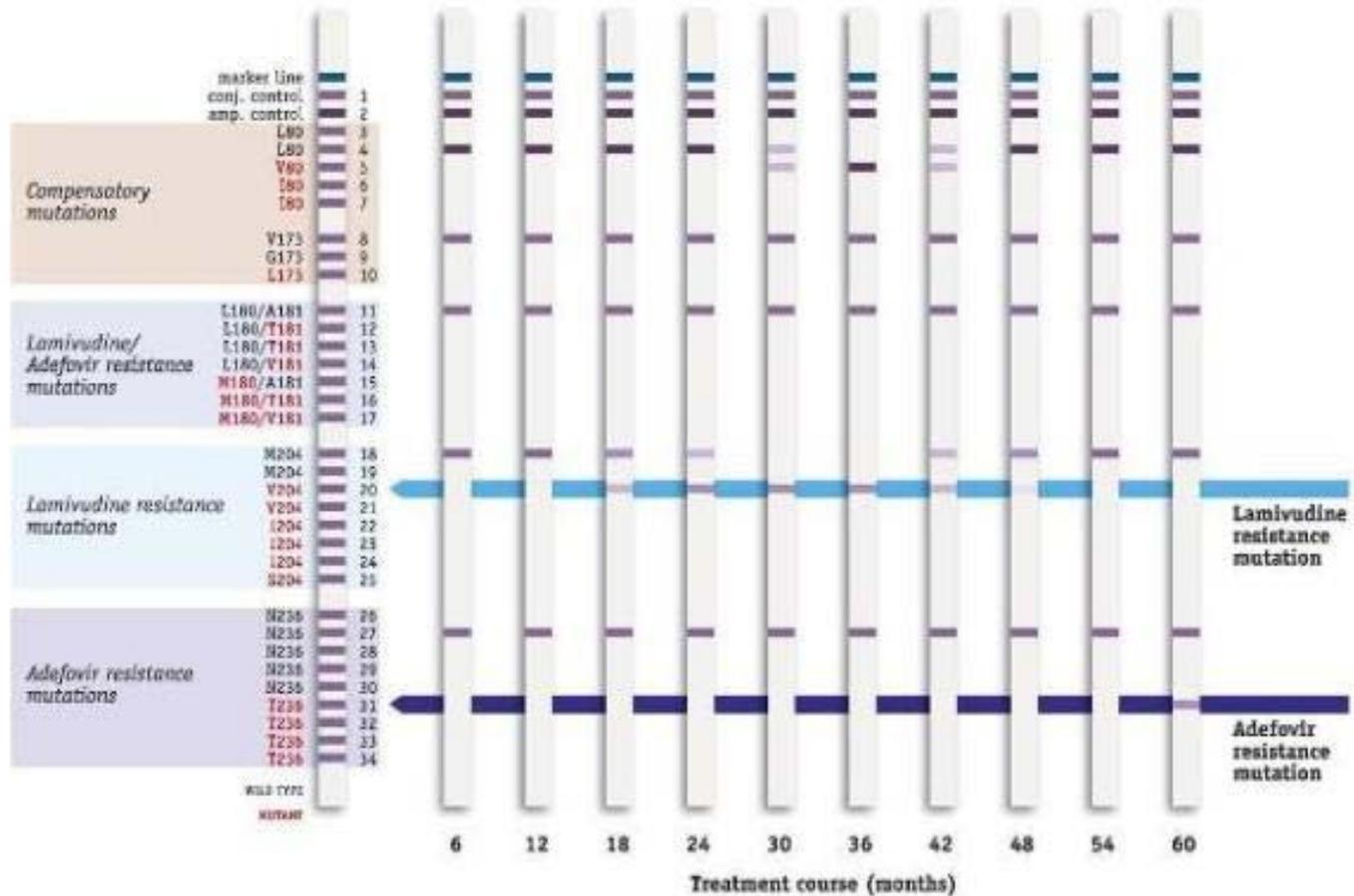
Mise en évidence des mutants de résistance aux antiviraux

- Technique d'hybridation inverse (InnoLiPA)
 - Séquençage partiel dans le gène de la polymérase
 - Détection des mutations par Light Cycler
 - Autres techniques génotypiques
 - Spectrométrie de masse
 - Puces à ADN
 - Techniques phénotypiques
-

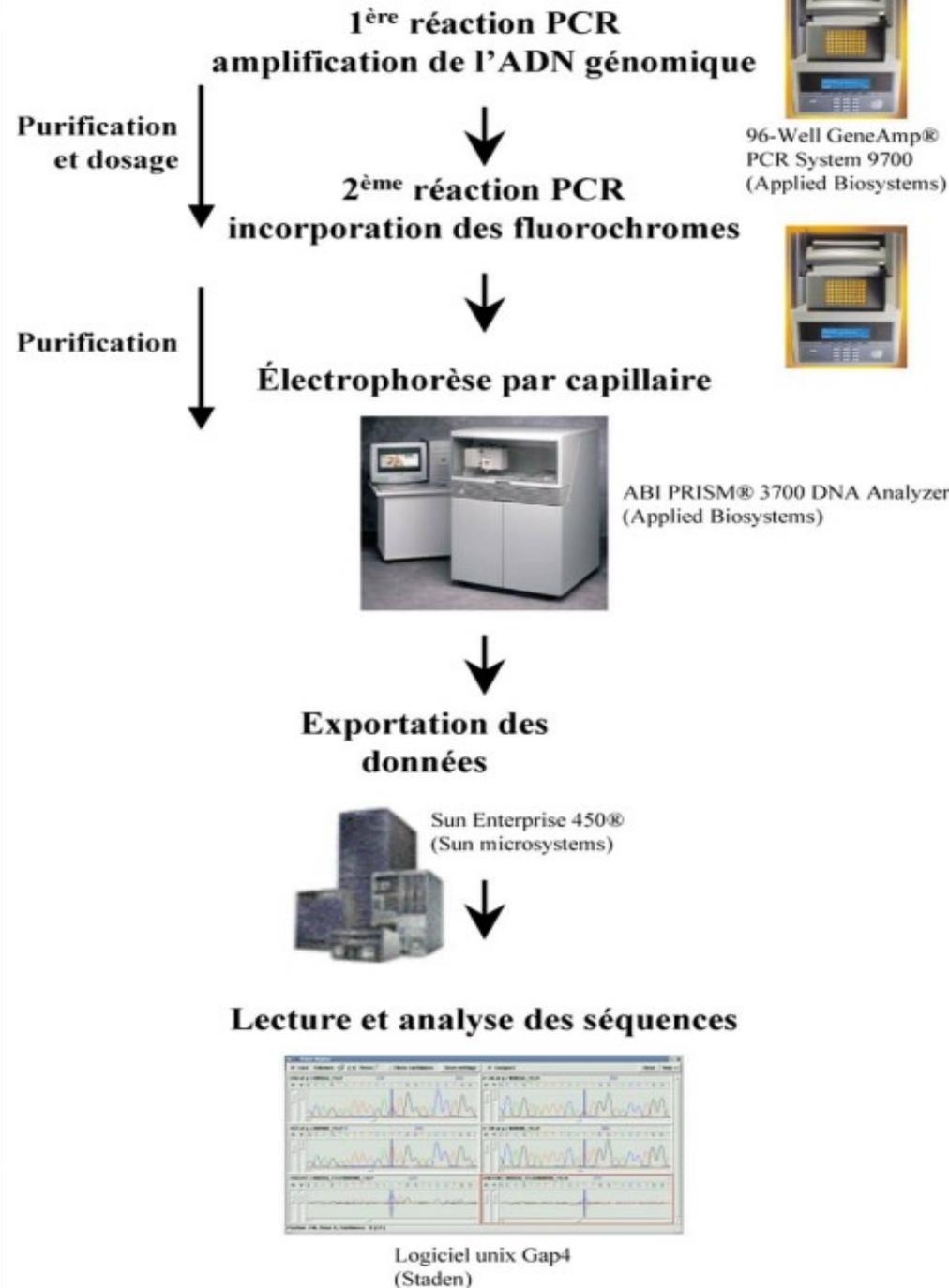
Technique d'hybridation - INNOLiPA



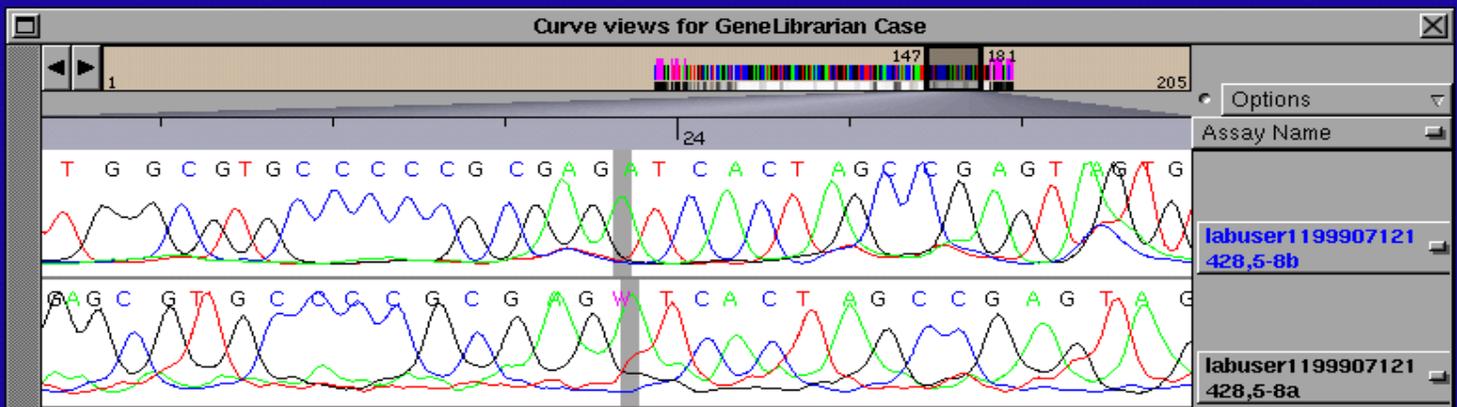
Technique d'hybridation - INNOLiPA



Recherche de mutations par séquençage



- GeneObjects
- Info
- Document
- Edit
- Format
- Tools
- Librarian
- Windows
- Print... p
- Services
- Hide h
- Quit q



labuser5199909151026 - Training HCV Database

Query: labuser1199907121428,5-8a & labuser1199907121428,5-8b

Name	Score	Similarity	Indels	Mismatch
3a_NZL1_D17763.seq	78/78	99.47	0	1
3a_FU99010VGI.seq	77/78	98.94	0	2
3a_T1787_L29467.seq	77/78	98.94	0	2

Q = Merge of Query Sequences
 1 = labuser1199907121428,5-8b Unknown dir 3' LR980115 2 UNTR Unanalyzed Processed
 2 = labuser1199907121428,5-8a Unknown dir 5' LR980115 2 UNTR Unanalyzed Processed
 W = 3a_NZL1_D17763.seq
 U = union of HCV_5'NC.gnl sequences

```

Q   1  AcGAGTGTcGTGCAGCCTCCAGGA-cCTCCCTCCCggGAGAG-CCATAGTGGTCTGgGGAACC-gGTGAGTACACCGGAATCGCTGgGGTGACCGGGTCCCTTC- 102
1  16  ASGAGTGTcGTGCAGCCTCCAGGA-cCTCCCTCCCggGAGAG-CCATAGTGGTCTGgGGAACC-gGTGAGTACACCGGAATCGCTGgGGTGACCGGGTCCCTTC- 116
2  20  YGTGCAG-CTCCAGG-cCTCCCTCCCggGAGAG-CCATAGTGGTCTGgGGAACC-gGTGAGTACACCGGAATCGCTGgGGTGACCGGGTCCCTTC- 111
W   1  AcGAGTGTcGTGCAGCCTCCAGGA-cCTCCCTCCCggGAGAG-CCATAGTGGTCTGgGGAACC-gGTGAGTACACCGGAATCGCTGgGGTGACCGGGTCCCTTC# 102
U   1  AYGAGTRTYGHRcAGCCTCCA#GN###CYCCYCCGSGAGAG##CATRGTGTCTKCGSAACC#KKYGAGTWACSSSAATYRBYRRRRHGACVGRGTCCCTTC# 98
      1                               28                               58                               88
  
```

```

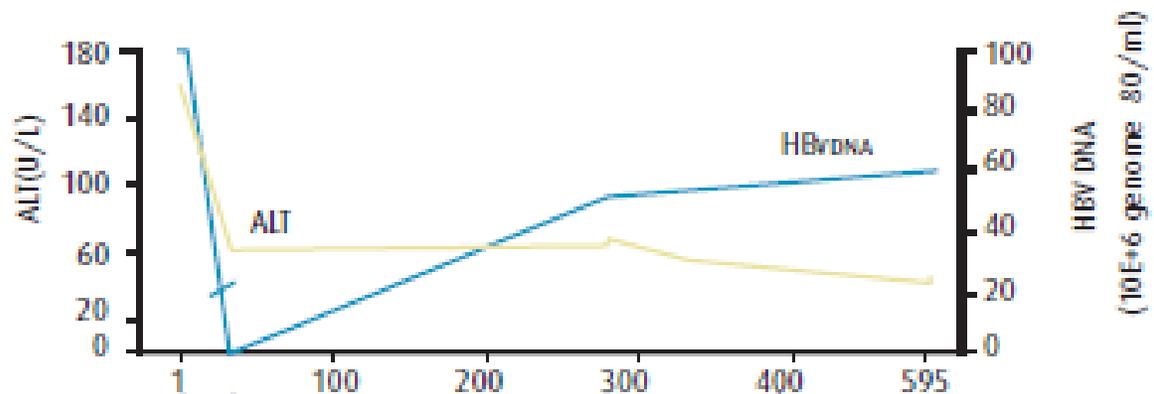
Q 103 -TTGGAG-CAA#CCGCTCAATACCCAGAAATTTGG-GCGTGC#CCCCGCGAG#TCACTAGCCGAGTAGTGTGGTGGTCGCgAAAGG 183
1 117 -TTGGAG-CAA#CCGCTCAATACCCAGAAATTTGG-GCGTGC#CCCCGCGAG#TCACTAGCCGAGTAGTGTGGTGGTCGCgAAAGG 185
2 112 -TTGGAG-CAA#CCGCTCAATACCCAGAAATTTGGAGCGTG#CCCCGCGAG#TCACTAGCCGAGTAGTGTGGTGGTCGCgAAAGG 192
W 103 #TTGGAG#CAA#CCGCTCAATACCCAGAAATTTGG-GCGTGC#CCCCGCGAG#TCACTAGCCGAGTAGTGTGGTGGTCGCgAAAGG 183
U 99 ##TGGRN#HWM#CCRC#WRTRY#YHRRHV#ATTTGG-RCRYG#CCCCGCGAG#TCACTAGCCGAGTAGTGTGGTGGTCGCgAAAGG 176
      118                               148                               157                               178
  
```

Apply Locked Bases Clear Locked Bases Show Amino Acids Wrap

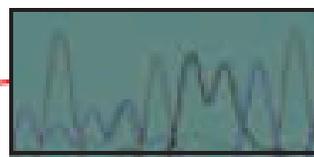


10:30:19
WED SEP 15

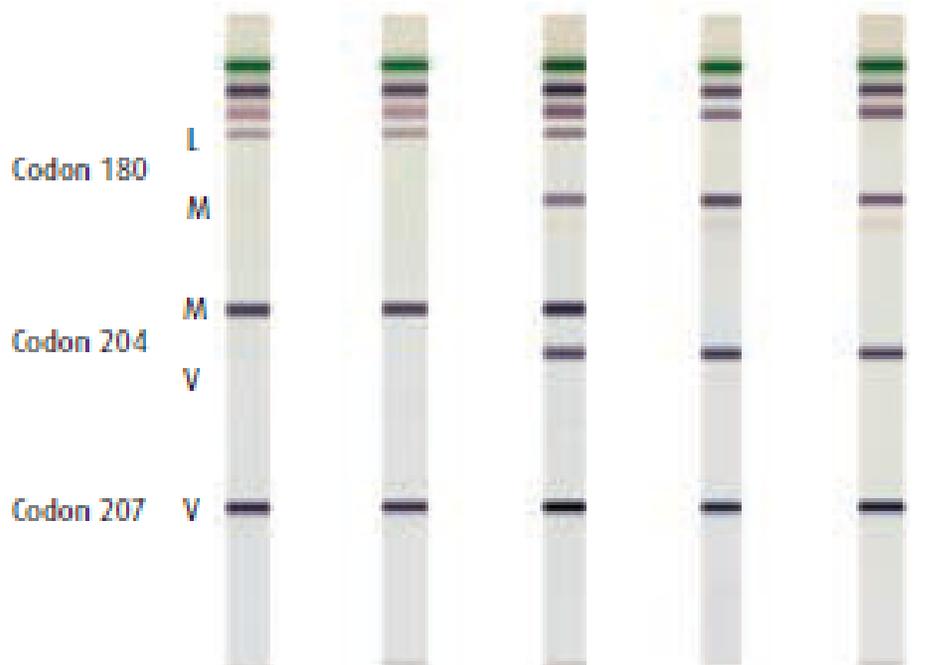




Day	1	39	290	400	595
Codon 180	LiPA	L	L/M	M	M
	Seq	L	L/M	M	M
Codon 204	LiPA	M	M/V	V	V
	Seq	M	M	V	V
Codon 207	LiPA	V	V	V	V
	Seq	V	V	V	V



Séquencage de produits de PCR
 Peut détecter toute nouvelle mutation



LIPA

Très sensible (mutants minoritaires et charge virale faible)

PCR en Temps réel

Méthode Light Cyclier

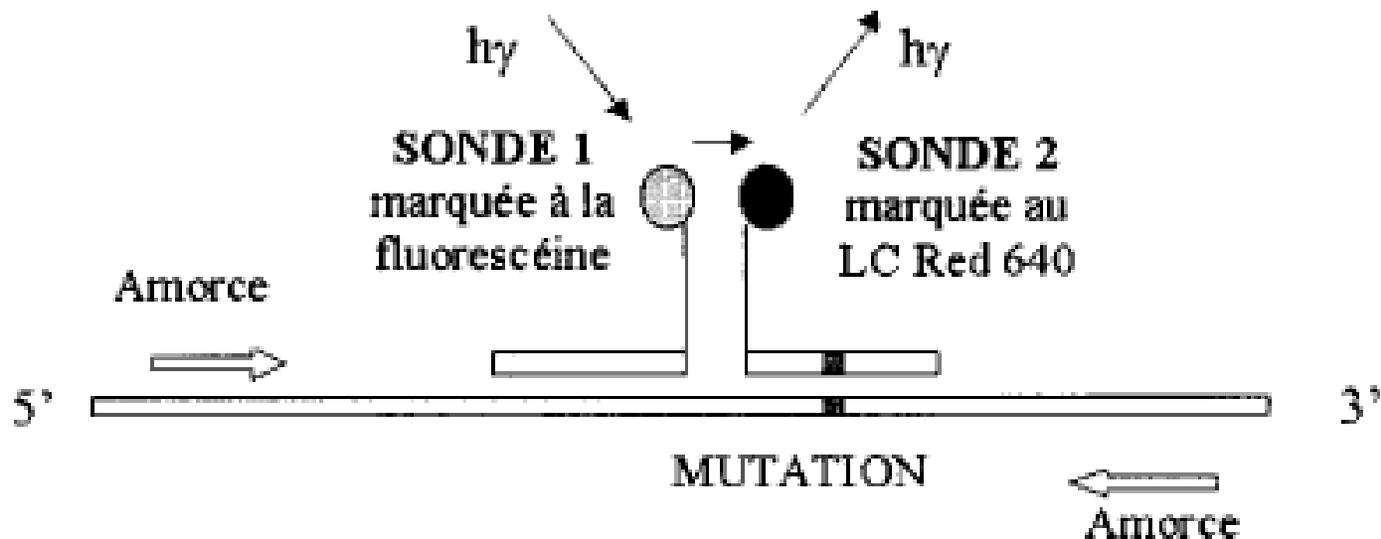
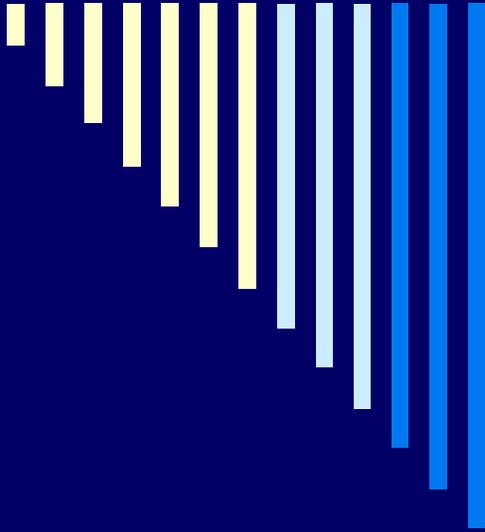
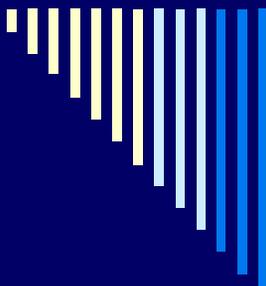


Fig 6. Principe de détection de mutations à l'aide de sondes marquées par PCR en temps réel.

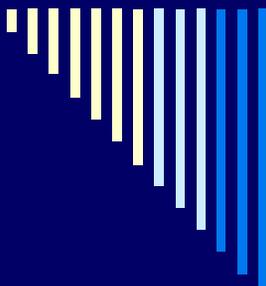


***PERSPECTIVES
THERAPEUTIQUES***



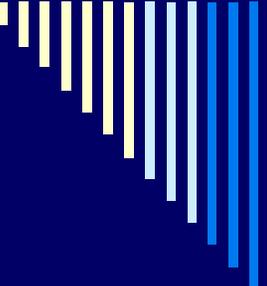
NOUVEAUX ANTIVIRAUX

- **Ténofovir**
 - **Clévudine** (Ans de la thymidine)
 - **Pradéfovir** (précurseur de l'ADF)
 - **LB 80380 (ANA 380)**: Ans de la guanosine
 - **Valtorcitabine**
 - **Ramafovir**
 - **Alamifovir**
 - **Amdoxovir**
-



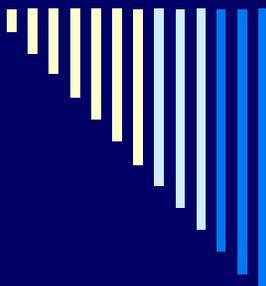
IMMUNOTHERAPIE

- **Virus non cytolitique**
 - **Rôle de la réponse immunitaire spécifique et inflammatoire non spécifique dans la lyse cellulaire**
 - Infection chronique
 - Réponse cellulaire T faible, de spécificité restreinte et difficilement détectable en périphérie
 - Présence de LT spécifiques au niveau du foie + fort infiltrat lymphocytaire non spécifique
 - Production de cytokines (réponse Th1) nécessaires au contrôle viral par les LT stimulés est faible ou absente
-



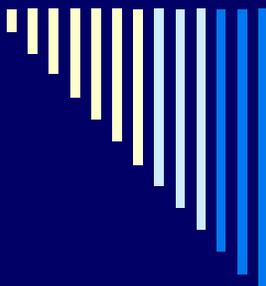
IMMUNOTHERAPIE

- Immunothérapie non spécifique ou spécifique par lymphocytes T
 - Inhibition d'IL10
 - Administration de lymphocytes T activés
 - Augmentation de la réponse immune spécifique en greffant sur les lymphocytes T des récepteurs recombinants
-



VACCINOTHERAPIE

- Vaccinothérapie
 - Vaccin protéique
 - Vaccin à ADN permettant une induction d'une réponse immune cellulaire et humorale
 - Vaccinothérapie associée à un traitement antiviral
-



CONCLUSION

- Importance du choix thérapeutique
 - Risque de résistances aux antiviraux
 - Risque de résistances croisées
 - Recours aux techniques sensibles
 - Surveillance du traitement
 - Détection précoce des mutants de résistance
 - **Importance de la recherche sur la thérapeutique contre l'infection par le VHB**
 - **Importance de la prévention**
-