

**DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT**

**(Arrêté du 25 mai 2016)**

Date de la soutenance : **19 octobre 2018**

Nom de famille et prénom de l’auteur : **INCHAUSPE Aurore**

Titre de la thèse : « De la détection de l'ADNccc par de nouvelles technologies à la preuve de concept de sa dégradation à visée thérapeutique dans des modèles d'infection par le virus de l'hépatite B ».



**Résumé**

L’infection par le virus de l’hépatite B est un problème de santé publique avec 325 millions de porteurs chroniques et cela malgré l’existence d’un vaccin préventif. Les traitements actuellement utilisés sont les analogues de nucléos(t)ide et/ou l’interféron α. Bien qu’ils permettent une diminution de la charge virale, ils ne permettent pas d’éradiquer la maladie du fait de la persistance de l’ADNccc, le minichromosome de l’hépatite B. Cet ADN sert de matrice à la transcription virale, et la présence d’une seule copie permet la réactivation de l’infection.

En prenant en compte la longue demi-vie des hépatocytes et de la stabilité de l’ADNccc dans leur noyau, un modèle mathématique suggère que de nombreuses années de traitement seraient nécessaires pour éliminer complètement cet ADN du foie des patients infectés chroniquement.

Les techniques utilisées en routine pour la quantification de l’ADNccc ne sont pas assez sensibles pour pouvoir détecter des faibles concentrations de cet ADN, notamment dans des biopsies de patients infectés chroniquement et traités à long terme. Il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies permettant de cibler directement l’ADNccc afin d’éliminer le virus.

Ainsi les travaux de cette thèse reposent sur le développement d’une nouvelle technologie : la Droplet Digital PCR (ddPCR) pour permettre la quantification de l’ADNccc dans les biopsies de patient. Cette technique permet un gain de 2 log au niveau de la sensibilité par rapport à la qPCR, technique utilisée actuellement en routine. Elle nous a ainsi permis de constater la présence de cet ADN chez des patients traités à long terme par des analogues de nucléos(t)ides et même en présence d’interféron. La présence d’ARNpg et les expériences de ChiP ont également confirmer que l’ADNccc était encore transcriptionnellement actif.

Ces résultats confirment d’autant plus la nécessité d’élaborer de nouvelles thérapeutiques pour permettre l’inactivation voire l’élimination de l’ADNccc. L’une des stratégies envisagées est le système CRISPR/Cas 9. Ainsi le dernier axe de cette thèse a été de développer ce système dans des modèles d’infection du virus de l’hépatite B. Pour vérifier l’efficacité de ce système sur le HBV, nous avons testé 8 ARN guide différents incorporer *via* des ribonucléoprotéines dans des cellules HepG2-NTCP. Les résultats préliminaires ont ainsi démontré que ce système pouvait réduire le pool d’ADNccc dans ces cellules.

Mots clés :

Hépatite B, ADNccc, ddPCR, Biopsies, CRISPR/Cas 9

1. Abstract

**From the detection of cccDNA by new technologies to the proof of concept of its therapeutic degradation in models of infection with the hepatitis B virus.**

Hepatitis B virus (HBV) is a major health problem with 325 million chronic carriers, despite the existence of a preventive vaccine. Currently the treatments used are nucleos(t)ide analogues and / or interferon α. Although they efficiently reach a decrease of the viral load, they do not allow the eradication the disease due to the persistence of the cccDNA, the minichromosome of the hepatitis B. This DNA serves as a template for the viral transcription and only a single copy suffice for the infection rebound.

However, the techniques used routinely for the quantification of the cccDNA are not sensitive enough to be able to detect low concentrations of this DNA, in particular in biopsies of patients chronically infected and long term treated. In addition, it is necessary to develop new strategies to target the cccDNA in order to clear the infection.

Thus, my thesis work is based on the development of a new technology: the Droplet Digital PCR (ddPCR) to allow the quantification of cccDNA in patient biopsies. This technique allows a gain of 2 log in sensitivity compared to the qPCR technique currently used in routine. It allowed us to see the presence of this DNA in long-term treated patients even in the presence of interferon. The presence of pgRNA and ChiP experiments also confirmed that the cccDNA was still transcriptionally active.

These results confirm the requirement to develop new therapeutics to allow the inactivation or even the elimination of the cccDNA. One of the strategies envisaged is the CRISPR / Case 9 system. Thus, the following part of this thesis was to develop this system in hepatitis B virus infection models. To reduce off-target effect we tested 8 different guide RNAs incorporated via ribonucleoproteins into HepG2-NTCP cells. Preliminary results have shown that this system can reduce the pool of cccDNA in these cells and open up the possibilities to test this model on PHH.

Keywords:

Hepatitis B, ADNccc, ddPCR, Biopsies, CRISPR/Cas 9