



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

*UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1*

**INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES**

**FACULTE DE PHARMACIE**

8, avenue Rockefeller - 69373 LYON Cedex 08

**Année 2016**

**THESE n° 14-2016**

**MEMOIRE**  
**DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE**  
**PHARMACIE HOSPITALIERE – PRATIQUE ET RECHERCHE**

Soutenu devant le jury interrégional le 1<sup>er</sup> juin 2016

Par **Mme BENSALAH Nesma**

Née le 7 mai 1985 à Annaba (Algérie)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**T H E S E**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

\*\*\*\*\*

**Evaluation de l'effet de la silibinine/Legalon®SIL en présence ou en absence d'interféron sur l'infection par le virus de l'hépatite delta et sur les éléments du microenvironnement hépatocytaire**

\*\*\*\*\*

**JURY**

**Président** : Mme MORFIN-SHERPA Florence, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

**Membres** : Mme PECHEUR Eve-Isabelle, PhD, Chargée de recherche de 1<sup>ère</sup> Classe

Mme BOUREL-BONNET Line, Professeur des Universités

Mme TRABAUD Mary-Anne, Praticien Hospitalier

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. Frédéric FLEURY
- Présidence du Conseil Académique M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Didier REVEL
- Vice-Président de la Commission Recherche M. Fabrice VALLEE
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire M. Philippe CHEVALIER

### Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

#### SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Jérôme ETIENNE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : Mme Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
Institut des Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Yves MATILLON
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directeur : Anne-Marie SCHOTT

#### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

**ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon**  
**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)  
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)  
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)  
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)  
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)  
Madame Françoise FALSON (Pr)  
Monsieur Hatem FESSI (Pr)  
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)  
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)  
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)  
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)  
Madame Laurence HEINRICH (MCU)  
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)  
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)  
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)  
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)  
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)  
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)  
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)  
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)  
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)  
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)  
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**  
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)  
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)  
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)  
Madame Christelle MARMINON (MCU)  
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)  
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**  
Monsieur Roland BARRET (Pr)  
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)  
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)  
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**  
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)  
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)  
Madame Isabelle KERZAON (MCU)  
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**  
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)  
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)  
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)  
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)  
Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**  
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)  
Madame Léa PAYEN (PU-PH)  
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)  
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**  
Monsieur Christian BARRES (Pr)  
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)  
Madame Kiao Ling LIU (MCU)  
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**  
Monsieur Michel TOD (PU – PH)  
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)  
Monsieur Roger BESANCON (MCU)  
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)  
Madame Evelyne CHANUT (MCU)  
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)  
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**  
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**  
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)  
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)  
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**  
Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)  
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)  
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)  
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**  
Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)  
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)  
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**  
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)  
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)  
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)  
Madame Florence MORFIN (PU – PH)  
Monsieur Didier BLAHA (MCU)

Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)  
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)  
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)  
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)  
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

#### DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)  
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)  
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Charlotte BOUARD (86ème section)

Madame Laure-Estelle CASSAGNES (85ème section)

Monsieur Karim MILADI (85ème section)

Madame Laurence PAGES (87ème section)

**Pr** : Professeur

**PU-PH** : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

**MCU** : Maître de Conférences des Universités

**MCU-PH** : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

**HDR** : Habilitation à Diriger des Recherches

**AHU** : Assistant Hospitalier Universitaire

**PAST** : Personnel Associé Temps Partiel



## **REMERCIEMENTS**

*Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à Mme Eve-Isabelle PECHEUR pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour m'avoir donné l'opportunité de participer à ses travaux de recherche et pour avoir encadré ce travail.*

*J'exprime toute ma gratitude à Mme Florence MORFIN-SHERPA pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et d'évaluer ce travail. Je la remercie également pour les conseils qu'elle m'a donnés et pour le temps qu'elle m'a consacré.*

*Je remercie Mme Line BOURREL-BONNET pour avoir accepté d'évaluer cette thèse et de faire partie du jury. Je lui suis reconnaissante aussi pour avoir accepté de se déplacer de Strasbourg pour assister à la présentation orale.*

*Mes remerciements vont également à Mme Mary-Anne TRABAUD pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer ce travail.*

*Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe de recherche Pathogénèse des hépatites B et C et nouvelles stratégies antivirales, en particulier Emma Reungoat pour m'avoir formée, soutenue et pour ses précieux conseils qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Je remercie également Nicolas pour m'avoir accompagnée durant les manipulations et pour tous les échanges constructifs. Mes remerciements vont aussi à Jennifer, Solène, Sarah et Louise pour leur aide et les moments réconfortants passés ensemble.*

*Je remercie Mr Camille Sureau pour sa précieuse contribution durant ce travail.*

*Je remercie l'ensemble de mes co-internes pour m'avoir supportée et avoir égayé mon internat et tout particulièrement Hélène Favier pour m'avoir encouragée et m'avoir ouvert les yeux sur l'opportunité de réaliser le master recherche qui m'a permis d'effectuer ce travail.*

*Mes remerciements vont à ma famille en particulier à mes parents pour m'avoir soutenue et encouragée pendant ces longues années d'études et à ma belle-mère pour m'avoir apporté son aide.*

*Je remercie mes amies Lina et Farah pour leurs conseils et leur soutien.*

*Et enfin, je remercie mon mari pour m'avoir libéré le temps nécessaire à la rédaction du mémoire, pour m'avoir encouragée et soutenue.*

# Table des matières

Liste des figures et tableaux .....	12
Liste des abréviations .....	13
Introduction .....	15
Partie 1 : Le Virus de l'hépatite delta .....	16
1. Historique .....	17
2. Epidémiologie.....	17
3. Caractéristiques du virus .....	19
3.1 Structure.....	19
3.2 Génome.....	20
3.3 Protéines virales.....	21
3.4 Cycle viral.....	22
3.4.1 Entrée du virus.....	22
3.4.2 Réplication virale.....	23
3.4.3 Assemblage de la particule virale .....	24
4. Expression clinique.....	24
4.1 Co-infection .....	25
4.2 Surinfection.....	26
5. Pathogenèse de l'hépatite delta .....	26
6. Diagnostic virologique .....	27
Partie 2 : Traitement de l'hépatite delta.....	30
1. Traitement conventionnel .....	31
1.1 Traitement par l'interféron- $\alpha$ .....	31
1.2 Traitement par les inhibiteurs nucléoti(si)diques .....	32
2. Transplantation hépatique.....	34

3. Prévention de l'hépatite D .....	34
4. Nouvelles approches thérapeutiques .....	34
4.1 Les inhibiteurs de la prénylation des protéines .....	35
4.2 Les inhibiteurs d'entrée dans l'hépatocyte .....	35
4.3 Les polymères d'acides nucléiques (NAPs) .....	36
Partie 3 : Evaluation de l'effet de la silibinine/Legalon®SIL en présence ou en absence d'interféron sur l'infection par le VHD et sur les éléments du microenvironnement hépatocytaire.....	37
1. Contexte et justification scientifique .....	38
2. Objectifs.....	39
3. Présentation de l'article .....	39
Abstract.....	40
Introduction .....	40
Materials and methods.....	41
<i>Silibinin, Legalon®SIL and interferon (IFN)</i> .....	41
<i>Cells and Stable Cell Lines</i> .....	41
<i>Effect of silibinin on HDV infection</i> .....	42
1. <i>Cytotoxicity Assay</i> .....	42
2. <i>Treatment and HDV Infection</i> .....	42
3. <i>RNA extraction and one-step Reverse Transcriptase-Quantitative PCR (RT-qPCR)</i> .....	43
<i>Syndecan-1 Silencing</i> .....	43
1. <i>RNA quantification</i> .....	44
2. <i>Western blotting</i> .....	44
<i>Effect of silibinin and Legalon®SIL on synd-1 and NTCP expression</i> .....	44
Results .....	45
<i>Cellular tolerance to silibinin and Legalon®SIL</i> .....	45

<i>Dose-dependent inhibition of HDV infection by Legalon®SIL</i> .....	45
<i>Silencing of synd-1 transcripts</i> .....	46
<i>Effect of silibinin and Legalon®SIL on synd-1 and NTCP expression depends on cell type</i> .....	51
Discussion.....	53
Partie 4 : Discussion et Conclusion .....	55
Discussion.....	56
Conclusion.....	58
Bibliographie .....	60

## Liste des figures et tableaux

### Figures

**Figure 1. Prévalence de l'infection par le VHD et répartition géographique en fonction du génotype**

**Figure 2. La particule virale VHD**

**Figure 3. Représentation schématique des trois ARN du VHD**

**Figure 4. Structures et fonctions des AgHD S et L**

**Figure 5. Représentation schématique des interactions impliquées dans l'entrée virale**

**Figure 6. Evolution des marqueurs sérologiques et virologiques lors de l'infection par le VHD**

### Article

**Figure 1. Cytotoxicity assays of silibinin and Legalon®SIL**

**Figure 2. Effect of silibinin and Legalon®SIL on HDV infection: previously obtained data**

**Figure 3. Effect of silibinin and Legalon®SIL on HDV infection**

**Figure 4. Synd-1 expression after RNA silencing**

**Figure 5. Synd-1 expression in HepG2-NTCP cells treated with increasing doses of silibinin or Legalon®SIL**

**Figure 6. NTCP expression in Huh7.106 cells treated with increasing doses of silibinin or Legalon®SIL**

### Tableaux

**Tableau 1. Résumé des études clés sur les traitements de l'hépatite D chronique**

## Liste des abréviations

AA : acide aminé

AgHBs : antigènes de surface du virus de l'hépatite B

AgHBs L : grand antigène de surface du virus de l'hépatite B (Large Hepatitis B surface Antigen)

AgHBs M : moyen antigène de surface du virus de l'hépatite B (Medium Hepatitis B surface Antigen)

AgHBs S : petit antigène de surface du virus de l'hépatite B (Small Hepatitis B surface Antigen)

AgHD : antigène du virus de l'hépatite delta

AgHD L : grand antigène delta (Large Hepatitis delta Ag)

AgHD S : petit antigène delta (Small Hepatitis delta Ag)

AGL: boucle antigénique (Antigenic loop)

ALAT : alanine amino transférase

ARN : acide ribonucléique

ARNP : ARN polymérase

ASAT : aspartate amino transférase

ATU : autorisation temporaire d'utilisation

CCD : domaine coiled-coil (Coiled-coil domain)

CHC : carcinome hépatocellulaire

Hépatite D : hépatite delta

HIDIT : Hep-Net-International Delta-Hepatitis Intervention Trial

HSPG : héparanes sulfates protéoglycanes

IFN- $\alpha$  : interféron alpha

NAPs : polymères d'acides nucléiques (Nucleic acid polymers)

NES : signal d'export nucléaire (Nuclear export signal)

NFκB : facteur nucléaire kappa B (Nuclear factor kappa B)

NLS : signal de localisation nucléaire (Nuclear localization signal)

NTCP : Sodium-Taurocholate Co-transporting polypeptide

ORF : cadres de lectures ouverts (Open Reading Frame)

PEG-IFN- $\alpha$  : IFN- $\alpha$  pégylé

RBD : domaine de fixation à l'ARN (RNA binding domain)

RNP : ribonucléoprotéine

TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale-alpha (Tumor necrosis factor-alpha)

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VHD : Virus de l'hépatite delta



# Introduction

---

L'hépatite delta (hépatite D) est une inflammation du tissu hépatique causée par le virus de l'hépatite delta (VHD). Le VHD est un virus déficient, c'est-à-dire qu'il est dépendant du virus de l'hépatite B (VHB) pour assurer sa réplication et sa propagation (1,2). L'infection par le VHD est uniquement observée chez les individus infectés par le VHB, soit par transmission simultanée des deux virus, on parle alors de co-infection, soit après surinfection d'un porteur chronique du VHB (2). La double infection par le VHB et le VHD est responsable d'une forme plus sévère que celle observée avec la mono-infection par le VHB. Elle peut induire une hépatite aiguë fulminante ou une hépatite chronique grave pouvant évoluer rapidement vers la cirrhose et la décompensation hépatique (2,3). L'infection chronique par le VHB et le VHD demeure très difficile à traiter. Les traitements qui sont actuellement utilisés sont ceux à base d'interféron mais leur efficacité n'est pas satisfaisante (4-6). Dans ce contexte, identifier des combinaisons thérapeutiques innovantes pour traiter et guérir les patients infectés par ces deux virus est urgemment requis. L'objet de ce mémoire porte sur l'évaluation de l'activité antivirale de la silibinine, un composé naturel extrait du lait de Chardon-Marie, utilisé depuis des millénaires en médecine traditionnelle pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et hépatoprotectrices (7). La silibinine, déjà sur le marché (Legalon®SIL) contre les empoisonnements aux amanites (8), a montré son efficacité contre le virus de l'hépatite C (VHC) au cours de plusieurs essais cliniques (9). Nous avons donc évalué l'activité antivirale potentielle de la silibinine seule ou en combinaisons avec le traitement standard à base d'interféron contre le VHD. Nous avons également tenté de comprendre son mécanisme d'action en identifiant ses effets potentiels sur les éléments du micro-environnement hépatocytaire. En effet, l'entrée des virus VHB et VHD dans l'hépatocyte requiert des facteurs d'attachement, qui sont des molécules du micro-environnement hépatocytaire, les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) (10), et une molécule réceptrice, le sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) (11). La molécule spécifique de HSPG impliquée dans l'attachement cellulaire et l'entrée des virus reste à ce jour inconnue. On s'est particulièrement intéressé au syndecan-1 car il a été récemment identifié comme facteur d'attachement à l'hépatocyte du VHC, en coopération avec une molécule réceptrice (travaux du laboratoire d'accueil, Grigorov et coll., soumis).

## **Partie 1 : Le Virus de l'hépatite delta**

## **1. Historique**

La découverte du VHD fut inattendue et a eu lieu suite de la description à Turin en 1977 d'un nouveau système antigène (Ag)/anticorps dans les noyaux des cellules hépatocytaires et le sérum de patients positifs pour les antigènes de surface du VHB (AgHBs) et présentant une forme sévère d'hépatite B (12). L'Ag delta (AgHD) a d'abord été considéré comme un marqueur de l'infection par le VHB. En 1978, suite à une collaboration du groupe de Turin avec the National Institutes of Health (NIH) et l'université de Georgetown aux États-Unis, la vraie nature de l'Ag delta a été établie. En effet, grâce à des expérimentations sur les chimpanzés, il a été démontré un an plus tard que l'AgHD n'était pas un composant du VHB mais d'un autre virus défectif qui nécessite la présence du VHB pour infecter les hépatocytes et a été nommé conformément à la nomenclature des virus des hépatites, le virus de l'hépatite delta (13). Ce virus possède un ARN circulaire d'environ 1700 nucléotides, plus petit que ceux des virus à ARN animaux et plus grand que ceux des viroïdes qui infectent les plantes supérieures. Il a donc été identifié comme étant le plus petit agent infectieux connu pouvant infecter l'homme et a été classé comme unique membre du genre Deltavirus (14).

Le clonage et le séquençage complet du génome viral en 1986 ainsi que les recherches ultérieures en virologie ont permis d'établir les caractéristiques qui rendent ce virus unique parmi les virus animaux comme sa ressemblance avec des agents pathogènes de plantes, en particulier les viroïdes et virusoïdes (15).

## **2. Épidémiologie**

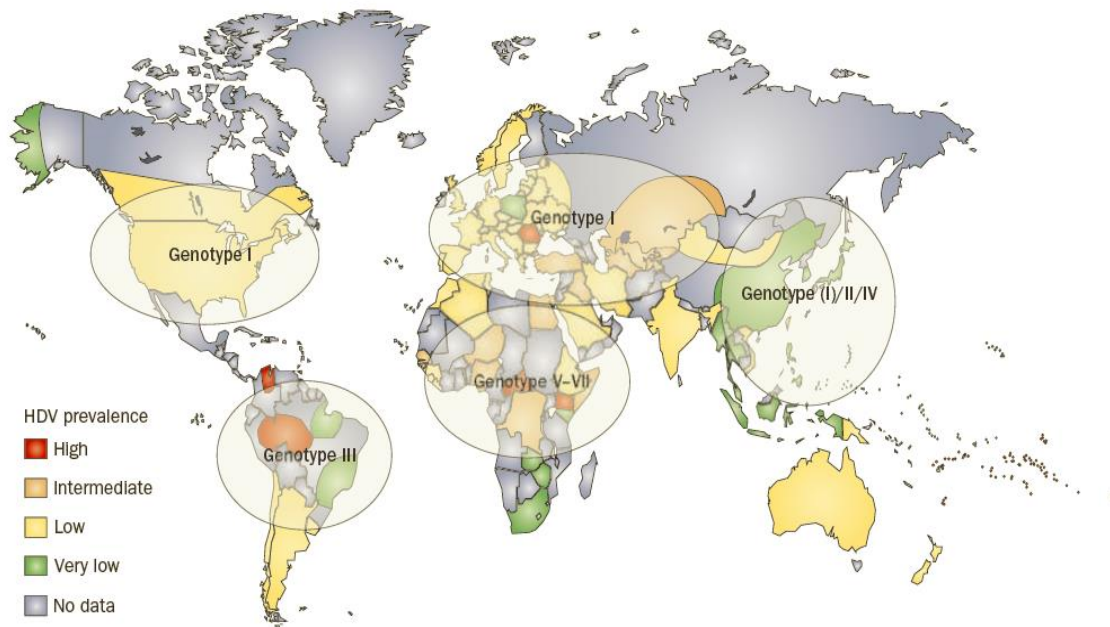
Le diagnostic sérologique du VHD est devenu possible dans le début des années 1980, ce qui a permis d'étudier l'épidémiologie et l'impact clinique de l'infection (16). Les enquêtes menées dans les années 1980 ont montré que le VHD est endémique à l'échelle mondiale mais avec des variations dans la prévalence et l'expression clinique de l'infection (16,17).

Il est estimé que plus de 350 millions d'individus sont porteurs chroniques du VHB dans le monde. Parmi eux, 5 à 20% sont également infectés par le VHD, soit environ 10 à 20 millions d'individus. Il s'agit d'un chiffre très approximatif car il manque des données pour les zones où le VHB est hautement prévalent et où le VHD est très peu étudié (18). Les zones de haute prévalence comprennent le bassin méditerranéen, le Moyen-Orient, l'Asie centrale, l'Afrique de l'Ouest, le bassin Amazonien en Amérique du Sud et certaines îles du Pacifique

Sud (19) (Figure 1). Le génotype du VHD peut influencer l'évolution de la maladie. Il existe huit grands génotypes : le génotype 1, le plus courant et de répartition mondiale, présente une pathogénicité variable ; les génotypes 2 et 4 ont été retrouvés en Extrême-Orient causant une maladie de faible gravité ; le génotype 3 est observé exclusivement dans la partie nord de l'Amérique du sud et a été associé avec le génotype F du VHB et l'hépatite fulminante ; les génotypes 4-8 ont principalement été identifiés chez les patients africains et sont associés à une infection VHB de génotype A-E (2,16) (Figure 1).

Plusieurs études réalisées dans les années 1980 et 1990 ont montré que la prévalence de l'infection par le VHD chez les individus AgHBs-positifs est supérieure à 20% et que la mise en œuvre des programmes de vaccination contre le VHB dans les années 1980 a diminué de façon significative l'incidence de 5-10% (2). Cependant, dans le début du XXI siècle, le nombre des individus AgHBs-positifs infectés par le VHD a augmenté à 8-12% en Europe. Cette augmentation avait été attribuée à l'immigration à partir des régions de haute prévalence, à la toxicomanie par voie intraveineuse et les comportements à risque tels que les partenaires sexuels multiples, le tatouage et le piercing (18). En effet, la transmission du VHD peut se produire par voie sexuelle ou sanguine (blessures par piqûre d'aiguille, utilisation de drogues injectables, transfusions) (1).

Dans les pays industrialisés, l'hépatite D reste, néanmoins, un problème de santé publique majeur pour les toxicomanes et les immigrants en provenance de zones dans lesquelles l'infection par le VHD reste endémique (17).



(Wedemeyer et al. 2010)

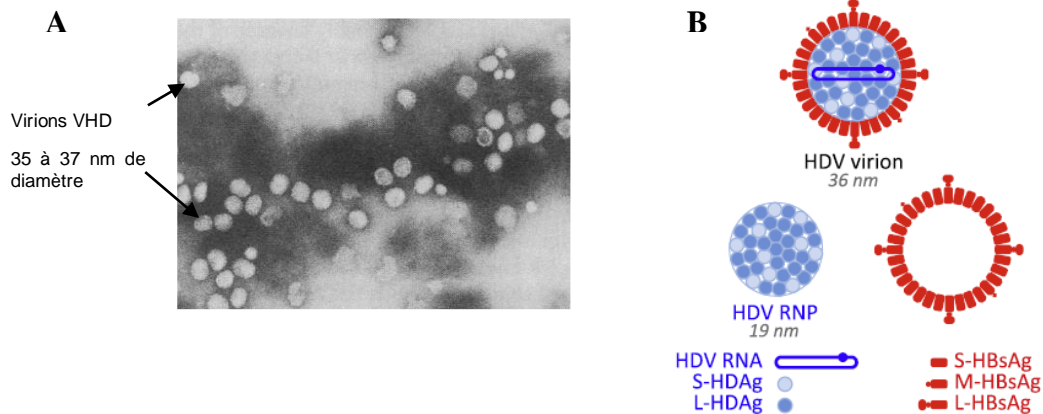
**Figure 1. Prévalence de l'infection par le VHD et répartition géographique en fonction du génotype.**

Le VHD a une répartition mondiale avec des zones de forte prévalence comme le bassin amazonien. Le génotype 1 est le plus répandu, le génotype 2 est observé en Extrême-Orient. Le génotype 3 est observé exclusivement dans la partie nord de l'Amérique du sud

**3. Caractéristiques du virus**

**3.1 Structure**

Le VHD est une petite particule sphérique enveloppée d'environ 36 nm de diamètre. Il est composé d'une ribonucléoprotéine (RNP) comprenant un ARN circulaire simple brin de polarité négative d'environ 1700 nucléotides et approximativement 200 copies de l'unique protéine virale codée, l'Ag delta. L'enveloppe virale comprend les trois antigènes de surface du VHB (AgHBs) L, M et S (Large, Medium and Small Hepatitis B surface Antigen), et les lipides de l'hôte (3,19) (Figure 2).



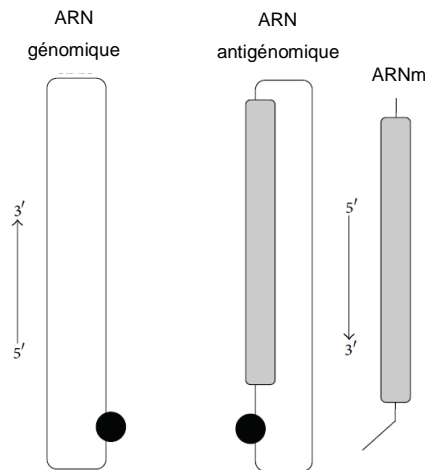
(Rizzetto et al 1980- Sureau et al 2016)

### Figure 2. La particule virale VHD

(A) Particules virales VHD de 35 à 37 nm de diamètre observées en microscopie électronique (x 70,500). (B) Représentation schématique de la particule virale VHD. Sa structure chimérique est composée d'une ribonucléoprotéine (en bleu) comprenant l'ARN delta associé aux deux isoformes de l'AgHD (AgHD S et L) et d'une enveloppe (en rouge) comprenant les protéines de surface du VHB (AgHBs S, M et L).

### 3.2 Génome

Le génome du VHD est composé de l'ARN delta qui comprend un fort degré d'appariement interne, environ 70 % de bases appariées GC, lui conférant une structure secondaire pseudo-double brin en forme de bâtonnet. Cette structure est similaire à celle décrite pour les viroïdes des plantes mais leur petit génome (250 à 400 nucléotides) ne leur permet pas de coder pour des protéines, contrairement au génome du VHD (20,21). Durant la réplication, deux ARN sont synthétisés dans la cellule infectée, l'ARN antigénomique, qui est la molécule complémentaire de l'ARN génomique, et l'ARN messager d'environ 80 nucléotides, codant pour l'AgHD (Figure 3). Plusieurs cadres de lectures ouverts (ORF) ont été identifiés dans l'ARN génomique et antigénomique. Un seul ORF, situé dans le brin antigénomique semble fonctionnel, codant pour l'AgHD (20,22). Le génome du VHD possède également une séquence codant pour une activité ribozyme d'autoclivage/autoligation de l'ARN génomique et antigénomique, très important dans la réplication (15,21).



(Taylor et al 2015)

**Figure 3. Représentation schématique des trois ARN du VHD.**

L'ARN génomique est un ARN simple brin circulaire qui forme une structure en bâtonnet en raison des appariements GC. L'ARN antigénomique est la molécule complémentaire de l'ARN génomique. Un site pour l'activité ribozyme est présent sur les deux ARN, représenté par un cercle noir. L'ARN antigénomique comprend une ORF pour la synthèse de l'AgHD, représenté en gris. L'ARNm d'environ 800 nucléotides, code pour l'AgHD.

**3.3 Protéines virales**

L'AgHD, unique protéine produite, existe sous deux isoformes de tailles différentes, 24 kDa pour l'AgHD S (Small Hepatitis delta Ag) composée de 195 acides aminés (AA) et 27 kDa pour l'AgHD L (Large Hepatitis delta Ag) composée de 213 ou 214 AA. Elles ont la même séquence N terminale et diffèrent par la présence de 19 AA supplémentaires dans la partie C terminale de l'AgHD L (19,21).

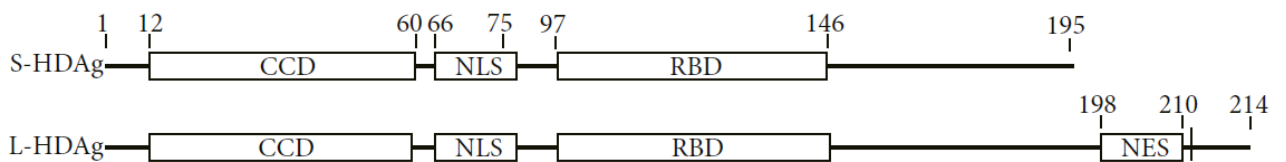
Ces deux isoformes ont des rôles distincts, l'AgHD S est importante pour la réplication alors que l'AgHD L inhibe la réplication et favorise l'assemblage de la particule virale (15,21).

Les deux isoformes subissent des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation, la sumoylation et la prénylation pour l'AgHD L (15).

Ces protéines ont plusieurs domaines fonctionnels (Figure 4), on distingue (23,24):

- Un site de phosphorylation sur des sérines appartenant à des sites consensus pour la caséine kinase II. L'AgHD L est plus phosphorylée que l'AgHD S ce qui est corrélé avec leur différence de fonction.

- Un domaine coiled-coil (leucine-zipper) qui permet la dimérisation des protéines delta.
- Deux séquences de localisation nucléaire riche en lysines permettant le transport de la RNP vers le noyau.
- Un domaine de fixation à l'ARN riche en arginine. La fixation de l'AgHD S à l'ARN permet d'activer la réplication.
- Un signal d'assemblage au niveau du site de prénylation dans la partie C terminale de l'AgHD L qui permet de lier la RNP aux AgHBs et favoriser l'assemblage. Dans cette partie, on distingue également un signal d'export nucléaire (NES).



(Alves et al 2013)

#### Figure 4. Structures et fonctions des AgHD S et L.

Les protéines AgHD S et AgHD L diffèrent uniquement par la présence de 19 AA supplémentaires dans la partie C terminale. Plusieurs domaines fonctionnels sont présents dans la partie commune : un domaine coiled-coil (CCD), un signal de localisation nucléaire (NLS), un domaine de fixation à l'ARN (RBD). L'AgHD L a en plus un signal d'export nucléaire (NES) et la cystéine en position 211 qui représente la cible de la prénylation.

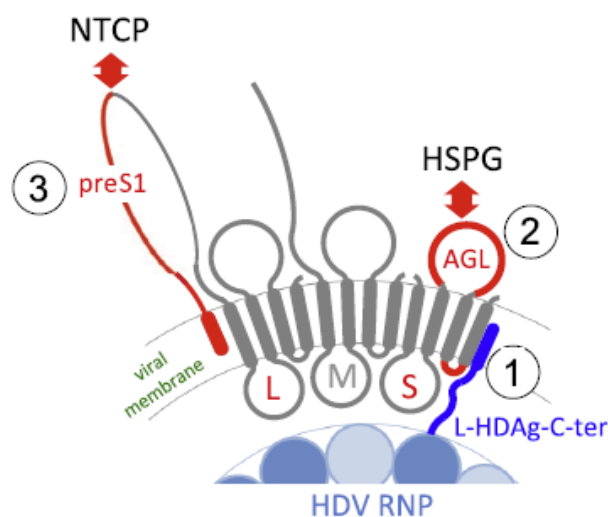
### 3.4 Cycle viral

#### 3.4.1 Entrée du virus

Le mécanisme d'entrée du VHD dans l'hépatocyte n'est pas très bien élucidé mais il semble qu'il soit similaire à celui du VHB (21). L'entrée du VHD impliquerait plusieurs interactions entre l'hépatocyte et le virus. Plusieurs études ont montré que l'étape initiale d'entrée du VHB et donc du VHD implique l'attachement du virus aux héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) présents sur la surface des cellules hépatocytaires (10,25). Cette étape est importante mais pas suffisante à l'entrée du virus (26). Récemment, Yan *et al* ont identifié un récepteur putatif pour l'entrée du VHB et VHD dans les hépatocytes, il s'agit du sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP), transporteur d'acides biliaires, qui interagit avec le domaine pre-S1 de la grande protéine d'enveloppe AgHB L (11,26). L'étape



initiale d'attachement implique la liaison entre la boucle antigénique AGL (antigenic loop) du domaine S des protéines d'enveloppe et les chaînes latérales glycosaminoglycanes des HSPG (24,27). Cette étape engendrerait un changement conformationnel qui rend accessible le domaine pre-S1 myristoylé de la grande protéine d'enveloppe et favorise la liaison au récepteur NTCP (28,29) (Figure 5). Après endocytose, la membrane virale et cellulaire fusionnent avec libération de la nucléocapside (28,29).



(Sureau et al 2016)

**Figure 5. Représentation schématique des interactions impliquées dans l'entrée virale.**

La boucle AGL (2) du domaine C terminal de l'AgHB S (S) interagit avec les HSPG. Le domaine pre-S1 (3) de l'AgHB L interagit avec NTCP.

### 3.4.2 Réplication virale

La protéine virale delta importe le génome viral vers le noyau où a lieu la réplication, grâce à ses signaux de localisation nucléaire. Le VHD utilise les ARN polymérases (ARNP) de la cellule hôte pour se répliquer. Les trois types d'ARNP interagissent avec le génome (30) mais le rôle des ARNP I et III dans la réplication virale n'est pas aussi bien établi que celui de l'ARNP II (24,31). La réplication se fait par un mécanisme en cercle roulant qui implique la transcription de l'ARN antigénomique à partir de l'ARN génomique par l'ARN polymérase II, voir également par l'ARN polymérase I (24). Des multimères d'ARN antigénomique sont produits. L'activité ribozyme d'autoclivage/autoligation permet de cliver les multimères en monomères (19,31) et l'activité ligase cellulaire permet de former des ARN circulaires fermés qui servent de matrice pour la synthèse de novo de l'ARN

génomique par le même mécanisme de cercle roulant (21,24). L'ARNP II catalyse la transcription de l'ARNm à partir de l'ARN antigénomique avec production des AgHD (21). Les petites protéines delta (AgHD S) jouent un rôle important dans l'amplification de la réplication en se liant à la fois au génome et à l'ARNP. Un nombre pouvant atteindre 300000 copies du génome par cellule infectée est produit (19,31). Les AgHD S sont synthétisés à une phase précoce à partir de l'ARNm antigénomique. Après la phase d'amplification, le génome subit un ARN editing par l'enzyme cellulaire adénosine désaminase 1 avec un changement de séquence entraînant la modification du codon STOP du cadre de lecture de l'AgHD S par un codon tryptophane et l'allongement de l'ORF permettant la traduction de 19 AA supplémentaire avec production d'une forme à 27 KD (AgHD L) (15,21). La synthèse de l'AgHD L inhibe la réplication ; en effet, il s'agit d'un inhibiteur dominant-négatif qui interagit avec l'AgHD S et diminue son interaction avec le génome (22,31). L'accumulation de l'AgHD L réduit efficacement l'activité d'amplification de l'AgHD S (22). De plus, elle est essentielle pour l'assemblage de la particule virale. L'AgHD L interagit avec l'AgHD S et le génome pour former la RNP qui est exportée du noyau grâce au signal d'export nucléaire retrouvé dans la partie C terminale de l'AgHD L (31).

### **3.4.3 Assemblage de la particule virale**

Les protéines AgHD L favorisent l'assemblage de la particule virale en interagissant avec les protéines d'enveloppe du VHB (24).

Une séquence dans la partie C terminale, au sein des 19 AA propres à l'AgHD L, est reconnue par une prényltransférase cellulaire qui permet de lier un acide gras géranylgeranyl (C20) sur la cystéine en position 211. La prénylation conduit à un changement conformationnel de l'AgHD L qui permet sa fixation aux AgHBs et favoriser l'assemblage (21).

## **4. Expression clinique**

Le VHD est généralement associé à une forme sévère d'hépatite. Cependant, l'expression clinique est variable allant des formes asymptomatiques aux hépatites fulminantes (18). L'infection concomitante par le VHB et le VHD est habituellement responsable d'une forme plus sévère que celle observée avec la monoinfection par le VHB (19). Deux situations

cliniques sont observées selon la chronologie de l'infection par le VHD par rapport à celle par le VHB : la co-infection et la surinfection (18,32).

#### **4.1 Co-infection**

Lors de la co-infection par le VHB et le VHD, les deux virus sont présents simultanément dans l'inoculum (32). Le VHD étant satellite du VHB, il pourra infecter les hépatocytes seulement après l'infection par le VHB. L'expression du VHD dépend de la virulence de l'infection concomitante par le VHB ; une expression restreinte des AgHBs peut conduire à une infection abortive par le VHD et inversement, une forte expression des AgHBs conduit à l'expression du VHD et à sa pathogénicité (33). Il en résulte une variation dans l'expression clinique de l'infection. La co-infection entraîne généralement une hépatite aiguë spontanément résolutive, il s'agit de 95% des cas. Cependant, elle est également responsable d'hépatite fulminante. Seulement 2% évoluent vers la chronicité (19,33).

La période d'incubation de l'hépatite D dépend du titre viral du VHB présent dans l'inoculum qui définit la période d'incubation de l'hépatite B (33). Après un délai d'incubation de trois à sept semaines, survient une hépatite aiguë qui débute par des symptômes non spécifiques (nausées, fatigue, léthargie) associés à une perturbation du bilan hépatique avec élévation des transaminases ASAT (Aspartate amino transférase) et ALAT (Alanine amino transférase). Cette phase peut être suivie d'une phase ictérique avec augmentation du taux de bilirubine. L'hépatite aiguë peut être d'évolution monophasique avec un seul pic de cytolysse hépatique ou biphasique avec deux pics distincts, le premier causé par le VHB et le second par le VHD (18,33). La phase de convalescence débute par la disparition des symptômes cliniques (33). L'hépatite aiguë peut conduire dans certains cas à une hépatite fulminante d'évolution dramatique, caractérisée par une destruction brutale des hépatocytes, aboutissant à une défaillance multi-viscérale chez un sujet sans antécédents d'atteinte hépatique. Les symptômes, d'évolution très rapide, débutent par un malaise et des nausées suivis d'ictère, coagulopathie et encéphalopathie hépatique, conduisant au décès dans la majorité des cas (33).

## **4.2 Surinfection**

L'expression clinique est différente lorsque le VHD surinfecte des individus chroniquement infectés par le VHB. L'évolution est plus rapide car le VHD peut infecter immédiatement les hépatocytes en utilisant les AgHBs préexistants suite à l'infection préalable par le VHB. L'expression clinique de cette surinfection est variable, mais se traduit généralement par une hépatite aiguë sévère avec une période d'incubation relativement courte et se présente uniquement sous forme monophasique (32,33). Elle peut se traduire par une exacerbation d'une hépatite chronique B préexistante, entraînant une décompensation hépatique ou bien par une hépatite aiguë classique chez les porteurs asymptomatique de l'AgHBs. Elle peut être mal diagnostiquée et confondue avec une hépatite B aiguë chez les individus non préalablement diagnostiqués comme porteurs chroniques du VHB (3,33).

Plus de 90% des cas évoluent vers la chronicité et seulement une minorité évolue spontanément vers la guérison (33). L'hépatite chronique delta est la plus sévère des hépatites chroniques qui entraîne dans 70% des cas une cirrhose en 5 à 10 ans. Le risque de développer une cirrhose est trois fois plus important que lors de la monoinfection par le VHB. Une fois la cirrhose établie, la pathologie peut rester stable et asymptomatique pendant plusieurs années ou bien évoluer jusqu'à un stade avancé qui s'exprime par des complications telles que l'hypertension portale, l'ascite et l'encéphalopathie. Une proportion élevée de patients décède d'une insuffisance hépatique, voire d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) s'ils n'ont pas bénéficié d'une transplantation hépatique. Une association entre le VHD et le développement d'un CHC a été démontrée mais les données sur le risque de CHC chez les patients infectés par le VHD sont controversées (24,34).

## **5. Pathogenèse de l'hépatite delta**

Les connaissances sur la pathogenèse de l'hépatite delta sont limitées. Les observations cliniques suggèrent l'implication principale de la réponse immunitaire antivirale dans les dommages causés au niveau hépatique (2,35). Les mécanismes de défense mis en jeu permettraient d'éliminer le virus mais seraient responsables de l'atteinte hépatique (3). Les données expérimentales sur les chimpanzés évoquent également un effet cytopathique direct du VHD, particulièrement dans la forme aiguë de l'infection (36,37).

Le peu de données sur l'aspect immunologique de l'infection suggèrent que la réponse immunitaire implique l'interféron alpha (IFN- $\alpha$ ) qui représente la première ligne de défense en créant un état antiviral qui empêche l'infection des cellules avoisinantes, la réponse cellulaire T spécifique du VHD, la réponse cytokinique et les voies de signalisation du Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) et du Nuclear Factor kappa B (NF $\kappa$ B). Cette réponse serait associée à une augmentation de la survie cellulaire (21).

Des variations dans la réponse immunitaire ont été rapportées durant l'infection aiguë et chronique, ce qui expliquerait la persistance et l'évolution vers la chronicité lors de la surinfection par le VHD (21). Les lymphocytes T cytotoxiques joueraient un rôle important dans l'élimination du virus en détruisant les hépatocytes infectés. Une réponse efficace se traduirait par la guérison. Une réponse insuffisante suite à la reconnaissance d'un nombre limité d'épitopes se traduirait par un échec de la réponse antivirale associé à une évolution vers la chronicité. Une réponse immunitaire exagérée semble être en lien avec la nécrose des hépatocytes et les dommages hépatiques observés lors de la forme fulminante (21).

La pathogénèse de l'infection par le VHD semble également impliquer l'interaction entre le VHD et le VHB. Lors de la co-infection, on observe une guérison dans la majorité des cas avec l'élimination des deux virus alors que la surinfection évolue généralement vers la chronicité (21,35). Il a été observé que le VHD inhibe la réplication du VHB mais que cette inhibition n'est pas maintenue tout au long de la maladie. Trois phases de l'hépatite D chronique sont proposées : une phase active précoce caractérisée par une réplication active du VHD et inhibition du VHB, une phase intermédiaire modérément active qui se traduit par une baisse de la charge virale du VHD et la réactivation du VHB et une phase tardive qui implique la réplication des deux virus avec apparition d'une cirrhose qui évolue vers un CHC ou bien l'élimination des deux virus et guérison (21).

## **6. Diagnostic virologique**

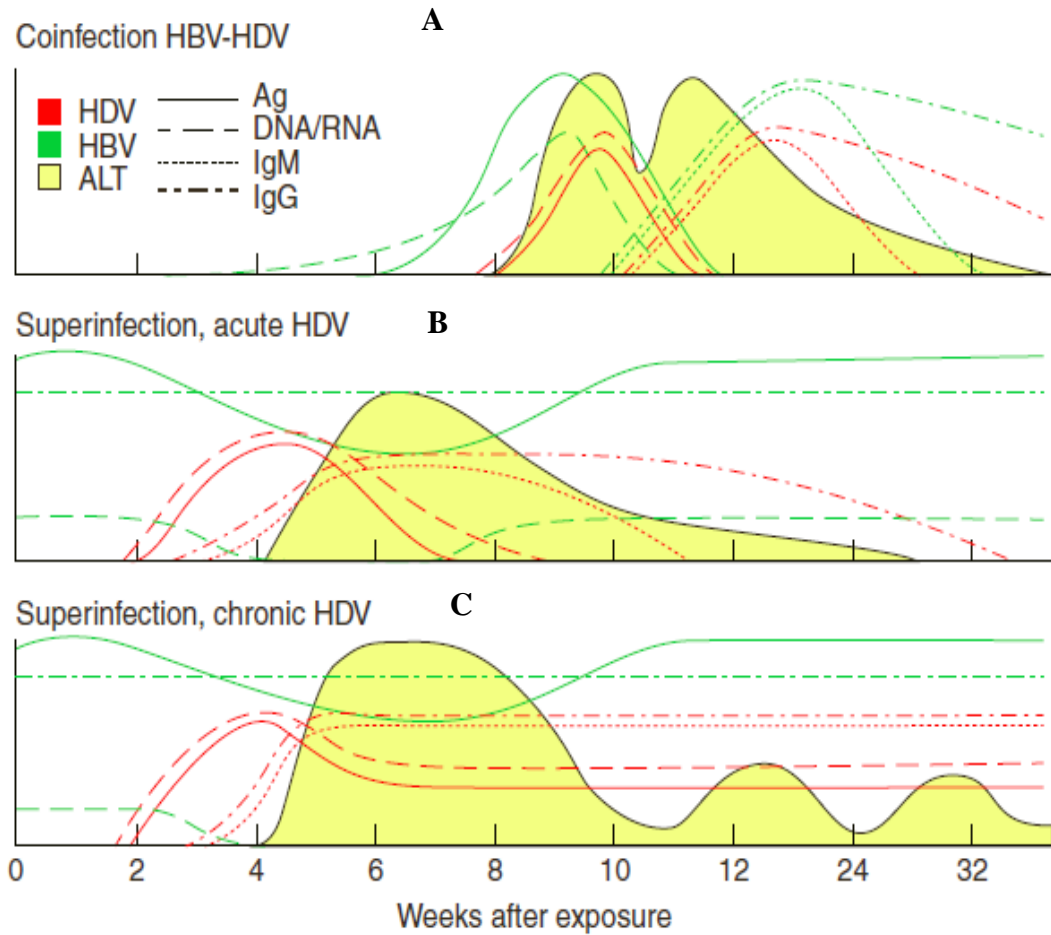
Tous les patients porteurs du VHB doivent être dépistés au moins une fois pour la co-infection avec le VHD en recherchant les anticorps anti-VHD. Un résultat négatif ne justifie pas la recherche de l'ARN viral car tous les individus infectés par le VHD développent des anticorps anti-VHD (2,18). En revanche, un résultat positif pour les anticorps anti-VHD nécessite la confirmation d'une infection active par la détection de l'ARN dans le sérum,

témoin de la réplication virale. En effet, en cas de guérison, les anticorps anti-VHD peuvent persister alors que l'ARN est indétectable (2,3). La recherche de l'AgHD est possible mais n'a pas d'intérêt en pratique car sa détection dans le sérum est transitoire (1).

Si l'infection est confirmée, l'étape de diagnostic suivante est l'évaluation de l'atteinte hépatique par la réalisation d'une biopsie du foie afin de grader et définir le stade de la maladie (2).

La détermination de la charge virale en quantifiant l'ARN dans le sérum n'est actuellement pas indispensable au diagnostic de l'hépatite D. Il n'y a pas de preuve de corrélation entre les taux d'ARN et le stade de l'atteinte hépatique. Cependant, l'analyse quantitative de l'ARN du VHD a un intérêt dans la surveillance de la réponse au traitement des patients qui subissent une thérapie antivirale (2,18).

L'évolution des marqueurs sérologiques et virologiques dépend de la chronologie de l'infection par le VHD. Lors d'une co-infection par le VHD et le VHB, l'AgHBs apparaît en premier, suivi de l'ARN delta. Ensuite, on retrouve les IgM anti-HBc suivis de la séroconversion en IgG anti-HBc et enfin apparaissent les IgM anti-VHD suivis de la séroconversion en IgG anti-VHD. On observe deux pics d'ALAT, marqueur de la cytolysse, correspondant aux deux phases de la co-infection (Figure 6.A). Les marqueurs de la surinfection sont l'absence d'IgM anti-HBc, la présence d'IgG anti-HBc, d'ARN delta, l'apparition d'IgM anti-VHD suivie de la séroconversion en IgG anti-VHD et la présence d'un seul pic d'ALAT (Figure 6.B). L'évolution vers la chronicité se traduit par la persistance de l'ARN delta, témoin de la réplication virale et des IgM anti-VHD (Figure 6.C) (1,3,34).



(Negro et al. 2014)

**Figure 6. Evolution des marqueurs sérologiques et virologiques lors de l'infection par le VHD.** (A) Co-infection par le VHD et le VHB qui se traduit par l'élimination du virus dans la majorité des cas. (B) Surinfection par le VHD des porteurs chroniques du VHB. L'élimination du VHD qui se traduit par la disparition de l'ARN delta peut prendre des années. (C) Surinfection des porteurs chroniques du VHB et persistance de la réplication virale.

## **Partie 2 : Traitement de l'hépatite delta**



Idéalement, un traitement efficace de l'infection par le VHD permet son éradication et celle de son virus auxiliaire, le VHB. La clairance des virions VHD est obtenue lorsque l'ARN delta et l'AgHD se maintiennent indétectables et on parle de guérison complète lors de la disparition des AgHBs (18). La co-infection B-D est généralement spontanément résolutive et aboutit à une guérison complète. Le meilleur traitement de la co-infection B-D est préventif par la vaccination contre le VHB. Dans les formes fulminantes résultant de la co-infection ou la surinfection, la transplantation hépatique reste l'unique moyen thérapeutique (18).

Le caractère unique du VHD et son association au VHB rendent à ce jour le traitement de l'hépatite D chronique difficile (1). Son génome ne code pas pour une activité enzymatique qui pourrait être ciblée par les traitements antiviraux conventionnels, les traitements utilisés dans l'hépatite B qui inhibent la synthèse d'ADN n'ont pas d'effet sur le VHD car ils n'agissent pas sur les AgHBs, l'utilisation de traitements efficaces contre le VHB dans le but de priver le VHD de son virus auxiliaire n'a pas d'effet sur l'élimination du VHD (15,38). Le traitement actuel de l'hépatite D chronique reste empirique, basé sur l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) dont l'utilisation remonte aux années 1980 (15,18).

## **1. Traitement conventionnel**

### **1.1 Traitement par l'interféron- $\alpha$**

L'IFN- $\alpha$  a été utilisé pour la première fois il y a 30 ans pour le traitement de l'hépatite D chronique (16). Plusieurs essais cliniques ont exploré différents dosages et durées de traitement. Un traitement avec une durée de deux ans semble être plus efficace que les traitements plus courts et le taux de réponse est proportionnel à la dose (18). Les patients traités avec 9 millions d'unités répondent plus efficacement que ceux traités par 3 millions d'unités (39). Un traitement par IFN- $\alpha$  sur une longue durée et à forte dose n'est toléré que chez une minorité de patients (40). Le traitement standard à 3-6 millions d'unités trois fois par semaine pendant un an a conduit à une rémission avec normalisation des ALAT dans 20 à 25% des cas mais la proportion d'élimination de l'ARN delta est faible (15,16).

En 2006, le traitement par une forme à demi-vie plus longue, l'IFN- $\alpha$  pégylé (PEG-IFN- $\alpha$ ), a largement remplacé le traitement standard en permettant une utilisation hebdomadaire (15).

De plus, les études réalisées ont montré une légère augmentation de l'efficacité. La normalisation des ALAT et une réponse virologique durable, définie par la négativation de l'ARN delta six mois après la fin du traitement, étaient observées dans 17 à 43% des cas pour une durée de traitement entre 12 et 18 mois (4,41,42). À l'heure actuelle, le schéma thérapeutique recommandé est l'utilisation du PEG-IFN- $\alpha$  à raison d'une fois par semaine pendant au moins un an, selon la tolérance des patients (3).

## **1.2 Traitement par les inhibiteurs nucléoti(s)i diques**

Les inhibiteurs nucléoti(s)i diques ont été testés dans le but d'éliminer le VHB, virus auxiliaire du VHD, par l'inhibition de l'activité polymérase. Ces traitements n'ont pas d'action directe sur le VHD car il ne présente pas de système enzymatique. Plusieurs inhibiteurs nucléoti(s)i diques utilisés dans le traitement de l'hépatite B n'ont pas montré d'efficacité contre l'hépatite D (2). Le famciclovir n'a pas d'activité antivirale contre le VHD (43). La lamivudine n'est pas efficace sur la réduction des concentrations en ARN delta et n'a pas prolongé la réponse virologique quand elle a été associée à l'IFN- $\alpha$  (44,45). La ribavirine, utilisée seule n'a pas montré d'efficacité, son association avec l'IFN- $\alpha$  standard ou pégylé n'a pas prolongé la réponse virologique (41,46). L'entécavir n'a pas réduit la virémie mais a réduit le taux des ALAT chez un petit groupe de patients (3). Un cas observé a présenté l'élimination du VHD associée à la disparition des AgHBs et la séroconversion des anticorps anti-AgHBs après 10 mois de traitement par du PEG-IFN associé au ténofovir et emtricitabine (47). L'étude Hep-Net-International Delta-Hepatitis Intervention Trial 1 (HIDIT-1) a montré que la monothérapie par adéfovir n'a aucun effet sur l'hépatite D chronique, son association à l'IFN ne prolonge pas la réponse virologique mais diminue la concentration en AgHBs (6). Une étude observationnelle chez des patients co-infectés par le VIH, VHB et VHD traités par antirétroviraux dont le ténofovir sur une durée moyenne de six ans a montré une réduction de l'ARN delta. 19% des patients ont présenté une réponse virologique durable (48). Une étude récente HIDIT-2 a comparé l'effet du traitement combiné par ténofovir et PEG-IFN au PEG-IFN seul sur la baisse des AgHBs. Contrairement à la combinaison du PEG-IFN à l'adéfovir, la diminution des AgHBs n'a montré aucune différence lors de l'utilisation du PEG-IFN seul ou en association au ténofovir. La réponse virologique était également similaire dans les deux groupes (49).

Une optimisation des traitements existants est nécessaire en jouant sur la dose, la durée et les associations qui peuvent avoir un intérêt thérapeutique comme le PEG-IFN- $\alpha$  et l'adéfovir qui en diminuant la concentration en AgHBs, empêcheraient la propagation du VHD (18).

Un récapitulatif des principales études sur les traitements par interféron seul ou associé aux inhibiteurs nucléoti(si)diques est présenté dans le tableau 1.

**Tableau 1. Résumé des études clés sur les traitements de l'hépatite D chronique**

Type d'étude	Traitement	N	Résultat
<b>Farci et al. 1994</b> (39) Etude randomisée monocentrique	IFN- $\alpha$ 2a 9 MU 3 x/semaine pendant 12 mois	14	Réponse virologique à la fin du traitement (71% pour la dose 9MU vs 36 % pour la dose 3MU). Récidive pour tous les patients
	IFN- $\alpha$ 2a 3 MU 3 x/semaine pendant 12 mois	14	
	Contrôles non traités	14	
<b>Yurdaydin et al. 2002</b> (43) Etude pilote ouverte	Famciclovir 500 mg 3x/j	15	Aucun effet sur les taux d'ARN dans le sérum
<b>Castelnau et al. 2006</b> (42) Etude pilote ouverte	PEG-IFN- $\alpha$ 2b 1,5 $\mu$ g/kg/semaine pendant 12 mois	14	Réponse virologique durable chez 6 patients (43%)
<b>Niro et al. 2006</b> (41) Etude randomisée multicentrique	PEG-IFN- $\alpha$ 2b 1,5 $\mu$ g/kg/semaine pendant 18 mois	16	Réponse virologique durable chez 8 patients (21%) Pas d'effet supplémentaire en présence d'Rbv
	vs PEG-IFN- $\alpha$ 2b + Rbv 800 mg/j pendant les 12 premiers mois	22	
<b>Erhardt et al. 2006</b> (4) Etude pilote ouverte	PEG-IFN- $\alpha$ 2b 1,5 $\mu$ g/kg/semaine pendant 12 mois	12	Réponse virologique durable chez 2 patients (17%)
<b>Yurdaydin et al. 2008</b> (45) Etude randomisée multicentrique	IFN- $\alpha$ 2a 9 MU 3 x/semaine pendant 12 mois	8	Réponse virologique durable chez 9 patients (41%) Pas d'effet supplémentaire en présence de Lam
	Vs Lam 100 mg/j pendant 2 mois + IFN- $\alpha$ 2a 9 MU 3 x/semaine + Lam 100 mg/j pendant 10 mois	14	
	Vs Lam 100 mg/j pendant 12 mois	17	
<b>Sheldon et al. 2008</b> (48) Etude observationnelle longitudinale	Traitement antirétroviral par Tnv	16	Réponse virologique durable chez 3 patients (19%)
<b>Wedemeyer et al. 2011</b> (6) Etude randomisée multicentrique	PEG-IFN- $\alpha$ 2a 180 $\mu$ g/semaine vs PEG-IFN- $\alpha$ 2b + Adv 10 mg/j	29	Réponse virologique durable chez 14 patients (23%) Diminution de l'AgHBs en présence d'Adv
	vs Adv 10 mg/j pendant 12 mois	31	
		30	
<b>Wedemeyer et al. 2014</b> Etude randomisée en double aveugle	PEG-IFN- $\alpha$ 2a 180 $\mu$ g/semaine vs PEG-IFN- $\alpha$ 2a 180 $\mu$ g/semaine + Tnv 300 mg/j	61	Réponse virologique durable (21%) Réponse virologique durable (29%)
	pendant 24 mois	59	

N= nombre de patients. MU = million d'unité. Rbv = Ribavirine. Adv= Adénovir. Lam = Lamivudine. Tnv = ténofovir

## **2. Transplantation hépatique**

La transplantation hépatique est la seule option thérapeutique pour les patients qui présentent une cirrhose au stade terminal due à la co-infection B-D et ceux présentant une hépatite aiguë fulminante (2,3). On prévient la réinfection du greffon par le VHD chez la plupart des individus par l'immunoprophylaxie contre le VHB en utilisant les anticorps anti-AgHBs au long cours et par l'administration d'inhibiteurs de polymérase (50). Suite à la transplantation, les taux sériques d'ARN delta diminuent rapidement en parallèle à la baisse des taux de l'AgHBs (51). L'évolution est de très bon pronostic avec des taux de survie à cinq ans de l'ordre de 80% (52,53).

## **3. Prévention de l'hépatite D**

La co-infection B-D peut être prévenue par la vaccination contre le VHB. Le Vaccin anti-VHB protège également contre l'infection par le VHD car il cible les protéines d'enveloppe, communes aux deux virus (54). Le risque de développer une hépatite D constitue une indication pour la vaccination contre l'hépatite B chez les individus à risque. Le programme de vaccination contre l'hépatite B a conduit à une baisse de la prévalence de l'infection par le VHD (55). La surinfection par le VHD des porteurs chroniques du VHB ne peut être prévenue par le vaccin anti-VHB et nécessite le développement d'une vaccination spécifique du VHD (55,56).

## **4. Nouvelles approches thérapeutiques**

Le traitement actuel de l'hépatite D chronique n'est pas satisfaisant. Le développement d'alternatives thérapeutiques est urgemment requis. De nouvelles approches qui ciblent différentes étapes du cycle cellulaire émergent et pourraient éventuellement conduire à d'importantes avancées dans le traitement de l'hépatite D (3,15). Certaines approches ont atteint le stade des essais cliniques de développement et sont actuellement testées dans la phase 2 chez l'homme. Elles concernent entre autres, l'étape d'assemblage de la particule virale par l'utilisation d'inhibiteurs de prénylation et l'étape d'attachement à l'hépatocyte via des inhibiteurs d'entrée hépatocytaire (57).

#### **4.1 Les inhibiteurs de la prénylation des protéines**

La prénylation au niveau de la partie C terminale de la grande protéine delta est importante pour l'interaction de l'AgHD et les protéines d'enveloppe (AgHBs) permettant ainsi l'assemblage de la particule virale. Plusieurs inhibiteurs de l'enzyme protéine farnesyltransferase qui joue un rôle dans la prénylation ont été développés. Ce sont des inhibiteurs compétitifs du substrat de l'enzyme, le motif qui correspond aux quatre AA en C terminal de l'AgHD ou du farnesyl diphosphate. Les études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que l'inhibition de la prénylation conduit à l'élimination du VHD (15). Un essai clinique de phase 2A en double aveugle randomisé (ClinicalTrials.gov : NCT01495585) a étudié l'effet d'un inhibiteur de prénylation, le lonafarnib vs placebo. 14 patients ont reçu 100 mg ou 200 mg de lonafarnib deux fois jour pendant 28 jours. Le traitement par lonafarnib a réduit significativement les taux d'ARN delta et cette baisse est corrélée aux concentrations de médicament dans le sérum (0.74 IU/mL vs 1.60 IU/mL) (58). Cette baisse reste néanmoins modérée (59). Les effets indésirables observés étaient mineurs à modérés à type gastro-intestinaux (58).

#### **4.2 Les inhibiteurs d'entrée dans l'hépatocyte**

Les thérapies qui inhibent l'entrée du virus constituent une piste intéressante pour le développement des nouvelles thérapies antivirales car l'infection est inhibée à un stade précoce (60,61). Plusieurs études ont montré l'importance du domaine N terminal myristoylé pre-S1 de l'AgHBs L dans la liaison des virus VHB et VHD au récepteur cellulaire NTCP (60). Un lipopeptide synthétique dérivé des 2-47 résidus du domaine pre-S1, Myrcludex B, empêche la liaison du virus au récepteur NTCP *in vitro* et *in vivo*. Myrcludex B est le seul inhibiteur d'NTCP qui a atteint le stade des études cliniques chez l'homme. L'efficacité du Myrcludex B chez les patients atteints d'hépatite B chronique a été prouvée durant un essai clinique de phase 2a (60). Une sous-étude de cet essai a été réalisée chez 24 patients co-infectés par le VHB et le VHD randomisée en trois bras : prétraitement par Myrcludex B pendant six mois, suivi d'un traitement par PEG-IFN pendant 12 mois (bras 1), traitement concomitant par Myrcludex B et PEG-IFN pendant les six premiers mois suivi d'un traitement par PEG-IFN pendant six mois (bras 2) et traitement par PEG-IFN seul pendant 12 mois (bras 3). Les premiers résultats à six mois de traitement montrent une baisse de

l'ARN delta supérieure à un log dans les bras 1 (6/7 patients) et 2 (7/7 patients). Cette baisse a été observée à trois mois dans le bras 3 (7/7 patients). Cependant, la négativation de l'ARN delta à six mois de traitement a été obtenue chez deux patients du bras 1 et cinq du bras 2 (Bogolomov et al, en cours de révision). Il s'agit d'une petite étude avec des résultats provisoires qui semblent montrer une meilleure réponse virologique quand le Myrcludex B est combiné à l'IFN (61). Ces études montrent que cibler NTCP constitue une piste possible pour de nouvelles approches thérapeutiques (60). Des molécules commercialisées pour d'autres indications telles qu'irbesartan, un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, utilisé dans l'hypertension artérielle, ézetimibe, un hypocholestérolémiant, ritonavir, un antirétroviral utilisé dans le traitement de l'infection par le VIH, ont montré qu'ils inhiberaient la fonction du récepteur NTCP. L'effet de ces molécules sur l'inhibition de l'entrée du VHD a été étudié in vitro et a montré qu'elles interfèrent avec l'entrée du virus (62). Une autre molécule, utilisée comme immunosuppresseur, la Cyclosporine A, est connue pour se lier au récepteur NTCP et inhiber sa fonction, a montré qu'elle inhibe l'entrée des virus VHB et VHD in vitro (63). Cependant, son utilisation dans le traitement de l'hépatite D chronique semble limitée car elle n'est pas spécifique d'NTCP mais inhibe d'autres transporteurs d'acides biliaires (60).

### **4.3 Les polymères d'acides nucléiques (NAPs)**

Les NAPs ciblent les interactions d'apolipoprotéines impliquées dans la formation des particules VHB sub-virales qui comprennent essentiellement les AgHBs. Il a été démontré dans les études précliniques et cliniques que les NAPs éliminent les AgHBs du sérum et agissent en synergie avec le PEG-IFN- $\alpha$  sur le contrôle de l'infection par le VHB (64). Un essai clinique de phase 2a en cours (ClinicalTrials.gov Identifier:NCT02233075) étudie l'effet antiviral du NAP REP 2139-Ca sur le VHD. Cette étude examine l'efficacité et la tolérance de REP 2139-Ca en combinaison avec le PEG-IFN- $\alpha$  2a chez 12 patients caucasiens infectés par les virus VHB et VHD. Les résultats préliminaires de l'administration de 500 mg de REP 2139-Ca par semaine pendant 15 semaines suivie de 180  $\mu$ g de PEG-IFN- $\alpha$  à partir de la 16<sup>ème</sup> semaine montrent une baisse des taux d'ARN delta sériques (15,65).

**Partie 3 : Evaluation de l'effet de la  
silibinine/Legalon<sup>®</sup>SIL en présence ou en absence  
d'interféron sur l'infection par le VHD et sur les  
éléments du microenvironnement hépatocytaire**

## 1. Contexte et justification scientifique

L'infection par le VHD représente un problème de santé publique, l'hépatite D chronique est responsable de la forme la plus sévère des hépatites virales et demeure très difficile à traiter. Les traitements à base d'interféron des patients co-infectés B-D ne sont pas satisfaisants, les inhibiteurs nucléoti(si)diques ne semblent pas augmenter l'efficacité du traitement quand ils sont associés à l'interféron. Plusieurs approches thérapeutiques ciblant différentes phases du cycle du VHD sont en cours d'investigation mais jusqu'à présent il n'existe pas de résultats définitifs qui confirment l'efficacité des traitements en cours d'étude chez l'homme. L'inhibiteur d'entrée Myrcludex B a montré une diminution des taux d'ARN delta mais la négativation complète n'a pas été obtenue chez tous les patients. L'inhibiteur de prénylation lonafarnib a été associé à une diminution dose-dépendante de la virémie mais qui reste modeste. L'utilisation des NAPs a montré une baisse des taux d'ARN delta mais d'autres résultats sont nécessaires pour tirer des conclusions définitives sur le bénéfice potentiel des NAPs dans le traitement de l'hépatite D chronique.

Dans ce contexte, identifier des combinaisons thérapeutiques innovantes pour traiter et guérir les patients co-infectés est urgemment requis. Nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antivirale de la silibinine, un composé naturel extrait du lait de Chardon-Marie, utilisé depuis des millénaires en médecine traditionnelle pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et hépatoprotectrices (7). Elle a démontré son efficacité contre le virus de l'hépatite C (VHC) au cours de plusieurs essais cliniques chez les patients non répondeurs aux traitements standards (9). Le mécanisme antiviral de la silibinine n'est pas encore bien élucidé mais il semble qu'elle interfère avec l'étape d'entrée du virus dans l'hépatocyte (66,67). De plus, la silibinine est bien tolérée ; en effet, elle est déjà sur le marché à l'étranger (Legalon®SIL) contre les empoisonnements aux amanites (8) et a le statut d'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) en France. Elle a récemment eu l'autorisation d'utilisation en Chine dans l'hépatite B chronique car des études chinoises ont montré que la silibinine sous forme de comprimé ou capsule entraînait une normalisation du bilan hépatique et des symptômes (68).

Nous avons également tenté d'élucider le mécanisme d'action de la silibinine, et avons pour cela étudié son influence sur les éléments du micro-environnement hépatocytaire impliqués dans l'étape d'entrée du cycle du VHD.



## **2. Objectifs**

Ce travail a porté principalement sur l'évaluation de l'activité antivirale potentielle de la silibinine contre le VHD, seule ou en combinaison avec l'interféron. Deux formes de silibinine ont été testées, la forme non hydrosoluble dénommée « silibinine » et la forme hydrosoluble « Legalon®SIL », utilisée en clinique par voie injectable.

Afin de comprendre à quelle étape du cycle viral agirait la silibinine, nous avons évalué son activité sur des hépatocytes en culture en trois étapes :

- traitement des hépatocytes avant inoculation des virions VHD
- traitement des hépatocytes et inoculation des virions VHD simultanément
- traitement des hépatocytes après inoculation des virions VHD

Nous avons également étudié les effets potentiels de la silibinine/Legalon®SIL sur les éléments du micro-environnement hépatocytaire impliqués dans l'entrée du VHD à savoir, le récepteur NTCP et un héparane sulfate protéoglycane (HSPG) en particulier, le syndécan-1. Nous nous sommes intéressés à cet HSPG car il a été récemment identifié comme facteur d'attachement à l'hépatocyte du virus de l'hépatite C (69). Nous avons donc évalué l'expression de ces deux marqueurs sur le plan génomique et protéique suite au traitement des hépatocytes en culture par des doses croissantes de silibinine/Legalon®SIL.

La méthodologie, les résultats et la discussion sont présentés dans l'article ci-dessous.

## **3. Présentation de l'article**

Ce travail sera présenté sous forme d'affiche au congrès de l'AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) qui aura lieu du 11 au 15 novembre 2016 à Boston.

# **Evaluation of the antiviral activity of silibinin against HDV with or without interferon and its effects on the hepatocyte microenvironment**

## **Abstract**

**Hepatitis B is caused by hepatitis B virus (HBV). Individuals co-infected with its satellite hepatitis D virus (HDV) develop the most severe form of viral hepatitis. There is currently no approved therapy for HDV infection and treatment with interferon-based therapies is not satisfying. Silibinin, a flavonolignan occurring in milk thistle seed extract, reported to exert an antiviral activity against hepatitis C virus (HCV), was investigated in its water-insoluble and water-soluble (Legalon®SIL) forms for its antiviral activity against HDV. We also tried to understand its antiviral activity by studying its effects on the recently described HBV and HDV receptor, sodium-taurocholate co-transporter polypeptide (NTCP) and a heparan sulfate proteoglycan, syndecan-1, because of its recent identification as an HCV attachment factor to hepatocytes. Our results show that silibinin and Legalon®SIL exhibit a dose-dependent inhibition of virus entry into hepatocytes. Treatment of these cells with these molecules induced a decrease in NTCP and syndecan-1 expression. However syndecan-1 involvement in HDV entry into hepatocytes remains to be determined.**

## **Introduction**

Hepatitis delta is caused by hepatitis D virus (HDV) infection and can only occur in individuals also infected with the hepatitis B virus (HBV) (1,2). HDV is a defective virus that uses the envelope proteins of HBV to enter hepatocytes and complete its life cycle (2,31). HDV is therefore a hybrid particle composed of the hepatitis delta antigen (HDAg) and RNA enclosed by HBV envelope proteins (18).

More than 350 million people worldwide are chronic HBV carriers, of which 15–20 million are infected by HDV, developing the most severe form of viral hepatitis (6,31).

Treatment of HDV infection has been notoriously difficult. There is currently no approved therapy for infection with HDV. Treatment with interferon (IFN)-based therapies is not satisfying, since it achieves HDV RNA negativity in only 25% of patients. Nucleot(s)ide analogues monotherapies such as adefovir, lamivudine or ribavirin are not effective at

treating HDV infection and did not significantly improve efficacy in combination with IFN compared to IFN alone (4–6).

Silibinin, a flavonolignan extracted from milk thistle seed, has been used for hepatobiliary diseases since the 16th century for its antioxidative, anti-inflammatory, antifibrotic, and hepatoprotective properties (7). It has been reported to be a promising alternative option for patients non responding to standard IFN treatment of hepatitis C, because of its reported antiviral activity and its tolerance (70). However, the mechanism of the antiviral activity remains a matter of debate.

The aim of this work was to investigate the effect on HDV infection of silibinin in its water-insoluble form (called silibinin thereafter) and water-soluble form Legalon®SIL, a pharmaceutical formulation of silibinin used in Amanita poisoning (8). The project also aims at understanding the antiviral activity of silibinin and Legalon®SIL, by studying their effects on some elements of the hepatocyte micro-environment : the recently described HBV and HDV receptor, sodium-taurocholate co-transporter polypeptide (NTCP) (11) and heparan sulfate proteoglycans (HSPG) described as key factors for virus attachment to hepatocyte (10). The specific HSPG molecule involved in cell attachment and entry of HBV/HDV remains unknown to date. Of particular interest is the HSPG syndecan-1, because of its recent identification as an attachment factor of the hepatitis C virus (69) in cooperation with a receptor molecule (Host laboratory's work: Grigorov et al., submitted).

## **Materials and methods**

### ***Silibinin, Legalon®SIL and interferon (IFN)***

We purchased Silibinin from Sigma Aldrich and IFN from Roche (Roferon A 18 M UI/0,5 ml). Legalon®SIL was a kind gift from Madaus GmbH, Cologne, Germany.

### ***Cells and Stable Cell Lines***

We used different human cell lines ranging from less differentiated to primary hepatocytes. We used the hepatocarcinoma cells HepG2 stably transfected with a human NTCP expression vector to make them susceptible to HDV infection (11). We maintained HepG2-NTCP cells in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal calf serum, 1xGlutaMAX, 1mM sodium pyruvate, 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin. We added Five mg ml<sup>-1</sup> puromycin to medium to stably select transduced HepG2-NTCP

cells. The clone Huh7.106, stably transfected with human NTCP, was kindly provided from Camille Sureau (Laboratoire de Virologie Moléculaire-INTS, Paris). It was selected for its resistance to neomycin and its susceptibility to infection with HDV. We maintained Huh7.106 cells in Williams E medium supplemented with 10% fetal calf serum and 0,5 mg ml<sup>-1</sup> of G418 to select clones resistant to neomycin. For differentiation, HepaRG cells were seeded in 12-well plates at a density of 2,5×10<sup>5</sup> cells/well and grown for 2 weeks in HepaRG growth medium (Williams E medium supplemented with 10% fetal calf serum, 5 mg ml<sup>-1</sup> insulin, 50 mM hydrocortisone, 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin). Two weeks post-seeding, the growth medium was changed to differentiation medium (growth medium supplemented with 1,8% dimethyl sulfoxide (DMSO)). All cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

### ***Effect of silibinin on HDV infection***

#### ***1. Cytotoxicity Assay***

We used the neutral red uptake and sulforhodamine B (SRB) assays for respectively HepaRG and Huh7.106 cells, treated with silibinin or Legalon<sup>®</sup>SIL (71,72). The neutral red test is based on the ability of viable cells to incorporate and bind the supravital dye neutral red in the lysosomes and the SRB test is based on the measurement of cellular protein content. Cells were seeded in 96-well tissue culture plates and were treated for 72 h. The plates were then incubated for 2 h with a medium containing neutral red or fixed with 10% trichloroacetic acid and stained for 30 min for the SRB test. Cells were washed (for the SRB test with 1% acetic acid). We extracted the dye in each well and we read the absorbance using Multiskan EX microplate photometer (Thermo Scientific). For the SRB test, we dissolved the protein-bound dye in 10 mM Tris base solution for absorbance determination.

#### ***2. Treatment and HDV Infection***

The effects of silibinin and Legalon<sup>®</sup>SIL on HDV infection in HepaRG cells were previously investigated. Pre-, co- and post-treatments with the molecules were performed as described in the experimental design (Fig. 2A). Therein, the pre-treatment condition maintained silibinin and Legalon<sup>®</sup>SIL after infection. In the pre-treatment strategy used in this study, silibinin and Legalon<sup>®</sup>SIL were removed just before infection (Fig. 3A). We treated differentiated HepaRG and Huh7.106 cells seeded in 12-well plates with 40 or 80 µM

silibinin and Legalon®SIL alone, or combined with 100 IU ml<sup>-1</sup> IFN for 8h. 100 nM Myrcludex B (MyrB), a peptide inhibiting virus entry, was used as positive control of infection inhibition (11). We used for infection, clarified supernatants of Huh7 cells containing HDV virions, kindly provide from C. Sureau who produced them as described (73). Cells were inoculated with 10<sup>8</sup> genomes of HDV virions in medium (HepaRG differentiation or Huh7.106 medium) containing 4% polyethylene glycol 8000 (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C for 16h, after which the inoculum was removed. After washing with Phosphate-buffered saline (PBS), medium was added and changed at days 2 and 5 post-infection. At day 6, we removed culture supernatant and extracted total RNA.

### *3. RNA extraction and one-step Reverse Transcriptase-Quantitative PCR (RT-qPCR)*

Total intracellular RNA from differentiated HepaRG and Huh7.106 cells was extracted using Extract-All™ (Eurobio, Courtaboeuf, France), according to manufacturer's protocol and RNA concentrations were measured with NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). We treated samples with RQ1 (RNA-Qualified) RNase-Free DNase (Promega, France), according to manufacturer's protocol. RT-qPCR was performed on LightCycler 480 (Roche) using the Invitrogen EXPRESS One-Step SYBR GreenER Kit (Life Technologies, France). The primer sequences used for the RT reaction were for HDV amplification, as published (74): HDAg-fw 5'CGGGCCGGCTACTCTTCT3' and HDAg-rev 5'AAGGAAGGCCCTCGAGAACA3'. We used B-Glucuronidase (GUS) as the reference gene.

### *Syndecan-1 Silencing*

We performed cytotoxicity assay of small interfering siRNAs on HepaRG cells by the SRB test. Four specific siRNAs constructs targeting syndecan-1 were used (CGCAAUUGUGGCUACUAA, CCAAACAGGAGGAAUUCUA, GGAGAAUACGGCUGUAGUG and GAGCAGGACUUCACCUUUG, Dharmacon) at 75 nM final concentration. We used non-targeting siRNAs as negative controls, and the Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene as positive control. For transfections, siRNAs were diluted in jetPRIME® transfection buffer and mixed with jetPRIME® transfection reagent (Polyplus Transfections) for 25 minutes at room temperature to form the transfection complex. Transfection mixes were added to differentiated HepaRG cells seeded on 12-well plates and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

After 96h cells were lysed in CHAPS buffer (1% CHAPS in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA) for protein analysis. For RNA evaluation, cells were lysed using Extract-All™ and RNA quantified by RT-qPCR for determination of gene silencing.

### *1. RNA quantification*

We treated samples with DNase, prior to reverse transcription performed using 1 µg of RNA and Reverse Transcription Kit from Invitrogen (Life Technologies, France). We incubated RNAs with random primers and dNTP mix at 65°C for 5 min after which we added buffer, reverse transcriptase, RNase out. The final mix was incubated at 25°C for 10 min, 37°C for 50 min and 75°C for 15 min. Quantitative PCR was performed on a QuantStudio™ Real Time PCR (Life Technologies) using 4 µL of diluted cDNAs 1:5 and 6 µL of SYBR® Green PCR Master Mix (Roche). The following primers were used: synd-1 fw: GCT-GAC-CTT-CAC-ACT-CCC-CA, rev: CAA-AGG-TGAAGT-CCT-GCT-CCC, GAPDH fw: 5'ACCCAGAAGACTGTGGATGG, GAPDH rev: 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTC. 45 cycles were performed at 95°C for 15 sec for denaturation and 72°C for 30 sec for elongation. We normalized synd-1 and GAPDH expression to GUS.

### *2. Western blotting*

Cells were harvested in CHAPS buffer, supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche, Life Science). Lysates were sonicated and total cellular protein was quantified by the BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Iselin, NJ) for equal loading in each lane. Samples were denatured for 5 min at 95°C in Laemmli buffer and proteins separated by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). For synd-1 and GAPDH detection, separated proteins were transferred onto PVDF membrane and revealed using respectively mouse monoclonal antibody DL-101 (Santa Cruz, Biotechnology) at 1:250 and rabbit polyclonal antibody to GAPDH (GenTex) at 1:1000. Equal loading was also controlled by revealing β-actin with mouse monoclonal antibody at 1:5000. We used secondary anti-rabbit and anti-mouse antibodies coupled to horseradish peroxidase to detect proteins by enhanced chemiluminescence.

### ***Effect of silibinin and Legalon®SIL on synd-1 and NTCP expression***

We treated differentiated HepaRG, Huh7.106 and HepG2-NTCP cells seeded in 12-well plates with increasing doses of silibinin and Legalon®SIL: 0, 10, 20, 40, 50, 60, 80 or 100

$\mu\text{M}$  for 72 h. For determination of synd-1 and NTCP expression after treatment, cells were lysed to perform western blotting and RNA was extracted. We lysed HepaRG cells in CHAPS buffer and Huh7.106 and HepG2-NTCP cells in Tris-HCl 50mM (pH 8)/EDTA 1mM/NP40 1%. For western blotting, we revealed NTCP using the rabbit polyclonal antibody HPA042727 (Sigma-Aldrich). For RT-qPCR, we used the following primers: NTCP as published (11) : fw: 5'-AAGGACAAGGTGCCCTATAAAGG, NTCP rev: 5'-TTGAGGACGATCCCTATGGTG. We used the same primers as for synd-1 silencing.

## **Results**

### ***Cellular tolerance to silibinin and Legalon®SIL***

Three cell lines were used in this study : (i) HepaRG cells, the canonical and routinely-used model for HBV and HDV infection; (ii) Huh7.106 cells, obtained from Huh7 cells not permissive for HBV/HDV infection and designed by Camille Sureau's lab to stably express the NTCP receptor at their surface, which renders them permissive, and (iii) HepG2-NTCP cells, obtained from polarized HepG2 cells and constitutively expressing NTCP at their surface. Note that not all cell lines were used for all tests.

As shown in Fig. 1, HepaRG cells tolerate well both silibinin and Legalon®SIL, up to 100 $\mu\text{M}$ . However, Huh7.106 tolerate silibinin much less than Legalon®SIL, and doses from 40 $\mu\text{M}$  appear to be cytotoxic. In addition, we observed a decrease of RNA and protein amounts dependent upon silibinin doses (data not shown). At present, we do not know if this effect is due to cell death or senescence. Senescence tests will be performed to elucidate this point. Cells tolerate IFN up to 1000 IU ml<sup>-1</sup> (data not shown).

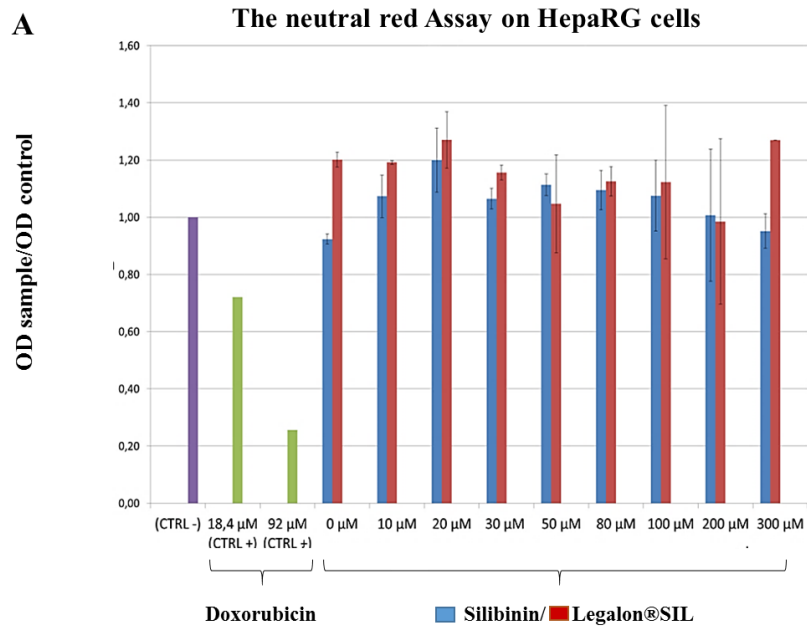
### ***Dose-dependent inhibition of HDV infection by Legalon®SIL***

Results previously obtained by the team, in pre-, co- and post-treatments with silibinin and Legalon®SIL on HDV infection of HepaRG cells, demonstrated that pre-treatment conditions decreased HDV infection (Fig.2 B,C). The results of the present study show that only Legalon®SIL inhibited HDV infection, and the best results were observed when Legalon®SIL was associated to IFN (Fig3. B). Note that this effect was only observed in HepaRG cells, not in Huh7.106 cells (Fig. 3C).

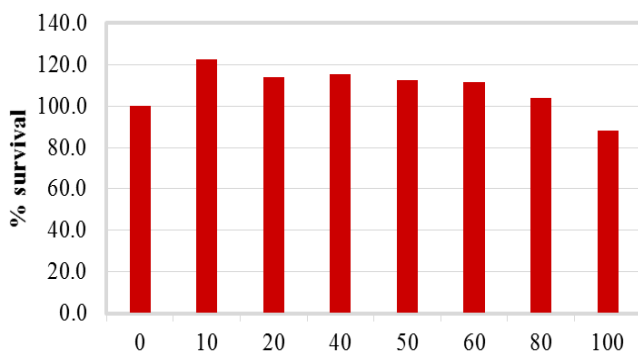
### *Silencing of synd-1 transcripts*

These experiments were performed in order to establish whether the HSPG syndecan-1 could play a role in HDV entry into hepatocytes, since HSPG have been described to be involved in HBV entry, and syndecan-1 in particular was shown to be an attachment factor for HCV. For this purpose, synd-1 expression was knocked down with 75 nM siRNA for 96h. SRB test shows that cells tolerate well transfection at that dose (Fig. 4A). We observed a neat decrease in RNA amounts after siRNA treatments compared to control, for GAPDH and for synd-1. However, to our surprise, protein expression did not follow the same pattern. Neither GAPDH nor synd-1 expression seemed to be properly silenced (Fig. 4B,C). Concerning synd-1, we concentrated on the dimer bands, one at 100 KD displaying a small decrease and one at 110 KD whose expression remains unchanged. This is also apparent from band quantification normalized to actin, using ImageJ (Fig. 4C). We are currently actively working to clarify this discrepancy.

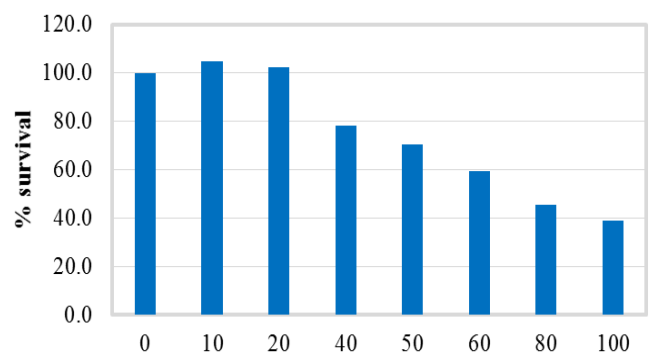




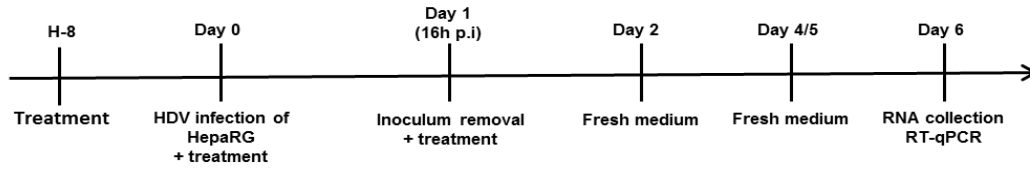
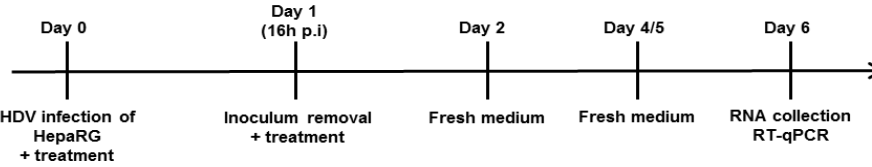
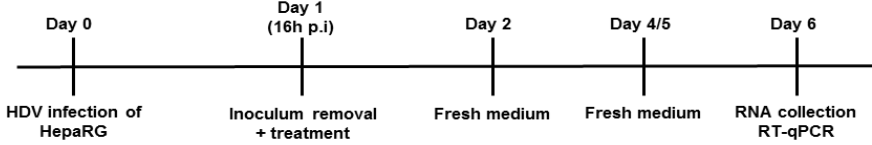
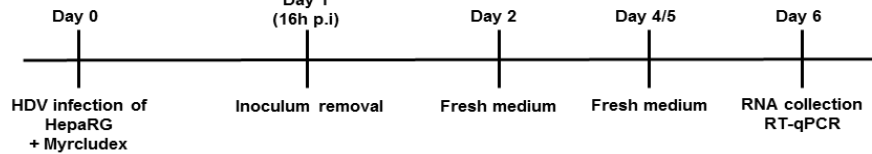
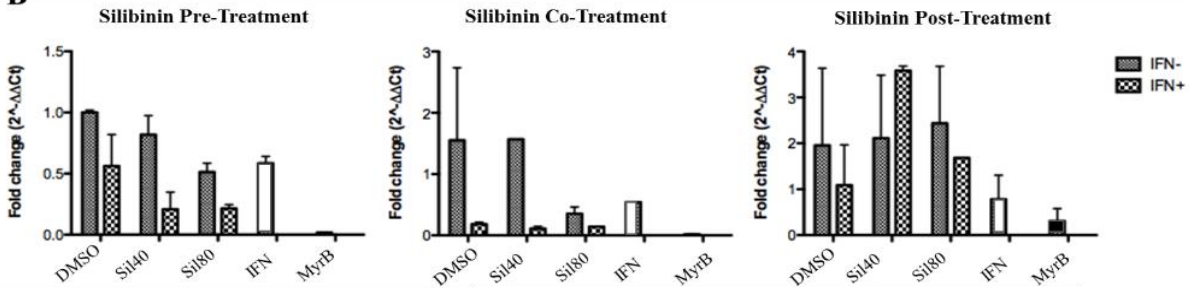
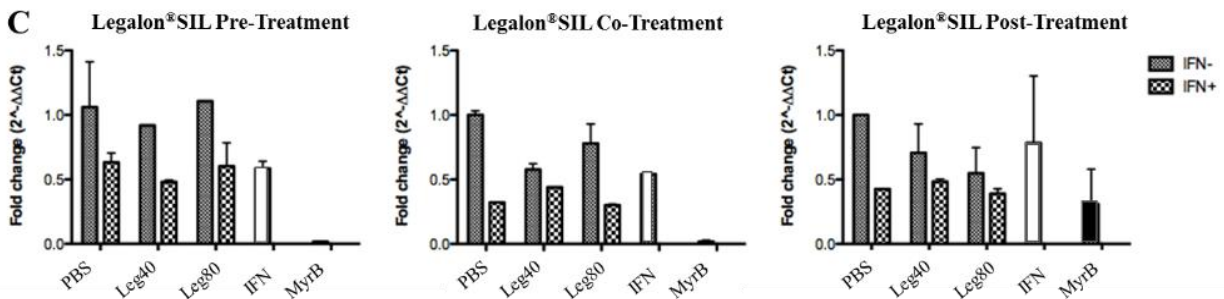
**B** **SRB cytotoxicity assay on Huh7.106 cells treated with increasing doses of Legalon®SIL (μM)**



**C** **SRB cytotoxicity assay on Huh7.106 cells treated with increasing doses of Silibinin (μM)**

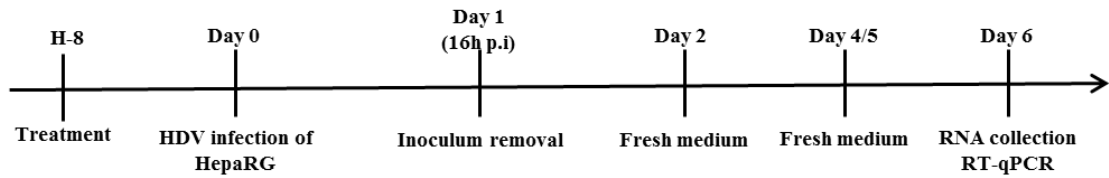


**Figure 1. Cytotoxicity assays of silibinin and Legalon®SIL.** (A) The neutral red assay on HepaRG cells performed with increasing doses of silibinin and Legalon®SIL. Doxorubicin is used as a positive control. CTRL- is a negative control. (B,C) SRB test on Huh7.106 cells with increasing doses of molecules.

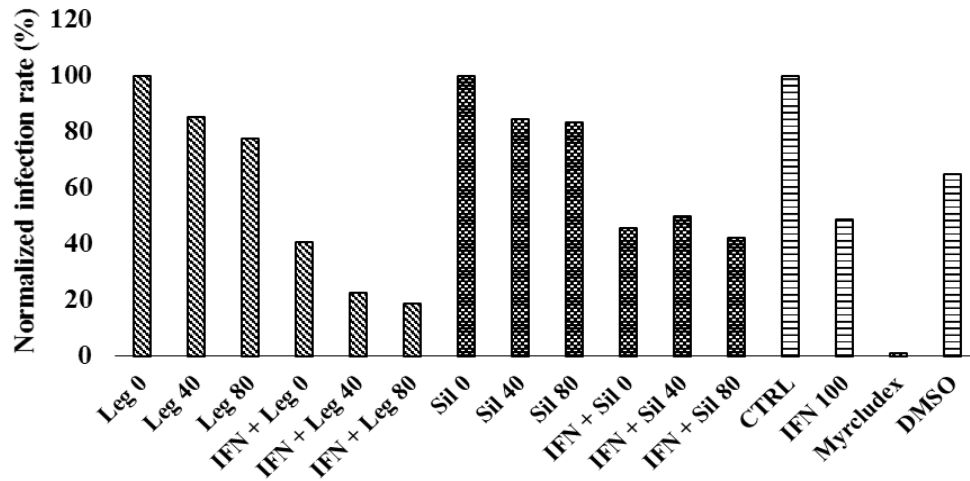
**A****Pre-inoculation strategy****Co-inoculation strategy****Post-inoculation strategy****Positive control****B****C****Figure 2. Effect of silibinin and Legalon®SIL on HDV infection: previously obtained data.**

(A) Experimental designs. (B,C) Data previously obtained on HepaRG cells. 40 and 80  $\mu$ M silibinin (Sil) or Legalon®SIL (Leg) were tested alone (IFN -) or combined to 100 IU/mL IFN (IFN +) in pre-, co- or post-treatment conditions. IFN alone was tested (white bar) to compare its effect to combined treatment. 100 nM MyrB was used as positive control of infection inhibition. PBS (Legalon®SIL solvent) and DMSO (Silibinin solvent) were used as controls to rule out an additional effect of solvent. RT-qPCR results are expressed in Fold change of RNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

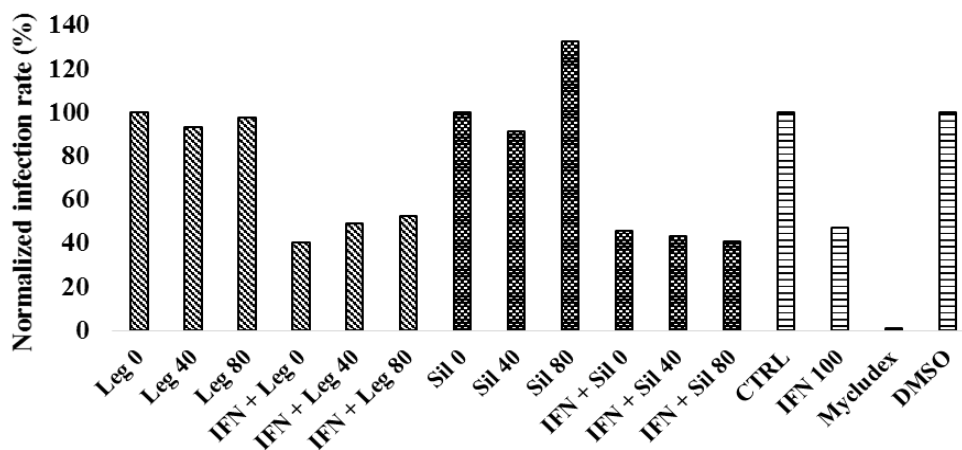
### A Pre-inoculation strategy



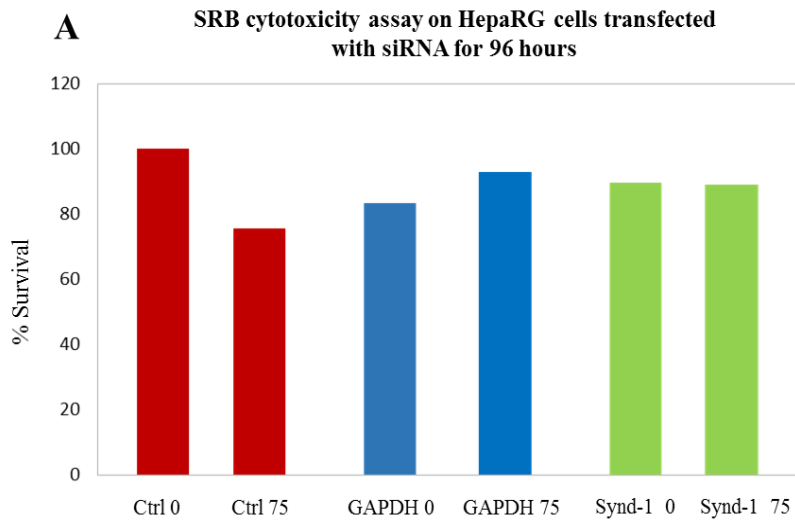
### B IFN/Legalon®SIL/Silibinin pre-treatment on HepaRG cells infected with HDV



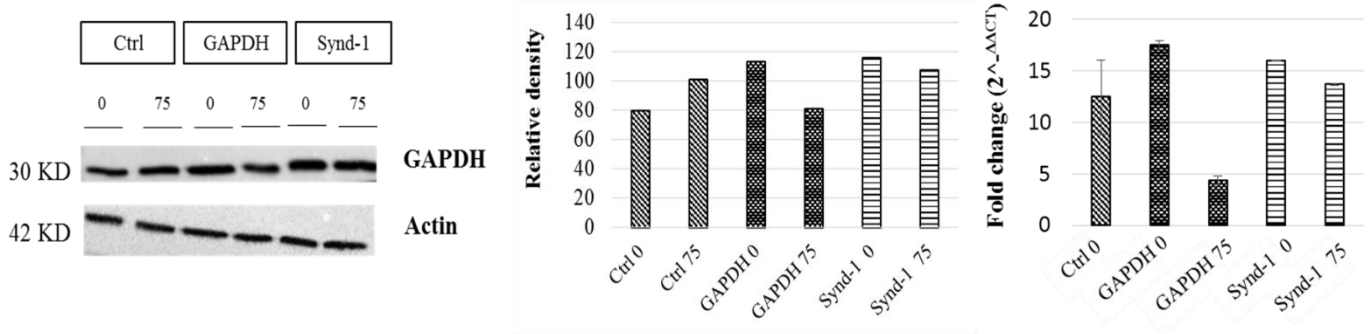
### C IFN/Legalon®SIL/Silibinin pre-treatment on Huh7-106 cells infected with HDV



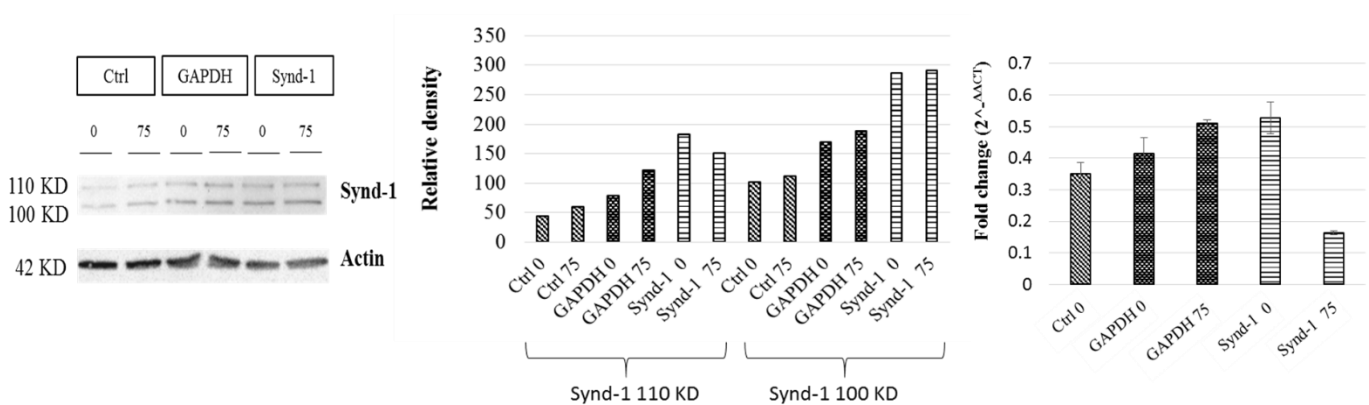
**Figure 3. Effect of silibinin and Legalon®SIL on HDV infection.** (A) Experimental designs. (B,C) Pre-treatment condition according to experimental design (A), on HepaRG (B) and Huh7.106 cells (C). 40 and 80  $\mu$ M silibinin (Sil) or Legalon®SIL (Leg) were tested alone or combined to 100 IU/mL IFN. IFN alone was tested to compare its effect to combined treatment. 100 nM MyrB was used as positive control of infection inhibition. CTRL is infected but non treated condition.



**B** GAPDH expression in HepaRG cells transfected with anti-GAPDH siRNA for 4 days



**C** Synd-1 expression in HepaRG cells transfected with anti-synd-1 siRNA for 4 days

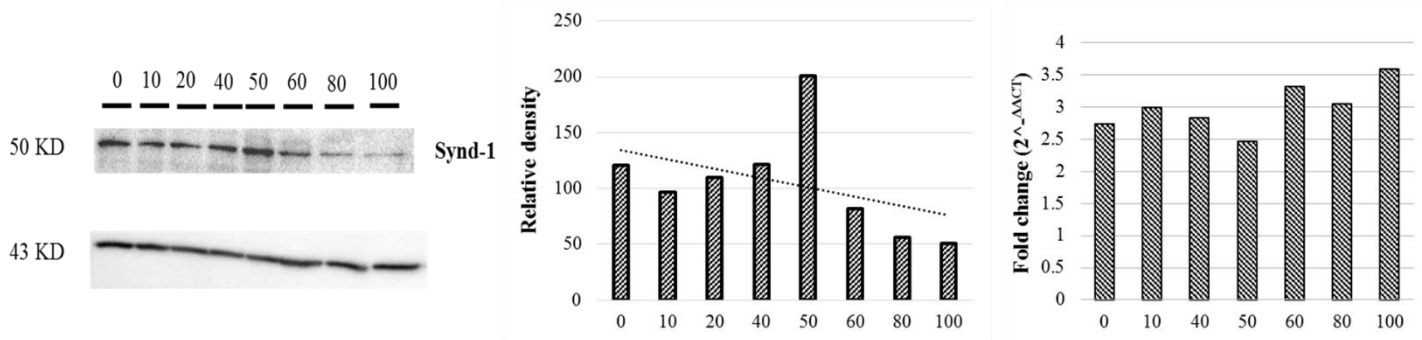


**Figure 4. Synd-1 expression after RNA silencing.** (A) SRB Cytotoxicity test after 4 days of transfection with siRNA. (B,C) GAPDH and Synd-1 relative expression after 4 days of transfection. Each panel includes from left to right: Western blot, blot quantification normalized to actin and RT-qPCR results normalized to GUS expressed in Fold change of RNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). GAPDH is a positive control of transfection. Negative control is a non-targeting sequence. Synd-1 expression was analyzed in (B) to confirm that the siRNA used to target GAPDH did not also target synd-1 (specificity test). The same was performed for GAPDH expression in (C).

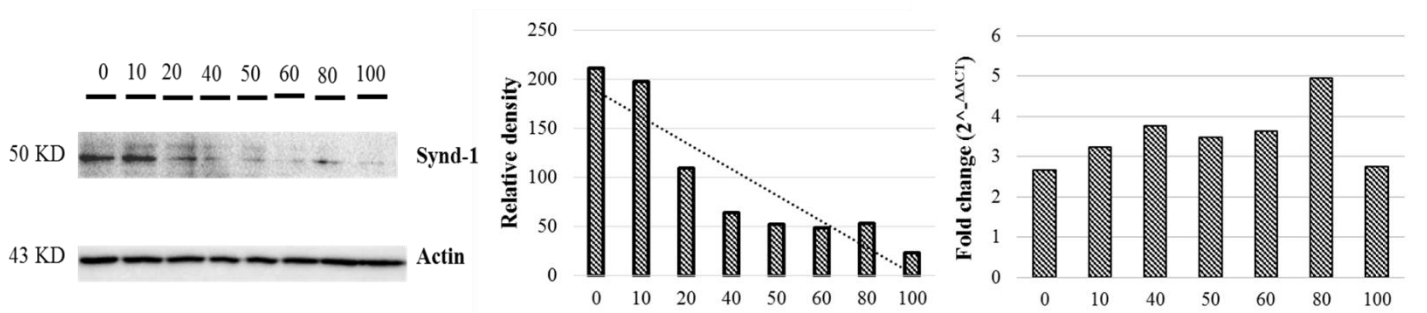
### Effect of silibinin and Legalon®SIL on synd-1 and NTCP expression depends on cell type

In HepG2-NTCP cells, silibinin and Legalon®SIL induced a dose-dependent decrease of synd-1 protein expression from 60  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$  respectively (Fig. 5A,B). This was not related to the RNA expression. In Huh7.106 and HepaRG cells, treatment showed no effect (data not shown).

**A** Synd-1 expression on HepG2-NTCP cells treated with silibinin ( $\mu\text{M}$ )



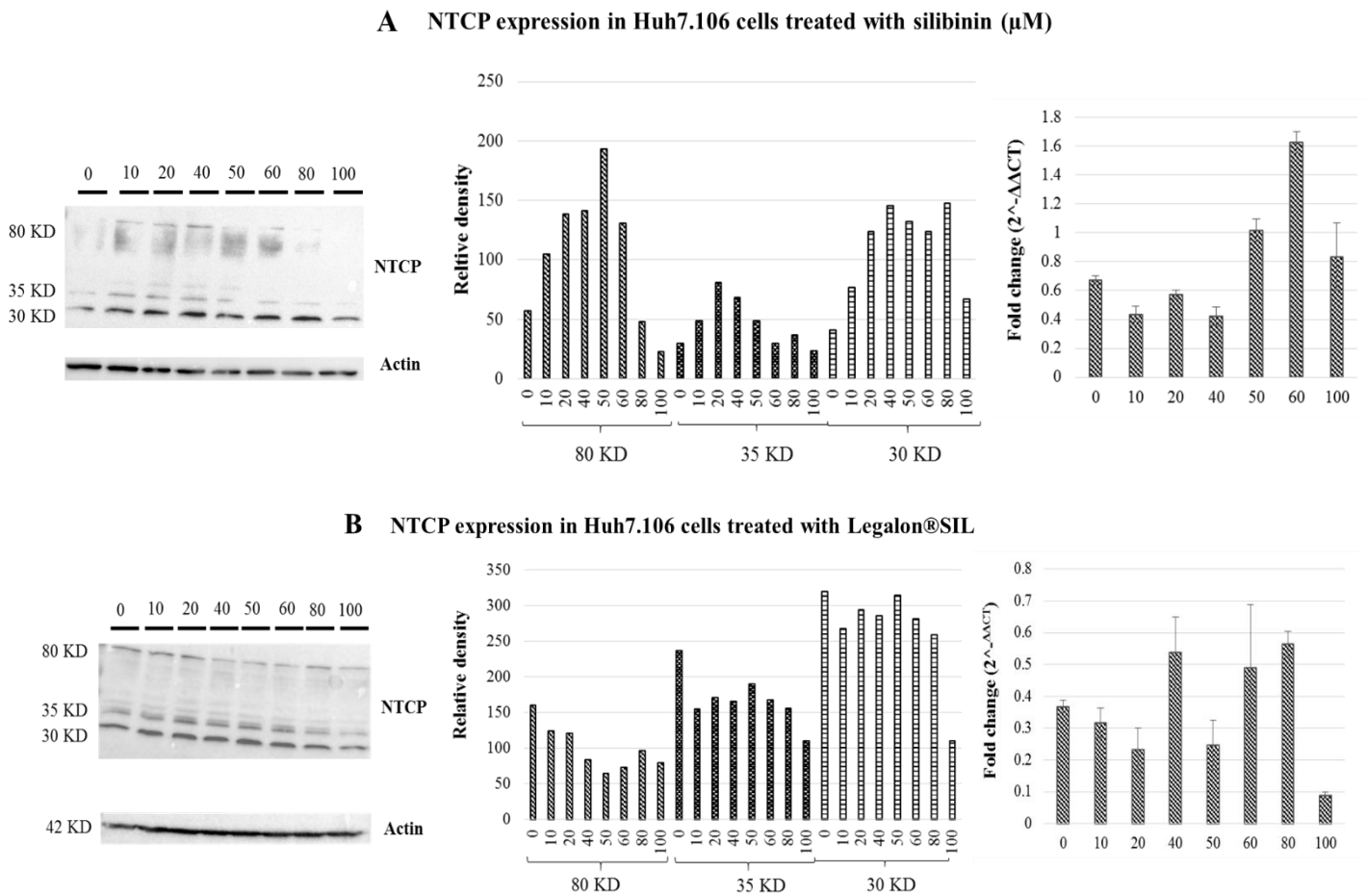
**B** Synd-1 expression in HepG2-NTCP cells treated with Legalon®SIL ( $\mu\text{M}$ )



**Figure 5. Synd-1 expression in HepG2-NTCP cells treated with increasing doses of silibinin or Legalon®SIL.**

(A,B) Synd-1 expression in HepG2-NTCP cells treated with increasing doses of silibinin (A) or Legalon®SIL (B). Each panel includes from left to right: Western blot, blot quantification normalized to actin and RT-qPCR results normalized to GUS expressed in Fold change of RNA (2<sup>- $\Delta\Delta\text{CT}$</sup> ).

Concerning NTCP, its expression at the protein level remained unchanged in HepG2-NTCP cells (data not shown). In Huh7.106 cells, Legalon®SIL induced a decrease of protein expression, for the 35 and 80 KD bands, but this was again not related to any modification at the RNA level (Fig. 6B). Silibinin showed no effect (Fig. 6A).



**Figure 6. NTCP expression in Huh7.106 cells treated with increasing doses of silibinin or Legalon®SIL.**

(A,B) NTCP expression in Huh7.106 cells treated with increasing doses of silibinin (A) or Legalon®SIL (B). Each panel includes from left to right: Western blot, blot quantification normalized to actin and RT-qPCR results normalized to GUS expressed in Fold change of RNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

## Discussion

Our main result is that silibinin and Legalon<sup>®</sup>SIL exhibit a dose-dependent inhibition of HDV infection, when cells are pre-treated with the molecules. This suggests that both molecules impede the viral life cycle at an early stage, i.e. at the stage of hepatocyte entry, as previously described for HCV (75). Interestingly IFN also provided better antiviral activity when added before infection, as already reported (76). In combination with IFN, Legalon<sup>®</sup>SIL significantly decreased HDV infection rate, unlike silibinin. This could be of importance for therapy, as Legalon<sup>®</sup>SIL is the pharmaceutical form of silibinin. However, we must remain cautious since this study must be repeated in order to demonstrate the reproducibility and reliability of the results. Also we must keep in mind that a similar conclusion could not be reached using Huh7-106 cells. These cells are not polarized, contrary to HepaRG and HepG2-NTCP cells and might therefore have a different microenvironment.

We hypothesized that (part of) the antiviral mechanism of silibinin and Legalon<sup>®</sup>SIL could be explained by a dys-regulation of surface receptor expression. The effect of increasing doses of molecules on NTCP expression were therefore studied; the results suggest that Legalon<sup>®</sup>SIL has a dose-dependent effect on NTCP expression in Huh7.106 cells, but results remain unclear for other cell types. This is most likely achieved at the protein biosynthetic level, since the RNA expression remains unchanged. These experiments should be completed and reproduced.

Concerning syndecan-1 expression that was shown to be an attachment factor of HCV to hepatocytes (69), suggested to be so for HBV/HDV, siRNA silencing was performed to determine whether synd-1 plays a role in HDV entry into hepatocytes. RNA knockdown was achieved at high efficiency, but the current results on protein expression are still not satisfying. Experiments will be repeated with higher amounts of siRNA, alternatively an shRNA strategy will be implemented. In parallel, and assuming that synd-1 might participate in HDV entry, the hypothesis that synd-1 expression could be affected by treatment with molecules was tested. The results show that silibinin and Legalon<sup>®</sup>SIL induce a dose-dependent decrease of synd-1 expression in HepG2-NTCP cells at the protein level. Since this was not observed at the transcript level, this suggests that both molecules may activate protein degradation or inhibit its biosynthesis/maturation in the Golgi. These experiments should be reproduced and other cell types should be tested.

In conclusion, silibinin and Legalon<sup>®</sup>SIL exhibit an anti-HDV activity, that likely concerns viral entry. Mechanistically, treatment of cells with these molecules appears to decrease NTCP expression, the recently identified entry receptor of HBV/HDV, and the expression of the HSPG syndecan-1. Whether synd-1 is involved in the attachment/entry of HDV remains to be determined. Taking into account its good tolerance and potential efficacy, silibinin could constitute a good therapeutic candidate combined to interferon in the treatment of HBV/HDV co-infection.



## **Partie 4 : Discussion et Conclusion**

## Discussion

---

L'hépatite D demeure jusqu'à présent difficile à traiter. Le traitement actuel reste empirique, basé sur l'IFN- $\alpha$  dont l'utilisation remonte aux années 1980 (15,18). L'efficacité du traitement qui se traduit par une réponse virologique durable est obtenue selon les études, dans 17 à 43% des cas (4,41,42). L'association des inhibiteurs nucléoti(si)diques, efficaces contre le VHB ne semble pas améliorer l'efficacité du traitement par l'IFN- $\alpha$  (6,43,45–47). Les thérapeutiques actuelles sont donc non satisfaisantes et rendent nécessaire le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Plusieurs axes de recherche ciblant différentes phases du cycle du VHD comme l'inhibiteur d'entrée Myrcludex B, l'inhibiteur de prénylation lonafarnib et le NAP REP 2139-Ca sont en cours d'investigation mais jusqu'à présent il n'existe pas de résultats définitifs qui confirment leur efficacité chez l'homme.

Notre étude a porté sur l'évaluation de l'activité antivirale de la silibinine, extraite du lait de Chardon-Marie, sur l'infection par le VHD de différentes lignées d'hépatocytes en culture. Cette évaluation s'est déroulée selon un « calendrier expérimental » en trois temps, soit le traitement des cellules par les molécules avant infection ce qui correspond au prétraitement, soit le traitement et l'infection des cellules simultanément ce qui correspond au co-traitement, soit le traitement après infection des cellules ce qui correspond au post-traitement. Notre principal résultat montre que la silibinine, sous ses deux formes, hydrosoluble ou non, induit une inhibition dose-dépendante de l'infection par le VHD quand les cellules subissent un prétraitement. Ceci suggère que les deux formes de silibinine interviennent à un stade précoce du cycle viral, comme il a été observé pour l'infection par le VHC (75). Cependant, la forme hydrosoluble, Legalon®SIL, semble montrer une inhibition plus importante de l'infection lors de son association à l'IFN, ce qui n'a pas été le cas pour la forme non hydrosoluble, silibinine. De plus, ces résultats n'ont pas été observés sur toutes les lignées cellulaires, ce qui peut être expliqué par un degré de différenciation et un microenvironnement hépatocytaire différents.

En ce qui concerne l'étude du mécanisme d'action de la silibinine, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait agir sur les éléments du microenvironnement hépatocytaire impliqués dans l'attachement et l'entrée du virus. L'identification récente du récepteur du VHD, NTCP (11), a

ouvert une porte sur le développement de nouvelles stratégies thérapeutique qui ciblent l'entrée du virus.

Nous avons donc étudié l'effet de doses croissantes des deux formes de silibinine sur l'expression du récepteur du VHD, NTCP et un facteur d'attachement du VHC, syndecan-1 dans l'hypothèse qu'il interagirait également avec le VHD. Les résultats suggèrent que Legalon®SIL diminue l'expression d'NTCP dans les cellules Huh7.106 et que les deux formes de silibinine diminuent l'expression du syndecan-1 dans les cellules HepG2-NTCP. Cependant, les résultats ne sont pas concluants pour les autres lignées cellulaires. De plus, ces résultats concernent uniquement l'expression protéique et non la transcription d'ARN ce qui suggère que la silibinine peut activer la dégradation de ces protéines ou inhiber leur synthèse et maturation.

Toutes ces expériences doivent être répétées pour démontrer leur reproductibilité et fiabilité.

Les deux formes de silibinine semblent avoir une activité antivirale contre le VHD qui concerne l'étape d'entrée. Son mécanisme pourrait se traduire par la baisse d'expression des molécules impliquées dans l'entrée du virus. La bonne tolérance et l'efficacité potentielle de la silibinine, pourrait en faire un bon candidat pour le traitement des patients infectés par le VHD et VHB, en association possible à l'IFN.

# Conclusion

---

L'hépatite delta est loin d'être une maladie en voie de disparition et constitue un problème de santé publique dans certaines régions du monde. Des études ont montré une augmentation de sa prévalence dans les pays industrialisés malgré le programme de vaccination contre le virus de l'hépatite B. L'hépatite delta est la seule forme d'hépatite virale pour laquelle il n'y a pas un traitement bien établi. Les traitements actuels sont basés sur l'interféron en présence ou en absence des traitements utilisés contre le virus de l'hépatite B et ne sont pas satisfaisants. Les recherches actuelles sur les nouvelles stratégies antivirales indiquent que les inhibiteurs de prénylation et d'entrée ainsi que d'autres approches thérapeutiques ont la possibilité de fournir un traitement plus efficace dans l'avenir.

Cibler l'étape d'attachement et d'entrée du virus est une approche intéressante car elle permet d'inhiber l'infection à un stade précoce du cycle viral et empêcher la réplication du virus. Une meilleure compréhension du mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite delta permettra l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

La silibinine, un composé naturel extrait du lait de Chardon-Marie, a montré son efficacité contre le virus de l'hépatite C et entraîne une amélioration des symptômes lors de son utilisation dans l'hépatite B en Chine. Son mécanisme d'action antiviral n'est pas bien élucidé mais il semblerait qu'elle interfère avec l'étape d'entrée dans l'hépatocyte. Son effet en présence ou en absence d'interféron ainsi que son mécanisme d'action ont été évalués durant ce travail.

Les résultats préliminaires obtenus ont montré un effet dose-dépendant de la silibinine sur l'entrée du virus de l'hépatite delta dans l'hépatocyte, effet augmenté par la combinaison silibinine-interféron. Concernant l'étude du mécanisme d'action de la silibinine, les résultats tendent à indiquer une sous-régulation de l'expression du récepteur sodium-taurocholate cotransporting polypeptide par la silibinine. De plus, nos premières études sur les héparanes sulfates protéoglycanes semblent indiquer que le syndecan-1 pourrait être un facteur d'attachement et/ou d'entrée du virus dans l'hépatocyte. De façon intéressante, ce travail montre que le traitement par silibinine induit une sous-régulation de l'expression du syndecan-1. A partir de là, nous posons l'hypothèse que la silibinine bloquerait l'entrée du virus en sous-régulant l'expression de molécules de surface réceptrice des virions, le syndecan-1 et le sodium-

taurocholate co-transporting polypeptide. Ceci ouvre sur un projet novateur proposant des pans de recherche totalement inexplorés.

L'identification de facteur(s) potentiel(s) du microenvironnement hépatocytaire, impliqués dans l'attachement et l'entrée des virus, permettra d'approfondir nos connaissances fondamentales du cycle viral du virus de l'hépatite delta, et l'effet éventuel de la silibinine sur ces mêmes facteurs éclairera les mécanismes d'action antivirale de cette molécule.

A plus long terme, il serait intéressant d'étudier des combinaisons silibinine / traitement standard contre les virus de l'hépatite B et delta in vivo.

**Le Président de Jury,**  
(Nom et Signature)

Pr Florence MORFIN



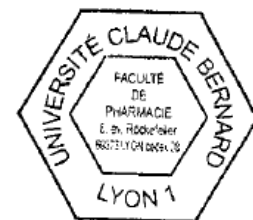
**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**

**Lyon, le**

**Vu, la Directrice de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon  
Pour le Président de l'Université Claude-Bernard**



**Professeur Christine VINCIGUERRA**



# Bibliographie

---

1. Nouredin M, Gish R. Hepatitis delta: epidemiology, diagnosis and management 36 years after discovery. *Curr Gastroenterol Rep.* 2014 Jan;16(1):365.
2. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Jan;7(1):31–40.
3. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *LANCET Lancet.* 2011;378(9785):73–85.
4. Erhardt A, Gerlich W, Starke C, Wend U, Donner A, Sagir A, et al. Treatment of chronic hepatitis delta with pegylated interferon-alpha2b. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2006 Sep;26(7):805–10.
5. Guedj J, Rotman Y, Cotler SJ, Koh C, Schmid P, Albrecht J, et al. Understanding early serum hepatitis D virus and hepatitis B surface antigen kinetics during pegylated interferon-alpha therapy via mathematical modeling. *Hepatol Baltim Md.* 2014 Dec;60(6):1902–10.
6. Wedemeyer H, Yurdaydin C, Dalekos GN, Erhardt A, Çakaloğlu Y, Değertekin H, et al. Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. *N Engl J Med.* 2011 Jan 27;364(4):322–31.
7. Schuppan D, Jia JD, Brinkhaus B, Hahn EG. Herbal products for liver diseases: a therapeutic challenge for the new millennium. *Hepatol Baltim Md.* 1999 Oct;30(4):1099–104.
8. Mengs U, Pohl R-T, Mitchell T. Legalon® SIL: the antidote of choice in patients with acute hepatotoxicity from amatoxin poisoning. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Aug;13(10):1964–70.
9. Yang Z, Zhuang L, Lu Y, Xu Q, Chen X. Effects and tolerance of silymarin (milk thistle) in chronic hepatitis C virus infection patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BioMed Res Int.* 2014;2014:941085.
10. Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatol Baltim Md.* 2007 Dec;46(6):1759–68.
11. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife [Internet].* 2012 Nov 13 [cited 2016 Apr 25];1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3485615/>
12. Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut.* 1977 Dec;18(12):997–1003.

13. Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, London WT, Sly DL, Purcell RH. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis.* 1980 May;141(5):590–602.
14. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Oct;77(10):6124–8.
15. Rizzetto M. The adventure of delta. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2016 Jan;36 Suppl 1:135–40.
16. Rizzetto M. Hepatitis D: thirty years after. *J Hepatol.* 2009 May;50(5):1043–50.
17. Rizzetto M. Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Jul;5(7):a021576.
18. Alves C, Branco C, Cunha C. Hepatitis delta virus: a peculiar virus. *Adv Virol.* 2013;2013:560105.
19. Cunha C, Tavanez JP, Gudima S. Hepatitis delta virus: A fascinating and neglected pathogen. *World J Virol.* 2015 Nov 12;4(4):313–22.
20. Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM, et al. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature.* 1986 Oct 9;323(6088):508–14.
21. Abbas Z, Afzal R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. *World J Hepatol.* 2013 Dec 27;5(12):666–75.
22. Taylor JM. Hepatitis D Virus Replication. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Nov;5(11).
23. Ghamari S, Alavian SM, Rizzetto M, Olivero A, Smedile A, Khedive A, et al. Prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic hepatitis B patients with unusual clinical pictures. *Hepat Mon.* 2013;13(8):e6731.
24. Sureau C, Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol.* 2016 Apr;64(1 Suppl):S102–16.
25. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* 2008 Jan 1;10(1):122–33.
26. Taylor JM. Virus entry mediated by hepatitis B virus envelope proteins. *World J Gastroenterol.* 2013 Oct 28;19(40):6730–4.
27. Sureau C, Salisse J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatol Baltim Md.* 2013 Mar;57(3):985–94.

28. Urban S. Liver capsule: Entry and entry inhibition of hepatitis B virus and hepatitis delta virus into hepatocytes. *Hepatology*. 2016 Feb;63(2):633.
29. Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology*. 2014 Jul;147(1):48–64.
30. Macnaughton TB, Shi ST, Modahl LE, Lai MMC. Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J Virol*. 2002 Apr;76(8):3920–7.
31. Huang C-R, Lo SJ. Hepatitis D virus infection, replication and cross-talk with the hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* WJG. 2014 Oct 28;20(40):14589–97.
32. Pol S. Traitements des hépatites virales delta. *Gastroentérologie Clin Biol*. 2005 avril;29(4):384–7.
33. Farci P, Niro GA. Clinical features of hepatitis D. *Semin Liver Dis*. 2012 Aug;32(3):228–36.
34. Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Nov;4(11):a021550.
35. Niro GA, Smedile A. Current concept in the pathophysiology of hepatitis delta infection. *Curr Infect Dis Rep*. 2012 Feb;14(1):9–14.
36. Govindarajan S, Fields HA, Humphrey CD, Margolis HS. Pathologic and ultrastructural changes of acute and chronic delta hepatitis in an experimentally infected chimpanzee. *Am J Pathol*. 1986 Feb;122(2):315–22.
37. Kamimura T, Ponzetto A, Bonino F, Feinstone SM, Gerin JL, Purcell RH. Cytoplasmic tubular structures in liver of HBsAg carrier chimpanzees infected with delta agent and comparison with cytoplasmic structures in non-A, non-B hepatitis. *Hepatology*. 1983 Oct;3(5):631–7.
38. Smedile A, Rizzetto M. HDV: thirty years later. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2011 Jan;43 Suppl 1:S15–8.
39. Farci P, Mandas A, Coiana A, Lai ME, Desmet V, Van Eyken P, et al. Treatment of chronic hepatitis D with interferon alfa-2a. *N Engl J Med*. 1994 Jan 13;330(2):88–94.
40. Yurdaydin C, Bozkaya H, Karaaslan H, Onder FO, Erkan OE, Yalçın K, et al. A pilot study of 2 years of interferon treatment in patients with chronic delta hepatitis. *J Viral Hepat*. 2007 Nov;14(11):812–6.
41. Niro GA, Ciancio A, Gaeta GB, Smedile A, Marrone A, Olivero A, et al. Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta. *Hepatology*. 2006 Sep;44(3):713–20.



42. Castelnau C, Le Gal F, Ripault M-P, Gordien E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, et al. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology*. 2006 Sep;44(3):728–35.
43. Yurdaydin C, Bozkaya H, Gürel S, Tillmann HL, Aslan N, Okçu-Heper A, et al. Famciclovir treatment of chronic delta hepatitis. *J Hepatol*. 2002 Aug;37(2):266–71.
44. Niro GA, Ciancio A, Tillman HL, Lagget M, Olivero A, Perri F, et al. Lamivudine therapy in chronic delta hepatitis: a multicentre randomized-controlled pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005 Aug 1;22(3):227–32.
45. Yurdaydin C, Bozkaya H, Onder FO, Sentürk H, Karaaslan H, Akdoğan M, et al. Treatment of chronic delta hepatitis with lamivudine vs lamivudine + interferon vs interferon. *J Viral Hepat*. 2008 Apr;15(4):314–21.
46. Gunsar F, Akarca US, Ersoz G, Kobak AC, Karasu Z, Yuce G, et al. Two-year interferon therapy with or without ribavirin in chronic delta hepatitis. *Antivir Ther*. 2005;10(6):721–6.
47. Mansour W, Ducancelle A, Le Gal F, Le Guillou-Guillemette H, Abgueguen P, Pivert A, et al. Resolution of chronic hepatitis Delta after 1 year of combined therapy with pegylated interferon, tenofovir and emtricitabine. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2010 Jan;47(1):97–9.
48. Sheldon J, Ramos B, Toro C, Ríos P, Martínez-Alarcón J, Bottecchia M, et al. Does treatment of hepatitis B virus (HBV) infection reduce hepatitis delta virus (HDV) replication in HIV-HBV-HDV-coinfected patients? *Antivir Ther*. 2008;13(1):97–102.
49. Yurdaydin C, Idilman R. Therapy of Delta Hepatitis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Oct;5(10).
50. Rosenau J, Kreutz T, Kujawa M, Bahr MJ, Rifai K, Hooman N, et al. HBsAg level at time of liver transplantation determines HBsAg decrease and anti-HBs increase and affects HBV DNA decrease during early immunoglobulin administration. *J Hepatol*. 2007 Apr;46(4):635–44.
51. Mederacke I, Filmann N, Yurdaydin C, Bremer B, Puls F, Zacher BJ, et al. Rapid early HDV RNA decline in the peripheral blood but prolonged intrahepatic hepatitis delta antigen persistence after liver transplantation. *J Hepatol*. 2012 Jan;56(1):115–22.
52. Niro GA, Rosina F, Rizzetto M. Treatment of hepatitis D. *J Viral Hepat*. 2005 Jan;12(1):2–9.
53. Samuel D, Zignego AL, Reynes M, Feray C, Arulnaden JL, David MF, et al. Long-term clinical and virological outcome after liver transplantation for cirrhosis caused by chronic delta hepatitis. *Hepatology*. 1995 Feb;21(2):333–9.
54. Hepatitis B and Delta Virus: Advances on Studies about Interactions between the Two Viruses and the Infected Hepatocyte. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2016 Apr 21]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26623269>

55. Thomas E, Yoneda M, Schiff ER. Viral hepatitis: past and future of HBV and HDV. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Feb;5(2):a021345.
56. Rizzetto M, Ponzetto A, Forzani I. Hepatitis delta virus as a global health problem. *Vaccine.* 1990 Mar;8 Suppl:S10–4; discussion S21–3.
57. Yurdaydin C, Idilman R. Therapy of Delta Hepatitis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Oct 1;5(10):a021543.
58. Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, et al. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis.* 2015 Oct;15(10):1167–74.
59. Durantel D, Zoulim F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J Hepatol.* 2016 avril;64(1, Supplement):S117–31.
60. Li W, Urban S. Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications. *J Hepatol.* 2016 Apr;64(1 Suppl):S32–40.
61. Abbas Z, Abbas M. Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic options. *World J Gastroenterol.* 2015 Aug 28;21(32):9461–5.
62. Blanchet M, Sureau C, Labonté P. Use of FDA approved therapeutics with hNTCP metabolic inhibitory properties to impair the HDV lifecycle. *Antiviral Res.* 2014 Jun;106:111–5.
63. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor [Internet]. [cited 2016 Apr 23]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827813008246>
64. Noordeen F, Vaillant A, Jilbert AR. Nucleic acid polymers inhibit duck hepatitis B virus infection in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Nov;57(11):5291–8.
65. Durantel D, Zoulim F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J Hepatol.* 2016 avril;64(1, Supplement):S117–31.
66. Blaising J, Lévy PL, Gondeau C, Phelip C, Varbanov M, Teissier E, et al. Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cell Microbiol.* 2013 Nov;15(11):1866–82.
67. Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, et al. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology Baltim Md.* 2010 Jun;51(6):1912–21.
68. Qi FH, Wang ZX, Cai PP, Zhao L, Gao JJ, Kokudo N, et al. Traditional Chinese medicine and related active compounds: a review of their role on hepatitis B virus infection. *Drug Discov Ther.* 2013 Dec;7(6):212–24.

69. Shi Q, Jiang J, Luo G. Syndecan-1 Serves as the Major Receptor for Attachment of Hepatitis C Virus to the Surfaces of Hepatocytes. *J Virol*. 2013 Jun;87(12):6866–75.
70. Yan H, Peng B, Liu Y, Xu G, He W, Ren B, et al. Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol*. 2014 Mar;88(6):3273–84.
71. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1125–31.
72. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112–6.
73. Sureau C. The use of hepatocytes to investigate HDV infection: the HDV/HepaRG model. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2010;640:463–73.
74. Scholtes C, Icard V, Amiri M, Chevallier-Queyron P, Trabaud M-A, Ramière C, et al. Standardized One-Step Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Universal Detection and Quantification of Hepatitis Delta Virus from Clinical Samples in the Presence of a Heterologous Internal-Control RNA. *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):2126–8.
75. Wagoner J, Morishima C, Graf TN, Oberlies NH, Teissier E, Pécheur E-I, et al. Differential In Vitro Effects of Intravenous versus Oral Formulations of Silibinin on the HCV Life Cycle and Inflammation. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 Jan 28 [cited 2015 May 31];6(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3030583/>
76. Han Z, Nogusa S, Nicolas E, Balachandran S, Taylor J. Interferon Impedes an Early Step of Hepatitis Delta Virus Infection. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 Jul 19 [cited 2015 May 31];6(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3139649/>

« L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs »

**BENSALAH Nesma**

**Evaluation de l'effet de la silibinine/Legalon®SIL en présence ou en absence d'interféron sur l'infection par le virus de l'hépatite delta et sur les éléments du microenvironnement hépatocytaire**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2016, 66 p.

**RESUME**

L'hépatite delta (hépatite D) est une atteinte hépatique due au virus de l'hépatite delta (VHD), satellite du virus de l'hépatite B (VHB). Elle ne survient que chez les individus porteurs du VHB et provoque une forme plus sévère que celle observée lors de la mono-infection B. Les traitements actuels sont basés sur l'utilisation de l'interféron en présence ou en absence des traitements contre l'hépatite B. Cependant, leur efficacité n'est pas satisfaisante et rend nécessaire le développement d'alternatives thérapeutiques.

La silibinine, extraite du lait de Chardon-Marie a montré son efficacité contre le virus de l'hépatite C (VHC) en interférant avec les étapes précoces du cycle viral. Nous avons testé sa forme hydrosoluble et non hydrosoluble sur l'infection par le VHD en absence ou en présence d'interféron et avons tenté de comprendre son mécanisme d'action antiviral en étudiant son effet sur le récepteur du VHD, le sodium-taurocholate co-transporter polypeptide (NTCP) et une molécule connue comme étant un facteur d'attachement pour le VHC, l'héparane sulfate proteoglycan (HSPG) syndecan-1.

Les résultats préliminaires obtenus ont montré un effet dose-dépendant de la silibinine sur l'entrée du VHD dans l'hépatocyte, effet augmenté par l'interféron. L'étude du mécanisme d'action de la silibinine tend à indiquer une sous-régulation de l'expression d'NTCP. Quant au syndecan-1, les résultats semblent indiquer qu'il pourrait être un facteur d'attachement et/ou d'entrée du virus dans l'hépatocyte et son expression serait également sous-régulée par la silibinine.

A partir de là, nous posons l'hypothèse que la silibinine bloquerait l'entrée du virus en sous-régulant l'expression de molécules de surface réceptrice des virions, le syndecan-1 et NTCP. Ceci ouvre sur un projet novateur proposant des pans de recherche totalement inexplorés.

**MOTS CLES**

Hépatite delta - Virus de l'hépatite delta - Silibinine - Sodium-taurocholate co-transporter polypeptide (NTCP) - Syndecan-1

**JURY**

Mme MORFIN-SHERPA Florence, Professeur  
Mme PECHEUR Eve-Isabelle, Docteur en pharmacie  
Mme BOUREL-BONNET Line, Professeur  
Mme TRABAUD Mary-Anne, Docteur en pharmacie

**DATE DE SOUTENANCE**

Mercredi 1<sup>er</sup> juin 2016

**ADRESSE**

15, Rue Romain Rolland. 69500 Bron