

# ***Place des Examens de Biologie Moléculaire dans le Suivi des Hépatites***

**Stéphane Chevaliez**

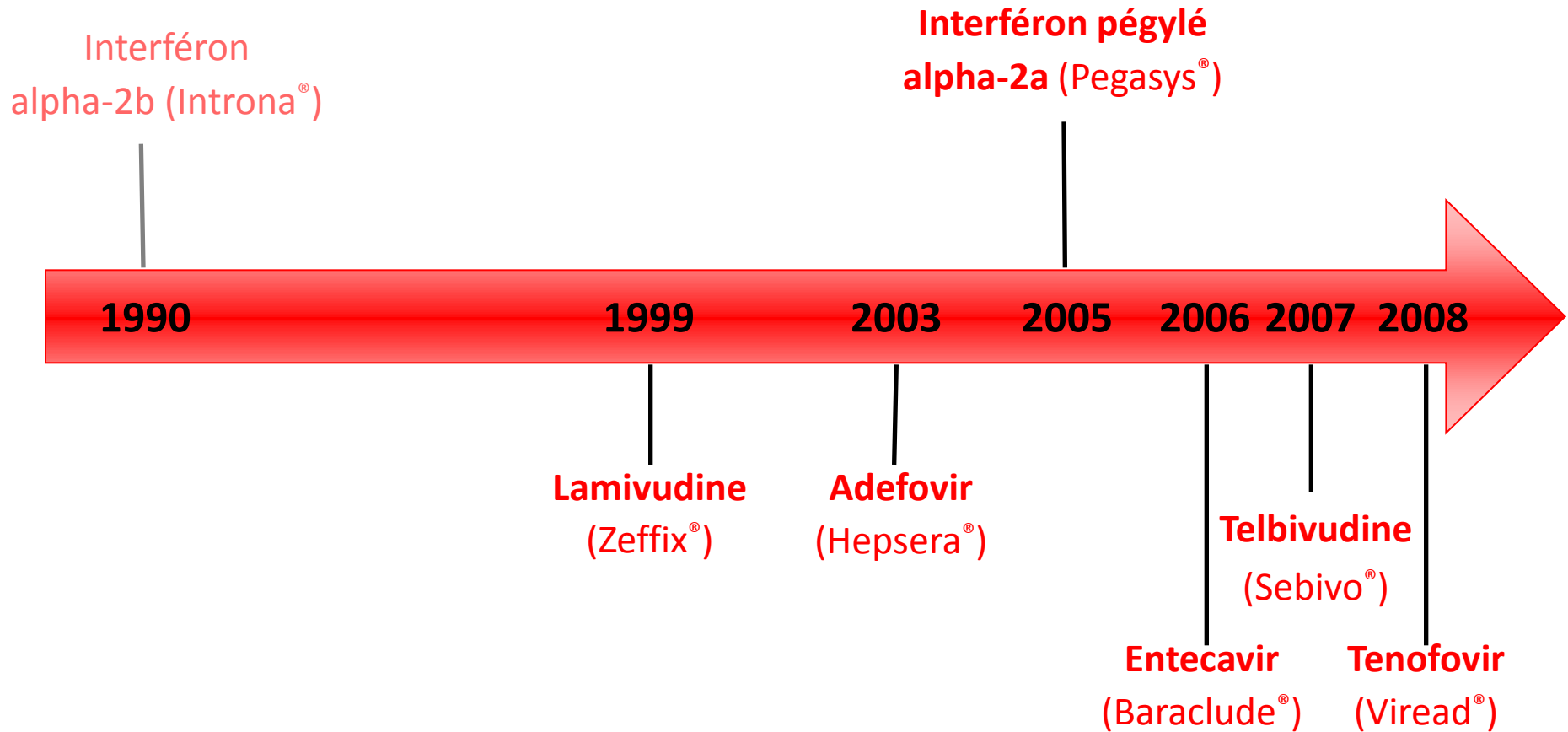
**Centre National de Référence  
des Hépatites Virales B, C et delta  
Laboratoire de Virologie & INSERM U955  
Hôpital Henri Mondor  
Université Paris-Est  
Créteil**



# Plan

- **Introduction**
- **Outils moléculaires**
  
- **Management de l'hépatite chronique B**
  
- **Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse**
  
- **Point of care testing**

# Options Thérapeutiques pour le Traitement de l'Hépatite Chronique B



# Critères d'Evaluation Thérapeutiques

- **Chez les malades AgHBe-positif et -négatif**
  - Perte durable de l'AgHBs avec ou sans séroconversion HBs  
(**Objectif thérapeutique idéal**)
- **Chez les malades AgHBe-positif**
  - Séroconversion HBe durable (**Objectif thérapeutique “discuté”**)
- **Chez les malades AgHBe-négatif et chez les malades AgHBe-positif qui n'ont pas développé de séroconversion HBe**
  - ADN du VHB indétectable sous traitement (analogues)
  - ADN du VHB indétectable après traitement (pegIFN)
  - (**Objectif thérapeutique souhaitable**)

# Critères d'Evaluation Thérapeutiques

- ADN du VHB indétectable sous analogues
  - **24 semaines** après le début du traitement par analogues modérément puissants ou avec une faible barrière génétique (LAM, LdT)
  - **48 semaines** après le début du traitement par analogues puissants et une barrière élevée à la résistance (TDF) ou avec une émergence retardée à la résistance (ADV)
  - **96 semaines** après le début du traitement par analogues puissants et une barrière génétique élevée à la résistance chez le patients naïf (ETV)

# Options Thérapeutiques pour le Traitement de l'Hépatite Chronique C

- **Bithérapie pégylée**
  - Patients infectés par un VHC de génotype 2, 3, 4, 5 et 6, (1)
- **Trithérapie incluant un inhibiteur de protéase (telaprevir ou boceprevir)**
  - Uniquement pour les patients infectés par un VHC de génotype 1

# Critère d'Evaluation Thérapeutique

- **La RVS est utilisé comme critère principal de succès thérapeutique**
  
- **La RVS est définie par un ARN indétectable (<10-15 UI/mL) 24 semaines après l'arrêt du traitement**

# Plan

- Introduction
- **Outils moléculaires**
- Management de l'hépatite chronique B
- Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse
- Point of care testing

# Tests Virologiques Moléculaires

## Tests Qualitatifs-Quantitatifs

Est-ce que le virus est présent et en quelle quantité ?

Détermination  
du Génotype

Quel est le génotype du virus ?

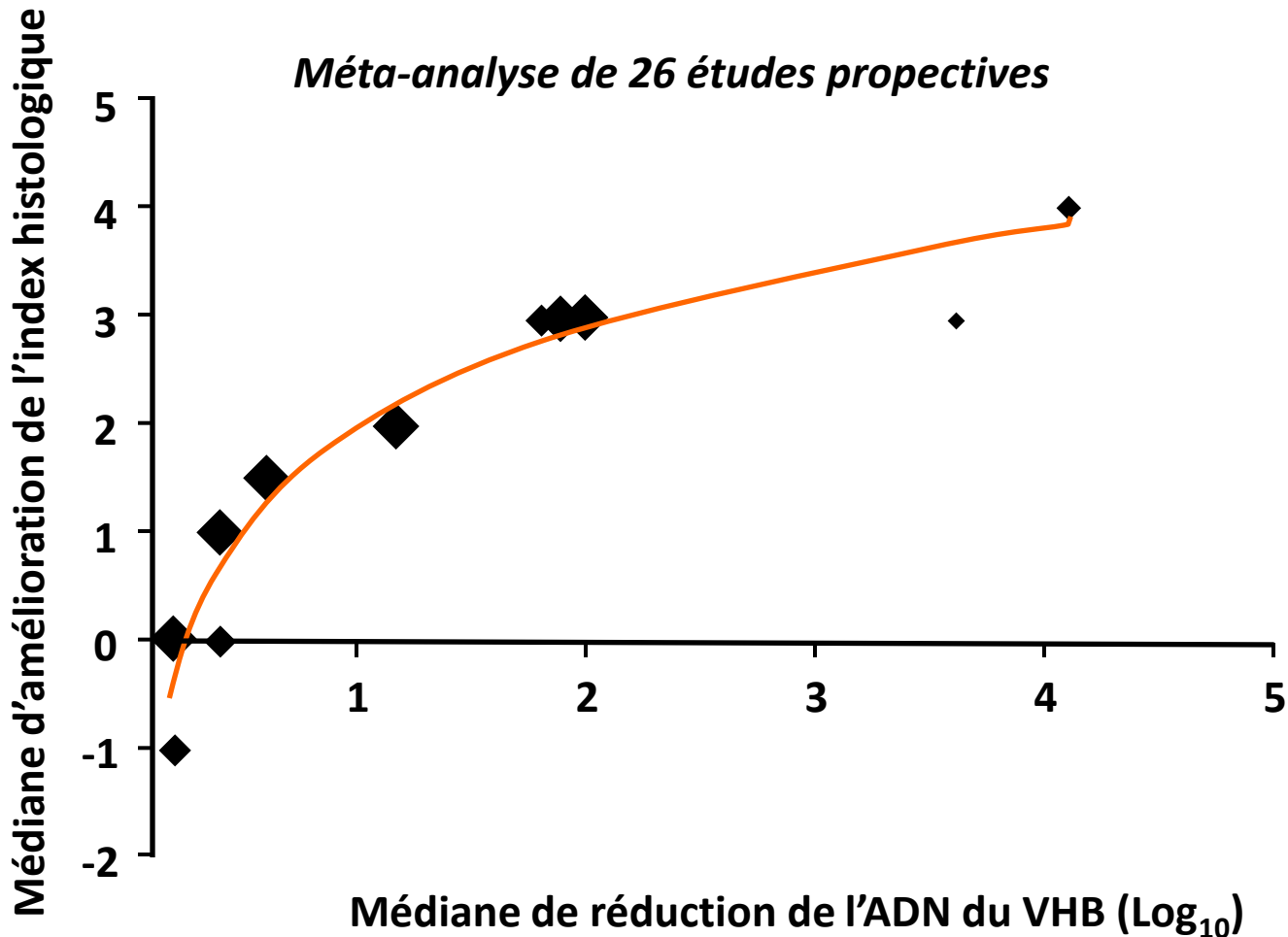
Détection de la résistance

Quel type de virus est présent ?

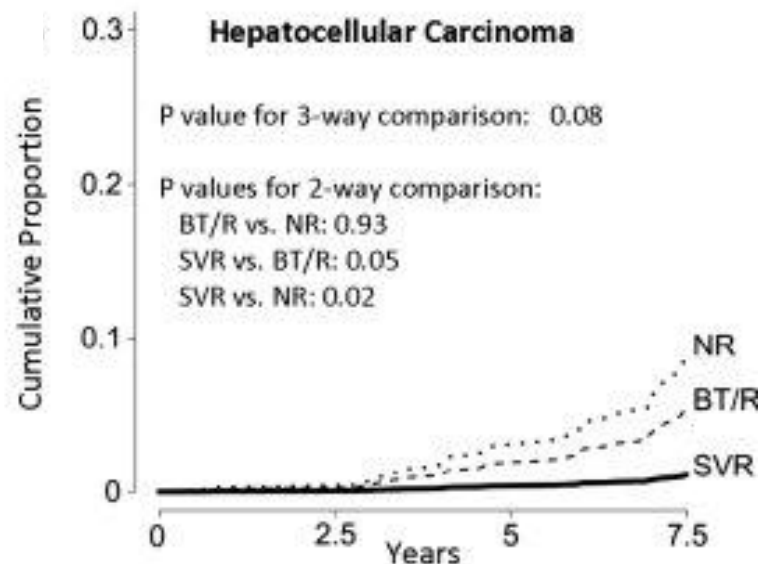
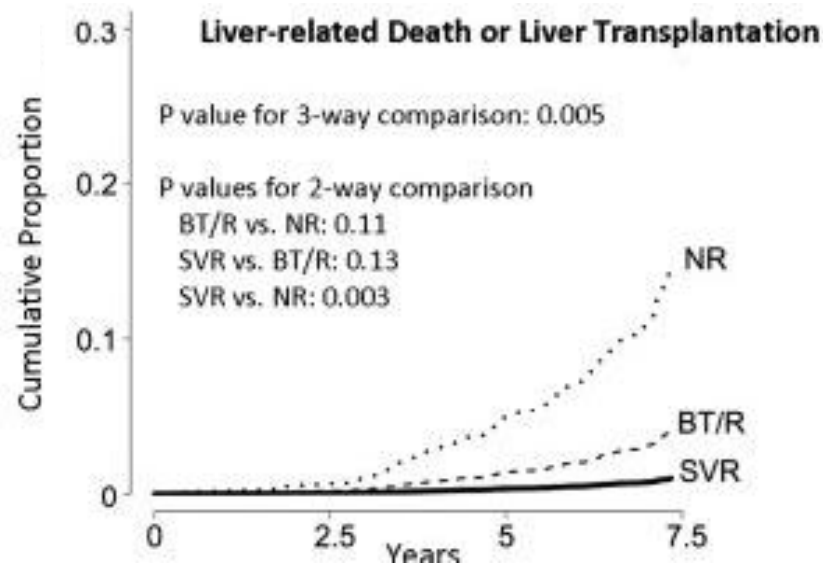
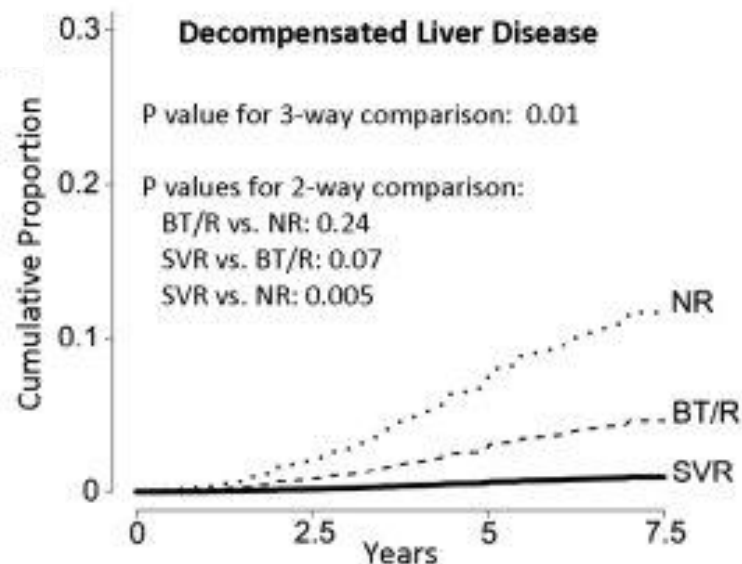
# Plan

- Introduction
- **Outils moléculaires**
  - Quantification des acides nucléiques
- Management de l'hépatite chronique B
- Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse
- Point of care testing

# Amélioration Histologique après Contrôle de la Réplication Virale



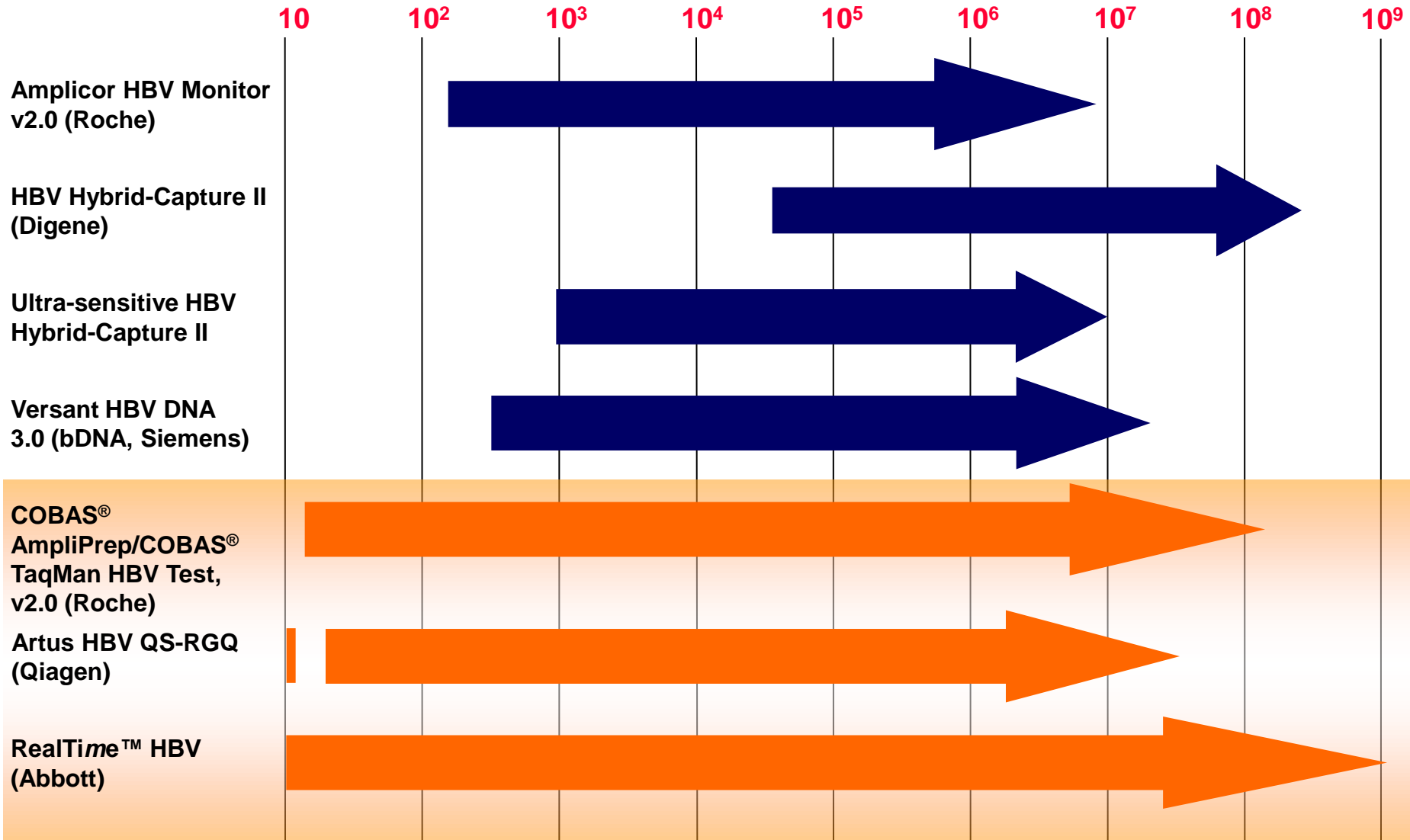
# Réduction des Risques de Complications chez les Patients avec RVS



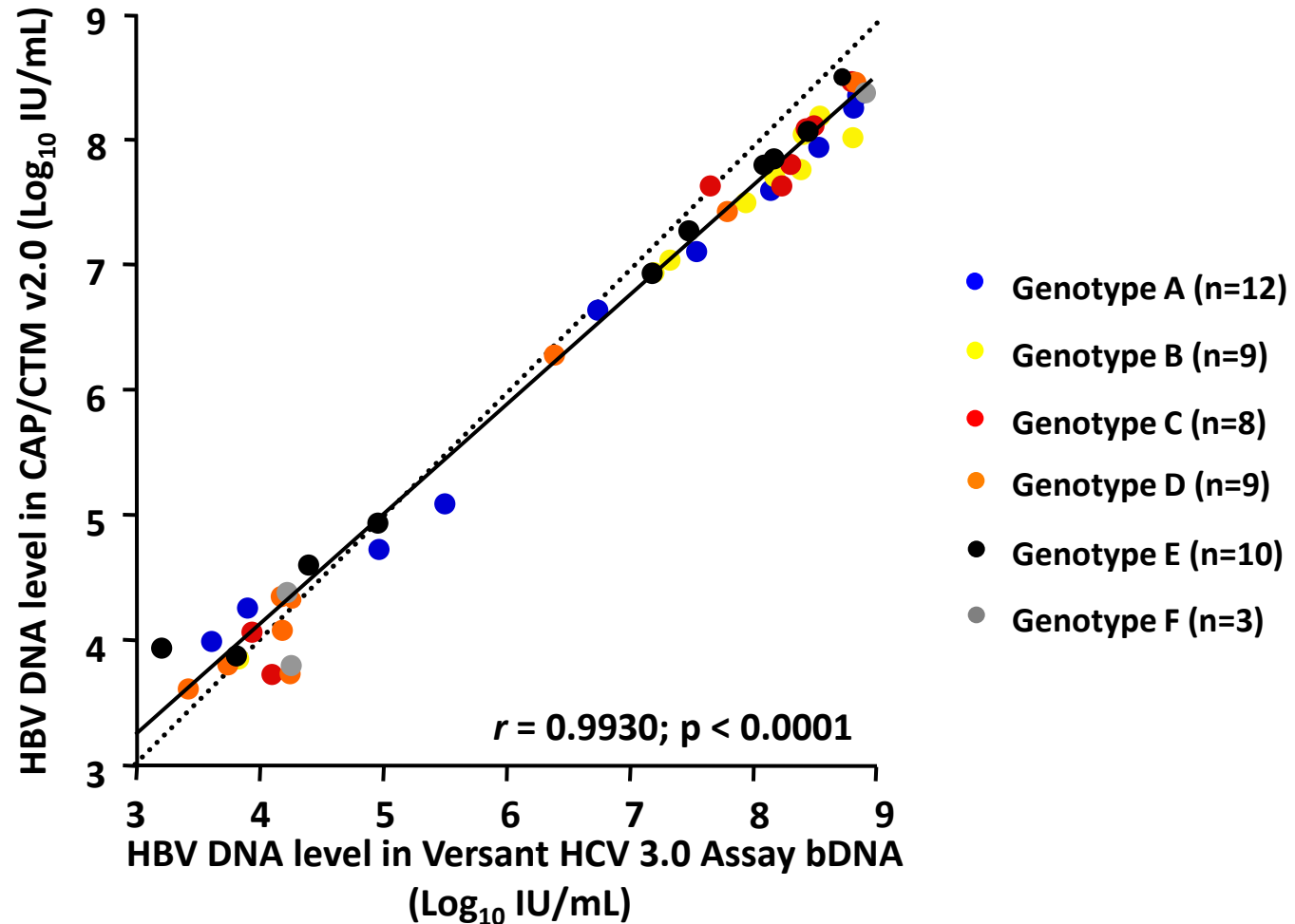
# Avantage Techniques de la PCR en Temps Réel

- **Diminution du risque de contamination**
- **Amélioration de la sensibilité**
- **Augmentation de l'intervalle de quantification linéaire**
- **Amélioration de la précision et de la reproductibilité**
- **Augmentation du débit à travers l'automatisation**

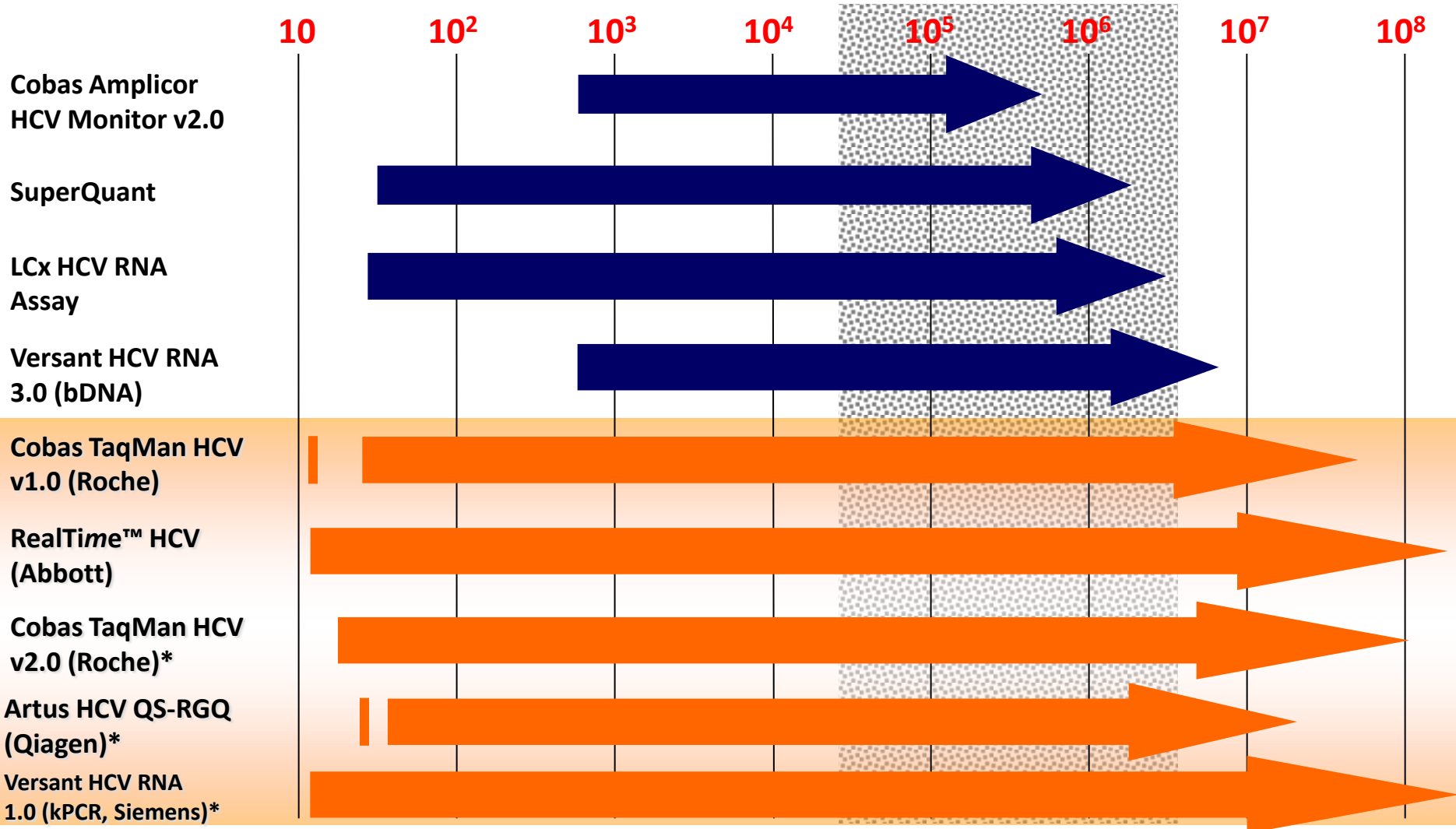
# Intervalles de Quantification (ADN du VHB)



# Quantification de l'ADN du VHB (CTM v2.0, Roche)

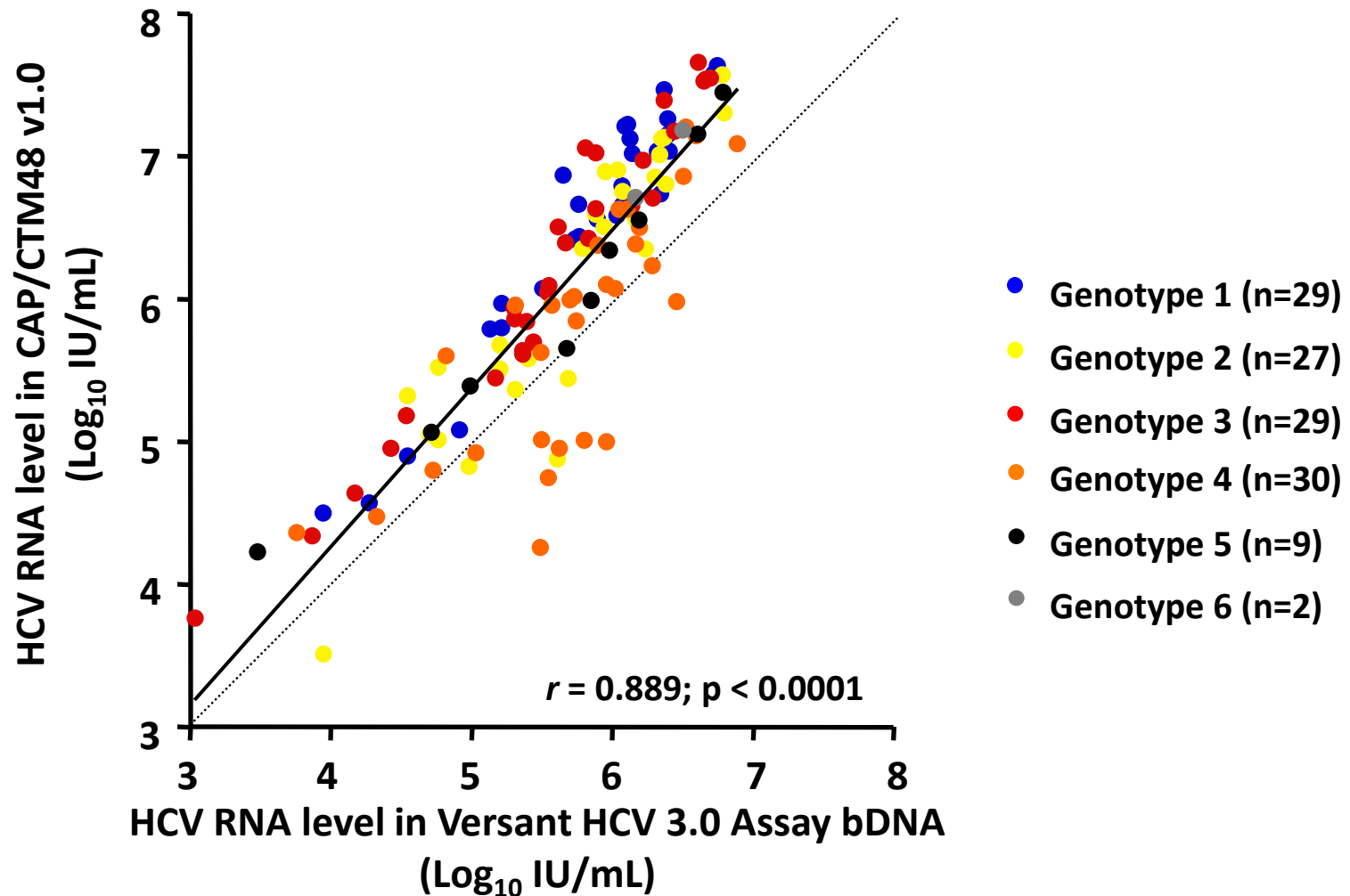


# Intervalles de Quantification (ARN du VHC)

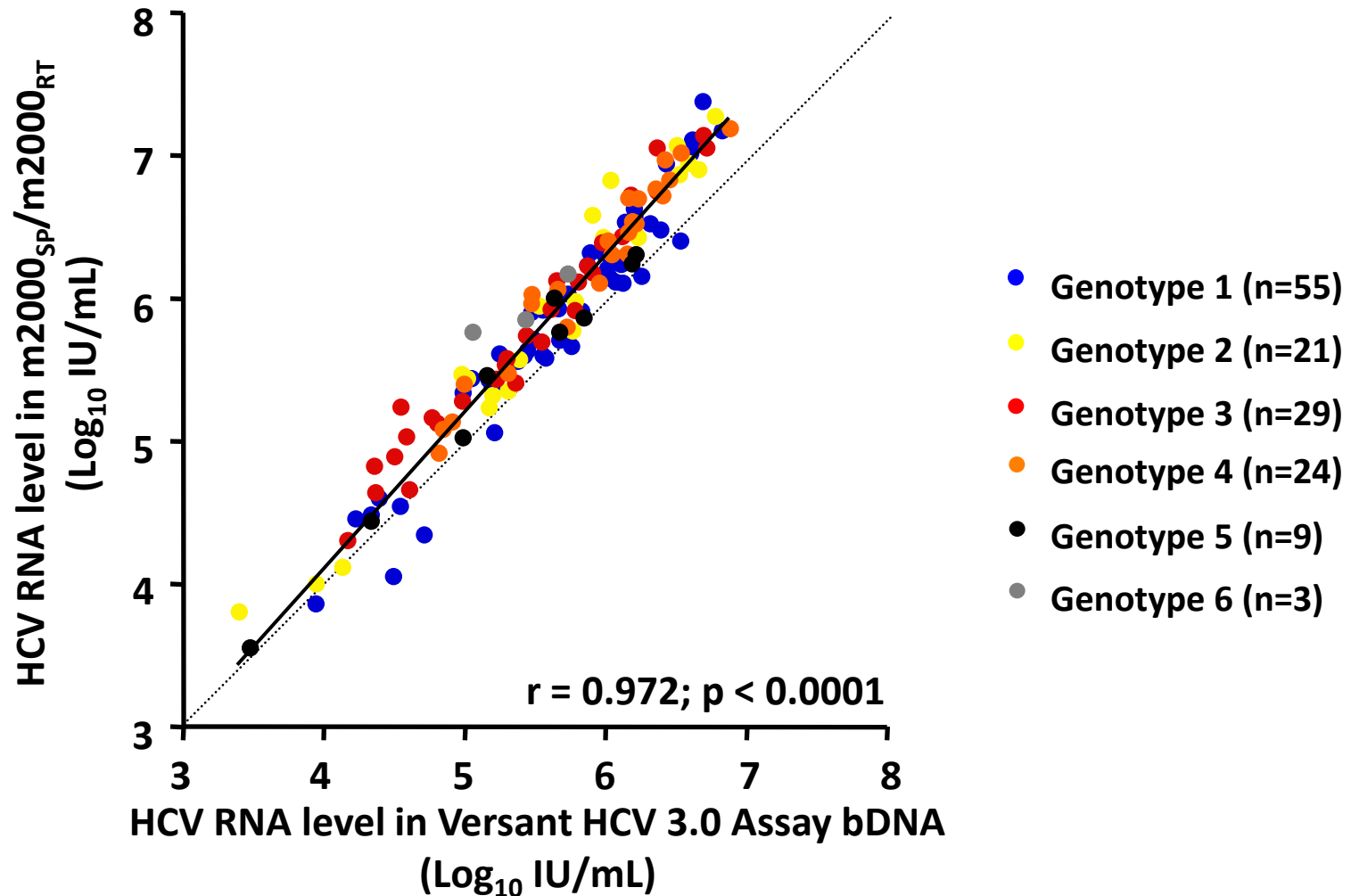


\*in development

# Quantification de l'ARN du VHC (CTM v1.0, Roche)



# Quantification de l'ARN du VHC (m2000, Abbott)



# Applications et Bénéfices de la PCR en Temps Réel

- **Remplace les techniques qualitatives de détection des acides nucléiques**
- **Quantifie l'ensemble des charges virales observées en pratique clinique**
  - Charges virales élevées avant traitement
  - Faibles charges virales au cours du traitement
- **Surveille efficacement les cinétiques virales afin d'évaluer l'efficacité virologique du traitement**

# Résumé

- **En pratique clinique, la quantification des acides nucléiques doit être réalisée à l'aide d'une technique de PCR en temps réel**
  - Résultats exprimés en UI/mL
  - LOD=LOQ de l'ordre de 10 à 20 UI/mL
- **Pour un patient donné, le monitoring de la charge virale doit être réalisé avec la même technique de PCR en temps réel**

# Plan

- Introduction
- **Outils moléculaires**
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
- Management de l'hépatite chronique B
- Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse
- Point of care testing

## Pas d'Intérêt de la Détermination du Génotype du VHB

- Les génotypes A et B répondraient mieux au traitement par pegIFN que les génotypes C et D
- Aucune différence de réponse au traitement par analogues des différents génotypes
- Néanmoins la valeur prédictive individuelle du génotype sur la réponse au traitement est faible
  - Relation très étroite entre le génotype viral et l'ethnie

# Le Génotype du VHC Détermine l'Approche du Traitement VHC

- **Génotypes 2/3, 4, (5/6)**
  - Maintien de la bithérapie pégylée (pegIFN/RBV)
- **Génotype 1**
  - Option thérapeutique possible : inhibiteur de protéase en association à l'interféron pégylé et la ribavirine
  - Boceprevir (Victrelis®) et Telaprevir (Incivo®) approuvés depuis mai 2011 par la FDA et respectivement en juillet et septembre 2011 par l'EMA

# Détermination du Génotype

- **Méthodes moléculaires (genotyping)**
  - Analyse de la séquence après séquençage direct
  - Hybridation inverse des produits d'amplification sur des supports solides comportant des sondes génotype spécifiques : Line Probe Assay (INNO-LiPA HCV, Innogenetics)
  - PCR en temps réel à l'aide d'amorces et de sondes génotype spécifiques
- **Méthodes sérologiques ("serotyping")**
  - ELISA compétitif



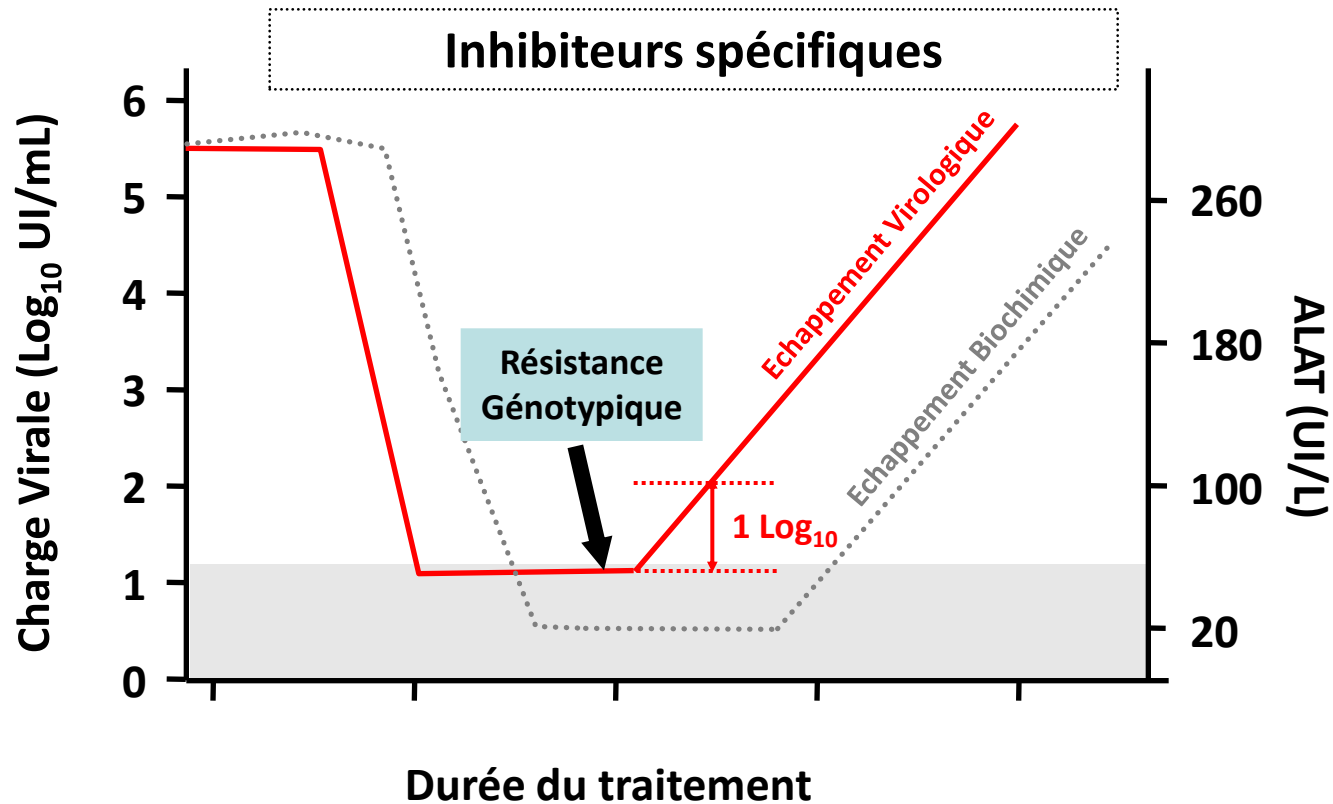
# Résumé

- **Détermination du génotype (sous-type) VHC**
  - La détermination du génotype sur la seule région 5'NC doit être proscrite
  - La 2<sup>nd</sup>e génération de Line Probe Assay qui utilise des sondes dirigées contre la région core en plus de la région 5'NC est la meilleure méthode permettant de distinguer les sous-types 1a et 1b
  
- **Détermination du génotype VHB**
  - A ce jour, aucun intérêt à titre individuel dans la prise en charge thérapeutique

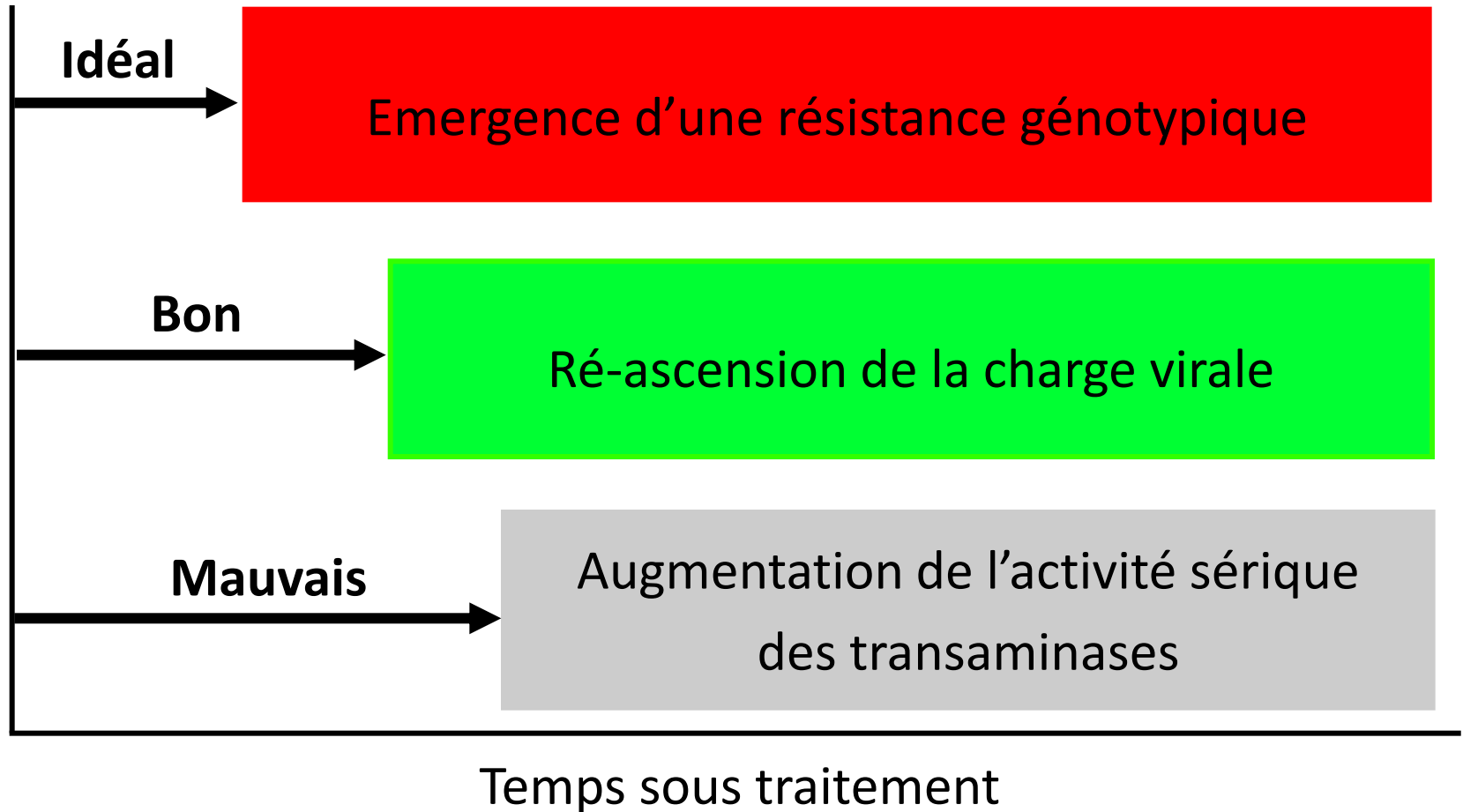
# Plan

- Introduction
- **Outils moléculaires**
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- Management de l'hépatite chronique B
- Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse
- Point of care testing

# Traduction de la Résistance



# Quand Doit-on Intervenir ?



# Techniques Moléculaires de Détection des Substitutions

## "Méthodes commerciales"

Séquençage direct du sous-domaine RT

- Sensibilité +
- Détection des variants représentant au moins 20% à 25% de la population virale
- Nécessaire pour détecter les substitutions non encore décrites

*Hybridation Inverse (INNO-LiPA)*

- Sensibilité ++
- Détection des variants représentant au moins 5% à 10% de la population virale
- Détection exclusive des substitutions décrites

## "Recherche"

Pyro-séquençage Haut Débit (UPDS)\*

MALDI-TOF













DNA Chips

PCR en temps réel

RFLP

- Détection de variants représentant 1% à 5% de la population, voire 0,1%\*
- Détection exclusive des substitutions décrites, excepté pour le pyroséquençage

# Méthodes Commerciales Utilisées en Pratique Clinique pour le VHB

	TRUGENE HBV Genotyping	Abbott HBV Sequencing	INNO-LiPA HBV DR v3
Méthodes	Semi-automatisée	Manuelle	Manuelle
Génotype Viral			
Substitutions AA			
- Gène S			
- Gène P			
Détection de nouvelles mutations			
Sensibilité	20-25%	20-25%	>5%

# Indications des Tests de Résistance Génotypique

- Cas du VHB
  - . Patients ayant une réponse virologique partielle
  - . Patients ayant un échappement virologique
  - . Patients avant la mise sous traitement ?
  
- Cas du VHC
  - . Patients ayant un échappement virologique ?
  - . Patients avant la mise sous traitement ?

# Intérêts des Tests Moléculaires dans le Diagnostic des Infections VHB et VHC

- Réduction de la fenêtre sérologique

Virus	Sérologie "standard"	Tests "combo"	DGV
VHB	35-44 jours	NA	20-22 jours
VHC	~70 jours	~40-50 jours	3-5 jours

# Intérêts des Tests Moléculaire dans la Prise en Charge Thérapeutique

- Décision de traiter
- Optimisation du schéma thérapeutique
- Etude de la réponse virologique au traitement

# Plan

- Introduction
- Outils moléculaires
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- **Management de l'hépatite chronique B**
- **Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse**
- Point of care testing

# Plan

- Introduction
- Outils moléculaires
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- **Management de l'hépatite chronique B**
  - Traitement par IFN pégylé
- Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse
  
- Point of care testing

# Monitorage Virologique des Patients sous IFN Pégylé

- **Quantification de la charge virale (ADN du VHB)**
  - Avant traitement, à la semaine 12 puis périodiquement toutes les 12 à 24 semaines
  - A l'aide d'une méthode de PCR en temps réel (seuil de détection <10 à 20 UI/mL)
- **Quantification de l'AgHBs**
  - Identification précoce des patients non répondeurs au traitement par interféron pégylé (règle d'arrêt à S12)
- **Quantification de l'AgHBe ?**

# Cinétiques de l'AgHBs et Prédiction de la Réponse sous IFN Pégylé

Diminution de l'AgHBs à S12	Nombre de patients	Réponse au traitement	
		VPP	VPN
<b>Patients AgHBe-positif</b>			
Absence de diminution	202	25%	97%
<1500 UI/mL	92	46%	86%
<1500 UI/mL	58	33%	91%
<b>Patients AgHBe-positifs</b>			
Diminution $\geq 10\%$	120	47%	84%
>0,5 Log <sub>10</sub> UI/mL	48	89%	90%
Absence de diminution	107	NA	100%

# Plan

- Introduction
- Outils moléculaires
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- **Management de l'hépatite chronique B**
  - Traitement par IFN pégylé
  - Traitement par analogues nucléos(t)idiques
- Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse
  
- Point of care testing

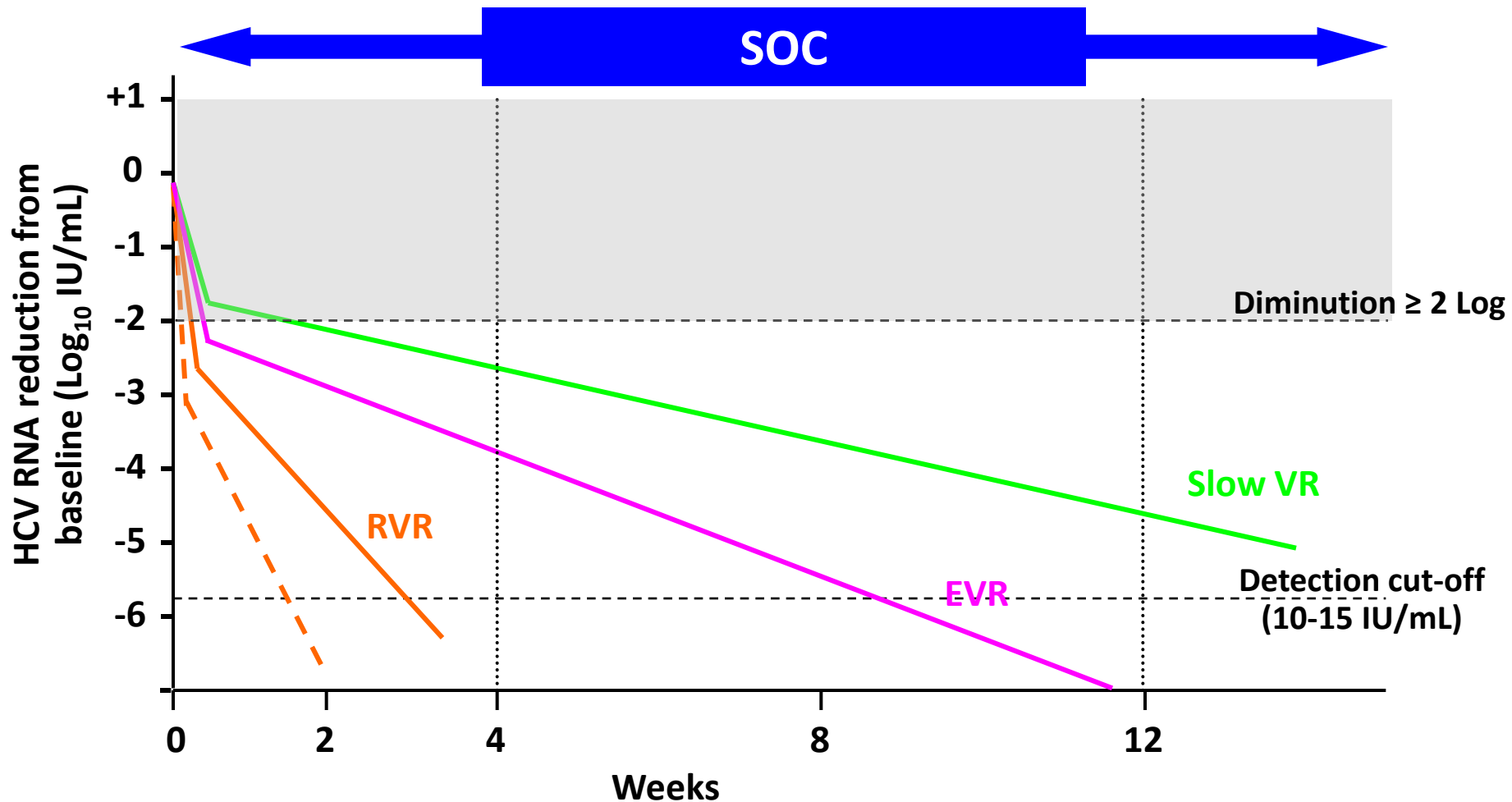
# Monitorage Virologique des Patients sous Analogues

- **Quantification de la charge virale (ADN du VHB)**
  - Avant traitement, à la semaine 12 puis périodiquement toutes les 12 à 24 semaines
  - A l'aide d'une méthode de PCR en temps réel (seuil de détection <10 à 15 UI/mL)
- **Détermination du profil de résistance génotypique**
  - Echappement virologique
  - Réponse virologique partielle
  - A l'aide d'une méthode de séquençage haut-débit ?
- **Quantification de l'AgHBs ?**
- **Quantification de l'AgHBe ?**

# Plan

- Introduction
- Outils moléculaires
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- **Management de l'hépatite chronique B**
  - Traitement par IFN pégylé
  - Traitement par analogues nucléos(t)idiques
- **Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse**
  
- Point of care testing

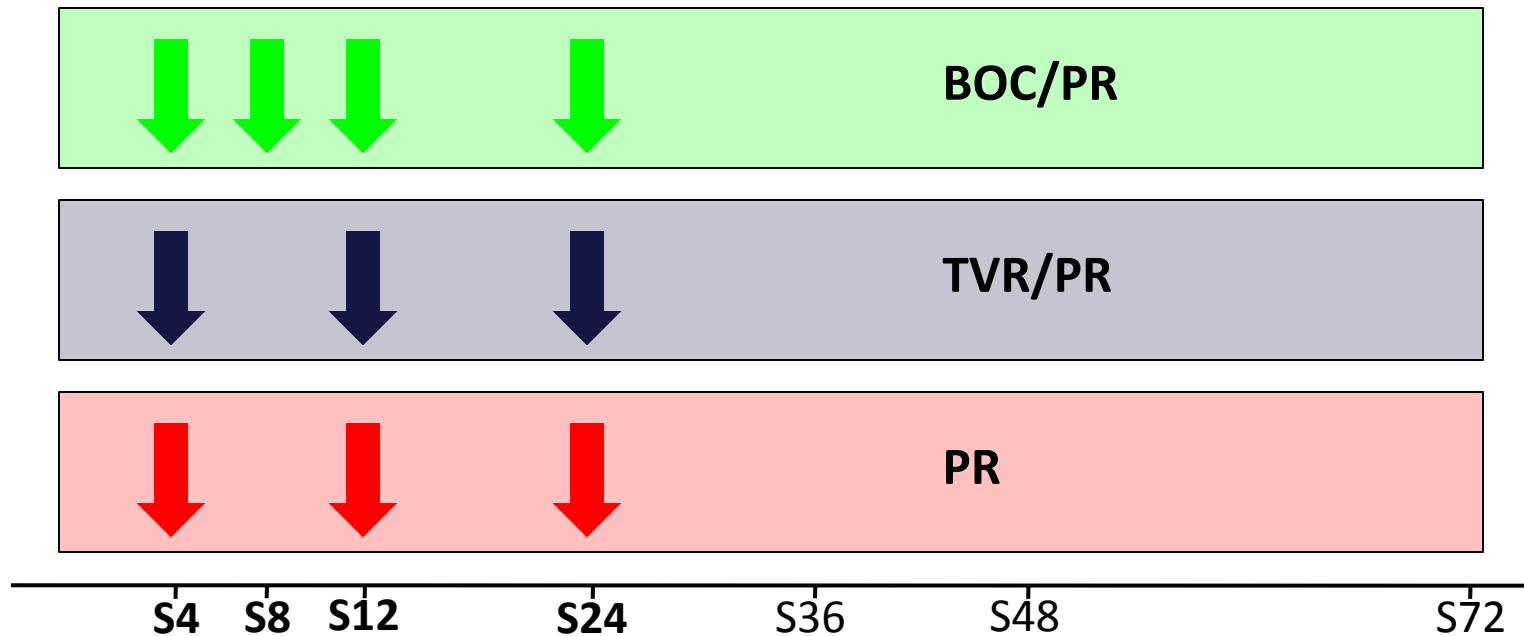
# Réponses Virologiques en Fonction des Cinétiques Virales



# Définitions des Réponses Virologiques

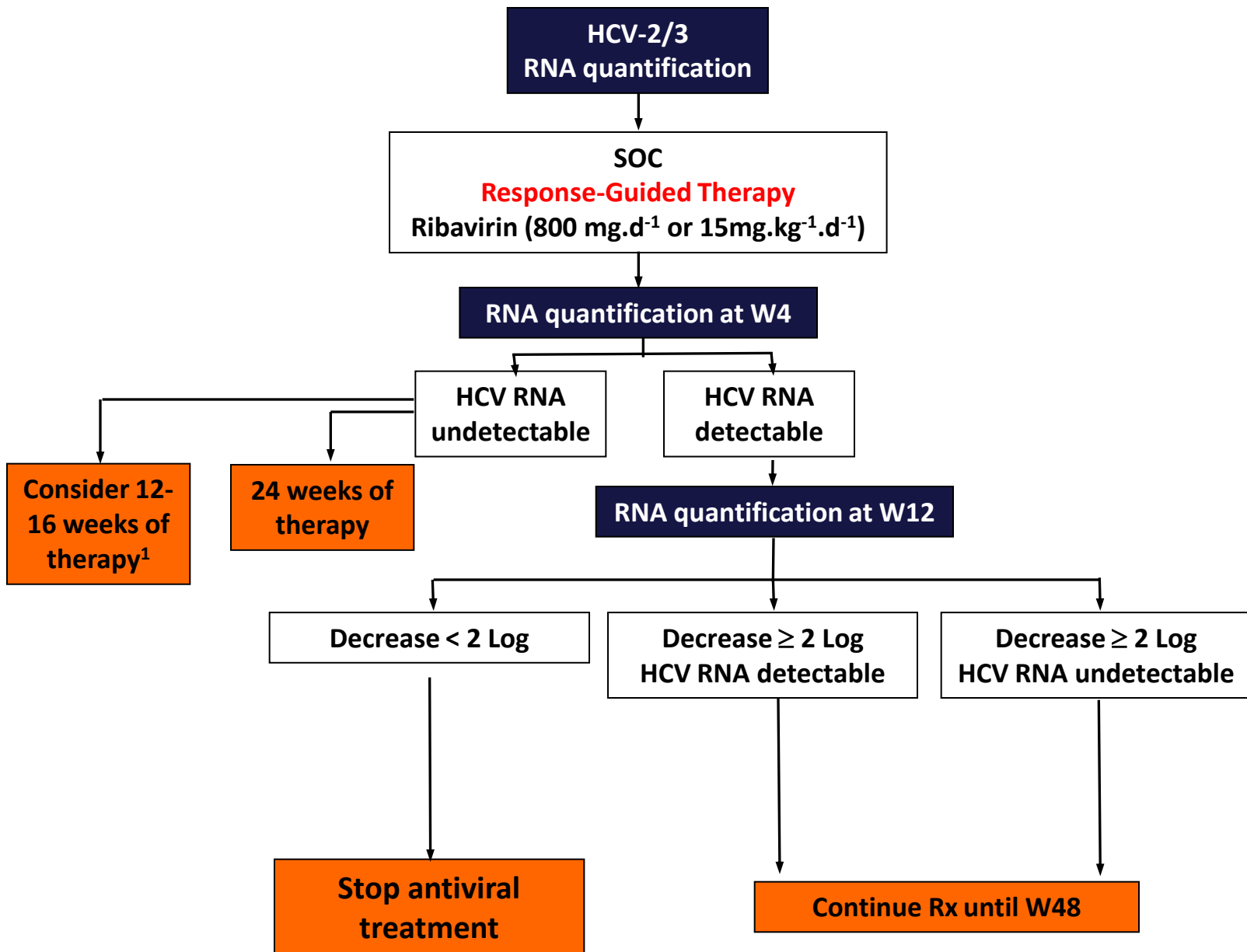
<i>Response</i>	<i>Definition</i>
SVR	HCV RNA undetectable 24 weeks after the end of treatment
RVR	HCV RNA undetectable at week 4
EVR	HCV RNA undetectable at week 12
DVR	>2 Log <sub>10</sub> IU/mL drop but detectable HCV RNA at week 12
Null response	Less than 2 Log <sub>10</sub> IU/mL in HCV RNA from baseline at week 12
Partial response	>2 Log <sub>10</sub> IU/mL decrease in HCV RNA from baseline at week 12 but still detectable at weeks 12 and 24
Viral breakthrough	HCV RNA detectable at any time during treatment after virological response
Relapse	HCV RNA detectable after withdrawal treatment in patient who was undetectable at the end of treatment
<b><i>New response categories with protease inhibitor-based therapy</i></b>	
eRVR with BOC	HCV RNA undetectable at weeks 8 and 24
eRVR with TVR	HCV RNA undetectable at weeks 4 and 12

# Monitorage Virologique des Patients sous Bithérapie Pégylée ou Trithérapie Incluant un IP



# Plan

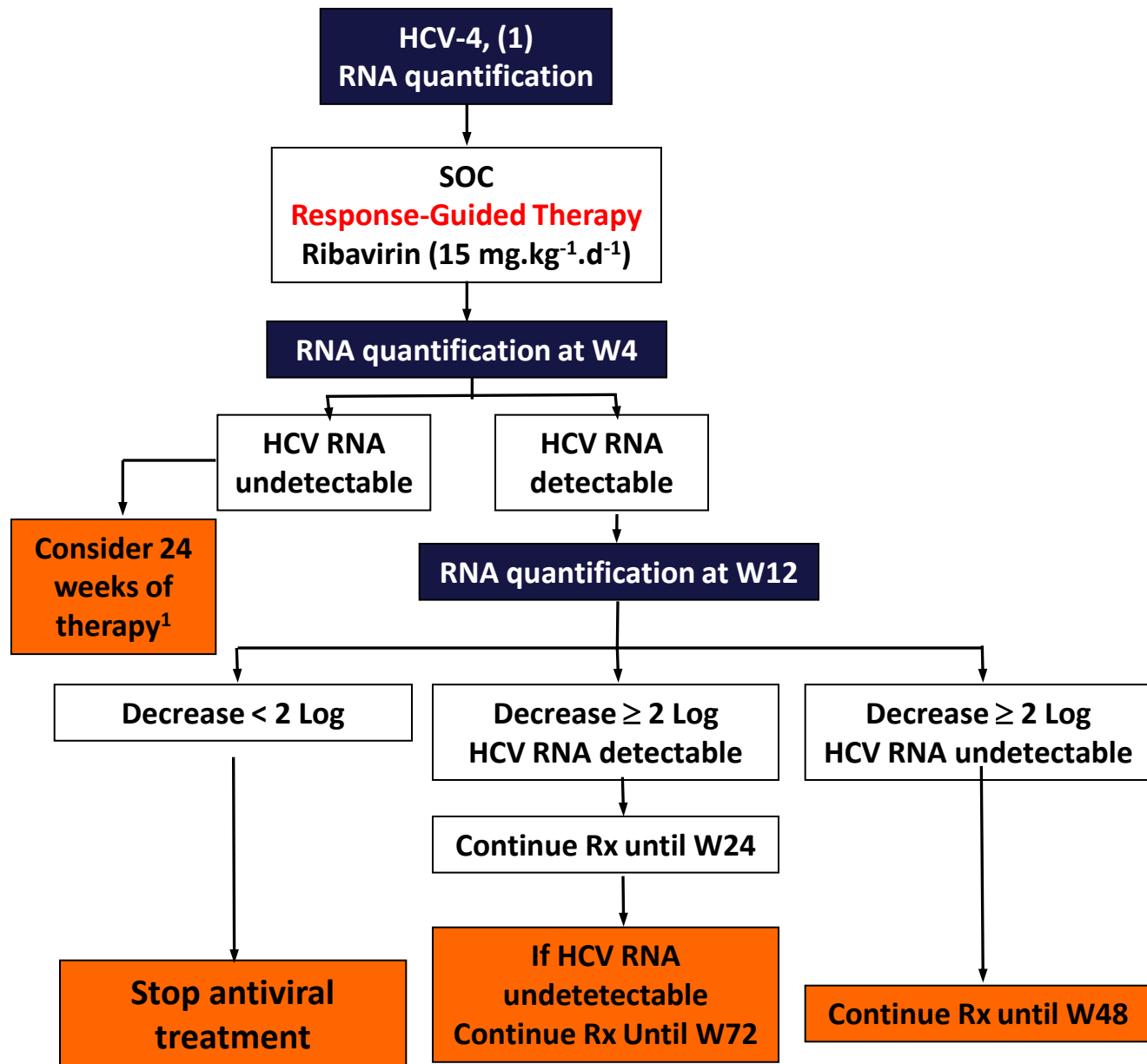
- Introduction
- Outils moléculaires
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- **Management de l'hépatite chronique B**
  - Traitement par IFN pégylé
  - Traitement par Analogues nucléos(t)idiques
- **Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse**
  - Patients naïfs infectés par un génotype 2/3
  
- Point of care testing



<sup>1</sup>In patients with a low viral load at baseline (<400,000 IU/mL); Marginally less effective due to higher rates of relapse in genotype 3 with high HCV RNA level.

# Plan

- Introduction
- Outils moléculaires
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- **Management de l'hépatite chronique B**
  - Traitement par IFN pégylé
  - Traitement par analogues nucléos(t)idiques
- **Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse**
  - Patients naïfs infectés par un génotype 2/3
  - Patients naïfs infectés par un génotype 4
- Point of care testing



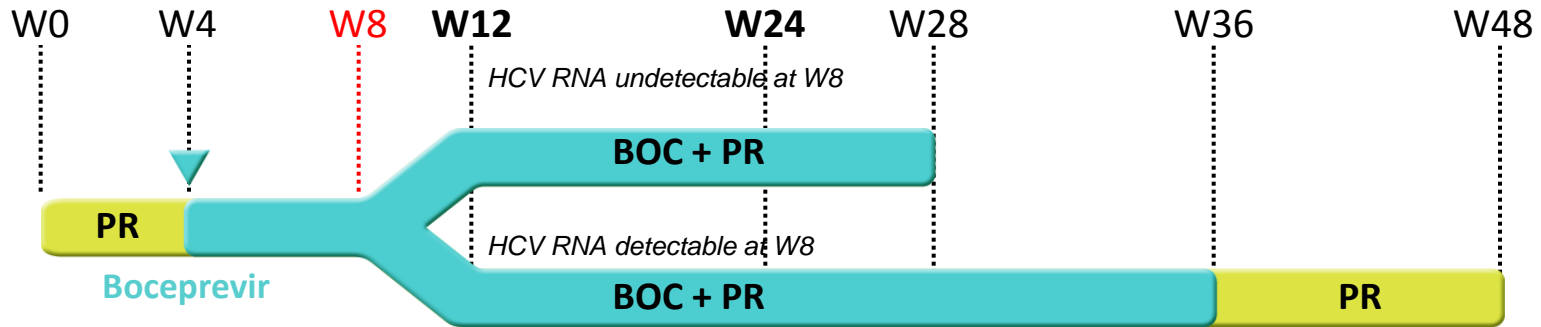
<sup>1</sup>In patients with a low viral load at baseline (<400,000 IU/mL); <sup>2</sup>In patients with a low viral load at baseline (400,000-600,000 IU/mL)

# Plan

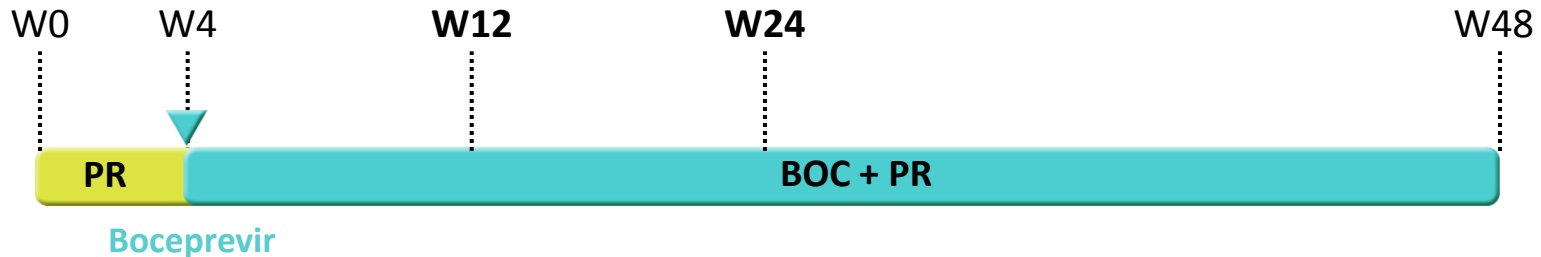
- Introduction
- Outils moléculaires
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- Management de l'hépatite chronique B
  - Traitement par IFN pégylé
  - Traitement par Analogues nucléos(t)idiques
- **Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse**
  - Patients naïfs infectés par un génotype 2/3
  - Patients naïfs infectés par un génotype 4
  - Patients naïfs infectés par un génotype 1
- Point of care testing

# Durée de Traitement par Boceprevir

Treatment-naïve patients without cirrhosis



Cirrhotic patients, poor-IFN responders (<1 Log at W4) and null responders

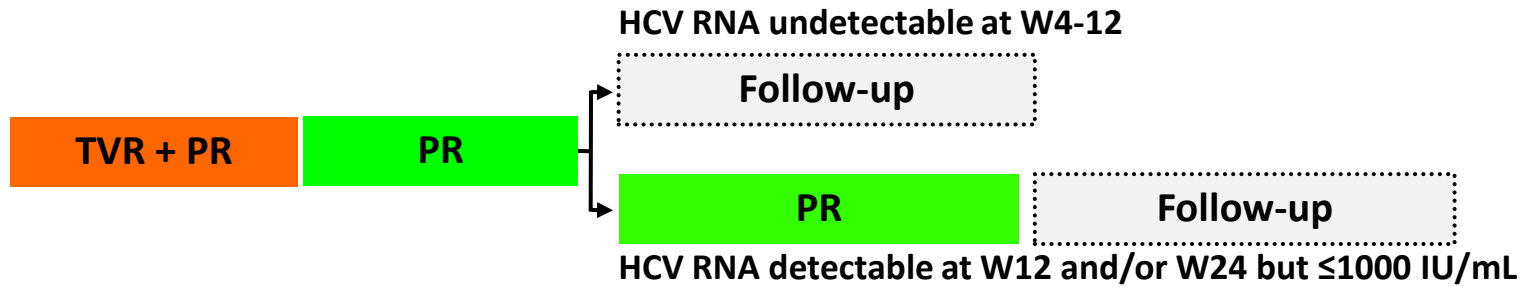


# Règles d'Arrêt

- Elles diffèrent pour le **BOC** et le TVR
  - Si l'ARN du VHC  $\geq 100$  UI/mL ( $2 \text{ Log}_{10}$ ) à la **semaine 12**, les trois médicaments doivent être arrêtés
  - Si l'ARN du VHC est **confirmé détectable** ( $>10^{-15}$  UI/mL) à la **semaine 24**, les trois médicaments doivent être arrêtés

# Durée de Traitement par Telaprevir

Treatment-naïve patients without cirrhosis



cirrhotic treatment-naïve patients



W4 W12

W24

W36

W48

W72

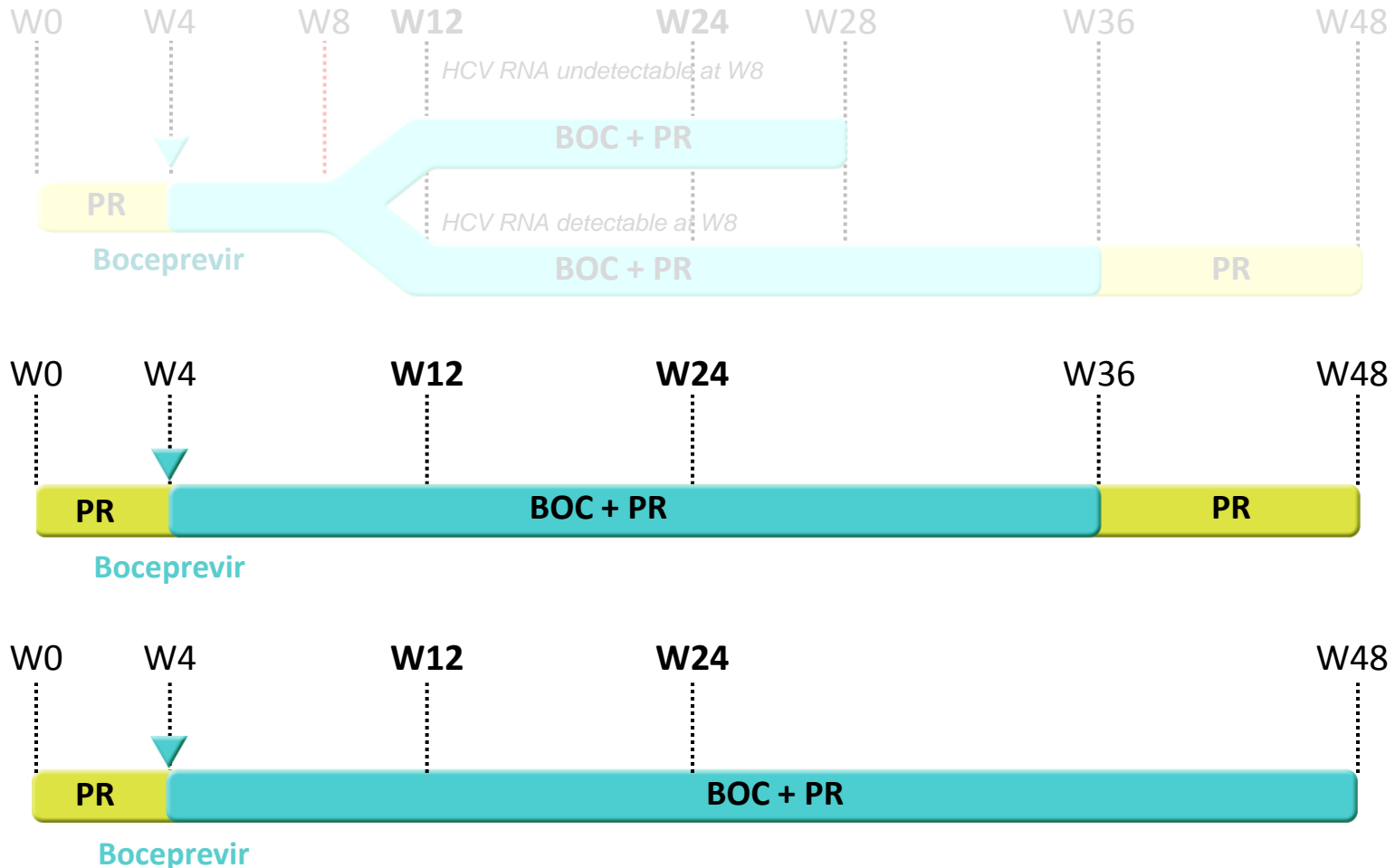
# Règles d'Arrêt

- Elles diffèrent pour le **TVR** et le **BOC**
  - Si l'ARN du VHC **>1000 UI/mL** ( $3 \text{ Log}_{10}$ ) à la **semaine 4 et 12**, les trois médicaments doivent être arrêtés
  - Si l'ARN du VHC est **confirmé détectable** ( $>10^{-15}$  UI/mL) à la **semaine 24**, la combinaison pegIFN et ribavirine doit être arrêtée

# Plan

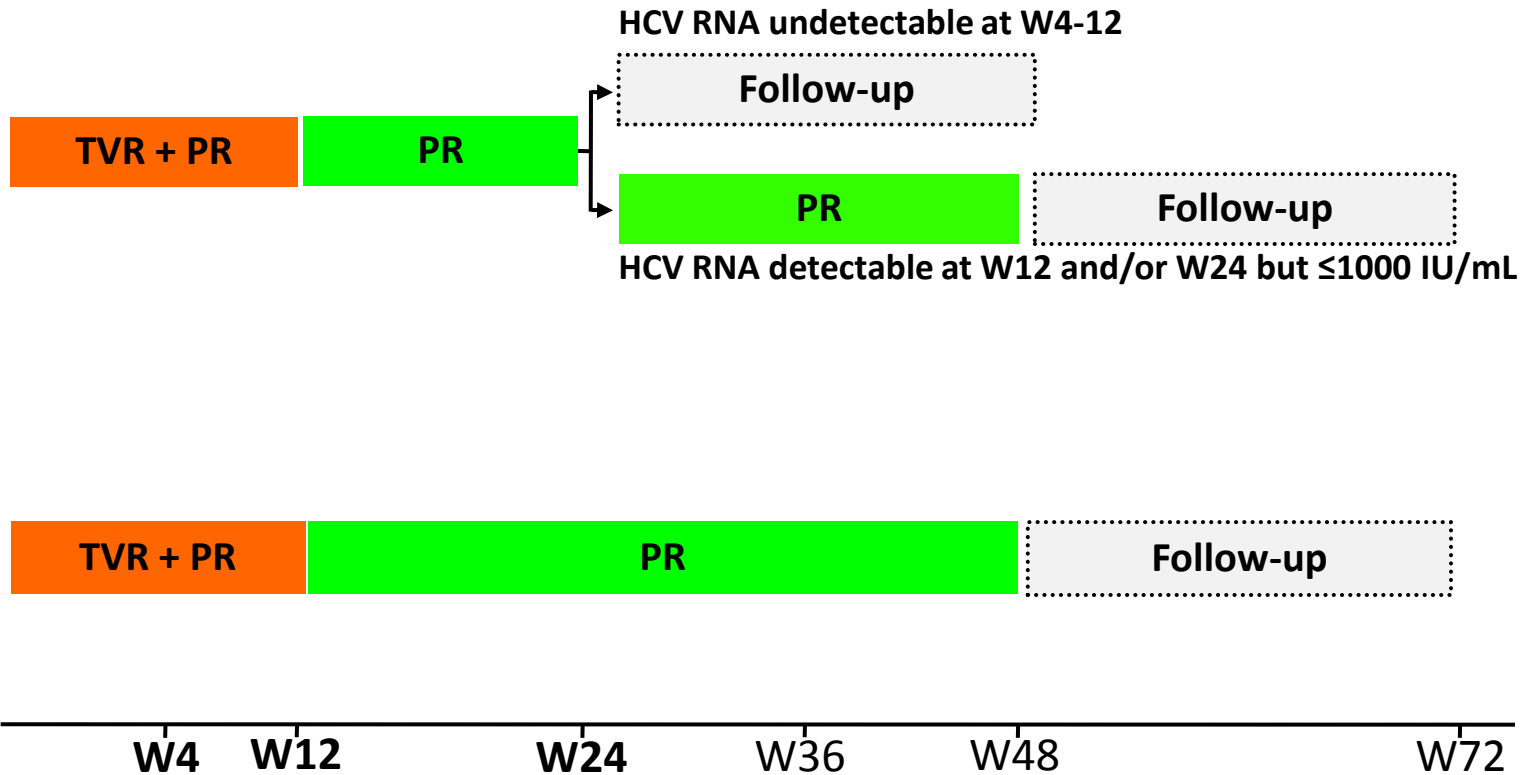
- Introduction
- Outils moléculaires
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- Management de l'hépatite chronique B
  - Traitement par IFN pégylé
  - Traitement par Analogues nucléos(t)idiques
- **Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse**
  - Patients naïfs infectés par un génotype 2/3
  - Patients naïfs infectés par un génotype 4
  - Patients naïfs infectés par un génotype 1
  - Patients non répondeurs infectés par un VHC de génotype 1
- Point of care testing

# Durée de Traitement par Boceprevir



# Durée de Traitement par Telaprevir

Treatment-naïve patients without cirrhosis and relapsers



# Plan

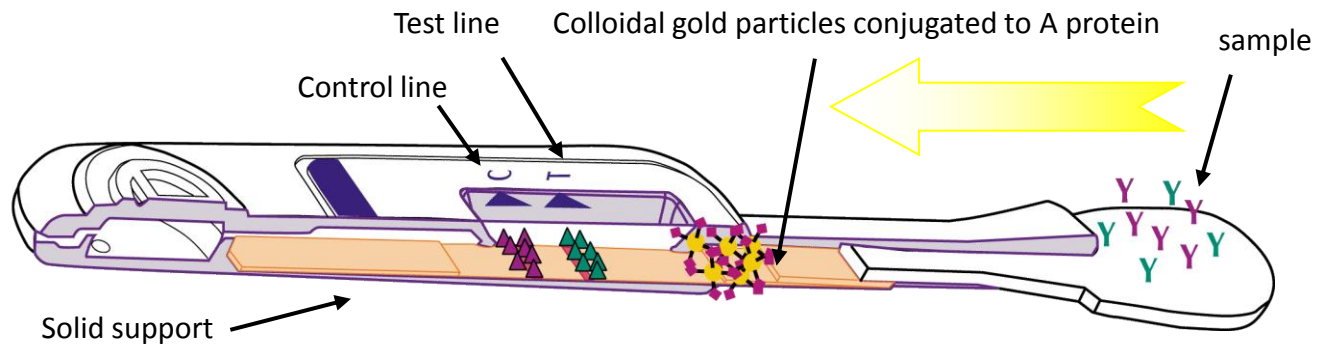
- **Introduction**
- **Outils moléculaires**
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- **Management de l'hépatite chronique B**
  - Traitement par IFN pégylé
  - Traitement par Analogues nucléos(t)idiques
- **Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse**
  - Patients naïfs infectés par un génotype 2/3
  - Patients naïfs infectés par un génotype 4
  - Patients naïfs infectés par un génotype 1
  - Patients non répondeurs infectés par un VHC de génotype 1
- **Point of care testing**

# “Point Of Care Testing“ (POCT) La Biologie Délocalisée auprès du Patient

- Permettre le dépistage à large échelle parmi les populations à risque
- Réduire les risques de complications à long terme liées aux hépatites virales
- Prévenir les futures transmissions
- Favoriser l'accès aux structures de soins de certaines populations (marginalisées, sans protection sociale)
- Permettre l'accès aux traitements antiviraux dans les PED
- Promouvoir la vaccination

# POCT en Médecine

- **Tests immunologiques** fondés sur des méthodes immunochromatographiques ou d'immunocapture permettant la détection des anticorps ou d'antigènes



- **Tests non-immunologiques** fondés sur la détection et éventuellement la quantification d'acides nucléiques, (ainsi que la détection des anticorps ou d'antigènes)



# Plan

- **Introduction**
- **Outils moléculaires**
  - Quantification des acides nucléiques
    - . Quel type de PCR en temps doit-on utiliser ?
  - Détermination du génotype
    - . Quel type de test doit-on utiliser ?
  - Détermination du profil de résistance génotypique
- **Management de l'hépatite chronique B**
  - Traitement par IFN pégylé
  - Traitement par Analogues nucléos(t)idiques
- **Management de l'hépatite chronique C : traitement guidé par la réponse**
  - Patients naïfs infectés par un génotype 2/3
  - Patients naïfs infectés par un génotype 4
  - Patients naïfs infectés par un génotype 1
  - Patients non répondeurs infectés par un VHC de génotype 1
- **Point of care testing**
  - “Dried blood spot”

# “Dried Blood Spot“

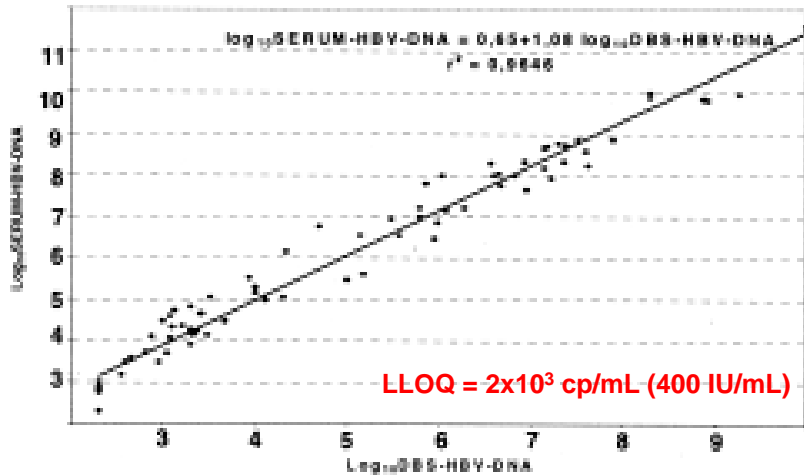
- **Forces**

- Faibles volumes nécessaires (50-70  $\mu\text{L}$ )
- Stabilité de la matrice biologique
- Facilité de recueil et d'acheminement des buvards
- Analyses sérologiques, moléculaires et pharmacologiques possibles

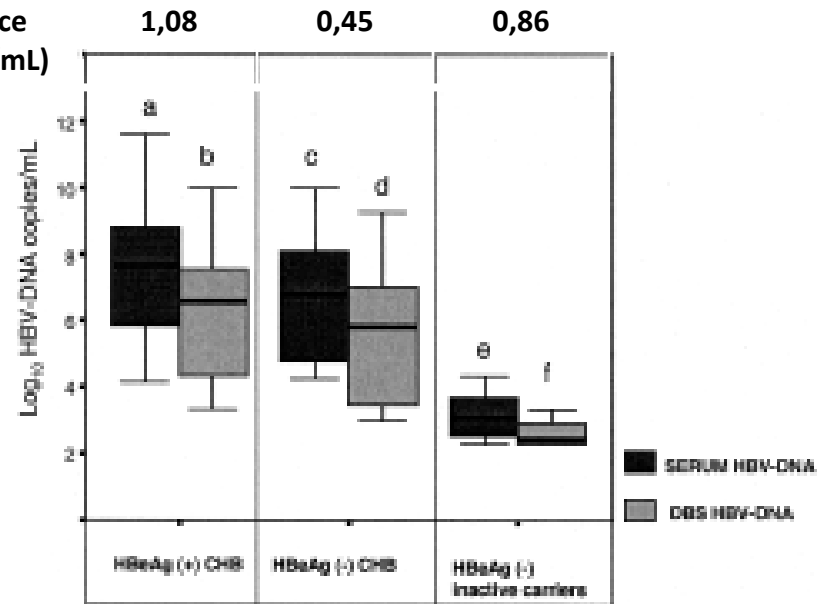
- **Faiblesses**

- Plus faible sensibilité analytique par rapport aux matrices usuelles (sérum, plasma)
- Absence de standards permettant d'évaluer la qualité de la procédure utilisée
- Nécessité d'un stockage des buvards à  $-20^{\circ}\text{C}$

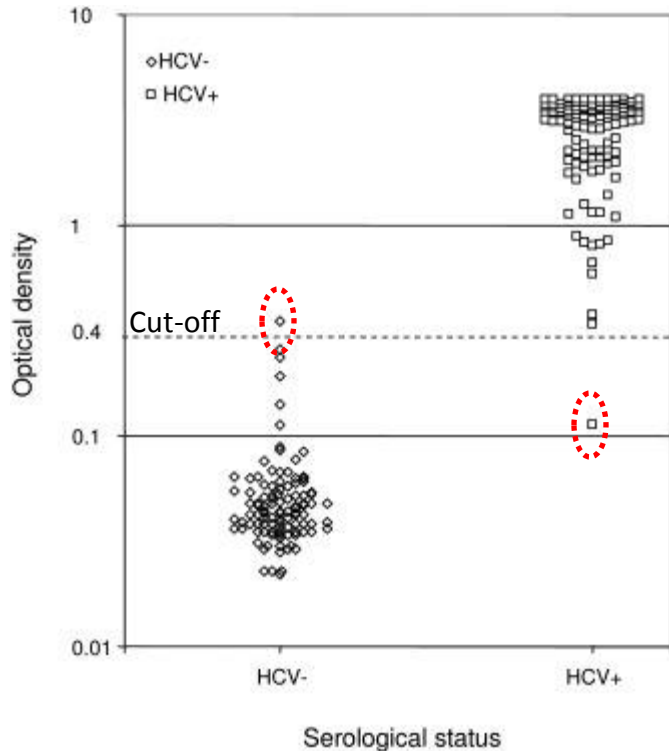
# ADN du VHB et DBS



Mean difference (Log cp/mL)

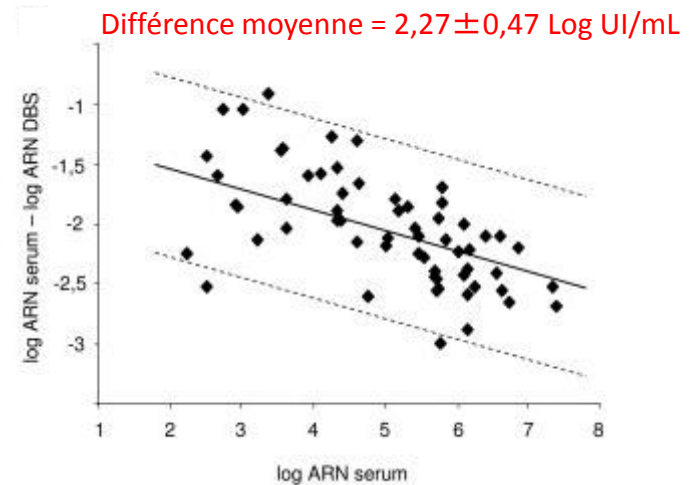
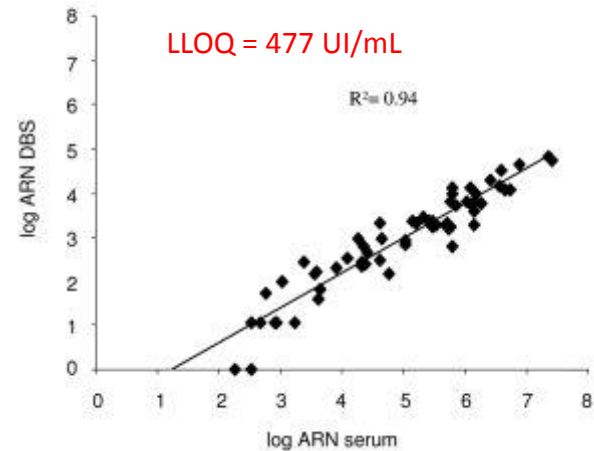


# Diagnostic de l'Infection VHC



**Sensibilité = 99,0%**

**Spécificité = 98,0%**



# Résumé

- L'utilisation des TROD est en plein essor dans le champs des hépatites virales
- La salive pourrait être une matrice prometteuse pour la détection de l'infection virale B & C
- Les DBS pourraient être une alternative pour le diagnostic de l'infection par le VHB ou le VHC, ainsi que pour la quantification de l'ADN ou de l'ARN viral sous réserve de standardisation et d'automatisation