UNIVERSITÉ DE RENNES 1

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Microbiologie, virologie, parasitologie

Par

Charlotte PRONIER

Formes circulantes du virus de l'hépatite B et nouveaux marqueurs viraux

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 23 novembre 2020

Unité de recherche : Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET UMR 1085)

Rapporteurs avant soutenance :

Diane Descamps	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Paris
Camille Sureau	Directeur de Recherches CNRS, INSERM, Université Paris

Composition du Jury :

Président :	Dominique Guyader	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Rennes 1
Examinateurs :	Alexandra Ducancelle	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université d'Angers
	Catherine Gaudy	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Tours
Rapporteurs :	Diane Descamps	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Paris
	Camille Sureau	Directeur de Recherches CNRS, INSERM, Université Paris
Dir. de thèse :	Vincent Thibault	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Rennes 1

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury

A Madame le Professeur Diane Descamps

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. C'est avec beaucoup d'intérêt que je prendrai connaissance de vos commentaires et critiques.

A Monsieur le Docteur Camille Sureau

C'est un honneur que vous ayez accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. Vos connaissances dans le domaine font toute mon admiration. Vos remarques me fourniront assurément des éléments pour améliorer ma réflexion.

A Madame le Professeur Alexandra Ducancelle

Je suis très honorée de vous compter parmi les membres de mon jury et vous suis reconnaissante de l'intérêt porté à ce travail.

A Madame le Professeur Catherine Gaudy-Graffin

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury et vous en suis reconnaissante.

A Monsieur le Professeur Dominique Guyader, président de ce jury de thèse.

Votre expertise en hépatologie force toute mon admiration. J'ai beaucoup appris à vos côtés et espère que cela durera encore longtemps.

A Monsieur le Professeur Vincent Thibault, directeur de thèse.

Merci de m'avoir confié ce sujet passionnant. Merci également pour la confiance que tu m'accordes, ta disponibilité tout au long de ce travail.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail

Merci à **Philippe Gripon**. C'est un honneur pour moi de travailler à tes côtés. Merci pour ta rigueur, ta disponibilité, ton grain de folie et tous nos échanges.

Merci à **Valentine Genet** et à **Jérémy Bomo** (la force tranquille) pour votre aide si précieuse toutes ces années et pour votre dévouement.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans de précieuses collaborations, avec l'INTS, l'ANRS. Un grand merci à **Syria Laperche, Daniel Candotti et Laure Boizeau**. Merci également à toutes les personnes en charge de la cohorte CirVir. Merci à **Laura Vernoux** pour nos échanges. J'espère que nous aurons l'occasion de poursuivre nos collaborations.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, le Docteur **David Durantel** et le Professeur **Philippe Roingeard**. Votre expertise et vos conseils m'ont beaucoup aidé pour ce travail.

Ce travail est le fruit d'un travail d'équipe.
Je remercie l'ensemble des **membres de l'équipe 2**, anciens et actuels et les membres de l'IRSET d'une manière générale. Merci pour les moments conviviaux partagés ensemble.
Merci à **Michel Samson**, directeur de l'IRSET et responsable de l'équipe 2. Ton management de l'équipe fait toute mon admiration.

J'ai une pensée pour **les doctorants** passés et présents de l'équipe: Elise, Aveline, Sorya, Christèle, Mélanie, Arnaud, Farooq, Hélène, Brice, Ghania…

A **Pauline Bargain** et **Juliette Besombes** qui ont réalisé leur M2 recherche avec nous. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à **Brigitte Bardot** (la nôtre !), secrétaire regrettée tout juste retraitée. Ton engagement pour les autres est ton quotidien. Je suis très admirative.

Je remercie chaleureusement **toute l'équipe du laboratoire de virologie du CHU de Rennes**. Dix ans que je suis arrivée à Rennes et presque autant de temps que j'ai fait mes premiers pas au laboratoire. C'est un plaisir de travailler à vos côtés. Nous formons une belle équipe.
Merci à mes collègues et amies biologistes (dites les « **viro girls** ») qui m'ont laissées du temps pour finaliser cette thèse. Merci pour la complicité que l'on a tissée au fil des années…

Aux internes du service qui sont la relève de demain. Profitez de chaque instant.
J'ai une pensée également pour des personnes hautes en couleurs qui ont quittée l'équipe mais qui ont marqué le service et qui m'ont initié à la virologie : Sophie Cha, Ronald Colimon et Marie Laure Retailleau.

A tous mes collègues virologues et biologistes du public ou du privé qui affrontent la tempête COVID.

A mes collègues des services cliniques avec qui j'ai plaisir à collaborer.

A mes proches

A mes amis de Rennes, Lille, Angers, Rouen, pour tous les moments de détente. Sorya, Clarisse, Émilie, MP, Carine, … impossible de tous vous citer. Merci pour votre soutien.

A toi **Astrid**, fraichement nommée MCU-PH. De Lille à Rennes, tu es toujours là.

A ma famille

A mon grand-père, Bernard et à mes grands-parents partis trop tôt.

A mon frère **Louis et à Camille**, jeunes mariés de l'année. Je vous souhaite tous mes vœux de bonheur. A ton tour, Louis, d'écrire ton mémoire !

Je remercie **mes parents** qui me soutiennent dans tous mes projets. Je vous remercie pour les valeurs que vous m'avez transmises. Cette thèse c'est un peu comme un marathon (!) Malgré la distance, vous êtes dans mon cœur. Je vous dédie ce travail.

TABLE DES MATIERES

Table des illustrations ***7***

Table des tableaux ***8***

Liste des abréviations ***9***

Introduction ***11***

Revue bibliographique ***12***

1. Biologie du Virus de l'hépatite B ***12***

1.1. Historique **12**

1.2. Classification et structure **12**

1.2.1. Hepadnaviridae 12

1.2.2. Organisation du génome et protéines 14

1.2.3. Génotypes du VHB 23

1.3. Cycle viral et modèles d'études **25**

1.3.1. Cycle de multiplication virale 25

1.3.2. Modèles d'étude 29

1.4. Les différentes particules virales **32**

1.4.1. Les particules virales complètes 32

1.4.2. Les particules sous-virales 34

1.4.3. Les particules défectives (dVHB) 36

1.4.4. Les particules nouvellement décrites 36

2. Infection chronique par le VHB ***44***

2.1. Épidémiologie **44**

2.2. Physiopathologie et clinique de l'infection chronique **45**

2.2.1. Histoire naturelle 45

2.2.2. Conséquences de l'hépatite B chronique 48

2.2.3. Les formes particulières 49

2.3. Traitement de l'infection chronique **51**

2.3.1. Objectifs du traitement et définitions de la guérison 51

2.3.2. Traitements actuels 52

2.3.3. Perspectives thérapeutiques 55

2.4. Prévention de la transmission **67**

2.4.1. Vaccination 67

2.4.2. Prophylaxies antivirale et post-exposition 67

3. Diagnostic et suivi virologique de l'infection 69

3.1. Marqueurs actuels 69

3.1.1. AgHBs/AcHBs 69

3.1.2. AgHBe/AcHBe 70

3.1.3. AcHBc (IgM et Anticorps totaux) 71

3.1.4. ADN-VHB 72

3.1.5. Marqueurs actuels et thérapeutiques en développement 72

3.1.6. Limites des marqueurs actuels 73

3.2. Nouveaux biomarqueurs 75

3.2.1. Quantification standardisée de l'ADNccc 75

3.2.2. Nouveaux tests AgHBs (ultrasensible, isoformes) 76

3.2.3. Hepatitis B core related Antigen (HBcrAg) 77

3.2.4. Détection/Quantification des ARN du VHB circulants 79

3.2.5. Anticorps anti-HBc quantitatif (IgG) 81

3.2.6. Place des nouveaux marqueurs 81

4. Vers une élimination de l'hépatite B comme menace de santé publique? 93

4.1. Les enjeux 94

4.1.1. Vacciner 94

4.1.2. Dépister, avoir accès aux tests et aux traitements 94

Objectifs des travaux de recherche 97

Travaux de thèse 99

Axe I. Caractérisation des formes circulantes du virus de l'hépatite B selon le statut de l'AgHBe et le génotype à l'aide de gradients de vélocité. 99

Abstract 102

Introduction 104

Materials and Methods 106

Results 108

Discussion 118

Bibliography 122

Axe II. Contribution d'un test AgHBs ultrasensible pour dépister et suivre l'infection par le VHB 126

Axe III. Cir-B2 : Etude de nouveaux marqueurs virologiques chez les patients atteints de cirrhose virale B 133

Abstract 134
Introduction 135
Materials and Methods 136
Results 138
Discussion 149
Bibliography 151

Discussion générale ***153***

1. Formes virales du VHB circulantes chez les patients **153**

2. Nouveaux marqueurs virologiques du VHB **171**

Conclusion ***178***

Bibliographie ***179***

Annnexes ***199***

Annexe 1 : Effet du traitement à la DNase ou à la RNase sur la quantification de l'ADN et de l'ARN-VHB **199**

Annexe 2 : Séparation des formes virales en gradients de vélocité à partir de surnageant de culture d'HepG2.2.15 ..... **201**

Annexe 3 : Article sur l'utilisation combinée des DBS et d'un système moléculaire à rendu rapide de détection de l'ADN-VHB **203**

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Arbre phylogénétique des Hepadnaviridae. 13
Figure 2 : Organisation du génome et des ARNm du VHB 15
Figure 3 : Représentation schématique des domaines de la polymérase du VHB et des sous-domaines de la protéine terminale. 17
Figure 4 : Représentation schématique des protéines core et précore. 20
Figure 5: Protéines d'enveloppe du VHB. 21
Figure 6: Structure du virus de l'hépatite B 33
Figure 7 : Modèle proposé pour la sécrétion des virions vides ou des virions complets impliquant deux signaux distincts. 38
Figure 8 : Espèces d'ARN dérivées de l'épissage alternatif de l'ARN. 41
Figure 9 : Histoire naturelle de l'infection par le VHB. 46
Figure 10: Interaction entre NTCP et le VHB et effet du Myrcludex B 57
Figure 11 : Cycle viral et antiviraux à action directe actuels ou en développement. 61
Figure 12 : Position des anticorps de capture et de détection utilisés dans le test HBcrAg. 78
Figure 13 : Stratégies de détection/quantification des ARN du VHB circulant. 80
Figure 14 : Structure chimique, formule et poids moléculaire du sucrose et du Nycodenz... 156
Figure 15 : Différentes formes circulantes du VHB identifiées dans les plasmas testés selon le statut de l'AgHBe. 161
Figure 16 : Formes compatibles avec un excès de capsides sans génome et sans HBs d'après nos expériences. 164
Figure 17 : Apport des tests ultrasensibles de l'AgHBs. 172

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques et distribution géographique des génotypes du VHB. 24
Tableau 2 : Modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* du VHB. 31
Tableau 3 : Nouvelles formes du VHB circulantes décrites chez les patients. 43
Tableau 4 : Liste des antiviraux à action directe en développement. 56
Tableau 5 : Liste des antiviraux à action indirecte en développement. 63
Tableau 6 : Évolution attendue des marqueurs classiques et nouveaux lors de l'histoire naturelle de la maladie. 83
Tableau 7 : Utilité des nouveaux marqueurs pour la classification des patients. 84
Tableau 8 : Utilité d'HBcrAg dans la prédiction de la survenue à long terme d'un CHC. 86
Tableau 9 : Applications cliniques des nouveaux marqueurs aux traitements actuels. 91
Tableau 10 : Densité des particules du VHB à l'équilibre selon les gradients. 156

LISTE DES ABREVIATIONS

AA *: acides aminés*
AAD : Antiviraux à action directe
ADN *: acide désoxyribonucléique*
ADNc : ADN complémentaire
ADNccc *: ADN circulaire clos de façon covalente*
ADNrc *: ADN relâché circulaire*
ALAT *: alanine aminotransférase*
Alix *: ALG-2 interacting protéin X*
ANRS *: Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales*
ARNpg *: ARN prégénomique*
ASO *: oligonucléotides antisens*
ATU *: autorisation temporaire d'utilisation*
CAC *: capsid-antibody complexe*
CAM *: modulateur allostérique de la capside*
CAR *: cellules T porteuses d'un récepteur chimérique antigénique*
Cas9 *: CRISPR associated protein 9*
CHC *: carcinome hépatocellulaire*
cinqPCR *: cccDNA inversion quantitative PCR*
cr *: core-related*
CRISPR *: Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats*
cryo-ME *: cryo-microscopie électronique*
dVHB *: particules défectives du VHB*
EASL *: European Association for the Study of the Liver*
EGF *: Epidermal Growth Factor*
ELISA *: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
ETV : entécavir
HBcrAg *: Hepatitis B core related Antigen*
HBs *: protéine de surface du VHB*
HBx *: protéine X du VHB*
HHP *: hépatocytes humains primaires*
HSPG *: protéoglycanes à héparane sulfate*
IARC *: International Agency for Research on Cancer*
ICE-HBV *: International Coalition to Eliminate HBV*
ICTV *: International Committee on Taxonomy of Viruses*
ImmTAV *: Immune mobilising monoclonal TCRs Against Virus*
kb *: kilobases*
L-HBs *: grande protéine de surface du VHB*
M-HBs *protéine de surface moyenne du VHB*
M-MLV *: virus de la leucémie murine de Moloney*
MVB *: corps multivésiculaires (ou multivesicular bodies en anglais)*
NAP : Polymères d'acides nucléiques
NLS *:nuclear localisation signal (ou signal de localisation nucléaire)*
NTCP : sodium taurocholate cotransporting polypeptide
NUC *: analogues de nucléos(t)ides de la transcriptase inverse*
OBI *: occult HBV infection (infection B occulte)*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF *: Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)*
PD1 *: programmed death-1*

PegIFNα *: interféron alpha pégylé*
préC/C *: préCore/Core*
RE *: reticulum endoplasmique*
RISC *: RNA-Induced Silencing Complex*
S-HBs *: petite protéine de surface du VHB*
SiMoA : Single Molecule Arrays
SVP *: subviral particles (particules sous-virales)*
TAF *: ténofovir alafénamide*
TALEN *: transcription activator-like effector nucleases*
TCR *: récepteur de cellule T*
TDF *: ténofovir disoproxil fumarate*
TH: *: transplantation hépatique*
TLM *: motif de translocation*
TLR *: toll-like receptors*
TP *: protéine terminale*
VHA *: virus de l'hépatite A*
VHB *: virus de l'hépatite B*
VHC *: virus de l'hépatite C*
VHD : virus de l'hépatite D, /
VIH *: virus de l'immunodéficience humaine*
VP *: particules virales*
VV *: virion vide*
WHV *Woodchuck hepatits virus (virus de l'hépatite de la marmotte)*

INTRODUCTION

L'hépatite B demeure un problème de santé public majeur à l'échelon mondial. Malgré la disponibilité d'un vaccin sûr et efficace, 257 millions de personnes sont chroniquement infectées. Seul 10% d'entre eux connaissent leur statut vis-à-vis du virus. Le virus de l'hépatite B (VHB) est une cause importante de cirrhose et de cancer du foie. Le fardeau de la maladie contribue à plus de 880 000 décès par an à travers le monde. L'Asie et l'Afrique sont les continents plus particulièrement touchés. Les traitements actuels permettent de contrôler la réplication mais ne permettent pas d'éliminer le virus du fait de la persistance de l'ADN circulaire covalent clos (ADNccc) dans le noyau des hépatocytes infectés. La recherche sur le VHB a beaucoup progressé ces dernières années. La description de nouveaux types de particules virales, outre les particules de Dane et les particules sous-virales, est tout à fait singulière. Les facteurs impliqués dans la production et la régulation de ces particules restent inconnus. Avec la découverte du récepteur cellulaire du virus et une meilleure compréhension du cycle de multiplication grâce aux modèles d'étude, de nouveaux traitements prometteurs sont actuellement en développement. Ces traitements ciblent directement le virus ou renforcent la réponse immune. De nouveaux marqueurs viraux sont proposés pour dépister ou suivre les patients infectés naïfs ou traités. L'objectif de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est d'éliminer les hépatites virales comme menace de santé publique à l'horizon 2030.

L'objectif de notre travail était d'étudier les formes virales circulantes du VHB chez les patients et trois nouveaux marqueurs viraux. La première partie de ce document présente une synthèse bibliographique concernant la biologie du virus de l'hépatite B et de l'infection qui en découle avec un accent mis sur les formes virales décrites, les marqueurs et les thérapeutiques actuels et en développement. La deuxième partie présente tout d'abord nos travaux concernant l'étude des formes virales circulantes du VHB par une approche novatrice. Nous exposerons ensuite les deux études évaluant l'apport de nouveaux marqueurs dans différents contextes cliniques. Une discussion générale des résultats obtenus et une conclusion sont proposées à la fin de ce mémoire.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. BIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE B

1.1.Historique

C'est en 1963 que Baruch S. Blumberg fit fortuitement la découverte de l'antigène *Australia* dans le sérum d'un aborigène australien, en employant la technique de l'immunoprécipitation en milieu gélosé pour étudier les lipoprotéines. Cet antigène était uniquement retrouvé dans les sérums de patients transfusés (Blumberg, 1965). Sa présence fut par la suite associée à une atteinte hépatique devant l'élévation des transaminases dans le sang des patients porteurs de cet antigène. Cette découverte lui valut le prix Nobel de médecine en 1976. En 1970, D.S. Dane observa le virus au microscope électronique sous forme de particules virales d'environ 42 nm de diamètre en quantités très importantes dans le sérum de patients porteurs de l'antigène *Australia* (Dane et al., 1970). La découverte du VHB ouvrit la voie à celles des virus des hépatites A (VHA), C (VHC) et D (VHD).

1.2.Classification et structure

1.2.1. Hepadnaviridae

Le virus de l'hépatite B est un membre de la famille des *Hepadnaviridae*. Parmi les caractéristiques notables de cette famille, on note une organisation simplifiée du génome avec un chevauchement important des gènes, un cycle de réplication singulier et un hépatotropisme. Les Hepadnaviridae regroupent des petits virus enveloppés dont le génome à ADN est partiellement double brin (3-3,4 kb). Le cycle de réplication implique une étape tardive de transcription inverse dans le cytoplasme des hépatocytes infectés, au sein de la nucléocapside. Les infections peuvent être transitoires ou persistantes. Il existe cinq genres et dix-huit espèces selon la nouvelle classification de l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Magnius et al., 2020).

Les *Orthohepadnavirus* infectent les mammifères avec une spécificité d'hôte étroite pour les 12 espèces virales connues. Le virus de l'hépatite B, espèce type du genre, infecte l'Homme et les singes. Le virus de l'hépatite de la marmotte (WHV) infecte les marmottes. Les *Avihepadnavirus* infectent les oiseaux. Le séquençage de génomes entiers a conduit à la découverte *in silico* de nouvelles espèces et à la création de trois nouveaux genres chacun représentés par une espèce : *Parahepadnavirus, Metahepadnavirus* et *Herpetohepadnavirus.* Les espèces sont différenciées par au moins 20% de divergence nucléotidique. Les relations phylogéniques entre les espèces sont illustrées dans la figure 1.

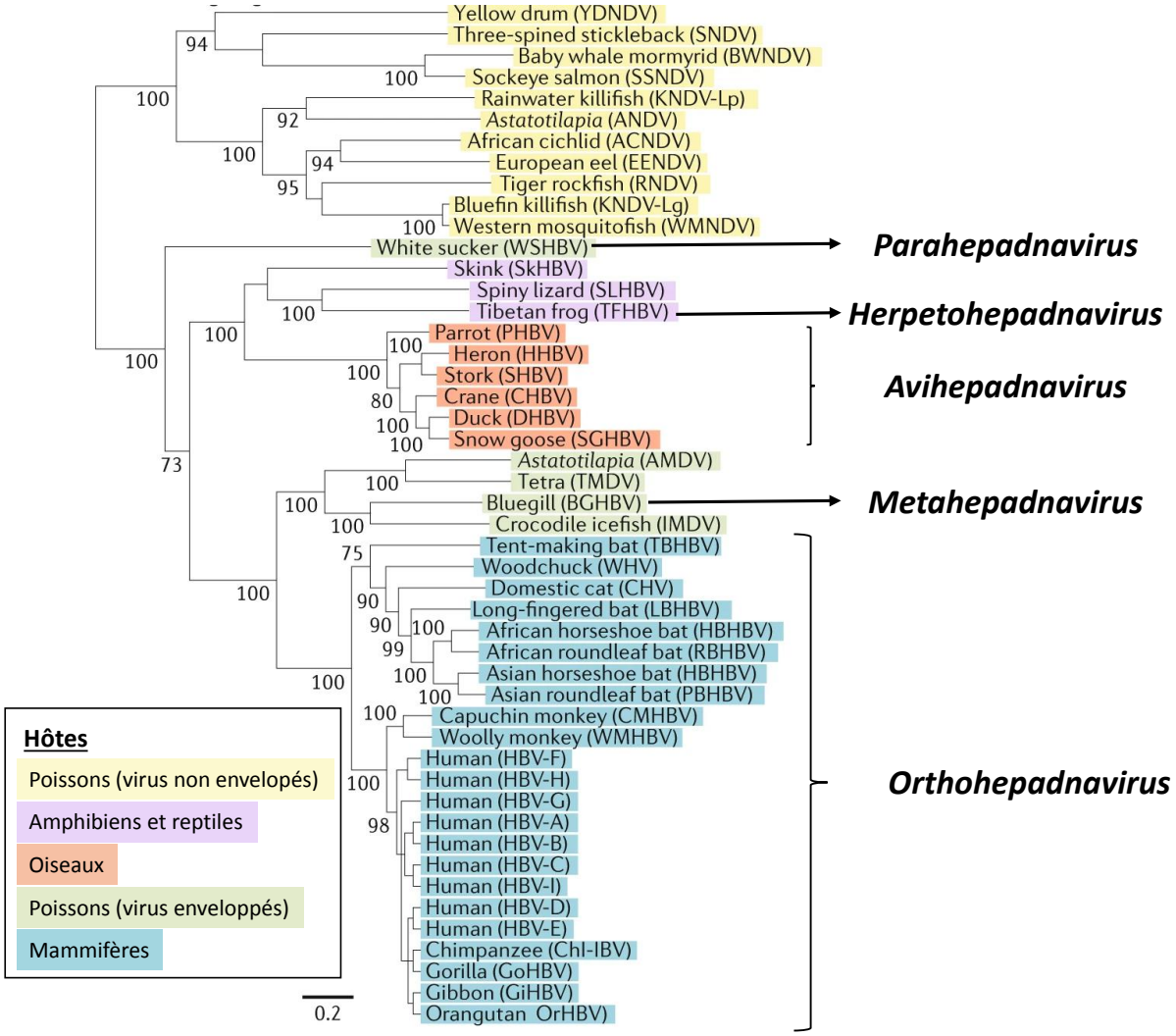


Figure 1: Arbre phylogénétique des Hepadnaviridae.
D'après (Revill et al., 2020) L'arbre a été généré à partir des génomes complets d'hepadnavirus représentatifs de chacun des hôtes connus selon la méthode du maximum de vraisemblance. Tous les génotypes du VHB identifiés chez l'Homme sont représentés.

La présence d'éléments endogènes d'hepadnavirus a été décrite pour la première fois, il y a dix ans par Clément Gilbert et Cédric Feschotte chez l'oiseau puis chez divers Sauropsides et permet de dater une origine du VHB à plus de 200 millions d'années (Gilbert and Feschotte, 2010). Très récemment, Revill et al. proposent un modèle intéressant d'évolution des *Hepadnaviridae* où les *Orthohepadnavirus* sont la résultante de rétroéléments présents chez les insectes, du gain d'une capside chez les poissons, puis de l'acquisition d'une enveloppe et de ce fait du tropisme d'organe chez les oiseaux et les reptiles et de l'apparition du gène X (Revill et al., 2020).

1.2.2. Organisation du génome et protéines

1.2.2.1. Organisation du génome

Le génome du VHB est extrêmement compact et organisé (Figure 2). La molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique) circulaire partiellement bicaténaire a une taille d'environ 3,2 kb (kilobases) qui varie en fonction du génotype. Le site de restriction EcoRI a été défini pour débuter la numérotation nucléotidique du génome. Les deux brins sont de tailles inégales. Le brin de polarité négative est complet et lié de manière covalente à la polymérase virale en 5'. Le brin de polarité positive est plus court (2,4 kb). Les extrémités 5' des deux brins sont complémentaires et assurent la forme circulaire du génome. Ce génome est organisé en quatre cadres ouverts de lectures (ou ORF pour Open Reading Frame) chevauchants dans la même orientation transcriptionnelle qui codent sept principales protéines grâce à différents codons d'initiation de la traduction. Le gène P qui occupe les trois quarts du génome code la polymérase virale P. Le gène préS/S qui chevauche dans une autre phase ouverte de lecture le gène de la polymérase code les trois protéines d'enveloppe (ou protéines de surface du VHB ; HBs). Le gène préC/C (préCore/Core) chevauche en partie la région 5' du gène de la polymérase et code pour la protéine de capside (HBc) et la protéine e du VHB (HBe). Le gène X chevauche la région promotrice du gène de la capside et code la protéine HBx. Le génome est également composé de régions fonctionnelles avec des séquences directement répétées (DR1 et DR2), une région U5-like, proche du signal de polyadénylation polyA, dans le gène préC/C, où débute la transcription, et un élément de réponse aux glucocorticoïdes dont la séquence est située dans le gène S.

La transcription des gènes viraux est régulée par quatre promoteurs :

- un promoteur PréS pour la grande protéine d'enveloppe,
- un deuxième promoteur S pour les petite et moyenne protéines d'enveloppe,
- un promoteur core commun pour la capside et la polymérase virale,
- un promoteur X.

Il existe deux séquences activatrices (*enhancers*), situées en amont du promoteur core, sur lesquelles des protéines virales ou cellulaires se fixent pour activer le promoteur et stimuler la transcription des gènes. La réplication virale est surtout activée par l'*enhancer* I tandis que l'*enhancer* II est plutôt responsable de la spécificité tissulaire.

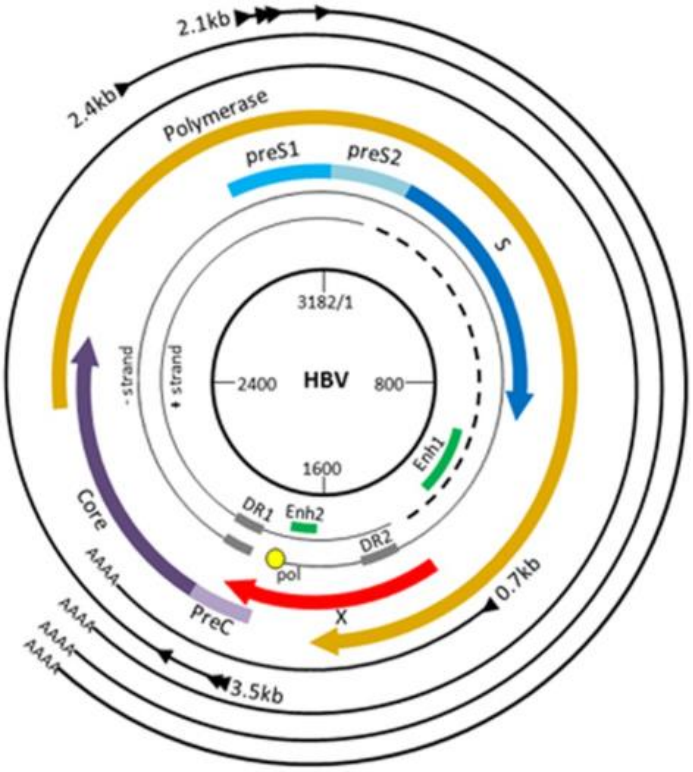


Figure 2 : Organisation du génome et des ARNm du VHB

Les cercles gris internes représentent le brin (-) complet et le brin (+) incomplet (petits tirets) de l'ADN. Le rond jaune à l'extrémité 5' du brin (-) schématise la polymérase. Les régions répétées (DR1 et DR2), les enhancers (Enh1 et 2) sont indiqués. Les différents ORF codant pour les protéines sont représentés par différentes couleurs (en jaune l'ORF codant pour la polymérase, en bleu, l'ORF codant pour les 3 protéines d'enveloppes, en rouge, l'ORF codant pour la protéine X et en violet, l'ORF codant pour la protéine de la capside et l'antigène HBe. Les différents transcrits du VHB sont représentés en noirs. Leurs longueurs respectives sont indiquées. Tous les ARN se terminent au niveau du site unique de polyadénylation (AAAA). Figure de (Minor and Slagle, 2014)

1.2.2.2. Les protéines virales : structure et fonctions

Les sept protéines principales du VHB sont les trois protéines d'enveloppe, la protéine de capside, l'antigène HBe, la protéine HBx et la polymérase virale P.

a. <u>La polymérase (P)</u>

La polymérase du VHB (845 AA) ressemble en séquence et en structure à la polymérase du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). La polymérase virale est une cible thérapeutique de choix et trois molécules utilisées possèdent une activité antivirale contre ces deux virus. Cette protéine est constituée de plusieurs domaines : le domaine terminal de la protéine (TP), une région non codante (spacer), la transcriptase inverse (ADN polymérase ARN dépendante) et une RNase H (Figure 3) (Buhlig et al., 2020). En N terminal, le domaine protéine terminale est essentiel à l'initiation de la transcription inverse et permet la liaison covalente de la polymérase virale au brin négatif. La région spacer assure la flexibilité de la polymérase virale mais n'est pas indispensable à son activité enzymatique. Malgré le chevauchement avec les régions Pré-S1 et Pré-S2, le domaine spacer peut supporter de nombreuses mutations (insertions/délétions) sans que cela soit délétère pour le virus. Le domaine catalytique de transcriptase inverse/ADN polymérase (RT) assure les fonctions de transcription inverse et d'ADN polymérase. Comme la polymérase virale est dépourvue d'activité de relecture, cela crée une variabilité génétique importante qui se traduit par la circulation du virus sous la forme de quasi-espèce virale. Le domaine RT contient un motif YMDD conservé chez les hépadnavirus. Des mutations dans ce domaine peuvent altérer l'activité enzymatique de la polymérase. Les variants peuvent avoir des conséquences sur le traitement antiviral. Le domaine C-terminal ou RNase H est responsable de la dégradation de l'ARN prégénomique lors de la synthèse du brin (-) de l'ADN viral.

La polymérase est responsable de la synthèse de l'ADN, qui est effectuée par le domaine de la transcriptase inverse (RT) catalytique. Alors que la matrice d'ARN est copiée, elle est dégradée par le domaine RNase H. Le domaine TP est composé de sept sous-domaines (trois boucles conservées et quatre régions hélicoïdales). Les trois boucles et l'hélice 5 sont les principaux déterminants. Le domaine TP agit comme une amorce pour les étapes initiales de la synthèse de l'ADN, et l'ADN reste attaché au domaine TP tout au long de la polymérisation. Le domaine spacer permettrait une certaine flexibilité, tandis que le domaine TP est attaché à une extrémité de l'ADN viral naissant et que le domaine RT synthétise l'autre extrémité. Dans le domaine TP, la fonction des sous-domaines hélicoïdaux est susceptible de fournir une structure, tandis que les sous-domaines en boucle sont impliqués dans des activités critiques pour le cycle de réplication virale, comme l'amorçage de la protéine qui commence à partir de la tyrosine en position 63. Des régions codant le domaine TP chevauchent d'autres cadres de lecture ouverts et sont ainsi soumises à une pression de sélection supplémentaire lorsque des mutations se produisent. Le domaine TP, essentiel à plusieurs fonctions de la polymérase à savoir la liaison à la structure ε, l'emballage de l'ARNpg dans la nucléocapside, l'amorçage de la synthèse initiale de l'ADN, et la poursuite de la synthèse des brins positif et négatif de l'ADN, constitue une cible thérapeutique potentielle de choix (Buhlig et al., 2020).

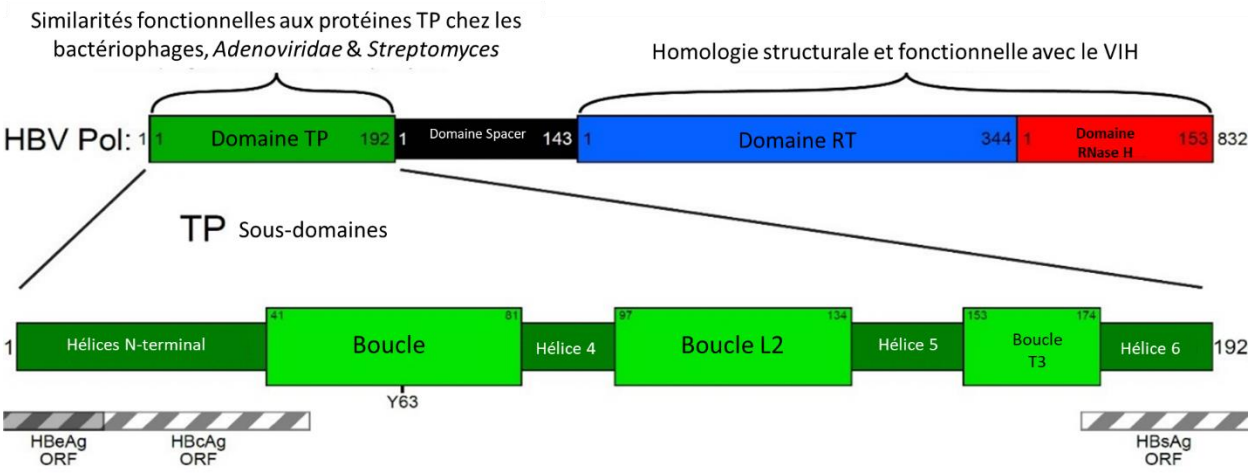


Figure 3 : Représentation schématique des domaines de la polymérase du VHB et des sous-domaines de la protéine terminale.
Les régions du domaine TP qui chevauchent les autres ORF sont indiquées par les rayures. D'après (Buhlig et al., 2020)

b. La capside « core » et les protéines précore

La protéine core (ou HBc) est la protéine majeure de la capside (21 kDa) issue du précurseur précore p25 (212 acides aminés). Ces deux protéines se différentient seulement par les 29 premiers acides aminés en N terminal. En effet, la p25 contient en plus le peptide signal. La protéine core de 183 (ou 185 acides aminés selon le génotype), peut être divisée en 2 régions. En région N terminale, les 149 premiers AA forment le domaine d'assemblage NTD (N terminal domain) riche en hélice alpha. En région C terminale, les 34 derniers résidus forment le domaine C-terminal riche en arginine (CTD). Ce domaine a deux fonctions. Il contient un motif de localisation nucléaire (NLS, nuclear localisation signal) régulé par phosphorylation et des motifs d'exportation nucléaire (NES, nuclear export signal). Son exposition à la surface des nucléocapsides permet leurs transports vers le noyau de la cellule. De plus, ce domaine possède quatre clusters riches en arginine. Le premier joue un rôle crucial dans l'encapsidation de l'ARN prégénomique associé à la polymérase virale (Nassal, 1992). Les trois autres sont susceptibles d'interagir avec l'ADN viral. Les études en microscopie électronique ont montré la localisation de cette extrémité de la protéine dans la lumière des capsides.

Les protéines core se présentent sous quatre structures quaternaires : un dimère soluble avec antigénicité "e" (AgHBe), un dimère qui ressemble à la forme de la capside, des capsides avec un nombre de triangulations T = 3 et T = 4 (Zlotnick et al., 2015). La protéine HBc est toujours isolée sous forme de dimères (Wingfield et al., 1995). Les études de cryo-microscopie électronique ont montré la présence de deux tailles de capsides. Il y a principalement des capsides de 35 nm de diamètre (T=4, 120 dimères) et des capsides de 32 nm de diamètre (T=3, 90 dimères). Ces deux types de capsides sont identifiés dans la cellule infectée mais la capside T=4 est souvent trouvée dans le virus infectieux. A leur surface, les capsides comportent de nombreuses excroissances ainsi que des pores d'un diamètre de 12 et 15Å qui servent pour le transport de nucléotides au moment de la formation de l'ADN viral. *In vitro*, le ratio entre les capsides T=3 et T=4 peut être modulé par la troncation de la protéine HBc, sa concentration, la force ionique et le degré d'oxydation des dimères (Harms et al., 2015; Zlotnick et al., 1996). Les dimères d'HBc sont liés de manière covalente par un pont disulfure entre 2 cystéines 61. Bien que conservé, le pont disulfure entre cystéines en position 61 n'est pas requis pour l'assemblage de la capside. Les dimères d'HBc liés par ce pont disulfure s'assemblent mais moins rapidement que la forme réduite en capsides (Selzer et

al., 2014). Morphologiquement identique, la forme oxydée est moins stable et ne favorise pas les interactions entre dimères d'HBc.

Le pont disulfure C61-C61 aurait une fonction de régulation du désassemblage de la capside et de la libération du génome viral. La protéine core est une protéine multifonction. Elle intervient dans la formation de la nucléocapside, l'encapsidation de l'ARNpg, la formation du virion et la sécrétion du virus. Elle participe à réguler et stabiliser l'ADNccc. Elle est impliquée dans la répression des gènes de l'immunité innée et dans la régulation de la protéine HBx.

La protéine non structurale p22 (193 AA) est quant à elle issue du clivage des 19 acides aminés du peptide signal et se retrouve ainsi libérée au niveau cytosolique. La fonction de cette protéine reste mal connue. Un nouveau rôle de cette protéine a récemment été proposé. Elle pourrait activer la voie de signalisation Wnt/β-caténine, qui dérégulée participe au processus de carcinogenèse (Tran et al., 2020).

La p22, par troncation du domaine riche en arginine en C terminal, est transformée en protéine HBe (159 AA ; 17 kDa), sécrétée au niveau extracellulaire. Cette maturation implique une furine (Messageot et al., 2003). La protéine HBe comprenant donc une séquence d'AA commune à la protéine HBc est sécrétée très précocement lors de la multiplication virale. Son rôle reste mal connu car elle n'est pas nécessaire ni pour l'infection ni pour le cycle de multiplication. Il est néanmoins admis que cette protéine joue un rôle d'immunomodulation dans la phase d'infection chronique. La conservation de cette protéine et de son précurseur au sein des hepadnavirus plaide pour un rôle important dans le cycle (Messageot et al., 2003).

Une autre protéine précore de 22 kDa a été décrite par Kimura et al. Appelée p22cr (core-related), sa composition est différente de la protéine p22 (Figure 4) malgré un poids moléculaire de 22 kDa. Elle possède à l'exception de la première méthionine en N-terminal, le peptide signal mais ne contient pas le domaine C-terminal riche en arginine.

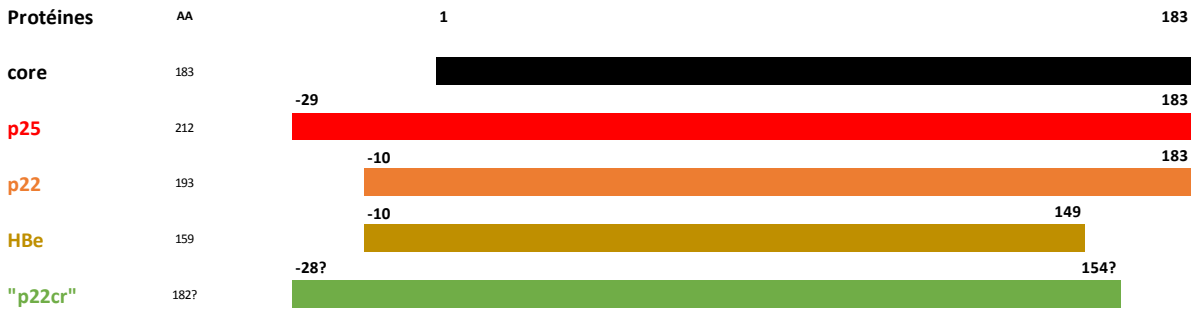


Figure 4 : Représentation schématique des protéines core et précore.
La protéine précore (p25) est codée par la totalité de l'ORF C qui possède 2 sites d'initiation de la traduction. La protéine de capside fait 183 AA. Par convention, le chiffre 1 est assigné au premier aminoacide de la protéine de capside. Le premier AA de la protéine précore est situé en position -29. La p22 résulte du clivage des 19 AA du peptide signal et commence donc à la position -10. La protéine HBe dérive de la p22 ôtée de 34 AA et se termine en position 149. La p22cr est une nouvelle protéine précore décrite par Kimura et al. Elle possède le peptide signal mais pas la première méthionine en N terminal et a un poids moléculaire de 22 kDa.

c. Les protéines d'enveloppe (HBs)

Il existe 3 protéines de surface du VHB, la petite (S-HBs), la moyenne (M-HBs) et la grande (L-HBs). Ces 3 protéines d'enveloppe diffèrent par la longueur de l'extrémité N-terminale (Figure 5). Elles sont traduites à partir de 3 codons d'initiation de la traduction différents et partagent le domaine S en C-terminal (226 AA). La protéine moyenne M-HBs contient en plus le domaine préS2 en N-terminal (55 AA). La grande protéine L-HBs comprend la partie préS1 en plus de la partie préS2. Les protéines d'enveloppe sont synthétisées et ancrées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) rugueux où elles acquièrent une conformation fonctionnelle et subissent des modifications post-traductionnelles. Les trois protéines peuvent ainsi être N-glycosylées au niveau de l'Asn-146 située dans le domaine S. Une seconde N-glycosylation au niveau de l'Asn-4 du domaine préS2 intervient sur la protéine M mais pas sur la protéine L.

La protéine S contient une boucle luminale AGL exposée en surface des particules et porte notamment les épitopes antigéniques impliqués dans la réponse immune anti-HBV. Elle se présente sous deux formes, non glycosylée de 24 kDa et mono-glycosylée de 27 kDa en proportion équivalente.

La protéine M est retrouvée sous forme bi-glycosylée (36 kDa) ou mono-glycosylée (33 kDa). Une séquence peptidique, capable de traverser les membranes cellulaires, appelée motif de translocation (TLM), a été identifié dans le domaine préS2 des protéines d'enveloppe des Hepadnaviridae ce qui suggère un rôle de ce peptide dans le cycle viral (Oess and Hildt, 2000). Pour le VHB, le TLM, hélice α amphiphile, est localisé entre les acides aminés 41 et 52 du domaine préS2 mais n'est pas nécessaire à l'infection du VHB ou du VHD (Blanchet and Sureau, 2007; Lepère et al., 2007).

La grande protéine L de 389 AA est soit non glycosylée (39 kDa) ou mono-glycosylée (42 kDa). La protéine L possède un site de myristylation à l'extrémité N terminale. La protéine L présente 2 topologies, l'une où le domaine préS N-terminal est retenu dans le cytosol, l'autre où le domaine préS est transloqué dans la lumière du RE. Cette double topologie de la grande protéine dépend d'une séquence C-terminale du domaine préS1, de 28 aa (résidus 70 à 94), nommée « déterminant cytosolique d'ancrage » (CAD). Chacune de ces 2 conformations de L-HBs joue un rôle propre dans le cycle soit le recrutement de la nucléocapside, soit la reconnaissance du récepteur. La répartition quantitative de ces 3 protéines d'enveloppe diffère selon le type de particules virales (Heermann et al., 1984).

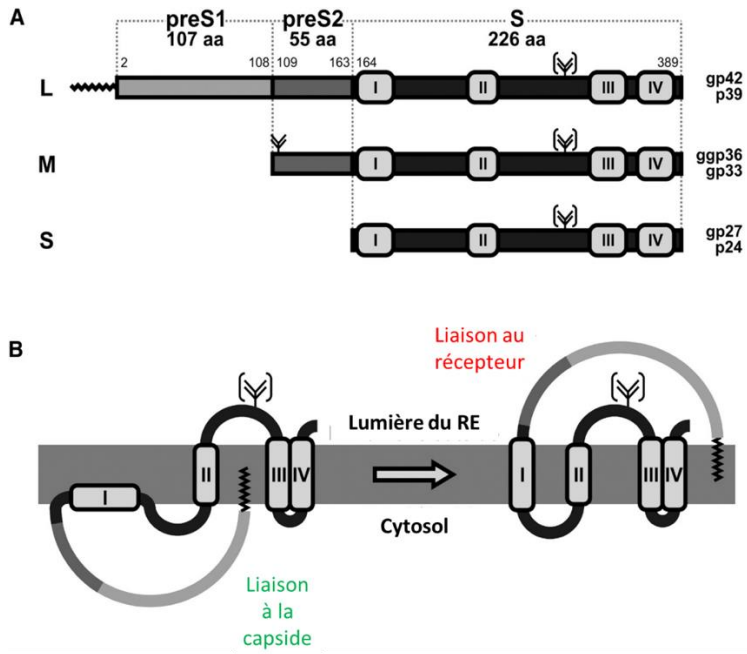


Figure 5: Protéines d'enveloppe du VHB.
A Structure des protéines d'enveloppe du VHB (L, M, S). Les parties transmembranaires sont indiquées par les chiffres romains. Le symbole entre crochets indique le site de glycosylation partiellement utilisé. Le poids moléculaire de chaque protéine est indiqué à droite ainsi que les variants de glycosylation. Le zigzag représente la N-myristylation. B modèle proposé avec une double topologie de L-HBs (liaison à la capside à gauche, liaison au récepteur à droite). D'après (Seitz et al., 2016)

d. La protéine HBx

La protéine X du VHB (HBx) est une petite protéine non structurale de 154 AA (17 kDa) codée par le transcrit de 0,7 kb. Nouveauté évolutive apparue chez les *Orthohepadnavirus*, il s'agit de la protéine la plus conservée entre les génotypes viraux. La protéine régulatrice HBx possède de multiples fonctions d'interaction avec les protéines et exerce un rôle dans la pathogénèse. Rapidement exprimée après l'infection, HBx est principalement localisée dans le noyau des hépatocytes infectés, HBx est constituée de deux domaines. Cette protéine est nécessaire à l'établissement de l'infection comme démontré lors d'une infection par le WHV chez la marmotte (Zoulim et al., 1994).

La protéine X est dite trans-activatrice de la transcription de plusieurs gènes cellulaires et viraux. Elle va favoriser la réplication. HBx joue un rôle essentiel dans le maintien de l'ADNccc dans un état transcriptionnellement actif (Lucifora et al., 2011). C'est également une oncoprotéine virale. La présence de HBx limitée aux mammifères coïncide avec le fait que l'infection chronique par le VHB est associée au développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) uniquement chez les mammifères tandis que les *Avihepadnavirus* ne semblent pas entrainer de CHC chez leurs hôtes. L'absence d'une protéine X dans le modèle du canard ne permet pas l'étude de cette protéine *via* ce modèle.

1.2.3. Génotypes du VHB

Les génotypes du VHB sont définis par une divergence des séquences au niveau nucléotidique supérieure à 7,5% (Kramvis et al., 2008). Les génotypes sont ensuite classés en sous-génotypes, sur la base d'une divergence de 4 à 7,5% (Kramvis, 2014). Il existe ainsi neuf génotypes du VHB, nommés de A à I et plus de 35 sous génotypes, à l'exception des génotypes E et G. Ces différents génotypes ont une distribution géographique particulière (Tableau 1). Chaque génotype a des caractéristiques propres (Kramvis, 2014). Les génotypes D et E présentent respectivement une délétion de 33 et 3 nucléotides au niveau de la région préS1. Tandis que le génotype G présente une insertion de 36 nucléotides en amont du gène codant la capside et deux mutations précore empêchant théoriquement toute production d'AgHBe. Ce génotype est souvent retrouvé associé à d'autres génotypes du VHB et chez des personnes vivant avec le VIH. Le génotype H est proche du génotype F. Avant la classification en génotypes, les virus étaient classés en sérotypes (adr, adw, ayr, ayw). Certaines associations entre sérotypes et génotypes sont retrouvées.

Génotype (Mode de transmission prédominant)	Taille du génome	Sous-génotypes	Sérotype	Distribution géographique	Principales caractéristiques cliniques
A (Horizontal)	3221	A1	adw2/ayw2	Afrique, Asie du sud	Progression vers le CHC chez le jeune africain
		A2	adw2	Europe, Amérique du Nord	Meilleure réponse à l'IFN
		Quasi A3	ayw1	Afrique, Haïti	
		A4	ayw1, (adw4)		
B (périnatal)	3215	B1	adw2	Japon	
		B2	adw2	Asie de l'est	
		Quasi B3	adw2	Indonésie, Philippines, Chine	
		B4	ayw1/adw2	Vietnam, Cambodge	
		B5	adw2, (adr)	Alaska (Esquimaux)	
C (périnatal)	3215	C1	adr	Asie du sud-est	Risque accru de CHC
		C2	adr	Asie de l'est	
		C3	adr	Iles du Pacifique	
		C4	ayw2/ayw3	Australie (indigènes)	
		C5	adw2	Philippines	
		C6-C16	adr, (ayr)	Indonésie	
D (Horizontal)	3182	D1	ayw2	Moyen Orient, Asie Centrale	
		D2	ayw3	Europe, Liban	
		D3	ayw2/ayw3	Mondiale	
		D4	ayw2	Iles du Pacifique, Arctique	
		D5	ayw2/ayw3	Inde	
		D6	ayw2, (ayw4, adw3)	Afrique	
E (périnatal)	3212	-	ayw4	Afrique de l'ouest et centrale	
F (Horizontal)	3215	F1-F4	adw4, adw2/ayw4	Amérique centrale et du sud, Alaska indigènes)	F1 : progression rapide de la maladie hépatique et du CHC chez l'enfant
G (Horizontal : sexuel, principalement les HSH)	3248	-	adw2	France, États-Unis	
H	3215	-	adw4	Amérique centrale	Rarement associé au CHC
I (périnatal)	3215	I1-I2	adw2, ayw2		Recombinant entre un génotype C et un génotype inconnu
« J »	3182	-	ayw3		Une souche unique isolée d'un Japonais atteint de CHC

Tableau 1: Caractéristiques et distribution géographique des génotypes du VHB.

1.3.Cycle viral et modèles d'études

1.3.1. Cycle de multiplication virale

a. Entrée virale, libération des nucléocapsides et transport nucléaire

Le cycle viral débute par l'attachement du virion à la surface de sa cellule cible, l'hépatocyte. Les protéoglycanes héparanes sulfates (HSPG) sont des glycoprotéines présentes à la surface de nombreuses cellules et dans la matrice extracellulaire (Sarrazin et al., 2011). Les HSPG sont impliqués dans l'attachement de plusieurs virus, tels les herpes simplex virus, le virus de la dengue, ou les papillomavirus humains, à leurs cellules cibles. Concernant le VHB, l'entrée du virus nécessite au préalable une liaison de faible affinité aux HSPG en particulier glypican 5 au niveau de la membrane cellulaire de l'hépatocyte suivie d'une liaison de haute affinité avec le récepteur du virus. Glypican 5, récemment identifié par criblage siARN comme facteur d'entrée préférentiel est fortement exprimé au niveau hépatique et pourrait en partie expliquer l'hépatotropisme privilégié du virus (Verrier et al., 2016). La capacité de liaison aux HSPG, en particulier au niveau hépatique dépendrait de la conformation du virion comme suggéré récemment (Seitz et al., 2016). La liaison aux HSPG se fait par des interactions électrostatiques entre les HSPG chargées négativement et deux résidus chargés positivement (Arg122 et Lys141) dans la région de la boucle antigénique du domaine S présent dans toutes les protéines d'enveloppe du VHB. La liaison à un récepteur de faible affinité, tel HSPG, stabilise et concentre le virus à la surface cellulaire et favorise ainsi la liaison de haute affinité au récepteur, le sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) (Yan et al., 2012). L'interaction du domaine préS1 de la grande protéine de surface avec NTCP permet l'entrée virale. La région située entre les acides aminés 2 et 47 dans le préS1 est indispensable à la liaison aux hépatocytes.

Le NTCP est clairement nécessaire mais pas suffisant pour une infection efficace. D'autres facteurs cellulaires de l'hôte semblent importants pour la susceptibilité à l'infection. Une étude récente a identifié le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) comme cofacteur déclenchant l'internalisation du VHB (Iwamoto et al., 2019). La machinerie pour l'endocytose du récepteur de l'EGF coordonne le transport des virus entrants à travers le réseau endosomal (précoce, tardif et lysosome) (Iwamoto et al., 2020). Ce processus implique

la phosphorylation du récepteur à l'EGF et le recrutement d'adaptateurs comme AP2A1 et Eps15.

La localisation du VHB au niveau de l'endosome tardif semble ainsi un prérequis pour une infection productive. Une autre étude a révélé l'importance de la protéine d'adhésion cellulaire calcium dépendante E-cadhérine dans l'entrée virale en influençant la distribution du NTCP. La E-cadhérine se lie au NTCP glycosylé et facilite la relocalisation du NTCP au niveau de la membrane plasmique basolatérale (Hu et al., 2020).

L'internalisation de la particule se fait par endocytose médiée par la clathrine (Herrscher et al., 2020). Deux mécanismes d'échappement du compartiment endosomal sont proposés pour cette étape post entrée : la fusion et la translocation. La fusion entre l'enveloppe virale et une membrane cellulaire est un mécanisme connu pour les virus enveloppés pour libérer la nucléocapside dans le cytoplasme. Les mécanismes responsables de la fusion endosomale n'ont pas encore été clairement identifiés. Le second mécanisme proposé est la translocation à travers la membrane endosomale, processus médié par le peptide TLM, démasqué dans le compartiment endosomal. L'étape de fusion entre l'enveloppe virale et une membrane intracellulaire conduit à la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme. La translocation libère les virions entiers dans le cytosol. Les mécanismes qui conduisent à la libération des nucléocapsides après translocation dans le cytosol ne sont pas connus.

Une fois libérée dans le cytosol, la nucléocapside migre alors vers le noyau *via* les microtubules (Rabe et al., 2006). LL1, une chaine légère de la dynéine est un partenaire des capsides et est impliquée dans le transport actif des capsides vers les complexes des pores nucléaires (Osseman et al., 2018). Les nucléocapsides interagissent alors avec les complexes des pores nucléaires grâce à la présence d'un signal de localisation nucléaire situé dans la région C-terminale de la protéine HBc.

Dans le noyau, l'ADN viral relâché circulaire (ADNrc), partiellement bicaténaire, est réparé et converti sous forme d'un ADN circulaire clos de façon covalente (ADNccc) qui forme un minichromosome et sert de matrice pour la transcription. *In vitro*, la formation de l'ADNccc est détectée dès 12 à 16 heures post infection puis augmente avec le temps pour atteindre un plateau 3 à 5 jours après l'infection (Gripon et al., 1993; Tu et al., 2020). Cela suggère un rôle limité des virions néoformés dans l'enrichissement du pool d'ADNccc.

L'ADN peut également être intégré au génome cellulaire. Ce phénomène d'intégration qui se produit très précocement après l'infection ne participe pas à la réplication du virus mais est impliqué dans le processus de carcinogenèse. L'ADNccc est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire en quatre ARN messagers viraux et en ARN prégénomique (ARNpg).

Tous les transcrits ont la même terminaison :

- ARN de 3,5 kb, plus long que le génome viral a 4 fonctions : ARNm pour la protéine HBc, ARNm pour la protéine HBe, pour la polymérase virale et ARN prégénomique (ARNpg) qui sera rétrotranscrit en ADN,
- ARNm de 2,4 kb pour la grande protéine d'enveloppe,
- ARNm de 2,1 kb pour la petite et la moyenne protéine d'enveloppe,
- ARNm 0,7 kb pour la protéine HBx.

L'interaction de protéines comme la GAPDH avec la séquence PRE (Post transcriptional Regulation Element), qui a une conformation en épingle à cheveux, permet l'export des ARNm viraux du noyau vers le cytoplasme. Ces transcrits sont traduits en protéines dans le cytoplasme.

b. Maturation de la capside, enveloppement et sécrétion

Le processus de maturation de la capside implique l'encapsidation de l'ARNpg nouvellement synthétisé et l'étape de transcription inverse de l'ARNpg pour former un intermédiaire ADN, suivi de la synthèse de l'ADN partiellement double brin. L'encapsidation de l'ARNpg est un processus sélectif qui dépend d'interactions spécifiques entre les protéines et l'ARNpg. Elle fait intervenir une structure en épingle à cheveux présente du coté N-terminal de l'ARNpg, appelée signal d'encapsidation ou epsilon (ε) (Junker-Niepmann et al., 1990). La transcription inverse a ensuite lieu au sein des nucléocapsides néoformées. La transcription inverse va donner naissance à une nouvelle molécule d'ADNrc. Elle nécessite l'activité du domaine CTD d'HBc à plusieurs étapes (Zlotnick et al., 2015). La capside n'est pas un contenant inerte mais a un rôle important pour la transcription inverse.

L'état de maturation de la capside influe sur l'enveloppement des particules. Les capsides immatures contenant l'ARNpg ou de l'ADN simple brin sont retrouvées au sein des cellules tandis que les nucléocapsides matures renfermant l'ADNrc sont observées au niveau des particules sécrétées (Gerelsaikhan et al., 1996). L'état de maturité des capsides est reflété par le statut de phosphorylation de la protéine HBc. L'hypophosphorylation de la protéine de capside favorise l'encapsidation de l'ARNpg et de la polymérase. A l'inverse, une

hyperphosphorylation est néfaste pour cette étape. La phosphorylation des nucléocapsides est nécessaire pour l'encapsidation de l'ARN et la synthèse d'ADN par les capsides immatures.

La déphosphorylation des capsides matures pourrait favoriser l'enveloppement et la sécrétion (Perlman et al., 2005). La phosphorylation de sites dans le domaine CTD de la protéine HBc conduit à réduire l'encapsidation d'ARN non spécifique de manière efficace (Heger-Stevic et al., 2018).

Les nucléocapsides matures ont trois destinés possibles. Soit elles sont sécrétées au niveau extracellulaire comme des capsides non enveloppées, soit elles sont désassemblées pour libérer l'ADNrc qui va rejoindre le noyau et amplifier ainsi le pool d'ADNccc ou être sécrétées sous forme de particules complètes enveloppées. Les protéines d'enveloppe sont essentielles à l'enveloppement de la capside, à l'exception de la protéine M-HBs.

Le bourgeonnement et la libération des particules virales infectieuses dépendent de vésicules intraluminales dans les endosomes tardifs, aussi appelés corps multivésiculaires (MVB ; multivesicular bodies) et du système ESCRT (Jiang and Hildt, 2020). Le bourgeonnement est souvent intimement lié à l'assemblage. La plupart des virus utilisent des motifs peptidiques courts appelés domaines d'assemblage tardifs. La libération des particules virales par la voie ESCRT est médiée par la protéine cellulaire α-taxiline, qui comporte un motif YXXL (Hoffmann et al., 2013). Ainsi, l'α-taxiline, se lie au domaine N-terminal des L-HBs et recrute *via* son domaine tardif la sous-unité TSG101 d'ESCRT-I. Ceci pallie au manque de domaine tardif de la protéine L-HBs, nécessaire pour recruter les composants de la voie ESCRT.

1.3.2. Modèles d'étude

Il existe différents modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* du VHB donc les caractéristiques, les avantages, inconvénients et applications potentielles sont présentés dans le tableau 2.

1.3.2.1. Modèles de culture cellulaire

Les modèles d'infection *in vitro* comprennent les hépatocytes humains primaires (HHP), les cellules HepaRG, les lignées d'hépatomes (HepG2, Huh7) parfois génétiquement modifiés et intégrant le génome du VHB (HepG2.2.15, HepAd38). La lignée HepaRG est issue d'une tumeur hépatique d'une femme infectée par le VHC. Ces cellules possèdent une morphologie et des fonctions similaires aux hépatocytes humains normaux, et sont aussi permissives au VHB (Gripon et al., 2002). Suite à la description du NTCP, récepteur principal du virus les systèmes basés sur des lignées d'hépatomes humains se sont enrichis de lignées exprimant le récepteur NTCP (Allweiss and Dandri, 2016). La principale limite des systèmes reposant sur des lignées d'hépatomes surexprimant NTCP provient du fond génétique anormal de la cellule utilisée. La culture d'HHP reste la référence. La culture en deux dimensions (2D) de ces cellules est limitée par l'approvisionnement, la variabilité interindividuelle des hépatocytes, une dédifférenciation et une dépolarisation des cellules, rendant ces cellules infectables pendant un court laps de temps et nécessitant une dose infectante importante associée le plus souvent à du PEG, voire du DMSO (Gripon et al., 1988). Le recours à des systèmes de culture cellulaire tridimensionnels (3D) d'HHP pourrait constituer une perspective intéressante comme le démontre une étude récente (Ortega-Prieto et al., 2018). Dans ce système reposant sur de la microfluidique et autorisant un maintien à long terme des hépatocytes primaires avec des propriétés physiologiques conservées, les auteurs démontrent la possibilité d'infecter les cellules avec une faible dose de virus et de maintenir cette production virale sur environ 3 semaines. La reproduction d'un cycle viral complet au sein de ces cellules et la genèse de l'ADNccc offrent la possibilité d'étudier finement les différentes étapes de réplication virale et de clarifier au moyen d'un modèle physiologique de nombreux points restés obscurs.

1.3.2.2. Modèles animaux de l'infection VHB

En ce qui concerne les modèles animaux, le modèle du chimpanzé était la référence car c'était le seul animal immunocompétent naturellement susceptible à l'infection par le VHB humain (Maynard et al., 1972). Les chimpanzés développent des formes aiguës et chroniques de l'infection, une hépatite et une réponse immune cellulaire comparables à celles observées chez les patients (Wieland, 2015). Bien que ce modèle soit celui qui mime le mieux l'histoire naturelle de l'infection, son utilisation est dorénavant interdite depuis 2013 pour des raisons éthiques. Un modèle d'infection par le VHB chez les primates non humains comme le macaque rhésus pourrait constituer une alternative intéressante. Le strict tropisme d'espèce est en partie dû à la variabilité de la séquence en acides aminés codant le NTCP. Les séquences sont identiques chez l'homme et le chimpanzé mais diffèrent de celle du macaque. Un modèle développé en 2017 faisant exprimer le NTCP humain aux macaques, les rendant ainsi permissif à l'infection, a récemment été optimisé pour augmenter la réplication virale, la durée de l'infection par le VHB, l'expression de tous les marqueurs utiles au suivi des patients (Burwitz et al., 2017; Wettengel and Burwitz, 2020).

Le tupaya de Belanger (*Tupaia belangeri*), petit mammifère d'Asie ressemblant à un écureuil, est le seul animal non primate permissif à l'infection par le VHB malgré quelques différences d'acides aminés au niveau des régions fonctionnelles du NTCP. L'infection des adultes entraine une infection modérée et transitoire tandis que l'infection de nouveau nés induit une infection chronique, le développement d'une fibrose et de carcinomes hépatocellulaires. Néanmoins, les difficultés expérimentales et la faible efficacité de l'infection *in vivo* n'en font pas un modèle de choix (Allweiss and Dandri, 2016).

Le modèle souris (*Mus musculus*) est un modèle souvent utilisé et bien étudié en recherche avec une reproduction rapide et une immunité bien caractérisée. De nombreux modèles de souris transgéniques ou humanisées, parfois complexes, ont été développés. Les souris avec des foies humanisés sont immunodéprimées pour supporter l'allogreffe. Ainsi les réponses immunes vis-à-vis du VHB ne peuvent pas être étudiées. Des modèles de souris doublement greffées à la fois avec un foie et un système immunitaire humanisés permettent l'étude des réponses immuno-médiées suite à l'infection par le VHB.

Modèle	Caractéristiques	Application(s) pour l'objectif de « guérison » du VHB	Avantage	Inconvénient	Infection	ADNccc
In vitro						
Hépatocytes humains primaires (HHP)	Hépatocytes isolés (frais ou congelés)	Antiviraux, pharmacologie, réponse immune innée	Cible naturelle, cycle complet	Disponibilité, variabilité, dédifférenciation, dépolarisation/perte de fonctions, MOI élevée	Oui	Oui
Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches	Différentiation de cellules souches embryonnaires ou pluripotentes	Antiviraux, réponse immune innée	Source alternative d'hépatocyte, reproductible, cycle complet	Différentiation complexe, non identique aux HHP, MOI élevée	Oui	Oui
dHepaRG	Lignée différenciée bipotente	Antiviraux, réponse immune innée	Source alternative d'hépatocyte, cycle complet	Différentiation complexe, Faible infectivité, MOI élevée,	Oui	Oui
Transfection de lignées cellulaires d'hépatomes	Transfection transitoire de plasmides contenant le génome ou un ADNccc recombinant	Antiviraux, réplication	Disponible, Analyse de l'ADNccc	Cellules transformées, pas d'entrée	Non	Oui
Infection de lignées cellulaires d'hépatomes	lignées cellulaires d'hépatomes exprimant NTCP humain (HepG2, Huh7)	Antiviraux	Disponible, cycle complet	Cellules transformées, MOI élevée	Oui	Oui
In vivo						
Modèle souris basé sur un vecteur AAV	Transduction du génome du VHB par un vecteur AAV	Antiviraux, immunomodulateurs, vaccination	Hôte immunocompétent, production virale persistante	Immunité de la souris, risque de réponse contre le vecteur viral	Non	En cours
Modèle basé sur l'ADNccc recombinant	injection hydrodynamique d'ADNccc recombinant ou plasmide via un vecteur AAV	Antiviraux, immunomodulateurs	Hôte immunocompétent, production virale persistante	Immunité de la souris, injection induit une inflammation hépatique	Non	Oui
Modèle souris basé sur injection hydrodynamique	Injection de grands volumes contenant un plasmide VHB dans la veine caudale	Antiviraux	Hôte immunocompétent, clairance du VHB	Immunité de la souris, injection induit une inflammation hépatique	Non	Non
Souris avec foie humanisé	Apport d'HHC chez des souris immunodéprimées	Antiviraux, immunité innée	Cycle complet	Pas de réponse adaptative, techniquement complexe, besoin d'HHP,	Oui	Oui
Souris avec foie et système immunitaire humanisé	Apport d'HHC et de CSH chez des souris immunodéprimées	Antiviraux, immunité innée et adaptative, immunomodulateurs, vaccination	Cycle complet, réponses innées et adaptatives	Système chimérique, techniquement complexe, faible débit, besoin de CSH et d'HHP,	Oui	Oui
Macaque	Infection après expression du NTCP humain	Antiviraux et immunomodulateurs	Primate non humain, immunocompétent	Modèle préliminaire	Oui	Oui

Tableau 2 : Modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* du VHB.
Adapté de (Allweiss and Strick-Marchand, 2020)

1.4.Les différentes particules virales

1.4.1. Les particules virales complètes

Les particules virales complètes (particules de Dane; virions; VP) sont des particules infectieuses de petite taille (42 nm de diamètre). Elles possèdent une enveloppe virale constituée d'une bicouche lipidique issue de la membrane cellulaire dans laquelle sont enchâssées les trois protéines d'enveloppe : S, M, L-HBs. La composition lipidique exacte de l'enveloppe des VP n'est pas connue à ce jour. La répartition des protéines d'enveloppe dans un virion en L, M et S-HBs est de 1 :1 :4 respectivement (Heermann et al., 1984). L'enveloppe renferme une capside icosaédrique composée de protéines HBc qui protègent le génome viral (Figure 6). Les virions sont majoritairement constitués de capsides de grande taille (T=4 ; 120 dimères ; 35 nm de diamètre ; 90%). On ne sait pas si les virions composés de petites capsides (T=3 ; 90 dimères ; 32 nm de diamètre ; 10%) sont infectieux ou s'ils représentent simplement les produits d'un assemblage aberrant. La capside contient et protège le génome viral lié à la polymérase virale. Excepté la protéine M, les protéines d'enveloppe S et L-HBs sont nécessaires à l'enveloppement de la nucléocapside (Fernholz et al., 1991). *In vivo*, l'assemblage des protéines HBc pour former la capside s'effectue de façon coordonnée à l'encapsidation de l'ARN prégénomique (ARNpg) et de la polymérase virale.

Les virions se présenteraient sous 2 conformations, l'une non infectieuse et l'autre infectieuse. L'acquisition du caractère infectieux serait le fruit d'une maturation lente (Seitz et al., 2016). Des particules de type N (HSPG-non-binding) ne pouvant pas se lier aux protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) seraient libérées sous une forme inactive où la partie préS serait du côté cytosolique. La capacité de liaison au récepteur de ces particules serait acquise par la translocation de la région PréS vers la surface de l'enveloppe. La conversion des particules de type N en particules de type B (HSPG-binding) capable de se lier aux HSPG a lieu spontanément et rend les virions infectieux. Ce changement de topologie dynamique est un moyen économique pour le virus d'éviter l'attachement inutile à des sites extra-hépatiques.

Les VP sont connues pour inhiber les réponses innées de l'hôte lors des interactions virions/cellules au niveau des hépatocytes ce qui conduit à une diminution de l'expression des cytokines antivirales (Luangsay et al., 2015).

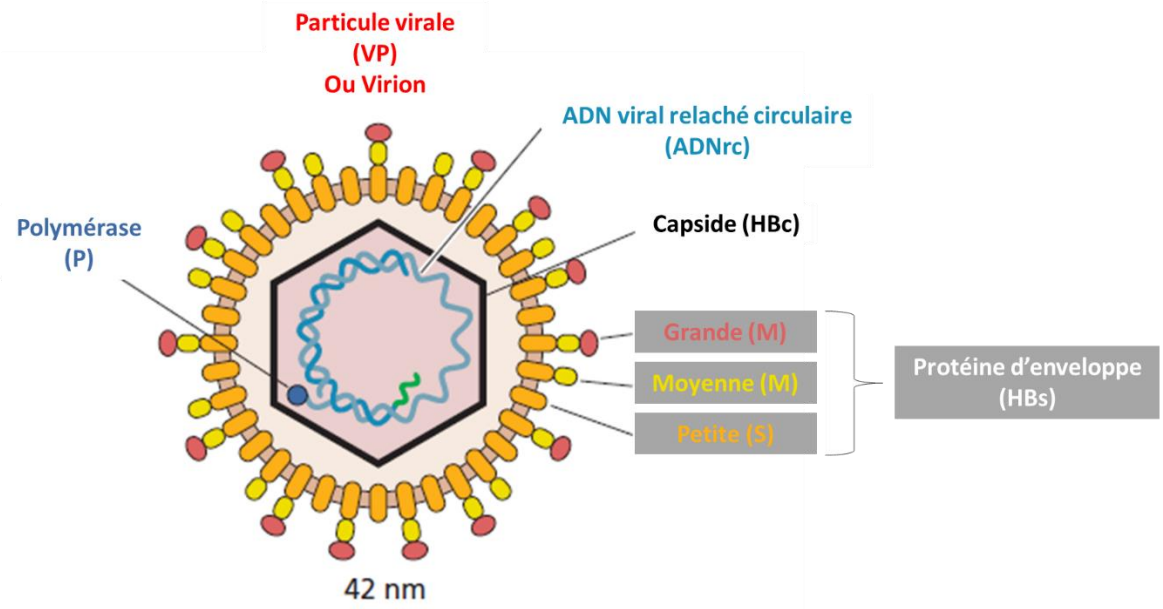


Figure 6: Structure du virus de l'hépatite B
D'après (Flint et al., 2015)

Une autre forme mineure de virions peut être sécrétée. Il s'agit de virions contenant l'ADN non pas sous forme relâchée circulaire mais sous forme d'ADN double brin linéaire. Cette forme de génome constitue 5 à 10% des virions. Comme pour les virions contenant de l'ADNrc, les virions contenant l'ADN double brin linéaire sont soit enveloppés ou soit recyclés vers le noyau.

1.4.2. Les particules sous-virales

Les protéines de surface du VHB (HBs) ne sont pas seulement les composants de l'enveloppe des particules virales complètes infectieuses mais sont aussi présentes sous formes de particules sous-virales (SVP ; subviral particles) ce qui constitue une particularité du VHB.

La production en large abondance de ces particules non infectieuses, sans génome ni nucléocapside, a grandement facilité la découverte du virus avant même la caractérisation de son matériel génétique. Les SVP se présentent sous forme de sphères (20-22 nm de diamètre) ou de filaments (100 nm de long pour le même diamètre).

Les SVP sphériques sont majoritairement constituées de petites protéines d'enveloppe S-HBs (90%) et de protéines M et L (10% de chaque). Les SVP sont aussi constituées de lipides, en majorité phosphatidylcholine (~60%), ester de cholestéryl (~14%), cholestérol (~15%) et triglycérides (~3%) (Gavilanes et al., 1982). Les lipides représentent seulement 25% du poids des SVP ce qui suggère que leur organisation au sein des SVP diffère du schéma d'une bicouche lipidique classique (Bruss, 2007). La surexpression de S-HBs dans des cellules eucaryotes permet la sécrétion de sphères similaires à celles observées dans le sérum des patients (Laub et al., 1983). La protéine S-HBs peut également être produite à partir de levures. Cependant, les sphères issues de ces deux systèmes ne sont pas comparables d'un point de vue de la glycosylation et des ponts disulfures (Diminsky et al., 1997). Les protéines S-HBs ont le pouvoir de s'auto assembler et suffisent pour le transport intracellulaire et leur sécrétion. Ainsi, les données concernant l'assemblage et la sécrétion des sphères sont basées sur des lignées cellulaires de mammifère transfectées avec S-HBs. Au niveau extracellulaire, les sphères issues de ces systèmes recombinants ont une forme octaédrique (Gilbert et al., 2005) contrairement aux sphères circulantes chez les patients qui ont une forme irrégulière sans symétrie globale et présentent des protrusions comme montré récemment en cryo-microscopie électronique (cryo-ME) (Cao et al., 2019). L'assemblage des protéines HBs en sphères a lieu au niveau du reticulum endoplasmique (RE). Les dimères transmembranaires s'auto assemblent initialement sous une forme filamenteuse dans l'espace périnucléaire au niveau du RE. Ces filaments sont regroupés et transportés par des vésicules dérivées du RE vers le compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC), où ils sont libérés et convertis en sphères (Patient et al., 2009). Les sphères sont transportées par la voie de la sécrétion constitutive, traversant ainsi le complexe de Golgi. Certains acides aminés de S-HBs sont critiques pour l'assemblage et l'export des sphères.

Des mutations ou des délétions dans le domaine N-terminal de S-HBs sont délétères pour l'assemblage ou la sécrétion des SVP (Prange et al., 1992) alors que l'insertion de séquences est supportée (Lambert et al., 2004).

Les SVP filamenteuses sont caractérisées par une proportion plus importante de protéines L-HBs que les sphères. On estime que les filaments sont constitués, comme les virions, par un ratio 1 :1 :4 en protéines L, M et S-HBs (Heermann et al., 1984). La forme filament et l'efficacité de leur libération dépendent des quantités relatives des petites et des grandes protéines d'enveloppe. Une faible concentration de protéines L-HBs entraîne la production et la sécrétion de sphères contenant des L-HBs, tandis qu'une concentration plus élevée conduit à la formation de filaments (Molnar-Kimber et al., 1988). La faible sécrétion des protéines L-HBs peut s'expliquer par la forme filamenteuse des particules (Roingeard and Sureau, 1998). L'accumulation intracellulaire de protéines L-HBs, sous forme de particules filamenteuses, entraine un effet cytopathique direct et pourrait causer une régénération hépatique et être associée au développement du CHC, comme observé dans un modèle souris (Chisari et al., 1989, 1987). Les hépatocytes ont alors un aspect caractéristique dit en verre dépoli. Cette accumulation intracellulaire est surtout observée aux phases tardives de l'infection et s'accompagne d'une circulation plus faible de l'AgHBs. Les SVP filamenteuses, comme les virions, entrent dans les corps multivésiculaires (MVB). Le blocage de la biogénèse ou l'inhibition de l'alpha taxiline inhibe la sécrétion des filaments. Les filaments comme les particules de Dane sont sécrétés par la voie ESCRT/MVB (Jiang et al., 2015).

La signification d'une telle production de SVP, parfois jusqu'à 100 000 fois plus que les virions, reste mal connue. Les SVP sont supposées jouer un rôle dans l'évolution vers la chronicité de l'infection. Elles agiraient comme un leurre pour le système immunitaire en bloquant les anticorps anti-HBs destinés à neutraliser les virions (Rydell et al., 2017). Par un phénomène de saturation du système immunitaire, les SVP conduiraient à son épuisement vis-à-vis du virus.

1.4.3. Les particules défectives (dVHB)

Plusieurs équipes ont mis en évidence dans le sérum ou dans les surnageants de culture la présence de particules défectives du VHB (dVHB). Ces particules détectées chez les patients chroniquement infectés (Preiss et al., 2008; Soussan et al., 2008) contiennent un ADN défectif formé par rétrotranscription à partir des ARN épissés du VHB (Günther et al., 1997; Terré et al., 1991). En effet, la présence de ε à l'extrémité 5' des ARN épissés permet l'encapsidation de ces ARN, leur transcription inverse et la sécrétion sous forme de particules défectives. La proportion de dVHB semble plus élevée chez les patients atteints d'une maladie hépatique sévère (Redelsperger et al., 2012).

1.4.4. Les particules nouvellement décrites

D'autres particules ont été décrites *in vitro* ou *in vivo* en plus des virions et des particules sous-virales et rendent plus complexe la compréhension de la morphogenèse du VHB. Un regroupement possible de ces nouvelles formes en deux grandes entités est proposé ici. Nous aborderons dans un premier temps les particules sans génome puis les particules contenant de l'ARN dans un second temps.

1.4.4.1. Les particules sans génome

a. <u>Capsides enveloppées sans génome ou virions vides (VV ou EV ; empty virions)</u>

Les virions vides (VV) ou capsides enveloppées sans génome ont la même morphologie que les virions infectieux à la différence près que la capside ne renferme pas d'acides nucléiques. Bien que récemment décrites, *a posteriori*, ce type de particules avait probablement été observé il y a plusieurs dizaines d'années à partir de plasma humain. En effet, il avait été décrit deux populations de particules circulant dans le sang des patients avec des densités différentes, 1,19 et 1,25 g/ml en chlorure de césium (Gerin et al., 1975; Kaplan et al., 1976). Les particules dites légères étaient constituées d'une enveloppe et des protéines de capside mais la polymérase ne présentait pas ou peu d'activité enzymatique. En microscopie électronique, ces particules apparaissent vides et donc dépourvues d'ADN.

Alors que ces premiers rapports laissent entrevoir la présence de virions vides (VV), ce type de particules pouvait également être le fruit de virions défectueux d'où le génome se serait échappé. Trente ans plus tard, Kimura et al. suggèrent que les virions vides pourraient en fait contenir une protéine précore de 22 kDa (p22cr) au lieu de la protéine core qui constitue normalement les capsides (Kimura et al., 2005). La p22cr contiendrait le peptide signal mais ne possèderait pas le domaine riche en arginine, impliqué dans la liaison à l'ARNpg et au génome. Cette hypothèse n'a par la suite pas été confirmée par les auteurs ou une autre équipe. L'année suivante, une autre équipe a rapporté la sécrétion de virions vides en petites quantités, à partir de cultures de cellules Huh7 transfectées pour exprimer les protéines HBc et HBs sans ARNpg. Cette observation remet en question le dogme qui dit que l'enveloppement et la sécrétion des particules requièrent que l'ARNpg soit rétrotranscrit (Schormann et al., 2006). Des virions vides sans génome sont également sécrétés en large excès par rapport aux virions infectieux dans le sérum de 4 chimpanzés infectés. Les virions vides représentaient 97,8-99,7% des virions sécrétés (Ning et al., 2011). Les expériences menées en présence de mutants incapables d'empaqueter l'ARNpg ou de synthétiser l'ADN montrent que la sécrétion de VV est totalement indépendante de ces étapes du cycle. Contrairement aux travaux de Kimura et al., ces virions vides sont constitués de protéines de capsides. Les auteurs proposent un "signal de blocage" qui est induit dans les nucléocapsides immatures, et qui empêche activement leur enveloppement. Les capsides vides, étant dépourvues d'acide nucléique, n'ont pas ce signal négatif et peuvent donc, par défaut, être enveloppées et sécrétées sous forme de VV. Selon ce modèle, l'exigence apparente d'ADNrc pour l'enveloppement des nucléocapsides matures et la sécrétion de virions contenant de l'ADN ne serait pas due nécessairement à la présence d'ADN, comme le prévoit le modèle classique du signal de maturation. Structurellement, les capsides vides, comme les nucléocapsides matures, sont moins stables que les nucléocapsides immatures. Cette propriété commune pourrait faciliter leur reconnaissance et leur sélection par les protéines d'enveloppe pour la formation de virions vides ou infectieux. Le modèle de sécrétion des virions vides et des virions complets qui impliquerait deux signaux distincts a récemment été mis à jour (Figure 7) (Ning et al., 2018). Les virions vides présentent un signal positif constitutif (signal de sécrétion I) qui induit leur enveloppement, lequel est médié par des interactions avec la protéine S. Un autre signal positif distinct du signal I, appelé signal de sécrétion II, émerge au niveau des nucléocapsides matures contenant l'ADNrc pour faciliter la sécrétion des virions complets. Un signal de blocage empêche l'enveloppement des nucléocapsides immatures.

La sécrétion extracellulaire de virions vides nécessite l'assemblage de capsides vides à l'intérieur des cellules. En effet, les capsides vides sont assemblées à des niveaux élevés dans les cellules humaines en culture, dans les cellules d'insectes, et probablement aussi dans le foie des patients infectés par le VHB. La protéine HBc normale est détectée dans les virions vides de surnageant de culture cellulaire et de sérum humain *via* des anticorps spécifiques du domaine C-terminal, ce qui prouve que les VV contiennent la totalité du domaine C-terminal (Ning et al., 2017). Ainsi, la p22cr à l'extrémité C-terminale tronquée n'est *a priori* pas nécessaire pour la sécrétion de virions vides. Les concentrations de ces virions vides sont au moins 100 fois plus élevées que les particules de Dane dans le sérum de patients infectés, évoluent peu sous traitement antiviral mais peuvent diminuer chez certains patients répondeurs au traitement (Luckenbaugh et al., 2015a).

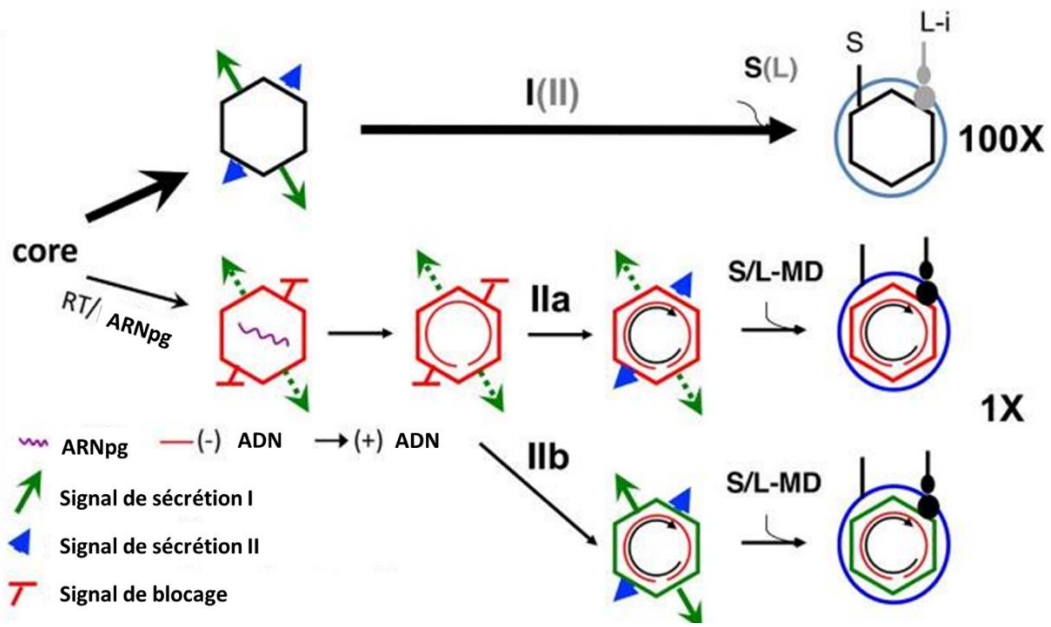


Figure 7 : Modèle proposé pour la sécrétion des virions vides ou des virions complets impliquant deux signaux distincts.
L'hexagone représente la capside. Le cercle externe représente la membrane virale avec les domaines S, M et L. Les signaux de sécrétion I (flèche verte) ou II (flèche bleue) sont proposés à la surface des capsides vides ou des nucléocapsides matures pour interagir avec les protéines S ou L, respectivement. Entre parenthèses figurent le signal II et la protéine L qui stimule la formation de virions vides mais ne sont pas essentiels à leur formation. Les nucléocapsides immatures affichent un signal de blocage qui régule négativement l'enveloppement des nucléocapsides et la formation de virions. Les flèches vertes en pointillés symbolisent le signal de sécrétion I séquestré ou supprimé. La perte du signal de blocage dans les nucléocapsides se traduit sur le schéma par un changement de couleur de la capside (de rouge à vert). L-i fait référence à l'une des 2 topologies de L-HBs où le domaine préS est interne, au niveau cytosolique et peut interagir avec la capside. 100X indique que les virions vides seraient 100 fois plus nombreux que les virions complets. D'après (Ning et al., 2018)

b. Capsides nues sans génome

Les capsides nues sans génome mesurent approximativement 28 nm de diamètre. Initialement observées dans des lignées cellulaires hépatiques répliquant le VHB, les capsides nues sans génome semblent absentes ou présentes en très faibles quantités dans le sang de patients ou de chimpanzés infectés. La faible détection de cette forme virale *in vivo* pourrait s'expliquer par la clairance très rapide de ces particules nues très immunogènes par les anticorps anti-HBc circulant chez les patients infectés. La sécrétion de ces particules par un mécanisme non lytique implique la protéine Rab33B et la protéine Alix (ALG-2 interacting protéin X) indépendamment de la machinerie ESCRT (Bardens et al., 2011; Döring and Prange, 2015). Une autre équipe a montré que la libération de capsides nues pouvait être favorisée spécifiquement par HGS du complexe ESCRT-0 (Chou et al., 2015).

1.4.4.2. Les particules contenant de l'ARN

Le génome des particules virales complètes infectieuses du VHB est un ADN circulaire partiellement double brin obtenu après rétrotranscription d'un ARNpg. Cependant, la circulation de différentes espèces d'ARN du VHB est décrite. Dans cette partie seront développées les espèces décrites d'ARN-VHB ainsi que la nature des particules qui contiennent ces ARN-VHB.

a. Les espèces d'ARN circulants

Comme abordé précédemment, plusieurs ARN sont transcrits au cours du cycle de réplication. La circulation de certains de ces ARN du VHB a été mise en évidence. Les séquences d'ARN-VHB détectés dans le sérum des patients semblent principalement être de l'ARNpg (Liu et al., 2019). Cependant d'autres espèces d'ARN circulants ont été décrites. Au moins 17 transcrits épissés de l'ARNpg et 4 transcrits épissés de préS2/S ont été identifiées au niveau du foie, dans le sérum ou des cellules transfectées. Ces ARN épissés conservent leurs extrémités 5' et 3' (Lam et al., 2017). Leur détection dans le sérum des patients semblent associer à une moins bonne réponse à un traitement par interféron α (Chen et al., 2015). Les principales espèces d'ARN épissés décrites sont représentées dans la figure 8.

Les ARN HBx de 0,7 kb ont été mis en évidence dans le sérum par Niu et al. (Niu et al., 2017) et leur détection dans la circulation sanguine a de nouveau été récemment rapportée (Stadelmayer et al., 2020).

Les ARN tronqués ont été décrits pour la première fois par Hilger et al. à partir d'un carcinome hépatocellulaire et sont la conséquence de l'existence d'un site cryptique de polyadénylation au sein de l'ORF HBx (Hilger et al., 1991). Les ARNtr seraient transcrits à partir de séquences virales intégrées. Ces ARNtr peuvent également être détectés dans le sérum de patients (Su et al., 2001; van Bömmel et al., 2015).

La circulation des ARN de 2,4 et 2,1 kb n'a pas été rapportée dans la littérature à ce jour.

Une association entre le niveau d'ARN du VHB circulant et la cytolyse hépatique a été rapportée *in vivo* ce qui suggère que les ARN-VHB circulants sont au moins partiellement issus de la lyse de cellules infectées (Bai et al., 2018; van Campenhout et al., 2018).

Les ARN du VHB sériques seraient donc probablement un mélange d'ARNpg intact, de variants épissés et de formes sans polyA. La composition hétérogène de ces espèces d'ARN-VHB circulantes mise en évidence peut varier selon les phases de l'infection, les traitements antiviraux et surtout de la méthode de détection utilisée.

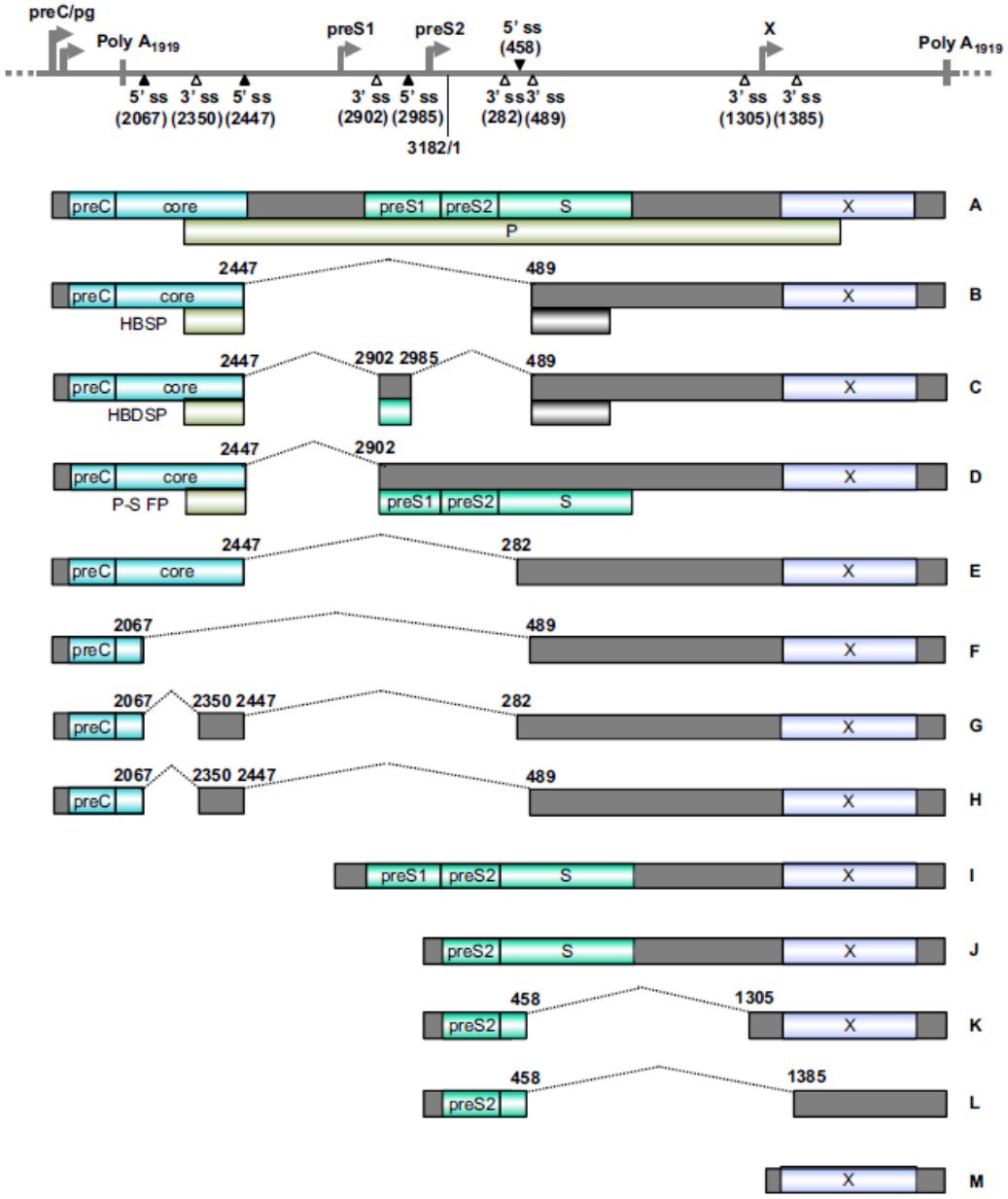


Figure 8 : Espèces d'ARN dérivées de l'épissage alternatif de l'ARN.
Les exons codant sont représentés par les encadrés colorés. Les exons non codants sont représentés par les encadrés grisés. Les lignes pointillées indiquent les introns pour chaque espèce d'ARN. Les positions des sites d'épissage cartographiés sont numérotées par les positions en nucléotides dans le génome du VHB. Espèces A-M. HBSP (Hepatitis B Spliced Protein); HBDSP (Hepatitis B Doubly Spliced Protein); PSFP (Polymerase-Surface Fusion Protein) (Ajiro and Zheng, 2014)

b. Particules virales contenant de l'ARN

Les ARN circulants détectés seraient en partie contenus dans des particules virales enveloppées, analogues aux virions, comme le suggèrent les données générées par une séparation des particules en gradient de densité. En effet, l'ARN est retrouvé dans les mêmes fractions que l'ADN et la protéine de capside (Prakash et al., 2018; Rokuhara et al., 2006; Wang et al., 2016). D'autres expériences menées *in vitro* sont aussi en faveur de la présence d'ARNpg contenus dans des capsides enveloppées (Jansen et al., 2016).

c. Capsides nues contenant de l'ARN ou de l'ADN simple brin

Selon Bai et al., dans les surnageants de culture, les ARN du VHB extracellulaires, de longueurs hétérogènes, seraient contenus majoritairement dans des capsides nues (non enveloppées) en plus des particules enveloppées à ARN. Chez les patients, ces ARN-VHB circuleraient au niveau plasmatique dans des capsides non enveloppées sous forme de gros immuns complexes, appelées CACs (capsid-antibody complexes) en plus des particules à ARN enveloppées (Bai et al., 2018). Cette détection de capsides nues contenant de l'ARN ou de l'ADN simple brin *in vivo* est en accord avec des données plus anciennes générées *in vitro* (Ning et al., 2011). L'ARNpg contenu dans ces capsides nues serait sécrété par la voie ESCRT (Chou et al., 2015). Habituellement, le domaine CTD de la protéine core est hautement phosphorylé ce qui limite l'empaquetage d'ARN non spécifique. Néanmoins, dans certaines conditions, le CTD peut se retrouver dans un état hypophosphorylé ce qui expliquerait la présence d'ARN non spécifiques dans ces capsides (Ludgate et al., 2016; Zhao et al., 2018).

d. ARNs libres circulant ou au sein d'exosomes

La part d'ARN circulant *via* les exosomes semble mineure, si elle existe et serait restreinte à certains ARN subgénomiques. En effet, aucune diminution du taux d'ARNpg n'a été observée par Wang et al. après inhibition de la sécrétion des exosomes (Wang et al., 2016). La détection d'ARN tronqués a été rapportée, en l'absence de tout autre marqueur viral, et est probablement liée au relargage par des vésicules lors de la lyse des hépatocytes infectés.

En conclusion, si la présence d'ARN du VHB chez certains patients infectés ne fait plus débat, des questions subsistent, que ce soit sur la composition exacte de(s) espèce(s) d'ARN circulante(s), la nature des particules qui la (les) contienne(nt) (particules enveloppées, capsides nues, associées aux exosomes,…) ou encore leur fonction (Charre et al., 2019). Le mécanisme de sortie est-il différent entre les particules contenant l'ARN et celles contenant l'ADN ? L'ARNpg de 3,5 kb apparait comme l'espèce d'ARN circulante la plus abondante. La source principale des ARN du VHB circulant semble être l'ADNccc mais la production à partir de séquences intégrées est possible. Cette diversité d'ARN du VHB circulant est susceptible de varier en fonction des différentes phases de l'infection. Des études fondamentales sont nécessaires pour répondre à ces questions.

Les formes virales nouvellement décrites par différentes études dans les plasmas de patients sont résumées dans le tableau 3. Les travaux menés à partir de plasma sont peu nombreux et nécessitent d'être renforcés par des études complémentaires.

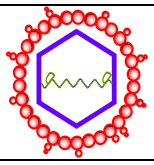
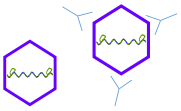
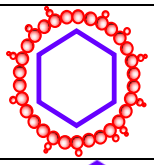
Formes virales nouvellement décrites		**Caractéristiques des patients**	**Littérature**
Particules enveloppées contenant de l'ARN		Gradients pour : N = 3 (Jansen) N=1 (Prakash) N=1 (Rokuhara)	(Jansen et al., 2016; Prakash et al., 2018; Rokuhara et al., 2006)
Capsides non enveloppées (ARN ou ADN simple brin) circulant sous forme d'immuns complexes (CACs)		Population asiatique N=45 ADN-VHB ≥ 10^7 UI/ml Majorité AgHBe positif	(Bai et al., 2018)
Capsides enveloppées ou virions vides (VV)		N=21 AgHBe + 16 / AgHBe – 5 Génotypes A – D ≈ 10^{11} VV/ml > VP	(Luckenbaugh et al., 2015a)
Capsides nues sans génome			Non décrites

Tableau 3 : Nouvelles formes du VHB circulantes décrites chez les patients.

2. INFECTION CHRONIQUE PAR LE VHB

2.1. Épidémiologie

Le VHB est un virus résistant dans le milieu extérieur malgré son caractère enveloppé. Les sujets AgHBs positif sont le réservoir du virus. Le VHB est présent dans différents liquides biologiques (sang, sécrétions génitales, salive, lait maternel, sueur…) à des concentrations importantes en phase aiguë et lors des phases chroniques avec AgHBe positif.

La transmission est interhumaine horizontale ou verticale. La transmission mère-enfant est prépondérante au niveau mondial et participe de manière importante à la diffusion du virus dans les régions de forte prévalence. Cette transmission a lieu principalement au moment de l'accouchement et est facilitée en présence de l'AgHBe et d'une forte réplication virale chez la mère. La transmission peut également avoir lieu par exposition au sang, par transmission sexuelle, ou *via* l'entourage.

L'hépatite B est une maladie infectieuse qui pose un problème de santé publique majeur. Le nombre de porteurs chroniques du VHB est estimé à 257 millions. La prévalence de l'AgHBs diffère selon les régions du globe. Elle est particulièrement élevée en Afrique et en Asie du sud-est, faible en Europe du nord et aux États-Unis (Razavi-Shearer et al., 2018). Le VHB est la cause de près de 900 000 décès par an dans le monde. Près de 2,7 millions de porteurs du VHB sont coinfectés par le VIH, en particulier en Afrique subsaharienne (Platt et al., 2019). Cela s'explique par des modes de transmission communs à ces deux virus.

Le VHB est un agent classé dans le groupe 1, cancérogène pour l'Homme, selon la classification de l'IARC (International Agency for Research on Cancer). Les programmes vaccinaux ont transformé l'épidémiologie mondiale. Mais les cancers du foie restent un lourd fardeau au niveau mondial avec près de 360 000 cas attribuables au VHB sur 2,2 millions de nouveaux cancers attribués à une infection en 2018 (de Martel et al., 2020). Le VHB est la cause la plus fréquente de CHC dans le monde. Dans les zones endémiques, le CHC survient à un âge jeune.

2.2. Physiopathologie et clinique de l'infection chronique

2.2.1. Histoire naturelle

Après une période d'incubation d'environ 10 semaines, l'hépatite B aiguë passe le plus souvent inaperçue devant le caractère asymptomatique fréquent (Figure 9) ou se manifeste par un ictère chez 20% des adultes infectés. Une hépatite fulminante est observée dans 0,1% des cas d'hépatites aiguës et peut conduire à une transplantation hépatique en urgence. L'infection chronique est définie par la persistance de l'AgHBs plus de 6 mois après la phase aiguë.

L'histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB varie en fonction du génotype viral, du mode de transmission, de l'âge et des défenses immunitaires de l'hôte infecté. C'est un processus dynamique dont l'évolution dépend des interactions entre le virus et le système immunitaire de l'hôte. Le virus étant peu cytolytique, c'est l'intensité de la réponse immune qui détermine l'évolution de l'infection. Le passage à la chronicité est d'autant plus fréquent que l'infection a lieu à la naissance ou dans l'enfance (80-90% des cas), du fait d'un système immunitaire immature. A l'inverse, chez l'adulte, le passage à la chronicité est plus rare (5%).

Les dernières recommandations européennes proposent une nouvelle nomenclature des cinq phases différentes de l'infection chronique, basées sur des marqueurs biochimiques (alanine aminotransférase ou ALAT), sérologiques (AgHBe, AgHBs) et moléculaires (ADN VHB) (Lampertico et al., 2017). Le statut vis-à-vis de l'AgHBe est utilisé pour distinguer les phases précoces (AgHBe positif) des phases tardives (AgHBe négatif, séroconversion anti-HBe). Ces phases ne se succèdent pas forcément et peuvent être réversibles.

Les manifestations cliniques de la maladie sont variées. La nouvelle nomenclature distinguent l'infection chronique, où l'atteinte hépatique est peu existante voire absente, et l'hépatite chronique, associée à une inflammation et où les lésions hépatiques s'aggravent avec une évolution possible vers la cirrhose, les complications de la cirrhose et/ou la survenue d'un carcinome hépatocellulaire.

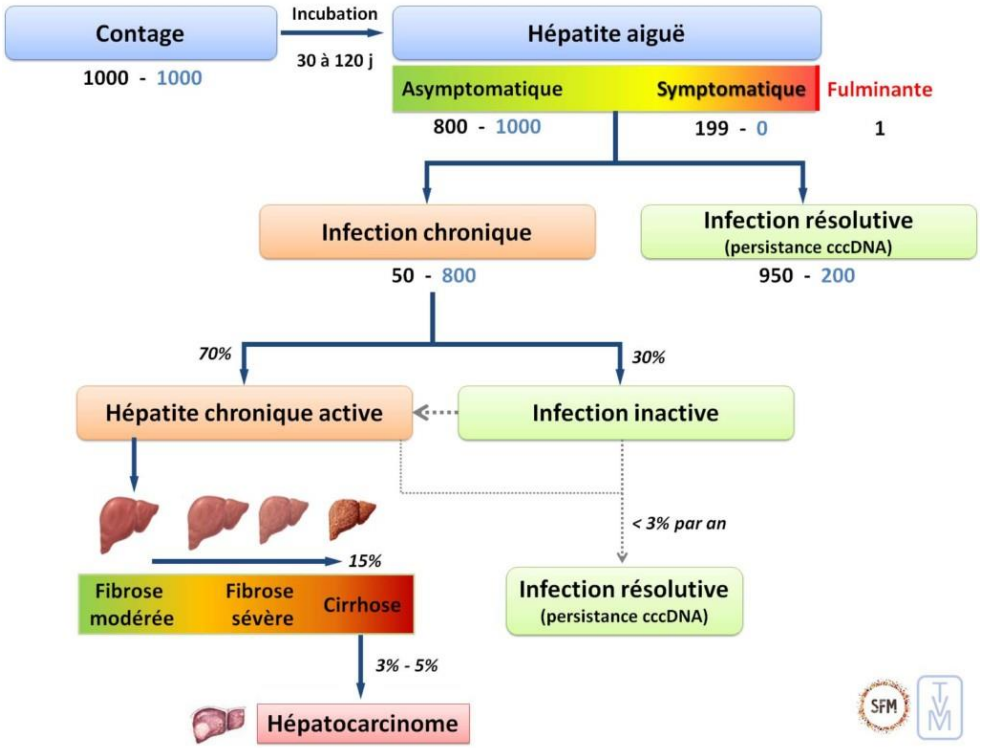


Figure 9 : Histoire naturelle de l'infection par le VHB.
D'après le traité de virologie médicale ; 2ème édition.

2.2.1.1. Patients positifs pour l'AgHBe

La phase d'infection chronique par le VHB à AgHBe positif (anciennement appelée phase d'immunotolérance) est observée chez le sujet infecté dans la période périnatale ou la jeune enfance. Elle est caractérisée par définition par un AgHBe positif et par un niveau élevé d'ADN du VHB plasmatique. A ce stade, il n'y a ni cytolyse, ni fibrose hépatique. Cependant, des phénomènes impliqués dans l'oncogenèse tels que l'intégration de l'ADN viral et la clonalité des hépatocytes ont été rapportés récemment (Mason et al., 2016). La phase suivante survenant généralement plusieurs dizaines d'années après la première phase, en cas d'infection pendant la période périnatale, est appelée hépatite chronique AgHBe positive (ex phase de clairance immune). Lors de cette phase, les transaminases augmentent et le niveau d'ADN reste élevé. La perte de l'AgHBe et l'apparition des anticorps anti-HBe est appelée séroconversion HBe et marquent la transition avec la phase suivante. Cette séroconversion HBe survient spontanément en parallèle d'une diminution de la charge virale. Si elle survient au-delà de 40 ans, le risque de développer une cirrhose ou un CHC augmente.

2.2.1.2. Patients négatifs pour l'AgHBe

La troisième phase appelée infection chronique à AgHBe négatif correspond à l'ancienne phase dite de portage inactif. Les transaminases sont dans les valeurs normales, l'AgHBe est négatif et les autres marqueurs viraux tels que l'ADN et l'AgHBs sont faiblement exprimés. La perte de l'AgHBs peut être observée dans 1 à 3% des cas par an, signe d'une infection résolutive malgré la persistance de l'ADNccc au sein des hépatocytes infectés.

La quatrième phase, hépatite chronique AgHBe négatif, est associée à un faible taux de rémission spontanée de l'infection. La virémie et les transaminases sont fluctuantes. La majorité des patients abritent des variants dans le promoteur basal du core ou dans la région précore qui réduisent ou abolissent la production de l'AgHBe. La transition de la phase inactive vers la phase d'hépatite active est relativement rare chez les patients AgHBe négatif avec une faible réplication virale. Dans une cohorte américaine incluant 970 patients, une transition de phase ou une indication d'initier un traitement a été objectivée chez 15% d'entre eux durant un suivi médian de 4 ans et dépendait surtout de facteurs viraux (niveau de charge virale, génotype, quantification de l'AgHBs) (Zhou et al., 2019).

La cinquième phase, connue sous le nom d'infection B occulte (OBI ou occult HBV infection) est caractérisée par un AgHBs négatif, des anticorps anti-HBc positifs avec ou sans anti-HBs. Les transaminases sont normales et l'ADN du VHB le plus souvent indétectable (Raimondo et al., 2019).

2.2.2. Conséquences de l'hépatite B chronique

Les deux complications principales de l'hépatite B chronique sont la cirrhose et le CHC. La cirrhose se développe chez 15% des patients atteints d'hépatite chronique. Des évènements génétiques et épigénétiques sont responsables de l'apparition de lésions prénéoplasiques. Les cellules dysplasiques prolifèrent et vont faire le lit du CHC. Le CHC apparait au décours de la cirrhose bien qu'il puisse survenir à toutes les phases de l'infection du fait du caractère oncogène propre au VHB. La survenue de CHC chez des patients non cirrhotiques a en particulier été mise en évidence chez des patients infectés par le sous-génotype africain A1 (Kramvis, 2018).

La cancérogenèse hépatique implique des mécanismes directs et indirects. Les mécanismes indirects sont liés à la constitution d'une fibrose hépatique avancée, au développement de la cirrhose déclenchée par une inflammation hépatique chronique et un stress oxydatif générés par les défenses de l'hôte. Les mécanismes directs sont principalement dus à l'action de l'oncoprotéine virale HBx, à l'instabilité chromosomique induite par l'intégration du génome du VHB au génome de l'hôte. Il faut noter le rôle pronostique majeur d'un diagnostic précoce du CHC, notamment dans le cadre d'un dépistage systématique (Costentin et al., 2018).

Dans les pays occidentaux, la majorité des CHC surviennent sur un foie cirrhotique. Tandis que les CHC dus au VHB en zones endémiques sont caractérisés par une absence fréquente de fibrose hépatique avancée sous-jacente. Les CHC en l'absence de cirrhose surviennent chez des patients non caucasiens, d'origine africaine ou asiatique, avec un antécédent de CHC dans la famille (Chayanupatkul et al., 2017).

2.2.3. Les formes particulières

2.2.3.1. Coinfection

a) <u>VHB-VHD</u>

Le VHD, découvert en 1977, est un virus satellite du VHB qui requiert l'enveloppe du VHB pour former la particule infectieuse et utilise le même récepteur cellulaire. La prévalence de ce virus a longtemps été sous-estimée. Le diagnostic d'infection par le VHD est dorénavant plus systématique à la découverte de l'infection par le VHB. Environ 14% des patients atteints d'hépatite B seraient également infectés par le VHD, soit près de 60 millions de personnes (Miao et al., 2020). La prévalence de l'infection est plus élevée chez les usagers de drogue intraveineuse. Il est important de distinguer deux situations d'infection par le VHD, soit une infection simultanée avec le VHB (coinfection), soit une surinfection d'un porteur chronique du VHB. La symptomatologie et le pronostic diffèrent selon qu'ils s'agissent d'une coinfection ou d'une surinfection. La coinfection peut se présenter sous forme d'une hépatite aiguë et aboutit souvent à une clairance des deux virus. Le passage à la chronicité est fréquent en cas de surinfection. Dans les deux cas, l'hépatite aiguë est plus sévère et plus fréquemment fulminante qu'en cas de monoinfection VHB. L'hépatite VHB-VHD chronique progresse plus rapidement vers la cirrhose et est plus fréquemment associée à des signes d'hypertension portale et/ou d'insuffisance hépatique. Classiquement, l'infection par le VHD réprime la réplication du VHB (Chen et al., 1988; Sureau et al., 1989).

b) <u>VHB-VHC</u>

La coinfection par le VHB et le VHC est possible en particulier dans les pays endémiques et chez les usagers de drogue par voie intraveineuse. Comme avec le VHD, on observe le plus souvent une interaction entre les deux virus et une inhibition du VHB par le VHC. Chez les coinfectés VHB-VHC, l'atteinte hépatique est plus sévère avec un risque de progression plus important vers la cirrhose et le CHC (Shih and Liu, 2020). Des traitements courts, efficaces mais couteux permettent maintenant de guérir d'une infection par le VHC.

c) VHB-VIH

L'infection par le VIH influe sur l'histoire naturelle de l'infection par le VHB et aggrave généralement son pronostic. La charge virale VHB est généralement plus élevée, la maladie hépatique progresse plus vite et la mortalité associée au foie est augmentée par rapport à la mono-infection par le VHB. Le passage à la chronicité, la vitesse de progression de la fibrose et le risque d'apparition du CHC sont augmentés avec la coinfection. Le traitement généralisé de tous les patients infectés par le VIH avec des antirétroviraux actifs contre le VHB a considérablement amélioré l'histoire naturelle de la coinfection VIH-VHB, mais la prévalence des maladies du foie reste élevée dans cette population (Singh et al., 2017).

2.2.3.2. Manifestations extra-hépatiques

Des manifestations extra-hépatiques immuno-médiées sont décrites avec le VHB chez près de 20% des patients, aussi bien en phase aiguë ou chronique. Les deux entités les mieux caractérisées sont des néphropathies liées au VHB (glomérulonéphrite et polyartérite noueuse). D'autres manifestations extra-hépatiques sont décrites en particulier neurologiques. Nous avons récemment rapporté la détection de marqueurs directs du VHB au niveau du liquide cérébro-spinal chez 2 patients présentant des troubles neurologiques contemporains d'une infection par le VHB (Pronier et al., 2018). Nous n'avons pas pu établir de lien de causalité formel entre la réplication du VHB au niveau neurologique et les symptômes observés. D'autres études seront nécessaires.

2.3. Traitement de l'infection chronique

2.3.1. Objectifs du traitement et définitions de la guérison

L'objectif du traitement est de guérir de l'infection, de la maladie hépatique associée et de prévenir la transmission. On cherche avant tout à obtenir une réponse clinique, à prévenir la progression de la fibrose voire à observer une régression de celle-ci, à réduire le risque de développement de carcinome hépatocellulaire. Contrairement à l'infection par le VHC par exemple, le terme de guérison pour l'infection par le VHB n'est pas totalement approprié pour plusieurs raisons. La perte de l'AgHBs est très faible avec les traitements actuels, la virosuppression observée au niveau plasmatique n'est pas complète puisque l'ADNccc persiste au sein des hépatocytes infectés et peut se réactiver au décours d'une immunosuppression ou spontanément à l'arrêt du traitement. De plus, le risque de CHC n'est pas éliminé malgré une suppression prolongée de la réplication virale.

Trois grands niveaux de guérison de l'infection ont été définis (Lok et al., 2017). La guérison complète stérilisante correspond à l'éradication virale. L'AgHBs est négatif et toutes les formes d'ADN du VHB (ADNccc et les formes intégrées) sont éliminées de l'organisme comme si l'individu n'avait jamais été infecté. Ce niveau de guérison n'a jamais été prouvé comme possible à atteindre. La guérison fonctionnelle est définie par une indétectabilité durable de l'AgHBs et de l'ADN dans le sérum, avec ou sans séroconversion des anticorps anti-HBs, mais avec la persistance de l'ADNccc intrahépatique sans activité transcriptionnelle, comme observé après une résolution spontanée de l'infection aiguë. Ce niveau de guérison a plus de chances d'être atteint que le premier. Le troisième niveau correspond à la guérison partielle, défini par un AgHBs détectable mais une indétectabilité prolongée de l'ADN sérique à l'arrêt d'un traitement pendant une durée définie. Les patients sont alors considérés comme des porteurs inactifs du virus sans traitement, ils ont une maladie hépatique inactive et un risque diminué de CHC par rapport aux patients atteints d'hépatite active. Avec les traitements actuels, l'obtention d'une charge virale indétectable est déjà possible mais la perte de l'AgHBs reste exceptionnelle. La virosuppression permet de limiter la progression de la fibrose hépatique, de diminuer l'incidence de la cirrhose et du CHC.

2.3.2. Traitements actuels

Selon les dernières recommandations européennes, le traitement antiviral est actuellement indiqué chez les patients atteints d'une hépatite B chronique ou chez les patients cirrhotiques, quel que soit leur statut pour l'AgHBe. Le traitement peut également être proposé selon le risque de développer un CHC ou une réactivation du VHB, chez les patients présentant des manifestations extra-hépatiques ou à risque de transmission du virus (personnel de santé par exemple). Il existe actuellement deux options thérapeutiques qui reposent sur la prescription soit de l'interféron pegylé alpha soit des analogues nucléos(t)idiques.

2.3.2.1. Interféron alpha pégylé

L'interféron alpha pégylé (PegIFNα) est utilisé pour son activité antivirale et immunomodulatrice. L'interféron est connu pour bloquer la formation de capsides contenant l'ARNpg (Wieland et al., 2005). Un nouveau mécanisme d'action a récemment été proposé. L'interféron alpha induirait des facteurs solubles qui se lieraient aux HSPG et permettraient ainsi de prévenir l'attachement viral (Xia et al., 2017). Il est administré sous forme d'injections sous-cutanées hebdomadaires pendant une durée limitée, en général, de 48 semaines. L'efficacité est limitée à certains patients et les effets indésirables nombreux. Une réponse thérapeutique soutenue est obtenue chez 30% des patients. L'indication de l'interféron alpha pégylé est donc restreinte aux patients ayant une probabilité importante de répondre à ce traitement. Chez les patients AgHBe positif, il s'agit du génotype A ou B, d'un niveau d'ALAT élevé, d'une faible charge virale ou d'un titre d'AgHBs faible. Les facteurs sont moins clairement identifiés chez les patients AgHBe négatif.

2.3.2.2. Analogues nucléos(t)idiques

Le premier analogue nucléosidique utilisé pour l'hépatite B fut la lamivudine. De nouveaux analogues de nucléos(t)ides (NUC) avec une barrière génétique à la résistance plus élevée sont aujourd'hui utilisés en première ligne : l'entécavir (ETV), le ténofovir disoproxil fumarate (TDF), et plus récemment le ténofovir alafénamide (TAF). Que ce soit sous ETV ou TDF, une régression de la cirrhose à 5 ans est observée (Marcellin et al., 2013; Wong et al., 2013). On dispose d'un recul de plus de 10 ans pour le TDF (Marcellin et al., 2019). La survie globale des patients Caucasiens traités par NUC rejoint celle de la population générale (Papatheodoridis et al., 2018). Le risque de développer un CHC diminue après 5 ans sous ETV ou TDF, en particulier chez les patients avec une cirrhose compensée, sans toutefois l'annuler (Papatheodoridis et al., 2017). Le risque de CHC reste plus élevé chez les patients traités cirrhotiques avec une faible réplication virale résiduelle par rapport aux patients qui ont une réponse virologique soutenue définie par une indétectabilité prolongée de la charge virale plasmatique (Kim et al., 2017). La perte de l'AgHBs associée à une virosuppression réduit encore davantage le risque de CHC chez les patients traités par NUC (Yip et al., 2019). Le CHC reste la principale cause pouvant impacter la durée de vie des patients chroniquement infectés par le VHB.

L'arsenal thérapeutique disponible à ce jour permet de contrôler la réplication virale en inhibant l'étape de transcription inverse mais ne permet pas une guérison dans la majorité des cas. Les NUCs, s'ils sont bien tolérés, ont peu d'effet sur le pool d'ADNccc intrahépatique. Ils sont administrés le plus souvent pour une durée illimitée car à l'arrêt du traitement, on observe fréquemment une reprise de la réplication virale. Actuellement, peu de substitutions associées à la résistance ont été documentées avec l'entecavir et aucune avec le TDF hormis une publication récente qui rapporte quatre substitutions isolées chez deux patients en échec thérapeutique associées à une résistance au ténofovir (Park et al., 2019). Une alternative au TDF est disponible. Il s'agit du TAF, une autre prodrogue du ténofovir. Son efficacité est similaire au TDF mais le TAF semble présenter un meilleur profil de tolérance aux niveaux rénal et osseux en lien avec des concentrations plasmatiques inférieures du métabolite actif (Charlton et al., 2020). De récentes études chez les patients infectés par le VIH qui initient ou bénéficient d'une trithérapie composée de TAF rapportent une prise de poids significative comparée au TDF (Taramasso et al., 2020; Venter et al., 2019). Il sera intéressant de regarder si cet effet est également observé chez les patients monoinfectés par le VHB traités par TAF.

2.3.2.3. La transplantation hépatique

La transplantation hépatique (TH) pour hépatite virale B doit être proposée en cas d'hépatite fulminante, de cirrhose décompensée et/ou de CHC. La transplantation est une des stratégies curatives du CHC pour les patients avec une tumeur de taille limitée et non candidats à une résection (Villanueva, 2019). Au niveau européen, le recul des indications de greffe pour cirrhose virale B a diminué au profit des indications pour CHC (Burra et al., 2013). Depuis 2014, le CHC est devenu la principale indication de greffe en France, toutes causes confondues (32 % des nouveaux inscrits en 2018). Une particularité et le principal enjeu en cas de transplantation pour hépatite B est la persistance du virus dans l'organisme nécessitant une prophylaxie afin d'éviter la réinfection du greffon par le VHB. La prévention de la récidive sur le greffon, dont le risque est de l'ordre de 80 % sans mesures préventives, repose sur un traitement par NUC avant et après la TH pour inhiber la réplication virale et l'utilisation d'immunoglobulines anti-HBs pour neutraliser les virions infectieux circulants (Miaglia et al., 2018).

2.3.3. Perspectives thérapeutiques

Des perspectives thérapeutiques intéressantes commencent à voir le jour. Les nouvelles molécules en développement sont réparties en deux catégories : les antiviraux à action directe (AAD) ou indirecte. Devant l'excellente tolérance des NUC, les nouvelles approches thérapeutiques devront présenter une sécurité comparable à celle des NUC ou permettre d'atteindre la guérison fonctionnelle ce qui pourrait justifier un surrisque.

2.3.3.1. Antiviraux à action directe (AAD)

Une meilleure compréhension des étapes clé du cycle viral et des interactions entre l'hôte et le VHB a permis le développement de nouveaux antiviraux qui ciblent d'autres étapes du cycle viral (entrée, synthèse de l'ADNccc, réplication, sécrétion) ou d'autres constituants des particules virales (ADNccc, capside) (Figure 11). Les AAD en développement sont listés dans le tableau 4.

Mécanisme d'action	Antiviral	Statut
Inhibiteur d'entrée	Myrcludex B (Bulevirtide)	Phase IIb
Inhibiteur de capside	Morphothiadin (GLS4)	Phase II
	JNJ 56136379	Phase II
	ABI-H0731 (vebicorvir)	Phase II
	ABI-H2158	Phase II
	RG7907	Phase I
	QL-007	Phase I
	EDP-514	Phase I
	ABI-H3733	Phase I
	ZM-H1505R	Phase I
	GLP-26	Préclinique
	ALG-000184	Préclinique
Inhibiteur de la sécrétion virale	REP 2139	Phase II
	REP 2165	Phase II
	ALG-10133	Phase Ia/b
Molécule antisens	GSK 3228836 (IONIS-HBVRx)	Phase II
	ALG-020572/020576	Préclinique
siARN	VIR-2218	Phase II
	RG6346 (DCR HBVS)	Phase I/II
	JNJ-3989 (ARO-HBV)	Phase I/II
	AB-729	Phase I
	BB-103	Préclinique
	Lunar-HBV	Préclinique

Tableau 4 : Liste des antiviraux à action directe en développement.
Adapté de https://www.hepb.org/treatment-and-management/drug-watch/. Mis à jour le 11 août 2020.

a. Inhibiteur d'entrée

L'entrée du virus représente une cible de choix. Avant même la découverte du récepteur NTCP, un lipopeptide mimant la grande protéine d'enveloppe a été développé (Gripon et al., 2005). Ce peptide myristoylé dérivé des 47 premiers acides aminés en N-terminal du domaine préS1 est nommé myrcludex B (ou bulevirtide). L'effet du myrcludex B est décrit figure 10. Son administration est journalière sous forme d'injection sous-cutanée. Il fait l'objet actuellement d'un traitement en ATU (autorisation temporaire d'utilisation), associé au Peg-IFNα, chez les patients ayant une infection chronique par les virus des hépatites B et D, avec une fibrose sévère ou une fibrose moyenne associée à une cytolyse hépatique persistante. L'infection *de novo* via le NTCP semble requise pour maintenir le pool d'ADNccc (Allweiss et al., 2018). Ainsi, l'inhibition de l'entrée virale pourrait participer à l'élimination de l'ADNccc par le système immunitaire et à la clairance de l'infection par le renouvellement physiologique des hépatocytes.

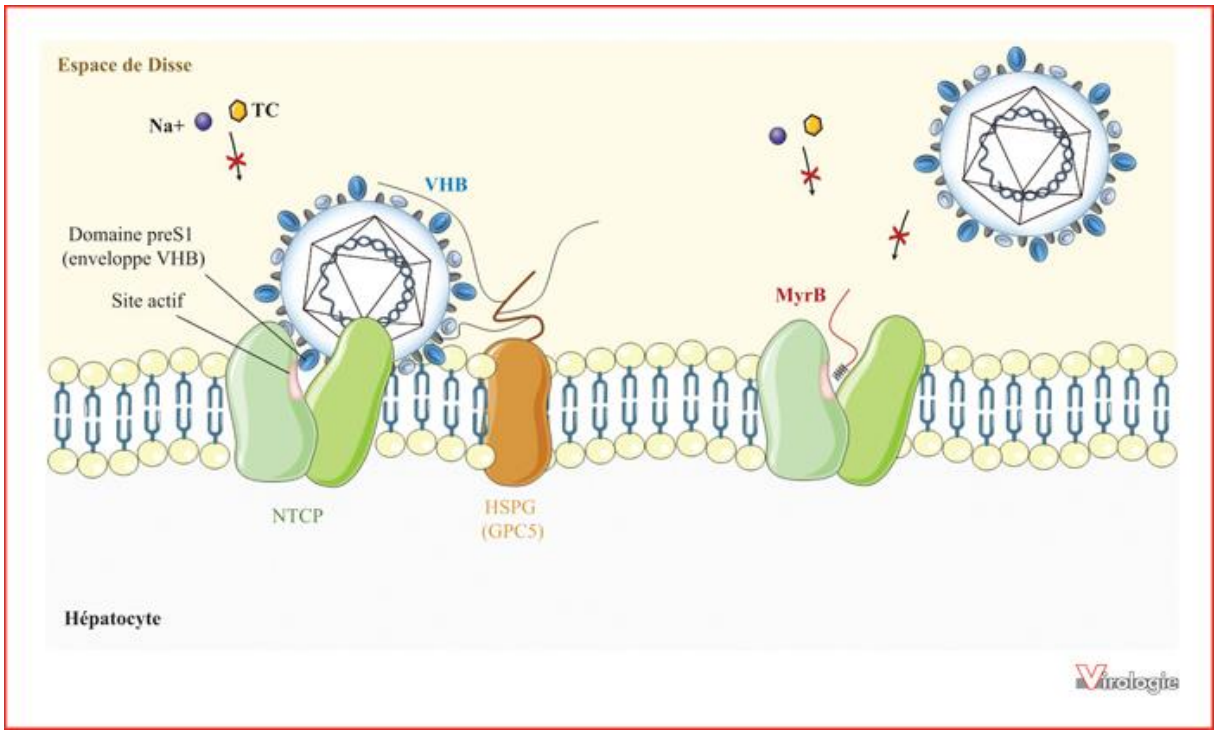


Figure 10: Interaction entre NTCP et le VHB et effet du Myrcludex B
Le domaine préS1 de la grande protéine d'enveloppe interagit avec le récepteur NTCP au niveau de son site actif, ce qui induit l'internalisation de la particule virale. Le Myrcludex B, lipopeptide myristoylé dérivé de l'enveloppe du VHB se lie spécifiquement au NTCP et inhibe l'entrée du virus dans l'hépatocyte. (Verrier et al., 2018)

b. Inhibiteurs de capside

La capside apparait également comme une cible prometteuse. Cette protéine structurale est multifonctionnelle. A ce jour, de nombreux inhibiteurs de capside, aussi appelés modulateurs allostériques de la capside (CAM), sont en développement clinique ou préclinique. Contrairement aux NUC qui inhibent uniquement la réplication virale, les CAM peuvent agir à différentes étapes du cycle. Ils inhibent la réplication en accélérant la cinétique de formation des capsides, ce qui conduit à la génération de capsides vides. Les CAM peuvent aussi inhiber la formation *de novo* de l'ADNccc. Les CAM peuvent inhiber la sécrétion d'AgHBe et diminuer la quantité d'ARN viral intracellulaire. Selon leur structure chimique, les CAM de classe-I ou CAM-N, dérivés de phénylpropénamide ou de sulfamoylbenzamide induisent la formation de capsides morphologiquement normales sans matériel génétique (capsides vides) alors que les CAM de classe-II ou CAM-A, dérivés d'hétéroarylpyrimidine, induisent des agrégats d'HBc formant des capsides aberrantes. Les CAM sont administrés par voie orale et semblent bien tolérés hormis quelques rashs cutanés ou quelques augmentations des transaminases. Un polymorphisme naturel existe au niveau de la poche hydrophobe à l'interface dimère dimère de la protéine HBc, site de liaison de certains CAM, et pourrait conférer une résistance au CAM. Ainsi, les inhibiteurs de capside pourraient renforcer l'effet antiviral des NUC et former une association synergique de par leurs mécanismes d'action différents et réduire le taux de sélection de résistance (Lam et al., 2018). Les traitements ciblant la capside participeraient à une réduction supplémentaire de la charge antigénique et pourraient ainsi concourir au rétablissement d'une réponse immunitaire efficace et permettre une clairance virale. La monothérapie ne semble pas suffisante. Il faudra certainement combiner cette classe thérapeutique à d'autres traitements.

c. Inhibiteurs de la sécrétion virale : polymères d'acides nucléiques

Les SVP sont produites en large excès par rapport aux VP et constituent la principale source d'AgHBs détecté dans le sang. Cet AgHBs circulant favoriserait la chronicité en induisant un épuisement du système immunitaire. Les polymères d'acides nucléiques (NAP) sont des oligonucléotides monocaténaires. Il existe des NAP avec des caractéristiques chimiques différentes pour réduire la réactivité TLR, soit phosphorothioés, soit avec un 2'O-methyl ribose pour augmenter la stabilité ou encore avec une 5-methylcytidine. L'inhibition

de l'entrée virale par les NAP a été étudiée *in vitro*. Il existe une relation structure/activité des NAP.

L'inhibition de l'entrée virale est phosphorothioée dépendante et diminuée par le 2'O-methyl ribose (Guillot et al., 2017). Les NAP semblent surtout agir à l'étape d'entrée virale car ils n'ont pas montré d'activité antivirale après infection virale. Leur activité est indépendante de la séquence mais dépendante de leur taille et de leur hydrophobicité (Vaillant, 2016). Plus la longueur du NAP est importante (40-mer ou plus) plus son activité est élevée.

L'activité inhibitrice des NAP sur l'entrée du VHD a également été montrée *in vitro* (Beilstein et al., 2017). L'activité antivirale semble pangénotypique et n'est pas altérée pour les principaux variants d'échappement immunitaire dans le domaine S (D144A et G145R). Les NAP interfèreraient à l'étape d'attachement du VHB ou du VHD aux HSPG présents à la surface de l'hépatocyte. Le NAP REP 2139, un dérivé de REP 2055, ayant montré une meilleure tolérance est la molécule la plus étudiée à ce jour. De nouvelles données sur la caractérisation *in vitro* des effets antiviraux du REP2139 sur le cycle viral ont été récemment rapportées (Boulon et al., 2020). Cette molécule inhibe ni la transcription, ni la traduction. La sécrétion de virions infectieux n'est pas inhibée par cette molécule qui bloque de manière sélective la sécrétion d'AgHBs. L'accumulation intracellulaire de l'AgHBs semble prévenue par une dégradation par le protéasome et le lysosome.

Les résultats d'un essai thérapeutique de phase 2 chez les patients AgHBe négatif, combinant le TDF, le PegIFNα et un NAP (REP-2139 ou -2165), ont été récemment publiés et montrent l'apport du NAP pour faire diminuer l'AgHBs voire le rendre indétectable chez plus de 50% des patients (Bazinet et al., 2020). Une augmentation des transaminases (ALAT) est observée chez la quasi-totalité des patients traités par NAP et est d'autant plus marquée que le taux d'AgHBs diminue. Les résultats obtenus lors de ces études sont convaincants, cependant les cohortes étudiées restent de petite taille et les effets restent à confirmer à plus grande échelle (Sonneveld et al., 2020).

L'ALG-10133 fait partie des polymères d'oligonucléotides inhibant le transport de l'AgHBs (STOPs™), proches des NAP. Cette molécule qui agirait comme un aptamère qui interagit avec des protéines spécifiques pour diminuer la concentration d'AgHBs va être évaluée dans un premier essai clinique chez l'homme.

d. Molécule antisens

Différents ARN sont transcrits à partir de l'ADNccc et ces ARN peuvent être ciblés par différentes approches (siARN, oligonucléotides simple brin, déstabilisation de l'ARN,…). Ces approches agiraient ainsi indirectement sur l'ADNccc.

Les oligonucléotides antisens (ASO) simple brin agissent en se liant aux ARNm et déclenchent leur dégradation médiée par la RNAse H. Les ASO ciblent des transcrits conservés du virus ce qui permettrait d'augmenter la barrière à la résistance et de couvrir les différents génotypes viraux. Des résultats commencent à être disponibles pour un faible nombre de patients avec le GSK836. RO7062931 est un oligonucléotide simple brin qui cible une séquence hautement conservée dans la région 3'.

Les siARN sont des petits ARN interférents. En s'appariant par complémentarité avec leur ARNm cible, ils forment un ARN double brin qui va être pris en charge par le complexe multiprotéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex), ce qui conduit à la dégradation de l'ARNm cible qui n'est donc plus traduit en protéine. Plusieurs siARN ciblant différentes régions du génome viral sont en cours d'évaluation dans le cadre d'études cliniques ou précliniques. VIR-2218 est un siARN administré par injections sous-cutanées et ciblent la région X en amont d'un hotspot d'intégration permettant ainsi en théorie l'élimination de l'AgHBs issu de l'ADN intégré et de l'ADNccc et l'élimination de tous les ARNm du VHB qui se chevauchent dans cette région. Le siARN JNJ-3989 cible à la fois les régions S et X. Des résultats encourageants ont été récemment présentés pour ces molécules.

e. Thérapies géniques qui ciblent l'ADNccc

Des techniques d'édition du génome, fondées sur l'utilisation de nucléases sont développées pour cibler directement l'ADNccc (Bloom et al., 2018). Il existe différents types de nucléases : les nucléases à doigt de zinc, les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN, transcription activator-like effector nucleases), les nucléases Cas9 (CRISPR associated protein 9) associées au système CRISPR (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats). Les nucléases n'éliminent pas l'ADNccc mais introduisent des cassures de l'ADN qui sont réparées par les mécanismes de réparation de l'ADN. L'ADNccc est une cible de choix en raison de sa configuration sous la forme d'un minichromosome et d'une plasticité limitée. Des insertions et des délétions au sein du génome viral peuvent créer des protéines aberrantes ou tronquées qui vont interférer avec la réplication virale.

Le complexe CRISPR-Cas9 (ou « ciseaux moléculaires ») est formé d'un brin ARN guide, de séquence homologue à celle de l'ADN cible et d'une endonucléase Cas9. Le brin d'ARN reconnait l'ADN cible et l'enzyme se charge de couper l'ADN cible. La preuve de concept du système CRISPR-Cas9 à induire des mutations de l'ADNccc a été récemment décrite (Seeger and Sohn, 2016). Ces approches sont à manipuler avec une grande précaution. Un des risques encouru est de créer de nouveaux génomes viraux de signification indéterminée. A ce stade, l'effet de ces molécules d'ADNccc modifiées sur le cycle, la production antigénique et la progression de la maladie n'est pas connu.

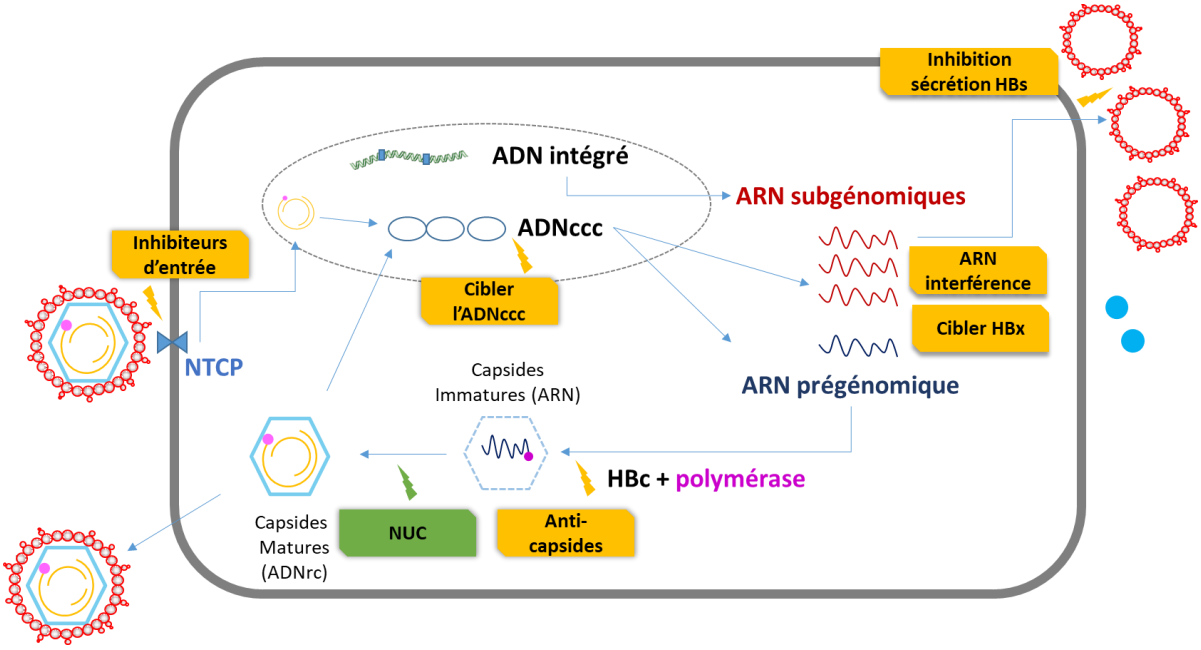


Figure 11 : Cycle viral et antiviraux à action directe actuels ou en développement.

Des combinaisons d'AAD avec différents mécanismes d'action et différentes cibles issues de l'ADNccc sont à l'étude et pourraient permettre d'obtenir une perte de l'AgHBs avec une durée finie de traitement. L'association de molécules éviterait la sélection rapide de variants résistants. Des trithérapies associant au NUC, un traitement par siARN, et un traitement par CAM semblent particulièrement intéressantes. La stimulation de la réponse immune par des antiviraux à action indirecte pourrait également contribuer à l'obtention d'une guérison fonctionnelle.

2.3.3.2. Antiviraux à action indirecte

Le rétablissement d'une réponse immunitaire efficace dirigée contre le virus est essentiel. En parallèle des AAD, des approches immunologiques sont développées afin de stimuler la réponse immunitaire. Les antiviraux à action indirecte en développement sont listés dans le tableau 5. Il existe deux principales catégories qui ciblent soit l'immunité innée (agonistes TLR) soit l'immunité adaptative (vaccin thérapeutique, …). Les cellules T CD8+ spécifiques du VHB ont à la fois une activité antivirale non cytolytique *via* la production de cytokines antivirales (TNF, IFNγ) et l'induction d'APOBEC3 et une activité cytolytique en éliminant les hépatocytes infectés. Les fonctions antivirales des cellules B et des anticorps lors d'une infection par le VHB sont la prévention de l'infection *de novo* des hépatocytes, l'élimination des hépatocytes infectés et une activité antivirale directe *via* les complexes antigène-anticorps HBs liés aux cellules dendritiques, la production de cytokines antivirales (IL-6) par les cellules B spécifiques et le rétrocontrôle négatif de l'expression de NTCP. Les réponses immunitaires adaptatives (cellules T et B spécifiques du VHB) permettent de cibler les hépatocytes infectés par le VHB et/ou les virions mais peuvent également créer des lésions tissulaires (Maini and Burton, 2019).

Mécanisme d'action	Composé	Statut
Vaccin thérapeutique	HepTcell AIC 649 INO-1800 HB-110 TG1050 VTP-300 JNJ 64300535 HBV VBI-2601 Chimigen HBV CARG-201 HBV TherVacB	Phase II Phase I Phase I Phase I Phase I Phase I Préclinique Préclinique Préclinique Préclinique Préclinique Préclinique Préclinique
Système immunitaire inné : Agonistes TLR • agoniste TLR-8 • agoniste TLR-7	 GS9688 (selgantolimod) RG7854	 Phase I Phase I
Action sur l'hôte • Inducteur d'apoptose • Inhibiteur cyclophiline	 APG-1387 CRV 431	 Phase II Phase I
Edition du génome • CRISPR/Cas9 • Plateforme ARCUS	 EBT106 HBV	 Préclinique Préclinique
Autre • Anticorps monoclonal anti-HBs • ImmTAV • Agoniste FXR • Molécule antisens ciblant l'hôte • Molécule antisens ciblant l'hôte • PD-L1 • Immunothérapie cellulaire T • MicroARN • Mort des cellules VHB dirigée par acide nucléique • "Nouveau peptide" • Microbiote oral	 GC1102 IMC-1109V EYP001 RG6084 RG6217 ASC22 (KN035) LTCR-H2-1 HBV ENOB-HB-01 GV1001 CP101	 Phase II Phase I/II Phase I Phase I Phase I Phase I Préclinique Préclinique Préclinique Préclinique Préclinique

Tableau 5 : Liste des antiviraux à action indirecte en développement.
Adapté de https://www.hepb.org/treatment-and-management/drug-watch/. Mis à jour le 11 août 2020.

L'immunité adaptative T et B spécifique anti-VHB est défectueuse chez les patients chroniquement infectés mais peut en théorie être restaurée, au moins partiellement, de manière directe ou indirecte.

Les approches directes pour restaurer l'immunité adaptative regroupent les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire comme les anti-PD1 (programmed death-1) ou les vaccins thérapeutiques et ont pour objectif de booster les réponses cellulaires T et B spécifiques du VHB existantes et/ou d'en créer de nouvelles. De nombreux candidats vaccins sont développés et utilisés seuls ou en association avec les antiviraux. L'essai le plus convaincant en matière d'efficacité a été mené *in vivo* chez la marmotte et associait un vaccin thérapeutique et un anti-PD-L1. Le vaccin thérapeutique idéal doit présenter une immunogénicité suffisante, cibler les principaux antigènes viraux. Il est essentiel également de sélectionner les patients présentant une immunité préexistante optimale.

Les protéines de point de contrôle immunitaire jouent un rôle important dans l'histoire naturelle de l'infection par le VHB. L'expression augmentée de ces marqueurs à la surface des cellules T CD8+ (PD-1, CTLA4, TIM3) et CD4+ (PD-1) chez les patients non traités réduit leurs fonctions cellulaires. La surexpression de PD-1 au cours de l'infection aiguë limiterait l'inflammation, les lésions hépatiques mais faciliterait la persistance de l'infection. Le blocage des points de contrôle immunitaire pourrait augmenter la production de cellules T CD8+ et CD4+ spécifiques du VHB au niveau hépatique, éliminer les hépatocytes infectés, ou encore faciliter la production d'anticorps anti-HBs et réduire la charge antigénique HBs circulante (Wykes and Lewin, 2018). *In vivo*, les effets du blocage de PD-1 lors de l'infection par le VHB ont été étudiés chez la souris et la marmotte. Les résultats de la première étude clinique menée chez l'homme avec le nivolumab, un anticorps anti-PD-1 administré en intraveineuse, associé ou non à un vaccin thérapeutique, ont été récemment publiés. Menée chez 22 patients AgHBe négatif, avec une réplication virale contrôlée, l'étude montre une bonne tolérance du nivolumab. La séroconversion de l'AgHBs a été observée pour un patient (Gane et al., 2019). Le risque théorique d'une hépatotoxicité due à infiltration accrue de cellules T intrahépatiques qui pourrait déclencher une inflammation importante n'a pas été mis en évidence dans les études. Un anticorps anti-PDL1 est actuellement en phase I. L'ASC22 (ou KN035) présente l'avantage de pouvoir être injecté en sous-cutané et a une bonne stabilité à température ambiante.

D'autres études sont nécessaires pour savoir si les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire utilisés seuls ou en association à d'autres classes thérapeutiques pourrait être utile dans le traitement de l'hépatite B chronique, en particulier dans le contexte du CHC.

Des approches indirectes sont développées pour restaurer une réponse adaptative spécifique efficace comme l'utilisation d'agonistes de toll-like receptors (TLR) ou une réduction de la charge antigénique. La stimulation de la réponse immunitaire innée intra-hépatique, inhibée par le VHB, pourrait permettre de rétablir une réponse efficace. Ainsi, les agonistes de TLR7 ou TLR8 sont des membres de la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR ou Pattern recognition receptor) impliqués dans l'initiation d'une réponse immunitaire innée et adaptative. Le TLR7 est principalement exprimé par les cellules B et les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Tandis que le TLR8 est exprimé par les cellules dendritiques conventionnelles, les monocytes, macrophages, neutrophiles et les Treg. Ces TLR agiraient en rétablissant la transcription des gènes de l'immunité innée. L'activation de TLR7 entraine principalement la production d'IFNα alors que l'activation de TLR-8 augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNFα ; IL1β) ou immunomodulatrices (IL-12, IL-18) et en diminuant la réplication virale. Deux agonistes de TLR sont actuellement en développement.

S'il existe des pistes pour restaurer l'immunité des patients, le défi reste entier. En cas d'impossibilité de restaurer cette immunité altérée, la supplémentation avec une source exogène d'effecteurs de l'immunité adaptative, dérivés des cellules T et B, pourrait permettre de surmonter cette limitation. Ainsi, les approches basées sur les cellules CAR-T (cellules T porteuses d'un récepteur chimérique antigénique) ou les cellules T avec TCR redirigé impliquent les cellules T du patient génétiquement modifiées. CRISPR-Cas9 a été utilisé pour éliminer le TCR endogène et ainsi améliorer l'efficacité des cellules T avec TCR redirigé. L'utilisation de ces thérapeutiques personnalisées n'est pas envisageable à large échelle. Des essais de phase I sont menés pour des CHC liés au VHB.

Toujours dans une approche de substitution de la réponse adaptative défaillante, les TCR solubles ou ImmTAV (Immune mobilising monoclonal TCRs Against Virus) forment une nouvelle classe thérapeutique, développée également pour le VIH. Ces petites molécules protéiques sont bispécifiques, composées d'un récepteur de cellule T (TCR) soluble, à affinité de l'ordre du picomolaire, dirigé contre un épitope du VHB immunodominant fusionné à un fragment variable à chaine unique anti-CD3 humanisé. La partie TCR a une affinité accrue tandis que le domaine anti-CD3 permet le recrutement et l'activation des cellules T, indépendamment de la spécificité. Elles conduisent à la reconnaissance et à l'élimination des cellules infectées par le VHB par le système immunitaire en redirigeant les cellules T

endogènes non spécifiques du VHB et en contournant les cellules T spécifiques du VHB épuisées.

Les premiers essais chez l'Homme avec le candidat ImmTAV spécifique de l'enveloppe, IMC-I109V, vont débuter (Fergusson et al., 2020).

Les anticorps thérapeutiques monoclonaux ou bispécifiques semblent également une piste intéressante. Parmi les autres pistes thérapeutiques à l'étude, on peut citer une molécule inhibitrice des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) développée pour traiter les tumeurs solides avancées et l'infection chronique par le VHB. APG-1387 peut se lier à la fois aux monomères et aux dimères des protéines IAP. Lors d'études précliniques, l'APG-1387 a démontré une puissante activité anti-tumorale et la capacité d'éliminer les antigènes de surface du VHB. Le récepteur Farnesoid X (FXR) est un facteur d'hôte et représente aussi une cible thérapeutique intéressante. Ce récepteur nucléaire hépatique favorise la réplication du VHB. Une équipe lyonnaise a montré, *in vitro* et *in vivo,* que la multiplication virale est réprimée en cas d'inhibition de l'expression de FXR ou lors de son activation *via* des molécules agonistes mimant l'action des sels biliaires (Mouzannar et al., 2019). EYP001 est un agoniste du (FXR) non dérivé des acides biliaires actuellement en phase II.

Nous nous dirigeons donc vers une stratégie thérapeutique personnalisée. La combinaison de différentes approches thérapeutiques directes et indirectes sera probablement nécessaire pour atteindre l'objectif de guérison fonctionnelle de l'infection.

2.4. Prévention de la transmission

2.4.1. Vaccination

L'infection par le VHB peut être prévenue par la vaccination. Les premiers résultats d'une vaccination anti-VHB ont été publiés en 1976 par l'équipe de Philippe Maupas à Tours. Ce vaccin a été préparé à partir d'antigène *Australia* purifié issu de donneurs de sang. Dix ans plus tard, un vaccin obtenu par génie génétique fut commercialisé. Ce vaccin injectable permet de prévenir à la fois l'infection par le VHB mais aussi par le VHD. Le vaccin contre le VHB fut le premier vaccin disponible pour prévenir la survenue d'un cancer. L'impact positif de la vaccination universelle des nourrissons a été rapportée à Taiwan, pays endémique, avec une diminution du taux de CHC liés au VHB chez les enfants et les jeunes adultes (Chang et al., 2016). L'objectif de l'OMS d'élimination des hépatites virales d'ici 2030 repose en partie sur la généralisation de la vaccination contre le VHB. Les vaccins contre le VHB possèdent une bonne immunogénicité. La présence d'anticorps anti-HBs à un seuil protecteur (>10 mUI/ml) est observée chez plus de 90% des sujets après un schéma vaccinal complet.

2.4.2. Prophylaxies antivirale et post-exposition

2.4.2.1. Prophylaxie antivirale

Des données de modélisation suggèrent que la vaccination du nourrisson seule ne serait pas suffisante pour atteindre l'objectif fixé d'une prévalence de 0.1% de l'AgHBs chez les enfants d'ici 2030 et que la prophylaxie antivirale pourrait être nécessaire (Nayagam et al., 2016). Selon les recommandations européennes, une prophylaxie antivirale par TDF est actuellement indiquée chez la femme enceinte ayant une forte charge virale (ADN-VHB > 200 000 UI/ml ou 5.3 log UI/ml) ou un AgHBs > 4 log UI/ml. Elle est instaurée avant le début du troisième trimestre de grossesse (vers 24-28 semaines) et poursuivie jusqu'à 12 semaines après l'accouchement dans le but de réduire la charge virale avant l'accouchement et ainsi de prévenir la transmission (Lampertico et al., 2017). Les recommandations de l'OMS récemment actualisées préconisent aussi le traitement antiviral de toutes les femmes enceintes de la 28ème semaine de grossesse jusqu'à la naissance en cas d'ADN-VHB > 200 000 UI/ml

ou d'AgHBe positif dans la situation où la quantification de l'ADN du VHB n'est pas disponible.

2.4.2.2. Prophylaxie post-exposition

Les immunoglobulines anti-HBs sont des anticorps polyclonaux dirigés contre la boucle AGL de la protéine S, issus de plasma humain. En se liant et en neutralisant les virions circulants, l'administration d'immunoglobulines anti-HBs prévient l'infection hépatocytaire. Cette immunisation passive est recommandée dans deux situations cliniques, la prévention de la transmission mère-enfant du virus et la prévention de la réinfection du greffon après transplantation hépatique. La prophylaxie post-exposition est recommandée chez tous les nouveau-nés nés de mère infectée par le VHB. Que la femme enceinte soit traitée ou non durant sa grossesse, une sérovaccination doit être réalisée impérativement, idéalement dans les 12 heures qui suivent la naissance. Les immunoglobulines anti-HBs sont recommandées en combinaison avec la vaccination du nouveau-né.

Dans le contexte de la transplantation hépatique, l'administration au long cours d'immunoglobulines anti-HBs associée à un NUC permet de prévenir la réinfection du greffon hépatique par le VHB. L'efficacité de cette immunisation passive a été démontrée dès 1993 par Samuel et al. dans une étude rétrospective (Samuel et al., 1993). Cependant, leur utilisation est restreinte d'une part par le coût et d'autre part par une disponibilité limitée, le temps de préparation et le manque d'efficacité contre certains variants de la protéine S. Pour surmonter ces limitations, des anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre le domaine préS1 sont en cours de développement. La capacité de l'anticorps monoclonal humanisé KR127 à neutraliser l'infection a été démontrée *in vivo* chez le chimpanzé (Hong et al., 2004). Plus récemment, les anticorps humanisés KR127-3.2 et KR359-1 ont montré une activité de neutralisation supérieure *in vitro* et une action sur différents génotypes (Kim et al., 2015; Wi et al., 2017). Le développement récent de formes injectables sous-cutanées avec des demi-vies longues participe également à une meilleure prise en charge de la prévention de la récidive sur le greffon.

3. DIAGNOSTIC ET SUIVI VIROLOGIQUE DE L'INFECTION

3.1. Marqueurs actuels

3.1.1. AgHBs/AcHBs

3.1.1.1. Antigène HBs

Le dépistage d'une infection par le VHB repose sur 3 marqueurs détectés par technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): l'antigène HBs (AgHBs), l'anticorps anti-HBs (AcHBs), et les anticorps anti-HBc totaux (AcHBc).

L'AgHBs, largement produit à tous les stades de l'infection, est un marqueur clé pour le diagnostic de l'infection par le VHB. Après la période d'incubation, l'AgHBs est détecté quelques jours après l'ADN. Le passage à la chronicité de l'infection est défini par une persistance de plus de 6 mois de l'AgHBs sérique. La quantification de l'AgHBs a émergé en pratique clinique devant la facilité de son dosage et son lien, même imparfait, avec l'ADNccc, marqueur inaccessible sans ponction biopsie hépatique, un geste particulièrement invasif, mal standardisé et relégué au second plan derrière les marqueurs de fibrose. Ce dosage est standardisé avec un résultat exprimé en UI/ml et une limite inférieure de quantification avec les tests actuels autour de 0,05 UI/ml.

Chez les patients AgHBe positif non traités, la concentration d'AgHBs est le plus souvent élevée. Chez les patients, naïfs de traitement, AgHBe négatif, avec une réplication virale élevée ou une fibrose hépatique avancée, la quantification de l'AgHBs a un rôle limité dans la décision de mise sous traitement qui s'impose devant le risque de progression de la maladie. Chez les patients AgHBe négatif ayant un faible niveau de réplication virale (< 2000 UI/ml), la concentration d'AgHBs donne des renseignements sur l'activité de la maladie et le pronostic. La quantification de l'AgHBs est utile pour mieux caractériser le portage inactif du VHB. Ainsi un niveau d'AgHBs inférieur à 100 UI/ml associé à une faible réplication virale permettaient d'identifier les porteurs inactifs, quel que soit le génotype viral (Brouwer et al., 2016). La probabilité de perdre l'AgHBs au cours du suivi est plus importante parmi ces patients.

Chez les patients AgHBe positif, traités par PegIFNα, l'AgHBs quantitatif est un marqueur sérique prédictif important de la réponse au traitement. Un AgHBs < 1500 UI/ml à

la semaine 12 (S12) serait prédictif d'une réponse au traitement (séroconversion HBe et ADN < 2000 UI/ml 6 mois après l'arrêt du traitement) et incite à poursuivre le traitement.

A l'inverse, des règles d'arrêt du traitement sont définies en fonction du niveau d'AgHBs retrouvé à la semaine 12 ou à la semaine 24 (S24) dans le dernier algorithme de l'EASL (European Association for the Study of the Liver). Les indications d'arrêt du traitement par PegIFNα sont définies, en fonction du génotype, à S12. Pour les génotypes A et D, il faut tenir compte d'une absence de déclin de l'AgHBs à S12 tandis que pour les génotypes B et C, un AgHBs > 20 000 UI/ml à S12 est prédictif d'un échec. A S24, quel que soit le génotype, tout AgHBs > 20 000 UI/ml conduira à un arrêt thérapeutique.

Chez les patients traités par NUC, le suivi de ce paramètre pourrait être utile pour identifier les patients pour qui une clairance de l'AgHBs peut être obtenue, le temps nécessaire pour l'atteindre et prédire les patients qui vont maintenir une réponse virologique soutenue à l'arrêt du traitement (Cornberg et al., 2017). Chez les patients AgHBe positif, une diminution de plus d'un log après 12 à 48 semaines de traitement est associée à une perte de l'AgHBs. Chez les patients AgHBe négatif, le déclin de l'AgHBs est extrêmement lent. Un taux d'AgHBs inférieur à 100 UI/ml pourrait guider l'arrêt des NUC après un traitement de 3 ans minimum.

Plusieurs facteurs ont une influence sur les concentrations d'AgHBs mesurées : le génome viral, les interactions hôte-virus ou les coinfections.

3.1.1.2. Anticorps anti-HBs

Les anticorps anti-HBs sont des anticorps neutralisants, dirigés contre l'AgHBs, qui confèrent une protection contre l'infection. Ils sont présents chez les patients qui développent une immunité vaccinale après un schéma de vaccination bien conduit ou chez les patients lors d'une infection aiguë en cours de résolution. Ces anticorps ne sont pas détectés chez la majorité des patients chroniquement infectés. Après vaccination, un taux d'anticorps anti-HBs > 10 UI/L est considéré comme protecteur. Chez les patients transplantés hépatiques recevant une immunisation passive par immunoglobulines anti-HBs, le taux d'anticorps anti-HBs souhaité est supérieur ou égal à 50-100 UI/L.

3.1.2. AgHBe/AcHBe

Avant de disposer de tests de quantification de l'ADN du VHB, l'AgHBe sérique a longtemps été utilisé comme un marqueur de réplication virale. En cas de mutant préC, l'AgHBe est négatif avec une charge virale qui reste élevée.

Ce marqueur sert actuellement à définir dans quelle phase de l'histoire naturelle de l'infection se trouve le patient. Les tests utilisés pour les dosages de l'antigène et de l'anticorps HBe sont qualitatifs, même si un standard existe pour la quantification de l'AgHBe. L'utilité de la quantification de l'AgHBe n'a pas été démontrée en pratique courante. L'AgHBe est détecté précocement au cours de l'infection aiguë. La disparition de l'AgHBe et surtout l'apparition d'anticorps anti-HBe (AcHBe) sont signe d'une évolution favorable et s'associent à une diminution importante de la réplication virale.

3.1.3. AcHBc (IgM et Anticorps totaux)

Les anticorps anti-HBc qualitatifs sont un marqueur sérologique classique de l'infection par le VHB. La présence de ces anticorps totaux signe un contact avec le virus et permet de distinguer parmi les patients AgHBs négatif, ceux qui possèdent une immunité acquise suite à une infection résolutive (AcHBc positifs) des patients vaccinés (AcHBc négatif). Malgré le fait que l'AgHBc soit très immunogène, il n'y a pas de test validé pour le détecter seul dans le sérum. L'AgHBc est uniquement visualisé dans les hépatocytes par immunomarquage de coupes de foie. A l'exception de patients très immunodéprimés, les anticorps anti HBc sont présents chez les patients avec un contact présent ou passé avec le virus, y compris chez des patients qui ne développent pas d'autre réponse immune (anti-HBs par exemple) (Avettand-Fenoel et al., 2006). Les tests usuels pour la détection de ces anticorps détectent principalement les IgG mais également les autres classes d'immunoglobulines. Il existe un test quantitatif pour le dosage des anticorps anti-HBc (cf. 3.2.5 Anticorps anti-HBc quantitatif).

La détection d'IgM anti-HBc dans un contexte de cytolyse hépatique importante correspond le plus souvent à une hépatite B aiguë mais il est parfois difficile de distinguer une infection aiguë d'une réactivation virale en présence de ces IgM anti-HBc.

3.1.4. ADN-VHB

La détection/quantification d'ADN du VHB (charge virale VHB) signe une réplication virale active. Plusieurs trousses commerciales existent pour ce dosage. L'ADN-VHB est un marqueur intéressant qui est corrélé au risque de développer une cirrhose ou un CHC. Ce marqueur est un critère pour l'initiation d'un traitement antiviral. Sous NUC, la majorité des patients ont une charge virale indétectable qui est le témoin d'une bonne observance du patient et d'une bonne efficacité thérapeutique. D'autres marqueurs seraient ainsi utiles dans la prise en charge des patients traités. La quantification de l'ADN viral ne se substitue pas à celle de l'AgHBs. Les résultats doivent être interprétés ensemble.

3.1.5. Marqueurs actuels et thérapeutiques en développement

Avec le développement de nouvelles thérapeutiques qui ciblent différentes étapes du cycle de réplication du VHB, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'AgHBs est importante pour pouvoir interpréter les résultats aux différentes phases de la maladie. La perte de l'AgHBs associée à une charge virale indétectable 6 mois après la fin du traitement est l'objectif principal fixé pour les essais de phase III. Idéalement, le taux de réponse souhaité dans ces essais est une perte de l'AgHBs chez plus de 30% des patients après 1 an sous traitement (Cornberg et al., 2020).

Avec les CAM, une diminution de l'ADN-VHB est observée mais il n'y a pas d'effet sur les concentrations d'AgHBs après 28 jours de traitement en monothérapie (Yuen et al., 2019; Zoulim et al., 2020).

Les NAP REP2139 ou REP2165 combinés au TDF et au PegIFNα pendant 48 semaines chez des patients AgHBe négatif, naïfs de NUC ont permis d'obtenir et de maintenir l'indétectabilité de l'ADN et de l'AgHBs chez 39% des patients.

L'ARC-520, un des premiers siARN à faire l'objet d'essais cliniques, s'est avéré efficace pour réduire l'AgHBs chez les patients AgHBe positifs. Cet effet sur l'AgHBs n'est pas retrouvé chez les patients AgHBe négatifs ou sous NUC, ce qui souligne l'importance de l'AgHBs circulant issu du génome intégré.

Des résultats préliminaires avec des siARN de deuxième génération, JNJ-3989 et AB-729 suggèrent une diminution de l'AgHBs quel que soit le statut vis-à-vis de l'AgHBe.

Récemment, dans un essai contrôlé, randomisé, en double aveugle, une diminution de l'AgHBs dose dépendante a été observée chez tous les patients sous NUC depuis plus de 6 mois et traités par VIR-2218, un siARN qui cible X.

Au dernier congrès de l'EASL, les données d'un autre essai contrôlé, randomisé, en double aveugle ont été présentées avec l'ASO modifié GSK836 administrés chez des patients naïfs (n=12) ou déjà traités par NUC (n=5). Après 6 injections sous-cutanées, l'effet sur le VHB a été évalué au 29ème jour. Une diminution de plus de 2 log de l'ADN a été observée chez 5 des 12 patients naïfs tandis qu'une diminution de l'AgHBs supérieure à 3 log était observée chez 3/12 patients. La perte de l'AgHBs a été obtenue chez 4 patients après 28 jours de traitement. Le maintien d'un AgHBs indétectable a été observé pour 2 patients.

Les données de phase 2, d'efficacité et de sécurité, d'un traitement *per os* chez 48 patients efficacement traités (AgHBe positif ou négatif), par le selgantolimod (GS-9688), agoniste de TLR-8, ont été récemment présentées et montrent une diminution modeste de l'AgHBs maintenue pendant au moins 24 semaines après l'arrêt du traitement, une perte de l'AgHBs dans 5% des cas, une perte de l'AgHBe dans 16% des cas.

3.1.6. Limites des marqueurs actuels

La prise en charge de l'hépatite B chronique reste complexe. Si tous les patients infectés ne vont pas développer de complications, il convient d'identifier les patients à risque de complications, ceux qui nécessite l'initiation d'un traitement antiviral ou d'un suivi rapproché.

Les marqueurs actuels, principalement l'ADN viral, les antigènes HBs, HBe et leurs anticorps respectifs, ne donne qu'une image globale. Une caractérisation plus fine à l'aide d'autres marqueurs sanguins, faciles à doser pourrait expliquer des vitesses de progression variables interindividuelles ou selon les phases de l'infection.

Les taux d'AgHBs dépendent d'une interaction biologique complexe entre l'hôte et le virus qui doit être prise en compte et qui rend difficile l'interprétation des valeurs d'AgHBs mesurées chez les patients. Les concentrations d'AgHBs mesurées peuvent être influencées par le niveau de réplication virale, le génotype, les variants préS/S, l'intégration du génome, la circulation d'immunocomplexes antigène/anticorps HBs mais aussi de l'état immunitaire du patient, de la durée de l'infection, du stade de la maladie hépatique ou encore des coinfections virales (Cornberg and Glebe, 2020).

Les traitements actuels basés sur les NUC bloquent la synthèse de l'ADN viral et par conséquence des virions. En pratique, cette inhibition se traduit par une négativation de la charge virale plasmatique et à une réduction constante mais lente de l'AgHBs sous traitement (Chevaliez et al., 2013). Pour la majorité des patients efficacement traités, aucun marqueur classique n'est alors prédictif du pronostic du patient. Les taux d'AgHBs sont mal corrélés aux taux d'ADNccc intrahépatique chez les patients AgHBe négatif. L'AgHBs quantitatif est ainsi un mauvais reflet de l'ADNccc chez ces patients et ne permet pas de distinguer la part d'AgHBs issu de la transcription de l'ADNccc de celle issue de séquences intégrées qui représentent parfois une part importante de l'AgHBs circulant (Wooddell et al., 2017). Nous ne disposons pas non plus de technique standardisée de quantification de l'ADNccc intrahépatique. La quantification de l'ADNccc permet une estimation de la taille du réservoir viral, cible des nouvelles thérapeutiques à visée curative. La nécessité de disposer d'une biopsie hépatique est également un frein important. Comme pour la prise en charge de l'hépatite C, ce geste invasif pose un problème éthique alors que des antiviraux efficaces peuvent aujourd'hui être administrés sans diagnostic histopathologique préalable.

Les traitements en développement administrés seuls ou associés aux traitements actuels permettent chez certains patients de diminuer l'ADN-VHB voire de le rendre indétectable. Nous aurons alors la même problématique de suivi des patients traités par ces nouveaux antiviraux qu'avec les traitements actuels. De nouveaux marqueurs sont nécessaires pour identifier les patients qui vont guérir sous traitement. Pour les patients qui vont perdre l'AgHBs, il convient de s'assurer que l'AgHBs rendu négatif n'est pas dû à un problème de sensibilité des tests actuellement utilisés.

3.2. Nouveaux biomarqueurs

3.2.1. Quantification standardisée de l'ADNccc

La quantification de l'ADNccc constitue un réel défi technique. Le nombre de copies d'ADNccc par cellule infectée est faible (environ 10 copies) en regard des formes intermédiaires de réplication (ADNrc, ADN double brin linéaire et ADN simple brin) qui partagent des séquences communes avec l'ADNccc et qui sont en quantité dix à cent fois plus importante. De plus, la structure même de l'ADNccc le rend particulièrement résistant à la dénaturation par la chaleur et donc difficile à amplifier par PCR. L'ADNccc peut être détecté par southern blot après extraction. Ainsi, l'ADNccc peut être séparé de l'ADNrc par électrophorèse (Cai et al., 2013). La limite inférieure de détection de cette technique est relativement élevée (10^5-10^6 copies d'ADNccc). De plus, les contrôles sont limités pour garantir le dépôt de l'ADN ou l'efficacité du transfert ce qui limite la quantification précise de l'ADNccc.

La quantification standardisée de l'ADNccc fait l'objet d'un projet de recherche international, à l'initiative de l'ANRS et du DZIF (centre allemand de recherche sur les maladies infectieuses), soutenu par ICE-HBV (International Coalition to Eliminate HBV). L'objectif étant de développer des protocoles fiables en comparant les différentes méthodologies et en explorant de nouvelles stratégies pour améliorer la spécificité vis-à-vis de l'ADNccc des PCR. D'autres méthodes que le southern blot sont actuellement utilisées impliquant soit une étape de traitement par l'exonucléase T5, soit la combinaison des exonucléases I et III, de manière à réduire ou hydrolyser complètement tous les ADN, sauf l'ADNccc, y compris l'ADN cellulaire (Allweiss et al., 2018; Luo et al., 2017; Qu et al., 2018).

Très récemment, une nouvelle méthode de quantification de l'ADNccc, appelée (cinq)PCR (cccDNA inversion quantitative PCR), a été proposée (Tu et al., 2020). En utilisant une série de réactions de digestion, de restriction et de ligation, l'ADNccc est spécifiquement converti en un fragment d'ADN linéaire inversé qui peut être amplifié efficacement par PCR. Cette approche contrairement aux précédentes méthodes apparaît plus sensible (10 copies) et a l'avantage de préserver l'ADN cellulaire. Ainsi, une normalisation par rapport à un gène cellulaire est possible. L'utilisation d'une plaque 96 puits permet de traiter un nombre important d'échantillons.

Cependant cette méthode nécessite un temps technique assez long et est limitée au clone « Galibert » et aux génotypes D ce qui empêche actuellement son utilisation pour l'analyse d'échantillons de patients. La quantification standardisée de l'ADNccc permettrait notamment d'apprécier l'efficacité des traitements lors d'essais cliniques.

3.2.2. Nouveaux tests AgHBs (ultrasensible, isoformes)

De nouveaux tests sont commercialisés offrant une meilleure sensibilité, avec une limite inférieure de quantification de 0,005 UI/ml. La pertinence clinique de ces tests reste à déterminer.

La composition des différentes isoformes de l'AgHBs varie selon les phases de l'infection (Petit et al., 1990). Les anticorps utilisés pour le dosage de l'AgHBs reconnaissent principalement le déterminant « a », commun aux trois protéines d'enveloppe qui sont détectées sans être distinguées par les tests utilisés en pratique clinique. Ainsi, la détection et la quantification des trois isoformes de l'AgHBs est proposée comme nouveau marqueur pour le suivi personnalisé de l'infection. La proportion de grande (LHBs) et moyenne (MHBs) protéines d'enveloppe est plus faible chez les porteurs d'une infection chronique inactive ce qui permettrait de les différencier clairement des patients ayant une hépatite chronique active (Pfefferkorn et al., 2018). Très récemment, cette même équipe a rapporté que la composition en AgHBs, en particulier la quantification de MHBs avant la mise sous traitement, serait un marqueur prédictif précoce de la perte de l'AgHBs chez les patients AgHBe positif traités (Pfefferkorn et al., 2020). Sous traitement, une diminution progressive des concentrations en protéines LHBs et MHBs précède la perte de l'AgHBs. Les tests ne permettent pas de distinguer l'AgHBs produit par les particules virales infectieuses, ou par les particules sous-virales ou encore issu de séquences intégrées.

3.2.3. Hepatitis B core related Antigen (HBcrAg)

L'hepatitis B core related antigen (HBcrAg) est un marqueur composite qui détecte mais sans faire la distinction trois protéines dénaturées, HBe, HBc et p22cr (Kimura et al., 2002). Ces 3 protéines partagent une séquence commune qui est reconnue par 3 anticorps de capture après un prétraitement de l'échantillon (Figure 12). En théorie, chez les patients AgHBe négatif, ce dosage détecte HBc et p22cr, bien que la détection d'AgHBe issu de complexes immuns soit possible en théorie. Les résultats de ce test quantitatif sont exprimés en log U/ml. La limite de détection annoncée est de 2 log U/ml. Les valeurs d'HBcrAg sont quantifiées entre 3 et 7 log U/ml.

Le marqueur HBcrAg présente plusieurs avantages. Premièrement, il a été récemment montré que ce marqueur est corrélé à l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc (Testoni et al., 2019). Ainsi, on peut apprécier l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc sans recourir à une biopsie hépatique. L'HBcrAg peut être positif chez des patients ayant une charge virale indétectable ou un AgHBs négatif (Suzuki et al., 2009). Deuxièmement, un atout majeur de ce dosage est que les protéines dosées par le marqueur HBcrAg ne proviennent pas de séquences virales intégrées, contrairement à l'AgHBs.

L'AgHBe étant dosé par ce marqueur, les taux d'HBcrAg sont de fait plus élevés chez les patients AgHBe positif. Une des limites de ce test est de ne pas distinguer le signal HBcrAg lié à cet AgHBe du signal lié à la détection de l'AgHBc. Une autre limite est que parmi les patients AgHBe négatif, seul 30 à 50% d'entre eux sont positifs pour ce marqueur. Enfin, la spécificité des valeurs comprises entre 2 et 3 log U/ml est remise en question (68% de spécificité pour un seuil à 2 log U/ml) (Charre et al., 2019).

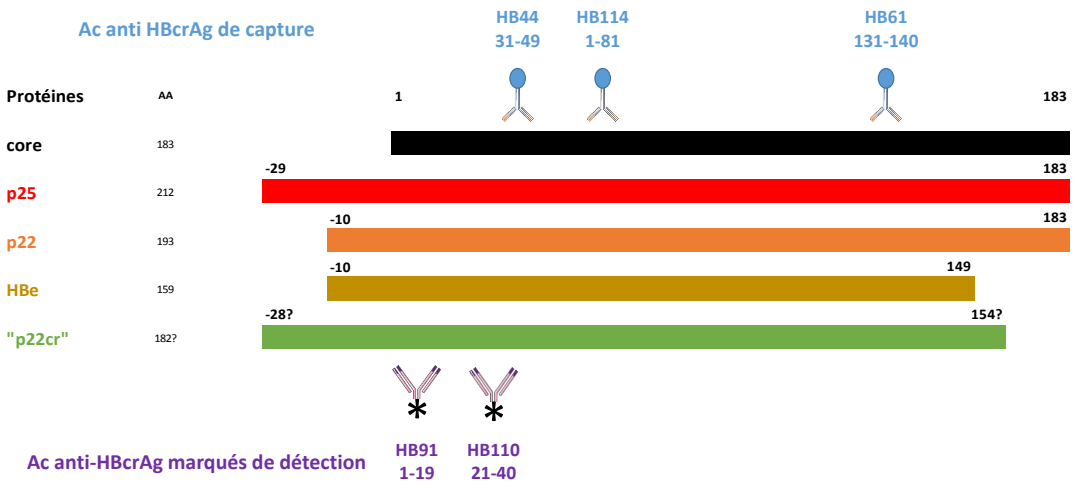


Figure 12 : Position des anticorps de capture et de détection utilisés dans le test HBcrAg.

3.2.4. Détection/Quantification des ARN du VHB circulants

La détection et /ou quantification des ARN du VHB fait partie des marqueurs émergents pour suivre le niveau et l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc intrahépatique. Un nombre croissant de travaux suggère le potentiel de l'ARN-VHB sérique circulant pour le suivi de l'infection, le traitement et le pronostic. Plusieurs approches ont été proposées pour mesurer ces ARN par différentes équipes (Figure 13). Deux stratégies principales sont utilisées. La première cible la région 5' de manière à amplifier préférentiellement les ARN de 3,5 kb (ARNpg et ARNm préC) (Butler et al., 2018; Jansen et al., 2016; Wang et al., 2016). La seconde cible l'extrémité 3' commune aux différents transcrits à l'exception des ARN tronqués qui nécessite d'utiliser d'autres amorces (van Bömmel et al., 2015; van Campenhout et al., 2018). Actuellement, il n'existe aucune technique standardisée ou commercialisée pour mesurer l'ARN-VHB. La plupart des techniques requiert un traitement à la DNase. Le traitement à la DNase n'est absolument pas garant d'une élimination totale de l'ADNrc souvent présent avec un facteur 100 à 10 000 fois en excès par rapport à l'ARN, selon le contexte (Hu and Liu, 2017). Il est primordial d'avoir les contrôles qui permettent de vérifier si de l'ADN résiduel n'est pas encore présent après traitement. Sinon, cet ADN peut être quantifié en plus ou à la place de l'ARN car les tests décrits passent le plus souvent par une étape de transcription inverse puis par l'amplification de l'ADN complémentaire. La quantification de l'ARN est souvent calculée indirectement à partir d'une courbe de calibration d'ADN. Cette hétérogénéité des protocoles utilisés pour la détection/quantification des résultats rend complexe l'interprétation des résultats et leurs comparaisons en fonction de la technique utilisée. De plus, la quantification des ARN semble varier en fonction du génotype viral, de la présence de mutations précore ou dans le BCP (Prakash et al., 2018; van Campenhout et al., 2018). La sensibilité de ces tests est à améliorer. La limite de détection annoncée est entre 1,85 et 3,4 log copies/ml selon le test. Un test automatisé basé sur la détection de deux cibles (core et X) a été récemment développé pour le système Abbott m2000 avec une limite de détection de 1,65 log U/ml (Butler et al., 2018). Si ce marqueur semble prometteur, il ne faut cependant pas négliger la possibilité d'une transcription d'ARN tronqués à partir de séquences intégrées qui si elle n'est pas anecdotique, pourrait constituer une limite à ce marqueur qui ne reflèterait pas uniquement l'ADNccc mais aussi la part d'intégration (Hu and Liu, 2017). Ce constat rejoint la problématique observée avec l'AgHBs.

Très récemment, Huang et al. présentent avec un faible effectif une nouvelle approche d'étude du renouvellement de l'ADNccc basée sur le pourcentage d'ARN-VHB présentant la substitution rtM204I/V (Huang et al., 2020). Cette substitution signature d'une résistance à la lamivudine et à la telbivudine retrouvée au niveau de l'ARN est corrélée à l'ADNccc suggérant que la composition de l'ARN sérique pourrait servir de reflet de la composition de l'ADNccc.

En somme, des études cliniques sont nécessaires pour mieux définir la composition de l'ARN-VHB sérique dans différentes situations, telles que les différentes phases de l'histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB, sous traitement antiviral par NUC ou PegIFNα, ainsi qu'avec les nouvelles thérapeutiques en développement. La technique de détection/quantification de l'ARN-VHB et de quantification de l'ADNccc doivent être standardisées pour pouvoir comparer les résultats des différentes études. Devant la multiplicité d'espèces d'ARN-VHB circulantes potentielles, la technique consensus idéale pour l'ARN devrait permettre de détecter toutes les espèces possibles d'ARN et être pangénotypique.

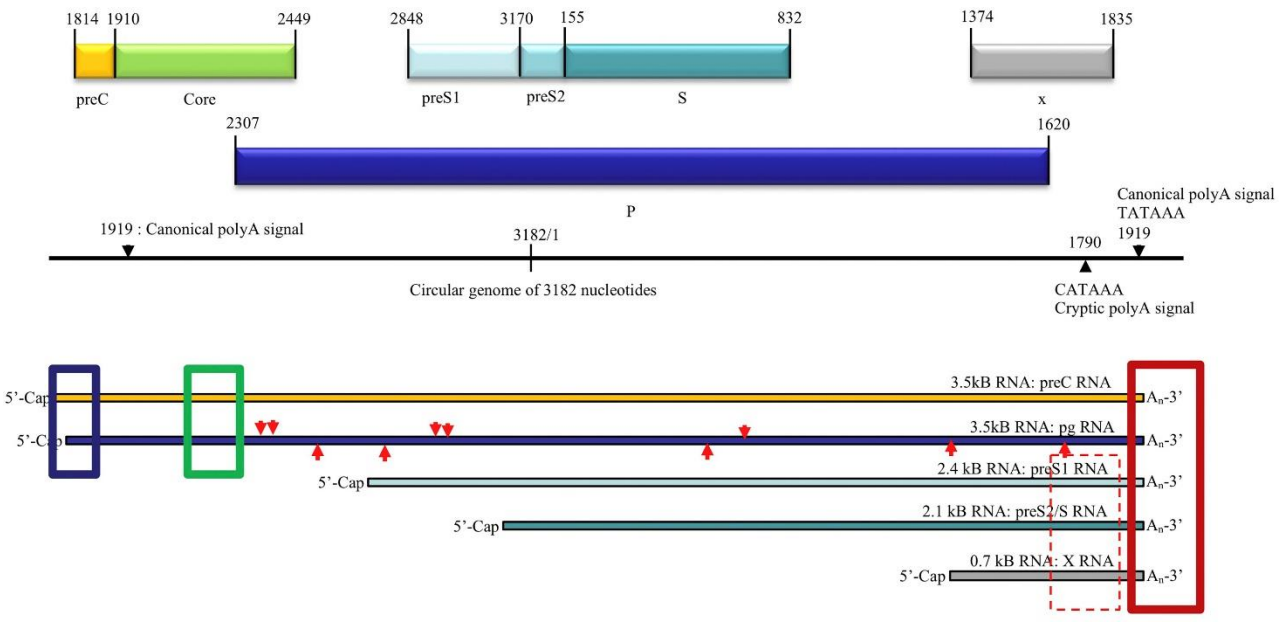


Figure 13 : Stratégies de détection/quantification des ARN du VHB circulant.
(Charre et al., 2019)

3.2.5. Anticorps anti-HBc quantitatif (IgG)

Les anticorps anti-HBc quantitatifs en particulier de type IgG pourraient être un marqueur supplémentaire utile pour aider à distinguer les phases de l'infection, prédire la réponse aux traitements actuels et le risque de réactivation à l'arrêt des NUC ou chez les patients immunodéprimés. Le titre anti-HBc corrèle avec l'histoire naturelle de l'infection. Le taux de ces anticorps est plus élevé durant les phases « hépatites » que durant les phases « infection » (Yuan et al., 2015). Le titre anti-HBc corrèle avec le niveau des transaminases et la réponse aux traitements. Il serait ainsi le témoin d'une réponse immunitaire continue de l'hôte contre le virus. Les autres applications de ce marqueur sont développées dans un paragraphe suivant (3.2.6.1.c prédiction de la réactivation).

3.2.6. Place des nouveaux marqueurs

3.2.6.1. Nouveaux marqueurs et histoire naturelle de la maladie

a. <u>Classification des patients</u>

Idéalement, l'association des nouveaux marqueurs aux marqueurs classiques devrait permettre de déterminer plus précisément et plus rapidement la phase de l'infection où se situe le patient et cela dès le premier dosage. Cela éviterait de devoir réitérer les dosages d'ALAT et d'ADN-VHB à différents temps, en particulier chez les patients AgHBe négatif, pour discriminer une phase d'infection inactive dont le suivi peut être espacé, d'une phase d'hépatite évolutive qui doit être plus suivie et rentre dans les indications thérapeutiques actuelles. Le biomarqueur idéal est un marqueur qui reflète parfaitement la quantité d'ADNccc intrahépatique mais surtout son activité transcriptionnelle sans être influencée par l'intégration virale.

Ainsi, l'HBcrAg apparait comme un bon candidat. Les patients présentant un taux d'HBcrAg sérique négatif (inférieur à 3 log U/ml) ont une quantité et une activité de l'ADNccc moindre que les patients positifs pour l'HBcrAg (Testoni et al., 2019). Les concentrations sériques d'HBcrAg varient significativement selon les différentes phases de l'infection chronique (Seto et al., 2014). Certaines études rapportent une meilleure classification des patients avec ce marqueur qu'avec l'AgHBs quantitatif (Riveiro-Barciela et al., 2017). Les valeurs d'HBcrAg sont plus élevées chez les patients AgHBe positif que chez les patients AgHBe négatif aussi bien dans les cohortes asiatiques qu'européennes

(Maasoumy et al., 2015). Dans les phases AgHBe positif, l'HBcrAg est plus élevé dans la phase infection que dans la phase hépatite. L'inverse est retrouvé dans les phases AgHBe négatif ce qui laisse penser que ce marqueur serait prédictif de la nécroinflammation et de la fibrose chez ces patients. Il faut noter qu'environ la moitié des patients AgHBe négatif non traités sont positifs pour ce marqueur. Dans une étude asiatique, l'HBcrAg est majoritairement négatif chez les patients qui sont à la phase AgHBs négatif. Toutefois 21% des 55 patients ont un HBcrAg détecté (Seto et al., 2014, 2013).

Concernant le marqueur ARN-VHB, de nombreuses études retrouvent une corrélation significative entre l'ADN et l'ARN chez les patients non traités (Liu et al., 2019). Une corrélation plus importante entre l'ADN et l'ARN chez les patients AgHBe négatif par rapport aux patients AgHBe positif est retrouvée par Huang et al (Huang et al., 2018). Tandis qu'une autre étude rapporte une corrélation équivalente entre ces patients (van Campenhout et al., 2018). L'ARN-VHB semble modérément corrélé à l'AgHBs chez les patients AgHBe positif. En revanche, il n'y a pas ou peu de corrélation entre l'ARN-VHB et l'AgHBs chez les patients AgHBe négatif (Huang et al., 2018; van Campenhout et al., 2018). La raison avancée est que chez ces patients AgHBe négatif, l'AgHBs serait majoritairement issu de la forme intégrée plutôt que de l'ADNccc. La corrélation entre les deux nouveaux marqueurs, ARN et HBcrAg, a été moins étudiée. Rokuhara et al. rapportent sur un faible effectif (24 patients) une corrélation entre ces marqueurs ($r=0,841$, $p < 0,001$) à l'initiation d'un traitement par lamivudine.

Les différentes études qui ont évalué l'utilité des nouveaux marqueurs pour une meilleure classification des patients sont résumées dans le tableau 7. La combinaison des marqueurs classiquement utilisés et des nouveaux marqueurs pourrait permettre de mieux déterminer dans quelle phase se situent les patients (Tableau 6).

	Infection chronique AgHBe +	Hépatite chronique AgHBe +	Infection chronique AgHBe -	Hépatite chronique AgHBe -	Guérison fonctionnelle
Fibrose	Minimale	Variable (progressive)	Variable (progressive)	Modérée à sévère	Variable (séquelles des phases précédentes)
Infiltrat inflammatoire hépatique	Absent	Elevé	Absent/modéré	Modéré	Absent
ADNccc	+++++	+++++	++	+++	±
Risque de progression de la maladie	Minime	Oui	Minime	Oui	Aucun
ALAT	Normal	Élevé	Normal / ±	Élevé	Normal
ADN-VHB	Très élevé	Elevé	<2000 – 20000 UI/ml	> 2000 – 20000 UI/ml	Indétectable
q AgHBs	Elevé	Intermédiaire	Faible	Intermédiaire	Négatif
HBcrAg	Très élevé	Elevé	Intermédiaire	Faible	Indétectable
ARN-VHB	Très élevé	Élevé	Élevé/intermédiaire	Intermédiaire/faible	
q anti-HBc	Faible	Élevé	Faible	Elevé	Positif
L-HBs			Faible	Elevé	

Tableau 6 : Évolution attendue des marqueurs classiques et nouveaux lors de l'histoire naturelle de la maladie.
d'après (Siederdissen et al., 2018)

Situation étudiée	Intérêt potentiel	Population étudiée	Marqueur	Mesure	Conclusion de l'étude	Référence
Histoire naturelle	Aide à la classification des patients	N=404 (5 phases de l'infection chronique représentées) Asiatique	HBcrAg	Durant le suivi	Taux significativement différents selon les phases de l'infection	(Seto et al., 2014)
	Reclassification des patients ?	N=329 Asiatique AgHBs négatif	HBcrAg et AgHBs us	11,2 mois après perte de l'AgHBs	21% HBcrAg détecté 25.8% AgHBs us détecté 40.4% positif pour l'un de ces marqueurs	(Seto et al., 2013)
Reflet de l'ADNccc (quantité ± activité)	Aide au suivi de la progression de la maladie ?	N=130 dont 125 non traités Origines et phases différentes (majorité caucasienne ou africaine)	HBcrAg		quantité et activité de l'ADNccc moindre si HBcrAg <3 log U/ml que les patients positifs pour ce marqueur	(Testoni et al., 2019)
		N=84 (62 HBe+/22 HBe-) Asiatique (gt B et C)	ARN-VHB	Durant le suivi	Faible corrélation de l'ARNpg à l'ADNccc (r=0,363)	(Huang et al., 2018)
		N=82 Asiatique	ARN-VHB	Avant traitement	Faible corrélation de l'ARN à l'ADNccc (r=0,25)	(Gao et al., 2017)
		N=102 Asiatique (gt B et C)	ARN-VHB	Durant le suivi	Corrélation modérée entre l'ARN et l'ADNccc (r=0.596) mais absence de corrélation selon les phases de l'infection	(Wang et al., 2018)

Tableau 7 : Utilité des nouveaux marqueurs pour la classification des patients.

b. Prédiction du CHC

L'apport des nouveaux marqueurs est également étudié pour prédire la survenue à long terme d'un CHC ou d'une récurrence après résection chirurgicale.

Les différentes études menées avec l'HBcrAg dans ce contexte, à la fois chez les patients non traités, mais aussi chez les patients efficacement traités par NUC ou après résection chirurgicale, sont répertoriées dans le tableau 8. L'HBcrAg serait un marqueur prédictif du développement de CHC. Cependant toutes ces études ont été menées sur des populations asiatiques. Il n'existe pas de seuil consensus d'HBcrAg prédictif du CHC.

D'autres marqueurs ont été rapportés comme associé au risque de développer un CHC. Il s'agit des variants épissés de l'ARN ou des délétions dans les domaines préS1 et préS2. Les délétions préS pourraient diminuer la sécrétion de la grande protéine d'enveloppe et seraient également associées à un risque de CHC chez les patients AgHBe négatif (Chen et al., 2007).

Les variants épissés de l'ARN sont détectés dans la majorité des sérums des patients infectés chroniquement par le VHB. Cette charge virale d'ARN épissés est significativement plus élevée chez les patients qui vont développer un CHC par rapport à ceux qui n'en développent pas et augmente avant l'apparition du CHC (Bayliss et al., 2013).

Les ARN circulants pourrait être un marqueur d'hépatocarcinogenèse d'après d'anciennes études (Hilger et al., 1991). Toutefois, Halgand et al. ont rapporté que la présence d'ARNpg au niveau de la tumeur hépatique était corrélée à l'absence d'invasion microvasculaire et à une meilleure survie des patients (Halgand et al., 2018). Les études évaluant l'utilité des ARN-VHB (ARNpg, ARN tronqués,…) pour la prédiction du CHC manquent à ce jour.

Situation étudiée	Population étudiée	Mesure	CHC (n ;%) Suivi médian (années)	Résultat de l'étude	Référence
Patients naïfs de traitement	N=2666 Asiatique (Gt B, C), non cirrhotique	Baseline	209 ; 7.8% 15,95 ans	Si 2000 < ADN-VHB < 20000 UI/ml HBcrAg ≥4 log U/ml prédictif de CHC (HR 6,29)	(Tseng et al., 2019)
	N=1031 dont 7% de cirrhotiques Asiatique (majorité Gt C)	Baseline	78; 7,6% 10,7 ans	HBcrAg >2,9 log U/ml prédictif de CHC (HR 5,05)	(Tada et al., 2016)
Patients traités	N=109 Asiatique (Gt B, C)	Sous traitement	36 ; 33% 6,5 ans	HBcrAg détecté prédictif de CHC sous NUC (HR 3,53)	(Honda et al., 2016)
	N=1268 sous NUC Asiatique (majorité gt B et C) 667 AgHBe + (dont 20% cirrhose) 601 AgHBe – (dont 25% cirrhose)	Baseline et à 1 an de traitement	113 ; 8,9% 8,9 ans	**[AgHBe+]** HBcrAg ≥4,9 log U/ml à 1 an associé à la survenue de CHC (HR 6,15) **[AgHBe-]** HBcrAg ≥4,4 log U/ml à 1 an associé à la survenue de CHC (HR 2,54))	(Hosaka et al., 2019)
	N=234 50% traités par NUC) 39% cirrhotique Asiatique (majorité Gt C)	Baseline ou sous traitement	57 (24,4%) 11,6-12,3 ans	HBcrAg ≥3log U/ml) associé à la survenue de CHC (HR 2,77)	(Kumada et al., 2013)
	N=207 (séroconversion HBe spontanée) Asiatique 3.9% cirrhose 49.3% sous NUC	Baseline, à 5 et 10 ans d'une séroconversion HBe spontanée	14 (6,8%) 13,1 ans	HBcrAg ≥5,21 log U/ml à baseline HR 4,27	(To et al., 2019)
	N=1400 traités par NUC Asiatique (chinois) 358 AgHBe + (dont 19.6% cirrhose) 1042 AgHBe – (dont 28.8% cirrhose)	Baseline	85 (6,1%) 3,75 ans	**[AgHBe-]** HBcrAg >2,9log U/ml associé à la survenue de CHC (HR 2,13)	(Liang et al., 2020)
	N=338 Asiatique	Baseline	14 (4,1%) 5 ans	HBcrAg ≥3 log U/ml et AgHBs <3log UI/ml associé au risque de CHC	(Suzuki et al., 2019)
	N=228 (57.9% cirrhose ; 96.1% AgHBe-) Asiatique 76 CHC sous NUC (ADN non détecté) *vs* 152 sans CHC	Baseline et sous traitement (au diagnostic du CHC)	76 1,5 ans	HBcrAg >4,67 log U/mL (pré-thérapeutique ; OR 5,95) HBcrAg >3,89 log U/mL (sous traitement ; OR 3,27)	(Cheung et al., 2017)
Après résection chirurgicale	N=55 traités pour leur CHC, sous NUC Majorité Gt C	Au diagnostic de CHC	21 récurrences (38%) sur 2,2 ans	au diagnostic de CHC, HBcrAg ≥4,8 log U/ml associé au risque de récurrence du CHC (HR 8,98)	(Hosaka et al., 2010)

Tableau 8 : Utilité d'HBcrAg dans la prédiction de la survenue à long terme d'un CHC.
Hazard ratio (HR); odd ratio (OR); genotype (Gt)

c. Prédiction de la réactivation du VHB sous immunosuppresseurs

La réactivation sous traitement immunosuppresseur n'est pas systématique chez tous les patients immunodéprimés. Les nouveaux marqueurs utilisés seuls ou combinés pourraient aider les cliniciens dans une prise en charge plus personnalisée de la prophylaxie antivirale de la réactivation.

La positivité de l'HBcrAg a été rapportée comme prédictive d'une réactivation du VHB par Seto et al. chez des patients asiatiques avec un profil d'infection B occulte (AgHBs négatif/AcHBc positif) et recevant du rituximab ou greffés de cellules souches hématopoïétiques, en utilisant un seuil de détection à 2 log U/ml (Seto et al., 2016).

Les anticorps anti-HBc quantitatifs pourraient être un meilleur marqueur que l'HBcrAg pour identifier les patients à risque de réactivation. Caviglia et al. ont ainsi démontré qu'une valeur d'anti HBc supérieure à 4,4 COI (cut-off index) était indépendamment associée à la détection de l'ADNccc chez des donneurs de foie anti-HBc positif tandis que la plupart des individus étaient négatifs pour l'HBcrAg sérique (Caviglia et al., 2018). Dans une cohorte longitudinale de patients atteints de lymphome et un profil d'infection résolutive pour le VHB, une concentration d'anti-HBc supérieure à 6,41 UI/mL était associé à un risque accru de réactivation du VHB (HR de 4,52). La combinaison d'un taux élevé d'anti-HBc et d'un taux faible d'anti-HBs (< 56 UI/L) pourrait identifier les patients présentant un risque très élevé de réactivation du VHB (HR 17,29) (Yang et al., 2018).

3.2.6.2. Prédiction de la réponse aux traitements actuels

Si l'on parvient à objectiver la perte de l'ADNccc intrahépatique (directement ou indirectement), la perte de l'AgHBs est peut être un critère trop strict de guérison si l'AgHBs mesuré est produit exclusivement à partir de l'ADN intégré. De nouveaux marqueurs seraient utiles pour prédire la réponse aux traitements à la place ou avant la perte de l'AgHBs (Tableau 9).

a. <u>Sous interféron</u>

Les ARN circulants diminuent sous traitement par interféron (Farag et al., 2020; Jansen et al., 2016; van Bömmel et al., 2018). L'HBcrAg et l'ARN-VHB sont proposés comme marqueurs prédictifs négatifs, en complément de l'AgHBs et de l'ADN au cours du traitement chez les patients AgHBe positif ou négatif traités par PegIFNα. Ils permettraient de prédire la perte de l'AgHBe chez les patients AgHBe positif. Le déclin de l'ARN et de l'HBcrAg est plus important chez les répondeurs au traitement que chez les non répondeurs. Des valeurs de ces marqueurs au-delà des seuils définis, dans ces petites séries, à 12 semaines de traitement ont une valeur prédictive négative d'au moins 90% d'une non réponse au traitement (Chuaypen et al., 2016) (van Bömmel et al., 2018).

Chez les patients AgHBe positif, plus le titre d'anti-HBc est élevé plus la probabilité de faire une séroconversion HBe sous traitement par NUC ou IFN est importante (Fan et al., 2016; Yuan et al., 2013).

b. Sous NUC

Les nouveaux marqueurs ont été étudiés chez les patients traités depuis plusieurs années sous NUC. Ainsi, l'HBcrAg et l'ARN-VHB restent détectés chez certains patients traités comme observé dans une cohorte de 66 patients négatifs vis-à-vis de l'AgHBe, non cirrhotiques et traités par TDF avec une charge virale ADN-VHB indétectable depuis plus de 5 ans (Carey et al., 2020). Après 3 ans sous ce traitement, 33% et 30% des patients avaient un HBcrAg détectable et un ARN détecté respectivement. A 5 ans, 27% et 14% des patients étaient positifs vis-à-vis de l'HBcrAg et de l'ARN respectivement, tandis que l'ADN restait indétectable.

Ces nouveaux marqueurs pourraient être une aide pour l'arrêt des NUC en toute sécurité. En effet, contrairement à l'AgHBs, ces marqueurs ne sont pas influencés par l'intégration du génome. La non détection de ces marqueurs pourrait être un bon reflet de la perte de l'ADNccc ou du contrôle de son activité transcriptionnelle sous traitement.

Dans une étude menée chez 33 patients avec un ADN-VHB indétectable, la détection d'ARN-VHB à la fin du traitement par NUC était associée à un risque de rebond virologique 24 semaines après l'arrêt du traitement (Wang et al., 2016).

L'apport de l'ARN et de l'HBcrAg pour guider l'arrêt des NUC a été évaluée (i) avant la perte de l'AgHBs chez 23 patients AgHBe négatif, non cirrhotiques, traités efficacement depuis au moins 3 ans, (ii) suite à la perte de l'AgHBs chez 19 patients. Cette étude inclut des patients infectés par différents génotypes (A-E), avec une prédominance de génotype E. Parmi les 23 patients, une augmentation sévère des ALAT a été observée chez 4 patients (17%) entre 2 et 6 mois de l'arrêt du traitement et a nécessité une reprise du traitement. L'HBcrAg et l'ARN-VHB étaient détectés à l'arrêt du traitement chez tous les patients, sauf un pour l'ARN, qui ont présenté une augmentation importante des transaminases. Parmi le petit effectif de patients traités avec un statut négatif pour l'AgHBs, les 2 patients qui ont présenté une réactivation de l'ADN-VHB après l'arrêt du traitement étaient positifs pour l'ARN et négatifs en HBcrAg. Ainsi, l'HBcrAg et l'ARN pourraient servir à distinguer les patients AgHBe négatif, positif ou négatif vis-à-vis de l'AgHBs, à risque de développer une cytolyse hépatique sévère ou une réactivation du VHB à l'arrêt des NUC (Carey et al., 2020).

Un niveau intermédiaire de guérison, appelé « guérison parafonctionnnelle », situé avant la guérison fonctionnelle (caractérisée par la perte de l'AgHBs) a été proposée.

La « guérison parafonctionnelle » est caractérisée par une perte soutenue de l'ARNpg. L'AgHBs peut être retrouvé à ce niveau à un taux faiblement positif contrairement à la guérison fonctionnelle (Wang et al., 2017). Cela implique que l'ARN détecté dans le sérum des patients soit spécifiquement de l'ARNpg. Or, aucune technique ne garantit une quantification de l'ARNpg uniquement.

Chez les patients AgHBe − contrôlés sous NUC depuis plusieurs années, le taux d'HBcrAg serait prédictif du risque de rechute après un arrêt éventuel du traitement. Jung et al. ont montré chez 68 patients asiatiques AgHBe - qu'un taux d'HBcrAg supérieur à 3,7 log U/ml à l'arrêt du traitement était prédictif d'une rechute virologique, dans l'année suivant l'arrêt, définie par un ADN supérieur à 2000 UI/ml (OR 3,751) (Jung et al., 2016).

La dissociation des concentrations sériques d'ADN, d'ARN et de l'HBcrAg chez les patients traités par NUC suggère que ces nouveaux marqueurs substitutifs de l'ADNccc seraient indicatifs de la persistance de l'activité transcriptionnelle de cet ADNccc sous traitement. Ces études souvent menées sur de petits effectifs et principalement dans la population asiatique nécessitent d'être confirmées sur de plus larges cohortes.

Le titre anti-HBc est également associé au risque de rechute à l'arrêt des NUC et pourrait ainsi permettre d'identifier les patients traités chez qui l'arrêt des NUC peut être envisagé en toute sécurité (Chi et al., 2019)

Traitement antiviral	Intérêt potentiel	Population étudiée	Marqueur	Mesure à	Seuil retenu	Référence
PegIFNα +/- TDF	Règle d'arrêt du PegIFNα?	N=62 AgHBe négatif (génotype A-E)	qAgHBs et HBcrAg	Baseline	AgHBs 3,14 log UI/mL ± HBcrAg 3,45 log U/mL (VPP 80,3% VPN 765%)	(Martinot-Peignoux et al., 2016)
PegIFNα + adefovir	Suivi sous traitement	N=86 (41 AgHBe +; 45 AgHBe -)	ARN-VHB	Baseline	Faible CV ARN à baseline prédictive d'une réponse à S72 ; OR 0,44 (AgHBe - uniquement)	(Jansen et al., 2016)
PegIFNα	Règle d'arrêt du PegIFNα?	N=46 AgHBe + Asiatique	HBcrAg	S12	HBcrAg >8 log U/ml à S12 ; VPN 94,4% d'atteindre une réponse virologique à l'arrêt du traitement	(Chuaypen et al., 2016)
PegIFNα +/- lamivudine	Règle d'arrêt du PegIFNα?	N=131 AgHBe + N=76 PegIFNα N=55 PegIFNα + lamivudine 96% Asiatiques	ARN-VHB	Baseline, S12, S24	ARN > 5,5 log copies/ml identifie 30% des non-répondeurs à S12 (VPN 90%)	(van Bömmel et al., 2018)
PegIFNα	Règle d'arrêt du PegIFNα?	N=133 AgHBe négatif caucasiens	ARN-VHB	Baseline à S144	ARN >3,2 log copies/ml (VPN 91% à S12; 93% à S24) CV ARN plus faible à S12 chez les patients qui ont un AgHBs < 100 UI/ml ou qui ont perdu l'AgHBs à S144	(Farag et al., 2020)
NUC (TDF/ETV)	Aide à l'arrêt des NUC	N=57 AgHBe négatif Caucasienne non cirrhotiques	HBcrAg	A l'arrêt du traitement (±1 mois du retraitement)	HBcrAg indétectable chez tous les patients qui ont perdu l'AgHBs	(Papatheodoridi et al., 2020)
NUC	Prédiction de la séroconversion HBe	N=50 Caucasienne Non cirrhotique	ARN-VHB	Initiation, à 3 et 6 mois du traitement	ARN à baseline ou une diminution de l'ARN sous traitement prédictifs d'une séroconversion HBe	(van Bömmel et al., 2015)

Tableau 9 : Applications cliniques des nouveaux marqueurs aux traitements actuels.
VPN : valeur prédictive négative ; VPP : valeur prédictive positive ; S : semaine ; OR : odd ratio ; CV : charge virale

3.2.6.3. Nouveaux marqueurs et thérapeutiques en développement

Nous commençons à avoir des premières données sur l'évolution des nouveaux marqueurs avec les thérapeutiques en développement grâce aux résultats des premiers essais cliniques menés en particulier avec les inhibiteurs de capsides (CAM).

L'effet des inhibiteurs de capside a été évalué dans une étude de phase 1 chez des patients naïfs de traitement, après un traitement de 28 jours par la molécule JNJ-6379 (Zoulim et al., 2020). Une diminution de 0,5 log U/mL des concentrations d'HBcrAg a été observée chez un petit groupe de patients, principalement ceux avec des valeurs d'ALAT comprises entre 1 et 2,5 fois la normale. La diminution d'HBcrAg observée après 28 jours de traitement chez quelques patients serait due à une inhibition directe de la libération de protéines HBc, plus qu'à un effet sur le pool d'ADNccc. En effet, la durée de traitement est trop courte pour évaluer l'effet sur l'ADNccc. De fortes diminutions de l'ARN-VHB ont été observées quel que soit la dose administrée. Cette diminution observée de l'ARN-VHB était attendue compte tenu du mode d'action supposé de cette molécule qui est d'accélérer la formation de capsides vides sans ARNpg ce qui inhiberait le relargage de particules virales contenant de l'ARN ou de l'ADN. Les résultats de phase 2 pour cette molécule JNJ-6379 associé à un NUC ont été présentés au dernier congrès de l'EASL et confirme une diminution après 24 semaines de traitement une diminution de l'ARN, associée à l'ADN mais un effet limité sur l'AgHBs et l'AgHBe.

Une diminution d'HBcrAg et de l'ARN-VHB a également été observée chez la majorité des patients AgHBe positif ou négatif avec une bithérapie associant un NUC et l'ABI-H0731 (vebicorvir), une autre molécule dans la classe des CAM (EASL 2020 ; Abstract AS070 ; LP30).

Concernant les autres classes thérapeutiques en développement, les études cliniques sont en cours. Nous devrions avoir plus d'informations très prochainement car le plus souvent, ces études intègrent le dosage de l'HBcrAg et de l'ARN-VHB.

4. VERS UNE ELIMINATION DE L'HEPATITE B COMME MENACE DE SANTE PUBLIQUE?

L'élimination de l'hépatite B et des hépatites virales au sens large comme menace de santé publique à l'horizon 2030 est un défi majeur. Cela implique une réduction de 90% de l'incidence et d'une diminution de 65% de la mortalité. La prévalence de l'AgHBs chez les enfants de 5 ans est considérée comme un marqueur indicatif de l'incidence cumulée des infections B chroniques. Un des objectifs dans la stratégie d'élimination mise en place est d'obtenir une prévalence de l'AgHBs inférieure à 0,1% en 2030 dans cette population. Actuellement, nous ne disposons pas de traitement curatif. Les stratégies pour parvenir à une guérison combineront certainement des antiviraux à action directe et des thérapeutiques immuno-médiées. L'élimination des hépatites virales requiert (i) la prévention de l'infection chez les nouveau-nés, (ii) de stopper la transmission mère-enfant de l'infection, (iii) l'accès aux tests et aux traitements à tous ceux qui en ont besoin, en particulier dans les groupes à risque et dans les pays à ressources limitées. Malgré l'existence d'antiviraux efficaces et de moyens de prévention, le nombre de nouvelles infections augmente dans plusieurs régions du monde. Au niveau mondial, peu de personnes vivant avec le VHB sont traitées. Avec les thérapeutiques actuelles, ce traitement doit être pris à vie ce qui représente un coût important.

L'élimination n'est possible qu'avec des moyens financiers importants. La pandémie de COVID-19 et la crise économique qui en découle pourraient mettre en péril les financements alloués aux hépatites virales. La révision des objectifs sera peut-être nécessaire.

4.1.Les enjeux

4.1.1. Vacciner

La vaccination demeure un enjeu majeur dans la lutte contre l'hépatite B. Cette vaccination est devenue obligatoire en France depuis 2018. Elle est recommandée par l'OMS chez les personnes exposées à un risque élevé d'infection par le VHB dans les tranches d'âge plus avancées qui n'ont pas été vaccinées à la naissance. Un rattrapage peut être proposé dans les pays d'endémicité faible ou intermédiaire chez ces personnes, en particulier dans les groupes à haut risque d'infection. La plupart des pays ont mis en place des programmes de vaccination néonatale universelle contre le VHB. Il reste maintenant à améliorer le taux de vaccination à la naissance. L'immunisation contre le VHB dès la naissance constitue une pierre angulaire de la prévention de la transmission périnatale et horizontale du virus, source importante d'infection chronique à l'échelle mondiale. L'OMS recommande pour tous les nourrissons que la première dose vaccinale soit administrée dès que possible, idéalement dans les 24 premières heures de vie, et qu'elle soit suivie par 2 ou 3 doses à distance.

4.1.2. Dépister, avoir accès aux tests et aux traitements

L'élimination globale du VHB est un objectif ambitieux. Pour y parvenir, la couverture diagnostique doit être augmentée pour atteindre 90% de personnes diagnostiquées en 2030. Le dépistage systématique anténatal pour toutes les femmes enceintes est maintenant recommandé par l'OMS, le plus précocement possible, en particulier dans les pays avec une prévalence de l'infection supérieure à 2%, au moins une fois durant la grossesse. La grossesse représente une opportunité idéale de dépistage. Ce dépistage passe par la recherche de l'AgHBs et doit être combiné au dépistage du VIH et de la syphilis.

Il convient d'identifier les patients infectés par le VHB qui ont une indication à la mise sous traitement antiviral. Classiquement, le diagnostic et le suivi des patients dans les pays du Nord repose sur le suivi de marqueurs sérologiques (AgHBs, AgHBe, …) et moléculaire (charge virale ADN). Ces examens sont réalisés à partir de sérum ou de plasma et nécessitent du personnel compétent en biologie moléculaire, et un équipement particulier (centrifugeuse, automate, consommables, …).

La majorité des patients infectés vivent dans des pays à ressources limitées qui sont confrontés à de nombreuses difficultés pour le suivi biologique de ces patients (coût, équipement, compétence technique…). Dans ces pays, les laboratoires centraux équipés, avec un personnel formé, sont souvent dans les capitales et donc éloignés géographiquement des patients, ce qui ne facilite pas leur suivi et est une source de perte de vue de ces patients. La réalisation du prélèvement veineux sanguin est un geste technique. Les contraintes préanalytiques sont nombreuses lorsque l'on travaille sur sérum ou plasma. Une centrifugation rapide des prélèvements ainsi que la conservation des échantillons à des températures contrôlées avant analyse sont nécessaires. Le transport de ces échantillons biologiques n'est pas aisé. Pour pallier à ces contraintes et faciliter l'accès aux tests classiquement utilisés pour le suivi des patients infectés par le VHB, deux types d'approches peuvent alors être envisagées. Une première approche consiste à réaliser l'analyse au plus près des patients à l'aide de tests faciles à utiliser dits « Point-of-care » (POC) ou test de diagnostic rapide (TDR). Ces tests, développés pour la détection de l'AgHBs, sont adaptés aux pays à ressources limitées et à certaines populations marginalisées et devrait faciliter le dépistage des populations.

La seconde approche consiste à développer des méthodes alternatives d'acheminement facile des prélèvements sanguins, tels que les prélèvements sur support buvard (ou dried-blood spot ; DBS), aux laboratoires spécialisés. Les DBS ou cartes de sang séché peuvent être réalisés à partir de sang capillaire prélevé au bout du doigt. Le support DBS combiné à l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire à rendu rapide automatisée a été récemment évalué par notre équipe et par d'autres et présente des performances satisfaisantes (Annexe 3) (Bargain et al., 2020; Poiteau et al., 2020; Roger et al., 2020). Les DBS constituent une alternative intéressante au prélèvement veineux sanguin et pourraient faciliter le suivi de la charge virale VHB chez les patients avec les techniques de biologie moléculaire les plus récentes.

La couverture thérapeutique doit être améliorée pour atteindre 80% en 2030. Elle dépend du diagnostic des patients infectés suivi d'un lien avec le soin. Pour cela des plans nationaux doivent être développés par chaque pays. Cet objectif sera difficile à atteindre en particulier dans les pays à ressources limitées. Néanmoins, la disponibilité de génériques du TDF, molécule avec une barrière génétique à la résistance élevée, devrait aider à disposer de traitements moins couteux, efficaces et bien tolérés à large échelle.

Il est également indispensable de traiter toutes les personnes qui ont une indication de traitement et en particulier les femmes enceintes avec une réplication virale importante pour prévenir la transmission mère-enfant. Un élargissement des indications de traitement aux patients avec une infection chronique AgHBe positif est discuté. En effet ces patients ont une réplication virale très élevée et sont donc particulièrement à risque de transmettre le virus. Le traitement de ces patients, voire de tous les patients, sur le modèle du VIH, pourrait permettre de diminuer les chaines de transmission du virus.

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Les connaissances sur le VHB évoluent constamment. Néanmoins, des inconnus subsistent concernant la morphogenèse des particules virales. Les systèmes d'étude du cycle disponibles sont imparfaits et les marqueurs utilisés pour suivre l'infection offrent une information limitée pour la prise en charge clinique des patients. La fluctuation de la production des particules virales et sous-virales circulantes du VHB au cours de l'histoire naturelle de l'infection est très mal caractérisée. Une détermination fine de la nature et de l'abondance de ces particules circulantes est intéressante et permettrait d'affiner notre compréhension sur les effets des nombreuses thérapeutiques actuellement en développement. En parallèle, de nouveaux marqueurs antigéniques et moléculaires sont développés et proposés pour le diagnostic ou le suivi de l'hépatite B. Cependant, l'apport de ces marqueurs dans différents contextes cliniques et pour différentes populations de patients reste à évaluer. De nombreuses études ont été conduites sur des populations asiatiques dont les caractéristiques, tant sur le plan de l'hôte que du virus, sont très différentes de celles rencontrées dans d'autres populations endémiques pour cette infection. Les objectifs et travaux de cette thèse s'inscrivent dans ce contexte et se déclinent en trois volets indépendants. La première partie est un travail mené *in vitro*. Il s'agissait de développer un outil utile pour la caractérisation des formes circulantes du VHB. Le premier objectif était d'étudier les formes circulantes du VHB, classiques et nouvellement décrites, dans le plasma de patients en fonction du génotype et du statut vis-à-vis de l'AgHBe à l'aide de gradients de vélocité. Ce travail s'est déroulé en plusieurs étapes. Il a d'abord fallu mettre au point la technique de séparation des particules en gradient de vélocité ainsi que la technique de détection/quantification de l'ARN-VHB. Après sélection et caractérisation des plasmas d'intérêt, l'étude des formes virales circulantes a été conduite. En parallèle du travail mené *in vitro*, des expériences originales ont également été conduites *in vivo*. Nous nous sommes intéressés à l'apport des nouveaux marqueurs dans différents contextes cliniques. Ainsi, nous avons étudié la contribution d'un nouveau test disponible pour l'AgHBs, dit ultrasensible avec trois panels d'échantillons cliniques négatifs ou avec des titres très faibles d'AgHBs. Enfin, nous avons analysé l'apport de l'HBcrAg et de l'ARN-VHB chez les patients cirrhotiques, mono-infectés par le VHB, inclus dans la cohorte nationale CirVir, pour prédire la survenue d'un carcinome hépatocellulaire, ou d'une décompensation hépatique.

TRAVAUX DE THESE

Axe I. Caractérisation des formes circulantes du virus de l'hépatite B selon le statut de l'AgHBe et le génotype à l'aide de gradients de vélocité.

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale à la réunion annuelle de l'AC42 Réseau National des Hépatites virales de l'ANRS le 6 février 2020 à Paris.

Full characterization of hepatitis B viral forms from patient plasma according to their HBeAg status and genotype using velocity gradients

C. Pronier; J. Bomo; V. Genet, P. Gripon; V. Thibault

En cours de soumission

Les connaissances sur la morphogenèse du VHB ne cessent d'évoluer depuis la découverte du virus. Une particularité de ce virus est la production en très grandes quantités de particules sous-virales, constituées uniquement de protéines d'enveloppe, ce qui a contribué à la découverte du virus et à la mise au point d'un vaccin. Cette surexpression de particules sous-virales par rapport aux virions infectieux va contribuer à un épuisement du système immunitaire par surcharge antigénique, l'empêchant de contrôler l'infection. Comme décrit précédemment dans la partie 1.3 de ce manuscrit, de nouvelles formes de particules virales ont été décrites pour ce virus, notamment des capsides enveloppées ou non et avec ou sans génome (ADN ou ARN). La répartition qualitative et quantitative ainsi que le rôle de ces différentes particules circulantes dans le plasma des patients au cours de l'histoire naturelle et leur évolution sous traitement antiviral reste à définir.

Ainsi, nous avons mis au point un système de séparation des particules à l'aide de gradient de vélocité. Grâce aux marqueurs classiques (AgHBs, ADN-VHB) et aux nouveaux marqueurs que sont l'HBcrAg et l'ARN-VHB, nous avons caractérisé les particules circulantes chez les patients selon le statut vis-à-vis de l'AgHBe. Le marqueur HBcrAg, développé par une équipe japonaise, dose théoriquement 3 protéines : HBc, HBe et p22cr. Si son intérêt émerge en pratique clinique pour le suivi des patients, peu de données existent sur ce qui est réellement détecté par ce dosage. Seules quelques publications rapportant des dosages d'HBcrAg effectués sur des fractions de gradient sont disponibles mais uniquement à partir de plasma de patients asiatiques infectés par un VHB de génotype B ou C. C'est

pourquoi, nous avons fait le choix de sélectionner des plasmas de donneurs de sang infectés par un génotype D ou E.

Les objectifs de ce travail étaient : (i) de caractériser les formes virales circulantes selon le statut AgHBe et le génotype, à l'aide de tous les marqueurs antigéniques et moléculaires disponibles, (ii) d'améliorer les connaissances sur le nouveau marqueur HBcrAg.

Les expériences ont été menées à partir de quatre plasmas de donneurs de sang, fournis par l'INTS, avec un grand volume disponible de manière à pouvoir répéter les expérimentations et les standardiser. Les critères de sélection de ces plasmas étaient le statut vis-à-vis de l'AgHBe (positif ou négatif), le génotype (D ou E) et une charge virale supérieure à 6 log UI/ml. Les plasmas ont été caractérisés notamment pour l'ARN-VHB et l'HBcrAg puis des gradients de vélocité en Nycodenz ont été réalisés à partir de ces plasmas. Le choix du Nycodenz était justifier par la possibilité d'utiliser éventuellement les fractions générées pour de la culture cellulaire sans risque de cytotoxicité.

Les profils obtenus après fractionnement montrent une bonne séparation des particules complètes infectieuses des particules sous-virales. Un pic d'HBcrAg est détecté au niveau de la fraction enrichie en particules complètes infectieuses (VP riche en ADN) tout comme un pic d'ARN-VHB, excepté pour le plasma avec des valeurs plus faibles pour tous les marqueurs dosés. Dans ces fractions, l'HBcrAg détecte essentiellement la protéine HBc du virus, qui constitue la capside. Un second pic d'HBcrAg situé au-dessus de la fraction enrichie en particules sous-virales (pic d'AgHBs correspondant au SVP) est observé pour les plasmas AgHBe positif et correspond à l'AgHBe également détecté par ce marqueur. De manière plus surprenante, un second pic d'HBcrAg, de moindre intensité, est également détecté dans les fractions supérieures du gradient pour les plasmas AgHBe négatif. La signification de ce pic tardif inattendu n'est pas connue.

Grâce aux expériences menées avec un détergent (NP-40) et à une approche mathématique, nous avons pu identifier les formes virales circulantes dans ces plasmas. Au total, au-delà des formes bien connues (VP et SVP), nous avons également détecté (i) des particules enveloppées contenant de l'ARN, (ii) des capsides vides (sans acide nucléique) enveloppées, avec de l'HBs pour les plasmas AgHBe négatif (= virions vides) et sans HBs pour les plasmas AgHBe positif. Les particules à ARN circulent en concentration plus faible

que les particules virales infectieuses contrairement aux capsides enveloppées sans acide nucléique qui sont en excès par rapport aux VP.

L'approche que nous avons développée est rapide, reproductible et complémentaire du traditionnel gradient de densité de sucrose ou de chlorure de césium à l'équilibre. Si peu d'échantillons ont été testés, il s'agit des premiers profils de gradients générés à partir d'échantillons non asiatiques, comparant les profils selon le statut AgHBe et présentant l'ensemble des marqueurs classiques et nouveaux. Cette approche offre plusieurs applications intéressantes. Elle pourrait servir à étudier l'effet des antiviraux en développement sur les différentes particules virales ou aider, par un enrichissement rapide en particules virales, à l'infection du modèle de culture 3D des hépatocytes humains primaires actuellement en développement dans l'équipe.

Title: Characterization of hepatitis B viral forms from patient plasma using velocity gradient: evidence for different viral entities according to HBeAg status

Authors Charlotte Pronier; Jérémy Bomo; Valentine Genet; Philippe Gripon; Vincent Thibault

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) morphogenesis is characterized by a large over production of subviral particles (SVP) in addition to complete viral particles (VP) during the replication cycle. More recently, other viral forms have been described as empty virions or RNA-containing particles. Little is known about the production of these new forms according to the patient's HBeAg status or in non-Asian genotypes. The objectives of the study were to characterize circulating HBV forms in patient's plasmas and to gain experience on recently developed HBV markers such as HBcrAg and HBV-RNA. Plasmas from 4 chronic hepatitis B (CHB) patients, HBeAg positive or negative, genotype D or E, were fractionated on Nycodenz velocity or sucrose density gradients. Antigenic (HBsAg, HBcrAg, HBeAg) and molecular markers (DNA, RNA) were measured in plasma and in each collected fraction. RNA-containing particles were present in all tested plasmas except one HBeAg negative, at lesser concentrations than Dane particles. Detection of HBcrAg in the bottom fractions containing both HBV DNA and RNA indicates the presence of capsids, while a positive signal on the upper fractions rather indicates HBeAg reactivity from HBeAg positive plasmas. Based on a calculation approach and detergent experiments, we have characterized the different forms co-localizing in the VP-enriched fractions. Differences between circulating viral forms according to HBeAg status were observed in plasmas of naïve chronically HBV infected patients. For HBeAg positive plasmas, the observed large excess of capsids compared to VP were likely enveloped within a lipid structure not containing HBs. Such new viral forms were tentatively named "budding capsid". For HBeAg negative plasmas, the observed very large excess of capsids compared to VP were likely enveloped with HBs and corresponded to empty virions. The high reproducibility observed for the velocity gradients and the good agreement with standard density sucrose gradient make this approach useful to better characterize HBV forms. Using velocity gradients and all available, classical and new, standardized biomarkers, our study provides a detailed characterization of HBV circulating forms in patients infected with different genotypes. Significant differences were also noticed in circulating viral forms in plasmas according to their HBeAg status.

Such rapid and reproducible fractionation approach should help to understand the regulation of each viral forms production at different stages of CHB or to appreciate the impact of new antivirals in development on each of them. Despite undefined positioning in clinical practice so far and an important reactive interference with HBeAg, the HBcrAg assay presents a good sensitivity to detect HBc proteins forming capsids and should find specific indications, particularly for the management of HBeAg negative patients.

Keywords: viral particles, HBV-RNA, HBcrAg, biomarker; empty virions; HBeAg; morphogenesis

Introduction

Hepatitis B virus (HBV) belongs to the Hepadnaviridae family, which gathers DNA reverse transcribing hepatotropic viruses [1]. Virus replication cycle occurs in hepatocytes. Virus entry involves direct interaction between the Na+ taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) receptor and the large Hepatitis B surface protein (L-HBs). After intracellular trafficking through microtubules, relaxed circular DNA (RC-DNA) is released in the nucleus and converted to the so-called covalently closed circular (cccDNA), a minichromosome-like structure lifelong persisting in infected hepatocytes. cccDNA is the template for transcription of mRNAs and pregenomic RNA (pgRNA) that are then exported to the cytoplasm for translation. pgRNA is encapsidated and reverse-transcribed to generate new RC-DNA. Then, either RC-DNA returns to the nucleus for cccDNA pool replenishment or is assembled to form new virions released by exocytosis [2]. Release of virions implies multivesicular bodies and ESCRT pathway [3].

HBV morphogenesis follows several complex pathways [4]. In parallel to infectious viral particles (VP), composed of enveloped capsid-containing RC-DNA and known as 42 nm diameter Dane particles, non-infectious subviral particles (SVP), circulating as 22 nm diameter spheres or filaments, are produced in large excess. Spheres are released *via* the secretory pathway while filaments are released like virions [5]. SVP play a role as immune regulator and contribute to the persistence of infection. Current antiviral analogs have little effect on SVP production for two main reasons, first HBsAg can be translated from integrated HBV DNA and second, cccDNA decreases very slowly during therapy. In addition to VP and SVP secretion, other types of HBV particles have been recently identified *in vivo* or *in vitro*. Empty virions (EV) consisting of genome free enveloped capsids, have been found in large amounts in patient's blood and in culture models [6]. Naked empty capsid are regularly released into cell culture supernatants but it is less clear whether such viral forms circulate in plasma of infected patients [7]. Although it is accepted that RNA-containing particles also circulates in the bloodstream, uncertainties remain about the exact composition of circulating RNA species and the nature of circulating RNA-containing particles. The precise circulating HBV-RNA forms have not been completely investigated. Circulation and stoichiometry of all these particles may broadly vary according to patient, genotype and phases of infection.

The outcome of HBV infection is linked to both viral and host factors and persistent infection may lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Nine HBV genotypes (A-I) have been currently identified, based on more than 7.5% nucleotide divergence.

HBV genotypes are heterogeneously distributed worldwide and are therefore unequally distributed among populations with heterogeneous genetic backgrounds. Consequently, a link exists between viral genotypes, natural history and treatment response [2,8]. Genotype D, itself subdivided in several subgenotypes, has a broad and overlapping geographic distribution. Genotype D chronic infection, mostly HBeAg negative, is more likely to cause severe liver disease than genotype A2 infection. By contrast, genotype E is largely restricted to Sub Saharan Africa. Genotypes E and to a lesser extent D, are less studied compared to B and C Asian genotypes. Nevertheless, genotypes D and E are of interest, particularly in Europe as they represent a large proportion of the circulating strains. There are two major entities of chronic HBV infection according to the HBeAg serological status [9]. However, few data are available on the nature of circulating particles according to the HBeAg status or the genotype.

New biomarkers have emerged these last years for HBV management including Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) and HBV-RNA. Such markers should contribute to a more accurate classification of the disease, differentiating at-risk patients to those with more favorable outcomes and leading to individualized care of patients. HBcrAg is a composite marker composed of HBcAg, HBeAg and a 22 kDa core-related protein (p22cr) [10]. Higher HBcrAg levels are measured in HBeAg positive patients than in HBeAg negative. HBV-RNAs are detected in the serum of patients at different levels [11]. Despite heterogeneous quantification protocols, the existence of circulating HBV-RNA is now admitted. These markers have recently been studied as tools to classify patient disease stage status or progression to HCC, to predict HBeAg and HBsAg loss or reactivation during immunosuppression and to evaluate treatment efficacy or chance of HBsAg clearance after treatment discontinuation [12].

The objective of the study is to depict circulating HBV viral forms in patients' plasma, using a new efficient and rapid system that combines use of velocity gradients and recently developed markers, HBcrAg and HBV-RNA?

Materials and Methods

Plasma samples:

The plasmas of 4 blood donors with chronic hepatitis B were provided by INTS (national blood transfusion institute) to perform all gradient experiments. The selection criteria were: the HBV-genotype (D or E), the HBeAg status (positive or negative) and a high-level viral replication above 6 log IU/mL.

Preparation of gradient solutions:

The Nycodenz® (Axis Shield POC, Oslo, Norway) gradient was prepared with a 26% Nycodenz phosphate-buffered saline solution with a freeze (overnight) / thaw cycle.

The sucrose (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) gradient was prepared with 5 sucrose solutions: 30%, 37.5%, 45%, 52.5% and 60% (w/w). One milliliter of each solution was layered in a tube with a peristaltic pump (Minipuls 3, Gilson, Middleton, CT, USA) and then left for diffusion over 24h at 4 °C before ultracentrifugation.

Gradient ultracentrifugation:

Plasma (0.2 mL) was deposited above the Nycodenz® or sucrose gradients in a 5mL, 13 x 51 mm, thinwall polyallomer tube (Beckman Instruments, Villepinte, France). A SW55Ti ultracentrifuge rotor (Beckman Instruments) was used and ultracentrifugation conditions were 40 minutes at 200,000g, at ambient temperature, or 16 hours at 100,000g at 4°C, for the Nycodenz® or the sucrose gradients, respectively. After piercing the bottom of the tube with an 18G needle, 14 to 16 fractions of approximately 250 µL were collected. The density of each fraction was calculated from their refractive index measured at 20°C using an Atago refractometer.

HBV markers

Characterization of all available HBV markers, quantitative (HBsAg, HBcrAg, HBV-DNA, HBV-RNA) and qualitative (HBeAg), was performed on each selected plasmas and their corresponding separated fractions. HBcrAg assay was tested on non-diluted fractions while the other assays were performed on a 1:10 dilution in phosphate buffered saline.

For serological assays, the quantitative Liaison XL Murex HBsAg quant assay (Diasorin, Antony, France) was used with a limit of quantification of 0.05 IU/mL. HBeAg was detected using the Elecsys HBeAg assay (Roche, Meylan, France).

Lumipulse® G HBcrAg assay (Fujirebio, Courtaboeuf, France) was performed on the Lumipulse G600 II, according to the manufacturer's recommendations. Only values above 3 logU/mL, the specified limit of quantification, were taken into account.

For molecular HBV markers, automated extraction of total nucleic acids was performed on the MagNA Pure 96 system with the DNA and Viral NA Small Volume 2.0 kit (Roche, Meylan, France). HBV-DNA was quantified in IU/mL (WHO Standard) as previously described [13]. HBV-RNA, was quantified as previously described by Van Bommel et al. with small modifications [14]. Briefly, the reverse transcription reaction was performed using 3' RACE-long primer (5'-ACC ACG CTA TCG CTA CTC AC $(dT)_{17}$ GWA GCT C- 3') with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Illkirch, France) and was followed by qPCR amplification. RT and qPCR were run in a CFX384 thermocycler (Biorad). Primers used were: forward primer 5'- CAA-CTT-TTT-CAC-CTC-TGC-CTA-3' and reverse primer 5'- ACC-ACG-CTA-TCG-CTA-CTC-AC-3', with the following program: an activation step of 95°C for 10 minutes followed by 40 two-steps cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C.

NP-40 Treatment:

NP-40, was used to dissociate viral envelop. Plasmas were incubated with a 1% NP-40 solution (Fluka, St. Quentin Fallavier, France) at 37°C during 30 min before being deposited on gradients.

Calculation detail

Calculations were made according to the known composition of the different viral particles. For DNA, we considered that each Dane particle contains one copy of DNA and a conversion factor of 5 copies equal to 1 IU was used [15]. For HBsAg, we applied a similar approach as Luckenbaugh et al. and considered that 1 IU of HBs was equal to 4 ng of HBs, corresponding to 8.10^8 spherical SVP [6]. Considering that 20 nm subviral particles are composed of 100 protein subunits as determined by Heermann et al., we determined by sphere surface comparison that 42nm VP contained 441 subunits with an equivalence of 1 IU representing around $1.81 .10^8$ VP [16]. For the capsid protein, we took into consideration the molecular size of the protein (21 kDa) and the HBcrAg assay description, giving an equivalence for 1 U of 10 fg, therefore corresponding to $2.72 .10^5$ HBc molecules [10]. Knowing that each capsid is made of 240 capsomers, considering a T4 symmetry, 1U then corresponds to roughly 1130 capsids.

Results

Four plasmas from blood donors with genotype D (n=2) or E (n=2) HB infection were selected. For each genotype, one plasma was HBeAg positive and the other negative. As shown in Table 1, all plasmas had comparable virological characteristics (median DNA 8.8 log IU/ml, RNA 5.3 log U/ml, HBsAg 7.5 log IU/ml, HBcrAg 7.5 log U/ml). Notably, plasma B7686 (HBeAg negative, genotype D) had the lowest values for all measured parameters in particular for RNA. For all plasmas, HBV-DNA levels were approximately 3.7 log above the HBV-RNA viral load. VP_{DNA}, the calculated amounts of VP according to DNA measurement and SVP_{HBs}, the calculated amounts of SVP according to HBsAg concentration were determined. Calculated ratios of SVP_{HBs} on VP_{DNA} for each plasma show an overproduction of SVP thousand to hundred thousand folds over VP.

Table 1: Virological characteristics of the 4 selected plasmas.

VP_{DNA} corresponded to the calculated amount of VP according to DNA measurement. SVP_{HBs} corresponded to the calculated amount of SVP according to HBsAg concentration.

Plasma	Genotype (HBeAg status)	HBV DNA **(log IU/mL)**	HBV RNA **(log U/mL)**	HBsAg **(log IU/mL)**	HBcrAg **(log U/mL)**	VP_{DNA} **(number/mL)**	SVP_{HBs} **(number/mL)**	SVP_{HBs}/VP_{DNA}
B7195	D (+)	9.31	5.95	4.25	7.9	1.02E+10	1.43E+13	1 401
B7505	E (+)	9.40	5.37	4.49	8.2	1.26E+10	2.48E+13	1 978
B7207	E (-)	8.21	5.21	4.00	7.2	8.11E+08	8.04E+12	9 915
B7686	D (-)	6.74	1.89	3.73	5.5	2.75E+07	4.32E+12	157 140

The calculated percentage, percent of the amount of each marker in one fraction over the total amount in all fractions, is graphically represented for each collected fraction (figure 1). Within the gradient, density values ranged from 1.264 to 1.027 $g.cm^{-3}$ and separations were highly reproducible between experiments (data not shown). A DNA peak was reproducibly identified in fractions 4 to 6 for all tested samples. As DNA is solely contained in VP, fractions 4-6 were likely enriched in Dane particles (VP). The single HBsAg peak observed in fractions 11 to 13, for all samples, likely identified SVP. The velocity approach offered a good resolution to separate VP from SVP. Noteworthy, the richest DNA fraction for each plasma was associated with slightly detectable HBsAg, with values below 17 IU/mL. By contrast, a first HBcrAg peak with HBcrAg levels above 6 log U/ml, was detected in these very VP-enriched fractions (lower fractions; F4-F6). This detection was observed for all tested plasmas, except sample B7686 with a crude circulating HBcrAg value of 5.5 log U/mL. For this sample, VP enriched fractions contained up to 3.8 log U/ml HBcrAg, slightly less than for the other plasmas. For both HBeAg positive samples, a second HBcrAg peak was observed in the upper fractions, above the HBsAg peak (fractions 14-15), and likely corresponding to HBeAg as confirmed by a specific HBeAg assay (data not shown). Surprisingly, on HBeAg negative samples (B7207 and B7686), HBcrAg was also detected and quantified in the last upper two fractions (F13-14) with concentrations around 4.4 log U/ml in each of these fractions. These values were at least one hundred fold lower than values obtained for the same fractions on HBeAg positive samples. Yet, all fractions collected from HBeAg negative plasmas were non-reactive for HBeAg when tested with the HBeAg specific assay (data not shown). Interestingly, HBV-RNA, DNA and HBcrAg highest values were detected in the same fractions whatever the tested plasma except for plasma B7686, characterized by a very low RNA viral load (1.89 log U/mL). Absence of RNA detection in gradient fractions was attributed to a low value below our limit of quantification. These data suggest that VP-enriched fractions also contain RNA-containing particles but to a lesser extent.

Figure 1: Nycodenz velocity gradient profiles of 4 HBV-positive plasmas.

genotype D HBeAg positive plasma; B. genotype E HBeAg positive plasma; C. genotype D HBeAg negative plasma; D. genotype E HBeAg negative plasma. Density of each fraction is shown as a dashed line. Each measured markers, HBV-DNA (empty circle), HBV-RNA (empty triangle), HBsAg (empty square) and HBcrAg (empty diamond-shaped), are represented as percentage per fraction. Nycodenz concentration gradient indicated by the underneath triangle.

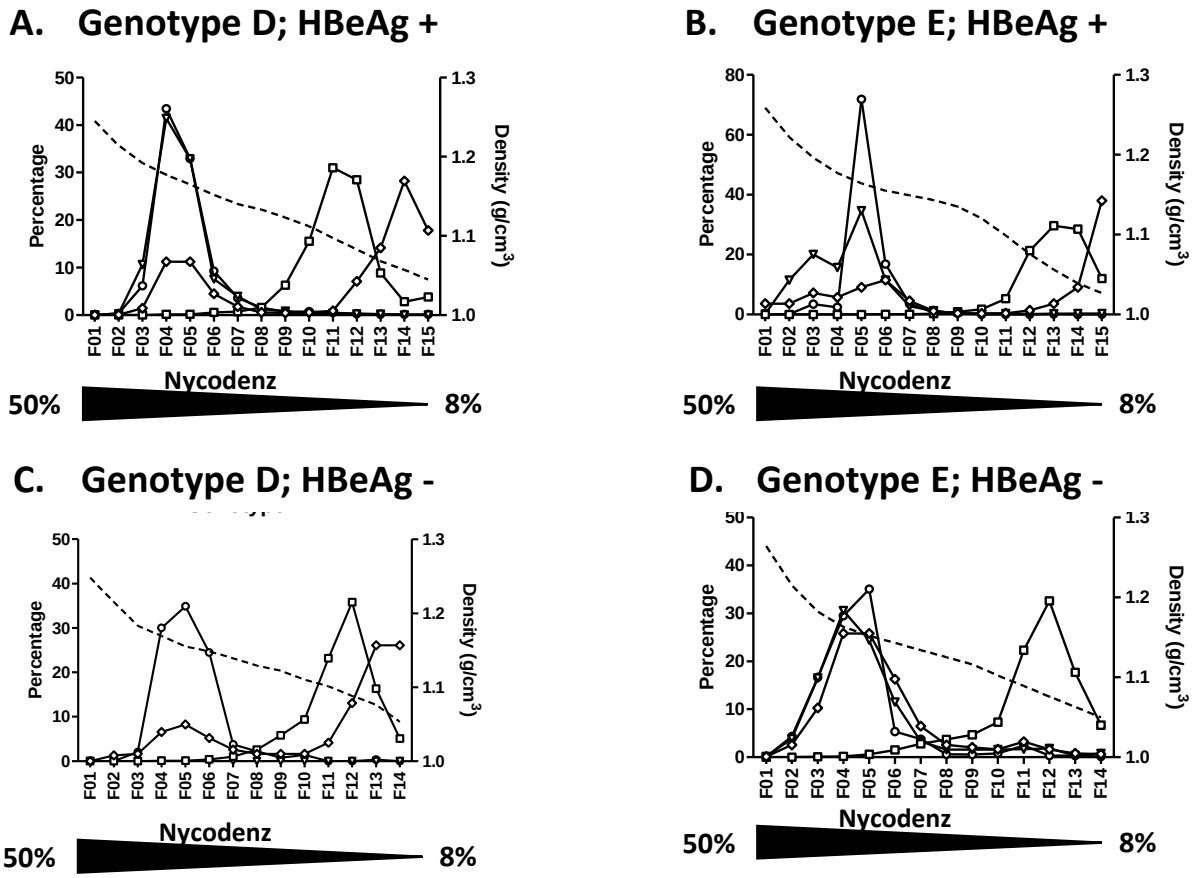


Table 2: Estimated number of VP, calculated according to DNA (VP_{DNA}), HBc (VP_{HBc}) or HBs (VP_{HBs}) concentrations, and their relative respective ratios in the richest DNA fraction of velocity gradients for each plasma.

plasma (genotype; HBe status)	Selected DNA containing fraction #	VP_{DNA} Number/ fraction according to [DNA]	VP_{HBc} Number/ fraction according to [HBc]	VP_{HBs} Number/ fraction according to [HBs]	VP_{HBs}/VP_{DNA}	VP_{HBc}/VP_{DNA}	VP_{HBc}/VP_{HBs}
B7195 (Gt D; positive)	4	1.47E+08	8.96E+08	2.18E+08	1.5	**6.1**	4.11
B7505 (Gt E; positive)	5	8.65E+07	1.13E+09	1.28E+08	1.5	**13.0**	8.82
B7686 (Gt D; negative)	5	5.85E+04	1.79E+06	1.04E+08	1777.0	**30.6**	0.02
B7207 (Gt E; negative)	5	8.65E+06	3.57E+08	7.70E+08	89.1	**41.2**	0.46

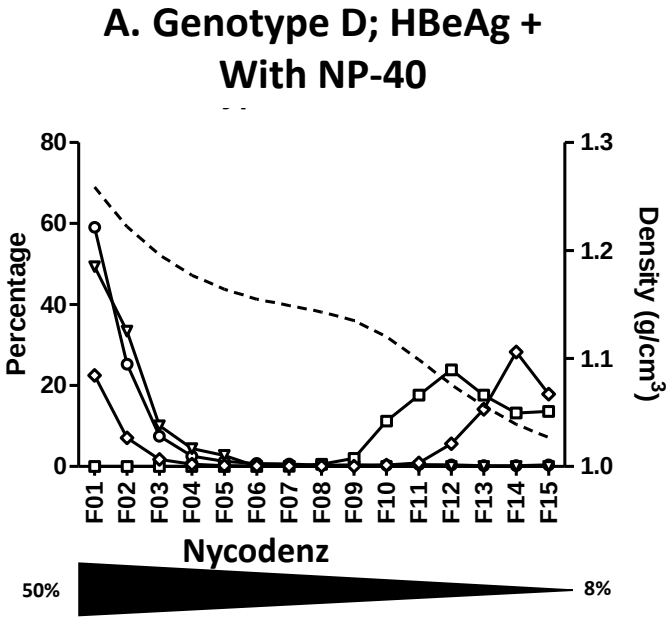
We then used a mathematical approach based on the composition of both VP and SVP and the correspondence to each marker unit (cf. material and methods). The expected number of VP in the richest DNA fraction for each plasma (4 or 5 depending on the gradient) was calculated according to each marker. VP_{DNA} corresponded to the calculated amount of VP according to DNA measurement; VP_{HBc} and VP_{HBs} corresponded to the calculation according to HBcrAg and HBsAg concentrations, respectively (table 2). Respective ratios from these calculated values are also presented. Interestingly, ratios were coherent according to the HBeAg status. For HBeAg positive plasmas, VP_{HBs}/VP_{DNA} ratios were close to 1, meaning that measured HBsAg likely corresponded to VP-associated HBs and attested an acceptable separation by velocity gradient between VP and SVP in each selected fraction. For HBe negative plasmas, these ratios were reproducibly well above 1 (89 and 1777) despite similar gradient profiles, questioning about the reason for this discrepancy. Looking at VP_{HBc}/VP_{DNA}, they were all above 1, raising the possibility that genome-free capsids were also present in these fractions, particularly in HBe negative samples. By contrast, the VP_{HBc}/VP_{HBs} ratios were almost 10 times higher in HBeAg positive than in negative plasmas. Analysis of these ratios confirmed an overproduction of genome-free capsids but of different natures. Thus, we hypothesized that in HBeAg positive plasmas, VP are also accompanied by an overproduction of enveloped capsids not containing HBs, while in HBeAg negative samples, HBs enveloped capsids predominated.

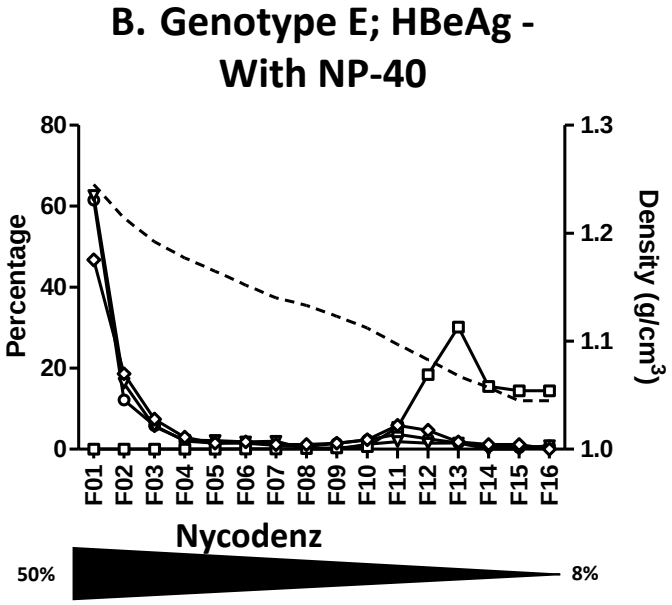
To further characterize the RNA- and the capsid-containing particles, similar velocity gradient separation were done after pretreatment with a detergent. With NP40 treatment, a shift toward higher density fractions was observed for DNA, RNA and HBcrAg. Practically, all these former components became detected in bottom fraction 1 while the HBsAg peak remained in fraction 12 and 13. This observation suggested that similarly to DNA-containing capsids (VP), RNA-containing particles and genome-free capsids are enveloped whatever the HBeAg status.

Altogether, for all plasmas, the NP-40 experiment confirmed the enveloped nature of the capsid excess. Yet, for HBeAg positive plasmas, capsid may be enveloped by a lipid layer not containing HBs, while for HBe negative plasmas the lipid component associates HBs proteins, such as described for empty virions.

Figure 2: Effect of NP40 treatment before fractionation. Quantification of HBV-DNA, HBV-RNA, HBsAg and HBcrAg in Nycodenz velocity gradient fractions of plasmas treated with NP-40 before fractionation.

A. From genotype D HBeAg positive plasma. B. From genotype E HBeAg negative plasma. Density of each fraction is shown as a dashed line. Each measured markers, HBV-DNA (empty circle), HBV-RNA (empty triangle), HBsAg (empty square) and HBcrAg (empty diamond), are represented as percentage per fraction. The Nycodenz gradient range is indicated by the underneath triangle.





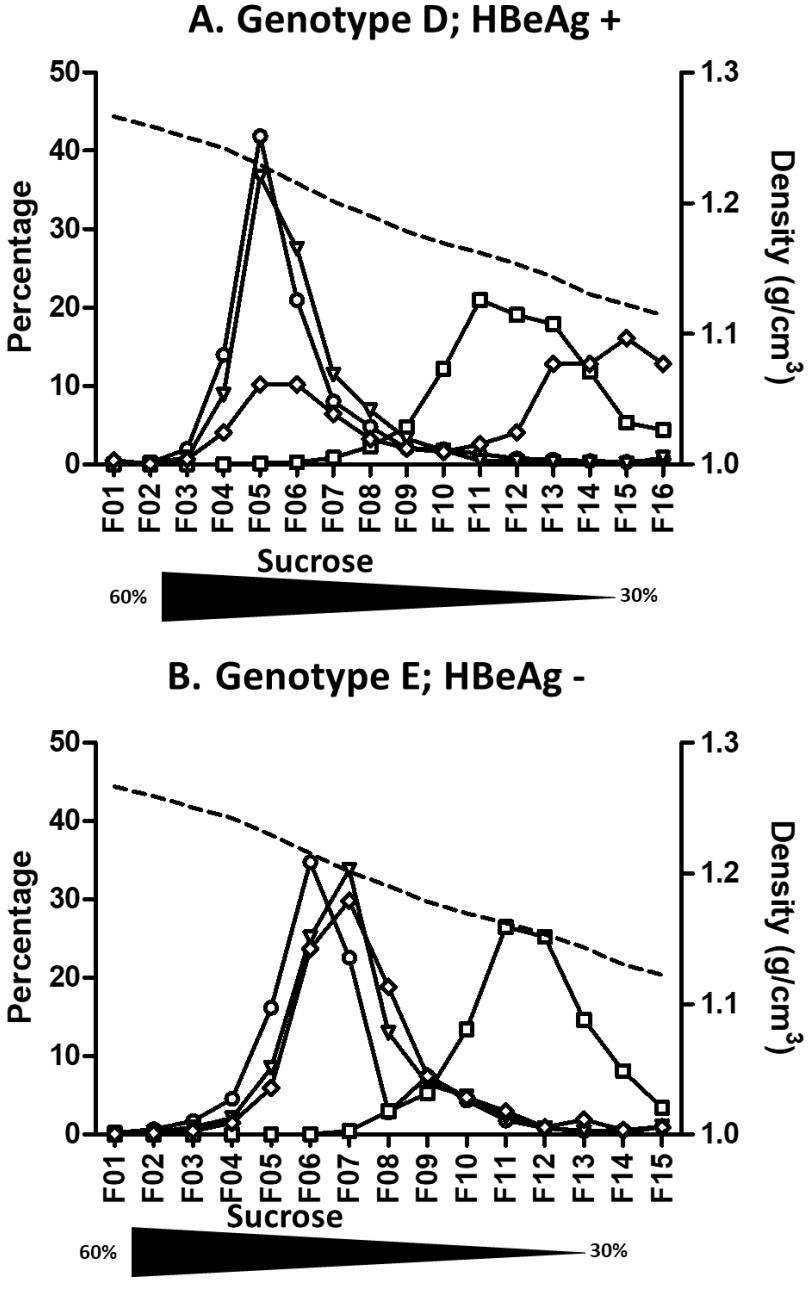
As velocity gradients separated particles according to several parameters such as size and density, a set of experiments was undertaken using a more classical equilibrium sucrose density gradient. Velocity gradient profiles looked similar to the conventional equilibrium profiles for both tested plasmas, one HBeAg positive (B7195), one negative (B7207) (figure 3). DNA, RNA and first HBcrAg peaks are all found in fraction 5 and are well separated from the HBsAg peak in fraction 11. A second HBcrAg peak in the late fractions is solely graphically visible for the HBeAg positive plasma but HBcrAg was also detected and quantified in the upper fractions with values around 4.7 log U/ml for the HBeAg negative

plasma. Despite not being at equilibrium, Nycodenz velocity gradients provide an alternative, rapid and reproducible approach to the sucrose reference gradients.

As HBcrAg value represented the sum of several protein concentrations, we took into consideration the fractions containing mostly capsids (lower fractions) and those containing most likely HBeAg (upper fractions) to define the reactivity that could be attributed to HBc or HBe in crude plasma. A ratio equal to 2 for both HBeAg positive plasmas is obtained, meaning that HBeAg accounted for two-thirds of HBcrAg reactivity while HBc and/or p22cr represented the last third.

Figure 3. Sucrose density gradient profiles of 2 HBV-positive plasmas Quantification of HBV-DNA, HBV-RNA, HBsAg and HBcrAg in sucrose density gradient fractions.

A. genotype D HBeAg positive plasma. B. genotype E HBeAg negative plasma. Density of each fraction is shown as a dashed line. Each measured markers, HBV-DNA (empty circle), HBV-RNA (empty triangle), HBsAg (empty square) and HBcrAg (empty diamond-shaped), are represented as percentage per fraction. Sucrose concentration gradient indicated by the underneath triangle



Discussion

Velocity gradients offer an attractive, alternative, effective approach to rapidly separate virions from SVP, complementary to more classical density gradients. This approach presents some advantages over traditional equilibrium gradients such as quickness. To our knowledge, this is the first description of velocity gradients applied to both HBeAg positive and negative patient plasmas and thoroughly characterized with all available standardized classical and new viral biomarkers. Moreover, our study compares 2 non-Asian genotypes less frequently studied. To avoid any methodological bias, we worked on large volume of fully characterized plasmas from 4 blood donors, obtained from INTS, with genotype D or E chronic HBV infection and naïve of treatment. Access to unique and consequent blood draws allowed us to check for reproducibility and consistency over several experiments. Gradient profiles of each plasmas were highly reproducible throughout all experimentations. The original collection method through tube bottom piercing associated to a free flow considerably reduces fluidic turbulence and less potential contamination by SVP present in large excess in the above fractions. As previously reported, all tested plasmas showed a similar rate-zonal separation profile characterized by a DNA-enriched bottom fraction surmounted by an HBsAg-enriched fraction, independently of the genotype [17]. Our results extend those observations by adding HBcrAg and HBV-RNA quantification in each fraction.

First, we confirm circulation of HBV-RNA containing particles in enveloped capsids in plasmas. These particles were present in lower fractions together with Dane particles, both in velocity and density gradients. However, theses RNA particles are thousand to ten thousand fewer than Dane particles. Generated profiles in sucrose density gradient are similar to those presented by Rokuhara et al. for genotype C. Co-localization of DNA, RNA and HBc peaks suggests that HBV-RNA is incorporated into core particles [19]. Unfortunately, lack of information regarding each fraction density, their collection method and the HBeAg status of the tested samples precluded any accurate comparison with our findings. More recently, Prakash et al. presented Nycodenz comparative gradient profiles with and without detergent treatment. Experimental conditions differ from ours in terms of temperature, speed, time of centrifugation and type of detergent. Despite a different fraction collection method and the chosen graphical representation, their profile and ours showed good separation between VP and SVP and distribution of viral RNA in the same fractions as DNA, suggesting that RNA as DNA is contained in similar density particles. Determination of HBcrAg and HBeAg in each fraction allowed us to refine this model.

For all gradient profiles showing an RNA peak, both HBcrAg and RNA peaks were in the same fraction, likely indicating that RNA is associated to capsid proteins. Detergent treatment deeply modified our gradient profiles contrary to what was reported by Prakash et al [20]. As expected for enveloped viral forms, detergent treatment led to significant sedimentation of DNA, RNA and HBcrAg markers to the bottom fraction (Figure 2). By contrast, their experiments solely indicated the broadening of the DNA and RNA peaks, with a tendency toward higher Nycodenz concentrations migration. This could be partly explained by the different number of fractions collected, 27 *vs* 15 in their and our experiments, respectively, or by the lower initial input volumes of both plasma and Nycodenz in our protocol. In any case, our experiments performed with NP-40 provided further evidence that HBV-RNA was present in enveloped particles in plasmas. Interestingly, NP-40 treatment was associated with a decreased concentration of HBcrAg in the lower fractions (up to fraction 8 to 9) but had no effect on this component in the upper fractions. This could be an argument for unenveloped (naked) capsids containing RNA (or single-stranded DNA) in the form of capsid-antibody complexes (CAC) as put forward by Bai et al. using CsCl density gradients [21]. If circulating HBV-RNA in some chronically infected patients is now well established, some doubts remain about the precise composition of detected viral RNA specie(s). Our study was not designed to characterize circulating RNA species. With the RNA detection method used in our study, adapted from van Bommel *et al*., all polyadenylated RNA forms including pgRNA are detected without distinction, except truncated RNAs, as we solely used the 3' long primer. In a very recent study data using HBV full-length 5'RACE approach, the authors report that in CHB patients, circulating HBV-RNA seems to belong to one of 3 main categories, pgRNA, spliced pgRNA variants and HBx [22]. HBV-RNA molecular characterization and assay standardization are needed to improve our knowledge and to compare studies between each other. Particular attention must be paid to the specificity of the proposed methods. Indeed, amplification of single-stranded or double-stranded DNA is strongly favored in the situation of high viral loads to the detriment of other nucleic acids. Although being a promising novel biomarker for current and futures therapies, HBV-RNA assays are not yet commercially available. However, Abbott is currently developing an automated assay on its m2000 platform [23][24].

Despite being a promising biomarker, with numerous studies published in the literature about the usefulness of HBcrAg testing in plasma, there is to date, no available data specifically describing what are the circulating proteins detected through this test.

Only two studies based on sucrose gradient separation of an HBeAg-positive, Asian genotype, plasma and carried out by the Japanese team having developed the HBcrAg assay are available [18,19]. Our study complete these data on HBeAg positive and negative plasmas and non-Asian genotypes. We confirm that the HBcrAg assay detects with a good sensitivity both HBc and HBe proteins. From our calculation, we could determine that HBcrAg would theoretically detects around 1 million VP while an HBsAg assay with a sensitivity of 0.05 IU/mL would give a positive signal for around 9.10^6 VP. These calculations are in agreement with the results obtained from our gradient measurements. In VP-enriched fractions, HBcrAg was detected at high concentrations but very low HBsAg concentrations were detected. For the HBeAg positive plasmas, two HBcrAg peaks were detected. The first one, co-localizing with nucleic acids and the second, above the major HBsAg peak (SVP) that was later confirmed as HBeAg using a specific HBeAg assay. From HBcrAg values obtained on each gradient performed on the different plasmas, one may estimate that HBeAg detection contributed for two third of the HBcrAg value, while one-third could be attributed to HBc and p22cr reactivity. Surprisingly, for both HBeAg negative plasmas, a similar profile was observed with an unexpected HBcrAg signal localizing also in the upper fractions. Specific HBeAg testing of these very fractions was negative as expected from HBeAg results obtained on crude plasmas. One hypothesis could be the presence of HBeAg-HBeAb complexes not detected by the HBeAg assay but identified by the HBcrAg assay. Reactivity of this latter assay would be explained by not only specific Ab targeting different epitopes but also a pretreatment step likely disrupting Ag-Ab complexes. Further experiments are in progress to better document the reasons for this unexpected reactivity.

Based on a calculation approach, with molecular stoichiometry calculated from VP and SVP known protein and nucleic acid composition, we aimed at better characterizing the different forms co-localizing in the different gradient fractions. Analysis of ratios in VP-enriched fractions revealed an overproduction of genome-free capsids but of different natures according to the HBeAg status. For HBeAg positive plasmas, we first demonstrated that HBc proteins found in the lower fraction were enveloped, then that the little amount of HBsAg found in the first peak was not in agreement with all capsids being HBs-enveloped. We thus raised the hypothesis that HBcrAg, and likely capsids, were indeed enveloped within a lipid structure not containing HBsAg. Such new viral forms tentatively named “budding capsid” may circulate as micro-vesicles or exosomes containing nascent immature or mature capsid. Further studies will be required to determine the exact nature of these vesicles and their content.

Indeed, as HBcrAg detect both core and p22cr proteins, we cannot exclude that these new viral like particle are composed of a capsid made of p22cr as it contains a signal peptide that could attract cellular membranes, therefore leading to an alternative budding [18]. Our data were not in agreement with those obtained by Kimura et al. using anti-HBsAg immunoprecipitation experiments. The existence of p22cr remains however controversial and has been only described by Kimura et al. Budding capsids would thus constitute an additional type of particles produced during HBV morphogenesis in HBeAg positive patients and different from previously described empty virions. The functions of this new abundant type of circulating viral like particles remain to be elucidate. As described for other viruses, namely HAV or HEV naked viruses, membrane enveloped capsids in the circulation may be another strategy for HBV to prevent an optimal immunological response against this protein [25]. For HBeAg negative plasmas, we demonstrate that the excess of capsids compared to the Dane particles were rather HBs-enveloped particles circulating as empty virions. By a different methodological approach than the one performed by Luckenbaugh et al using native agarose gel electrophoresis followed by Western and Southern blot analyses, we also observed an abundant circulation of empty virions solely in HBeAg negative plasmas [6]. Native agarose gel electrophoresis is a good method to finely separate charged capsids from enveloped subviral-, viral-like- or viral-particles but is less performant to separate VP from SVP on the contrary to the gradient method. Knowledge about EV are growing with recent evidences showing a pivotal role of the core protein linker in the secretion pathway of these particles [26]. The same authors proposed a two distinct signals model between secretion of empty virions *versus* complete virions [27].

By its design, the HBcrAg assay detects and quantify in an equivalent manner HBc, HBe and p22cr with a better sensitivity than what can be expected from a western blot. With a limit of quantification of 1 kU corresponding to 10 pg of one of these 3 proteins, one may estimate that the HBcrAg assay is probably around 5000 times more sensitive than a Western blot, with an accepted limit of detection of approximately 50 ng per protein [6,10]. Ideally, it would even be more interesting to have a specific HBcAg assay.

To conclude, we provide evidences by an original methodological approach that empty virions represent the major viral forms circulating in HBeAg negative plasmas and should be considered in HBV cure strategies, as vaccine candidate and as diagnostic markers [28]. In parallel, new VLP, named “budding capsids”, seem to circulate in HBeAg positive plasmas. While these findings certainly deserve to be confirmed on more samples, the characterization

of the HBV particles spectrum combining velocity gradient and new biomarkers should find many applications in different settings.

Such approach will also be very helpful to study the mechanism of action of new direct acting antivirals in development and their effect on each type of HBV particles.

Bibliography

1. Magnius L, Mason WS, Taylor J, Kann M, Glebe D, Dény P, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae. J Gen Virol. 2020;101: 571–572. doi:10.1099/jgv.0.001415
2. Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. J Hepatol. 2016;64: S4–S16. doi:10.1016/j.jhep.2016.01.027
3. Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M, Kim S, Ahlquist P. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. Proc Natl Acad Sci. 2007;104: 10205–10210. doi:10.1073/pnas.0704000104
4. Jiang B, Hildt E. Intracellular Trafficking of HBV Particles. Cells. 2020;9: 2023. doi:10.3390/cells9092023
5. Jiang B, Himmelsbach K, Ren H, Boller K, Hildt E. Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. J Virol. 2015;90: 3330–3341. doi:10.1128/JVI.03109-15
6. Luckenbaugh L, Kitrinos KM, Delaney WE, Hu J. Genome-free hepatitis B virion levels in patient sera as a potential marker to monitor response to antiviral therapy. J Viral Hepat. 2015;22: 561–570. doi:10.1111/jvh.12361
7. Ning X, Nguyen D, Mentzer L, Adams C, Lee H, Ashley R, et al. Secretion of Genome-Free Hepatitis B Virus – Single Strand Blocking Model for Virion Morphogenesis of Para-retrovirus. Ou JJ, editor. PLoS Pathog. 2011;7: e1002255. doi:10.1371/journal.ppat.1002255
8. Rajoriya N, Combet C, Zoulim F, Janssen HLA. How viral genetic variants and genotypes influence disease and treatment outcome of chronic hepatitis B. Time for an individualised approach? J Hepatol. 2017;67: 1281–1297. doi:10.1016/j.jhep.2017.07.011
9. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu, Lampertico P, Agarwal K, Berg T, Buti M, Janssen HLA, et

al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2017. doi:10.1016/j.jhep.2017.03.021

10. Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. Sensitive Enzyme Immunoassay for Hepatitis B Virus Core-Related Antigens and Their Correlation to Virus Load. J Clin Microbiol. 2002;40: 439–445. doi:10.1128/JCM.40.2.439-445.2002
11. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. J Hepatol. 2016;65: 700–710. doi:10.1016/j.jhep.2016.05.029
12. Charre C, Levrero M, Zoulim F, Scholtès C. Non-invasive biomarkers for chronic hepatitis B virus infection management. Antiviral Res. 2019;169: 104553. doi:10.1016/j.antiviral.2019.104553
13. Pas SD, Fries E, De Man RA, Osterhaus ADME, Niesters HGM. Development of a Quantitative Real-Time Detection Assay for Hepatitis B Virus DNA and Comparison with Two Commercial Assays. J Clin Microbiol. 2000;38: 2897–2901.
14. van Bömmel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Krüger DH, Berg T, et al. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors: van BÖMMEL ET AL. Hepatology. 2015;61: 66–76. doi:10.1002/hep.27381
15. Gish RG, Locarnini SA. Chronic Hepatitis B: Current Testing Strategies. Clin Gastroenterol Hepatol. 2006;4: 666–676. doi:10.1016/j.cgh.2006.03.017
16. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. J Virol. 1984;52: 396–402.
17. Désiré N, Ngo Y, Franetich J-F, Dembele L, Mazier D, Vaillant J-C, et al. Definition of an HBsAg to DNA international unit conversion factor by enrichment of circulating hepatitis B virus forms. J Viral Hepat. 2015. doi:10.1111/jvh.12387
18. Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, et al. Hepatitis B Virus DNA-negative Dane Particles Lack Core Protein but Contain a 22-kDa Precore Protein without C-terminal Arginine-rich Domain. J Biol Chem. 2005;280: 21713–21719. doi:10.1074/jbc.M501564200
19. Rokuhara A, Matsumoto A, Tanaka E, Umemura T, Yoshizawa K, Kimura T, et al. Hepatitis B virus RNA is measurable in serum and can be a new marker for

monitoring lamivudine therapy. J Gastroenterol. 2006;41: 785–790. doi:10.1007/s00535-006-1856-4

20. Prakash K, Rydell GE, Larsson SB, Andersson M, Norkrans G, Norder H, et al. High serum levels of pregenomic RNA reflect frequently failing reverse transcription in hepatitis B virus particles. Virol J. 2018;15: 86. doi:10.1186/s12985-018-0994-7
21. Bai L, Zhang X, Kozlowski M, Li W, Wu M, Liu J, et al. Extracellular Hepatitis B Virus RNAs Are Heterogeneous in Length and Circulate as Capsid-Antibody Complexes in Addition to Virions in Chronic Hepatitis B Patients. J Virol. 2018;92. doi:10.1128/JVI.00798-18
22. Stadelmayer B, Diederichs A, Chapus F, Rivoire M, Neveu G, Alam A, et al. Full-length 5'RACE identifies all major HBV transcripts in HBV-infected hepatocytes and patient serum. J Hepatol. 2020;73: 40–51. doi:10.1016/j.jhep.2020.01.028
23. Butler EK, Gersch J, McNamara A, Luk K-C, Holzmayer V, de Medina M, et al. Hepatitis B Virus Serum DNA andRNA Levels in Nucleos(t)ide Analog-Treated or Untreated Patients During Chronic and Acute Infection. Hepatol Baltim Md. 2018;68: 2106–2117. doi:10.1002/hep.30082
24. Carey I, Gersch J, Wang B, Moigboi C, Kuhns M, Cloherty G, et al. Pregenomic HBV RNA and Hepatitis B Core-Related Antigen Predict Outcomes in Hepatitis B e Antigen-Negative Chronic Hepatitis B Patients Suppressed on Nucleos(T)ide Analogue Therapy. Hepatol Baltim Md. 2020;72: 42–57. doi:10.1002/hep.31026
25. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. Nature. 2013;496: 367–371. doi:10.1038/nature12029
26. Liu K, Luckenbaugh L, Ning X, Xi J, Hu J. Multiple roles of core protein linker in hepatitis B virus replication. Siddiqui A, editor. PLOS Pathog. 2018;14: e1007085. doi:10.1371/journal.ppat.1007085
27. Ning X, Luckenbaugh L, Liu K, Bruss V, Sureau C, Hu J. Common and Distinct Capsid and Surface Protein Requirements for Secretion of Complete and Genome-Free Hepatitis B Virions. Ou J-HJ, editor. J Virol. 2018;92: e00272-18, /jvi/92/14/e00272-18.atom. doi:10.1128/JVI.00272-18
28. Hu J, Liu K. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. Viruses. 2017;9: 56. doi:10.3390/v9030056

Axe II. Contribution d'un test AgHBs ultrasensible pour dépister et suivre l'infection par le VHB

Cette étude a fait l'objet de communications affichées dans 3 congrès en 2018 : ILC (Paris), ESCV (Athènes), RICAI (Paris) et d'une communication orale au GEMHEP à Paris le 6 décembre 2018

Pronier C, Candotti D, Boizeau L, Bomo J, Laperche S, Thibault V, The contribution of more sensitive hepatitis B surface antigen assays to detecting and monitoring hepatitis B infection, Journal of Clinical Virology (2020), doi: https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104507

L'AgHBs est un marqueur clé de diagnostic et de suivi de l'hépatite B. Premier marqueur sérologique à apparaître après l'ADN, il est utilisé pour le dépistage de l'infection en association avec la détection des anticorps anti-HBc et anti-HBs. La perte de l'AgHBs, spontanée ou sous traitement, signe la guérison fonctionnelle de l'infection. Ce marqueur peut cependant réapparaitre lors d'une réactivation virale, observée notamment au cours d'une immunosuppression. Il existe des tests de détection et/ou de quantification de l'AgHBs. La quantification de l'AgHBs peut aider à l'identification de l'infection chronique AgHBe négatif, aussi appelée portage inactif. A ce stade, l'AgHBs circule en général à taux faible (<100 UI/ml).

La limite inférieure de quantification des tests pour l'AgHBs classiquement utilisés au laboratoire est de 0,05 UI/ml. Récemment, de nouveaux tests émergent avec une limite inférieure de quantification au moins dix fois inférieure, soit 0,005 UI/ml.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'apport du test Fujirebio pour des échantillons cliniques soit négatifs pour l'AgHBs avec les tests usuels soit faiblement positifs pour l'AgHBs ou avec un résultat discordant selon le test utilisé. Ce travail a été mené en collaboration avec l'INTS (Syria Laperche, Daniel Candotti et Laure Boizeau).

Le test AgHBs ultrasensible a été testé pour trois panels différents, soit 88 échantillons, en parallèle du test DiaSorin utilisé en routine au laboratoire.

Le premier panel regroupe 13 échantillons de donneurs de sang en phase aiguë de l'infection (« *ramping phase* »), identifiés avec un ADN positif sans anticorps anti-HBc, ni AgHBs.

Le deuxième panel collige 52 échantillons de patients présentant une infection B occulte (ADN et anticorps anti-HBc positifs sans AgHBs).

Le dernier panel rassemble 23 échantillons de donneurs de sang (ADN et anticorps anti-HBc positifs) pour lesquels l'AgHBs est soit faiblement positif, soit avec un statut discordant selon les techniques utilisées.

Un quart des échantillons initialement détectés sans AgHBs deviennent AgHBs positif avec le test ultrasensible Fujirebio uniquement (médiane 0,015 UI/ml). Parmi les 23 échantillons AgHBs faiblement positif ou discordant, 22 sont positifs avec le test Fujirebio contre 19 avec le test DiaSorin, avec un AgHBs médian de 0,32 UI/ml et 0,31 UI/ml respectivement. Les faibles concentrations en AgHBs obtenues avec ces deux tests sont bien corrélées.

Ce travail met en lumière le potentiel de tests plus sensibles pour la détection de l'AgHBs dans la prise en charge des patients et dans la sécurisation de la transfusion sanguine. En effet, ce test permet une détection plus précoce d'une infection aiguë mais aussi une reclassification des patients initialement qualifiés comme porteurs d'une infection B occulte (OBI) ou ayant un profil de guérison fonctionnelle, en porteurs inactifs avec une faible concentration d'AgHBs circulant. Si la perte de l'AgHBs reste le critère de guérison fonctionnelle et d'un arrêt thérapeutique, il reste à déterminer s'il faut utiliser les tests conventionnels de l'AgHBs ou les tests dits ultrasensibles pour objectiver cette perte. De plus, la plupart des pays à forte prévalence de l'hépatite B sont des pays à ressources limités, qui ne peuvent pas tous implémenter le diagnostic génomique viral pour sécuriser les dons de sang et ainsi éviter la transmission du virus par ce biais. L'utilisation de tests plus sensibles pour l'AgHBs pour qualifier les dons de sang permettrait de réduire le délai avant que l'AgHBs ne soit détecté et limiterait ainsi la transmission du virus par la transfusion.

Journal of Clinical Virology 129 (2020) 104507

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

The contribution of more sensitive hepatitis B surface antigen assays to detecting and monitoring hepatitis B infection

Charlotte Pronier[a], Daniel Candotti[b], Laure Boizeau[b], Jérémy Bomo[a], Syria Laperche[b], Vincent Thibault[a,*]

[a] Univ Rennes, Department of Virology, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000, Rennes, France

[b] Department of Blood-borne Agents, National Reference Center of Infectious Risks in Blood Transfusion, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Analytical performance
Limit of quantification
Clinical samples
Occult HBV infection
Serological profile

ABSTRACT

Background: Hepatitis B surface antigen (HBsAg) remains the main viral marker for screening and monitoring hepatitis B virus (HBV) infection. The quantification limit of most current HBsAg assays is around 0.05 IU/mL. The Lumipulse-G-HBsAg-Quant assay (Fujirebio) claims to obtain a tenfold improvement in sensitivity. This study aimed to assess the performance of this assay in detecting low HBsAg levels in clinical samples.

Methods: Three panels of stored frozen samples were selected on the basis of HBV-DNA and HBsAg values obtained previously with routine techniques. Panels 1 (n = 13) and 2 (n = 52) consisted of DNA-positive/HBsAg-negative samples from individuals in the window period and with occult HBV infection respectively. Panel 3 comprised 23 samples with low or discrepant HBsAg screening results. All these samples were tested retrospectively with the DiaSorin and Fujirebio HBsAg assays.

Results: Sixteen out of 65 samples (25 %), initially screened HBsAg negative, were reactive only with the Fujirebio assay (median value = 0.015 IU/mL; IQR = 0.012): three (23 %) samples from panel 1 and 13 (25 %) from panel 2. Thirteen of these 16 (81 %) had HBsAg values below 0.03 IU/mL with the DiaSorin assay. In panel 3, 22 (96 %) samples were quantified successfully with the Fujirebio assay (median: 0.32 IU/mL; IQR: 1.20) and 19 (83 %) with the DiaSorin assay (median: 0.31 IU/mL; IQR: 0.65). Concentrations obtained with the two assays showed good correlations (r = 0.893, Spearman).

Conclusions: HBsAg assays with enhanced analytical sensitivity could improve HBV serological profile interpretation with possible consequences on clinical management of infected patients, and on blood transfusion safety.

1. Introduction

Despite a vaccine to prevent Hepatitis B virus (HBV) infection and antivirals to control replication, hepatitis B remains a public health problem and one of the leading causes of chronic liver disease [1]. Due to the often silent nature of the disease, HBV testing is essential for individuals, public health, and blood screening.

Hepatitis B surface antigen (HBsAg), widely produced at all stages of infection, remains a key marker for the diagnosis and the monitoring of HBV infection. Following the incubation period, HBsAg often accompanied by anti-HBc IgM, can be detected a few days after HBV-DNA [2]. The greater the sensitivity of HBsAg detection, the sooner an acute infection can be identified through HBsAg screening. HBsAg assay sensitivity is a key issue, firstly in transfusion settings, in countries that cannot afford to implement nucleic acid testing (NAT) of blood donations and rely solely on HBsAg testing. Increased HBsAg assay sensitivity could translate into an improved blood safety as it would reduce the pre-HBsAg window period (WP), classically defined as the time between infection and the appearance of HBsAg in the blood of infected persons [3]. This delay is currently established at 33.5 days but obviously depends on the HBsAg detection sensitivity. Secondly, HBV infection monitoring could benefit from improved sensitivity. DNA and HBsAg concentrations, with liver function and histology assessments are helpful to stage the infection evolution [4,5]. While HBsAg levels are usually high during the early chronic phases (HBeAg-positive), a concentration below 3 log IU/mL with low viral replication in HBeAg negative patients, usually signs an inactive form of infection. [6]. In a few cases, the disappearance of HBsAg indicates a "functional cure" [7].

* Corresponding author.
E-mail address: vincent.thibault@chu-rennes.fr (V. Thibault).

https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104507
Received 10 March 2020; Received in revised form 3 June 2020; Accepted 9 June 2020
1386-6532/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/).

Because small amounts of HBsAg can still be generated from intrahepatic HBV-DNA, improved HBsAg detection sensitivity could change a "cured" profile to a low-HBsAg level chronic carrier profile. Occult HBV infection (OBI), defined as the presence of replication-competent HBV-DNA in the liver and/or in the blood of people who test negative for HBsAg using currently available assays, would also be re-appraised by more sensitive HBsAg assays [8]. Indeed, the failure to detect HBsAg detection despite viral replication could be explained by different hypotheses, one of them being that amounts of HBsAg are too small to be detected by current HBsAg assays. The identification of patients with low residual production of HBsAg could also be beneficial among immunosuppressed patients to better identify those at risk of reactivation [9,10].

The analytical characteristics of HBsAg testing have greatly improved over the years. Detection of HBsAg in serum is commonly carried out using enzyme immunoassays (EIA) based on chemiluminescence and polyclonal antibodies with exquisite sensitivity. An evaluation of 70 HBsAg assays showed unequal performances in term of sensitivity between EIAs and rapid tests, but also among EIAs [11]. The coexistence of HBsAg and anti-HBs in serum is identified in 5–10% of chronic hepatitis B carriers and could also constitute a challenge for HBsAg detection assays [12]. Ideally, the presence of anti-HBs should not influence HBsAg quantification. A new Japanese iTACT-HBsAg assay, which includes a pretreatment step, seems to detect HBsAg with greater sensitivity, including that complexed with anti-HBs [13]. This approach should certainly be considered for further development. HBV protein variability also presents a challenge for immunoassays, as they need to detect HBsAg variants for accurate diagnosis or for the prevention of transfusion-transmitted infection [14]. HBsAg assays marketed in Europe are CE-marked devices and should meet the requirements for sensitivity and specificity set out in common technical specifications. The analytical sensitivity of HBsAg assays has been fixed at 0.130 IU/mL (second international standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A, NIBSC code 00/588). The lower limit of quantification (LoQ) for most current HBsAg quantification assays is around 0.05 IU/mL. Some assays such as the Lumipulse G HBsAg-Quant (Fujirebio, Tokyo, Japan) or the more recently reported ultra-sensitive Abbott ARCHITECT® assay have been developed and claim tenfold sensitivity improvement (LoQ 0.005 IU/mL) [15].

This study aimed to assess the performance of the highly sensitive Fujirebio assay in detecting low HBsAg levels in clinical samples and to evaluate the possible practical consequences of this increased sensitivity.

2. Material and methods

A total of 88 samples were collected from the INTS (national blood transfusion institute) and Rennes University Hospital. Plasma or serum samples were selected among individuals with documented HBV replication despite an undetectable HBsAg (n = 65): 13 samples were collected during the WP (panel 1) and 52 from occult B infection carriers (OBI; panel 2). A third panel (panel 3) comprised 23 blood donor samples from the INTS: 4 samples tested initially positive with the PRISM HBsAg 5.0 assay (Abbott Diagnostics, Rungis, France) at the time of donation but negative (S/CO: 0.70 − 0.88) when repeat-tested using the Murex HBsAg Version 3 assay (Diasorin, Antony, France); 18 samples with repeatedly detected but low HBsAg levels (median: 0.1 IU/mL [range: 0.07–1.21 IU/mL]); and 1 sample from a HBsAg + donor infected with a viral strain carrying substitutions in the S protein (sM103I, sS113A, sP120 T) and a stop codon at position 216.

Frozen samples were retrospectively tested after thorough thawing and mixing, according to the manufacturer's instructions with first the LIAISON® XL MUREX HBsAg Quant (DiaSorin, Antony, France) assay and then with the Lumipulse® G HBsAg-Quant (Fujirebio, Tokyo, Japan) assay. The dynamic ranges of the Fujirebio and DiaSorin assays announced were 0.005–150 IU/mL and 0.05–150 IU/mL, respectively. Following Fujirebio's instructions (all details regarding samples processing are provided in the supplementary file) samples with an HBsAg value below 0.005 IU/mL with their assay were considered non-reactive. In our study, samples with an initial HBsAg titer between 0.002 and 1 IU/mL with the Fujirebio assay were tested twice to ascertain specificity of the result.

2.1. Complementary laboratory testing

On INTS samples, HBV-DNA was quantified using the COBAS TaqMan HBV assay (Roche Diagnostics; Meylan, France; LoQ ≥6 IU/mL). HBsAg, anti-HBc and anti-HBs antibodies were detected using Murex HBsAg Version 3 (Diasorin, Antony, France), Monolisa Anti-HBc PLUS (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France), and Monolisa Anti-HBs PLUS (Bio-Rad) respectively. HBV genotypes were determined by direct sequencing as previously described [16].

On Rennes University Hospital samples, the HBV-DNA level was measured using Realtime HBV (Abbott molecular, Rungis, France) or VERIS HBV (Beckman Coulter, Maurens-Scopont, France) assays with a LoQ ≥10 IU/mL. HBsAg, anti-HBc and anti-HBs antibodies were detected using Elecsys HBsAg, anti-HBc and anti-HBs II assays respectively (Roche Diagnostics, Meylan, France).

2.2. Statistical analysis

The HBsAg positive rates were compared using the McNemar test. Correlations and differences were analyzed using Spearman's coefficient and Bland-Altman plots. These analyses were performed using Analyse-it 4.65.3 statistical software package. P-values below 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

The virological characteristics of the samples selected are presented in Table 1. HBV genotype information was available for 65 samples (73.9 %). The most prevalent genotypes (53 %) were A or D.

In all, 88 samples were tested with the DiaSorin and Fujirebio assays, as shown in Fig. 1. Only 19 (22 %) samples were positive with DiaSorin, all belonging to panel 3 with HBsAg concentrations ranging

Table 1
Characteristics of the samples studied.

Number (%)	Total n = 88	WP n = 13	OBI n = 52	Low/ Discordant n = 23
HBV Genotype	65 (73.9)	13 (100)	41 (78.8)	11 (47.8)
▪ A	25 (28.4)	5 (38.5)	17 (41.5)	3 (27.3)
▪ B	6 (6.8)	1 (7.7)	3 (7.3)	2 (18.2)
▪ C	3 (3.4)	0	2 (4.9)	1 (9.1)
▪ D	22 (25)	3 (23.1)	15 (36.6)	4 (36.4)
▪ E	7 (8)	3 (23.1)	4 (9.8)	0
▪ F	2 (2.3)	1 (7.7)	0	1 (9.1)
HBV-DNA				
Not detected	3 (3.4)	0	0	3 (13)
Detected < 10 IU/mL	42 (47.7)	3 (23.1)	29 (55.8)	10 (43.5)
Detected ≥ 10 IU/mL	43 (48.9)	10 (76.9)	23 (44.2)	10 (43.5)
(median; IQR)	(106; 428)	(41; 229)	(106; 244)	(2042; 21,073)
Anti-HBc positive	75 (85.2)	0	52 (100)	17 (73.9)
Anti-HBs				
positive	27 (30.7)	3 (23.1)	18 (34.6)	6 (26.1)
concentration IU/L [min-max]	[11 − 414]	[193 − 414]	[11 − 227]	[11 − 95]
negative	58 (65.9)	10 (11.4)	31 (35.2)	17 (19.3)
not determined	3 (3.4)	0	3 (3.4)	0

WP: window period; OBI: occult HBV infection.

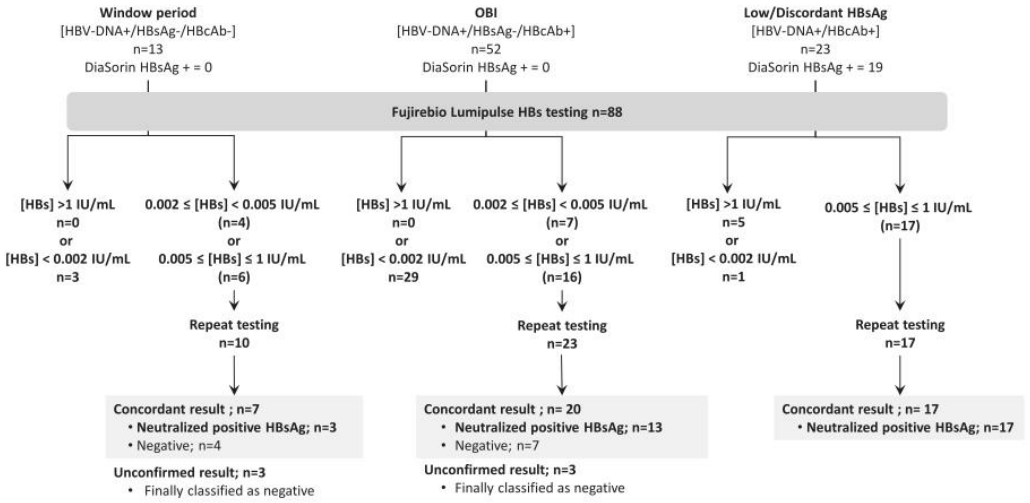


Fig. 1. Study flowchart and associated results.

from 0.05 to 5,100 IU/mL. In contrast, 39 (44 %) samples tested positive (HBsAg ≥ 0.005 IU/mL) on initial testing with the Fujirebio assay. All negative or positive results with HBsAg concentrations between 0.002 and 1 IU/mL on initial testing (50 samples, 57 %) were retested in a second run. Six (12 %) samples initially found positive were finally classified as HBsAg-negative after two negative results on repeat testing (referred as "unconfirmed result" in Fig. 1). The first results were confirmed in repeat assays for 44 (88 %) samples (11 as HBsAg-negative and 33 as HBsAg-positive).All samples which were repeatedly HBsAg-positive (n = 33) were further tested using the confirmatory inhibition assay and were confirmed as true positives with a mean inhibition rate of 83 % (range 67–93 %).

The characteristics of the reactive samples detected solely by Fujirebio are summarized in Table 2. The three samples from panel 1 with confirmed positive HBsAg results were HBV-DNA-positive, with viral loads ranging from 251 to 456 IU/mL. (Details on 3 anti-HBs positive samples are provided in the supplementary file).

In panel 2, the 13 samples with confirmed positive Fujirebio HBsAg results had HBsAg concentrations ranging from 0.005 to 0.057 IU/mL. All samples were positive for HBV-DNA (range: detected below 10 IU/mL and 3,670 IU/mL) and 2 of them were also positive for anti-HBs antibodies. It can be noted that all HBsAg levels measured with the Fujirebio assay were below or around the LoQ of the DiaSorin assay. The highest values measured with the Fujirebio assay corresponded to values close to the LoQ of the DiaSorin assay. All main genotypes were represented (A–E). Anti-HBs status was available for 85 samples, 58 (65.9 %) being negative and 27 (30.7 %) positive. The performance of the two assays was compared according to anti-HBs status. For anti-HBs negative samples, a significantly higher HBsAg-positive rate was observed with the Fujirebio assay (n = 31, 53 %) compared to the DiaSorin assay (n = 14, 24 %) ($p < 0.0001$). In contrast, no significant difference was observed for the 27 anti-HBs positive samples with comparable positive rates of 18 % and 26 % ($p = 0.16$), for DiaSorin and Fujirebio, respectively.

Table 2
Characteristics of the samples detected solely with the Fujirebio assay.

Panel	HBsAg Fujirebio [IU/mL]	HBsAg DiaSorin [IU/mL]	HBV-DNA [IU/mL]	Anti-HBs Ab [IU/L]	Genotype
1-Window Period	0.016	< 0.03	456	Negative	E
	0.016	< 0.03	251	Negative	A
	0.018	< 0.03	284	Negative	A
2-OBI	0.005	< 0.03	33	Negative	A
	0.006	< 0.03	106	Negative	C
	0.010	< 0.03	163	Negative	E
	0.010	< 0.03	23	11	B
	0.011	< 0.03	Detected (BQL)	Negative	D
	0.012	< 0.03	11	Negative	B
	0.012	< 0.03	13	Negative	A
	0.014	< 0.03	16	Negative	Not tested
	0.017	< 0.03	267	Negative	A
	0.026	< 0.03	3670	225	C
	0.043	0.048	372	Negative	A
	0.054	0.049	Detected (BQL)	Negative	Not tested
	0.057	0.046	16	Negative	A

BQL: below quantification limit of the assay.

In the low/discordant group, 6 samples were anti-HBc and anti-HBs negative including 2 samples that were HBV-DNA-negative, corresponding to an HBsAg positivity following an HBV vaccination. The 4 remaining were DNA positive with an available genotype for 3 of 4. These 6 samples were HBsAg-positive with the Fujirebio assay while only four samples were HBsAg-positive with the DiaSorin assay. Six other samples in this group were anti-HBs low-positive (11 − 95 IU/L). Five of these samples were HBsAg-positive in both assays studied while one was HBsAg-negative in both tested assays.

Of the 88 samples tested, 18 were within the quantification range of both tests. Comparisons of HBsAg quantification were performed on the 16 samples with values below 2 IU/mL to assess the accuracy of the two techniques in the lower dynamic range. All samples belonged to panel 3. As shown in Fig. 2, the Spearman correlation coefficient between the two techniques was 0.893 with a slope of 1.69. The Bland-Altman analysis indicated that HBsAg concentrations measured using Fujirebio were slightly higher than those measured using DiaSorin (mean bias of 0.17 IU/mL) with a quantification difference tending to decrease towards lower HBsAg values.

4. Discussion

In our study, we evaluated the performances of the Fujirebio assay in detecting low HBsAg levels in clinical samples and compared it to the DiaSorin quantitative HBsAg assay used in our routine practice. The enhanced sensitivity of the Fujirebio assay was confirmed in three different types of samples. Almost a quarter of documented HBsAg-negative samples, as determined using conventional assays from panels 1 and 2 (16/65 (25 %)) were finally identified as HBsAg-positive with

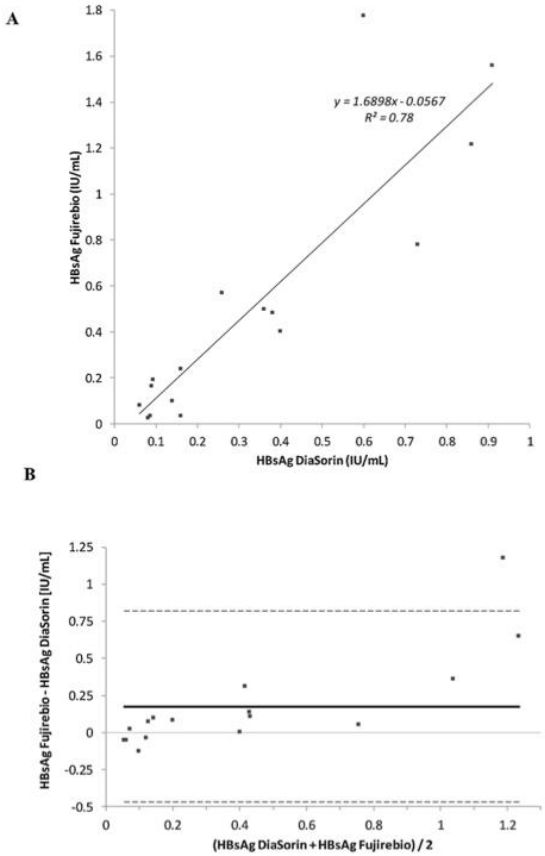


Fig. 2. A: Correlation between serum HBsAg concentrations (below 2 IU/mL) quantified using the two assays; B: Bland-Altman analysis of HBsAg concentrations measured using Fujirebio and DiaSorin assays. The solid line represents the mean difference between the assays. The dashed line illustrates the 95 % confidence interval of the mean difference.

the Fujirebio assay. All of these samples were HBV-DNA-positive with an HBsAg reactivity confirmed by neutralization, attesting specificity. It is essential to repeat the test for each case of HBsAg reactivity, as recommended, in particular in case of low HBsAg titers, to ascertain the specificity of the assay. Indeed, in this set, 6 initially HBsAg-reactive samples were finally not confirmed as positive.

Across panels 2 and 3, 56 samples corresponded to a serological profile of past infection (HBsAg-negative / anti-HBc-positive) as determined with the DiaSorin assay (Table 2). The HBsAg positivity rate increased from 34 % (19/56) to 63 % (35/56) when tested with our routine technique and the more sensitive Fujirebio assay respectively. Using a highly sensitive screening test, a patient formerly identified as functionally cured can be reclassified as a chronic carrier with low HBsAg concentrations. The clinical consequences of these findings may be limited, as low HBsAg concentrations are generally predictive of an inactive status and most of these patients do not require medical attention [5]. Considering solely identified OBI patients (panel 2, n = 52), 25 % (13/52) of the patients would have been reclassified as chronic carriers using the Fujirebio assay. Thus, patients classified as OBI with the current assays could be reclassified as chronic carriers using more sensitive HBsAg or molecular assays [8,17]. Although the clinical consequences of OBI remain debated, changing the patient's status from HBsAg-negative to positive will certainly modify both patient and physician perceptions of the infection. For the remaining OBI samples (n = 39) with undetectable HBsAg, the possibility of even lower HBsAg concentrations is challenging.

In some cases, a low level HBsAg is associated with low to moderate replication, compatible with transmission, at least by transfusion [18]. In terms of public health, the identification of these HBsAg carriers is therefore highly desirable. In high-prevalence countries where NAT is not implemented for blood screening, improving HBsAg detection sensitivity tenfold would significantly reduce the WP thereby limiting HBV transmission. Although we only tested 13 samples corresponding to the WP, 3 (23 %) were identified as positive, confirming the potential added value of these more sensitive assays for blood screening. Matsubara et al. tested a sensitive immunoassay on seroconversion panels [19]. The mean time to HBsAg first detection of HBsAg was 17.4 days, less than the delay obtained with existing assays including PRISM. In the ongoing effort to improve HBsAg assays, Abbott recently described a new ultrasensitive qualitative prototype assay with clinical performance approaching that of the NAT mini-pool and reducing the early WP as shown on seroconversion panels [15]. Recently, studying profiles of two longitudinal vaccine breakthrough from plasma donors, Kuhns et al. showed that the prototype significantly reduced the WP with HBsAg detection 21 and 43 days earlier than with currently used HBsAg assays [20]. Our data and these studies clearly indicate the benefit of more sensitive HBsAg detection in the context of blood safety for countries that may not be able to afford NAT.

Our study strengthens previous studies exploring quantification comparisons between techniques. In a study assessing the performance of 7 quantitative HBsAg assays on the WHO International Standard and a regional reference panel [21], two kits, BLEIA Eiken HBsAg (BLEIA; Eiken Chemical, Tokyo, Japan) and Fujirebio, detected HBsAg concentrations of 0.010 IU/mL. For samples with low HBsAg concentrations (< 2 IU/mL) we demonstrate that the Fujirebio and DiaSorin assays provide similar values on different HBV genotypes with a mean bias of 0.17 IU/mL. These findings are in line with a previous study comparing the Lumipulse (Fujirebio) with the Architect (Abbott) and the Elecsys (Roche) assays in various clinical settings [22].

Depending on the assay, different HBsAg-positive rates according to the patient's anti-HBs status were noted in our study. The coexistence of HBsAg and anti-HBs raises the question of the effect of anti-HBs on the analytical sensitivity of HBsAg assays [12]. In previous studies, reexamination of samples from HBV carriers in whom HBsAg seroclearance had been confirmed using conventional assays showed a positive HBsAg result with the Fujirebio assay, months or years away from the initial seroclearance, with differences according to the anti-HBs status [13,23,24]. Negative anti-HBs status, and also antiviral therapy and liver cirrhosis seem to contribute to the discrepancies between ultrasensitive and conventional assays in multivariate analyses [24]. As functional cure and the decision to stop antiviral treatment are based on the disappearance of HBsAg from the serum, more sensitive HBsAg assays will require extensive clinical validation to assess their impact on clinical management [7,25].

Improved HBsAg assay sensitivity could also modify the risk of reactivation assessment under immunosuppressive therapies. This risk seems greater if HBsAg is detected [26]. Among 120 HBV-resolved patients receiving chemotherapy, 12 had quantifiable HBV-DNA. HBsAg was detected using the Fujirebio assay in all reactivating patients [27]. Thus, detection of HBsAg with more sensitive assays among patients previously identified as HBsAg-negative would certainly lead to different clinical management.

This study clearly indicates that more sensitive HBsAg assays will significantly improve screening and blood transfusion safety. In clinical management, the gain in HBsAg sensitivity will probably translate into an adjustment of treatment follow-up and patient classification according to their serological profiles. With these improved assays, one must be prepared to reclassify patients initially documented as OBI or functionally cured as chronic carriers with low HBsAg levels.

CRediT authorship contribution statement

Charlotte Pronier: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Daniel Candotti:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Laure Boizeau:** Investigation, Resources, Data curation. **Jérémy Bomo:** Validation, Investigation, Resources, Data curation, Visualization. **Syria Laperche:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision. **Vincent Thibault:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgment

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104507.

References

[1] World Health Organization, Global Hepatitis Programme, Global Hepatitis Report, 2017, World Health Organization, 2017 (Accessed 25 April 2017), http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1.

[2] D. Candotti, S. Laperche, Hepatitis B virus blood screening: need for reappraisal of blood safety measures? Front. Med. 5 (2018) 29, https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029.

[3] M. Vermeulen, H. van Drimmelen, C. Coleman, W. Sykes, R. Reddy, M. Busch, S. Kleinman, N. Lelie, Reassessment of hepatitis B virus window periods for two transcription-mediated amplification assays using screening data of South African blood donors, Transfusion (Paris) 59 (2019) 2922–2930, https://doi.org/10.1111/trf.15420.

[4] P. Lampertico, K. Agarwal, T. Berg, M. Buti, H.L.A. Janssen, G. Papatheodoridis, F. Zoulim, F. Tacke, EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection, J. Hepatol. 67 (2017) 370–398.

[5] M. Martinot-Peignoux, M. Lapalus, T. Asselah, P. Marcellin, HBsAg quantification: useful for monitoring natural history and treatment outcome, Liver Int. 34 (Suppl. 1) (2014) 97–107, https://doi.org/10.1111/liv.12403.

[6] M. Pfefferkorn, S. Böhm, T. Schott, D. Deichsel, C.M. Bremer, K. Schröder, W.H. Gerlich, D. Glebe, T. Berg, F. van Bömmel, Quantification of large and middle proteins of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) as a novel tool for the identification of inactive HBV carriers, Gut 67 (2018) 2045–2053.

[7] M.B. Zeisel, J. Lucifora, W.S. Mason, C. Sureau, J. Beck, M. Levrero, M. Kann, P.A. Knolle, M. Benkirane, D. Durantel, M.-L. Michel, B. Autran, F.-L. Cosset, H. Strick-Marchand, C. Trépo, J.-H. Kao, F. Carrat, K. Lacombe, R.F. Schinazi, F. Barré-Sinoussi, J.-F. Delfraissy, F. Zoulim, Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions—report of the ANRS workshop on HBV cure, Gut 64 (2015) 1314–1326, https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308943.

[8] G. Raimondo, S. Locarnini, T. Pollicino, M. Levrero, F. Zoulim, A.S. Lok, Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members, Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection, J. Hepatol. 71 (2019) 397–408, https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034.

[9] R. Loomba, T.J. Liang, Hepatitis B reactivation associated with immune suppressive and biological modifier therapies: current concepts, management strategies, and future directions, Gastroenterology 152 (2017) 1297–1309, https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.009.

[10] V. Thibault, Hepatitis B virus reactivation after direct-acting antivirals for chronic hepatitis C infection, Lancet Gastroenterol. Hepatol. 3 (2018) 145–147, https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30004-9.

[11] H. Scheiblauer, M. El-Nageh, S. Diaz, S. Nick, H. Zeichhardt, H.-P. Grunert, A. Prince, Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes, Vox Sang. 98 (2010) 403–414, https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01272.x.

[12] M. Pancher, N. Désiré, Y. Ngo, S. Akhavan, C. Pallier, T. Poynard, V. Thibault, Coexistence of circulating HBsAg and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B carriers is not a simple analytical artifact and does not influence HBsAg quantification, J. Clin. Virol. 62 (2015) 32–37, https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.11.015.

[13] A. Matsumoto, M. Imaizumi, Y. Tanaka, S. Nishiguchi, H. Yatsuhashi, T. Ishida, K. Moriyama, K. Aoyagi, E. Tanaka, Novel and highly sensitive immunoassay for total hepatitis B surface antigen, including that complexed with hepatitis B surface antibody, J. Gastroenterol. 52 (2017) 376–384, https://doi.org/10.1007/s00535-016-1244-7.

[14] V. Thibault, A. Servant-Delmas, T.D. Ly, A.-M. Roque-Afonso, S. Laperche, Performance of HBsAg quantification assays for detection of Hepatitis B virus genotypes and diagnostic escape-variants in clinical samples, J. Clin. Virol. 89 (2017) 14–21, https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.02.001.

[15] S. Lou, R. Taylor, S. Pearce, M. Kuhns, T. Leary, An ultra-sensitive Abbott ARCHITECT ® assay for the detection of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), J. Clin. Virol. 105 (2018) 18–25, https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.009.

[16] A. Servant-Delmas, M. Mercier, M.-H. El Ghouzzi, A. Girault, F. Bouchardeau, J. Pillonel, S. Laperche, National survey of hepatitis B virus (HBV) polymorphism in asymptomatic HBV blood donors from 1999 to 2007 in France: HBV GENETIC DIVERSITY IN FRANCE, Transfusion (Paris) 50 (2010) 2607–2618, https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02725.x.

[17] N. Lelie, R. Bruhn, M. Busch, M. Vermeulen, W. Tsoi, S. Kleinman, et al., Detection of different categories of hepatitis B virus (HBV) infection in a multi-regional study comparing the clinical sensitivity of hepatitis B surface antigen and HBV-DNA testing, Transfusion (Paris) 57 (2017) 24–35, https://doi.org/10.1111/trf.13819.

[18] D. Candotti, S.M. Assennato, S. Laperche, J.-P. Allain, S. Levicnik-Stezinar, Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose, Gut 68 (2019) 313–321, https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316490.

[19] N. Matsubara, O. Kusano, Y. Sugamata, T. Itoh, M. Mizuii, J. Tanaka, H. Yoshizawa, A novel hepatitis B virus surface antigen immunoassay as sensitive as hepatitis B virus nucleic acid testing in detecting early infection, Transfusion (Paris) 49 (2009) 585–595, https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.02026.x.

[20] M.C. Kuhns, A.L. McNamara, V. Holzmayer, G.A. Cloherty, Molecular and serological characterization of hepatitis B vaccine breakthrough infections in serial samples from two plasma donors, Virol. J. 16 (2019), https://doi.org/10.1186/s12985-019-1154-4.

[21] A. Murayama, H. Momose, N. Yamada, Y. Hoshi, M. Muramatsu, T. Wakita, K. Ishimaru, I. Hamaguchi, T. Kato, Evaluation of in vitro screening and diagnostic kits for hepatitis B virus infection, Journal of Clinical Virology 117 (2019) 37–42.

[22] R. Yang, G. Song, W. Guan, Q. Wang, Y. Liu, L. Wei, The Lumipulse G HBsAg-Quant assay for screening and quantification of the hepatitis B surface antigen, J. Virol. Methods 228 (2016) 39–47, https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.11.016.

[23] W.-K. Seto, Y. Tanaka, D.K.-H. Wong, C.-L. Lai, N. Shinkai, J.C.-H. Yuen, T. Tong, J. Fung, I.F.-N. Hung, M.-F. Yuen, Evidence of serologic activity in chronic hepatitis B after surface antigen (HBsAg) seroclearance documented by conventional HBsAg assay, Hepatol. Int. 7 (2013) 98–105, https://doi.org/10.1007/s12072-012-9354-7.

[24] I. Ozeki, T. Nakajima, H. Suii, R. Tatsumi, M. Yamaguchi, M. Kimura, T. Arakawa, Y. Kuwata, T. Ohmura, S. Hige, Y. Karino, J. Toyota, Analysis of hepatitis B surface antigen (HBsAg) using high-sensitivity HBsAg assays in hepatitis B virus carriers in whom HBsAg seroclearance was confirmed by conventional assays: high-sensitivity HBsAg assays, Hepatol. Res. 48 (2018) E263–E274, https://doi.org/10.1111/hepr.12979.

[25] J. Liu, T. Li, L. Zhang, A. Xu, The role of hepatitis B surface antigen in nucleos(t)ide analogues cessation among Asian patients with chronic hepatitis B: a systematic review, Hepatology 70 (2019) 1045–1055, https://doi.org/10.1002/hep.30474.

[26] J. Sasadeusz, A. Grigg, P.D. Hughes, S. Lee Lim, M. Lucas, G. McColl, S.A. McLachlan, M.G. Peters, N. Shackel, M. Slavin, V. Sundararajan, A. Thompson, J. Doyle, J. Rickard, P. De Cruz, R.G. Gish, K. Visvanathan, Screening and prophylaxis to prevent hepatitis B reactivation: introduction and immunology, Clin. Liver Dis. 23 (2019) 487–492, https://doi.org/10.1016/j.cld.2019.04.009.

[27] N. Shinkai, S. Kusumoto, S. Murakami, S. Ogawa, M. Ri, T. Matsui, A. Tamori, H. Toyoda, T. Ishida, S. Iida, Y. Tanaka, Novel monitoring of hepatitis B reactivation based on ultra-high sensitive hepatitis B surface antigen assay, Liver Int. 37 (2017) 1138–1147, https://doi.org/10.1111/liv.13349.

Axe III. Cir-B2 : Etude de nouveaux marqueurs virologiques chez les patients atteints de cirrhose virale B

La cirrhose est un facteur de risque important de développer un CHC. Le traitement des patients cirrhotiques permet de réduire ce risque mais ne l'annule pas. La cohorte ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales) CO12 CirVir inclut des patients atteints de cirrhoses virales Child-Pugh A, prouvées par une biopsie. Une étude préalable s'est intéressée aux facteurs de risque viraux ou liés à l'hôte sur la survenue d'un CHC plus particulièrement chez les patients cirrhotiques infectés par le VHB. Les facteurs viraux étudiés (AgHBs quantitatif et ADN-VHB) n'étaient pas prédictifs du CHC contrairement aux facteurs liés à l'hôte (obésité et âge) et à la sévérité de la cirrhose (thrombopénie). Parmi les nouveaux marqueurs du VHB, l'HBcrAg apparaît prédictif du CHC dans des études asiatiques conduites avec des populations incluant souvent peu de patients cirrhotiques. L'ARN viral circulant, quant à lui, n'a pas été étudié comme facteur prédictif du CHC ou d'un événement clinique chez le cirrhotique. L'objectif de cette étude était donc d'évaluer l'apport des nouveaux marqueurs HBcrAg et ARN-VHB pour prédire la survenue d'un événement clinique (survenue de CHC, décompensation hépatique ou décès) chez les patients de la cohorte Cirvir, uniquement infectés par le VHB. Les marqueurs HBcrAg et ARN-HBV ont été dosés sur les sérums prélevés à l'inclusion dans la cohorte. L'analyse des résultats a été effectuée en tenant compte de l'ensemble des données clinico-biologiques disponibles. Au total, 246 patients ont été inclus dans cette étude, en majorité des hommes, traités, AgHBe négatif. Parmi eux, 27 ont développé un CHC sur une durée médiane de suivi de près de 7 ans, soit un taux d'incidence annuelle de 1,74%. A l'inclusion, 95 (38%) patients avaient un ADN détecté mais le plus souvent non quantifié (n=66). Pour l'HBcrAg, 155 (63,5%) patients étaient positifs (médiane 4,2 log U/ml) et pour l'ARN-VHB, 81 (33%) patients étaient positifs (médiane 2,72 log U/ml). Nous avons identifié plusieurs profils en fonction du statut (positif ou négatif) de chaque marqueur. Aucun de ces profils n'est ressorti comme prédictif de la survenue d'un événement. Pris individuellement, ni l'HBcrAg ni l'ARN ne semblent prédictifs du développement d'un CHC. La survie globale était significativement plus faible chez les patients avec un ARN-VHB détecté. Ainsi, les deux marqueurs étudiés n'apportent pas d'informations supplémentaires quant au risque de survenue de CHC chez ces patients cirrhotiques uniquement infectés par le VHB.

L'article en préparation ci-dessous a été envoyé aux co-auteurs.

Title: Evaluation of new HBV markers for prediction of hepatocellular carcinoma occurrence in HBV-cirrhosis (ANRS CO12 CirVir)

Charlotte Pronier; Jérémy Bomo ; Valentine Genet ; Richard Layese; Segolene Brichler; Pierre Nahon; Vincent Thibault; the ANRS CO12 CirVir study group

Abstract

Severe clinical complications of chronic hepatitis B virus (HBV) infection are overlooked by cirrhosis and hepatocarcinoma (HCC), the last being not necessarily a prerequisite for the second. We aimed to evaluate the contribution of recently developed HBV markers, HBcrAg and HBV-RNA, on the prediction of HCC occurrence in HBV-monoinfected without hepatitis C or D coinfection patients with cirrhosis. Baseline frozen sera of patients with positive HBsAg and a biopsy-proven Child-Pugh A viral cirrhosis included in the ANRS CO12 CirVir cohort were selected to evaluate the adding value of HBcrAg and HBV-RNA quantification in addition to classical markers (HBsAg and HBV-DNA quantification) to predict for clinical events. Among 246 patients studied (82.1% men, median age 54 years, mostly HBeAg negative and treated), 27 HCC occurred during a median follow-up of 82.9 months (annual incidence: 1.74%). At baseline, 95 (38%) patients were positive for DNA, in majority detected but not quantified (n=66), with a median value of 4.22 log IU/ml for the 29 quantified HBV-DNA. For HBcrAg, 155 (63.5%) patients were positive (median 4.2 log U/ml) and for HBV-RNA, 81 (33%) patients were positive (median 2.72 log U/ml). Several profiles could be identified according to the detection of one or more HBV markers. Neither HBcrAg nor RNA taken on their own were statistically associated with the occurrence of HCC or a decompensation event. Overall survival was significantly lower in patients with detected HBV-RNA at baseline (p=0.0474). New virological markers tested once did not appear predictive of HCC in this specific cirrhotic patient population. Monitoring the kinetics of these markers over time should be evaluated to assess their clinical utility in predicting severe events.

Keywords: cirrhosis, HCC, HBV-RNA, HBcrAg, biomarker

Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infection is one the main causes of hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide, with 40% of all HCC in developed countries and with more than 60% in resource-limited countries. Fortunately, universal HBV vaccination is likely to progressively change the etiologic landscape of HCC and to reduce HBV to an anecdotal cause of this cancer. HCC accounts for the majority of primary liver cancers, the sixth most commonly diagnosed cancer and the fourth leading cause of cancer-related death worldwide. Despite remarkable progress in diagnosis and treatment, its prognosis remains poor with a median survival of less than 12 months. This highlights the key roles of primary and secondary preventions, with a better control of risk factors and an efficient monitoring of liver cancer in at-risk patients. The risk of HCC varies according to geographic area, sex, age, and degree of liver damage. Cirrhosis, caused by HBV or other etiologic agents, is an important risk factor for HCC. Around 2% of HBV-infected cirrhotic patients develop HCC per year. Once cirrhosis is established, antiviral therapy is beneficial in preventing cirrhosis progression and decompensation but successful therapy solely reduces but does not fully eliminate the risk of HCC development [1]. Surveillance to detect early HCC is recommended in at-risk patients i.e. cirrhotic patients, Child-Pugh A and B, or Child-Pugh C awaiting liver transplantation but also in non-cirrhotic HBV patients at intermediate or high risk of HCC according to PAGE-B or in non-cirrhotic F3 patients [1]. HBV-associated HCC represents the main factor that affects longevity of patients [2].

Since direct antiviral therapy modifies several variables such as ALT, HBV-DNA levels and HBeAg status, taking into account the treatment and new viral markers status may help refining the prediction of clinical events. In a previous study conducted on the same cohort, it was shown that three factors were independently associated with HCC occurrence: (i) age >50 years, (ii) platelets <150 000 /mm^3 and (iii) body mass index >30 kg/m^2. The virological factors (HBsAg and DNA) seemed to weigh less than host conditions in predicting HCC occurrence [3]. It also revealed that the most discriminant HCC risk score in this cohort was the European PAGE-B score.

Recently, new non-invasive HBV biomarkers have emerged that could represent potential candidates to predict HCC development. Indeed, serum Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) was shown to correlate with transcriptional activity of intrahepatic cccDNA [4].

Studies evaluating this marker as a predictive marker of HCC have been conducted on heterogeneous population of patients, mostly Asian, receiving treatment or not, with or without cirrhosis [5]–[13]. It was also shown that serum HBV-RNA could represent a surrogate marker of cccDNA transcriptional activity in virally suppressed NA-treated patients [14]. Despite lack of standardization and heterogeneous measurement approaches, circulating HBV-RNA might be an additional marker to monitor the efficacy of antiviral therapy, in association with more classical markers (DNA and HBsAg). Its role in predicting HBV relapse and sustained response after discontinuation of NA is still under investigation. The influence of serum HBV-RNA in the prediction of HCC development has not been studied so far [15].

The objective of this study was to evaluate what would be the additional value of two novel biomarkers HBcrAg and HBV-RNA combined with DNA and HBsAg to predict clinical events in the large multicenter prospective ANRS CO12 CirVir cohort of Child Pugh A HBV cirrhotic patients.

Materials and Methods

The Cir-B2 study follows on from the Cir-B study, an ancillary study derived from the CirVir cohort. The CirVir cohort was promoted by the French ANRS institution and approved by the local ethics committee. All patients gave written informed consent to participate. The full CirVir protocol is available on the ANRS website (http:// www.anrs.fr).

Patients

Among the 1,671 patients with prior biopsy-proven Child-Pugh A uncomplicated virus-related cirrhosis enrolled in the French multicenter ANRS CO12 CirVir cohort between March 2006 and July 2012 and prospectively followed for the development of HCC, those HBsAg positive were selected (Figure 1). Coinfections with hepatitis C virus (HCV), hepatitis D virus or HIV were excluded.

HBV markers

Virological analyses were performed on frozen serum samples provided by the CRB. For all patients, HBcrAg and HBV-RNA were tested at baseline in a unique laboratory (CHU Rennes). HBcrAg was measured with the Lumipulse® G HBcrAg assay (Fujirebio, Courtaboeuf, France) on the Lumipulse G600 II, according to the manufacturer's recommendations. Only values above 3 logU/mL, the specified limit of quantification, were taken into account. For molecular HBV markers, automated extraction of total nucleic acids was performed on the MagNA Pure 96 system with the DNA and Viral NA Small Volume 2.0 kit (Roche, Meylan, France). HBV-DNA was quantified in IU/mL (WHO Standard) as previously described [16]. HBV-RNA, was quantified as previously described with minor modifications [17]. Both HBV nucleic acids were tested on the same extract to limit any technical bias.

Follow-up

Follow-up was scheduled according to the French medical guidelines. Abdominal Doppler US was performed every 6 months. All events that occurred after enrolment were recorded based on the information obtained from the patient medical files at each center and monitored by a panel of 3 dedicated clinical research associates. Any modifications to treatments during follow-up, including antiviral therapy, were notified.

HCC diagnosis and treatment

In cases of focal liver lesions detected by US, a diagnostic procedure using contrast-enhanced imaging (CT scan or MRI), serum AFP assay and/or guided biopsy was performed. The HCC diagnosis was thus established either by histological examination or by using probabilistic non-invasive criteria according to the different periods of time (before and after 2011). When HCC diagnosis was established, treatment was decided using a multidisciplinary approach. The reports of imaging techniques showing liver focal lesions were secondarily reviewed by two dedicated senior hepatologists.

Statistical analyses

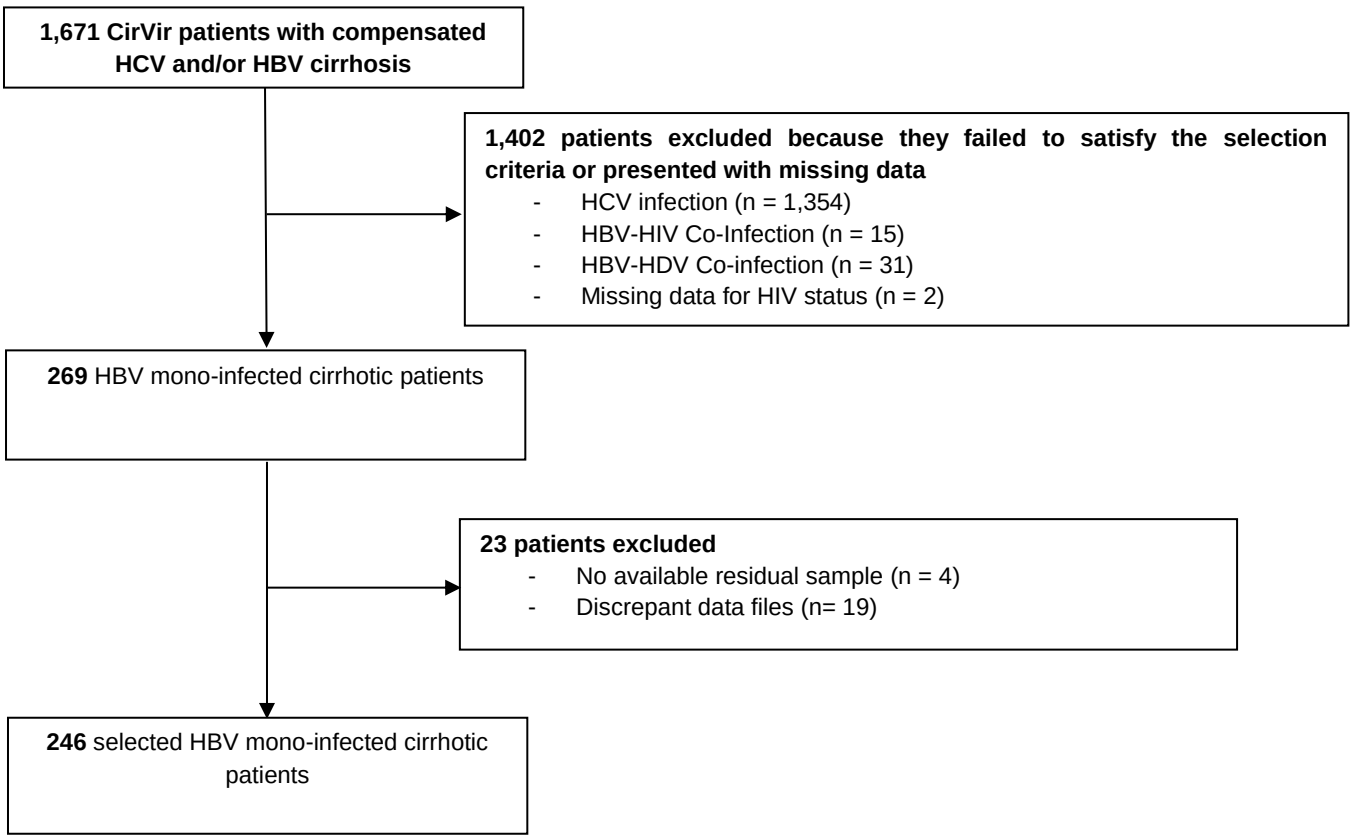
Descriptive results are expressed as median [IQR] or mean ± standard deviation for quantitative variables and as number or percentage for categorical data. Initial characteristics are compared between groups using the Student or Mann-Whitney test for continuous variables, and the chi-square or Fisher exact test for qualitative variables. For median comparisons between more than 2 groups, the Kruskal-Wallis test was applied. Incidence curves of events and survival curves were constructed by the Kaplan-Meier method. The comparison of these curves was evaluated by a log-rank test. Risk factors were assessed using

Cox regression models. All statistical analyses were performed using Stata 13.0 software. A p value lower than 0.05 was considered significant.

Results

In the French ANRS CO12 CirVir cohort, 269 were HBV-monoinfected. Twenty-three were secondarily excluded from analysis because of empty aliquots or conflicting data within the centralized database. Finally, 246 patients were taken into account (figure 1) with a median follow-up of 82.9 months [IQR: 58.9-105.5]. During follow-up, 27 patients developed HCC, decompensation occurred in 16 patients, 5 were transplanted and 16 died. HCC annual incidence was 1.74%. The 1-, 5- and 8-year cumulative incidence rates of HCC were 1.68%, 8.97%, 14.48%, respectively (figure 2).

Figure 1: flow chart of patient selection



Baseline characteristics of the selected patients at inclusion are detailed in table 1. Patients were mainly males (82.1%). Median age was significantly higher in patients who developed HCC. Most patients were European (58.7%). Concerning comorbidities, compared with patients who did not develop an HCC, there was significantly more patients with an ongoing tobacco consumption (p= 0.040) or an ongoing alcohol (≥ 10g/d) consumption (p=0.051) in the HCC group. Median body mass index (BMI) and percent of patients with BMI ≥ 30 kg/m^2 were both significantly higher in patients who developed HCC (p=0.048 and p=0.007). In the HCC group, patients also presented significantly more arterial hypertension (p=0.004). Regarding biological features, median platelet count, gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and total bilirubin serum levels were significantly different between patients who developed HCC and those who did not. A majority of patients (57.8%) had a PAGE-B score comprised between 10 and 17. Median PAGE-B score was significantly higher in the HCC group with more patients with PAGE-B score > 17 (p<0.001 and p=0.001). All patients with a PAGE-B score ≤ 9 did not develop HCC. At inclusion, 199 (80.9%) patients were treated with NA, yet, 95 (38.6%) had a baseline positive HBV-DNA, mostly below the limit of quantification of the assay. HBV genotyping was available for 63 patients and mostly represented by genotypes D (30.2%), A (27%) and E (17.5%). The majority of patients (85%) were HBeAg negative at inclusion. The median HBsAg titer was 3.03 log IU/ml [IQR 2.42-3.37]. HBcrAg was positive for 155 patients (63.5%) with a median level of 4.2 log U/ml [IQR 3.6-5.1]. HBV-RNA was not detected for 165 patients (67.1%). Median HBV-RNA was 2.72 log U/ml [IQR 2.14-3.83]. The virological features at baseline did not differ according to the genotype except for the HBsAg and HBeAg status (table 2).

Figure 2: cumulative incidence curve for HCC.

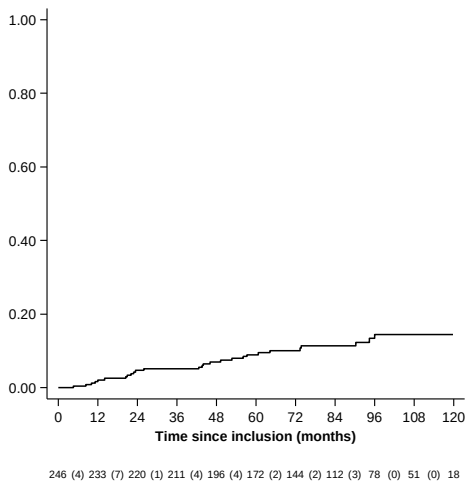


Table 1 characteristics of the Cir-B2 patients at baseline

Characteristics at inclusion	Number of patients	Total n=246	No HCC n=219 (89.0%)	HCC n=27 (11.0%)	P–value*
Demographic features					
Male gender	246	202 (82.1)	177 (80.8)	25 (92.6)	0.144
Age (years) ***(median, IQR)***	246	54.0 [43.8 – 62.4]	53.1 [42.6 – 61.5]	61.7 [57.0 – 67.8]	**0.001**
Place of birth	224				0.414
Europe + Indo Europe		114 (50.9)	101 (50.0)	13 (59.1)	
Subsaharan Africa		44 (19.6)	39 (19.3)	5 (22.7)	0.915
Northern Africa		20 (8.9)	17 (8.4)	3 (13.6)	0.858
Southeast Asia		46 (20.5)	45 (22.3)	1 (4.6)	0.099
Ethnic origin (SNPs)	213				0.223
EUR		125 (58.7)	110 (57.9)	15 (65.2)	
AFR		47 (22.1)	40 (21.05)	7 (30.4)	0.590
EAS		41 (19.2)	40 (21.05)	1 (4.4)	0.120
Comorbidities					
Past excessive alcohol consumption	229	25 (10.9)	22 (10.8)	3 (11.5)	0.851
Ongoing alcohol consumption	223				
0 or <10		209 (93.7)	188 (95.0)	21 (84.0)	
≥10		14 (6.3)	10 (5.0)	4 (16.0)	0.051
Tobacco consumption	226				0.095
Never		138 (61.1)	127 (63.2)	11 (44.0)	
Past		54 (23.9)	46 (22.9)	8 (32.0)	0.149
Ongoing		34 (15.0)	28 (13.9)	6 (24.0)	**0.040**
Drug use	234				
Never		231 (98.7)	206 (99.0)	25 (96.2)	
Past		2 (0.9)	2 (1.0)	0	
Ongoing		1 (0.4)	0	1 (3.8)	0.059
Body Mass Index (kg/m²) ***(median, IQR)***	206	25.1 [23.3 – 27.9]	25.1 [23.2 – 27.7]	25.9 [24.3 – 30.6]	**0.048**
Body Mass Index (class)	206				**0.002**
<25		99 (48.1)	88 (48.3)	11 (45.8)	
[25 ; 30[		79 (38.3)	74 (40.7)	5 (20.8)	0.270
≥ 30		28 (13.6)	20 (11.0)	8 (33.3)	**0.007**
Diabetes	246	29 (11.8)	25 (11.4)	4 (14.8)	0.687
Dyslipidaemia	246	16 (6.5)	14 (6.4)	2 (7.4)	0.840
Arterial hypertension	246	57 (23.2)	45 (20.6)	12 (44.4)	**0.004**
Past history of CV events	246	16 (6.5)	12 (5.5)	4 (14.8)	0.073
Metabolic syndrome *	246	23 (9.4)	19 (8.7)	4 (14.8)	0.237
Past history of malignancy (non HCC)	246	10 (4.1)	8 (3.7)	2 (7.4)	0.346
Biological features					
Platelet count (10^3/mm^3) ***(median, IQR)***	242	175.0 [131.0 – 207.0]	179.0 [136.0 – 210.0]	126.0 [110.0 – 150.0]	**<0.001**
AST (IU/L) ***(median, IQR)***	246	31.0 [26.0 – 41.0]	31.0 [25.0 – 41.0]	32.0 [26.0 – 57.0]	0.122
ALT (IU/L) ***(median, IQR)***	246	34.0 [24.0 – 47.0]	34.0 [24.0 – 46.0]	35.0 [26.0 – 58.0]	0.293
GGT (IU/L) ***(median, IQR)***	246	33.0 [22.0 – 57.0]	31.0 [21.0 – 55.0]	55.0 [34.0 – 75.0]	**0.001**
Serum albumin (g/L) ***(median, IQR)***	245	44.0 [41.1 – 46.4]	44.0 [41.1 – 46.5]	43.3 [41.0 – 46.0]	0.405
Total bilirubin (µmol/L) ***(median, IQR)***	246	10.0 [7.0 – 14.0]	10.0 [7.0 – 13.0]	12.0 [10.0 – 17.0]	**0.013**
Prothrombin time (%) ***(median, IQR)***	236	90.9 [81.0 – 98.0]	91.0 [82.0 – 98.0]	87.0 [77.5 – 93.5]	0.427
Virological features on original database					
Past or ongoing antiviral treatment	246	231 (93.9)	206 (94.1)	25 (92.6)	0.586
Positive HBV viral load	246	69 (28.1)	63 (28.8)	6 (22.2)	0.522

Characteristics at inclusion	Number of patients	Total n=246	No HCC n=219 (89.0%)	HCC n=27 (11.0%)	P–value*
Additional virological features					
HBeAg	246				
Negative		209 (85.0)	184 (84.0)	25 (92.6)	
Positive		37 (15.0)	35 (16.0)	2 (7.4)	0.297
HBV-DNA	246				0.718
Not detected		151 (61.4)	133 (60.7)	18 (66.7)	
Detected		95 (38.6)	86 (39.3)	9 (33.3)	0.451
HBsAg (log IU/mL)	241	3.03 [2.42 – 3.37]	3.03 [2.38 – 3.40]	3.04 [2.43 – 3.32]	0.663
HBcrAg	244				
Negative (< 3 log U/mL)		89 (36.5)	81 (37.3)	8 (29.6)	
Positive		155 (63.5)	136 (62.7)	19 (70.4)	0.386
Quantified HBcrAg (log U/mL) (among HBcrAg+)	155	4.2 [3.6 – 5.1]	4.2 [3.6 – 5.1]	4.1 [3.9 – 4.8]	0.666
HBV-RNA	246				
Not detected (negative)		165 (67.1)	147 (67.1)	18 (66.7)	
Detected (positive)		81 (32.9)	72 (32.9)	9 (33.3)	0.940
Quantified HBV-RNA (log IU/mL) (among HBV-RNA+)	81	2.72 [2.14- 3.83]	2.70 [2.09 – 3.89]	2.99 [2.58 – 3.01]	0.692
HBV genotype	63				0.999
A		17 (27.0)	15 (26.3)	2 (33.3)	
B		4 (6.3)	4 (7.0)	-	
C		9 (14.3)	9 (15.8)	-	
D		19 (30.2)	17 (29.8)	2 (33.3)	
E		11 (17.5)	9 (15.8)	2 (33.3)	
F		-	-	-	
G		3 (4.7)	3 (5.3)	-	
PAGE-B score (continuous variable)	242	16 [12 – 18]	14 [12 – 18]	18 [16 – 20]	**<0.001**
PAGE-B score (categorical variable)	242				
≤9		22 (9.1)	22 (10.2)	0	
10-17		140 (57.8)	132 (61.4)	8 (29.6)	
>17		80 (33.1)	61 (28.4)	19 (70.4)	**0.001**

*p-value from Cox regression model

Table 2 virological features at baseline according to genotype

virological features at inclusion	HBV genotype A n=17 (27.0%)	HBV genotype B n=4 (6.3%)	HBV genotype C n=9 (14.3%)	HBV genotype D n=19 (30.2%)	HBV genotype E n=11 (17.5%)	HBV genotype G n=3 (4.7%)	P-value
HBV-DNA							0.469
Not detected	4 (23.5)	1 (25.0)	4 (44.4)	5 (26.3)	1 (9.1)	-	
Detected	13 (76.5)	3 (75.0)	5 (55.6)	14 (73.7)	10 (90.9)	3 (100)	
HBV-DNA (log IU/mL)	3.89 [3.36 – 4.36]	4.00 – 4.91	3.33 – 7.13	4.34 [3.49 – 5.04]	5.67 [4.89 – 6.53]	8.19	0.126
HBsAg (log IU/mL)	3.14 [2.44 – 3.51]	2.83 [2.72 – 2.89]	2.66 [2.42 – 3.39]	3.18 [2.62 – 3.74]	3.58 [3.28 – 3.86]	3.03 [1.91 – 4.49]	**0.026**
HBeAg							**0.023**
Negative	10 (58.8)	3 (75.0)	5 (55.6)	18 (94.7)	6 (54.6)	2 (66.7)	
Positive	7 (41.2)	1 (25.0)	4 (44.4)	1 (5.3)	5 (45.4)	1 (33.3)	
HBV-RNA							0.401
Not detected	8 (47.1)	-	3 (33.3)	10 (52.6)	4 (36.4)	-	
Detected	9 (52.9)	4 (100)	6 (66.7)	9 (47.7)	7 (63.6)	3 (100)	
HBV-RNA (log U/mL)	2.98 [2.58 – 3.78]	2.84 [2.67 – 3.48]	2.71 [2.10 – 3.93]	2.61 [2.36 – 2.98]	2.89 [2.68 – 4.14]	4.23 [2.26 – 4.47]	0.779
HBcrAg							0.288
Negative (< 3 log U/mL)	4 (23.5)	-	1 (11.1)	7 (36.8)	2 (18.2)	1 (33.3)	
Positive	13 (74.5)	4 (100)	8 (88.9)	12 (63.2)	9 (81.8)	2 (66.7)	
HBcrAg (log U/mL)	5.0 [3.8 – 5.7]	3.9 [3.3 – 4.9]	5.3 [4.4 – 5.5]	4.5 [3.7 – 5.1]	5.6 [4.5 – 6.1]	5.4 – 9.4	0.611

Considering all patients, HBcrAg was significantly and positively correlated with DNA, RNA, and AST and negatively correlated with prothrombin time (table 3). In the subpopulation of HBeAg negative patients, there was an inverse correlation between HBcrAg and prothrombin time (p=0.059) specifically. Additionally, a significant inverse correlation was found between HBcrAg concentrations and platelet counts in HBeAg negative patients (p=0.028). In the HBeAg positive subpopulation, a strong correlation was found between HBcrAg concentrations, DNA and RNA loads (p=0.005 for both).

At baseline, none of the HBV studied markers was statistically associated with the occurrence of HCC or any decompensation event whether in the whole population or in the HBeAg negative subpopulation. The overall survival was significantly shorter in patients with detected HBV-RNA at baseline (p=0.047) but did not differ according to the DNA or HBcrAg status at baseline (Figure 3).

To take into account the potential added value of recently developed HBV markers HBcrAg and HBV-RNA, patients were categorized according to the detection of any of these markers (table 4). We made the postulate that the absence of detection of any of these markers was the most favorable virological profile. Based on this hypothesis, we did not find any difference regarding HCC onset between patients positive for all 3 markers (DNA, RNA and HBcrAg, n=38) compared to those negative for these markers (n=53). For HBeAg positive patients (n=37), all were HBcrAg positive. In these patients, the two major profiles representing 25 patients (67.6%) were both HBV-RNA and HBcrAg positive and were distinguished by their replication status. For HBeAg negative patients, the two major profiles representing 107 patients (51.2%) were both HBV-DNA and HBV-RNA negative and were distinguished by their HBcrAg status.

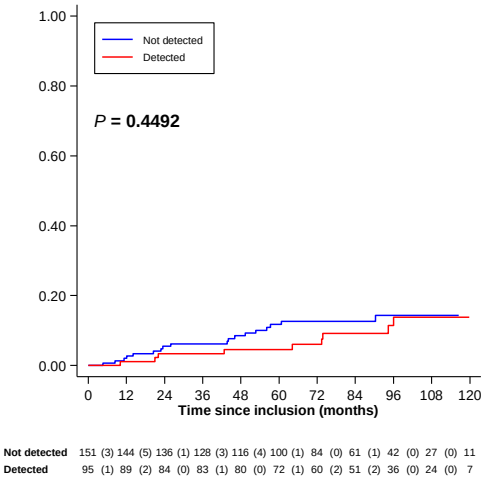
Table 3: correlations between virological and biological parameters

Total Population	**DNA (log IU/mL) N=29**	**RNA (log IU/mL) N=81**	**HBcrAg (log U/mL) N=155**
DNA (log IU/mL)		(n=21) R_S=0.2689 p=0.2385	(n=21) R_S=0.5553 p=**0.009**
RNA (log IU/mL)			(n=65) R_S=0.4112 p=**0.0007**
AST	R_S=0.2103 p=0.2736	R_S=0.1971 p=0.0778	R_S=0.2234 p=**0.0052**
ALT	R_S=0.2701 p=0.1564	R_S=0.0537 p=0.6341	R_S=0.1153 p=0.1531
GGT	R_S=0.1302 p=0.5009	R_S=0.0889 p=0.4300	R_S=-0.0261 p=0.7472
Prothrombin time	R_S=-0.2339 p=0.2219	(n=76) R_S=-0.2294 p=0.0462	(n=148) R_S=-0.2345 p=**0.0041**
Albumin	R_S=-0.3513 p=0.0617	R_S=0.0756 p=0.5024	(n=154) R_S=-0.1078 p=0.1832
Total bilirubin	R_S=0.1903 p=0.3226	R_S=0.0786 p=0.4857	R_S=0.0548 p=0.4981
Platelet	R_S=0.0372 p=0.8480	R_S=0.0188 p=0.8675	(n=152) R_S=-0.0793 p=0.3314
HBeAg- Population	**DNA (log IU/mL) N=23**	**RNA (log IU/mL) N=56**	**HBcrAg (log IU/mL) N=119**
DNA (log IU/mL)		(n=15) R_S=0.0626 p=0.8247	(n=15) R_S=0.3492 p=0.2021
RNA (log IU/mL)			(n=40) R_S=0.1736 p=0.2841
AST	R_S=0.0583 p=0.7915	R_S=0.2299 p=0.0882	R_S=0.1632 p=0.0762
ALT	R_S=0.0490 p=0.8244	R_S=0.0739 p=0.5885	R_S=0.0922 p=0.3186
GGT	R_S=-0.0285 p=0.8973	R_S=0.1411 p=0.2996	R_S=0.0108 p=0.9073
Prothrombin time	R_S=-0.1576 p=0.4726	(n=52) R_S=-0.2122 p=0.1311	(n=113) R_S=-0.1781 p=0.0591
Albumin	R_S=-0.2911 p=0.1778	R_S=0.0840 p=0.5381	(n=118) R_S=0.0281 p=0.7627
Total bilirubin	R_S=0.1088 p=0.6213	R_S=-0.0023 p=0.9864	R_S=0.0936 p=0.3114
Platelet	R_S=-0.0168 p=0.9393	R_S=-0.0451 p=0.7414	(n=116) R_S=-0.2044 p=**0.0277**
HBeAg+ Population	**DNA (log IU/mL) N=6**	**RNA (log IU/mL) N=25**	**HBcrAg (log IU/mL) N=36**
DNA (log IU/mL)		(n=6) R_S=0.6000 p=0.2080	(n=6) R_S=0.9429 p=**0.0048**
RNA (log IU/mL)			(n=25) R_S=0.5396 p=**0.0054**
AST	R_S=0.0580 p=0.9131	R_S=-0.0085 p=0.9679	R_S=0.3010 p=0.0745
ALT	R_S=0.8286 p=0.0416	R_S=-0.0982 p=0.6405	R_S=0.1527 p=0.3740
GGT	R_S=0.2571 p=0.6228	R_S=0.0027 p=0.9898	R_S=-0.1199 p=0.4859
Prothrombin time	R_S=0.2571 p=0.6228	R_S=-0.2385 p=0.2618	(n=35) R_S=-0.1347 p=0.4405
Albumin	R_S=-0.8286 p=0.0416	R_S=0.0427 p=0.8393	R_S=-0.2663 p=0.1164
Total bilirubin	R_S=0.6000 p=0.2080	R_S=0.4329 p=0.0306	R_S=0.3184 p=0.0584
Platelet	R_S=0.1429 p=0.7872	R_S=0.1133 p=0.5896	R_S=0.0822 p=0.6336

Figure 2: cumulative incidence of HCC according to HBV markers status

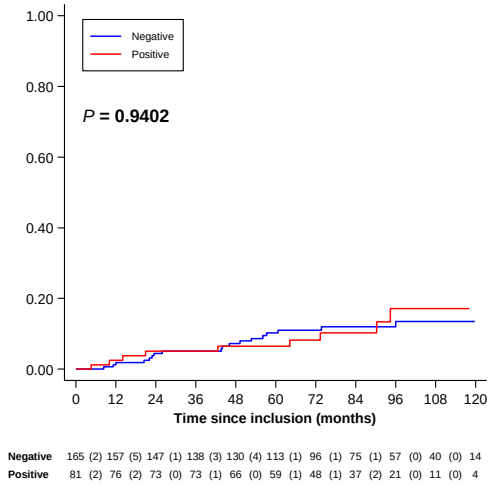
(A) DNA; (B) RNA; (C) HBcrAg

(A) HBV-DNA



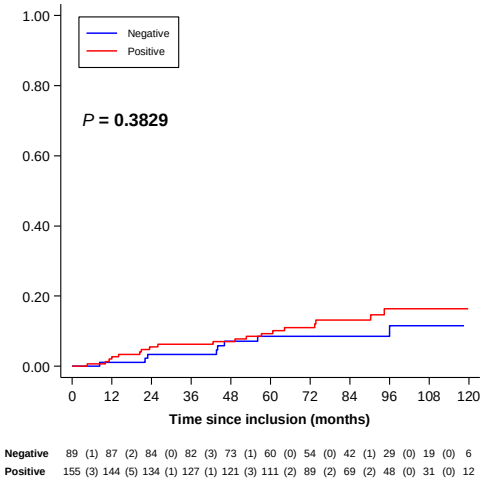
if censored at 60 months: p = 0.0802

(B) HBV-RNA



if censored at 60 months: p = 0.4406

(C) HBcrAg

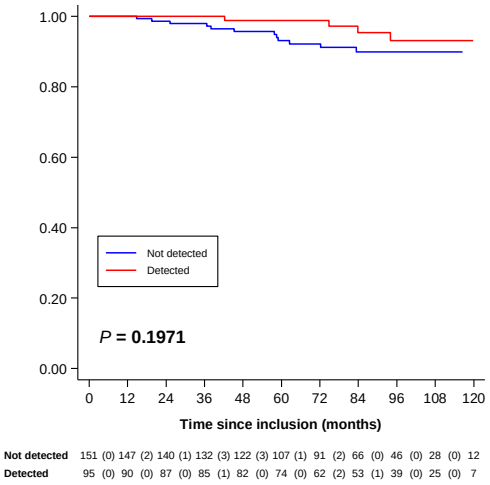


if censored at 60 months: p = 0.7904

Figure 3: overall survival according to HBV markers status

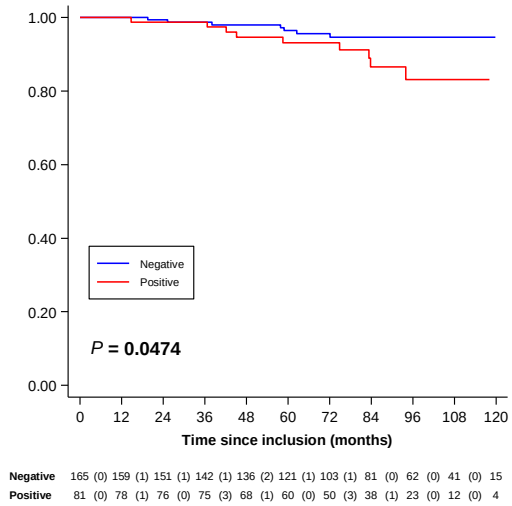
(A) DNA; (B) RNA; (C) HBcrAg

(A) HBV-DNA



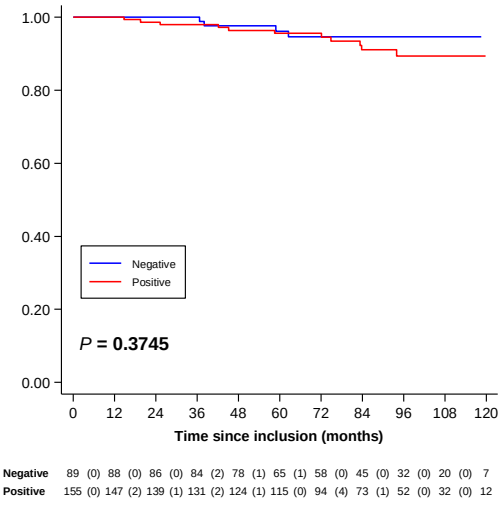
if censored at 60 months: p = 0.0566

(B) HBV-RNA



if censored at 60 months: p = 0.2686

(C) HBcrAg



if censored at 60 months: = 0.7737

Table 4: "DNA-RNA-HBcrAg" profiles according to the HBeAg status

Number (%)	DNA	RNA	HBcrAg
total population			
60 (24.4)	-	-	+
53 (21.5)	-	-	-
38 (15.5)	+	+	+
30 (12.2)	+	-	+
27 (11.0)	-	+	+
20 (8.1)	+	-	-
9 (3.7)	-	+	-
7 (2.8)	+	+	-
2 (0.8)	-	-	MD
HBeAg- subpopulation			
54 (25.8)	-	-	+
53 (25.4)	-	-	-
25 (12.0)	+	-	+
23 (11.0)	+	+	+
20 (9.6)	+	-	-
17 (8.1)	-	+	+
9 (4.3)	-	+	-
7 (3.3)	+	+	-
1 (0.5)	-	-	MD
HBeAg+ subpopulation			
15 (40.54)	+	+	+
10 (27.03)	-	+	+
6 (16.22)	-	-	+
5 (13.51)	+	-	+
1 (2.70)	-	-	MD

MD: missing data

We next asked whether these new viral markers could help to identify poor outcomes such as HCC development or decompensation events. As shown on table 5 for HCC, none of these markers reached a satisfactory area under the receiver operating characteristic curve (AUROC), most of them ceiling around 0.5 therefore not applicable as a diagnostic tool. When applied to PAGE-B stratified patients, the same conclusions prevailed. HBcrAg had a sensitivity of 70.4%, a specificity of 37.3%, a PPV of 12.3% and a NPV of 91% to predict HCC in all cirrhotic patients. HBcrAg sensitivity (73.7%) were higher in PAGE-B high risk patients while NPV were higher in PAGE-B intermediate patients (94.5%) compared to all patients. HBV-RNA had a sensitivity of 33.3%, a specificity of 67.1%, a PPV of 11.1% and a NPV of 89.1% to predict HCC in all cirrhotic patients. HBV-RNA NPV was higher in PAGE-B intermediate patients (94.7%) compared to all patients (89.1%).

Table 5: Performances of HBcrAg and HBV-RNA to predict HCC

	Total population (n=246)		**Patients with 10 ≤ PAGE-B ≤ 17 (n=140)**		**Patients with PAGE-B >17 (n=80)**	
	HBcrAg	**HBV RNA**	**HBcrAg**	**HBV RNA**	**HBcrAg**	**HBV RNA**
Area under ROC curve	0.54	0.50	0.51	0.53	0.54	0.47
Sensitivity (%)	**70.4**	33.3	**62.5**	37.5	**73.7**	31.6
Specificity (%)	37.3	**67.1**	39.7	**68.2**	34.4	**62.3**
PPV (%)	12.3	11.1	9.0	6.7	25.9	20.7
NPV (%)	**91.0**	**89.1**	**94.5**	**94.7**	**80.8**	**74.5**

Discussion

Novel HBV markers emerged these last years with several fields of application. We aimed to evaluate the predictive value for HCC of serum HBcrAg and HBV-RNA levels at baseline in cirrhotic HBV monoinfected patients included in the ANRS CO12 CirVir cohort. To the best of our knowledge, it is the first study who is interested in predicting the risk of HCC only in cirrhotic, high risk patients, and evaluating both HBV-RNA and HBcrAg markers in this context. The strengths of our study are: (i) an homogeneous cohort of cirrhotic HBV monoinfected patients, (ii) the inclusion of patients from diverse ethnic origins with a majority of European, (iii) a median follow-up of 7 years, (iv) and the prospective nature of the study.

In these cirrhotic patients, in majority treated for at least 4 years at the time of inclusion, HCC surveillance is still required as the annual HCC incidence (1.74%) remains high. Despite probable reversal of cirrhosis in few of these patients, predictive scores and biomarkers are still needed.

In these cirrhotic patients, in majority treated for at least 4 years at the time of inclusion, HCC surveillance is still required as the annual HCC incidence (1.74%) remains high. Despite probable reversal of cirrhosis in few of these patients, predictive scores and biomarkers are still needed.

In this homogeneous cohort of cirrhotic HBV monoinfected patients, neither HBcrAg nor HBV-RNA tested at baseline were predictive of HCC or hepatic event. These results were different from those reported in the literature, particularly for the HBcrAg marker both in untreated and treated patients. Indeed, Tseng et al. showed that an HBcrAg level greater or equal to 4 log was associated with an increased risk of HCC in HBeAg negative patients with HBV DNA levels from 2000 to 20,000 IU/ml [5]. Our study was not designed to confirm this finding. Their study included Asian, untreated and without cirrhosis patients while our cohort was solely constituted of cirrhotic patients and a majority of European and treated patients. Another study was conducted in 1031 untreated Asian patients including 7% of patients with cirrhosis, defined as a FIB-4 index > 3.6 [6]. Contrary to our study, they concluded that a positive HBcrAg was positively correlated with the incidence of HCC. Their result may partly be influenced by the high proportion of HBeAg positive patients, representing 188 of 1031 patients. HBcrAg measurement is largely influenced by the presence of circulating HBeAg and should be used with caution in this population. The predictive potency of HBcrAg for the incidence of HCC was not found in our population of patients with cirrhosis.

Our results were also inconsistent with previous studies in NA treated patients that highlighted HBcrAg positivity as a predictive for the development of HCC. All these retrospective studies were mainly conducted in Asian population, with numbers varying from 109 to 1400 patients but with a variable percentage of cirrhotic patients (4-58%) and with a follow-up time of 3 to 13 years. HBeAg negative and NA treated patients represented 47 to 100% and 41% to 100% of patients, respectively [7]–[13]. While Liang et al. reported that the level of HBcrAg at baseline could accurately predict the risk of HCC in HBeAg negative treated patients, one should highlight that their population was solely Chinese, an important difference with our study that included a majority of European patients. Very recently, in a retrospective Dutch long-term follow-up study including 119 patients with HBV-HCC, Beudeker et al. reported that HBcrAg levels predicted recurrence-free survival in mainly Caucasian patients with HBV associated early stage HCC [18]. Median HBcrAg levels at baseline in our cohort (4.2 log U/ml) was quite similar with their median HBcrAg levels at HCC diagnosis (4.32 log U/ml; IQR 2.78-5.82). However, HBcrAg levels ranging between 2 to 3 log U/ml should not have been taken into account as the validated limit of quantification of the assay, as claim by the manufacturer, is 3 log U/ml. The authors suggested that HCC was associated to HBV but data about comorbidities like BMI were lacking. In our study, overall survival did not significantly differ according to the HBcrAg level at baseline contrary to HBV-RNA. So, the role of HBcrAg to predict HCC seems at least to depend on the studied population and certainly remains to be clarified. If a single measurement of both RNA and HBcrAg did not appear useful to predict HCC, the study of these new markers kinetics over time could be more relevant.

This study presents also some limitations. First, we had a low occurrence of HCC that may have led to underpowered analyses and we had only few HBeAg positive patients therefore limiting the analyses for this subgroup. Second, we did not have HBV genotype data for most of our patients because most of them were successfully treated at inclusion with no viral replication allowing to perform the analysis.

In conclusion, HBcrAg and HBV-RNA measured at baseline in our cohort were not predictive of HCC occurrence in HBV cirrhotic patients. While these new markers could not help to better identify at-risk patients, all other preventing measures should be reinforced, such as hygienic-dietetic measures, reduction of alcohol and tobacco consumption. Other studies looking at sequential measurement of these markers in cirrhotic HBV patients are warranted.

Bibliography

[1] European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu and European Association for the Study of the Liver, "EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma," *J. Hepatol.*, vol. 69, no. 1, pp. 182–236, 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.019.

[2] G. V. Papatheodoridis *et al.*, "Eight-year survival in chronic hepatitis B patients under long-term entecavir or tenofovir therapy is similar to the general population," *J. Hepatol.*, vol. 68, no. 6, pp. 1129–1136, 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.031.

[3] S. Brichler *et al.*, "Non-virological factors are drivers of hepatocellular carcinoma in virosuppressed hepatitis B cirrhosis: Results of ANRS CO12 CirVir cohort," *J. Viral Hepat.*, vol. 26, no. 3, pp. 384–396, Mar. 2019, doi: 10.1111/jvh.13029.

[4] B. Testoni *et al.*, "Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients," *J. Hepatol.*, vol. 70, no. 4, pp. 615–625, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.jhep.2018.11.030.

[5] T.-C. Tseng *et al.*, "High Level of Hepatitis B Core–Related Antigen Associated With Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Chronic HBV Infection of Intermediate Viral Load," *Gastroenterology*, vol. 157, no. 6, pp. 1518-1529.e3, Dec. 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.028.

[6] T. Tada *et al.*, "HBcrAg is a predictor of hepatocellular carcinoma development: an analysis using time-dependent receiver operating characteristics," *J. Hepatol.*, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.jhep.2016.03.013.

[7] M. Honda *et al.*, "Hepatitis B Virus (HBV) Core-Related Antigen During Nucleos(t)ide Analog Therapy Is Related to Intra-hepatic HBV Replication and Development of Hepatocellular Carcinoma," *J. Infect. Dis.*, vol. 213, no. 7, pp. 1096–1106, Apr. 2016, doi: 10.1093/infdis/jiv572.

[8] T. Hosaka *et al.*, "Impact of hepatitis B core-related antigen on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients treated with nucleos(t)ide analogues," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 49, no. 4, pp. 457–471, 2019, doi: 10.1111/apt.15108.

[9] T. Kumada *et al.*, "Effect of nucleos(t)ide analogue therapy on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B patients: A propensity score analysis," *J. Hepatol.*, vol. 58, no. 3, pp. 427–433, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.jhep.2012.10.025.

[10] W. To *et al.*, "Hepatitis B core- related antigen levels after HBeAg seroconversion is associated with the development of hepatocellular carcinoma," *J. Viral Hepat.*, vol. 26, no. 12, pp. 1473–1480, Dec. 2019, doi: 10.1111/jvh.13191.

[11] L. Y. Liang *et al.*, “Serum hepatitis B core-related antigen predicts hepatocellular carcinoma in hepatitis B e antigen-negative patients,” *J. Gastroenterol.*, Jun. 2020, doi: 10.1007/s00535-020-01700-z.

[12] Y. Suzuki *et al.*, “Hepatitis B virus (HBV)-infected patients with low hepatitis B surface antigen and high hepatitis B core-related antigen titers have a high risk of HBV-related hepatocellular carcinoma,” *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.*, vol. 49, no. 1, pp. 51–63, Jan. 2019, doi: 10.1111/hepr.13277.

[13] K.-S. Cheung, W.-K. Seto, D. K.-H. Wong, C.-L. Lai, and M.-F. Yuen, “Relationship between HBsAg, HBcrAg and hepatocellular carcinoma in patients with undetectable HBV DNA under nucleos(t)ide therapy,” *J. Viral Hepat.*, vol. 24, no. 8, pp. 654–661, Aug. 2017, doi: 10.1111/jvh.12688.

[14] J. Wang *et al.*, “Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients,” *J. Hepatol.*, vol. 68, no. 1, pp. 16–24, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2017.08.021.

[15] S. Liu, B. Zhou, J. D. Valdes, J. Sun, and H. Guo, “Serum Hepatitis B Virus RNA: A New Potential Biomarker for Chronic Hepatitis B Virus Infection,” *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 69, no. 4, pp. 1816–1827, 2019, doi: 10.1002/hep.30325.

[16] S. D. Pas, E. Fries, R. A. De Man, A. D. M. E. Osterhaus, and H. G. M. Niesters, “Development of a Quantitative Real-Time Detection Assay for Hepatitis B Virus DNA and Comparison with Two Commercial Assays,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 8, pp. 2897–2901, Aug. 2000.

[17] F. van Bömmel *et al.*, “Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors: van BÖMMEL ET AL.,” *Hepatology*, vol. 61, no. 1, pp. 66–76, Jan. 2015, doi: 10.1002/hep.27381.

[18] B. J. B. Beudeker *et al.*, “Hepatitis B core- related antigen levels predict recurrence-free survival in patients with HBV associated early stage hepatocellular carcinoma: results from a Dutch long- term follow- up study,” *J. Viral Hepat.*, p. jvh.13394, Sep. 2020, doi: 10.1111/jvh.13394.

DISCUSSION GENERALE

Depuis la découverte du virus, les connaissances sur les formes circulantes du virus de l'hépatite B ne cessent d'évoluer. Diverses particules virales et sous-virales sont libérées selon différentes voies, en proportions variables selon le contexte. La production de chacune de ces particules, qui doivent avoir un rôle spécifique, peut influer sur l'histoire naturelle de la maladie. De nouveaux marqueurs viraux ont également émergé. Les différentes indications pour chacun de ces marqueurs pour le suivi des patients restent à définir. Une meilleure compréhension de la morphogenèse complexe du VHB et des nouveaux marqueurs viraux diagnostiques permettra de déterminer leur intérêt potentiel dans le suivi des nouveaux traitements et de mieux appréhender les stratégies d'élimination virale. Ces travaux de thèse se composent d'une approche *in vitro* et *in vivo* pour (i) l'étude des formes virales circulantes chez les patients et (ii) l'étude des nouveaux marqueurs du VHB.

1. Formes virales du VHB circulantes chez les patients

1.1. Peu de travaux disponibles à partir de plasma de patients

L'étude des différentes formes de particules virales du VHB est essentiellement effectuée à partir de surnageant de culture et très peu à partir de plasma. La disponibilité de grands volumes pour l'étude des formes virales est un atout majeur de l'utilisation des surnageants de culture. Toutefois, les formes virales produites *in vitro* à partir de cultures cellulaires ne sont pas forcément transposables à ce que l'on peut observer *in vivo* chez les patients. Les systèmes de culture en deux dimensions actuellement utilisés s'éloignent des conditions physiologiques et n'intègrent pas l'action du système immunitaire dont on connaît l'importance dans cette infection. On sait par exemple que les surnageants contiennent un nombre important de capsides non enveloppées qui ne sont pas ou peu décrites chez les patients. Nous avons ainsi souhaité par ce travail étudier les formes virales circulantes chez les patients. Une originalité de notre travail est de comparer des plasmas AgHBe positif et négatif et des génotypes D et E, moins étudiés que les génotypes asiatiques (B et C).

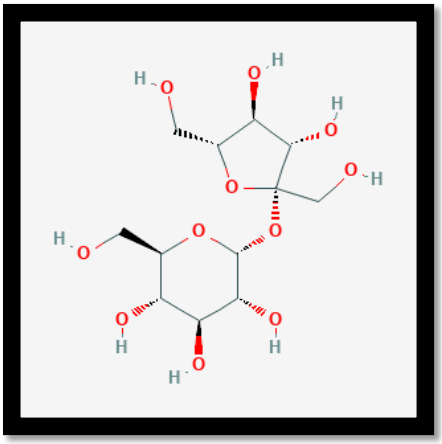
1.2. Gradient de vélocité et marqueurs du VHB: un système performant pour caractériser les formes circulantes

Cette étude s'inscrit dans la continuité d'un travail précédent, initié à Paris, qui a montré la capacité des gradients de vélocité à **s**éparer rapidement et efficacement les particules virales des particules sous-virales (Désiré et al., 2015). La technique n'était néanmoins pas transposable en l'état. Il a fallu adapter la technique en fonction des équipements disponibles à Rennes (ultracentrifugeuse, rotor, type de tube). Nous avons également modifié la méthode de formation du gradient continu. Ce dernier est dorénavant obtenu par congélation sur la nuit d'une solution de Nycodenz 26% dans les tubes de centrifugation suivie d'une décongélation à température ambiante (Rickwood et al., 1982). Enfin, nous avons consacré un temps conséquent à la mise au point de la technique de détection/quantification de l'ARN-VHB. Avant de valider l'approche développée par Van Bömmel et al. (van Bömmel et al., 2015) comme technique de quantification de l'ARN-VHB pour nos expériences, nous avons ainsi testé les approches développées par Jansen et al et Wang et al (Jansen et al., 2016; Wang et al., 2016). Nous avons rencontré plusieurs écueils, notamment sur un problème de spécificité de ces techniques, développés dans le paragraphe suivant de la discussion (1.3).

Dans ce travail, l'approche des gradients de vélocité combinée à l'utilisation de marqueurs classiques (AgHBs quantitatif et ADN-VHB quantitatif) et de nouveaux marqueurs du VHB (HBcrAg et ARN-VHB quantitatifs) a permis une caractérisation fine des particules circulantes chez les patients en fonction du statut vis-à-vis de l'AgHBe et du génotype. De façon tout à fait originale, nous avons estimé le nombre de particules virales complètes obtenues selon les différents marqueurs (AgHBs, ADN et HBcrAg) dosés de façon standardisée, sur chacune des fractions récoltées. Les différents rapports calculés ont révélé des similitudes et des différences de formes circulantes selon le statut vis-à-vis de l'AgHBe. Par souci de standardisation de nos expériences, nous avons pour ce travail utilisé 4 plasmas issus de donneurs de sang, disponibles avec d'importants volumes, grâce à la contribution de Syria Laperche (INTS, Paris). En répétant à plusieurs reprises les gradients, nous avons d'une part optimiser la technique et ensuite montré la bonne reproductibilité des gradients de vélocité malgré les difficultés que représente une collecte des fractions par le fond du tube de centrifugation.

Les profils obtenus avec les gradients de vélocité sont très intéressants. Néanmoins, la séparation n'étant pas réalisée à l'équilibre et avec une durée de centrifugation courte, les particules n'ont pas le temps d'atteindre la densité attendue. Nous avons ainsi souhaité contrôler ces profils par des gradients de densité à l'équilibre plus conventionnels pour s'assurer que nous retrouvions des profils équivalents. L'atout majeur des gradients de vélocité est de réaliser une séparation très rapide des particules virales. Les gradients de vélocité sont obtenus par une séparation zonale en gradient continu.

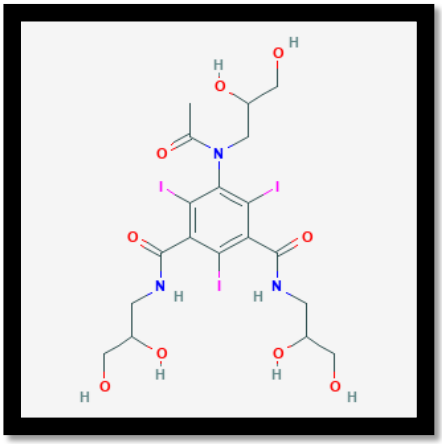
La séparation des particules se fait en partie en fonction de la masse des particules. Lors de la centrifugation, en tenant compte du gradient de concentrations de Nycodenz, de la durée et de la vitesse de centrifugation choisis, les particules lourdes sédimentent plus vite que les plus légères sans atteindre le fond du tube. Avec les gradients de densité à l'équilibre, la différence entre la densité des particules et celle de la solution de centrifugation utilisée influe sur la vitesse de sédimentation des particules. Chaque particule sédimente jusqu'à ce qu'elle atteigne la concentration de la solution utilisée pour le gradient (ici le sucrose pour les gradients à l'équilibre) correspondant à sa densité. La compréhension des profils est plus aisée à l'équilibre puisque les particules sont à l'équilibre. Nous avons fait le choix du sucrose, pour ces gradients à l'équilibre, plus couramment employés comme le chlorure de césium. Les densités théoriques des différentes particules virales à l'équilibre selon la solution utilisée pour le gradient sont présentées dans le tableau 10. Avec nos expériences de gradient de densité en sucrose à l'équilibre, les VP sont situées dans les fractions 5-6, soit à une densité de 1,21 $g.cm^{-3}$ tandis que les SVP sont situées en fraction 11, soit à une densité de 1,14-1,16 $g.cm^{-3}$ en sucrose. Le sucrose et le Nycodenz sont deux molécules avec une structure chimique et un poids moléculaire différents (Figure 14). Néanmoins, les profils de séparation obtenus en vélocité (nycodenz) ou à l'équilibre (sucrose) sont remarquablement semblables (pic de VP en fractions 4-6 et pic de SVP en fractions 11-13).



Sucrose

$C_{12}H_{22}O_{11}$

342.3 g/mol



Nycodenz

$C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$

821.1 g/mol

Figure 14 : Structure chimique, formule et poids moléculaire du sucrose et du Nycodenz.

Densité (g/cm^3)	Chlorure de césium	Sucrose
VP	1,24 -.1,26	1,21
SVP	1,18	1,15

Tableau 10 : Densité des particules du VHB à l'équilibre selon les gradients.

1.3. Présence de particules virales à ARN confirmée chez les patients AgHBe positif ou négatif

L'ARN-VHB a été testé pour les plasmas sélectionnés et les fractions des gradients générés correspondant à ces plasmas, avec la technique de détection/quantification de l'ARN-VHB mise au point. Avec ce dosage et les expériences en présence de détergent, nous avons identifié des particules enveloppées contenant de l'ARN-VHB pour trois des quatre plasmas testés. Pour le plasma B7686 (génotype D ; AgHBe négatif), la concentration d'ARN détectée dans le plasma est proche du seuil de la technique ce qui explique certainement l'absence de détection d'ARN dans les fractions collectées.

Ces particules circulent en quantités inférieures, d'un facteur 1 000 à 10 000, par rapport aux virions chez ces patients non traités. Deux études utilisant des techniques de quantification de l'ARN différentes de la nôtre ont observé un phénomène identique de quantification moindre de l'ARN par rapport à l'ADN chez des patients non traités. Dans l'étude de Wang menée chez 11 patients AgHBe positif, la différence de quantification préthérapeutique de l'ARN par rapport à l'ADN était d'un facteur 10 à 100 en faveur de l'ADN (Wang et al., 2016). Une détection d'ARN chez la majorité des 102 donneurs de sang testés est rapportée par Butler et al., en concentration toujours inférieure par rapport à l'ADN, d'un facteur 100 à 1 500 avec leur technique de quantification de l'ARN qui cible deux régions X et core (Butler et al., 2018). Les 10 donneurs non détectés en ARN dans leur étude étaient tous AgHBe négatif. Ainsi la production de particules virales contenant de l'ARN semble inférieure chez les patients non traités AgHBe négatif par rapport à ceux AgHBe positif. Le rôle de ces particules enveloppées qui contiennent de l'ARN-VHB n'est pas connu.

Au-delà de la détection de ces particules à ARN, il est important de déterminer la (ou les) espèce(s) d'ARN circulante(s) au sein de ces particules et de standardiser la technique de quantification de l'ARN. De plus, on peut se demander si la nature de l'ARN-VHB détecté varie au cours de l'histoire naturelle de la maladie ou sous traitement. Les premières études s'intéressant à la détection de l'ARN dans le sérum des patients prétendent détecter l'ARNpg. Wang et al. mettent en avant le caractère infectieux potentiel de ces virions qui contiendraient spécifiquement de l'ARNpg (Wang et al., 2016). En effet, sur le modèle du VHD, si ces particules défectives rentrent dans les hépatocytes, grâce à la polymérase virale, l'ARNpg pourrait être rétro-transcrit et former une nouvelle particule infectieuse qui participerait à la persistance de l'infection. La comparaison des résultats des différentes études menées sur l'ARN-VHB est cependant difficile en l'absence d'une technique standardisée disponible.

La spécificité de la technique est également primordiale en particulier pour les échantillons avec des concentrations très élevées d'ADN-VHB. Nous avons fait l'expérience lors du choix et du développement de la technique de quantification de l'ARN-VHB qu'un traitement à la DNase bien conduit ne suffisait pas à éliminer la totalité de l'ADN-VHB présent dans l'échantillon mais aussi qu'une amplification à partir d'ADN simple brin était possible. En effet, la transcriptase inverse MultiScribe™ utilisée pour le développement de la technique de quantification de l'ARN est une transcriptase inverse recombinante du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MLV), qui a été optimisée pour les dosages TaqMan. Cette ADN polymérase recombinante, dépendante de l'ARN, utilise l'ARN monocaténaire pour modèle en présence d'une amorce pour synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc). La transcriptase inverse du M-MLV est capable de synthétiser des ADNc à partir d'ADN simple brin (Gerard and D'Alessio, 1993). Quel que soit la technique de détection de l'ARN présentée, il est donc primordial de montrer les contrôles de spécificité de la technique, à savoir les valeurs de Ct (cycle threshold) obtenues après un traitement à la DNase et à la RNase (Prakash et al., 2018). Les quantifications d'ADN et d'ARN-VHB, des plasmas utilisés dans notre étude, obtenues avec et sans traitement à la RNase sont présentées en Annexe 1.

Le choix de la région préférentielle à cibler par les amorces va dépendre de l'espèce majoritaire détectée au niveau plasmatique. En partant du principe que l'espèce majoritaire circulante chez les patients était de l'ARNpg ou tout du moins une forme polyadénylée, l'approche proposée par Van Bömmel et al. est la plus convaincante. En effet elle ne requiert pas de traitement à la DNase du fait du choix d'amorce pour la RT au niveau du site de polyadénylation en aval de l'ORF X, commun à tous les ARN, hormis les ARN tronqués, mais non présent au niveau de l'ADN. Si la technique de détection utilisée est au point, un standard international pour la quantification de l'ARN reste nécessaire.

1.4. Présence de virions vides confirmée chez les patients AgHBe négatif

De ce travail, nous confirmons aussi la présence de virions vides chez les patients AgHBe négatif, mise en évidence précédemment par une autre équipe (Luckenbaugh et al., 2015b). Ces particules dépourvues d'acides nucléiques et enveloppées par de l'AgHBs circuleraient en excès par rapport aux particules complètes infectieuses d'un facteur 30 à 40 pour les 2 plasmas testés. Les approches utilisées sont différentes. Dans notre étude, ces formes ont été mises en évidence *via* une séparation des particules en gradient de vélocité tandis que Luckenbaugh et al. utilisent des gels d'agarose natif. La circulation abondante de ces types de particules soulève une série de questions autour de leurs rôles, leur évolution sous traitement, leur lien avec l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc intrahépatique, par exemple.

1.5. Découverte d'une nouvelle forme de particules pseudo-virales : « budding capsids » chez les patients AgHBe positif?

Chez les patients AgHBe positif, nos calculs et les expériences en présence de détergent indiquent que les capsides en excès observées dans la fraction enrichie en particules de Dane seraient enveloppées mais ne contiendraient *a priori* pas d'AgHBs et pas d'acides nucléiques. Nous avons appelé cette nouvelle entité « budding capsids » ou capsides enveloppées bourgeonnantes sans HBs pour les distinguer des virions vides évoqués dans le paragraphe précédent chez les patients AgHBe négatif qui sont enveloppés de protéines HBs. Par cette appellation, on entend des capsides dont l'enveloppement par une bicouche lipidique serait déclenché par une interaction entre la capside et une molécule présente dans cette membrane. Cette forme est à distinguer de capsides qui pourraient circuler dans des vésicules extracellulaires non dédiées (exosomes ou microvésicules) (Figure 16). Les « budding capsids » auraient une forme de taille à peu près équivalente à celle des VP. Les vésicules extracellulaires sont formées soit par le bourgeonnement de la membrane plasmique, auquel cas elles sont appelées micro-vésicules (taille 50-500 nm), soit par des vésicules dans la lumière des endosomes multivésiculaires qui fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer des exosomes (taille 50-150 nm). Dans les deux cas, ces vésicules de

taille supérieure aux VP auraient une faible densité et on ne s'attend donc pas à les observer dans les fractions inférieures du gradient comme dans nos expériences.

Des expériences d'immunoprécipitations avec des marqueurs typiques de ces vésicules extracellulaires (CD63, flotilline-1, Tsg101 par exemple) pourraient venir étayer cette hypothèse.

D'autres virus des hépatites comme le VHA et le VHE ont été récemment décrits dans la circulation sanguine associés à des lipides. Des similarités existent entre ces virus nus à ARN simple brin de polarité positive. Ces particules virales n'ont pas d'enveloppe lorsqu'ils sont excrétés dans les selles ce qui leur confère une résistance dans le milieu extérieur et favorise leur propagation et le potentiel épidémique de ces virus. Le VHA et le VHE peuvent circuler sous forme enveloppée dans l'organisme (Feng et al., 2013; Feng and Lemon, 2014). Le VHA est libéré par les cellules sous une forme enveloppée par les membranes dérivées de l'hôte qui ressemble aux exosomes dont on sait qu'ils jouent un rôle dans les communications intercellulaires (van Niel et al., 2018). Sous cette forme enveloppée infectieuse, le VHA et le VHE seraient protégés des anticorps neutralisants produits par l'hôte infecté et pourrait se propager plus facilement dans le foie. Le détournement des membranes par ces virus peut être considéré comme un mécanisme de survie virale, remet en question la dichotomie classiquement effectuée entre virus enveloppés et non enveloppés (nus) et a des conséquences sur le mécanisme de sortie des particules de la cellule infectée et sur les réponses immunitaires de l'hôte.

La synthèse des différentes particules identifiées selon le statut vis-à-vis de l'AgHBe dans les plasmas testés est proposée figure 15.

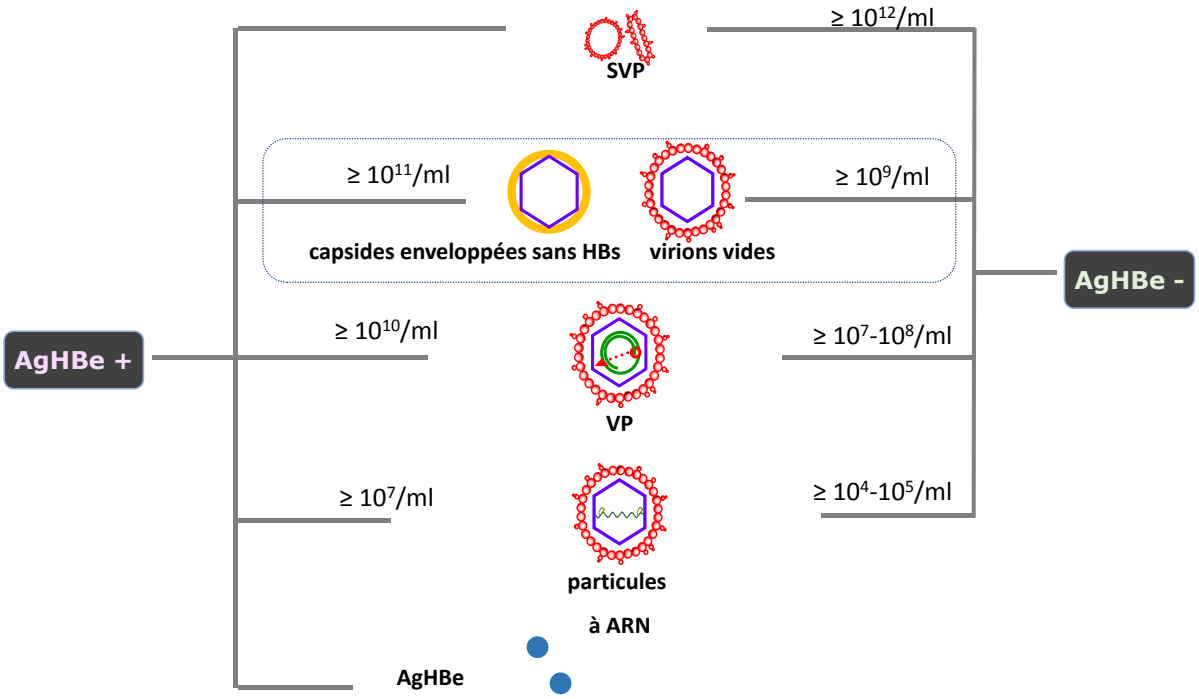


Figure 15 : Différentes formes circulantes du VHB identifiées dans les plasmas testés selon le statut de l'AgHBe.

1.6. Particules virales circulantes chez les patients décrites dans la littérature mais non retrouvées avec nos expériences

Certaines formes virales circulantes chez les patients, décrites dans la littérature, ne sont pas retrouvées dans nos expériences. Il s'agit des virions vides chez les patients AgHBe positif et des capsides non enveloppées contenant de l'ARN ou de l'ADN simple brin sous forme de complexes immuns (Bai et al., 2018).

Pour rappel, nous avons estimé le nombre de particules virales infectieuses (VP) présentes dans la fraction la plus riche en ADN d'après chaque marqueur mesuré sur cette fraction, ADN (VP_{ADN}), AgHBs (VP_{HBs}), HBcrAg (VP_{HBc}). Les calculs prennent en compte les quantités stœchiométriques connues de chaque constituant de la particule virale (cf. calculs détaillés dans l'article dans la partie travaux de thèse axe I). Pour exemple, un rapport entre VP_{ADN} et VP_{HBs} proche de 1 indique un nombre de VP estimé dans la fraction équivalent, quel que soit le marqueur, et donc par conséquent que tout l'AgHBs mesuré dans cette fraction correspond uniquement à de l'HBs associé aux particules virales.

Dans nos conditions, la présence de virions vides dans les 2 plasmas AgHBe positif est écartée d'après les rapports obtenus pour la fraction enrichie en VP. En effet, un rapport VP_{HBs}/VP_{ADN} proche de 1 associé à des rapports VP_{HBc}/VP_{HBs} et VP_{HBc}/VP_{ADN} supérieurs à 1 pour ces 2 plasmas indiquent que l'excès de capsides observé par rapport à l'ADN ne contient ni ADN, ni HBs. D'après ces calculs et les expériences menées avec du détergent, ces capsides en excès mesurées seraient des « budding capsids » (évoquées dans le paragraphe précédent 1.5 de la discussion). Nous ne retrouvons donc pas d'éléments en faveur d'une circulation de virions vides dans nos expériences, contrairement à Luckenbaugh et al. qui détectent des virions vides quel que soit le statut AgHBe des patients, avec des concentrations en virions vides supérieures chez les patients AgHBe positif que chez les HBe négatif (Luckenbaugh et al., 2015a). La séparation des particules sur gel d'agarose natif sépare préférentiellement les capsides chargées des particules enveloppées et ne présage pas d'une séparation correcte entre les particules virales complètes enveloppées et les virions vides également enveloppés, ce qui pourrait entrainer une surestimation de la concentration en virions vides.

Bai et al. ont récemment décrit une autre forme circulant en abondance dans les plasmas (Bai et al., 2018). Il s'agit des capsides nues renfermant de l'ADN simple brin ou de l'ARN associées sous forme de complexes immuns, appelé CAC (capsid-antibody complexe). Nous nous sommes demandé si cette forme virale était présente dans les plasmas testés.

Si des capsides contenant de l'ADN simple brin ou de l'ARN sont présentes en abondance dans les plasmas, il est difficile de connaitre précisément dans quelle fraction des gradients de vélocité vont se situer ces formes *a priori* plus petites mais plus denses que les particules enveloppées.

On peut s'attendre à détecter ces formes en vélocité par la présence d'un pic d'HBcrAg associé à un pic d'ARN-VHB et/ou d'ADN dans les fractions inférieures ou supérieures par rapport à la fraction enrichie en VP. Nous n'excluons pas non plus que ces particules ne soient pas séparées des particules complètes (VP) et soient retrouvées dans la même fraction que les VP. Les expériences menées avec les surnageants présentées en annexe 2 et développées dans le paragraphe suivant de la discussion (1.7) laissent à penser que des capsides nues se situeraient au même niveau que les VP (fractions 4-5).

Dans tous les cas, l'action du détergent ne devrait pas avoir d'effet sur ces formes virales non enveloppées. On devrait ainsi continuer à détecter, après action du détergent, un pic d'HBcrAg en fraction 4 ou 5 en plus du pic d'HBcrAg décalé en fraction 1, lié à l'action du détergent sur les VP. Or, ce n'est pas ce que nous avons observé. Tout le signal HBcrAg détecté en fractions 4-5 (sans détergent) est détecté en fraction 1 (avec détergent). Cette expérience n'est donc pas en faveur d'une circulation de capsides non enveloppées. Ou alors ces capsides non enveloppées sont associés à des lipides ce qui pourrait expliquer l'effet du détergent observé (Figure 16).

Les gradients de densité en sucrose à l'équilibre ne plaident pas non plus en faveur d'une circulation de capsides non enveloppées. En effet ces formes non enveloppées sont plus denses que les VP. On devrait alors détecter un signal conséquent d'HBcrAg dans les fractions inférieures par rapport à la fraction enrichie en VP. Or, comme pour les gradients de vélocité, un seul pic d'HBcrAg est détecté dans les fractions inférieures du gradient correspondant à la fraction enrichie en VP. Nous n'avons donc pas identifié dans les plasmas testés de capsides contenant de l'ADN simple brin ou de l'ARN.

De manière assez surprenante Bai et al. montrent que les capsides en présence d'anticorps anti-HBc ont une densité un peu plus faible que les capsides non enveloppées seules, en gradient de chlorure de césium.

Malgré tout, cette petite différence de densité observée en présence d'anticorps anti-HBc ne peut pas expliquer la présence du pic d'HBcrAg inattendu, observé dans les fractions supérieures des gradients générés pour les plasmas AgHBe négatif, au-delà des fractions enrichies en particules sous-virales.

Pour identifier ou infirmer la présence de capsides non enveloppées sous forme de complexes immuns (CAC), nous envisageons de réaliser une immunoprécipitation sur les fractions inférieures du gradient à l'aide de protéines A/G couplées à des billes de sépharose, technique employée par Bai et al. pour identifier les CAC. Ces protéines se lient aux immunoglobulines. En l'absence de capsides circulantes sous forme de complexes immuns, nous nous attendons à ne pas détecter de signal HBcrAg dans l'immuno-précipité et à l'inverse, la détection d'un signal HBcrAg dans l'immuno-précipité pour ces fractions pourrait mettre en évidence la présence de CAC.

Il serait également intéressant de doser les fractions de nos gradients avec le nouveau marqueur anticorps anti-HBc quantitatif. Si des capsides non enveloppées circulent chez les patients associées à des anticorps anti-HBc, ces complexes immuns CAC pourraient être éventuellement détectés et localisés dans les fractions du gradient par ce dosage anti-HBc quantitatif.

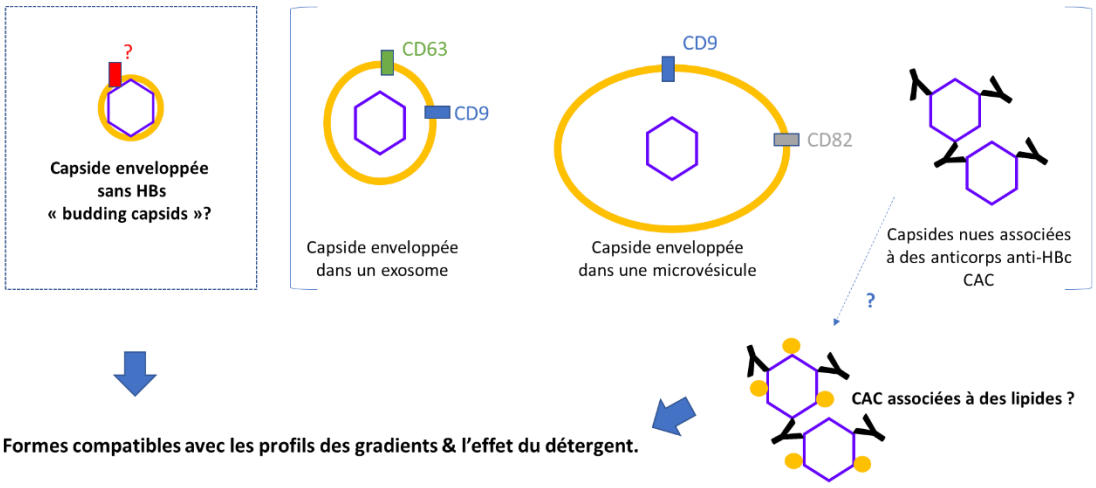


Figure 16 : Formes compatibles avec un excès de capsides sans génome et sans HBs d'après nos expériences.

1.7. Alternatives et approches complémentaires pour caractériser les formes virales

En complément des expériences menées à partir des plasmas de donneurs de sang, nous avons étudié le profil de séparation de surnageant de culture d'HepG2.2.15 en gradient de vélocité avec ou sans traitement par un détergent (figure en annexe 2). Ces profils sont intéressants à plusieurs titres. On peut noter une très faible production de particules sous virales dans ces surnageants. Aucun pic d'AgHBs n'est détecté dans les fractions supérieures du gradient (sans détergent). La présence de particules sous-virales est révélée après traitement par le détergent. Comme avec les plasmas, un pic d'HBcrAg est observé dans les fractions supérieures (fractions 13-15), des pics d'ADN, d'ARN-VHB et d'HBcrAg sont observés dans les fractions inférieures du gradient (fraction 5). Cependant, contrairement aux plasmas, on peut noter (i) que le pic d'HBcrAg est légèrement décalé (fractions 6-7) par rapport aux pics d'ADN et d'ARN, (ii) que le détergent a peu d'effet sur les pics d'ADN, d'ARN mais surtout sur le pic d'HBcrAg. Cette absence d'effet du détergent témoigne de la présence en concentrations importantes de capsides non enveloppées majoritairement sans génome, classiquement décrites avec ces cultures cellulaires. Les calculs effectués viennent renforcer cette observation. Dans la fraction la plus riche en ADN, nous détectons près de 50 fois plus de capsides nues sans génome que de VP. Cette matrice surnageant, riche en capsides non enveloppées, formes virales non retrouvées dans le plasma, se comporte différemment en gradient de vélocité et est donc complémentaire aux plasmas pour l'étude des formes virales.

Nous avons cherché par ailleurs à caractériser les fractions générées par une autre approche que les dosages antigéniques et moléculaires de manière à confirmer nos résultats. Nous nous sommes tout d'abord orientés vers les techniques d'imagerie classique. En effet ; la visualisation des particules virales a longtemps reposé sur les techniques d'imagerie, la microscopie électronique et la cryo-microscopie électronique. Ainsi, nous avons effectué une expérience préliminaire de microscopie électronique malheureusement décevante avec des images difficiles à interpréter. Peu d'outils offrent une résolution suffisante pour étudier d'une part les virus de petite taille comme le VHB (42 nm de diamètre) et d'autre part de subtiles différences de quelques nanomètres seulement entre les multiples formes circulantes.

En parallèle de la piste microscopie électronique, après une analyse bibliographique, nous nous sommes intéressés à des nouvelles technologies qui se sont développées ces dernières années pour l'étude des nanoparticules. Elles permettent une quantification en temps réel des nanoparticules et fournissent également des informations supplémentaires telles que le diamètre des particules ou le potentiel zêta (charge électrique d'une nanoparticule en suspension due aux ions qui l'entourent) (Heider and Metzner, 2014).

Certaines de ces technologies sont dorénavant commercialisées et présentent l'avantage de réduire considérablement le temps d'analyse de quelques heures à quelques minutes mais restent néanmoins non spécifiques des virus. Les nanoparticules peuvent être étudiées par (i) l'analyse du suivi des nanoparticules (NTA ou nanoparticle tracking analysis), (ii) le TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) ou (iii) le Vidéodrop sur le principe de l'interférométrie. Peu de données sur l'application de ces nouvelles technologies aux virus existent dans la littérature. Il existe quelques données pour des virus qui ont une taille au moins supérieure à 80 nm de diamètre (adénovirus, lentivirus, par exemple). A ce jour, il n'y a aucune donnée dans la littérature pour l'étude des particules du VHB avec ces nouvelles technologies (NTA, TRPS, interférométrie) et les instruments commercialisés disponibles. Nous avons donc étudié la possibilité d'utiliser l'une ou l'autre de ces technologies pour caractériser autrement les formes virales circulantes dans les fractions après séparation en gradient de vélocité.

(i) l'analyse du suivi des nanoparticules (NTA)

La limite basse de taille annoncée pour la détection des particules en NTA est d'environ 30 nm. Cependant, la concentration en particules dans les échantillons doit être au minimum de 10^7-10^9 particules/ml. Après contact avec la société Malvern, qui commercialise le Nanosight, la résolution et la sensibilité de l'instrument ne semble malheureusement pas suffisante pour discriminer des particules avec une taille comprise entre 20 et 42 nm de diamètre, en particulier dans les limites de concentrations basses de la technique. Nous n'avons donc pas pu explorer l'approche NTA pour caractériser les formes virales après séparation en gradient de vélocité.

(ii) TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing)

Nous nous sommes intéressés à un second système, le TRPS, pour caractériser les formes virales. Le système TRPS mesure les nanoparticules en suspension, particule par particule, lorsqu'elles passent à travers un nanopore. Cette méthode analytique s'appuie sur le principe Coulter dont le fondement est que la chute de courant transitoire mesurée est proportionnelle au volume de la particule. L'instrument qNano distribué par la société Izon est disponible. La présence d'une particule dans le pore modifie la résistance du système, ce qui entraîne un changement de courant pour chaque passage. Le pore ajustable est au centre de cette technique et permet de mesurer des particules de taille comprise entre 40 nm et 10 µm selon le fabricant. Ces technologies mesurent les particules virales mais aussi potentiellement tout ce qui est compris dans ce spectre de taille restreint soit les exosomes, les débris cellulaires… Une autre limite décrite de ce système est l'obstruction possible du pore qui semble dépendre de la préparation des échantillons. Tous ces éléments rendent difficile les mesures à partir de matrices biologiques complexes tel que le sérum. Malheureusement, le virus de l'hépatite B fait partie des virus de petite taille avec des virions de 42 nm et des enveloppes vides de 22 nm de diamètre respectivement.

En plus du facteur taille limitant, les concentrations plasmatiques circulantes des différentes particules virales fluctuent chez les patients en fonction de la phase de l'infection et du traitement ce qui constitue un autre facteur limitant. Bien que les contraintes de taille et de concentration des particules virales du VHB représentent un frein réel à leur utilisation actuellement, on peut espérer une amélioration de la résolution de ces systèmes dans le futur notamment avec le développement d'un système de pores multiples en série. Ce système appliqué à l'étude de la capside fournit une signature unique qui améliore le suivi des particules et, par conséquent, l'identification d'une seule particule et réduit le nombre de cycles nécessaires pour effectuer le nombre requis de mesures (Zhou et al., 2018). L'instrument qNano commercialisé dans sa version actuelle n'est *a priori* pas adapté pour visualiser nos formes virales mais pourrait cependant être intéressant pour mettre en évidence la présence ou non d'exosomes dans nos fractions. En fonction de leur localisation dans le gradient, cela pourrait nous aider à caractériser les pseudo-particules virales circulantes chez les patients AgHBe positif que nous avons appelé « budding capsids ».

(iii) Vidéodrop et interférométrie

La détection des particules basée seulement sur le mouvement brownien ne peut pas différencier les virus de vésicules de même taille. Une nouvelle technologie récemment développée montre que la distinction entre vésicules et virus est possible grâce à un instrument nommé Vidéodrop qui visualise, compte et contrôle les nanoparticules. Cet instrument s'appuie sur le principe de l'interférométrie optique. Lorsque l'on envoie de la lumière sur une nanoparticule, il y a très peu de lumière qui est diffusée. L'interférométrie permet d'augmenter l'intensité du signal détecté. En général, l'interféromètre est un montage complexe. L'innovation du Vidéodrop réside dans le fait que c'est le même faisceau qui illumine la particule et qui mesure les interférences. Le suivi du mouvement brownien des particules couplé à la mesure des interférences permet la détection en temps réel et sans marquage de l'ensemble des particules nanométriques présentes dans un échantillon (Boccara et al., 2016). Cet appareil filme en temps réel dans une goutte toutes les particules dans la gamme 30 - 200 nm. Des petits volumes d'échantillon (5 µL) avec une gamme de concentration de 10^8 à 10^{11} particules/ml sont nécessaires**.** La solution contenant les nanoparticules est placée dans une microcuvette éclairée par une LED, tandis qu'un système optique, couplé à une caméra, filme les mouvements. Par le calcul de la vitesse et des distances des trajectoires, le type, la taille et le nombre des éléments observés sont déterminés. Des fractions de gradients de vélocité et les plasmas correspondant ont été analysés à l'aide du VidéoDrop, sur le plateau de microscopie L3 du CEMIPAI à Montpellier (collaboration S. Lyonnais / L. Talini). Malheureusement, l'instrument dans sa version actuelle ne permet pas une analyse fiable de la concentration et de la taille des particules de taille inférieure à 70 nm. Une optimisation de ce système nous permettra peut-être de réitérer cette expérience prochainement.

1.8. Meilleure connaissance du test HBcrAg

Les gradients de vélocité nous ont permis d'acquérir de meilleures connaissances sur le test HBcrAg. En effet, il n'y a pas de données issues de gradient et disponibles pour ce test, en dehors de celles publiées par l'équipe japonaise qui l'a développé. Or, de nombreux travaux publiés ont rapporté la place du dosage plasmatique de ce nouveau marqueur dans différentes situations cliniques. L'interprétation du résultat de ce test n'est pas aisée en raison des propriétés intrinsèques du dosage qui détecte trois protéines distinctes, partageant une séquence commune. Nous avons constaté une forte influence de l'AgHBe sur ce dosage pour les plasmas AgHBe positif. En effet, lors de nos expériences sur les gradients, les valeurs d'HBcrAg les plus élevées sont mesurées dans les fractions les plus légères, au-dessus des fractions contenant l'AgHBs et sont attribués à l'AgHBe, comme attesté par un dosage spécifique de cet antigène. Nous avons pu déterminer que le résultat mesuré d'HBcrAg au niveau plasmatique correspondait pour deux-tiers de la valeur à la quantification de l'AgHBe. De manière plus surprenante, pour les plasmas AgHBe négatif, nous avons également observé une détection d'HBcrAg dans ces fractions supérieures, avec des concentrations plus faibles que celles mesurées pour les plasmas AgHBe positif. A ce stade, il est difficile de conclure quant à la détection de ces signaux inattendus d'HBcrAg dans les fractions supérieures du gradient, au-dessus des fractions contenant l'AgHBs. Nous avons émis l'hypothèse d'une possible détection par le test HBcrAg de complexes immuns Ag/AcHBe rendue possible par le prétraitement de l'échantillon préalable par un détergent/dénaturant. Un séquençage de la région précore/core est en cours pour s'assurer de l'absence de mutants précore pour ces plasmas. Les mutants précore diminue ou abolisse la production d'AgHBe selon leur nature. Un double mutant (A1762T/G1764T) dans le promoteur basal du core est fréquemment décrit chez les patients AgHBe négatif et entraine une synthèse diminuée de l'AgHBe, tout en conservant une réplication virale. D'autres mutants sont également décrits. Tandis que la mutation G1896A dans la région précore implique l'apparition d'un codon stop en position 28 et empêche la production d'AgHBe. La mise en évidence de l'absence de mutants précore dans nos échantillons irait dans le sens d'une possible détection de complexes immuns Ag/AcHBe par le test HBcrAg. A l'inverse, l'identification de mutants remettrait en question cette hypothèse pour expliquer le signal inattendu d'HBcrAg dans les fractions au-dessus de l'AgHBs pour les patients AgHBe négatif.

Malgré l'influence de l'AgHBe sur le dosage HBcrAg chez les patients AgHBe positif, des valeurs importantes d'HBcrAg sont mesurées au niveau des VP dans le gradient et sont attribuées à la détection de protéines HBc, constituants de la capside virale. Ce test est donc une alternative intéressante plus sensible que les traditionnels western blots pour détecter et quantifier les capsides après séparation des particules virales. Il faut cependant souligner la faible spécificité du test dans les valeurs comprises entre 2 et 3 log U/ml (comme indiqué dans le paragraphe 3.2.3 de la revue bibliographique). Or on trouve dans la littérature un certain nombre d'articles qui interprètent ces valeurs en deçà de 3 log U/ml. Un biais certain dans l'interprétation des résultats de ces études est donc à prendre en considération. Pour notre étude seules les valeurs supérieures à 3 log U/ml ont été prises en compte. Le test HBcrAg dose également en théorie la protéine p22cr décrite par Kimura et al. Il faut bien distinguer cette protéine qui porte le peptide signal, de la protéine p22, précurseur de la protéine HBe. Hormis l'équipe japonaise, l'existence de cette p22cr n'a pas été rapportée depuis par d'autres équipes. Nous envisageons de réaliser un western blot à partir de lysat cellulaire d'HepG2.2.15 (et d'HepG2 comme contrôle) pour voir si l'on retrouve ou non cette protéine « core related » de 22 kDa.

Nous avons aussi pu déterminer qu'1 kU d'HBcrAg (limite de quantification de la technique) correspondait à environ 1 million de capsides soit 1.10^6 VP. Le test HBcrAg est donc près de 10 fois plus sensible qu'un test AgHBs au seuil de 0,05 UI/ml qui détecte 9.10^6 VP, ce qui coupe court à un problème de sensibilité du test HBcrAg. Il serait intéressant de doser les fractions issues du gradient avec un test ultrasensible de l'AgHBs, 10 fois plus sensible (limite de quantification à 0,005 UI/ml).

En somme, les gradients de vélocité constituent une approche rapide et efficace pour séparer les particules virales des particules sous-virales. La séparation et l'identification des populations majoritaires de particules circulantes chez les patients est possible par cette approche couplée aux dosages des marqueurs viraux disponibles. L'approche que nous avons développé pourra être appliquée à une collection d'échantillons biologiques plus importante ce qui permettra d'étudier la variabilité inter et intra-individuelle des formes circulantes chez les patients en fonction de la phase de l'infection, du génotype, du traitement...

2. Nouveaux marqueurs virologiques du VHB

2.1. AgHBs ultrasensible : interprétation du profil sérologique modifiée

De nouveaux tests annoncés plus sensibles sont dorénavant disponibles pour le marqueur AgHBs. L'AgHBs est un marqueur clé pour le diagnostic et le suivi de l'infection. L'étude menée sur 3 panels d'échantillons différents nous a permis de dégager plusieurs avantages attendus à l'utilisation de ces tests avec une sensibilité améliorée d'un facteur 10 voire 100. L'apport des tests ultrasensibles pour l'AgHBs est résumé dans la figure 17.

Le premier panel est constitué d'échantillons de donneurs de sang, collectés à une phase très précoce de l'infection aiguë par le VHB, où seul l'ADN-VHB est détecté (AgHBs négatif / AcHBc négatif). Avec la technique ultrasensible, un AgHBs a été détecté positif dans 23% des cas (3/13). Ce type de test peut ainsi avoir une place pour la qualification des dons de sang dans le cadre de la sécurité transfusionnelle dans les pays à ressources limitées où le dépistage génomique viral est parfois trop couteux à implémenter. Dans ce cas, il est primordial de disposer de la technique la plus sensible qui existe sur le marché. L'utilisation pour le dépistage de l'infection aiguë apparait aussi évidente, bien qu'il soit rare de dépister les patients dans cette phase très courte. L'infection aiguë par le VHB est le plus souvent recherchée devant une cytolyse hépatique, conséquence de la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis du virus et donc de la présence d'anticorps anti HBc. Un test plus sensible permettra également de détecter plus précocement une réactivation de l'infection par le VHB à partir de l'ADNccc dans un contexte d'immunodépression.

Le second panel correspond à des échantillons de patients ou donneurs de sang avec un profil d'infection B occulte (AgHBs négatif, AcHBc positif, ADN positif). Avec le test ultrasensible, le statut de ces échantillons est modifié de négatif à positif dans 25% des cas (13/52). Ce changement d'interprétation du profil sérologique vis-à-vis de l'AgHBs conduit à une reclassification de ces patients qui passent du statut d'infection B occulte ou d'infection résolutive à celui de « portage chronique inactif » ou infection chronique AgHBe négatif selon la dernière classification dont l'impact clinique devra être évalué. Cela pose également la question du seuil de l'AgHBs à utiliser pour définir la guérison fonctionnelle de l'infection spontanée ou sous traitement. En 2019, les experts de l'EASL et l'AASLD réunis se sont accordés pour retenir un seuil classique de l'AgHBs à 0,05 UI/ml comme critère d'évaluation des essais cliniques (Cornberg et al., 2020).

Deux raisons à cela : (i) un manque de recul sur les tests ultrasensibles et (ii) l'impossibilité des tests actuels de faire la part entre l'AgHBs issu de l'ADNccc, témoin de son activité transcriptionnelle et la part issue de l'ADN intégré. Considérant l'arrêt d'un traitement par NUC envisagé par le clinicien, la persistance d'une faible concentration d'AgHBs détecté par les tests ultrasensibles n'est pas en réalité un frein à l'arrêt car selon les dernières recommandations de l'EASL, l'arrêt thérapeutique peut être considéré, même en l'absence d'AgHBs négatif, devant une indétectabilité de l'ADN-VHB soutenue pendant au moins 3 ans sous traitement.

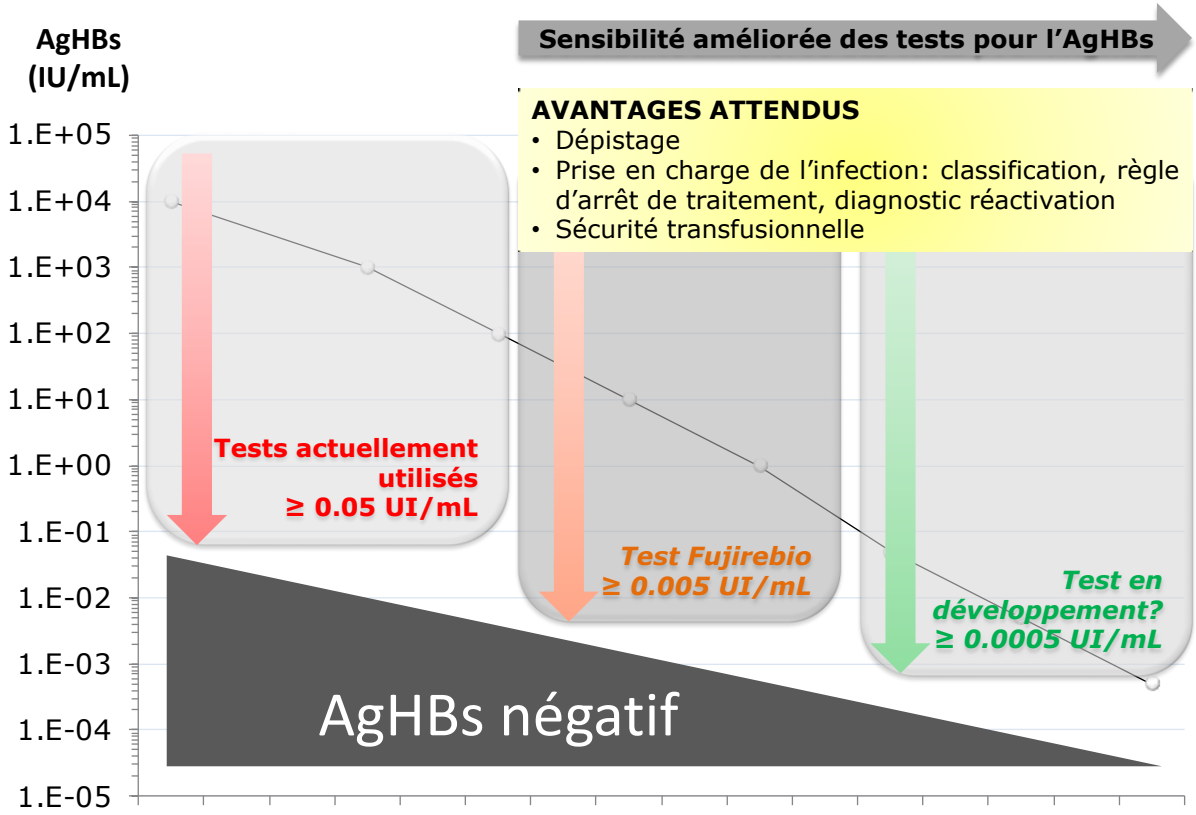


Figure 17 : Apport des tests ultrasensibles de l'AgHBs.

Le dosage de l'AgHBs est un dosage global qui ne fait pas la distinction entre les 3 isoformes de la protéine HBs. Récemment, une équipe a rapporté que la composition des isoformes d'HBs variait selon la phase de l'infection et pourrait être prédictive de la perte de l'AgHBs sous traitement (Pfefferkorn et al., 2020, 2018). D'autres études sont nécessaires pour déterminer si un tel dosage aurait sa place pour le suivi des patients.

Les limites de détection des tests sont constamment améliorées. Une technique appelée digital elisa (ou Single Molecule Arrays ; SiMoA) apparait ainsi environ 1000 fois plus sensible que les techniques ELISA standards. Le dosage SiMoA permet un niveau de détection de l'ordre du femtogramme (Rissin et al., 2010). Il repose sur l'utilisation de billes couplées à un anticorps spécifique de la cible et d'un autre anticorps aussi dirigé contre la cible et capable d'émettre une fluorescence. A faible concentration, les billes lient un seul antigène cible voir aucun. Chaque bille est ensuite insérée dans un micropuit de l'ordre du femtolitre qui ne peut accueillir qu'une seule bille. La fluorescence est analysée pour chaque puit. La sensibilité est très proche de celle obtenue avec la PCR. Le développement de cette technique pour l'AgHBs serait intéressant.

2.2. ARN-VHB et HBcrAg : non prédictif du risque de CHC chez les patients cirrhotiques

Dans notre étude, l'HBcrAg n'apparaît pas prédictif du CHC ou d'un autre événement clinique, contrairement aux études asiatiques publiées. Cela peut s'expliquer par le fait que les populations étudiées sont très différentes.

La force de notre étude vient du fait que l'effectif de patients inclus (n=246), issus de la cohorte nationale CirVir, est homogène. En effet, l'ensemble des patients sont monoinfectés par le VHB et ont tous une cirrhose prouvée par une biopsie hépatique. Nous avons fait le choix d'exclure les coinfections virales avec le VIH, le VHC ou le VHD pour éviter un biais dans l'analyse de nos résultats. Cela nous semblait important car on sait que l'évolution clinique des patients coinfectés est moins bonne. Les patients inclus dans notre étude sont majoritairement des hommes (82%), européens, AgHBe négatif (85%) et traités à l'inclusion (81%). Les études asiatiques publiées ont été conduites avec un pourcentage variable de patients cirrhotiques (4-58%), de patients AgHBe négatif (47-100%) et de patients traités (41-100 %) selon les études. De plus, le diagnostic de cirrhose ne reposait pas toujours sur une biopsie hépatique. La comparaison des résultats obtenus avec ceux provenant de populations de patients hétérogènes est donc difficile. L'influence de l'AgHBe sur le dosage de l'HBcrAg complexifie encore un peu plus l'interprétation des données chez les patients AgHBe positif. Les patients de notre étude étant en majorité traités, les génotypes sont connus pour un quart des patients seulement. Néanmoins, les génotypes majoritaires identifiés dans notre population sont les génotypes D, A et E. Ainsi, on peut également noter une autre différence entre notre étude et les études asiatiques qui ont surtout des populations de patients infectés par des génotypes B ou C.

L'HBcrAg est significativement corrélé à l'ADN et à l'ARN-VHB dans la population totale de l'étude. Ces corrélations ne sont pas retrouvées chez les patients AgHBe négatif.

Il faut souligner que dans la sous population de patients AgHBe négatif de notre étude, le profil majoritaire observé pour un quart des patients est le suivant : HBcrAg positif associé à un ADN et un ARN négatifs. Ces patients avec une charge virale ADN et ARN indétectable sous traitement ont un HBcrAg positif qui serait le reflet indirect d'une activité transcriptionnelle de l'ADNccc et possiblement de la circulation virions vides. Un suivi longitudinal des patients traités AgHBe négatif en fonction de leur statut vis-à-vis de l'HBcrAg serait intéressant à mener.

L'intérêt de la quantification de l'ARN-VHB circulant pour la prédiction du CHC n'avait pas été évalué auparavant. Dans notre étude, ce marqueur n'apparaît ni prédictif de la survenue du CHC, ni d'une décompensation hépatique. En revanche, la survie globale apparaît plus faible chez les patients qui ont un ARN-VHB positif. Cette observation sera à confirmer par d'autres études. Les patients sont majoritairement traités à l'inclusion. Ainsi, contrairement à l'HBcrAg, l'ARN-VHB est indétectable chez la plupart des patients à l'inclusion.

Il pourrait être intéressant d'évaluer l'apport du dosage des ARN épissés sur la cohorte CirVir. En effet, de précédentes études ont montré que la protéine HBSP produite à partir d'un ARN épissé est associée à la pathogenèse et augmenterait le risque de développer un CHC en favorisant la réplication virale, la production de protéines et la fibrose hépatique (Bayliss et al., 2013; Soussan et al., 2003). Récemment, la quantification des variants épissés a été réalisée sur la cohorte taiwanaise REVEAL et montre que la détection de variants épissés supérieure à un seuil de 20% serait prédictive du CHC (Pan et al., 2018). Ainsi, il serait bon de confirmer ou infirmer ce constat dans la cohorte CirVir composée majoritairement de patients d'origine européenne.

Les limites de cette étude sont les suivantes : le nombre d'évènements est relativement faible dans la cohorte. Un CHC est survenu chez 27 patients et 16 patients sont décédés au cours du suivi. Le nombre de CHC n'a pas augmenté depuis la première étude menée par Brichler et al. sur la cohorte. Une nouvelle analyse des données après une durée de suivi plus longue devrait être effectuée. De plus, au lieu d'un dosage ponctuel de ces 2 marqueurs à l'inclusion, la cinétique de ces marqueurs serait peut-être plus intéressante.

La carcinogenèse est un processus complexe, multifactoriel. Les marqueurs viraux testés (AgHBs, ADN, ARN, HBcrAg), pris isolément ou combinés ne sont pas prédictifs de la survenue de CHC. Le score PAGE-B reste à ce jour le meilleur score pour estimer le risque de CHC parmi les sept scores créés ces dernières années et validés avec des cohortes de patients traités. Ce score prend en compte l'âge, le sexe des patients et le taux de plaquettes, reflet de la sévérité de la cirrhose. Chez les patients les plus à risque de CHC (score PAGE-B > 17), les performances de ces nouveaux marqueurs ne permettent pas de stratifier encore plus ce risque. Les patients qui ont développé un CHC sont significativement plus âgés, en surpoids ou obèses, fumeurs, hypertendus et avec une thrombopénie plus marquée. Compte tenu de ce

profil, les mesures hygiéno-diététiques sont à mettre au premier plan dans la prévention du CHC chez les patients cirrhotiques.

Les traitements en développement permettent d'espérer obtenir une guérison fonctionnelle de l'infection ainsi qu'une diminution du risque d'évolution vers le CHC sans toutefois l'éliminer. Chez les patients cirrhotiques, malgré l'obtention d'une guérison fonctionnelle de l'infection, il sera difficile de se passer de la surveillance biannuelle du CHC si l'on se réfère au modèle des antiviraux à action directe contre le VHC où l'élimination du virus chez les patients cirrhotiques ne modifie pas le suivi rapproché de ces patients.

A propos des nouveaux traitements disponibles, nous allons débuter très prochainement une étude pour suivre l'évolution des nouveaux marqueurs du VHB chez les patients coinfectés VHB-VHD, ayant une cirrhose compensée, une fibrose sévère ou moyenne associée à une cytolyse hépatique persistante, traités par une trithérapie associant de l'interféron pégylé alpha, un NUC, et le bulevirtide, nouvel inhibiteur d'entrée, disponible en ATU. Nous nous intéresserons en plus du suivi de l'AgHBs sous traitement, à l'HBcrAg, l'ARN-VHB, et aux anticorps anti-HBc quantitatifs.

En résumé, l'HBcrAg est un marqueur composite novateur qui présente une sensibilité analytique satisfaisante et qui semble particulièrement intéressant chez les patients AgHBe négatif. Cela en fait un marqueur de choix au diagnostic et pour le suivi des patients infectés par le VHB. La majorité des patients en France et en Europe sont AgHBe négatif au diagnostic de l'infection. Ainsi, un dosage d'HBcrAg pourrait être ajouté au bilan de découverte de l'infection. Le suivi quantitatif de ce marqueur pourrait être proposé pour tous les patients HBcrAg positif au diagnostic jusqu'à négativation. En cas de négativation d'HBcrAg au cours du temps, ce marqueur pourrait être substitué par un suivi des anticorps anti-HBc quantitatif. La persistance d'HBcrAg au niveau plasmatique est associée à une activité transcriptionnelle de l'ADNccc. Ainsi, la détection d'HBcrAg pourrait être un critère d'indication de mise sous traitement antiviral chez les patients AgHBe négatif ou guider le clinicien à ne pas arrêter le traitement antiviral chez le patient non cirrhotique malgré une indétectabilité soutenue de la charge virale.

Contrairement à l'HBcrAg, la détection/quantification de l'ARN-VHB n'est pas standardisée ce qui rend difficile en l'état l'application de ce dosage dans les laboratoires médicaux pour le suivi des patients.

CONCLUSION

En alliant une approche novatrice et des tests standardisés, ce travail a permis de mieux caractériser les formes virales circulantes du VHB chez les patients et d'évaluer trois nouveaux marqueurs du VHB : l'AgHBs ultrasensible, l'HBcrAg et l'ARN-VHB. Nous avons identifié en plus des particules virales complètes et des particules sous-virales classiquement décrites, des particules enveloppées contenant de l'ARN-VHB et des formes circulantes différentes en fonction du statut de l'AgHBe. Le rôle et l'impact clinique de ces formes virales restent à déterminer.

Nous avons documenté une meilleure sensibilité de l'AgHBs ultrasensible pour des échantillons très particuliers, initialement rendus AgHBs négatif avec les tests courants. Le dépistage de l'infection est un des piliers dans la stratégie d'élimination des hépatites virales. Il est primordial à l'échelle individuelle ou pour la sécurité transfusionnelle de disposer des tests présentant la meilleure sensibilité analytique possible. Le test AgHBs ultrasensible devrait progressivement remplacer les tests classiquement utilisés. Dans le contexte de la cirrhose, le dosage des marqueurs HBcrAg et ARN-VHB, à l'inclusion dans la cohorte, ne semblent pas présager de la survenue d'un évènement clinique chez les patients.

L'ensemble de ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes pour la prise en charge des patients infectés par le VHB. Avec les nouvelles formes virales décrites et les nouveaux marqueurs, on pourrait envisager un suivi biologique plus personnalisé des patients chroniquement infectés par le VHB. Les critères de mise sous traitement antiviral ou d'arrêt pourraient être redéfinis et les stratégies thérapeutiques adaptées en fonction des formes virales circulantes chez les patients ou des marqueurs détectés au niveau sanguin.

La disponibilité d'un vaccin, de nouveaux marqueurs virologiques et le développement de nouvelles thérapeutiques sont de bon augure pour l'élimination de l'hépatite B comme menace de santé publique pour le siècle à venir.

BIBLIOGRAPHIE

Ajiro, M., Zheng, Z.-M., 2014. Oncogenes and RNA splicing of human tumor viruses. Emerg. Microbes Infect. 3, 1–16. https://doi.org/10.1038/emi.2014.62

Allweiss, L., Dandri, M., 2016. Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. J. Hepatol. 64, S17–S31. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.012

Allweiss, L., Strick-Marchand, H., 2020. In-vitro and in-vivo models for hepatitis B cure research: Curr. Opin. HIV AIDS 15, 173–179. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000616

Allweiss, L., Volz, T., Giersch, K., Kah, J., Raffa, G., Petersen, J., Lohse, A.W., Beninati, C., Pollicino, T., Urban, S., Lütgehetmann, M., Dandri, M., 2018. Proliferation of primary human hepatocytes and prevention of hepatitis B virus reinfection efficiently deplete nuclear cccDNA in vivo. Gut 67, 542–552. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312162

Avettand-Fenoel, V., Thabut, D., Katlama, C., Poynard, T., Thibault, V., 2006. Immune suppression as the etiology of failure to detect anti-HBc antibodies in patients with chronic hepatitis B virus infection. J. Clin. Microbiol. 44, 2250–2253. https://doi.org/10.1128/JCM.00234-06

Bai, L., Zhang, X., Kozlowski, M., Li, W., Wu, M., Liu, J., Chen, L., Zhang, J., Huang, Y., Yuan, Z., 2018. Extracellular Hepatitis B Virus RNAs Are Heterogeneous in Length and Circulate as Capsid-Antibody Complexes in Addition to Virions in Chronic Hepatitis B Patients. J. Virol. 92. https://doi.org/10.1128/JVI.00798-18

Bardens, A., Döring, T., Stieler, J., Prange, R., 2011. Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner. Cell. Microbiol. 13, 602–619. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01557.x

Bargain, P., Heslan, C., Thibault, V., Pronier, C., 2020. Combined use of dried blood spot and rapid molecular systems: A robust solution to monitor hepatitis B virus infection with potential for resource-limited countries. J. Virol. Methods 283, 113908. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113908

Bayliss, J., Lim, L., Thompson, A.J.V., Desmond, P., Angus, P., Locarnini, S., Revill, P.A., 2013. Hepatitis B virus splicing is enhanced prior to development of hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. 59, 1022–1028. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.06.018

Bazinet, M., Pântea, V., Placinta, G., Moscalu, I., Cebotarescu, V., Cojuhari, L., Jimbei, P., Iarovoi, L., Smesnoi, V., Musteata, T., Jucov, A., Dittmer, U., Krawczyk, A., Vaillant, A., 2020. Safety and Efficacy of 48 Weeks REP 2139 or REP 2165, Tenofovir Disoproxil, and Pegylated Interferon Alfa-2a in Patients With Chronic HBV Infection Naïve to Nucleos(t)ide Therapy. Gastroenterology 158, 2180–2194. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.058

Beilstein, F., Blanchet, M., Vaillant, A., Sureau, C., 2017. Nucleic acid polymers are active against Hepatitis Delta Virus infection in vitro. J. Virol. JVI.01416-17. https://doi.org/10.1128/JVI.01416-17

Blanchet, M., Sureau, C., 2007. Infectivity Determinants of the Hepatitis B Virus Pre-S Domain Are Confined to the N-Terminal 75 Amino Acid Residues. J. Virol. 81, 5841–5849. https://doi.org/10.1128/JVI.00096-07

Bloom, K., Maepa, M., Ely, A., Arbuthnot, P., 2018. Gene Therapy for Chronic HBV—Can We Eliminate cccDNA? Genes 9, 207. https://doi.org/10.3390/genes9040207

Blumberg, B.S., 1965. A “New” Antigen in Leukemia Sera. JAMA J. Am. Med. Assoc. 191, 541. https://doi.org/10.1001/jama.1965.03080070025007

Boccara, M., Fedala, Y., Bryan, C.V., Bailly-Bechet, M., Bowler, C., Boccara, A.C., 2016. Full-field interferometry for counting and differentiating aquatic biotic nanoparticles: from laboratory to Tara Oceans. Biomed. Opt. Express 7, 3736. https://doi.org/10.1364/BOE.7.003736

Boulon, R., Blanchet, M., Lemasson, M., Vaillant, A., Labonté, P., 2020. Characterization of the antiviral effects of REP 2139 on the HBV lifecycle in vitro. Antiviral Res. 104853. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104853

Brouwer, W.P., Lik-Yuen Chan, H., Brunetto, M.R., Martinot-Peignoux, M., Arends, P., Cornberg, M., Cherubini, B., Thompson, A.J.V., Liaw, Y.-F., Marcellin, P., Janssen, H.L.A., Hansen, B.E., 2016. Repeated Measurements of Hepatitis B Surface Antigen Identify Carriers of Inactive HBV During Long-Term Follow-Up. Clin. Gastroenterol. Hepatol. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.01.019

Bruss, V., 2007. Hepatitis B virus morphogenesis. World J. Gastroenterol. 13, 65–73.

Buhlig, T.S., Bowersox, A.F., Braun, D.L., Owsley, D.N., James, K.D., Aranda, A.J., Kendrick, C.D., Skalka, N.A., Clark, D.N., 2020. Molecular, Evolutionary, and Structural Analysis of the Terminal Protein Domain of Hepatitis B Virus Polymerase, a Potential Drug Target. Viruses 12. https://doi.org/10.3390/v12050570

Burra, P., Germani, G., Adam, R., Karam, V., Marzano, A., Lampertico, P., Salizzoni, M., Filipponi, F., Klempnauer, J.L., Castaing, D., Kilic, M., Carlis, L.D., Neuhaus, P., Yilmaz, S., Paul, A., Pinna, A.D., Burroughs, A.K., Russo, F.P., 2013. Liver transplantation for HBV-related cirrhosis in Europe: An ELTR study on evolution and outcomes. J. Hepatol. 58, 287–296. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.016

Burwitz, B.J., Wettengel, J.M., Mück-Häusl, M.A., Ringelhan, M., Ko, C., Festag, M.M., Hammond, K.B., Northrup, M., Bimber, B.N., Jacob, T., Reed, J.S., Norris, R., Park, B., Moller-Tank, S., Esser, K., Greene, J.M., Wu, H.L., Abdulhaqq, S., Webb, G., Sutton, W.F., Klug, A., Swanson, T., Legasse, A.W., Vu, T.Q., Asokan, A., Haigwood, N.L., Protzer, U., Sacha, J.B., 2017. Hepatocytic expression of human sodium-taurocholate cotransporting polypeptide enables hepatitis B virus infection of macaques. Nat. Commun. 8, 2146. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01953-y

Butler, E.K., Gersch, J., McNamara, A., Luk, K.-C., Holzmayer, V., de Medina, M., Schiff, E., Kuhns, M., Cloherty, G.A., 2018. Hepatitis B Virus Serum DNA andRNA Levels in Nucleos(t)ide Analog-Treated or Untreated Patients During Chronic and Acute Infection. Hepatol. Baltim. Md 68, 2106–2117. https://doi.org/10.1002/hep.30082

Cai, D., Nie, H., Yan, R., Guo, J.-T., Block, T.M., Guo, H., 2013. A southern blot assay for detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA from cell cultures. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 1030, 151–161. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-484-5_13

Cao, J., Zhang, Junchang, Lu, Y., Luo, S., Zhang, Jingqiang, Zhu, P., 2019. Cryo-EM structure of native spherical subviral particles isolated from HBV carriers. Virus Res. 259, 90–96. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.10.015

Carey, I., Gersch, J., Wang, B., Moigboi, C., Kuhns, M., Cloherty, G., Dusheiko, G., Agarwal, K., 2020. Pregenomic HBV RNA and Hepatitis B Core-Related Antigen Predict Outcomes in Hepatitis B e Antigen-Negative Chronic Hepatitis B Patients Suppressed on Nucleos(T)ide Analogue Therapy. Hepatol. Baltim. Md 72, 42–57. https://doi.org/10.1002/hep.31026

Caviglia, G.P., Abate, M.L., Tandoi, F., Ciancio, A., Amoroso, A., Salizzoni, M., Saracco, G.M., Rizzetto, M., Romagnoli, R., Smedile, A., 2018. Quantitation of HBV cccDNA

in anti-HBc-positive liver donors by droplet digital PCR: A new tool to detect occult infection. J. Hepatol. 69, 301–307. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.021

Chang, M.-H., You, S.-L., Chen, C.-J., Liu, C.-J., Lai, M.-W., Wu, T.-C., Wu, S.-F., Lee, C.-M., Yang, S.-S., Chu, H.-C., Wang, T.-E., Chen, B.-W., Chuang, W.-L., Soon, M.-S., Lin, C.-Y., Chiou, S.-T., Kuo, H.-S., Chen, D.-S., Yang, Y.-J., Lo, G.-H., Kong, M.-S., Wang, P.-M., Yang, C.-C., Chu, C.-H., Lin, L.-H., Chien, R.-N., Lee, T.-H., Yang, K.-C., Liao, L.-Y., Mo, L.-R., Liu, J.-D., Yang, T.-H., Lo, C.-C., Tsai, M.-H., Chou, C.-H., Cheng, Y.-S., 2016. Long-term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer. Gastroenterology 151, 472-480.e1. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.05.048

Charlton, M.R., Alam, A., Shukla, A., Dashtseren, B., Lesmana, C.R.A., Duger, D., Payawal, D.A., Duy Cuong, D., Jargalsaikhan, G., Cua, I.H.Y., Sollano, J.D., Singh, K.R., Madan, K., Win, K.M., Kyi, K.P., Tun, K.S., Salih, Mohd., Rastogi, M., Saraf, N., Thuy, P.T.T., Hien, P.T.D., Gani, R.A., Mohamed, R., Tanwandee, T., Piratvisuth, T., Sukeepaisarnjaroen, W., Naing, W., Hashmi, Z.Y., 2020. An expert review on the use of tenofovir alafenamide for the treatment of chronic hepatitis B virus infection in Asia. J. Gastroenterol. 55, 811–823. https://doi.org/10.1007/s00535-020-01698-4

Charre, C., Levrero, M., Zoulim, F., Scholtès, C., 2019. Non-invasive biomarkers for chronic hepatitis B virus infection management. Antiviral Res. 169, 104553. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104553

Chayanupatkul, M., Omino, R., Mittal, S., Kramer, J.R., Richardson, P., Thrift, A.P., El-Serag, H.B., Kanwal, F., 2017. Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. J. Hepatol. 66, 355–362. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.013

Chen, C., Hung, C., Lee, C., Hu, T., Wang, Jing–Houng, Wang, Jyh–Chwan, Lu, S., Changchien, C., 2007. Pre-S Deletion and Complex Mutations of Hepatitis B Virus Related to Advanced Liver Disease in HBeAg-Negative Patients. Gastroenterology 133, 1466–1474. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.002

Chen, J., Wu, M., Wang, F., Zhang, W., Wang, W., Zhang, X., Zhang, J., Liu, Yinghui, Liu, Yi, Feng, Y., Zheng, Y., Hu, Y., Yuan, Z., 2015. Hepatitis B virus spliced variants are associated with an impaired response to interferon therapy. Sci. Rep. 5, 16459. https://doi.org/10.1038/srep16459

Chen, P.-J., Chen, D.-S., Chen, C.-R., Chen, Y.-Y., Chen, H.-M.H., Lai, M.-Y., Sung, J.-L., 1988. δ Infection in asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen: Low prevalence of δ activity and effective suppression of hepatitis B virus replication. Hepatology 8, 1121–1124. https://doi.org/10.1002/hep.1840080525

Cheung, K.-S., Seto, W.-K., Wong, D.K.-H., Lai, C.-L., Yuen, M.-F., 2017. Relationship between HBsAg, HBcrAg and hepatocellular carcinoma in patients with undetectable HBV DNA under nucleos(t)ide therapy. J. Viral Hepat. 24, 654–661. https://doi.org/10.1111/jvh.12688

Chevaliez, S., Hézode, C., Bahrami, S., Grare, M., Pawlotsky, J.-M., 2013. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: finite treatment duration unlikely. J. Hepatol. 58, 676–683. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.11.039

Chi, H., Li, Z., Hansen, B.E., Yu, T., Zhang, X., Sun, J., Hou, J., Janssen, H.L.A., Peng, J., 2019. Serum Level of Antibodies Against Hepatitis B Core Protein Is Associated With Clinical Relapse After Discontinuation of Nucleos(t)ide Analogue Therapy. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 17, 182-191.e1. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.05.047

Chisari, F.V., Filippi, P., Buras, J., McLachlan, A., Popper, H., Pinkert, C.A., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., 1987. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B

virus large envelope polypeptide in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 6909–6913. https://doi.org/10.1073/pnas.84.19.6909

Chisari, F.V., Klopchin, K., Moriyama, T., Pasquinelli, C., Dunsford, H.A., Sell, S., Pinkert, C.A., Brinster, R.L., Palmiter, R.D., 1989. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. Cell 59, 1145–1156. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90770-8

Chou, S.-F., Tsai, M.-L., Huang, J.-Y., Chang, Y.-S., Shih, C., 2015. The Dual Role of an ESCRT-0 Component HGS in HBV Transcription and Naked Capsid Secretion. PLoS Pathog. 11, e1005123. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005123

Chuaypen, N., Posuwan, N., Payungporn, S., Tanaka, Y., Shinkai, N., Poovorawan, Y., Tangkijvanich, P., 2016. Serum hepatitis B core-related antigen as a treatment predictor of pegylated interferon in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver 36, 827–836. https://doi.org/10.1111/liv.13046

Cornberg, M., Glebe, D., 2020. Editorial: which factors influence HBsAg levels in HBV-infected patients? Aliment. Pharmacol. Ther. 52, 547–548. https://doi.org/10.1111/apt.15864

Cornberg, M., Lok, A.S.-F., Terrault, N.A., Zoulim, F., Berg, T., Brunetto, M.R., Buchholz, S., Buti, M., Chan, H.L.Y., Chang, K.-M., Dandri, M., Dusheiko, G., Feld, J.J., Ferrari, C., Ghany, M., Janssen, H.L.A., Kennedy, P., Lampertico, P., Liang, J., Locarnini, S., Maini, M.K., Mishra, P., Papatheodoridis, G., Petersen, J., Schlottmann, S., Wang, S., Wedemeyer, H., 2020. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B - Report from the 2019 EASL-AASLD HBV Treatment Endpoints Conference‡. J. Hepatol. 72, 539–557. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.11.003

Cornberg, M., Wong, V.W.-S., Locarnini, S., Brunetto, M., Janssen, H.L.A., Chan, H.L.-Y., 2017. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. J. Hepatol. 66, 398–411. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.009

Costentin, C.E., Layese, R., Bourcier, V., Cagnot, C., Marcellin, P., Guyader, D., Pol, S., Larrey, D., De Lédinghen, V., Ouzan, D., Zoulim, F., Roulot, D., Tran, A., Bronowicki, J.-P., Zarski, J.-P., Riachi, G., Calès, P., Péron, J.-M., Alric, L., Bourlière, M., Mathurin, P., Blanc, J.-F., Abergel, A., Serfaty, L., Mallat, A., Grangé, J.-D., Attali, P., Bacq, Y., Wartelle, C., Dao, T., Thabut, D., Pilette, C., Silvain, C., Christidis, C., Nguyen-khac, E., Bernard-Chabert, B., Zucman, D., Di Martino, V., Sutton, A., Letouzé, E., Imbeaud, S., Zucman-Rossi, J., Audureau, E., Roudot-Thoraval, F., Nahon, P., Nahon, P., Marcellin, P., Guyader, D., Pol, S., Fontaine, H., Larrey, D., De Lédinghen, V., Ouzan, D., Zoulim, F., Roulot, D., Tran, A., Bronowicki, J.-P., Zarski, J.-P., Leroy, V., Riachi, G., Calès, P., Péron, J.-M., Alric, L., Bourlière, M., Mathurin, P., Dharancy, S., Blanc, J.-F., Abergel, A., Serfaty, L., Mallat, A., Grangé, J.-D., Attali, P., Bacq, Y., Wartelle, C., Dao, T., Thabut, D., Pilette, C., Silvain, C., Christidis, C., Capron, D., Thiefin, G., Hillaire, S., Di Martino, V., 2018. Compliance With Hepatocellular Carcinoma Surveillance Guidelines Associated With Increased Lead-Time Adjusted Survival of Patients With Compensated Viral Cirrhosis: A Multi-Center Cohort Study. Gastroenterology 155, 431-442.e10. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.027

Dane, D.S., Cameron, C.H., Briggs, M., 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet Lond. Engl. 1, 695–698. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(70)90926-8

de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., Clifford, G.M., 2020. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. Lancet Glob. Health 8, e180–e190. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7

Désiré, N., Ngo, Y., Franetich, J.-F., Dembele, L., Mazier, D., Vaillant, J.-C., Poynard, T., Thibault, V., 2015. Definition of an HBsAg to DNA international unit conversion factor by enrichment of circulating hepatitis B virus forms. J. Viral Hepat. 22, 718–726. https://doi.org/10.1111/jvh.12387

Diminsky, D., Schirmbeck, R., Reimann, J., Barenholz, Y., 1997. Comparison between hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (Hansenula polymorpha): composition, structure and immunogenicity. Vaccine 15, 637–647. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(96)00239-3

Döring, T., Prange, R., 2015. Rab33B and its autophagic Atg5/12/16L1 effector assist in hepatitis B virus naked capsid formation and release: HBV capsid biogenesis depends on Rab33B and Atg5/12/16L1. Cell. Microbiol. 17, 747–764. https://doi.org/10.1111/cmi.12398

Fan, R., Sun, J., Yuan, Q., Xie, Q., Bai, X., Ning, Q., Cheng, J., Yu, Y., Niu, J., Shi, G., Wang, H., Tan, D., Wan, M., Chen, S., Xu, M., Chen, X., Tang, H., Sheng, J., Lu, F., Jia, J., Zhuang, H., Xia, N., Hou, J., 2016. Baseline quantitative hepatitis B core antibody titre alone strongly predicts HBeAg seroconversion across chronic hepatitis B patients treated with peginterferon or nucleos(t)ide analogues. Gut 65, 313–320. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308546

Farag, M.S., van Campenhout, M.J.H., Pfefferkorn, M., Fischer, J., Deichsel, D., Boonstra, A., van Vuuren, A.J., Ferenci, P., Feld, J.J., Berg, T., Hansen, B.E., van Bömmel, F., Janssen, H.L.A., 2020. Hepatitis B virus RNA as Early Predictor for Response to PEGylated Interferon Alfa in HBeAg Negative Chronic Hepatitis B. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa013

Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K.L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., Jeong, S.-H., Walker, C., Lanford, R.E., Lemon, S.M., 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. Nature 496, 367–371. https://doi.org/10.1038/nature12029

Feng, Z., Lemon, S.M., 2014. Peek-a-boo: membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis. Trends Microbiol. 22, 59–64. https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.10.005

Fergusson, J.R., Wallace, Z., Connolly, M.M., Woon, A.P., Suckling, R.J., Hine, D.W., Barber, C., Bunjobpol, W., Choi, B., Crespillo, S., Dembek, M., Dieckmann, N., Donoso, J., Godinho, L.F., Grant, T., Howe, D., McCully, M.L., Perot, C., Sarkar, A., Seifert, F.U., Singh, P.K., Stegmann, K.A., Turner, B., Verma, A., Walker, A., Leonard, S., Maini, M.K., Wiederhold, K., Dorrell, L., Simmons, R., Knox, A., 2020. Immune- mobilising monoclonal T cell receptors mediate specific and rapid elimination of Hepatitis B- infected cells. Hepatology hep.31503. https://doi.org/10.1002/hep.31503

Fernholz, D., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F., Will, H., 1991. Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein. J. Hepatol. 13 Suppl 4, S102-104. https://doi.org/10.1016/0168-8278(91)90036-b

Flint, S.J., Racaniello, V.R., Rall, G.F., Skalka, A.M., Enquist, L.W., 2015. Principles of virology, 4th edition. ed. ASM Press, Washington, DC.

Gane, E., Verdon, D.J., Brooks, A.E., Gaggar, A., Nguyen, A.H., Subramanian, G.M., Schwabe, C., Dunbar, P.R., 2019. Anti-PD-1 blockade with nivolumab with and without therapeutic vaccination for virally suppressed chronic hepatitis B: A pilot study. J. Hepatol. 71, 900–907. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.028

Gao, Y., Li, Yutang, Meng, Q., Zhang, Z., Zhao, P., Shang, Q., Li, Yue, Su, M., Li, T., Liu, X., Zhuang, H., 2017. Serum Hepatitis B Virus DNA, RNA, and HBsAg: Which Correlated Better with Intrahepatic Covalently Closed Circular DNA before and after Nucleos(t)ide Analogue Treatment? J. Clin. Microbiol. 55, 2972–2982. https://doi.org/10.1128/JCM.00760-17

Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J.M., Peterson, D.L., 1982. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. J. Biol. Chem. 257, 7770–7777.

Gerard, G.F., D'Alessio, J.M., 1993. Reverse transcriptase (EC 2.7.7.49): the use of cloned maloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 16, 73–93. https://doi.org/10.1385/0-89603-234-5:73

Gerelsaikhan, T., Tavis, J.E., Bruss, V., 1996. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. J. Virol. 70, 4269–4274. https://doi.org/10.1128/JVI.70.7.4269-4274.1996

Gerin, J.L., Ford, E.C., Purcell, R.H., 1975. Biochemical characterization of Australia antigen. Evidence for defective particles of hepatitis B virus. Am. J. Pathol. 81, 651–668.

Gilbert, C., Feschotte, C., 2010. Genomic fossils calibrate the long-term evolution of hepadnaviruses. PLoS Biol. 8. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000495

Gilbert, R.J.C., Beales, L., Blond, D., Simon, M.N., Lin, B.Y., Chisari, F.V., Stuart, D.I., Rowlands, D.J., 2005. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 14783–14788. https://doi.org/10.1073/pnas.0505062102

Gripon, P., Cannie, I., Urban, S., 2005. Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by Acylated Peptides Derived from the Large Viral Surface Protein. J. Virol. 79, 1613–1622. https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1613-1622.2005

Gripon, P., Diot, C., Guguen-Guillouzo, C., 1993. Reproducible High Level Infection of Cultured Adult Human Hepatocytes by Hepatitis B Virus: Effect of Polyethylene Glycol on Adsorption and Penetration. Virology 192, 534–540. https://doi.org/10.1006/viro.1993.1069

Gripon, P., Diot, C., Thézé, N., Fourel, I., Loreal, O., Brechot, C., Guguen-Guillouzo, C., 1988. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. J. Virol. 62, 4136–4143. https://doi.org/10.1128/JVI.62.11.4136-4143.1988

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C., 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 15655–15660. https://doi.org/10.1073/pnas.232137699

Guillot, C., Martel, N., Berby, F., Bordes, I., Hantz, O., Blanchet, M., Sureau, C., Vaillant, A., Chemin, I., 2017. Inhibition of hepatitis B viral entry by nucleic acid polymers in HepaRG cells and primary human hepatocytes. PLOS ONE 12, e0179697. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179697

Günther, S., Sommer, G., Iwanska, A., Will, H., 1997. Heterogeneity and Common Features of Defective Hepatitis B Virus Genomes Derived from Spliced Pregenomic RNA. Virology 238, 363–371. https://doi.org/10.1006/viro.1997.8863

Halgand, B., Desterke, C., Rivière, L., Fallot, G., Sebagh, M., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Neuveut, C., Buendia, M.-A., Samuel, D., Féray, C., 2018. Hepatitis B Virus Pregenomic RNA in Hepatocellular Carcinoma: A Nosological and Prognostic Determinant. Hepatol. Baltim. Md 67, 86–96. https://doi.org/10.1002/hep.29463

Harms, Z.D., Selzer, L., Zlotnick, A., Jacobson, S.C., 2015. Monitoring Assembly of Virus Capsids with Nanofluidic Devices. ACS Nano 9, 9087–9096. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03231

Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., Gerlich, W.H., 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. J. Virol. 52, 396–402.

Heger-Stevic, J., Zimmermann, P., Lecoq, L., Böttcher, B., Nassal, M., 2018. Hepatitis B virus core protein phosphorylation: Identification of the SRPK1 target sites and impact of their occupancy on RNA binding and capsid structure. PLOS Pathog. 14, e1007488. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007488

Heider, S., Metzner, C., 2014. Quantitative real-time single particle analysis of virions. Virology 462–463, 199–206. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.005

Herrscher, C., Pastor, F., Burlaud- Gaillard, J., Dumans, A., Seigneuret, F., Moreau, A., Patient, R., Eymieux, S., Rocquigny, H. de, Hourioux, C., Roingeard, P., Blanchard, E., 2020. Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis. Cell. Microbiol. 22, e13205. https://doi.org/10.1111/cmi.13205

Hilger, C., Velhagen, I., Zentgraf, H., Schröder, C.H., 1991. Diversity of hepatitis B virus X gene-related transcripts in hepatocellular carcinoma: a novel polyadenylation site on viral DNA. J. Virol. 65, 4284–4291.

Hoffmann, J., Boehm, C., Himmelsbach, K., Donnerhak, C., Roettger, H., Weiss, T.S., Ploen, D., Hildt, E., 2013. Identification of α-taxilin as an essential factor for the life cycle of hepatitis B virus. J. Hepatol. 59, 934–941. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.06.020

Honda, M., Shirasaki, T., Terashima, T., Kawaguchi, K., Nakamura, M., Oishi, N., Wang, X., Shimakami, T., Okada, H., Arai, K., Yamashita, Taro, Sakai, Y., Yamashita, Tatsuya, Mizukoshi, E., Kaneko, S., 2016. Hepatitis B Virus (HBV) Core-Related Antigen During Nucleos(t)ide Analog Therapy Is Related to Intra-hepatic HBV Replication and Development of Hepatocellular Carcinoma. J. Infect. Dis. 213, 1096–1106. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv572

Hong, H.J., Ryu, C.J., Hur, H., Kim, S., Oh, H.K., Oh, M.S., Park, S.Y., 2004. In vivo neutralization of hepatitis B virus infection by an anti-preS1 humanized antibody in chimpanzees. Virology 318, 134–141. https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.014

Hosaka, T., Suzuki, F., Kobayashi, Masahiro, Fujiyama, S., Kawamura, Y., Sezaki, H., Akuta, N., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K., Kobayashi, Mariko, Kumada, H., 2019. Impact of hepatitis B core-related antigen on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients treated with nucleos(t)ide analogues. Aliment. Pharmacol. Ther. 49, 457–471. https://doi.org/10.1111/apt.15108

Hosaka, T., Suzuki, F., Kobayashi, Masahiro, Hirakawa, M., Kawamura, Y., Yatsuji, H., Sezaki, H., Akuta, N., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K., Kobayashi, Mariko, Kumada, H., 2010. HBcrAg is a predictor of post-treatment recurrence of hepatocellular carcinoma during antiviral therapy: HBcrAg is a predictor of HCC recurrence. Liver Int. 30, 1461–1470. https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02344.x

Hu, J., Liu, K., 2017. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. Viruses 9, 56. https://doi.org/10.3390/v9030056

Hu, Q., Zhang, F., Duan, L., Wang, B., Ye, Y., Li, P., Li, D., Yang, S., Zhou, L., Chen, W., 2020. E-cadherin Plays a Role in Hepatitis B Virus Entry Through Affecting Glycosylated Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide Distribution. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10, 74. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00074

Huang, H., Wang, J., Li, W., Chen, R., Chen, X., Zhang, F., Xu, D., Lu, F., 2018. Serum HBV DNA plus RNA shows superiority in reflecting the activity of intrahepatic cccDNA in treatment-naïve HBV-infected individuals. J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 99–100, 71–78. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.12.016

Huang, Q., Zhou, B., Cai, D., Zong, Y., Wu, Y., Liu, S., Mercier, A., Guo, H., Hou, J., Colonno, R., Sun, J., 2020. Rapid Turnover of HBV cccDNA Indicated by Monitoring Emergence and Reversion of Signature-Mutation in Treated Chronic Hepatitis B Patients. Hepatology. https://doi.org/10.1002/hep.31240

Iwamoto, M., Saso, W., Nishioka, K., Ohashi, H., Sugiyama, R., Ryo, A., Ohki, M., Yun, J.-H., Park, S.-Y., Ohshima, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Muramatsu, M., Matano, T., Iwami, S., Sureau, C., Wakita, T., Watashi, K., 2020. The machinery for endocytosis of epidermal growth factor receptor coordinates the transport of incoming hepatitis B virus to the endosomal network. J. Biol. Chem. 295, 800–807. https://doi.org/10.1074/jbc.AC119.010366

Iwamoto, M., Saso, W., Sugiyama, R., Ishii, K., Ohki, M., Nagamori, S., Suzuki, R., Aizaki, H., Ryo, A., Yun, J.-H., Park, S.-Y., Ohtani, N., Muramatsu, M., Iwami, S., Tanaka, Y., Sureau, C., Wakita, T., Watashi, K., 2019. Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. Proc. Natl. Acad. Sci. 116, 8487–8492. https://doi.org/10.1073/pnas.1811064116

Jansen, L., Kootstra, N.A., van Dort, K.A., Takkenberg, R.B., Reesink, H.W., Zaaijer, H.L., 2016. Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Is Present in Virions in Plasma and Is Associated With a Response to Pegylated Interferon Alfa-2a and Nucleos(t)ide Analogues. J. Infect. Dis. 213, 224–232. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv397

Jiang, B., Hildt, E., 2020. Intracellular Trafficking of HBV Particles. Cells 9, 2023. https://doi.org/10.3390/cells9092023

Jiang, B., Himmelsbach, K., Ren, H., Boller, K., Hildt, E., 2015. Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. J. Virol. 90, 3330–3341. https://doi.org/10.1128/JVI.03109-15

Jung, K.S., Park, J.Y., Chon, Y.E., Kim, H.-S., Kang, W., Kim, B.K., Kim, S.U., Kim, D.Y., Han, K.-H., Ahn, S.H., 2016. Clinical outcomes and predictors for relapse after cessation of oral antiviral treatment in chronic hepatitis B patients. J. Gastroenterol. 51, 830–839. https://doi.org/10.1007/s00535-015-1153-1

Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R., Schaller, H., 1990. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. EMBO J. 9, 3389–3396. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07540.x

Kaplan, P.M., Ford, E.C., Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1976. Demonstration of subpopulations of Dane particles. J. Virol. 17, 885–893. https://doi.org/10.1128/JVI.17.3.885-893.1976

Kim, J.H., Gripon, P., Bouezzedine, F., Jeong, M.S., Chi, S.-W., Ryu, S.-E., Hong, H.J., 2015. Enhanced humanization and affinity maturation of neutralizing anti-hepatitis B virus preS1 antibody based on antigen-antibody complex structure. FEBS Lett. 589, 193–200. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.046

Kim, J.H., Sinn, D.H., Kang, W., Gwak, G.-Y., Paik, Y.-H., Choi, M.S., Lee, J.H., Koh, K.C., Paik, S.W., 2017. Low-level viremia and the increased risk of hepatocellular carcinoma in patients receiving entecavir treatment. Hepatology 66, 335–343. https://doi.org/10.1002/hep.28916

Kimura, T., Ohno, N., Terada, N., Rokuhara, A., Matsumoto, A., Yagi, S., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Ohno, S., Maki, N., 2005. Hepatitis B Virus DNA-negative Dane Particles Lack Core Protein but Contain a 22-kDa Precore Protein without C-terminal Arginine-rich Domain. J. Biol. Chem. 280, 21713–21719. https://doi.org/10.1074/jbc.M501564200

Kimura, T., Rokuhara, A., Sakamoto, Y., Yagi, S., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Maki, N., 2002. Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load. J. Clin. Microbiol. 40, 439–445.

Kramvis, A., 2018. Molecular characteristics and clinical relevance of African genotypes and subgenotypes of hepatitis B virus. South Afr. Med. J. Suid-Afr. Tydskr. Vir Geneeskd. 108, 17–21. https://doi.org/10.7196/SAMJ.2018.v108i8b.13495

Kramvis, A., 2014. Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus. Intervirology 57, 141–150. https://doi.org/10.1159/000360947

Kramvis, A., Arakawa, K., Yu, M.C., Nogueira, R., Stram, D.O., Kew, M.C., 2008. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. J. Med. Virol. 80, 27–46. https://doi.org/10.1002/jmv.21049

Kumada, T., Toyoda, H., Tada, T., Kiriyama, S., Tanikawa, M., Hisanaga, Y., Kanamori, A., Niinomi, T., Yasuda, S., Andou, Y., Yamamoto, K., Tanaka, J., 2013. Effect of nucleos(t)ide analogue therapy on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B patients: A propensity score analysis. J. Hepatol. 58, 427–433. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.025

Lam, A.M., Espiritu, C., Vogel, R., Ren, S., Lau, V., Kelly, M., Kuduk, S.D., Hartman, G.D., Flores, O.A., Klumpp, K., 2018. Preclinical Characterization of NVR 3-778, a First-in-Class Capsid Assembly Modulator against Hepatitis B Virus. Antimicrob. Agents Chemother. 63, e01734-18, /aac/63/1/AAC.01734-18.atom. https://doi.org/10.1128/AAC.01734-18

Lam, A.M., Ren, S., Espiritu, C., Kelly, M., Lau, V., Zheng, L., Hartman, G.D., Flores, O.A., Klumpp, K., 2017. HBV Capsid Assembly Modulators, but not Nucleoside Analogs, Inhibit the Production of Extracellular Pregenomic RNA and Spliced RNA Variants. Antimicrob. Agents Chemother. AAC.00680-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00680-17

Lambert, C., Thomé, N., Kluck, C.J., Prange, R., 2004. Functional incorporation of green fluorescent protein into hepatitis B virus envelope particles. Virology 330, 158–167. https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.031

Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., Buti, M., Janssen, H.L.A., Papatheodoridis, G., Zoulim, F., Tacke, F., 2017. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. J. Hepatol. 67, 370–398. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021

Laub, O., Rall, L.B., Truett, M., Shaul, Y., Standring, D.N., Valenzuela, P., Rutter, W.J., 1983. Synthesis of hepatitis B surface antigen in mammalian cells: expression of the entire gene and the coding region. J. Virol. 48, 271–280. https://doi.org/10.1128/JVI.48.1.271-280.1983

Lepère, C., Régeard, M., Le Seyec, J., Gripon, P., 2007. The Translocation Motif of Hepatitis B Virus Envelope Proteins Is Dispensable for Infectivity. J. Virol. 81, 7816–7818. https://doi.org/10.1128/JVI.00224-07

Liang, L.Y., Wong, V.W.-S., Toyoda, H., Tse, Y.-K., Yip, T.C.-F., Yuen, B.W.-Y., Tada, T., Kumada, T., Lee, H.-W., Lui, G.C.-Y., Chan, H.L.-Y., Wong, G.L.-H., 2020. Serum hepatitis B core-related antigen predicts hepatocellular carcinoma in hepatitis B e antigen-negative patients. J. Gastroenterol. https://doi.org/10.1007/s00535-020-01700-z

Liu, S., Zhou, B., Valdes, J.D., Sun, J., Guo, H., 2019. Serum Hepatitis B Virus RNA: A New Potential Biomarker for Chronic Hepatitis B Virus Infection. Hepatol. Baltim. Md 69, 1816–1827. https://doi.org/10.1002/hep.30325

Lok, A.S., Zoulim, F., Dusheiko, G., Ghany, M.G., 2017. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval: Lok et al. Hepatology 66, 1296–1313. https://doi.org/10.1002/hep.29323

Luangsay, S., Gruffaz, M., Isorce, N., Testoni, B., Michelet, M., Faure-Dupuy, S., Maadadi, S., Ait-Goughoulte, M., Parent, R., Rivoire, M., Javanbakht, H., Lucifora, J., Durantel, D., Zoulim, F., 2015. Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. J. Hepatol. 63, 1314–1322. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.014

Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., Protzer, U., 2011. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. J. Hepatol. 55, 996–1003. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.015

Luckenbaugh, L., Kitrinos, K.M., Delaney, W.E., Hu, J., 2015a. Genome-free hepatitis B virion levels in patient sera as a potential marker to monitor response to antiviral therapy. J. Viral Hepat. 22, 561–570. https://doi.org/10.1111/jvh.12361

Luckenbaugh, L., Kitrinos, K.M., Delaney, W.E., Hu, J., 2015b. Genome-free hepatitis B virion levels in patient sera as a potential marker to monitor response to antiviral therapy. J. Viral Hepat. 22, 561–570. https://doi.org/10.1111/jvh.12361

Ludgate, L., Liu, K., Luckenbaugh, L., Streck, N., Eng, S., Voitenleitner, C., Delaney, W.E., Hu, J., 2016. Cell-Free Hepatitis B Virus Capsid Assembly Dependent on the Core Protein C-Terminal Domain and Regulated by Phosphorylation. J. Virol. 90, 5830–5844. https://doi.org/10.1128/JVI.00394-16

Luo, J., Cui, X., Gao, L., Hu, J., 2017. Identification of an Intermediate in Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular (CCC) DNA Formation and Sensitive and Selective CCC DNA Detection. J. Virol. 91. https://doi.org/10.1128/JVI.00539-17

Maasoumy, B., Wiegand, S.B., Jaroszewicz, J., Bremer, B., Lehmann, P., Deterding, K., Taranta, A., Manns, M.P., Wedemeyer, H., Glebe, D., Cornberg, M., 2015. Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) levels in the natural history of hepatitis B virus infection in a large European cohort predominantly infected with genotypes A and D. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21, 606.e1–10. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.010

Magnius, L., Mason, W.S., Taylor, J., Kann, M., Glebe, D., Dény, P., Sureau, C., Norder, H., Report Consortium, I., 2020. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae. J. Gen. Virol. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001415

Maini, M.K., Burton, A.R., 2019. Restoring, releasing or replacing adaptive immunity in chronic hepatitis B. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 16, 662–675. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0196-9

Marcellin, P., Gane, E., Buti, M., Afdhal, N., Sievert, W., Jacobson, I.M., Washington, M.K., Germanidis, G., Flaherty, J.F., Schall, R.A., Bornstein, J.D., Kitrinos, K.M., Subramanian, G.M., McHutchison, J.G., Heathcote, E.J., 2013. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. The Lancet 381, 468–475. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61425-1

Marcellin, P., Wong, D.K., Sievert, W., Buggisch, P., Petersen, J., Flisiak, R., Manns, M., Kaita, K., Krastev, Z., Lee, S.S., Cathcart, A.L., Crans, G., Brouw, M.O. den, Jump, B., Gaggar, A., Flaherty, J., Buti, M., 2019. Ten-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B virus infection. Liver Int. 39, 1868–1875. https://doi.org/10.1111/liv.14155

Martinot-Peignoux, M., Lapalus, M., Maylin, S., Boyer, N., Castelnau, C., Giuily, N., Pouteau, M., Moucari, R., Asselah, T., Marcellin, P., 2016. Baseline HBsAg and HBcrAg titres allow peginterferon-based “precision medicine” in HBeAg-negative

chronic hepatitis B patients. J. Viral Hepat. 23, 905–911. https://doi.org/10.1111/jvh.12565
Mason, W.S., Gill, U.S., Litwin, S., Zhou, Y., Peri, S., Pop, O., Hong, M.L.W., Naik, S., Quaglia, A., Bertoletti, A., Kennedy, P.T.F., 2016. HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant. Gastroenterology 151, 986-998.e4. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.07.012
Maynard, J.E., Berquist, K.R., Krushak, D.H., Purcell, R.H., 1972. Experimental infection of chimpanzees with the virus of hepatitis B. Nature 237, 514–515. https://doi.org/10.1038/237514a0
Messageot, F., Salhi, S., Eon, P., Rossignol, J.-M., 2003. Proteolytic processing of the hepatitis B virus e antigen precursor. Cleavage at two furin consensus sequences. J. Biol. Chem. 278, 891–895. https://doi.org/10.1074/jbc.M207634200
Miaglia, C., Lebossé, F., Zoulim, F., 2018. Enjeux de la prise en charge du virus de l'hépatite B (VHB) en transplantation. Virologie 22, 277–288. https://doi.org/10.1684/vir.2018.0755
Miao, Z., Zhang, S., Ou, X., Li, S., Ma, Z., Wang, W., Peppelenbosch, M.P., Liu, J., Pan, Q., 2020. Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection. J. Infect. Dis. 221, 1677–1687. https://doi.org/10.1093/infdis/jiz633
Minor, M., Slagle, B., 2014. Hepatitis B Virus HBx Protein Interactions with the Ubiquitin Proteasome System. Viruses 6, 4683–4702. https://doi.org/10.3390/v6114683
Molnar-Kimber, K.L., Jarocki-Witek, V., Dheer, S.K., Vernon, S.K., Conley, A.J., Davis, A.R., Hung, P.P., 1988. Distinctive properties of the hepatitis B virus envelope proteins. J. Virol. 62, 407–416. https://doi.org/10.1128/JVI.62.2.407-416.1988
Mouzannar, K., Fusil, F., Lacombe, B., Ollivier, A., Ménard, C., Lotteau, V., Cosset, F.-L., Ramière, C., André, P., 2019. Farnesoid X receptor- α is a proviral host factor for hepatitis B virus that is inhibited by ligands *in vitro* and *in vivo*. FASEB J. 33, 2472–2483. https://doi.org/10.1096/fj.201801181R
Nassal, M., 1992. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. J. Virol. 66, 4107–4116. https://doi.org/10.1128/JVI.66.7.4107-4116.1992
Nayagam, S., Thursz, M., Sicuri, E., Conteh, L., Wiktor, S., Low-Beer, D., Hallett, T.B., 2016. Requirements for global elimination of hepatitis B: a modelling study. Lancet Infect. Dis. 16, 1399–1408. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30204-3
Ning, X., Basagoudanavar, S.H., Liu, K., Luckenbaugh, L., Wei, D., Wang, C., Wei, B., Zhao, Y., Yan, T., Delaney, W., Hu, J., 2017. Capsid Phosphorylation State and Hepadnavirus Virion Secretion. J. Virol. 91, e00092-17, e00092-17. https://doi.org/10.1128/JVI.00092-17
Ning, X., Luckenbaugh, L., Liu, K., Bruss, V., Sureau, C., Hu, J., 2018. Common and Distinct Capsid and Surface Protein Requirements for Secretion of Complete and Genome-Free Hepatitis B Virions. J. Virol. 92, e00272-18, /jvi/92/14/e00272-18.atom. https://doi.org/10.1128/JVI.00272-18
Ning, X., Nguyen, D., Mentzer, L., Adams, C., Lee, H., Ashley, R., Hafenstein, S., Hu, J., 2011. Secretion of Genome-Free Hepatitis B Virus – Single Strand Blocking Model for Virion Morphogenesis of Para-retrovirus. PLoS Pathog. 7, e1002255. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002255
Niu, C., Livingston, C.M., Li, L., Beran, R.K., Daffis, S., Ramakrishnan, D., Burdette, D., Peiser, L., Salas, E., Ramos, H., Yu, M., Cheng, G., Strubin, M., Delaney IV, W.E., Fletcher, S.P., 2017. The Smc5/6 Complex Restricts HBV when Localized to ND10

without Inducing an Innate Immune Response and Is Counteracted by the HBV X Protein Shortly after Infection. PLOS ONE 12, e0169648. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169648

Oess, S., Hildt, E., 2000. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. Gene Ther. 7, 750–758. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301154

Ortega-Prieto, A.M., Skelton, J.K., Wai, S.N., Large, E., Lussignol, M., Vizcay-Barrena, G., Hughes, D., Fleck, R.A., Thursz, M., Catanese, M.T., Dorner, M., 2018. 3D microfluidic liver cultures as a physiological preclinical tool for hepatitis B virus infection. Nat. Commun. 9, 682. https://doi.org/10.1038/s41467-018-02969-8

Osseman, Q., Gallucci, L., Au, S., Cazenave, C., Berdance, E., Blondot, M.-L., Cassany, A., Bégu, D., Ragues, J., Aknin, C., Sominskaya, I., Dishlers, A., Rabe, B., Anderson, F., Panté, N., Kann, M., 2018. The chaperone dynein LL1 mediates cytoplasmic transport of empty and mature hepatitis B virus capsids. J. Hepatol. 68, 441–448. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.032

Pan, M.-H., Hu, H.-H., Mason, H., Bayliss, J., Littlejohn, M., Lin, Y.-L., Su, C.-Y., Chiang, C.-T., Chen, C.-J., Locarnini, S., Yang, H.-I., Revill, P., 2018. Hepatitis B splice variants are strongly associated with and are indeed predictive of hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. 68, S474–S475. https://doi.org/10.1016/S0168-8278(18)31197-8

Papatheodoridi, M., Hadziyannis, E., Berby, F., Zachou, K., Testoni, B., Rigopoulou, E., Gatselis, N.K., Lyberopoulou, A., Vlachogiannakos, I., Manolakopoulos, S., Dalekos, G.N., Zoulim, F., Papatheodoridis, G.V., 2020. Predictors of hepatitis B surface antigen loss, relapse and retreatment after discontinuation of effective oral antiviral therapy in noncirrhotic HBeAg-negative chronic hepatitis B. J. Viral Hepat. 27, 118–126. https://doi.org/10.1111/jvh.13211

Papatheodoridis, G.V., Idilman, R., Dalekos, G.N., Buti, M., Chi, H., van Boemmel, F., Calleja, J.L., Sypsa, V., Goulis, J., Manolakopoulos, S., Loglio, A., Siakavellas, S., Keskın, O., Gatselis, N., Hansen, B.E., Lehretz, M., de la Revilla, J., Savvidou, S., Kourikou, A., Vlachogiannakos, I., Galanis, K., Yurdaydin, C., Berg, T., Colombo, M., Esteban, R., Janssen, H.L.A., Lampertico, P., 2017. The risk of hepatocellular carcinoma decreases after the first 5 years of entecavir or tenofovir in Caucasians with chronic hepatitis B. Hepatol. Baltim. Md 66, 1444–1453. https://doi.org/10.1002/hep.29320

Papatheodoridis, G.V., Sypsa, V., Dalekos, G., Yurdaydin, C., van Boemmel, F., Buti, M., Goulis, J., Calleja, J.L., Chi, H., Manolakopoulos, S., Loglio, A., Siakavellas, S., Gatselis, N., Keskın, O., Lehretz, M., Savvidou, S., de la Revilla, J., Hansen, B.E., Kourikou, A., Vlachogiannakos, I., Galanis, K., Idilman, R., Colombo, M., Esteban, R., Janssen, H.L.A., Berg, T., Lampertico, P., 2018. Eight-year survival in chronic hepatitis B patients under long-term entecavir or tenofovir therapy is similar to the general population. J. Hepatol. 68, 1129–1136. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.031

Park, E.-S., Lee, A.R., Kim, D.H., Lee, J.-H., Yoo, J.-J., Ahn, S.H., Sim, H., Park, S., Kang, H.S., Won, J., Ha, Y.N., Shin, G.-C., Kwon, S.Y., Park, Y.K., Choi, B.-S., Lee, Y.B., Jeong, N., An, Y., Ju, Y.S., Yu, S.J., Chae, H.B., Yu, K.-S., Kim, Y.J., Yoon, J.-H., Zoulim, F., Kim, K.-H., 2019. Identification of a quadruple mutation that confers tenofovir resistance in chronic hepatitis B patients. J. Hepatol. 70, 1093–1102. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.006

Patient, R., Hourioux, C., Roingeard, P., 2009. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. Cell. Microbiol. 11, 1561–1570. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01363.x

Perlman, D.H., Berg, E.A., O'Connor, P.B., Costello, C.E., Hu, J., 2005. Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids. Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 9020–9025. https://doi.org/10.1073/pnas.0502138102

Petit, M.-A., Zoulim, F., Caipel, F., Dubanchet, S., Dauguet, C., Trepo, C., 1990. Variable expression of preS1 antigen in serum during chronic hepatitis B virus infection: An accurate marker for the level of hepatitis B virus replication. Hepatology 11, 809–814. https://doi.org/10.1002/hep.1840110515

Pfefferkorn, M., Böhm, S., Schott, T., Deichsel, D., Bremer, C.M., Schröder, K., Gerlich, W.H., Glebe, D., Berg, T., van Bömmel, F., 2018. Quantification of large and middle proteins of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) as a novel tool for the identification of inactive HBV carriers. Gut 67, 2045–2053. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313811

Pfefferkorn, M., Schott, T., Böhm, S., Deichsel, D., Felkel, C., Gerlich, W.H., Glebe, D., Wat, C., Pavlovic, V., Heyne, R., Berg, T., van Bömmel, F., 2020. Composition of HBsAg is predictive of HBsAg loss during treatment in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. J. Hepatol. S0168827820336205. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.039

Platt, L., French, C.E., McGowan, C.R., Sabin, K., Gower, E., Trickey, A., McDonald, B., Ong, J., Stone, J., Easterbrook, P., Vickerman, P., 2019. Prevalence and burden of HBV co- infection among people living with HIV: a global systematic review and meta- analysis. J. Viral Hepat. https://doi.org/10.1111/jvh.13217

Poiteau, L., Wlassow, M., Hézode, C., Pawlotsky, J.-M., Chevaliez, S., 2020. Evaluation of the Xpert HBV Viral Load for hepatitis B virus molecular testing. J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 129, 104481. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104481

Prakash, K., Rydell, G.E., Larsson, S.B., Andersson, M., Norkrans, G., Norder, H., Lindh, M., 2018. High serum levels of pregenomic RNA reflect frequently failing reverse transcription in hepatitis B virus particles. Virol. J. 15, 86. https://doi.org/10.1186/s12985-018-0994-7

Prange, R., Nagel, R., Streeck, R.E., 1992. Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles. J. Virol. 66, 5832–5841. https://doi.org/10.1128/JVI.66.10.5832-5841.1992

Preiss, S., Littlejohn, M., Angus, P., Thompson, A., Desmond, P., Lewin, S.R., Sasadeusz, J., Matthews, G., Dore, G.J., Shaw, T., Sozzi, V., Yuen, L., Lau, G., Ayres, A., Thio, C., Avihingsanon, A., Ruxrungtham, K., Locarnini, S., Revill, P.A., 2008. Defective hepatitis B virus DNA is not associated with disease status but is reduced by polymerase mutations associated with drug resistance. Hepatol. Baltim. Md 48, 741–749. https://doi.org/10.1002/hep.22386

Pronier, C., Guyader, D., Jézequel, C., Tattevin, P., Thibault, V., 2018. Contribution of quantitative viral markers to document hepatitis B virus compartmentalization in cerebrospinal fluid during hepatitis B with neuropathies. J. Neurovirol. 24, 769–772. https://doi.org/10.1007/s13365-018-0662-0

Qu, B., Ni, Y., Lempp, F.A., Vondran, F.W.R., Urban, S., 2018. T5 Exonuclease Hydrolysis of Hepatitis B Virus Replicative Intermediates Allows Reliable Quantification and Fast Drug Efficacy Testing of Covalently Closed Circular DNA by PCR. J. Virol. 92. https://doi.org/10.1128/JVI.01117-18

Rabe, B., Glebe, D., Kann, M., 2006. Lipid-Mediated Introduction of Hepatitis B Virus Capsids into Nonsusceptible Cells Allows Highly Efficient Replication and Facilitates the Study of Early Infection Events. J. Virol. 80, 5465–5473. https://doi.org/10.1128/JVI.02303-05

Raimondo, G., Locarnini, S., Pollicino, T., Levrero, M., Zoulim, F., Lok, A.S., Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members, 2019. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. J. Hepatol. 71, 397–408. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034

Razavi-Shearer, D., Gamkrelidze, I., Nguyen, M.H., Chen, D.-S., Van Damme, P., Abbas, Z., Abdulla, M., Abou Rached, A., Adda, D., Aho, I., Akarca, U., Hasan, F., Al Lawati, F., Al Naamani, K., Al-Ashgar, H.I., Alavian, S.M., Alawadhi, S., Albillos, A., Al-Busafi, S.A., Aleman, S., Alfaleh, F.Z., Aljumah, A.A., Anand, A.C., Anh, N.T., Arends, J.E., Arkkila, P., Athanasakis, K., Bane, A., Ben-Ari, Z., Berg, T., Bizri, A.R., Blach, S., Brandão Mello, C.E., Brandon, S.M., Bright, B., Bruggmann, P., Brunetto, M., Buti, M., Chan, H.L.Y., Chaudhry, A., Chien, R.-N., Choi, M.S., Christensen, P.B., Chuang, W.-L., Chulanov, V., Clausen, M.R., Colombo, M., Cornberg, M., Cowie, B., Craxi, A., Croes, E.A., Cuellar, D.A., Cunningham, C., Desalegn, H., Drazilova, S., Duberg, A.-S., Egeonu, S.S., El-Sayed, M.H., Estes, C., Falconer, K., Ferraz, M.L.G., Ferreira, P.R., Flisiak, R., Frankova, S., Gaeta, G.B., García-Samaniego, J., Genov, J., Gerstoft, J., Goldis, A., Gountas, I., Gray, R., Guimarães Pessôa, M., Hajarizadeh, B., Hatzakis, A., Hézode, C., Himatt, S.M., Hoepelman, A., Hrstic, I., Hui, Y.-T.T., Husa, P., Jahis, R., Janjua, N.Z., Jarčuška, P., Jaroszewicz, J., Kaymakoglu, S., Kershenobich, D., Kondili, L.A., Konysbekova, A., Krajden, M., Kristian, P., Laleman, W., Lao, W.C., Layden, J., Lazarus, J.V., Lee, M.-H., Liakina, V., Lim, Y.-S.S., Loo, C.K., Lukšić, B., Malekzadeh, R., Malu, A.O., Mamatkulov, A., Manns, M., Marinho, R.T., Maticic, M., Mauss, S., Memon, M.S., Mendes Correa, M.C., Mendez-Sanchez, N., Merat, S., Metwally, A.M., Mohamed, R., Mokhbat, J.E., Moreno, C., Mossong, J., Mourad, F.H., Müllhaupt, B., Murphy, K., Musabaev, E., Nawaz, A., Nde, H.M., Negro, F., Nersesov, A., Nguyen, V.T.T., Njouom, R., Ntagirabiri, R., Nurmatov, Z., Obekpa, S., Ocama, P., Oguche, S., Omede, O., Omuemu, C., Opare-Sem, O., Opio, C.K., Örmeci, N., Papatheodoridis, G., Pasini, K., Pimenov, N., Poustchi, H., Quang, T.D., Qureshi, H., Ramji, A., Razavi-Shearer, K., Redae, B., Reesink, H.W., Rios, C.Y., Rjaskova, G., Robbins, S., Roberts, L.R., Roberts, S.K., Ryder, S.D., Safadi, R., Sagalova, O., Salupere, R., Sanai, F.M., Sanchez-Avila, J.F., Saraswat, V., Sarrazin, C., Schmelzer, J.D., Schréter, I., Scott, J., Seguin-Devaux, C., Shah, S.R., Sharara, A.I., Sharma, M., Shiha, G.E., Shin, T., Sievert, W., Sperl, J., Stärkel, P., Stedman, C., Sypsa, V., Tacke, F., Tan, S.S., Tanaka, J., Tomasiewicz, K., Urbanek, P., van der Meer, A.J., Van Vlierberghe, H., Vella, S., Vince, A., Waheed, Y., Waked, I., Walsh, N., Weis, N., Wong, V.W., Woodring, J., Yaghi, C., Yang, H.-I., Yang, C.-L., Yesmembetov, K., Yosry, A., Yuen, M.-F., Yusuf, M.A.M., Zeuzem, S., Razavi, H., 2018. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. Lancet Gastroenterol. Hepatol. 3, 383–403. https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30056-6

Redelsperger, F., Lekbaby, B., Mandouri, Y., Giang, E., Duriez, M., Desire, N., Roque Afonso, A., Brichler, S., Dubreuil, P., Dobrin, A., Perlemuter, G., Prevot, S., Bacon, N., Grange, J.D., Zatla, F., Le Pendeven, C., Pol, S., Strick-Marchand, H., Di Santo, J., Kremsdorf, D., Soussan, P., 2012. Production of hepatitis B defective particles is dependent on liver status. Virology 431, 21–28. https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.008

Revill, P.A., Tu, T., Netter, H.J., Yuen, L.K.W., Locarnini, S.A., Littlejohn, M., 2020. The evolution and clinical impact of hepatitis B virus genome diversity. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. https://doi.org/10.1038/s41575-020-0296-6

Rickwood, D., Ford, T., Graham, J., 1982. Nycodenz: A new nonionic iodinated gradient medium. Anal. Biochem. 123, 23–31. https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90618-2

Rissin, D.M., Kan, C.W., Campbell, T.G., Howes, S.C., Fournier, D.R., Song, L., Piech, T., Patel, P.P., Chang, L., Rivnak, A.J., Ferrell, E.P., Randall, J.D., Provuncher, G.K., Walt, D.R., Duffy, D.C., 2010. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. Nat. Biotechnol. 28, 595–599. https://doi.org/10.1038/nbt.1641

Riveiro-Barciela, M., Bes, M., Rodríguez-Frías, F., Tabernero, D., Ruiz, A., Casillas, R., Vidal-González, J., Homs, M., Nieto, L., Sauleda, S., Esteban, R., Buti, M., 2017. Serum hepatitis B core-related antigen is more accurate than hepatitis B surface antigen to identify inactive carriers, regardless of hepatitis B virus genotype. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.003

Roger, S., Lefeuvre, C., Grison, M., Ducancelle, A., Lunel-Fabiani, F., Pivert, A., Le Guillou-Guillemette, H., 2020. Evaluation of the Aptima™ HBV Quant Dx assay for semi-quantitative HBV viral load from dried blood spots. J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 129, 104524. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104524

Roingeard, P., Sureau, C., 1998. Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis. Hepatology 28, 1128–1133. https://doi.org/10.1002/hep.510280431

Rokuhara, A., Matsumoto, A., Tanaka, E., Umemura, T., Yoshizawa, K., Kimura, T., Maki, N., Kiyosawa, K., 2006. Hepatitis B virus RNA is measurable in serum and can be a new marker for monitoring lamivudine therapy. J. Gastroenterol. 41, 785–790. https://doi.org/10.1007/s00535-006-1856-4

Rydell, G.E., Prakash, K., Norder, H., Lindh, M., 2017. Hepatitis B surface antigen on subviral particles reduces the neutralizing effect of anti-HBs antibodies on hepatitis B viral particles in vitro. Virology 509, 67–70. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.05.017

Samuel, D., Muller, R., Alexander, G., Fassati, L., Ducot, B., Benhamou, J.P., Bismuth, H., 1993. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. N. Engl. J. Med. 329, 1842–1847. https://doi.org/10.1056/NEJM199312163292503

Sarrazin, S., Lamanna, W.C., Esko, J.D., 2011. Heparan Sulfate Proteoglycans. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3, a004952–a004952. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952

Schormann, W., Kraft, A., Ponsel, D., Bruss, V., 2006. Hepatitis B virus particle formation in the absence of pregenomic RNA and reverse transcriptase. J. Virol. 80, 4187–4190. https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.4187-4190.2006

Seeger, C., Sohn, J.A., 2016. Complete Spectrum of CRISPR/Cas9-induced Mutations on HBV cccDNA. Mol. Ther. 24, 1258–1266. https://doi.org/10.1038/mt.2016.94

Seitz, S., Iancu, C., Volz, T., Mier, W., Dandri, M., Urban, S., Bartenschlager, R., 2016. A Slow Maturation Process Renders Hepatitis B Virus Infectious. Cell Host Microbe 20, 25–35. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.013

Selzer, L., Katen, S.P., Zlotnick, A., 2014. The Hepatitis B Virus Core Protein Intradimer Interface Modulates Capsid Assembly and Stability. Biochemistry 53, 5496–5504. https://doi.org/10.1021/bi500732b

Seto, W.-K., Tanaka, Y., Wong, D.K.-H., Lai, C.-L., Shinkai, N., Yuen, J.C.-H., Tong, T., Fung, J., Hung, I.F.-N., Yuen, M.-F., 2013. Evidence of serologic activity in chronic

hepatitis B after surface antigen (HBsAg) seroclearance documented by conventional HBsAg assay. Hepatol. Int. 7, 98–105. https://doi.org/10.1007/s12072-012-9354-7

Seto, W.-K., Wong, D.-H., Chan, T.-Y., Hwang, Y.-Y., Fung, J., Liu, K.S.-H., Gill, H., Lam, Y.-F., Cheung, K.-S., Lie, A.K.W., Lai, C.-L., Kwong, Y.-L., Yuen, M.-F., 2016. Association of Hepatitis B Core-Related Antigen With Hepatitis B Virus Reactivation in Occult Viral Carriers Undergoing High-Risk Immunosuppressive Therapy: Am. J. Gastroenterol. 111, 1788–1795. https://doi.org/10.1038/ajg.2016.436

Seto, W.-K., Wong, D.K.-H., Fung, J., Huang, F.-Y., Liu, K.S.-H., Lai, C.-L., Yuen, M.-F., 2014. Linearized hepatitis B surface antigen and hepatitis B core-related antigen in the natural history of chronic hepatitis B. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20, 1173–1180. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12739

Shih, Y.-F., Liu, C.-J., 2020. Hepatitis C Virus and Hepatitis B Virus Co-Infection. Viruses 12, 741. https://doi.org/10.3390/v12070741

Siederdissen, C.H. zu, Maasoumy, B., Cornberg, M., 2018. New viral biomarkers for Hepatitis B: Are we able to change practice? J. Viral Hepat. 25, 1226–1235. https://doi.org/10.1111/jvh.12993

Singh, K.P., Crane, M., Audsley, J., Avihingsanon, A., Sasadeusz, J., Lewin, S.R., 2017. HIV-hepatitis B virus coinfection: epidemiology, pathogenesis, and treatment. AIDS 31, 2035–2052. https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001574

Sonneveld, M.J., Gehring, A.J., Janssen, H.L.A., 2020. NUCLEIC ACID POLYMER THERAPY FOR HBV – STRONG HBSAG DECLINE BUT MANY UNANSWERED QUESTIONS. Gastroenterology S0016508520351192. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.097

Soussan, P., Pol, J., Garreau, F., Schneider, V., Pendeven, C.L., Nalpas, B., Lacombe, K., Bonnard, P., Pol, S., Kremsdorf, D., 2008. Expression of Defective Hepatitis B Virus Particles Derived from Singly Spliced RNA Is Related to Liver Disease. J. Infect. Dis. 198, 218–225. https://doi.org/10.1086/589623

Soussan, P., Tuveri, R., Nalpas, B., Garreau, F., Zavala, F., Masson, A., Pol, S., Brechot, C., Kremsdorf, D., 2003. The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. J. Hepatol. 38, 343–348. https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00422-1

Stadelmayer, B., Diederichs, A., Chapus, F., Rivoire, M., Neveu, G., Alam, A., Fraisse, L., Carter, K., Testoni, B., Zoulim, F., 2020. Full-length 5'RACE identifies all major HBV transcripts in HBV-infected hepatocytes and patient serum. J. Hepatol. 73, 40–51. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.01.028

Su, Q., Wang, S.F., Chang, T.E., Breitkreutz, R., Hennig, H., Takegoshi, K., Edler, L., Schröder, C.H., 2001. Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection : representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 7, 2005–2015.

Sureau, C., Taylor, J., Chao, M., Eichberg, J.W., Lanford, R.E., 1989. Cloned hepatitis delta virus cDNA is infectious in the chimpanzee. J. Virol. 63, 4292–4297. https://doi.org/10.1128/JVI.63.10.4292-4297.1989

Suzuki, F., Miyakoshi, H., Kobayashi, M., Kumada, H., 2009. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients: HBcrAg and cccDNA in Chronic HB Patients. J. Med. Virol. 81, 27–33. https://doi.org/10.1002/jmv.21339

Suzuki, Y., Maekawa, S., Komatsu, N., Sato, M., Tatsumi, A., Miura, M., Matsuda, S., Muraoka, M., Nakakuki, N., Shindo, H., Amemiya, F., Takano, S., Fukasawa, M., Nakayama, Y., Yamaguchi, T., Inoue, T., Sato, T., Sakamoto, M., Yamashita, A., Moriishi, K., Enomoto, N., 2019. Hepatitis B virus (HBV)-infected patients with low

hepatitis B surface antigen and high hepatitis B core-related antigen titers have a high risk of HBV-related hepatocellular carcinoma. Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol. 49, 51–63. https://doi.org/10.1111/hepr.13277

Tada, T., Kumada, T., Toyoda, H., Kiriyama, S., Tanikawa, M., Hisanaga, Y., Kanamori, A., Kitabatake, S., Yama, T., Tanaka, J., 2016. HBcrAg is a predictor of hepatocellular carcinoma development: an analysis using time-dependent receiver operating characteristics. J. Hepatol. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.013

Taramasso, L., Berruti, M., Briano, F., Di Biagio, A., 2020. The switch from tenofovir disoproxil fumarate to tenofovir alafenamide determines weight gain in patients on rilpivirine-based regimen. AIDS Lond. Engl. 34, 877–881. https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002496

Terré, S., Petit, M.A., Bréchot, C., 1991. Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. J. Virol. 65, 5539–5543. https://doi.org/10.1128/JVI.65.10.5539-5543.1991

Testoni, B., Lebossé, F., Scholtes, C., Berby, F., Miaglia, C., Subic, M., Loglio, A., Facchetti, F., Lampertico, P., Levrero, M., Zoulim, F., 2019. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients. J. Hepatol. 70, 615–625. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.11.030

To, W., Mak, L., Wong, D.K., Fung, J., Liu, F., Seto, W., Lai, C., Yuen, M., 2019. Hepatitis B core- related antigen levels after HBeAg seroconversion is associated with the development of hepatocellular carcinoma. J. Viral Hepat. 26, 1473–1480. https://doi.org/10.1111/jvh.13191

Tran, B.M., Flanagan, D.J., Ebert, G., Warner, N., Tran, H., Fifis, T., Kastrappis, G., Christophi, C., Pellegrini, M., Torresi, J., Phesse, T.J., Vincan, E., 2020. The Hepatitis B Virus Pre-Core Protein p22 Activates Wnt Signaling. Cancers 12. https://doi.org/10.3390/cancers12061435

Tseng, T.-C., Liu, C.-J., Hsu, C.-Y., Hong, C.-M., Su, T.-H., Yang, W.-T., Chen, C.-L., Yang, H.-C., Huang, Y.-T., Fang-Tzu Kuo, S., Liu, C.-H., Chen, P.-J., Chen, D.-S., Kao, J.-H., 2019. High Level of Hepatitis B Core–Related Antigen Associated With Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Chronic HBV Infection of Intermediate Viral Load. Gastroenterology 157, 1518-1529.e3. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.028

Tu, T., Zehnder, B., Qu, B., Ni, Y., Main, N., Allweiss, L., Dandri, M., Shackel, N., George, J., Urban, S., 2020. A novel method to precisely quantify Hepatitis B Virus covalently closed circular (ccc)DNA formation and maintenance. Antiviral Res. 104865. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104865

Vaillant, A., 2016. Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection. Antiviral Res. 133, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.07.004

van Bömmel, F., Bartens, A., Mysickova, A., Hofmann, J., Krüger, D.H., Berg, T., Edelmann, A., 2015. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors: van BÖMMEL ET AL. Hepatology 61, 66–76. https://doi.org/10.1002/hep.27381

van Bömmel, F., van Bömmel, A., Krauel, A., Wat, C., Pavlovic, V., Yang, L., Deichsel, D., Berg, T., Böhm, S., 2018. Serum HBV RNA as a Predictor of Peginterferon Alfa-2a Response in Patients With HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B. J. Infect. Dis. 218, 1066–1074. https://doi.org/10.1093/infdis/jiy270

van Campenhout, M.J.H., van Bömmel, F., Pfefferkorn, M., Fischer, J., Deichsel, D., Boonstra, A., van Vuuren, A.J., Berg, T., Hansen, B.E., Janssen, H.L.A., 2018. Host

and viral factors associated with serum hepatitis B virus RNA levels among patients in need for treatment. Hepatol. Baltim. Md 68, 839–847. https://doi.org/10.1002/hep.29872

van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G., 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 19, 213–228. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125

Venter, W.D.F., Moorhouse, M., Sokhela, S., Fairlie, L., Mashabane, N., Masenya, M., Serenata, C., Akpomiemie, G., Qavi, A., Chandiwana, N., Norris, S., Chersich, M., Clayden, P., Abrams, E., Arulappan, N., Vos, A., McCann, K., Simmons, B., Hill, A., 2019. Dolutegravir plus Two Different Prodrugs of Tenofovir to Treat HIV. N. Engl. J. Med. 381, 803–815. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1902824

Verrier, E.R., Colpitts, C.C., Bach, C., Heydmann, L., Weiss, A., Renaud, M., Durand, S.C., Habersetzer, F., Durantel, D., Abou-Jaoudé, G., López Ledesma, M.M., Felmlee, D.J., Soumillon, M., Croonenborghs, T., Pochet, N., Nassal, M., Schuster, C., Brino, L., Sureau, C., Zeisel, M.B., Baumert, T.F., 2016. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. Hepatol. Baltim. Md 63, 35–48. https://doi.org/10.1002/hep.28013

Verrier, E.R., Heydmann, L., Baumert, T.F., Schuster, C., 2018. Le transporteur d'acides biliaires NTCP, un acteur majeur dans l'infection par les virus humains des hépatites offrant de nouvelles perspectives thérapeutiques. Virologie 22, 55–66. https://doi.org/10.1684/vir.2018.0716

Villanueva, A., 2019. Hepatocellular Carcinoma. N. Engl. J. Med. 380, 1450–1462. https://doi.org/10.1056/NEJMra1713263

Wang, J., Du, M., Huang, H., Chen, R., Niu, J., Jiang, J., Zhuang, H., Lu, F., 2017. Reply to: "Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity." J. Hepatol. 66, 462–463. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.034

Wang, J., Shen, T., Huang, X., Kumar, G.R., Chen, X., Zeng, Z., Zhang, R., Chen, R., Li, T., Zhang, T., Yuan, Q., Li, P.-C., Huang, Q., Colonno, R., Jia, J., Hou, J., McCrae, M.A., Gao, Z., Ren, H., Xia, N., Zhuang, H., Lu, F., 2016. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. J. Hepatol. 65, 700–710. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.029

Wang, J., Yu, Y., Li, G., Shen, C., Li, J., Chen, S., Zhang, X., Zhu, M., Zheng, J., Song, Z., Wu, J., Shao, L., Meng, Z., Wang, X., Huang, Y., Zhang, J., Qiu, C., Zhang, W., 2018. Natural history of serum HBV-RNA in chronic HBV infection. J. Viral Hepat. 25, 1038–1047. https://doi.org/10.1111/jvh.12908

Wettengel, J.M., Burwitz, B.J., 2020. Innovative HBV Animal Models Based on the Entry Receptor NTCP. Viruses 12, 828. https://doi.org/10.3390/v12080828

Wi, J., Jeong, M.S., Hong, H.J., 2017. Construction and Characterization of an Anti-Hepatitis B Virus preS1 Humanized Antibody that Binds to the Essential Receptor Binding Site. J. Microbiol. Biotechnol. 27, 1336–1344. https://doi.org/10.4014/jmb.1703.03066

Wieland, S.F., 2015. The Chimpanzee Model for Hepatitis B Virus Infection. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 5, a021469–a021469. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021469

Wieland, S.F., Eustaquio, A., Whitten-Bauer, C., Boyd, B., Chisari, F.V., 2005. Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 9913–9917. https://doi.org/10.1073/pnas.0504273102

Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Williams, R.W., Steven, A.C., 1995. Hepatitis Core Antigen Produced in Escherichia coli: Subunit Composition, Conformation Analysis, and in

Vitro Capsid Assembly. Biochemistry 34, 4919–4932. https://doi.org/10.1021/bi00015a003

Wong, G.L.-H., Chan, H.L.-Y., Mak, C.W.-H., Lee, S.K.-Y., Ip, Z.M.-Y., Lam, A.T.-H., Iu, H.W.-H., Leung, J.M.-S., Lai, J.W.-Y., Lo, A.O.-S., Chan, H.-Y., Wong, V.W.-S., 2013. Entecavir treatment reduces hepatic events and deaths in chronic hepatitis B patients With liver cirrhosis. Hepatology 58, 1537–1547. https://doi.org/10.1002/hep.26301

Wooddell, C.I., Yuen, M.-F., Chan, H.L.-Y., Gish, R.G., Locarnini, S.A., Chavez, D., Ferrari, C., Given, B.D., Hamilton, J., Kanner, S.B., Lai, C.-L., Lau, J.Y.N., Schluep, T., Xu, Z., Lanford, R.E., Lewis, D.L., 2017. RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. Sci. Transl. Med. 9, eaan0241. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan0241

Wykes, M.N., Lewin, S.R., 2018. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. Nat. Rev. Immunol. 18, 91–104. https://doi.org/10.1038/nri.2017.112

Xia, Y., Cheng, X., Blossey, C.K., Wisskirchen, K., Esser, K., Protzer, U., 2017. Secreted Interferon-Inducible Factors Restrict Hepatitis B and C Virus Entry In Vitro. J. Immunol. Res. 2017, 1–12. https://doi.org/10.1155/2017/4828936

Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., Li, W., 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. eLife 1. https://doi.org/10.7554/eLife.00049

Yang, H.-C., Tsou, H.-H., Pei, S.-N., Chang, C.-S., Chen, J.-H., Yao, M., Lin, S.-J., Lin, J., Yuan, Q., Xia, N., Liu, T.-W., Chen, P.-J., Cheng, A.-L., Hsu, C., 2018. Quantification of HBV core antibodies may help predict HBV reactivation in patients with lymphoma and resolved HBV infection. J. Hepatol. 69, 286–292. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.033

Yip, T.C.-F., Wong, G.L.-H., Chan, H.L.-Y., Tse, Y.-K., Lam, K.L.-Y., Lui, G.C.-Y., Wong, V.W.-S., 2019. HBsAg seroclearance further reduces hepatocellular carcinoma risk after complete viral suppression with nucleos(t)ide analogues. J. Hepatol. 70, 361–370. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.014

Yuan, Q., Song, L.-W., Cavallone, D., Moriconi, F., Cherubini, B., Colombatto, P., Oliveri, F., Coco, B.A., Ricco, G., Bonino, F., Shih, J.W.K., Xia, N.-S., Brunetto, M.R., 2015. Total Hepatitis B Core Antigen Antibody, a Quantitative Non-Invasive Marker of Hepatitis B Virus Induced Liver Disease. PLOS ONE 10, e0130209. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130209

Yuan, Q., Song, L.-W., Liu, C.-J., Li, Z., Liu, P.-G., Huang, C.-H., Yan, Y., Ge, S.-X., Wang, Y.-B., Peng, C.-Y., Zhang, J., Kao, J.-H., Chen, D.-S., Chen, P.-J., Xia, N.-S., 2013. Quantitative hepatitis B core antibody level may help predict treatment response in chronic hepatitis B patients. Gut 62, 182.2-184. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302656

Yuen, M.F., Gane, E.J., Kim, D.J., Weilert, F., Yuen Chan, H.L., Lalezari, J., Hwang, S.G., Nguyen, T., Flores, O., Hartman, G., Liaw, S., Lenz, O., Kakuda, T.N., Talloen, W., Schwabe, C., Klumpp, K., Brown, N., 2019. Antiviral Activity, Safety, and Pharmacokinetics of Capsid Assembly Modulator NVR 3-778 in Patients with Chronic HBV Infection. Gastroenterology 156, 1392-1403.e7. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.023

Zhao, Q., Hu, Z., Cheng, J., Wu, S., Luo, Y., Chang, J., Hu, J., Guo, J.-T., 2018. Hepatitis B Virus Core Protein Dephosphorylation Occurs during Pregenomic RNA Encapsidation. J. Virol. 92. https://doi.org/10.1128/JVI.02139-17

Zhou, J., Kondylis, P., Haywood, D.G., Harms, Z.D., Lee, L.S., Zlotnick, A., Jacobson, S.C., 2018. Characterization of Virus Capsids and Their Assembly Intermediates by Multicycle Resistive-Pulse Sensing with Four Pores in Series. Anal. Chem. 90, 7267–7274. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00452

Zhou, K., Wahed, A.S., Cooper, S., Di Bisceglie, A.M., Fontana, R.J., Ghany, M.G., Khalili, M., Lok, A.S., Perrillo, R., Lee, W.M., Lau, D.T.Y., Sterling, R., Janssen, H.L.A., Terrault, N.A., 2019. Phase Transition Is Infrequent Among North American Adults With e-Antigen-Negative Chronic Hepatitis B and Low-Level Viremia: Am. J. Gastroenterol. 114, 1753–1763. https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000400

Zlotnick, A., Cheng, N., Conway, J.F., Booy, F.P., Steven, A.C., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., 1996. Dimorphism of Hepatitis B Virus Capsids Is Strongly Influenced by the C-Terminus of the Capsid Protein. Biochemistry 35, 7412–7421. https://doi.org/10.1021/bi9604800

Zlotnick, A., Venkatakrishnan, B., Tan, Z., Lewellyn, E., Turner, W., Francis, S., 2015. Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. Antiviral Res. 121, 82–93. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.020

Zoulim, F., Lenz, O., Vandenbossche, J.J., Talloen, W., Verbinnen, T., Moscalu, I., Streinu-Cercel, A., Bourgeois, S., Buti, M., Crespo, J., Manuel Pascasio, J., Sarrazin, C., Vanwolleghem, T., Shukla, U., Fry, J., Yogaratnam, J.Z., 2020. JNJ-56136379, an HBV Capsid Assembly Modulator, Is Well-Tolerated and Has Antiviral Activity in a Phase 1 Study of Patients With Chronic Infection. Gastroenterology 159, 521-533.e9. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.036

Zoulim, F., Saputelli, J., Seeger, C., 1994. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. J. Virol. 68, 2026–2030. https://doi.org/10.1128/JVI.68.3.2026-2030.1994

ANNNEXES

Annexe 1 : Effet du traitement à la DNase ou à la RNase sur la quantification de l'ADN et de l'ARN-VHB

Effet du traitement DNase sur les extraits de cellules HepG2.2.15

Les extraits de cellules issues de culture d'HepG2.2.15 ont été traités avec la DNase I (Promega) ± TURBO DNase (Invitrogen) pendant 30 minutes à 37°C, selon les recommandations du fabricant. Des contrôles sans DNase ont été effectués en parallèle. Les extraits traités ou non à la DNase ont été utilisés extemporanément pour la quantification de l'ADN et de l'ARN-VHB (Tableau S1).

Tableau S1: Valeurs de ct (cycle threshold) obtenues, avec ou sans traitement DNase I ± TURBO DNase des extraits, en ARN-VHB et en ADN-VHB de cellules d'HepG2.2.15

	DNase I	TURBO DNase	ADN-VHB (ct)	ARN-VHB (ct)
Extrait de cellules HepG2.2.15	-	-	22	**19**
	- (tampon 30' ; 37°C sans enzyme)	- (tampon 30' ; 37°C sans enzyme)	22	**19**
	+	-	**36**	**19**
	-	+	**Non amplifiable**	**19**
	+	+	**Non amplifiable**	**20**

Conclusion:

- Traitement à la DNase I insuffisant pour se débarrasser de l'ADN-VHB
- Traitement à la TURBO DNase efficace pour se débarrasser de l'ADN-VHB
- Pas d'effet de la DNase I ou TURBO DNase sur la quantification de l'ARN-VHB

Effet du traitement RNase sur les extraits des plasmas utilisés dans nos expériences.

Les extraits des plasmas utilisés dans nos expériences ont été traités avec la RNase A (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA) à la concentration de 1000 ng/µL pendant 30 minutes à 37°C. Un contrôle sans RNase a été effectué en parallèle. Les extraits traités ou non à la RNase ont été utilisés extemporanément pour la quantification de l'ADN et de l'ARN-VHB (Tableau S2).

Tableau S2: Valeurs de ct (cycle threshold) obtenues avec ou sans traitement RNase des extraits en ARN-VHB et en ADN-VHB pour les plasmas

Extrait Plasma	RNase	ARN-VHB (ct)	ADN-VHB (ct)
B7195	-	21	13
B7195	+	36	14
B7505	-	23	13
B7505	+	37	14
B7207	-	23	15
B7207	+	37	15
B7686	-	34	21
B7686	+	Non détecté	21

Conclusion:

- Pas d'effet de la RNase sur la quantification de l'ADN-VHB
- Diminution très significative de l'ARN-VHB après traitement par la RNase

Annexe 2 : Séparation des formes virales en gradients de vélocité à partir de surnageant de culture d'HepG2.2.15

Des gradients de vélocité ont été réalisés avec des surnageants de culture d'HepG2.2.15 arrivées à confluence, en présence ou en absence de détergent. Les profils obtenus sont présentés dans la figure S1 ci-dessous. Le nombre de particules virales complètes dans la fraction la plus riche en ADN a été calculé. Les résultats sont présentés dans le tableau S3 ci-dessous.

Figure S1: Profils de séparation obtenus en gradients de vélocité à partir de surnageant de culture d'HepG2.2.15 (sans et avec traitement en amont par un détergent).

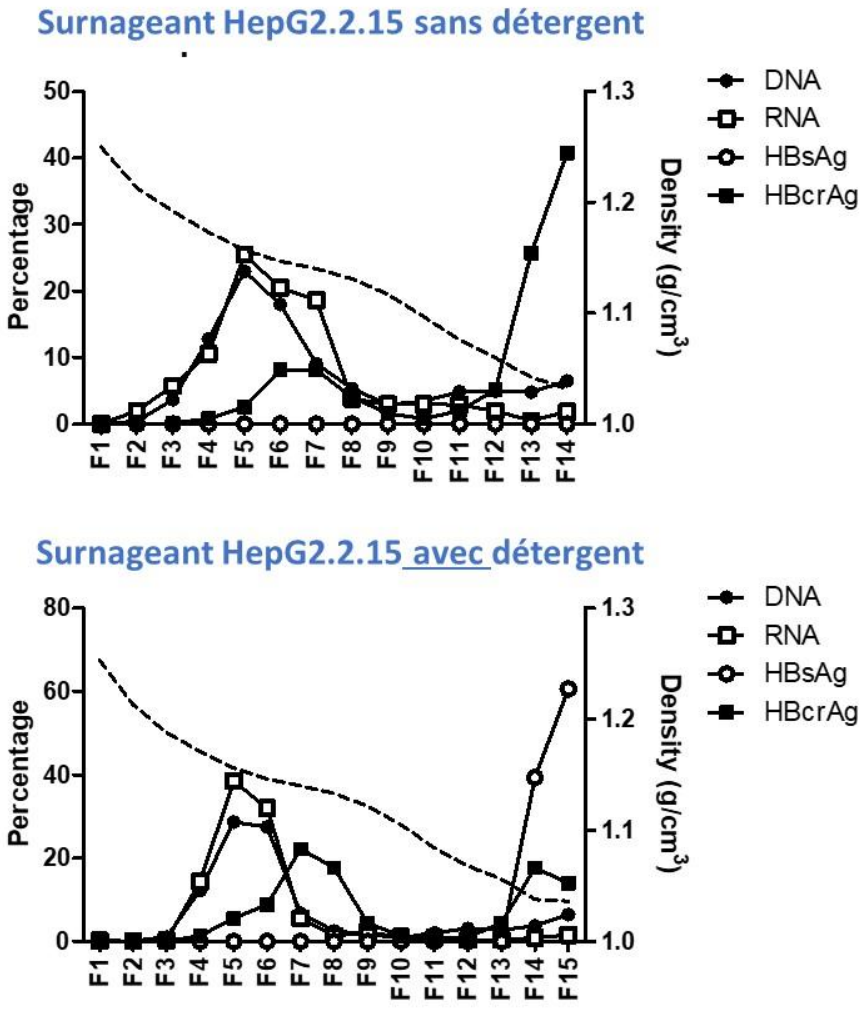


Tableau S3: Nombre de VP estimé dans la fraction la plus riche en ADN selon les concentrations d'ADN (VP_{ADN}) **ou d'HBcrAg** (VP_{HBc}) **mesurées pour le surnageant d'HepG2.2.15 après séparation en gradient de vélocité**

Surnageant HepG2.2.15 (sans détergent)	**VP_{ADN} Nombre/ fraction selon [ADN]**	**VP_{HBc} Nombre/ fraction selon [HBc]**	**VP_{HBc}/VP_{DNA}**
Fraction riche en ADN : fraction 5	2,54E+06	1,13E+08	**44**

<u>Conclusion:</u>

- **Profil de séparation en gradient de vélocité avec la matrice surnageant différent de celui observé avec les plasmas.**
- **Prédominance de capsides non enveloppées sans génome (peu d'effet du détergent dans les fractions inférieures)**

Annexe 3 : Article sur l'utilisation combinée des DBS et d'un système moléculaire à rendu rapide de détection de l'ADN-VHB

Journal of Virological Methods 283 (2020) 113908

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Short communication

Combined use of dried blood spot and rapid molecular systems: A robust solution to monitor hepatitis B virus infection with potential for resource-limited countries

Pauline Bargain[a], Christopher Heslan[b], Vincent Thibault[a,*], Charlotte Pronier[a]

[a] Univ Rennes, Department of Virology, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail), UMR_S 1085, F-35000, Rennes, France
[b] Univ Rennes, Department of Virology, CHU Rennes, F-35000, Rennes, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Viral load
Standardization
Sensitivity
DBS testing

ABSTRACT

Chronic hepatitis B (CHB) particularly affects resource-limited countries. CHB management in these areas faces many obstacles for optimal care of patients, including poor access to HBV-DNA quantification, a key marker. This study aims to evaluate the quantification of HBV-DNA on dried blood spots (DBS) using rapid, standardized and fully automated on-demand systems. After a simple and rapid DBS elution protocol, HBV-DNA was simply and accurately quantified on this matrix using two different systems. Limit of quantification was estimated at 400 IU/mL. DBS and plasma HBV-DNA quantification provided comparable results. HBV-DNA stability for up to one month was demonstrated on DBS stored at room temperature, a condition compatible for preservation or transport before analysis. The combined use of DBS and commercially available automated molecular on-demand systems for HBV-DNA quantification could represent a reliable alternative in resource-limited countries to reach remote populations. The good sensitivity of this approach makes it attractive for mother-to-child transmission prevention, treatment decision and follow-up. Costs can be limited if such systems are also validated for other molecular markers.

Despite an effective vaccine, over 257 million people are chronically infected with the hepatitis B virus (HBV) worldwide. Resource-limited countries, particularly in African and Western Pacific regions, are exposed to specific situations regarding HBV infection: high prevalence, insufficient vaccination coverage and limited access to prevention, screening, monitoring and treatment. The treatment guidelines for the management of chronic hepatitis B (CHB) take into account clinical and biological criteria, ideally including HBV-DNA measurement in plasma World Health Organization, 2017. Unfortunately, resource-limited countries have currently limited access to this key marker in diagnosing and monitoring HBV infection. Dried blood spots (DBS) seem a practical alternative to plasma, the gold standard matrix. Several previous studies comparing HBV viral loads (VL) in plasma and DBS have used various methodologies, highlighting a large heterogeneity in DBS preparation and elution protocols and making comparison between each study difficult. Indeed, samples consisted of either fingertip or venipuncture, collected blood volume ranged from 20 to 100 µL, number of tested spots of different diameters varied and the elution processes used diverse buffers with or without a heating step. Likewise, these publications report various nucleic acid extraction processes and amplification strategies based on in-house or commercial molecular assays. Most of these methods have shown a significant loss of HBV-DNA quantification in DBS compared to plasma, from -1.59 to -0.59 $\log_{10}$ IU/mL, suggesting a poor yield of these protocols Lange et al., 2017. New systems for VL quantification, integrating sample loading, nucleic acid extraction, reaction preparation, real-time PCR and result interpretation are now available worldwide. These random access systems allow continuous and homogeneous processing of samples and reduce both hands-on and turnaround times. This study aims to evaluate the quantification of HBV-DNA on DBS using rapid, fully automated, on-demand systems Uceda et al., 2019.

HBV-free whole blood (WB) was spiked with HBV positive plasmas and serial 1:10 dilutions were performed in HBV-free blood to obtain an HBV-DNA range of 0.26–8.74 log IU/mL. DBS were prepared by deposition of 50 µL per spot of each dilution, either on a five-spots Whatman® protein saver card (Sigma-Aldrich, Copenhagen, Denmark) or on a pre-cut Munktell TFN card (Ahlstrom-Munksjö, Helsinki, Finland). Eluates were obtained by incubation of 2 spots (100 µL of WB)

* Corresponding author at: Virology, CHU Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux, 35000, Rennes, France.
E-mail address: vincent.thibault@chu-rennes.fr (V. Thibault).

https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113908
Received 3 January 2020; Received in revised form 3 June 2020; Accepted 3 June 2020
Available online 06 June 2020
0166-0934/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/).

into 2 mL of phosphate buffered saline (PBS) under constant agitation for 2 h at room temperature (RT).

HBV-DNA was quantified using first DxN VERIS Molecular Diagnostics System (Beckman Coulter, Villepinte, France) and then Xpert GeneXpert System (Cepheid, Maurens-Scopont, France) HBV VL assays. Both assays lower limit of quantification (LLQ) on plasma samples is 10 IU/mL. Because none of these two assays includes a dedicated DBS protocol, the DBS eluates were analysed as recommended for plasma. Raw DBS-VL were multiplied by 40 to take into account the elution of two spots corresponding to 100 µL of WB, *i.e.* 50 µL of plasma by assuming a haematocrit value of 50 %, in 2 mL of PBS. As plasma and eluted DBS were then processed in a similar manner, no further correction factor was required to obtain the final result. Thus, the theoretical LLQ on DBS was calculated at 400 IU/mL (2.60 $\log_{10}$ IU/mL).

R^2 (Pearson correlation squared) was used to assess the correlation strength between quantification methods or between matrices. Bland-Altman analysis was used to document the agreement and the average difference between both quantitative methods or between both matrices. Statistical analyses were performed using GraphPad Software (Version 5.03, GraphPad Software, Inc).

A proof of concept emerged from a preliminary work performed on DxN VERIS showing that HBV-DNA measured on Whatman® protein saver card DBS, stored for 12 days at −80 °C was highly correlated to values obtained on plasma ($R^2 = 0.99$; $P < 0.0001$, data not shown). The Bland-Altman analysis indicated a mean difference measurement (DBS-plasma) of +0.31 $\log_{10}$ IU/mL in favour of DBS. However, false positive results suggested potential specificity concerns that were attributed to possible cross-sample contamination at the step of DBS puncture, despite thorough decontamination of the hole-punch apparatus between successive punches. Indeed, two out of the 6 negative controls, consisting of blank spots obtained by multiple punching of a clean unused card between each dilution, generated a low positive signal regardless of the virus load applied onto the previous spot. Robust quantification of HBV-DNA on DBS was then confirmed on precut Munktell TFN cards stored up to 14 days at RT, a condition closer to real situations. The contamination observed related to the DBS cutting system is concerning and has not been often reported for HBV. With high replication values in hepatitis B chronic carriers, this is certainly a preoccupying matter. A solution to avoid this major issue may solely be to use precut spots. This approach avoids using a puncher, the likely source of cross-contamination, thereby leading to better specificity. A similar difference measurement of +0.09 $\log_{10}$ IU/mL in favour of DBS between the two matrices (DBS-plasma) was found. Stability of HBV viral load on DBS was assessed by analysis with the VERIS HBV assay of DBS obtained from three patient's samples corresponding to 3 different viral loads (2.11, 3.14 and 5.50 $\log_{10}$ IU/mL) (Table 1). No clinically significant difference was found between the DBS analysed at 7 or 14 days and stored at room temperature or at −80 °C. These encouraging results prompted us to test the same approach using the simple worldwide available GeneXpert integrated system (Uceda et al., 2019).

In order to first compare HBV-DNA quantification with both Xpert and VERIS assays, ten HBV-infected patient plasmas were analysed in parallel on both systems. Obtained HBV-DNA loads ranged from 1.73 to 8.51 and 1.89–8.73 $\log_{10}$ IU/mL on the VERIS and the Xpert, respectively. One of the lowest plasma VL quantified by VERIS at 1.74 $\log_{10}$ IU/mL was not detected by Xpert. The Bland-Altman analysis showed a mean difference between the two assays (Xpert-VERIS) of +0.28 $\log_{10}$ IU/mL in favour of the Xpert assay. The extraction process may largely influence one method lower limit of detection. For all-in-one approaches such as Xpert cartridge or VERIS, each step (extraction and amplification) cannot be individualized. It is therefore difficult to analyze the specific reason why one assay would perform better than the other. Although 0.28 $\log_{10}$ IU/mL cannot be considered significant, this difference could potentially be attributable to the extraction protocol.

Then, to compare DBS *vs* plasma HBV-DNA quantification using the Xpert assay, eight paired plasma and DBS (Munktell TFN card), these last ones stored for 7 days at RT and obtained from positive sample serial dilutions were analysed with the Xpert HBV VL kit. One DBS corresponding to a theoretical plasma VL of 0.69 $\log_{10}$ IU/mL gave a positive signal (detected < 10 IU/mL without correction factor) below the theoretical LLQ on DBS (< 2.60 $\log_{10}$ IU/mL) corresponding to the claimed LLQ times 40, to take into account the DBS dilution factor. Linear regression performed on all dilution values showed a strong correlation between the two matrices ($R^2 = 0.99$; $P < 0.0001$) (Fig. 1A). The Bland-Altman analysis indicated a mean difference between the two matrices (DBS-plasma) equal to 0.07 $\log_{10}$ IU/mL. All quantitative results were within the limits of agreement (mean ± 2SD: -0.35 to 0.49 $\log_{10}$ IU/mL) (Fig. 1B). Quantification of HBV DNA from DBS stored for 31 days at RT did not differ whatever the VL level, with a mean difference d31-d7 = 0.07 $\log_{10}$ IU/mL (Table 1).

There is a need for more trustworthy, standardized methods for specimen preparation, storage and processing to provide reliable HBV-DNA quantification from DBS. Our study confirms previous results obtained on the DxN VERIS system in our lab for HBV-DNA quantification from DBS. After a simple and rapid elution protocol, HBV-DNA could accurately be quantified on DBS with the fully automated Xpert HBV VL assay. Interestingly, despite a lower limit of quantification estimated around 400 IU/mL on DBS and inherent to the sample and elution volumes, no significant loss of HBV-DNA quantification between DBS and plasma was observed contrary to previous published studies (Lange et al., 2017). This interesting point could be explained by the limited pre-analytical steps and the use of optimised fully automated

Table 1
Effect of DBS storage conditions and durations: Quantification of HBV-DNA on plasma and DBS on Munktell TFN paper after 7, 14 or 31 days under different storage conditions.

Sample	Sample dilution	HBV Assay	HBV-DNA Plasma $\log_{10}$ IU/mL)	HBV-DNA DBS ($\log_{10}$ IU/mL)				
				Room temperature			Frozen (−80 °C)	
				Storage time (day)				
				7	14	31	7	14
# 1	**No**	**VERIS**	2.11	3.25	3.26	NT	3.28	3.30
# 2	**No**	**VERIS**	3.14	3.79	3.93	NT	3.81	3.88
# 3	**No**	**VERIS**	5.50	5.41	5.43	NT	5.47	5.50
# 4	**No**	**Xpert**	7.55	7.49	NT	7.54	NT	NT
	10^{-2}	**Xpert**	5.55	5.51	NT	5.51	NT	NT
	10^{-3}	**Xpert**	4.68	4.42	NT	4.46	NT	NT
	10^{-4}	**Xpert**	3.75	3.64	NT	3.69	NT	NT
	10^{-5}	**Xpert**	2.55	2.75	NT	2.83	NT	NT

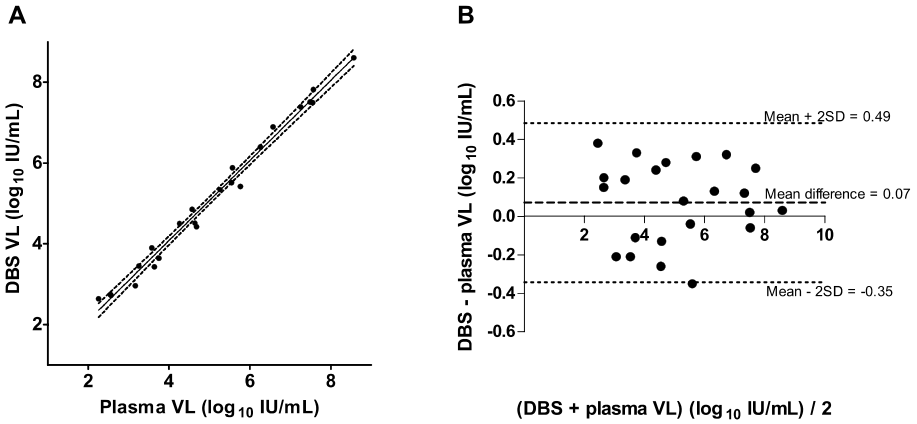


Fig. 1. Comparison of HBV-DNA quantification by Xpert HBV Viral Load assay on DBS and plasma. (A) Linear regression, (B) Bland-Altman analysis. VL, viral load.

systems. Indeed, the main works published on HBV-VL measurement from DBS report an under-quantification of HBV-DNA between -1.59 log IU/mL to -0.59 log IU/mL compared to plasma, whatever the processing analytical steps and the in-house or commercial used protocols. In addition, our study confirms HBV-DNA stability on DBS stored at RT for up to 31 days (Jackson et al., 2019). These results, while promising, certainly need confirmation on larger studies.

The combined use of DBS on an automated molecular test such as the Xpert HBV assay may sound contradictory since they both represent alternative solutions to follow remote HBV infected patients with no access to specialized laboratories. However, in a study assessing the use of GeneXpert systems for different markers, Ndlovu and colleagues pointed out that the lack of efficient blood sample transport networks increases the need for technologies such as point of care (POC) testing that can be performed on DBS samples (Ndlovu et al., 2018). Cepheid through the HIV-1 Qual Assay performed on the GeneXpert has already developed a test suitable for the use of DBS, however such approach is not available for HBV-DNA. Performing HBV-DNA quantification on a worldwide established system could drastically decreases the turn-around time compared to current methods requiring the shipment of DBS to larger cities, other countries and sometimes even other continents for analysis by an automated or low-cost PCR. Shortening the time to deliver results may also prove beneficial to rapidly initiate maternal antiviral prophylaxis in mother with high replication level, therefore limiting new cases of mother-to-child transmission of HBV or to identify and follow-up patients who need treatment (Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) et al., 2016). In the proposed concept of the study, the Cepheid assay should not be perceived as a POC test but rather as a well-calibrated unitary system that can be used in remote areas and for samples shipped in suboptimal conditions in low-income countries. Our approach should certainly not be perceived as what is done for hepatitis C with the Xpert HCV Viral Load Finger-Stick solution where a rapid turn-around-time is useful to avoid loss of care (test and treat concept). For this reason, we do not believe the DBS elution time should be seen as a limiting factor. Indeed, the turn-around-time may reach 4 h following our protocol but shorter elution times could be tested. We believe Cepheid should be able to provide soon a finger-stick solution for HepB even though a rapid access to the result is not as critical as for HepC.

Using DBS and an automated molecular system opens the door to the possibility of a combined follow-up of HIV, HBV and HCV for the same patient if required. It can particularly be relevant in Sub-Saharan Africa where the burden of HBV co-infection among people living with HIV has been estimated at 2.6 million people (Platt et al., 2019).

To our knowledge, there has been no report describing the combined use of DBS and rapid, fully automated molecular system for HBV-DNA quantification. Such strategy could overcome encountered difficulties in resource-limited countries, where easy-to-use solutions are sometimes already implemented but not attainable to remote patients. In this proof of concept study, we mostly had access to artificially spiked samples. These encouraging results may help other investigators in the field to confirm and strengthen our findings on clinical samples and to validate the relevance of such approach for HBV-infected patient care.

Credit author statement

Combined use of dried blood spot and rapid molecular systems: a robust solution to monitor hepatitis B virus infection with potential for resource-limited countries

Pauline BARGAIN, Christopher HESLAN, Vincent THIBAULT, Charlotte PRONIER

CRediT authorship contribution statement

Pauline Bargain: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Christopher Heslan:** Methodology, Validation, Investigation, Resources, Visualization. **Vincent Thibault:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision. **Charlotte Pronier:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgment

Authors are indebted to Dr Syria Laperche (INTS, Paris, France) for providing hepatitis B infected calibrated biological material.

References

Jackson, K., Holgate, T., Tekoaua, R., Nicholson, S., Littlejohn, M., Locarnini, S., 2019. Evaluation of dried blood spots for hepatitis B and D serology and nucleic acid testing. J. Med. Virol. https://doi.org/10.1002/jmv.25485. Published online April 12, 2019.

Lange, B., Roberts, T., Cohn, J., et al., 2017. Diagnostic accuracy of detection and quantification of HBV-DNA and HCV-RNA using dried blood spot (DBS) samples – a systematic review and meta-analysis. BMC Infect. Dis. 17 (Suppl 1). https://doi.org/10.1186/s12879-017-2776-z.

Ndlovu, Z., Fajardo, E., Mbofana, E., et al., 2018. Multidisease testing for HIV and TB

using the GeneXpert platform: a feasibility study in rural Zimbabwe. Yotebieng M, ed. PLoS One 13 (3), e0193577. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193577.

Platt, L., French, C.E., McGowan, C.R., et al., 2019. Prevalence and burden of HBV co-infection among people living with HIV: a global systematic review and meta-analysis. J. Viral Hepat. https://doi.org/10.1111/jvh.13217. Published online October 11, 2019.

Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM), Dionne-Odom, J., Tita, A.T.N., Silverman, N.S., 2016. #38: hepatitis B in pregnancy screening, treatment, and prevention of vertical transmission. Am. J. Obstet. Gynecol. 214 (1), 6–14. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.09.100.

Uceda, S., Greco, L., Loglio, A., Lunghi, G., Lampertico, P., 2019. THU-221-Xpert HBV VL, simplifying HBV viral load testing and disease management. J. Hepatol. 70 (1), e262. https://doi.org/10.1016/S0618-8278(19)30494-3.

World Health Organization, 2017. World Health Organization, Global Hepatitis Programme. Accessed August 8, 2018. Global Hepatitis Report, pp. 2017. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1.

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Titre : **Formes circulantes du virus de l'hépatite B et nouveaux marqueurs viraux.**

Mots clés : particules virales ; gradient ; HBcrAg ; ARN-VHB ; AgHBs ultrasensible

Résumé : L'hépatite B chronique demeure un problème de santé public majeur. Les connaissances sur la morphogenèse complexe du virus de l'hépatite B (VHB) ne cessent d'évoluer depuis sa découverte. Les marqueurs virologiques classiques utilisés en pratique clinique ne sont que partiellement informatifs pour le diagnostic et le suivi des patients. Des marqueurs émergents sont proposés dont l'utilité clinique est à l'étude. Nos travaux de recherche se sont attachés à développer un système pour étudier les différentes formes virales circulantes au niveau plasmatique, en fonction du génotype et du statut vis-à-vis de l'AgHBe. En parallèle, nous avons étudié l'apport des nouveaux marqueurs tels que l'AgHBs ultrasensible, l'HBcrAg, et l'ARN-VHB dans différentes situations cliniques. Les résultats confirment la présence de particules enveloppées contenant de l'ARN dans les plasmas et révèlent une circulation abondante de capsides sans acide nucléique enveloppées avec ou sans protéines HBs selon le statut de l'AgHBe. Concernant l'étude des marqueurs viraux, l'utilisation d'un test AgHBs dit ultrasensible, sur des échantillons initialement testés négatifs par les tests AgHBs courants, a conduit à un changement d'interprétation du profil sérologique dans près d'un quart des cas. Les marqueurs HBcrAg et ARN-VHB, testés sur le prélèvement à l'inclusion dans la cohorte CirVir, ne semblent pas prédictifs de la survenue d'un évènement clinique. En alliant une approche novatrice et des tests standardisés, ce travail a permis de mieux caractériser les formes virales et les nouveaux marqueurs dont le rôle et l'impact clinique restent à déterminer.

Title : **Circulating hepatitis B virus forms and new viral markers.**

Keywords : viral particles; gradient ; HBcrAg ; HBV-RNA; ultrasensitive HBsAg

Abstract: Chronic hepatitis B remains a major public health problem. Knowledge about the complex morphogenesis of hepatitis B virus (HBV) has been evolving since its discovery. Classical viral markers used in clinical practice for the diagnosis and management of patients are only partially informative. New viral markers are being proposed and their clinical utility is under investigation. We focused on developing a system to study the different viral forms circulating in patient plasma according to the genotype and HBeAg status. In parallel, we studied the contribution of new markers such as ultrasensitive HBsAg, HBcrAg, and HBV-RNA in different clinical settings. The results confirm the presence of enveloped RNA-containing particles in plasmas and reveal an abundant circulation of genome-free capsids enveloped with or without HBs proteins depending on the HBeAg status. Concerning viral markers, the use of an ultrasensitive HBsAg assay on samples previously identified as HBsAg negative with conventional assays led to a change of the serological profile interpretation in nearly a quarter of the cases. HBcrAg and HBV-RNA tested on samples at inclusion in the CirVir cohort seem not predictive of a clinical event. This work allowed to characterize HBV particles and markers whose roles and clinical impact remain to be determined.