

Progrès récents dans la compréhension et le diagnostic de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B

Slim Fourati^{1,2}

Jean-Michel Pawlotsky^{1,2}

¹ Université Paris Est,
Hôpital Henri-Mondor,
Centre national de référence
des hépatites virales B, C et delta,
Service de virologie,
51, avenue du M^{al}-de-Lattre de Tassigny,
94010 Créteil, France

² Inserm U955,
51, avenue du M^{al}-de-Lattre de Tassigny,
94010 Créteil, France
<slim.fourati@aphp.fr>

Résumé. Le virus de l'hépatite B (VHB) infecte environ 257 millions d'individus dans le monde. Dans cette revue, sont présentées les avancées récentes de la virologie clinique de l'infection par le VHB et une nouvelle classification de l'histoire naturelle de l'infection chronique par ce virus proposée par la Société européenne pour l'étude du foie (EASL) en 2017. Plusieurs nouveaux outils diagnostiques et de surveillance sont maintenant disponibles, notamment des tests de diagnostic rapide pour la détection de l'antigène de surface du VHB (AgHBs), des tests de quantification de l'AgHBs, un test de quantification de l'antigène lié au core du VHB (*hepatitis B core-related antigen* [HBcrAg]) et des outils de détection et de quantification des ARN du VHB. Leur utilité clinique, encore à l'étude, est discutée dans cette revue.

Mots clés : hépatite B, quantification de l'AgHBs, ARN du VHB, HBcrAg

Abstract. Hepatitis B virus (HBV) infects approximately 257 million individuals worldwide. Recent advances in the virology and diagnosis of HBV infection are summarized in this review article. A novel classification of the different phases of chronic HBV infection, proposed by the European Association for the Study of the Liver (EASL), is presented. New diagnostic and monitoring tools are now available, including rapid diagnostic tests for hepatitis B surface antigen (HBsAg) detection, HBsAg quantification assays, an *HBV core-related antigen* (HBcrAg) quantification test, and HBV RNA quantification testing. Their clinical utility under study is discussed in this review.

Key words: hepatitis B, HBV RNA, HBcrAg, HBsAg quantification

Introduction

Le virus de l'hépatite B (VHB) est responsable de la plus fréquente des hépatopathies chroniques d'origine infectieuse, touchant aujourd'hui environ 257 millions d'individus dans le monde [1-3]. L'hépatite chronique B peut être mortelle si elle évolue vers la décompensation d'une cirrhose ou la survenue d'un carcinome hépatocellulaires (CHC). La mortalité liée aux infections par le VHB a augmenté de 33 % entre 1990 et 2013, atteignant plus de 686 000 décès en 2013 [4]. La plupart des nouvelles infections par le VHB survient dans les régions de forte endémicité, principalement la Chine, l'Asie du Sud-Est et l'Afrique subsaharienne [3]. Le virus peut se transmettre de

la mère à l'enfant en période périnatale, par voie sexuelle, nosocomiale ou sanguine, par exemple lors d'un contact de sang infecté avec une plaie ou une muqueuse, ou lors de l'utilisation partagée de matériel de préparation, d'injection ou d'inhalation contaminée.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs facteurs ont modifié l'épidémiologie mondiale du VHB, notamment les migrations massives de populations originaires de zones d'endémicité élevée vers les pays de l'hémisphère Nord, mais aussi les stratégies de prévention incluant les politiques de dépistage et d'éducation des populations cibles et l'extension de la vaccination [5]. Les campagnes de vaccination prophylactique et l'amélioration globale des conditions socioéconomiques dans les zones de forte endémicité ont permis une baisse lente de la prévalence du portage de l'antigène de surface du VHB (AgHBs), malgré l'augmentation du nombre absolu de sujets infectés

résultant de la croissance de la population mondiale (le nombre absolu de porteurs chroniques du VHB dans le monde a été estimé à 233 millions en 1990, 248 millions en 2010 et 257 millions en 2016) [1, 6].

L'histoire naturelle de l'infection par le VHB est un processus dynamique qui reflète les interactions entre le virus et les réponses immunitaires innées et adaptatives de l'hôte. L'infection par le VHB évolue vers la chronicité dans environ 95 % des cas lorsque la transmission se fait de la mère à l'enfant en période périnatale ; l'incidence de l'évolution chronique diminue progressivement pour atteindre moins de 1 % lorsque l'infection survient à l'âge adulte [7]. En effet, lorsque le sujet est infecté à l'âge adulte, les réponses immunitaires innées et adaptatives sont dans la très grande majorité des cas précoces, efficaces et entraînent l'élimination de l'infection en quelques semaines, habituellement associée à une inflammation hépatique (hépatite aiguë) régressive [8]. En revanche, les porteurs chroniques du VHB présentent des réponses immunitaires contre le virus qualitativement et quantitativement altérées [9].

La compréhension des aspects virologiques et immunopathologiques de l'infection par le VHB a progressé de façon considérable au cours des dernières années [5]. Dans cet article, nous discuterons les avancées les plus pertinentes en matière de virologie du VHB, la nouvelle classification de l'histoire naturelle de l'infection proposée par l'Association européenne pour l'étude du foie (EASL) en 2017 [10] et les nouveaux outils virologiques utilisés pour dépister et diagnostiquer l'infection et pour optimiser la prise en charge des patients atteints d'hépatite B chronique.

Actualités et progrès dans la compréhension de la virologie du VHB

Nouvelles découvertes dans la virologie du VHB

Le VHB appartient à la famille des *Hepadnaviridae*. Le génome du virus est présent dans la particule virale (particule de Dane) sous la forme d'un ADN circulaire partiellement double brin d'environ 3 200 paires de bases contenu dans une capsidie icosaédrique, elle-même située à l'intérieur d'une enveloppe lipidique exposant les protéines de surface du virus.

Cycle de réplication du VHB

Le cycle viral débute par l'attachement non spécifique de la particule virale aux protéoglycanes de type héparanes sulfates (HSPG). Celui-ci permet la liaison spécifique du virus à un récepteur cellulaire récemment identifié, le *sodium taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP). L'identification du NTCP, transporteur clé des acides biliaires exprimé exclusivement à la surface des hépa-

cytes et récepteur principal responsable de l'entrée dans la cellule du VHB ainsi que du virus de l'hépatite delta (VHD), a permis le développement de modèles cellulaires permissifs à l'infection par le VHB, ainsi qu'au développement d'approches antivirales ciblant l'entrée du VHB et du VHD [11-14]. Sur le plan structural, le domaine pré-S1 de la grande protéine d'enveloppe (protéine L) du VHB interagit spécifiquement et de façon irréversible avec le récepteur NTCP au niveau de son site actif. Cette interaction déclenche l'internalisation de la particule virale, suivie du transfert vers le noyau de la nucléocapside du VHB contenant une molécule de la polymérase ADN virale [15]. Les mécanismes impliqués dans les étapes précoces ultérieures, telles que la fusion membranaire, la décapsidation et la translocation au noyau de l'ADN viral circulaire relâché (*relaxed circular DNA*, *rcDNA* ou *ADNrc*), restent mal connues.

Dans le noyau, l'ADNrc est converti par ligation en un ADN circulaire clos de façon covalente (*covalently closed circular DNA*, *cccDNA* ou *ADNccc*) qui constitue la forme intrahépatocytaire stable du VHB. L'ADNccc est le réservoir permettant la persistance de l'information génétique virale dans l'hépatocyte infecté. Cette forme génétique virale sert de matrice pour la transcription des ARNm viraux et pour celle de l'ARN pré-génomique (*pregenomic RNA*, *pgRNA* ou *ARNpg*) [16]. Le génome du VHB est constitué de quatre gènes chevauchants localisés dans le même sens transcriptionnel : S, C, P et X. Les produits de ces gènes génèrent sept protéines virales : les trois protéines d'enveloppe S, M, et L ; la polymérase virale P ; la protéine X ; la protéine core (C) et enfin la protéine précore (préC). L'existence de plusieurs codons d'initiation de la traduction sur un même ARN messager (ARNm) viral permet la génération de ces différentes protéines. Deux ARN viraux sont de taille génomique (environ 3,5 kb) correspondant à l'ARN pré-génomique et un ARNm légèrement plus grand appelé « transcrit pré-c » ; ce transcrit code la protéine pré-c, qui est le précurseur de l'antigène « e » (AgHBe), protéine soluble non structurale non essentielle à la réplication du VHB qui joue un rôle dans la modulation du système immunitaire. De plus, l'ARN pré-génomique sert comme ARNm pour la traduction des protéines core et de la polymérase virale, et sert également de matrice lors de l'étape de transcription inverse.

La transcription inverse a lieu dans le cytoplasme dans la nucléocapside nouvellement formée. La réplication se déroule alors en deux étapes incluant d'abord la synthèse d'une chaîne longue d'ADN de polarité négative suivie de la synthèse du brin court d'ADN de polarité positive pour former un ADNrc partiellement bicaténaire. Cet ADN partiellement double brin pourra, soit acquérir une enveloppe via le réticulum endoplasmique et/ou le compartiment intermédiaire pour être ensuite sécrétée à l'extérieur des

hépatocytes, soit revenir vers le noyau pour augmenter le pool d'ADNccc.

Plusieurs facteurs cellulaires sont impliqués dans la formation de l'ADNccc, sa stabilité et/ou sa régulation transcriptionnelle (tels que les protéines Pol-K, flap endonuclease 1, la tyrosyl-ADN phosphodiesterase 2) [17-19]. Cependant, les mécanismes précis et les facteurs à l'origine de la formation de l'ADNccc restent largement inconnus ou mal compris. L'activité transcriptionnelle de l'ADNccc est régulée par des modifications épigénétiques, comme par exemple l'acétylation ou la méthylation des histones, et par la protéine HBx [20]. D'autres formes d'ADN viral existent au sein de l'hépatocyte infecté. En effet, l'ADN du VHB a la capacité de s'intégrer au génome de l'hépatocyte infecté dès les premières heures de l'infection et de façon continue tant que celle-ci dure. Ce sont les séquences d'ADN viral intégré qui sont à l'origine de la majeure partie de la production d'AgHBs chez les patients AgHBe (-). L'intégration de séquences virales est également responsable de la production de protéines virales mutées ou tronquées qui pourraient jouer un rôle dans la carcinogénèse hépatique.

De nouvelles approches antivirales ciblant différentes étapes du cycle de vie du VHB, y compris la régulation de l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc, sont en cours d'évaluation. Ils comprennent les inhibiteurs d'entrée du VHB, tels que Myrcludex B, un lipopeptide synthétique analogue du domaine pré-S1 de la glycoprotéine d'enveloppe qui entre en compétition avec les particules infectieuses pour la liaison au récepteur cellulaire NTCP [21] ; des nucléases modifiés appelés « ciseaux moléculaires » spécifiques de séquences du génome du VHB qui induiraient l'endommagement ou la destruction de l'ADNccc ; des ARN ou des oligonucléotides antisens dirigés contre des ARNm viraux qui bloquent l'expression des protéines virales ; des inhibiteurs de capsid affectant l'assemblage de nucléocapsides et l'encapsidation de l'ARN pré-génomique [22]. Ces derniers agents semblent aujourd'hui très prometteurs mais des évaluations à long terme sont nécessaires pour évaluer leur innocuité et leur efficacité. Des approches thérapeutiques basées sur la modulation du système immunitaire pour induire la clairance virale sont également en cours d'étude, en association avec les antiviraux disponibles. Ils comprennent des modulateurs de la réponse immunitaire innée, tels que les agonistes du TLR7 [23] ou des agonistes de RIG-I et NOD2 [24] ou encore des vaccins thérapeutiques qui stimulent le système immunitaire [25].

Ces nouvelles thérapeutiques ont pour but d'induire une « guérison fonctionnelle » de l'infection par le VHB. La « guérison fonctionnelle » correspond à une situation clinico-virologique où le traitement antiviral classique par des analogues de nucléos(t)ides pourrait être arrêté sans risque

de réactivation. En pratique, cette situation correspond à la négativation de l'AgHBs avec ou sans séroconversion anti-HBs. L'utilisation d'autres marqueurs sérologiques (tels que l'ARN du VHB ou l'HBcrAg pour *hepatitis B core-related antigen*) en tant qu'éventuels marqueurs de guérison fonctionnelle sont encore à l'étude (voir chapitre correspondant). Sur le plan virologique, l'ADNccc viral intrahépatocytaire peut persister dans le foie mais il est transcriptionnellement inactif et/ou contrôlé par les défenses de l'hôte. Lorsqu'elle est obtenue, la « guérison fonctionnelle » est associée à une régression du risque de cirrhose et de CHC.

Variabilité génétique du VHB

La variabilité génotypique du VHB pourrait avoir une influence sur l'histoire naturelle de l'infection chronique. Dix génotypes du VHB (A à J) ont été identifiés. Ils se différencient par au moins 8 % de la séquence de leurs génomes entiers. Les VHB de génotypes A et D sont trouvés principalement en Amérique du Nord, en Europe et en Afrique du Nord et de l'Est, tandis que les VHB de génotypes B et C prédominent en Asie. En France, on trouve également une prévalence relativement élevée de génotype E, principalement chez des malades originaires d'Afrique subsaharienne. Les sujets infectés par des virus de génotype C présenteraient un risque de progression accélérée vers la cirrhose et le CHC comparativement aux autres génotypes [26]. Sur le plan thérapeutique, les génotypes A et B du VHB sont associés à une meilleure réponse à l'interféron alpha que les génotypes C et D [27].

Nouvelle classification de l'histoire naturelle du VHB

L'infection chronique par le VHB est un processus dynamique qui reflète l'interaction entre la réplication du VHB et les réponses immunitaires de l'hôte. Les manifestations cliniques de l'infection chronique sont variées, certains patients développant une infection peu active, ne nécessitant pas de traitement antiviral, tandis que d'autres présentent des signes d'inflammation hépatique et voient leur maladie hépatique évoluer rapidement vers la cirrhose, les complications de la cirrhose et/ou la survenue d'un carcinome hépatocellulaire.

L'histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB suit schématiquement cinq phases, définies en fonction de la présence ou de l'absence de l'AgHBe, du niveau de la réplication virale, de la valeur de l'activité sérique des transaminases (alanine aminotransférase [ALAT]) et de la présence ou de l'absence d'inflammation hépatique. Ces phases ne se succèdent pas nécessairement et peuvent dans certains cas être réversibles. La nouvelle nomenclature

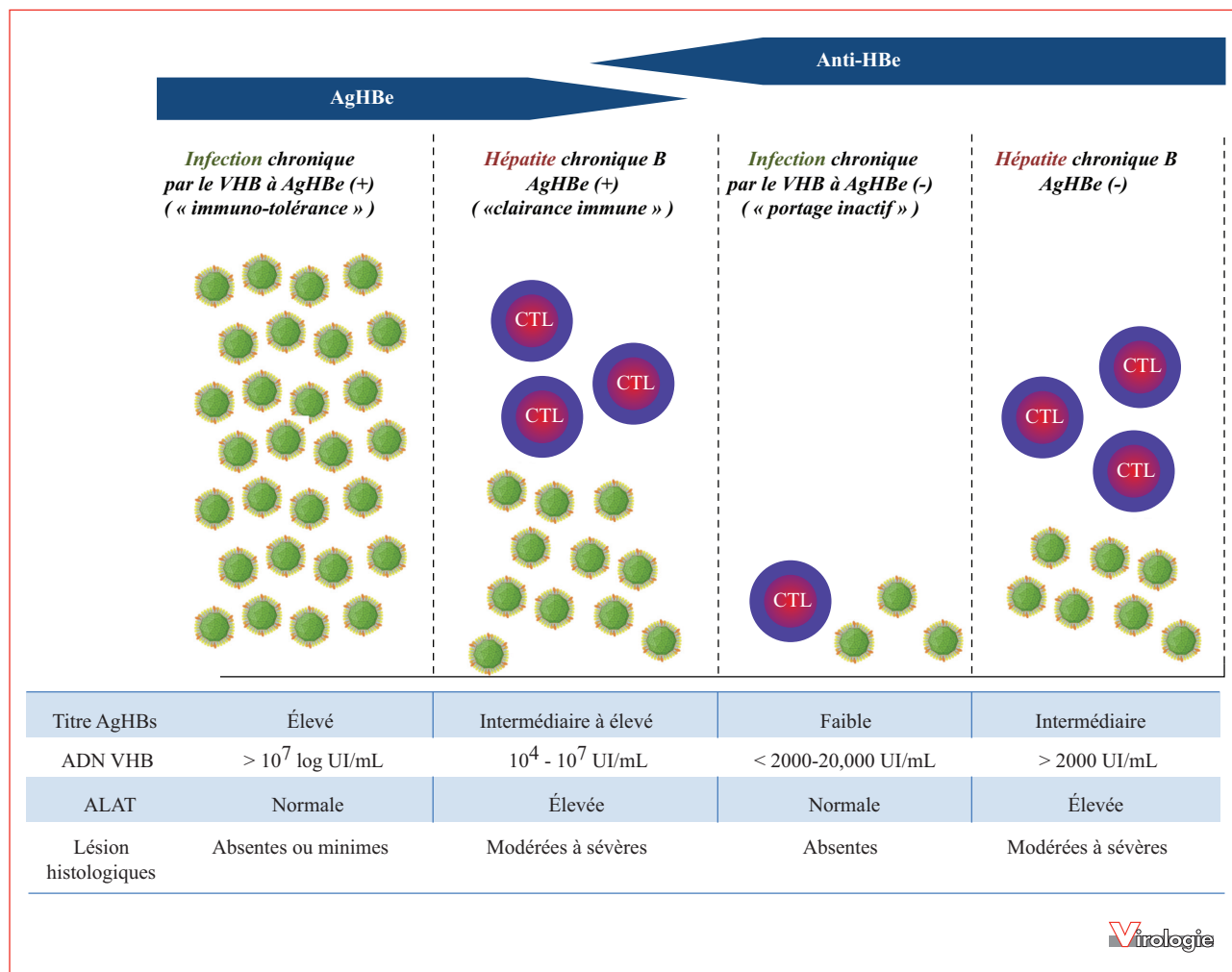


Figure 1. Histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB (nouvelle classification de l'EASL, 2017). CTL : lymphocyte T cytotoxique.

proposée par l'EASL en 2017 se fonde sur la différenciation entre « infection », non associée à une inflammation hépatique, et « hépatite », qui associe infection et inflammation hépatique, ainsi que sur la présence ou l'absence de l'AgHBe (figure 1). La surveillance régulière des taux sériques d'AgHBe et d'ALAT et la quantification de l'ADN du VHB permettent de classer les malades ayant une infection chronique par le VHB dans la majorité des cas.

Les phases de l'infection chronique par le VHB nouvellement définies par l'EASL sont les suivantes.

Phase 1 : infection chronique par le VHB à AgHBe (+)

Cette phase, auparavant appelée phase « d'immuno-tolérance », est fréquente et prolongée lorsque l'infection

est acquise dans la période périnatale. Elle est caractérisée par la présence d'AgHBe sérique, des taux très élevés d'ADN du VHB (> 10⁷ unités internationales [UI]/mL) sans élévation du taux sérique de l'ALAT. Sur le plan histopathologique, l'activité nécrotico-inflammatoire est absente ou très minime et on n'observe pas de fibrose hépatique. Cependant, un niveau élevé d'intégration chromosomique de l'ADN du VHB et une expansion clonale des hépatocytes ont été observés, suggérant que l'oncogenèse hépatocyttaire débute dès cette phase précoce de l'infection [28].

Phase 2 : hépatite chronique B à AgHBe (+)

Cette phase, auparavant appelée phase de « clairance immunitaire », survient plusieurs dizaines d'années après la phase

précédente lorsque l'infection est acquise dans la période périnatale. Sa survenue est plus rapide chez les sujets infectés à l'âge adulte. Elle est caractérisée par la présence d'AgHBe sérique, par des taux relativement élevés d'ADN du VHB (10^4 à 10^7 UI/mL) et par une élévation fluctuante du taux sérique de l'ALAT. Le foie est le siège d'une activité nécrotico-inflammatoire modérée à sévère, avec ou sans fibrose. Une séroconversion HBe (perte de l'AgHBe et apparition des anticorps anti-HBe) survient spontanément chez la majorité des patients, concomitamment à une diminution de la répllication virale. Celle-ci peut devenir très faible ($< 2\,000$ UI/mL), définissant la phase d'infection chronique par le VHB à AgHBe (–), ou rester relativement élevée, définissant la phase d'hépatite chronique B à AgHBe (–). Lorsque la séroconversion HBe survient après l'âge de 40 ans, il existe un risque accru de survenue d'une cirrhose ou d'un CHC.

Phase 3 : infection chronique par le VHB à AgHBe (–)

Cette phase était auparavant appelée phase de « portage inactif » du VHB, terminologie qui reste largement usitée. Elle est caractérisée par l'absence d'AgHBe, la présence d'anticorps anti-HBe, un niveau d'ADN du VHB indétectable ou faible ($< 2\,000$ UI/mL) et un taux sérique de l'ALAT normal. Certains patients présentent un niveau d'ADN du VHB compris entre 2 000 et 20 000 UI/mL associé à un taux sérique de l'ALAT normal de façon répétée et à une activité nécrotico-inflammatoire hépatique faible ou absente. Ces patients présentent un risque faible (mais non nul) de progression vers la cirrhose ou le CHC. La phase d'infection chronique par le VHB à AgHBe (–) évolue dans 1 à 3 % des cas par an vers la perte de l'AgHBs, avec ou sans apparition des anticorps anti-HBs (« guérison fonctionnelle »).

Phase 4 : hépatite chronique B à AgHBe (–)

Cette phase, qui n'a pas changé de dénomination, est caractérisée par l'absence d'AgHBe, la présence d'anticorps anti-HBe, et une virémie persistante ou fluctuante ($> 2\,000$ UI/mL), généralement moins élevée que chez les patients ayant une hépatite chronique B à AgHBe (+), ainsi que des taux sériques de l'ALAT fluctuants ou élevés. L'histologie hépatique montre la présence d'une activité nécro-inflammatoire modérée à sévère, habituellement associée à une fibrose. La plupart de ces patients hébergent des variants du VHB porteurs de mutations génomiques dans la région précore et/ou dans celle du promoteur basal du core qui suppriment ou diminuent l'expression de l'AgHBe. Cette phase est associée à de faibles taux de rémission spontanée de la maladie.

Phase 5 : phase AgHBs (–)

Cette phase est caractérisée par la perte de l'AgHBs sérique en présence d'anticorps anti-HBc, avec ou sans apparition des anticorps anti-HBs. Les patients présentent des valeurs normales de l'ALAT sérique et habituellement un ADN du VHB indétectable. Lorsque la perte de l'AgHBs survient avant l'apparition d'une cirrhose, le risque de survenue de celle-ci ou d'un CHC est minime et la survie globale est améliorée. En revanche, si une cirrhose était installée avant la perte de l'AgHBs, le risque résiduel de survenue d'un CHC est non négligeable et une surveillance régulière doit être mise en place. Une immunosuppression, en particulier thérapeutique, peut entraîner une réactivation du VHB chez ces patients.

Progrès récents dans le dépistage, le diagnostic et le suivi virologique de l'infection par le VHB

Le diagnostic d'infection par le VHB repose actuellement sur la détection des marqueurs sérologiques suivants : AgHBs, anticorps anti-HBc totaux ou IgM, AgHBe ou anticorps anti-HBe, et ADN du VHB qui peut être quantifié. Le diagnostic d'hépatite aiguë B est fondé sur la présence concomitante d'AgHBs et d'IgM anti-HBc. Dans le cas d'une infection chronique (portage de l'AgHBs au-delà de six mois), la présence ou l'absence d'AgHBe, le niveau d'ADN du VHB et le taux sérique de l'ALAT permettent d'identifier la phase de l'infection et de proposer la prise en charge et le suivi thérapeutique adéquats. De nouveaux outils virologiques ont été récemment développés pour améliorer l'accès au dépistage et le diagnostic de l'infection par le VHB [29] et pour optimiser la prise en charge thérapeutique [30].

Tests de diagnostic rapide pour la détection de l'AgHBs

Le dépistage à grande échelle de l'infection par le VHB est une priorité de l'Organisation Mondiale de la Santé visant à permettre l'accès universel aux soins, c'est-à-dire d'une part la vaccination des personnes non protégées, d'autre part un traitement antiviral efficace pour les patients infectés ayant une indication thérapeutique (www.who.int/hepatitis).

Le dépistage de l'infection par le VHB est fondé sur la détection de l'AgHBs dans le sang périphérique. Le dosage immuno-enzymatique de l'AgHBs, réalisé au sein d'un laboratoire central, est la technique de référence, souvent inaccessible dans les régions à ressources limitées ou dans certaines populations marginalisées. Des tests de diagnostic

rapide (TDR) ont été développés pour la détection de l'AgHBs. Les TDR ne nécessitent pas d'infrastructure de laboratoire, sont faciles à utiliser, nécessitent une formation courte du personnel et fournissent un résultat en quelques minutes. Ces tests peuvent être réalisés à partir de sérum ou de plasma, mais également à partir de sang total prélevé au bout du doigt et, pour certains d'entre eux, d'un échantillon salivaire. La sensibilité des TDR varie considérablement en fonction du fournisseur et de la matrice utilisée, tandis que leur spécificité est proche de 100 %. Certains TDR ont montré d'excellentes performances analytiques pour la détection de l'AgHBs, par exemple les tests VIKIA HBsAg (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), Alere Determine HBsAg (Alere, Inc., Waltham, Massachusetts) et DRW-HBsAg v.2. (Diagnostics for the Real World, Ltd, Sunnyvale, Californie) [31]. Ces tests se sont révélés également sensibles (> 98,5 %) pour la détection de mutants de l'AgHBs variés [31, 32]. Une récente méta-analyse a évalué les performances de 33 TDR détectant l'AgHBs en comparaison à une technique immuno-enzymatique de référence [33]. Cette étude a inclus 23 716 individus ; la sensibilité et la spécificité globales étaient respectivement de 90,0 % (intervalle de confiance à 95 % [IC 95] : 89,1-90,8 %) et 99,5 % (IC 95 : 99,4-99,5 %). Les performances analytiques des tests n'étaient pas influencées par le type de matrice testée (sérum, plasma ou sang total veineux ou capillaire). En revanche, la sensibilité des TDR était significativement réduite chez des patients coinfectés par le VIH-1 et le VHB (72,3 %) comparativement aux personnes mono-infectés par le VHB, sans qu'aucune explication de cette observation soit fournie.

Dans l'ensemble, les TDR validés pour la détection de l'AgHBs sont des outils prometteurs pour le dépistage à grande échelle de l'infection par le VHB, mais leur sensibilité pourrait être réduite chez les patients coinfectés par le VIH. Les avantages des TDR sont nombreux : un faible volume d'échantillon requis pour l'analyse, pas de ponction veineuse si on utilise du sang total capillaire, un moindre coût, une amélioration du flux de consultations. De nouveaux tests permettant le dépistage combiné du VIH, de l'AgHBs et des anticorps anti-VHC sont en cours d'évaluation [34].

Marqueurs supposés refléter le réservoir viral du VHB

Marqueur intrahépatocytaire : quantification de l'ADNccc

L'ADNccc est la forme génomique virale intrahépatocytaire responsable de la persistance du VHB dans l'organisme. L'ADNccc persiste toute la vie chez les porteurs du VHB, y compris au cours d'un traitement par analogues nucléos(t)idiques à long terme efficace et/ou en

cas de perte de l'AgHBs [35, 36]. La régulation du pool d'ADNccc intrahépatique est complexe, sous la dépendance de plusieurs acteurs de l'immunité cellulaire, de la production de cytokines pro-inflammatoires [37] et d'un fin contrôle épigénétique qui fait intervenir des facteurs viraux et cellulaires [16, 37, 38]. La quantification de l'ADNccc intrahépatocytaire permet une estimation de la taille du réservoir viral, cible des nouvelles thérapeutiques à visée curative. Cependant, les techniques de quantification de l'ADNccc et de son expression ne sont pas standardisées. La nécessité de disposer d'une biopsie hépatique est également un obstacle important, qui pose un problème éthique alors que des antiviraux efficaces peuvent aujourd'hui être administrés sans diagnostic histopathologique préalable.

Des biomarqueurs sériques qui pourraient refléter la taille du pool intracellulaire d'ADNccc ont également été développés. Leur signification réelle reste discutée. Les plus avancés incluent la quantification de l'AgHBs quantitatif, la quantification de l'antigène lié au core (*hepatitis B core-related antigen* [HBcrAg]) et la quantification des ARN circulants du VHB.

Quantification de l'AgHBs

Au cours des dix dernières années, l'intérêt de la quantification de l'AgHBs a été étudié dans des contextes cliniques variés, tels que la prédiction du stade de la maladie et l'évaluation de la réponse au traitement antiviral. Plusieurs trousseaux de quantification de l'AgHBs sont disponibles et bénéficient d'excellentes performances analytiques permettant une quantification précise de ce paramètre : Elecsys (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana), Architect (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) et Liaison XL Murex quantitatif (Diasorin, Saluggia, Italie).

Sur le plan virologique, la production d'AgHBs résulte de :
– l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc intrahépatocytaire ;

– l'activité transcriptionnelle de fragments d'ADN viral linéarisés et intégrés au génome de l'hépatocyte.

La fréquence d'intégration varie en fonction des phases de la maladie et d'un individu infecté à un autre [39-41]. La transcription des fragments génomiques intégrés ne permet pas la production de particules virales infectieuses ; en revanche, le cadre de lecture du gène *S* et les fragments géniques nécessaires à sa régulation sont souvent intégrés dans leur intégralité. Par conséquent, l'AgHBs peut être produit en quantités plus ou moins importantes à partir de l'ADN intégré intrahépatocytaire. La quantification de l'AgHBs ne reflète donc pas exclusivement l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc [42].

À la fin du cycle viral, l'AgHBs est libéré en quantités largement supérieures à celles requises pour l'assemblage du virion. L'AgHBs en excès est présent au sein de

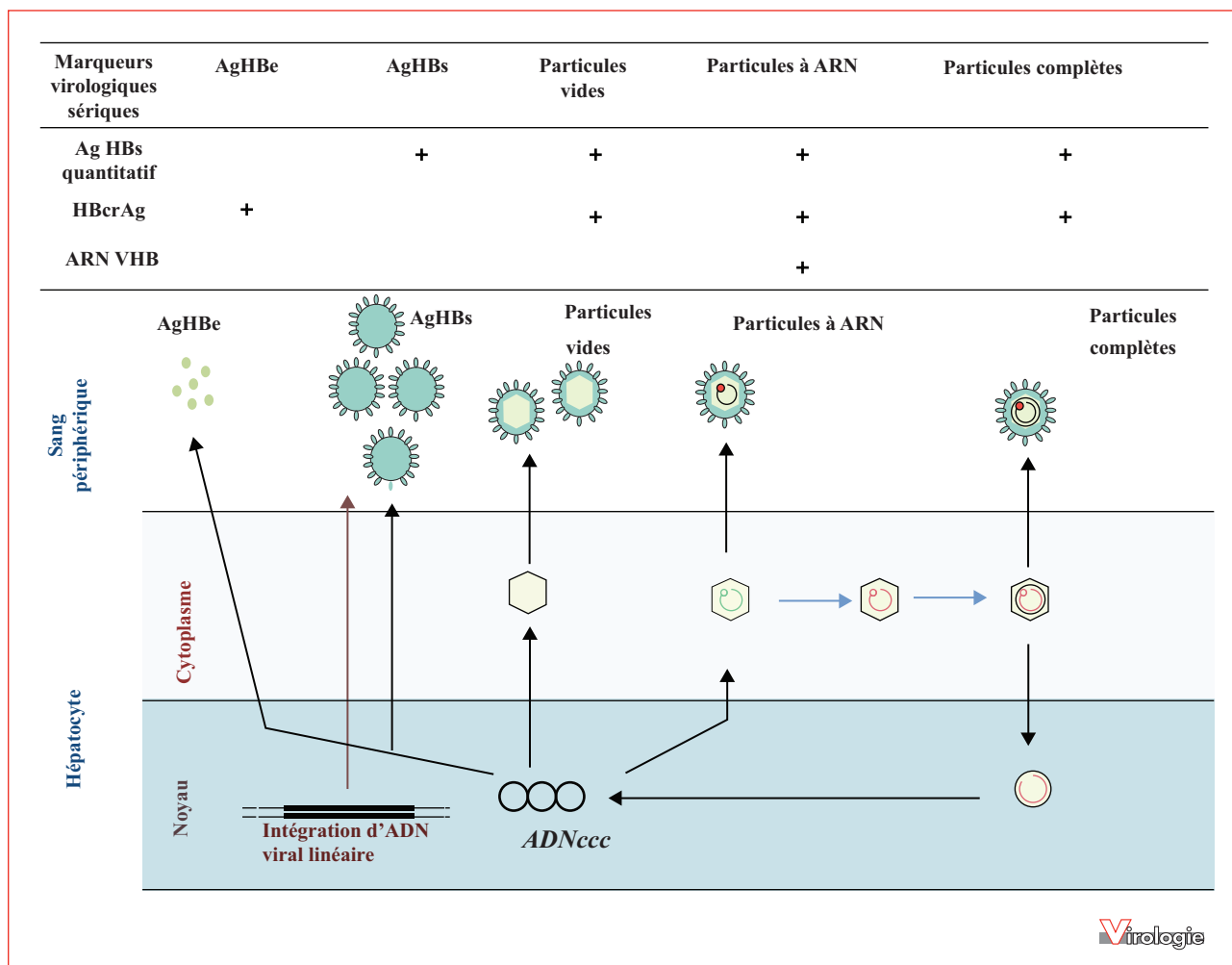


Figure 2. Biomarqueurs sériques produits par le VHB. L'AgHBs, dont l'origine est l'ADNccc viral ainsi que des séquences virales intégrées, est libéré en quantités largement supérieures à celles requises pour l'assemblage des virions ; l'excès de production est associé à des pseudoparticules vides, non infectieuses, contenant ou pas des protéines de capsid. L'HBcrAg ou *hepatitis B core-related antigen* mesure de façon globale l'Ag HBe sérique linéarisé, l'Ag du core des particules de Dane infectieuses, des pseudovirions dépourvus de génome du VHB et contenant des protéines de capsid et des pseudovirions contenant des ARN viraux. L'ARN viral mesure en grande partie mais sans doute pas exclusivement des ARN pré-génomiques encapsidés et enveloppés sous forme de pseudoparticules virales dont le pouvoir infectieux est aujourd'hui débattu.

l'enveloppe de pseudoparticules vides, non infectieuses, filamenteuses ou sphériques contenant ou pas la protéine de capsid (figure 2). L'AgHBs sérique quantifié par les techniques actuellement disponibles comprend toutes les formes d'AgHBs présentes dans différentes particules, c'est-à-dire les particules virales infectieuses contenant l'ADN génomique, les particules contenant des ARN viraux et les particules vides filamenteuses et sphériques.

La cinétique de production de l'AgHBs varie au cours de l'histoire naturelle de la maladie en fonction de la phase de l'infection. Les quantités d'AgHBs présentes sont en moyenne de l'ordre de $4,5 \log_{10}$ UI/mL chez les

malades ayant une infection chronique à AgHBe (+) et de $2,8 \log_{10}$ UI/mL chez ceux ayant une infection chronique à AgHBe (–) [43]. La quantification de l'AgHBs est de plus en plus répandue en pratique clinique [44] et l'EASL recommande son utilisation dans les contextes suivants [10] :

- la caractérisation et le suivi du portage inactif du VHB (infection chronique par le VHB à AgHBe [–]), en complément du dosage de l'ALAT et de la quantification de l'ADN du VHB [43]. Il est parfois difficile, sur la seule normalité du taux sérique de l'ALAT et sur une seule quantification de l'ADN du VHB $< 2\,000$ UI/mL de différencier les patients ayant une infection chronique par le VHB à AgHBe (–)

de ceux ayant une hépatite chronique B à AgHBe (–) [45]. Près d'un tiers des patients initialement considérés comme des porteurs inactifs du VHB présente en effet au cours du suivi une fluctuation de la charge virale et du taux sérique de l'ALAT qui nécessitent la mise en route d'un traitement antiviral [43, 46]. *A contrario*, certains patients ayant des taux sériques de l'ALAT normales de façon répétée sont d'authentiques porteurs inactifs (infection chronique par le VHB à AgHBe [–]), malgré des fluctuations de la virémie entre 2 000 et 20 000 UI/mL [47] ;

- la quantification de l'AgHBs pourrait aider à mieux identifier le portage inactif du VHB. En effet, des travaux menés chez des patients européens ont montré qu'un taux d'AgHBs < 1 000 UI/mL associé à un niveau d'ADN du VHB < 2 000 UI/mL avait une bonne valeur prédictive positive sur le diagnostic de portage chronique du VHB [43, 48]. Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés chez des patients asiatiques infectés par un VHB de génotype B ou C, suggérant que les seuils prédictifs d'AgHBs devraient être interprétés en fonction du génotype viral et/ou de la population étudiée. Dans tous les cas, l'association d'un AgHBs < 100 UI/mL et d'un ADN du VHB < 2 000 UI/mL est fortement prédictive d'une infection chronique par le VHB à AgHBe (–), c'est-à-dire d'un portage inactif du VHB, et ce, quel que soit le génotype viral [49]. Il a, par ailleurs, été récemment suggéré que la détection et la quantification des AgHBs spécifiquement associés aux protéines d'enveloppe large et moyenne du VHB permettait de différencier clairement les porteurs inactifs du virus des patients ayant une hépatite chronique active [50] ;

- la quantification de l'AgHBs est utile pour prédire la réponse au traitement par interféron alpha pégylé (PegIFN α) [51]. Ce traitement ayant de nombreux effets secondaires et induisant une réponse virologique prolongée dans un nombre de cas relativement faible, il est nécessaire de limiter son utilisation aux seuls patients présentant une forte probabilité de répondre et d'arrêter le traitement le plus tôt possible si la probabilité de réponse est faible. Il a été montré chez des patients AgHBe (+) que l'obtention d'un titre d'AgHBs < 1 500 UI/mL à la semaine 12 ou < 300 UI/mL à la semaine 24 du traitement par PegIFN α était associé à un taux de séroconversion HBe de 54 à 57 % [52]. À l'inverse, l'absence de diminution du taux d'AgHBs ou un taux supérieur à 20 000 UI/mL à la semaine 24 du traitement étaient associés à une séroconversion HBe dans seulement 0 à 16 % des cas [53]. Chez les patients AgHBe (–), l'absence de diminution du taux de l'AgHBs et de l'ADN du VHB de plus de 2 log₁₀ UI/mL à la semaine 12 de traitement était associé à un échec virologique dans tous les cas. L'EASL a proposé un nouvel algorithme de suivi des patients traités par PegIFN α , incluant la quantification de l'AgHBs avant et pendant le traitement et des règles d'arrêt ou de poursuite du traitement fondées sur ce résultat [10] ;

- les données clinicovirologiques manquent en ce qui concerne l'interprétation des modifications des taux d'AgHBs au cours du traitement par analogues nucleos(t)idiques [44, 54]. Alors qu'une très faible proportion de patients sous analogues nucleos(t)idiques élimine rapidement l'AgHBs dès la première année du traitement, la grande majorité d'entre eux présente une diminution très lente du titre d'AgHBs au cours de celui-ci. Le suivi du taux d'AgHBs permettrait d'estimer la durée minimale du traitement par analogues nucleos(t)idiques nécessaire pour atteindre une séroconversion HBs [54]. Cette lente cinétique d'AgHBs contraste avec la décroissance rapide de l'ADN du VHB qui reste actuellement le marqueur clé pour surveiller l'efficacité et l'adhérence au traitement par analogues nucleos(t)idiques.

Quantification de l'antigène du VHB lié au core (*hepatitis B core-related antigen* [HBcrAg])

L'HBcrAg est un biomarqueur composite qui inclut l'ensemble des antigènes exprimés à partir du gène pré-core/core du VHB : l'AgHBc, l'AgHBe et un précurseur protéique, la protéine p22. Ces trois protéines virales présentent en commun une séquence de 149 acides aminés permettant, après dénaturation, l'utilisation d'anticorps monoclonaux communs pour leur détection simultanée. L'HBcrAg est présent dans les particules de Dane infectieuses, dans les particules non infectieuses qui contiennent la protéine précore de 22 kDa (100 fois plus abondantes que les particules de Dane) [55] et dans les pseudovirions contenant l'ARN pré-génomique [56] (*figure 2*). Un test utilisant le sérum ou le plasma comme matrice a été développé par la firme japonaise Fujirebio (Tokyo, Japon) avec une limite de détection de 2,0 log₁₀ U/mL et un intervalle linéaire de quantification compris entre 3,0 et 7,0 log₁₀ U/mL.

Contrairement à l'AgHBs, l'expression de l'HBcrAg n'est pas sous la dépendance de séquences virales intégrées. Il pourrait donc mieux refléter l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc du VHB [57, 58]. Une corrélation a été trouvée entre l'HBcrAg sérique et la quantité d'ADNccc intra-hépatique dans trois cohortes asiatiques sur quatre dans lesquelles ces deux paramètres ont été mesurés [57, 59-61]. Sous traitement par analogues nucleos(t)idiques, la décroissance de l'HBcrAg était également corrélée à la diminution du réservoir d'ADNccc intrahépatocytaire [61]. En pratique clinique, la quantification de l'HBcrAg pourrait s'avérer utile dans les contextes suivants :

- détermination de la phase de l'infection. En effet, les porteurs inactifs (infection chronique par le VHB à AgHBe [–]) ont un titre d'HBcrAg significativement plus faible que les patients ayant une hépatite chronique B à AgHBe (–) [62, 63]. La quantification de l'HBcrAg serait plus efficace que celle de l'AgHBs pour différencier les porteurs inactifs

des patients ayant une hépatite chronique active parmi les sujets ayant un ADN du VHB < 2 000 UI/mL, et ce, quel que soit le génotype du VHB [64] ;

- prédiction de la réponse au traitement antiviral. Plusieurs travaux, essentiellement asiatiques, ont étudié l'intérêt de la quantification de l'HBcrAg dans la prédiction de la réponse au traitement antiviral [60, 65]. Un faible titre d'HBcrAg avant le début du traitement serait associé à une bonne réponse virologique au traitement par analogues de nucléos(t)ides (ADN du VHB indétectable à la semaine 48 du traitement) [65]. Chez les patients AgHBe (+) traités par analogues de nucléos(t)ides, la combinaison des taux d'AgHBs et d'HBcrAg mesurés à six et 12 mois du traitement permettent de prédire la séroconversion HBe ultérieure [66]. Chez les patients AgHBe (–) contrôlés sous analogues de nucléos(t)ides depuis plusieurs années, le taux d'HBcrAg serait prédictif du risque de rechute après un arrêt éventuel du traitement [67, 68]. À ce jour, les données sur l'apport éventuel de la mesure de l'HBcrAg dans la prédiction de la perte de l'AgHBs sous traitement sont manquantes ;

- prédiction de la survenue à long terme d'un CHC chez les patients naïfs de traitement [69], les patients bien contrôlés par analogues de nucléos(t)ides [58, 70] ou après résection chirurgicale [71]. Ces résultats nécessitent d'être confirmés sur des études prospectives à plus large échelle ;

- prédiction d'une réactivation VHB chez les patients ayant une hépatite B occulte au décours d'une immunodépression induite par une chimiothérapie anti-CD20 ou chez des patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétique [72].

Malgré ces résultats, l'utilisation du test de détection et de quantification de l'HBcrAg dans la prise en charge des patients infectés par le VHB fait débat, car les études ont inclus un faible nombre de patients et ont été réalisées essentiellement chez des populations asiatiques infectées par des virus de génotypes B et C, différents des virus infectant les populations européennes, majoritairement de génotypes A et D. La validation de l'intérêt clinique de ce test sur des cohortes plus larges, incluant différentes populations et différents génotypes viraux, est aujourd'hui nécessaire.

Quantification des ARN du VHB circulants

L'ARN du VHB a été détecté pour la première fois en 1996 dans le sérum de patients infectés [73]. Des études récentes ont confirmé que des ARN pré-génomiques étaient présents dans le sang circulant au sein de pseudoparticules virales enveloppées [56]. Il est probable que d'autres ARNs viraux, par exemple des ARN tronqués, sont également présents au sein de pseudoparticules virales [10]. En raison de la difficulté technique d'amplifier spécifiquement et avec la même efficacité les différents ARN du VHB, les tests dis-

ponibles n'ont pas été standardisés et il n'existe aucun test commercialisé pour la quantification de l'ARN du VHB.

Une relation fortement significative a été rapportée entre la quantité d'ARN du VHB circulant et l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc intrahépatique [74, 75]. La quantification des ARN du VHB dans le sang périphérique pourrait donc apporter des informations importantes dans les contextes suivants :

- pour identifier les porteurs inactifs du VHB (infection chronique à AgHBe[–]) lorsque l'ARN du VHB est indétectable, alors que l'ARN du VHB est presque toujours présent chez les patients ayant une hépatite chronique active [76] ;

- pour prédire la réponse virologique à un traitement antiviral chez les patients Ag HBe (+). Des études récentes ont montré une forte corrélation entre la dynamique de décroissance des ARN du VHB et la perte de l'AgHBe chez des patients traités par PegIFN α [77] ou par analogues de nucléos(t)ides [78]. Chez des patients sous analogues de nucléos(t)ides, la cinétique de l'ARN du VHB avait une valeur prédictive de la séroconversion HBe supérieure à celle de la cinétique de l'ADN du VHB ou à celle de l'AgHBs au cours des premiers mois de traitement [78]. Dans une autre étude, l'indétectabilité de l'ARN du VHB à la fin du traitement par analogues de nucléos(t)ides prédisait l'absence de rebond virologique après l'arrêt du traitement [56].

Ces résultats doivent maintenant être validés sur de plus larges cohortes et des efforts de standardisation seront nécessaires pour une utilisation rationnelle en pratique clinique. D'autre part, les niveaux d'ARN du VHB étant variables en fonction de différents paramètres immunovirologiques comme le statut HBe, le génotype viral ou la présence de mutants du promoteur basal du core, ces paramètres devront être pris en compte pour l'interprétation des résultats de ce test [79].

Conclusion

À ce jour, il n'est pas démontré que les nouveaux biomarqueurs, tels que l'HBcrAg ou l'ARN du VHB, utilisés individuellement ou en combinaison, puissent apporter des informations complémentaires pertinentes par rapport aux marqueurs déjà disponibles (AgHBs quantitatif et ADN du VHB). Des études à large échelle seront nécessaires pour évaluer l'intérêt des différents biomarqueurs dans la prise en charge individualisée de l'infection chronique par le VHB et dans la prédiction de la réponse thérapeutique à court et long terme. Ces nouveaux biomarqueurs pourraient également s'avérer utiles dans les essais cliniques évaluant de nouvelles thérapeutiques visant la guérison fonctionnelle de l'infection chronique par le VHB.

Liens d'intérêts : Slim Fourati déclare ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article. Jean-Michel Pawlotsky déclare : essais cliniques PEGAN HB06-ANRS (résultats non encore publiés), avec versement de l'ANRS ; interventions ponctuelles pour Abott, Gilead, Siemens.

Références

1. Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, Yuen MF. Chronic hepatitis B virus infection. *Lancet* 2018 ; 392 : 2313-24.
2. Ginzberg D, Wong RJ, Gish R. Global HBV burden : guesstimates and facts. *Hepatology* 2018 ; 12 : 315-29.
3. Graber-Stiehl I. The silent epidemic killing more people than HIV, malaria or TB. *Nature* 2018 ; 564 : 24-6.
4. Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, Fitzmaurice C, Vos T, Abubakar I, *et al.* The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013 : findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2016 ; 388 : 1081-8.
5. Cohen J. Forgotten no more. *Science* 2018 ; 362 : 984-7.
6. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection : a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 2015 ; 386 : 1546-55.
7. Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003 ; 362 : 2089-94.
8. Bertolotti A, Tan AT, Gehring AJ. HBV-Specific Adaptive Immunity. *Viruses* 2009 ; 1 : 91-103.
9. Busca A, Kumar A. Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *Virol J* 2014 ; 11 : 22.
10. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017 ; 67 : 370-398.
11. Allweiss L, Dandri M. Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2016 ; 64 : S17-31.
12. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012 ; 1 : e00049.
13. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Falth M, Stindt J, *et al.* Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014 ; 146 : 1070-83.
14. Wedemeyer H, Bogomolov P, Blank A, Allweiss L, Dandri-Petersen M, Bremer B, Voronkova N, *et al.* Final results of a multicenter, open-label phase 2b clinical trial to assess safety and efficacy of Myrcludex B in combination with Tenofovir in patients with chronic HBV/HDV co-infection. *J Hepatol* 2018 ; 68(S1) : S3.
15. Li W, Urban S. Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes : Basic insights and clinical implications. *J Hepatol* 2016 ; 64 : S32-40.
16. Nassal M. HBV cccDNA : viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* 2015 ; 64 : 1972-84.
17. Koniger C, Wingert I, Marsmann M, Rosler C, Beck J, Nassal M. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 ; 111 : E4244-4253.
18. Qi Y, Gao Z, Xu G, Peng B, Liu C, Yan H, Yao Q, *et al.* DNA Polymerase kappa Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus. *PLoS Pathog* 2016 ; 12 : e1005893.
19. Kitamura K, Que L, Shimadu M, Koura M, Ishihara Y, Wakae K, Nakamura T, *et al.* Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. *PLoS Pathog* 2018 ; 14 : e1007124.
20. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, Raimondo G, *et al.* Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; 106 : 19975-9.
21. Blank A, Eidam A, Haag M, Hohmann N, Burhenne J, Schwab M, van de Graaf S, *et al.* The NTCIP-inhibitor Myrcludex B : Effects on Bile Acid Disposition and Tenofovir Pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2018 ; 103 : 341-8.
22. Schinazi RF, Ehteshami M, Bassit L, Asselah T. Towards HBV curative therapies. *Liver Int* 2018 ; 38 Suppl 1 : 102-14.
23. Lanford RE, Guerra B, Chavez D, Giavedoni L, Hodara VL, Brasky KM, Fosdick A, *et al.* GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology* 2013 ; 144 : 1508-1517, 1517 e1501-1510.
24. Suresh M, Korolowicz KE, Balarezo M, Iyer RP, Padmanabhan S, Cleary D, Gimi R, *et al.* Antiviral Efficacy and Host Immune Response Induction during Sequential Treatment with SB 9200 Followed by Entecavir in Woodchucks. *PLoS One* 2017 ; 12 : e0169631.
25. Lok AS, Pan CQ, Han SH, Trinh HN, Fessel WJ, Rodell T, Massetto B, *et al.* Randomized phase II study of GS-4774 as a therapeutic vaccine in virally suppressed patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2016 ; 65 : 509-16.
26. Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology* 2014 ; 57 : 141-50.
27. Raimondi S, Maisonneuve P, Bruno S, Mondelli MU. Is response to antiviral treatment influenced by hepatitis B virus genotype? *J Hepatol* 2010 ; 52 : 441-9.
28. Mason WS, Gill US, Litwin S, Zhou Y, Peri S, Pop O, Hong ML, *et al.* HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant. *Gastroenterology* 2016 ; 151 : 986-998 e984.
29. Fourati S, Challine D, Poveda JD, Laperche S, Rallier S, Pawlotsky JM, Chevaliez S. Evaluation of a new random-access HBV DNA molecular assay : The VERIS HBV assay. *J Clin Virol* 2017 ; 92 : 69-74.
30. Fourati S, Pawlotsky JM. Recent advances in understanding and diagnosing hepatitis B virus infection. *F1000Res* 2016 ; 5. doi: 10.12688/f1000research.8983.1.
31. Chevaliez S, Challine D, Naija H, Luu TC, Laperche S, Nadala L, Allain JP, *et al.* Performance of a new rapid test for the detection of hepatitis B surface antigen in various patient populations. *J Clin Virol* 2014 ; 59 : 89-93.
32. Servant-Delmas A, Ly TD, Hamon C, Houdah AK, Laperche S. Comparative Performance of Three Rapid HBsAg Assays for Detection of HBs Diagnostic Escape Mutants in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 2015 ; 53 : 3954-5.
33. Amini A, Varsaneux O, Kelly H, Tang W, Chen W, Boeras DI, Falconer J, *et al.* Diagnostic accuracy of tests to detect hepatitis B surface antigen : a systematic review of the literature and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2017 ; 17 : 698.
34. Robin L, Mboumba Bouassa RS, Nodjikuambaye ZA, Charmant L, Matta M, Simon S, Filali M, *et al.* Analytical performances of simultaneous detection of HIV-1, HIV-2 and hepatitis C- specific antibodies and hepatitis B surface antigen (HBsAg) by multiplex immunochromatographic rapid test with serum samples : A cross-sectional study. *J Virol Methods* 2018 ; 253 : 1-4.
35. Boyd A, Lacombe K, Lavocat F, Maylin S, Mialhes P, Lascoux-Combe C, Delaugerre C, *et al.* Decay of ccc-DNA marks persistence of intrahepatic viral DNA synthesis under tenofovir in HIV-HBV co-infected patients. *J Hepatol* 2016 ; 65 : 683-91.
36. Lai CL, Wong D, Ip P, Kopaniszen M, Seto WK, Fung J, Huang FY, *et al.* Reduction of covalently closed circular DNA with long-term nucleos(t)ide analogue treatment in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2017 ; 66 : 275-81.

37. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51 : 581-92.
38. Lucifora J, Protzer U. Attacking hepatitis B virus cccDNA—The holy grail to hepatitis B cure. *J Hepatol* 2016; 64 : S41-8.
39. Bill CA, Summers J. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 : 11135-40.
40. Yang W, Summers J. Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination. *J Virol* 1995; 69 : 4029-36.
41. Gong SS, Jensen AD, Wang H, Rogler CE. Duck hepatitis B virus integrations in LMH chicken hepatoma cells : identification and characterization of new episomally derived integrations. *J Virol* 1995; 69 : 8102-8.
42. Zoulim F, Testoni B, Lebosse F. Kinetics of intrahepatic covalently closed circular DNA and serum hepatitis B surface antigen during antiviral therapy for chronic hepatitis B : lessons from experimental and clinical studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11 : 1011-3.
43. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Moriconi F, Ciccorossi P, Coco B, Romagnoli V, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 2010; 139 : 483-90.
44. Chevaliez S. Is HBsAg quantification ready, for prime time? *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37 : 559-63.
45. Invernizzi F, Vigano M, Grossi G, Lampertico P. The prognosis and management of inactive HBV carriers. *Liver Int* 2016; 36 Suppl 1 : 100-4.
46. Manno M, Camma C, Schepis F, Bassi F, Gelmini R, Giannini F, Miselli F, et al. Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy : morbidity and mortality after 30 years. *Gastroenterology* 2004; 127 : 756-63.
47. Zacharakis GH, Koskinas J, Kotsiou S, Papoutselis M, Tzara F, Vafeiadis N, Archimandritis AJ, et al. Natural history of chronic HBV infection : a cohort study with up to 12 years follow-up in North Greece (part of the Interreg I-II/EC-project). *J Med Virol* 2005; 77 : 173-9.
48. Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Asselah T, Marcellin P. The role of HBsAg quantification for monitoring natural history and treatment outcome. *Liver Int* 2013; 33(Suppl 1) : 125-32.
49. Brouwer WP, Chan HL, Brunetto MR, Martinot-Peignoux M, Arends P, Cornberg M, Cherubini B, et al. Repeated Measurements of Hepatitis B Surface Antigen Identify Carriers of Inactive HBV During Long-term Follow-up. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14 : 1481-9e5. doi: 10.1016/j.cgh.2016.01.019.
50. Pfefferkorn M, Bohm S, Schott T, Deichsel D, Bremer CM, Schroeder K, Gerlich WH, et al. 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* 2018; 67 : 2045-53.
51. Ma H, Yang RF, Wei L. Quantitative serum HBsAg and HBeAg are strong predictors of sustained HBeAg seroconversion to pegylated interferon alfa-2b in HBeAg-positive patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25 : 1498-506.
52. Chan HL. Response-guided therapy by hepatitis B surface antigen level for peginterferon therapy : what is next? *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 : 420-1.
53. Sonneveld MJ, Hansen BE, Piratvisuth T, Jia JD, Zeuzem S, Gane E, Liaw YF, et al. Response-guided peginterferon therapy in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels. *Hepatology* 2013; 58 : 872-80.
54. Chevaliez S, Hezode C, Bahrami S, Grare M, Pawlotsky JM. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy : finite treatment duration unlikely. *J Hepatol* 2013; 58 : 676-83.
55. Luckenbaugh L, Kitrinis KM, Delaney WEt, 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 : 561-70.
56. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, Zhang R, 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 : 700-10.
57. Wong DK, Seto WK, Cheung KS, Chong CK, Huang FY, Fung J, Lai CL, et al. Hepatitis B virus core-related antigen as a surrogate marker for covalently closed circular DNA. *Liver Int* 2017; 37 : 995-1001.
58. Honda M, Shirasaki T, Terashima T, Kawaguchi K, Nakamura M, Oishi N, Wang X, 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* 2016; 213 : 1096-106.
59. Wong DK, Tanaka Y, Lai CL, Mizokami M, Fung J, Yuen MF. Hepatitis B virus core-related antigens as markers for monitoring chronic hepatitis B infection. *J Clin Microbiol* 2007; 45 : 3942-7.
60. Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, Kumada H. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 2009; 81 : 27-33.
61. Chen EQ, Feng S, Wang ML, Liang LB, Zhou LY, Du LY, Yan LB, et al. Serum hepatitis B core-related antigen is a satisfactory surrogate marker of intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B. *Sci Rep* 2017; 7 : 173.
62. Seto WK, Wong DK, Fung J, Huang FY, Liu KS, Lai CL, Yuen MF. Linearized hepatitis B surface antigen and hepatitis B core-related antigen in the natural history of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 : 1173-80.
63. Maasoumy B, Wiegand SB, Jaroszewicz J, Bremer B, Lehmann P, Deterding K, Taranta A, et al. 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* 2015; 21 : 606 e1-10.
64. Riveiro-Barciela M, Bes M, Rodriguez-Frias F, Tabernero D, Ruiz A, Casillas R, Vidal-Gonzalez J, et al. 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* 2017; 23 : 860-7.
65. Okuhara S, Umemura T, Joshita S, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, et al. Serum levels of interleukin-22 and hepatitis B core-related antigen are associated with treatment response to entecavir therapy in chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2014; 44 : E172-180.
66. Wang B, Carey I, Bruce M, Montague S, Dusheiko G, Agarwal K. HBsAg and HBcrAg as predictors of HBeAg seroconversion in HBeAg-positive patients treated with nucleos(t)ide analogues. *J Viral Hepat* 2018; 25 : 886-93.
67. Jung KS, Park JY, Chon YE, Kim HS, Kang W, Kim BK, Kim SU, et al. Clinical outcomes and predictors for relapse after cessation of oral antiviral treatment in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol* 2016; 51 : 830-9.
68. Matsumoto A, Nishiguchi S, Enomoto H, Kang JH, Tanaka Y, Shin-kai N, Kurosaki M, et al. Combinational use of hepatitis B viral antigens predicts responses to nucleos(t)ide analogue/peg-interferon sequential therapy. *J Gastroenterol* 2018; 53 : 247-57.
69. Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, et al. HBcrAg predicts hepatocellular carcinoma development : An analysis using time-dependent receiver operating characteristics. *J Hepatol* 2016; 65 : 48-56.
70. Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, et al. Effect of nucleos(t)ide analogue therapy on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B patients : a propensity score analysis. *J Hepatol* 2013; 58 : 427-33.
71. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, et al. HBcrAg is a predictor of post-treatment

recurrence of hepatocellular carcinoma during antiviral therapy. *Liver Int* 2010 ; 30 : 1461-70.

72. Seto WK, Wong DK, Chan TS, Hwang YY, Fung J, Liu KS, Gill H, *et al.* Association of Hepatitis B Core-Related Antigen With Hepatitis B Virus Reactivation in Occult Viral Carriers Undergoing High-Risk Immunosuppressive Therapy. *Am J Gastroenterol* 2016 ; 111 : 1788-95.

73. Kock J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology* 1996 ; 23 : 405-13.

74. Giersch K, Allweiss L, Volz T, Dandri M, Lutgehetmann M. Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity. *J Hepatol* 2017 ; 66 : 460-2.

75. Wang J, Du M, Huang H, Chen R, Niu J, Jiang J, Zhuang H, *et al.* Reply to : "Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity" : Consistent loss of serum HBV RNA might predict the "para-functional cure" of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2017 ; 66 : 462-3.

76. van Bömmel F. The level of HBV RNA in serum as a novel marker for the phase of chronic hepatitis B virus (HBV) infections. In : American Association for the Study of Liver Diseases 2016 ; 2016. Présentation n° 1814.

77. van Bömmel F, van Bommel A, Krauel A, Wat C, Pavlovic V, Yang L, Deichsel D, *et al.* Serum HBV RNA as a Predictor of Peginterferon Alfa-2a Response in Patients With HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B. *J Infect Dis* 2018 ; 218 : 1066-74.

78. van Bömmel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Kruger DH, Berg T, Edelmann A. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology* 2015 ; 61 : 66-76.

79. van Campenhout MJH, van Bommel F, Pfefferkorn M, Fischer J, Deichsel D, Boonstra A, van Vuuren AJ, *et al.* Host and viral factors associated with serum hepatitis B virus RNA levels among patients in need for treatment. *Hepatology* 2018 ; 68 : 839-47.