



Prévalence des génotypes et des mutants précocore chez les donneurs de sang

SFTS automne 2006

*Françoise Lunel et Alexandra
Ducancelle*

INTRODUCTION

- **Hépatite B : problème de santé publique mondial**
 - 360 millions de porteurs chroniques du virus
 - 2 millions de morts par an
- **Particularités du VHB**
 - **Activité de reverse transcription de l'ADN polymérase du VHB**
 - Niveau de réplication virale élevé (10^{11} particules virales par jour)
 - **Quasiespèces** : coexistence de populations virales sauvages et mutées chez un même individu

Variabilité virale

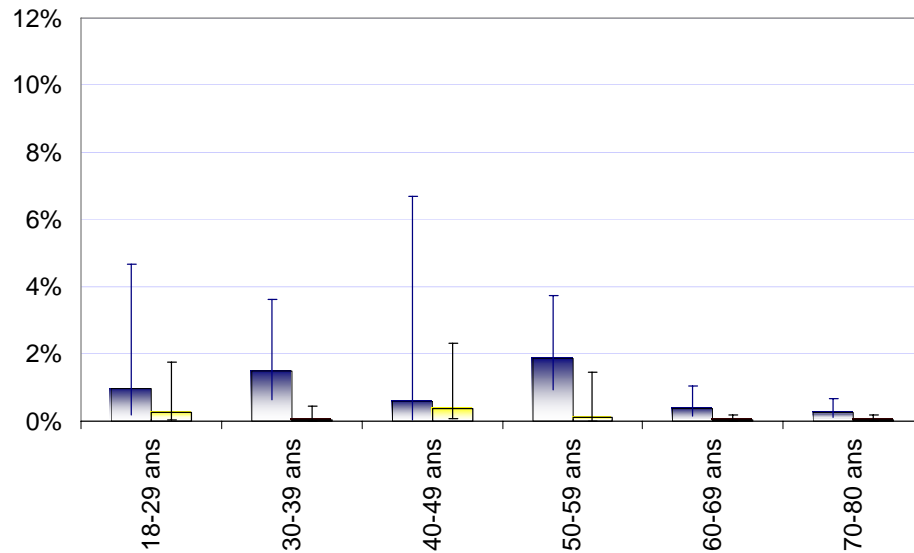
- **Deux types de variants du VHB :**
 - **Variants génotypiques :**
 - Evolution naturelle des *Hepadnavirus*
 - 8 génotypes (A à H)
 - Souches virales stables
 - **Variants phénotypiques ou mutants**
 - Emergence de variants du VHB sous une pression de sélection immunitaire ou immune (vaccination, immunisation passive) ou médicamenteuse

- **Epidémiologie changeante en France**
 - **Enquête INVS 2004 : prévalence de l'AgHBs estimée à 0,68%**
 - **soit 300 000 porteurs du VHB**

Prévalence des AgHBs CMU/sexes/age

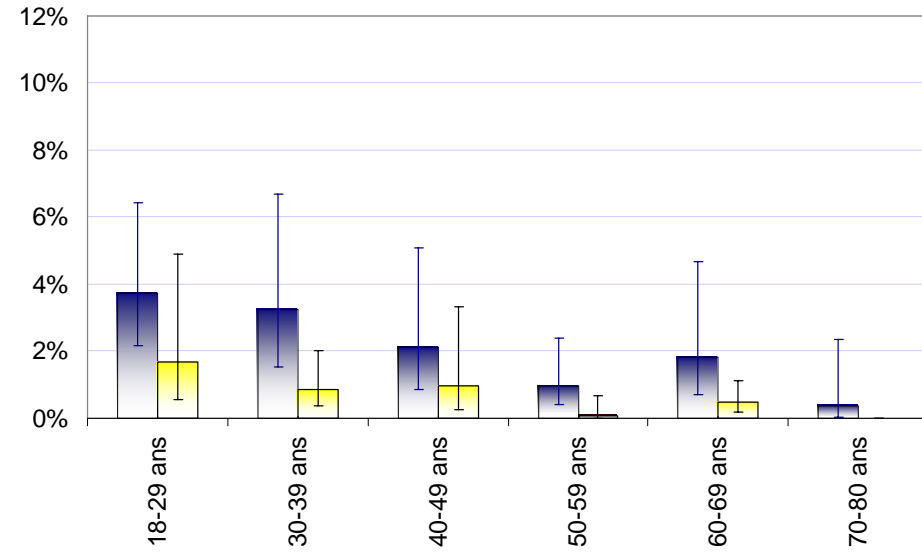
Non bénéficiaires de la CMUc
0.57% IC95%=[0.37 - 0.88]

■ Hommes
■ Femmes

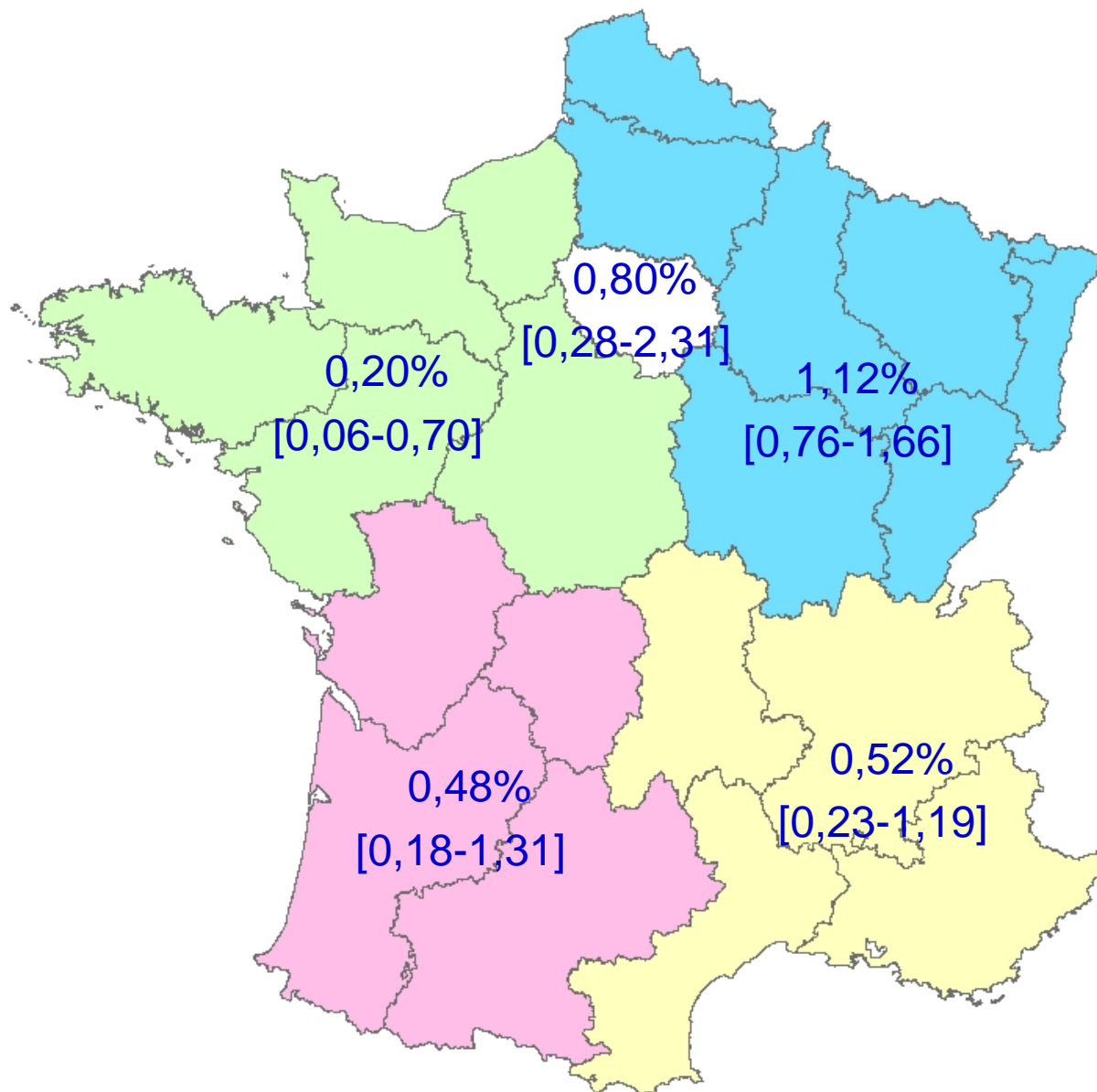


Bénéficiaires de la CMUc
1.80% IC95%=[1.31 - 2.47]

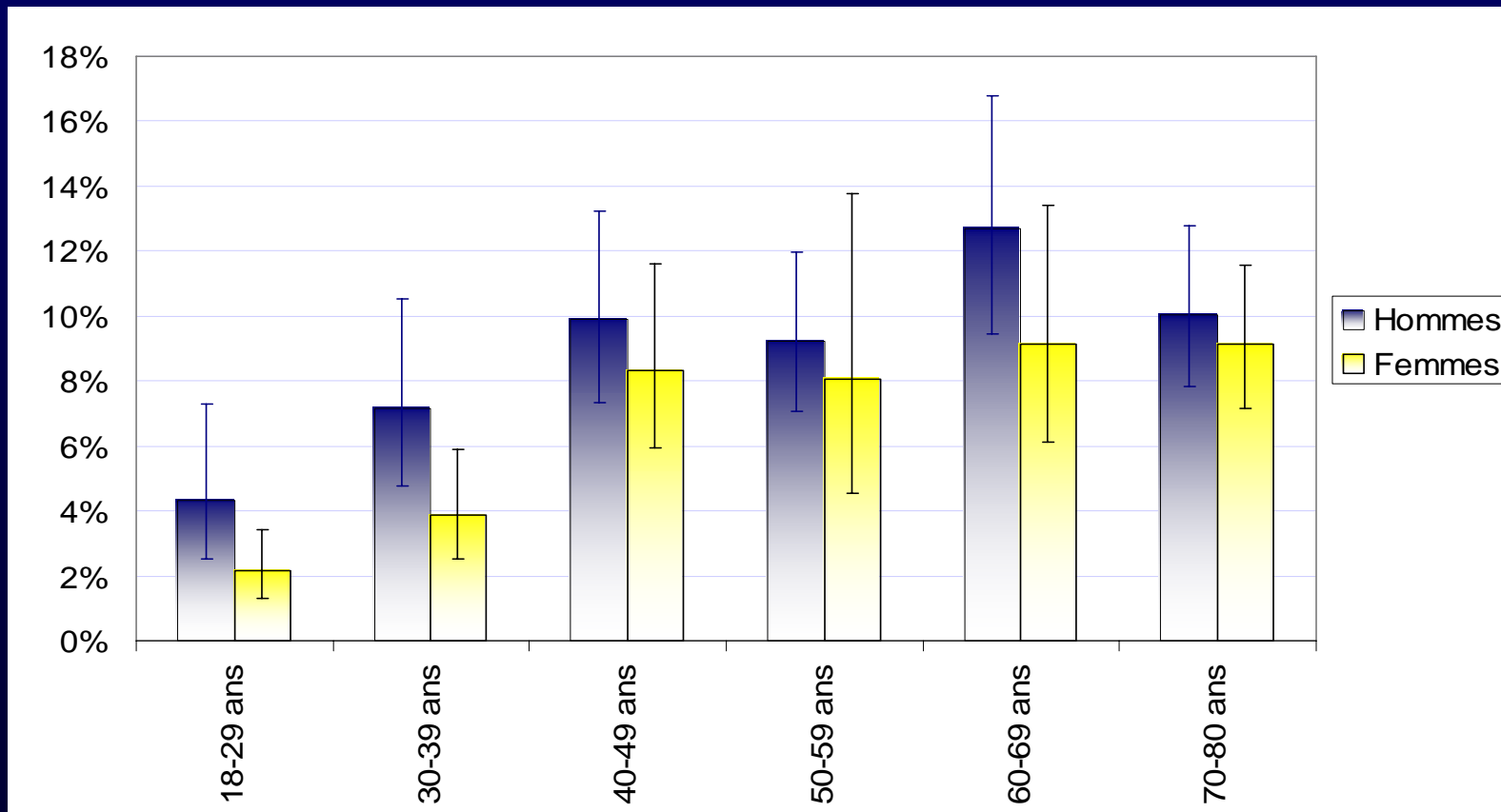
■ Hommes
■ Femmes



Prévalence de l'AgHBs inter-région



Prévalence des anticorps anti-HBc selon l'âge



L'HÉPATITE B EN 2006

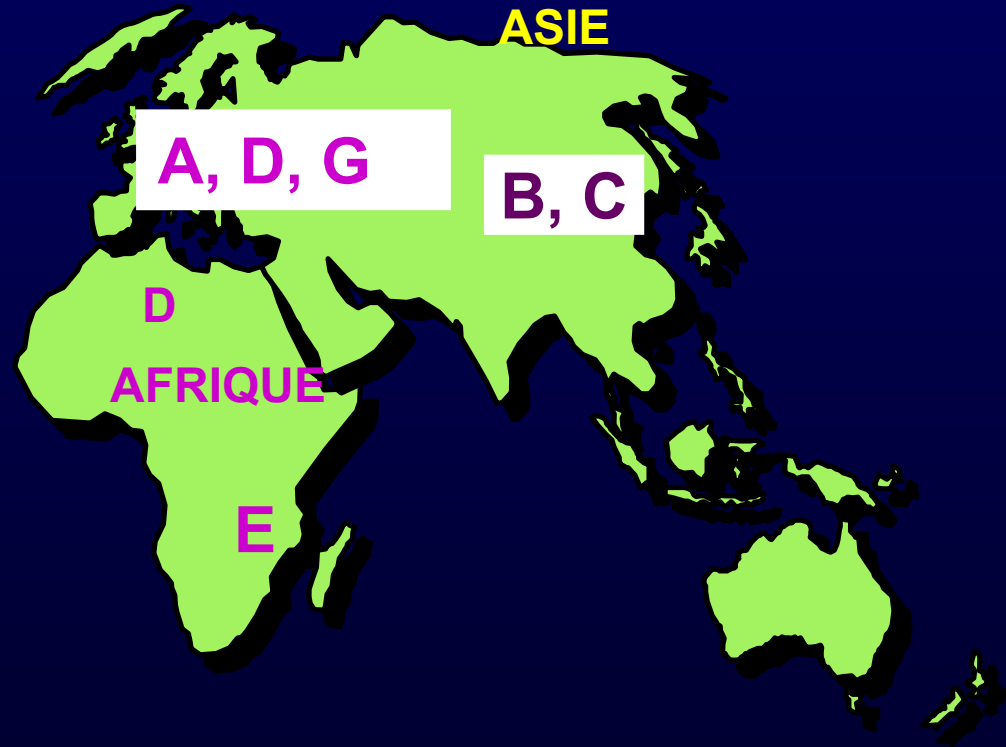
- **Epidémiologie changeante au niveau mondial**
 - Emergence de nouveaux génotypes
 - Augmentation de la prévalence des variants du VHB (mutants AgHBs et précore)

Variabilité génotypique

AMERIQUES



EUROPE



Variabilité génotypique

- **Pathogénicité virale**
 - Rôle dans la progression de la maladie controversé
 - **Génotypes B et C : études en Asie++++**
 - Séroconversion anti-HBe plus rapide pour les génotypes B
 - Évolution plus lente vers la fibrose pour les génotypes B
 - **Résultats controversés pour les génotypes A et D**
 - Meilleur pronostic pour le génotype A (clairance de l'AgHBs plus fréquente, moins de fibrose)

Variabilité génotypique

- **Génotypes et réponse au traitement**
 - Réponse aux antiviraux influencée par les génotypes
 - Meilleure réponse à l'interféron (INF) pour les génotypes A et B que pour les génotypes C et D
 - Influence du génotype sur la réponse à la lamivudine controversée
 - Émergence de résistance à la lamivudine indépendante des génotypes

Variabilité préC/C

- **Mutants précore**
 - Décrits depuis 1981 en Italie
 - Infection chronique par le VHB
 - Profil sérologique : AgHBs+, AgHBe-, AntiHBe+
 - Persistance d'une réplication virale
 - Etude moléculaire → mutation dans la région précore

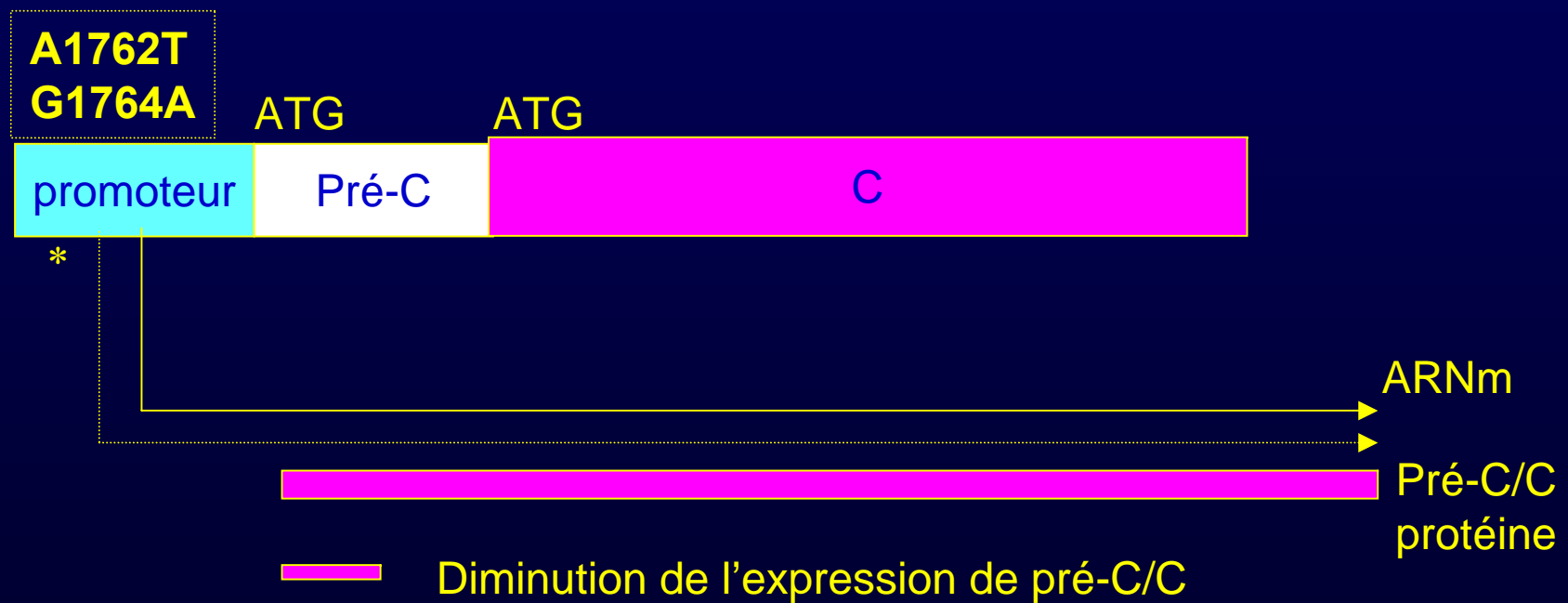
Variabilité préC/C

- Mécanisme moléculaire :
 - Mutants de la région pré-core



Variabilité préC/C

- Mécanisme moléculaire :
 - Mutants de la région du promoteur du core



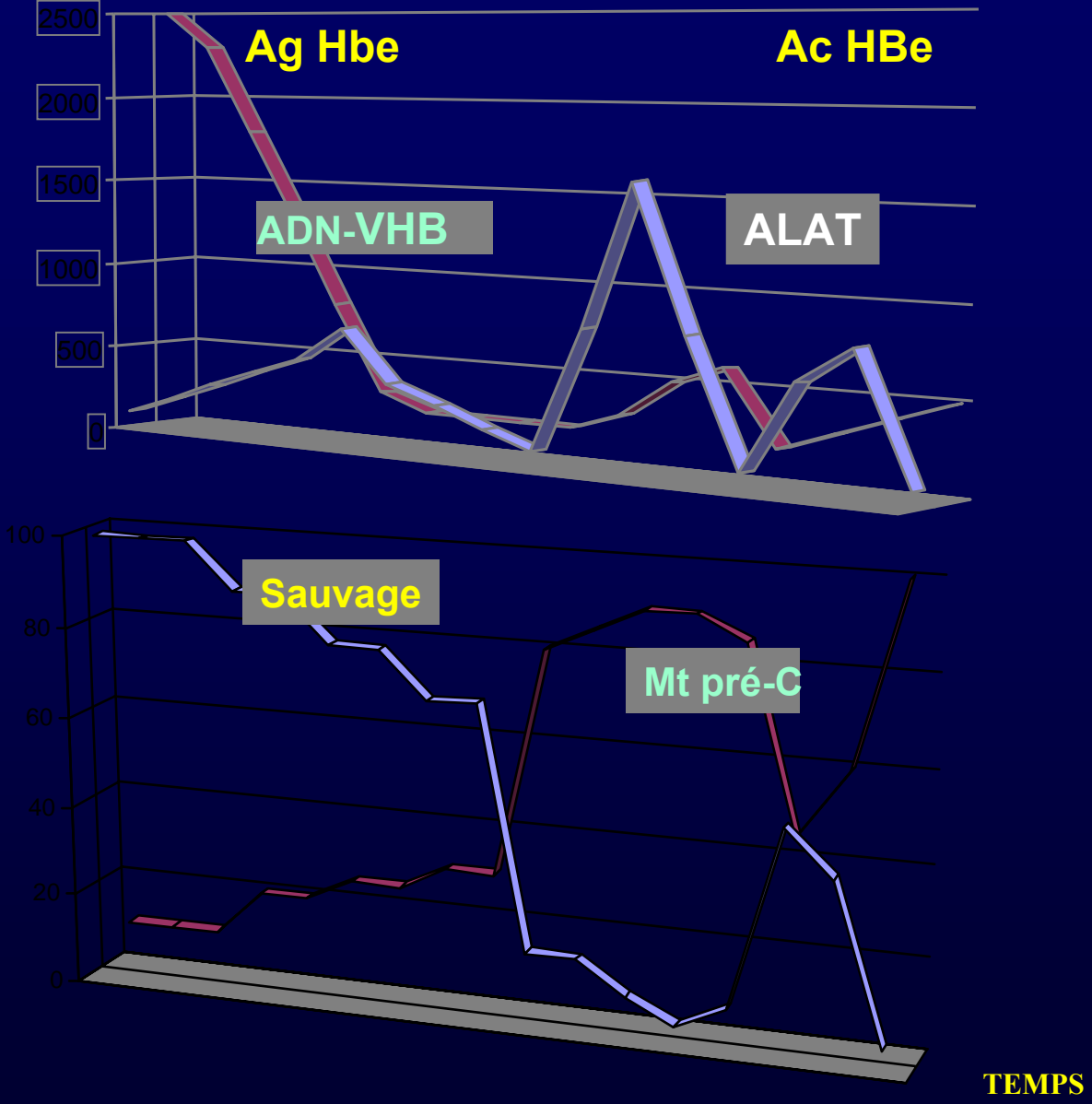
Variabilité préC/C

- Relation entre mutants précore et génotype
 - Mutations dans la région pré-C :
 - génotypes B, D, E et certaines souches de C
 - Mutations dans le promoteur des régions pré-C et C :
 - génotypes A, F, H certaines souches de C

Variabilité préC/C

- **Epidémiologie**
 - Patients plus âgés (40-55 ans)
 - Prédominance masculine
 - Source de contamination inconnue
 - Prévalence élevée dans le pourtour méditerranéen, Europe de l'Est et l'Asie de Sud-Est
 - Prévalence en augmentation dans toutes les zones
 - France : hépatite AgHBe négatif : forme prédominante des infections chroniques à VHB en 2006 (*JP Zarski et al, J of Hepatol, 2006*)

HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION CHRONIQUE A VHB



Variabilité préC/C

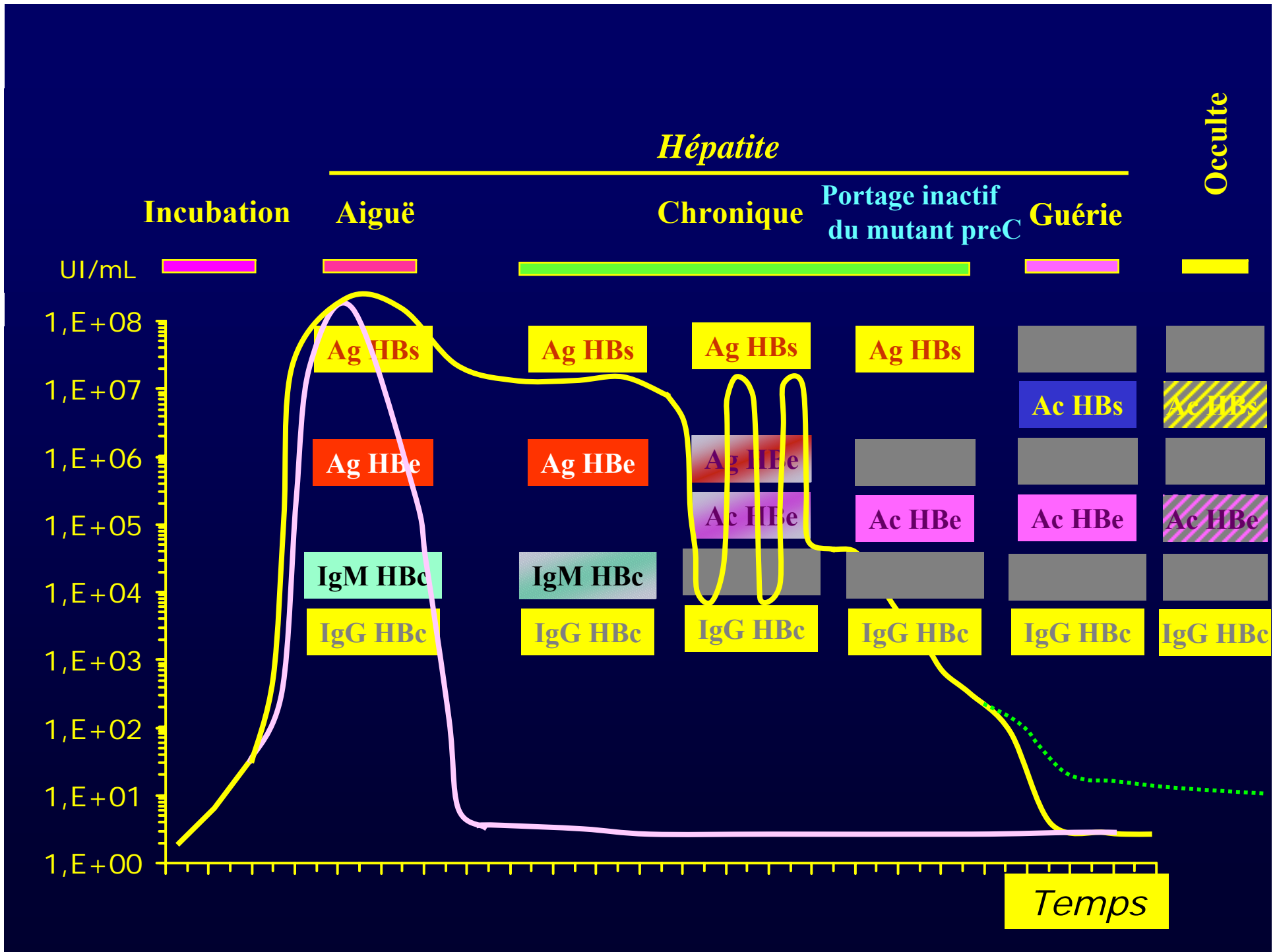
- Pathogénicité :
 - Reste à préciser
- Donneurs de sang
 - Angleterre (*Davidson F et al, Vox sang, 2005*)
 - 70% infection chronique VHB - AgHBe négatif
 - 55% (G1896A), 26% (A1762T), 35% (G1764A)
 - Inde (*Vivekanandan P et al, Mol Diagn, 2004*)
 - 82% infection chronique VHB - AgHBe négatif
 - 69% G1896A (population majoritaire ou mixte)

Questions

- **Intérêt clinique des génotypes et des mutants précore** dans la progression de la maladie hépatique et dans la réponse aux traitements antiviraux reste à préciser
- Portage inactif de l'AgHBs = portage du mutant pré-C ?

OBJECTIFS DU PROJET

- Etude de la **prévalence des génotypes et des mutants pré-core**
 - chez les donneurs de sang
 - Comparaison avec des patients atteints d'une hépatite chronique
- **Lien entre le portage inactif et mutant précore chez les donneurs de sang en France ?**
- Impact des **génotypes** et/ou des **mutants pré-core** sur la pathogénicité (fibrose hépatique)



ETUDE DES VARIANTS DU VHB CHEZ LES DONNEURS DE SANG

- **GATT**
- **Etude prospective** chez des donneurs de sang recrutés dans la majorité des établissements de transfusion sanguine en France

- Estimation Effectif**

Taux de positivité de l'AgHBs (*INTS, 2003*)

	Nouveaux Donneurs (n=381 606)	Donneurs connus (n=2 086 432)	Total (n= 2 468 038)
AgHBs +	447	4	451
Taux pour 10000 dons	11,7	0,02	1,83

65,5% des dons AgHBs + sont virémiques avec une charge virale ≥ 500 copies/ml soit un effectif de **300 patients / an**

- **Critères d'inclusion / exclusion**
 - AgHBs positif et confirmé
 - absence de coinfection VHC VIH
- **A l'inclusion**
 - Recueil des données épidémiologiques (âge, origine géographique, source de contamination)

ETUDE DES VARIANTS DU VHB CHEZ LES DONNEURS DE SANG

- Méthodes :
 - **Génotypage** des souches de VHB (INTS, Syria Laperche)
 - Etude virologique à Angers
 - Mesure de la **charge virale VHB** (Cobas Amplicor HBV monitor test, seuil : 38UI/ml)
 - Détection de la **mutation G1896A** par une technique de PCR en temps réel
 - **Séquençage** des régions précore et core

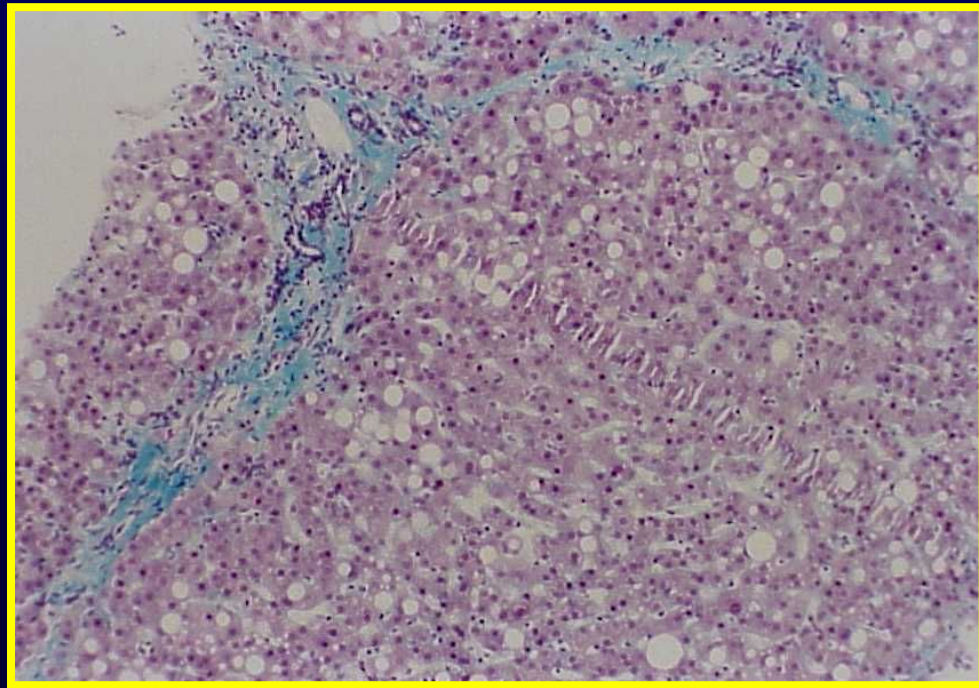
- ② **Détection des mutations dans les régions du promoteur du core et du précore**
 - **Hybridation moléculaire** (Inno Lipa HBV Precore, Innogenetics)
 - **Avantages** : test standardisé, populations virales mixtes
 - **Inconvénients** : mutations connues (G1896A, A1762T et G1764A), coûteuse
 - **Séquençage direct**
 - **Avantages** : simple et peu coûteuse
 - **Inconvénients** : populations virales minoritaires non détectées → Séquençage après clonage?

Pathogénicité des souches : Examens non invasifs de fibrose hépatique

- **Examens physiques**
 - « Imagerie »
 - Elastométrie impulsionnelle
- **Examens biologiques**
 - Marqueurs isolés
 - Indirects
 - Directs
 - Tests (ou scores) composites
- **Validation récente par l'HAS**

Tests qualitatifs

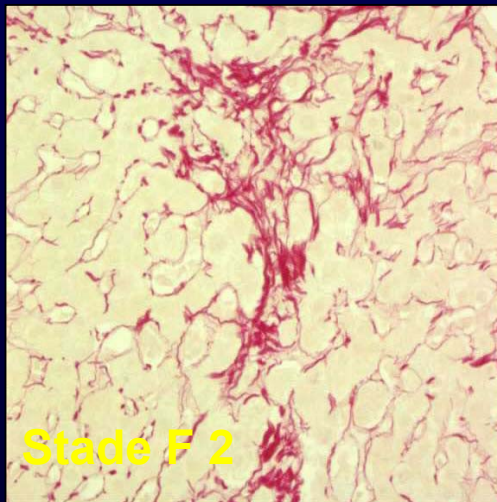
- Tous les tests sanguins + Fibroscan (F)
- Diagnostic de stades groupés de fibrose
- \geq F2



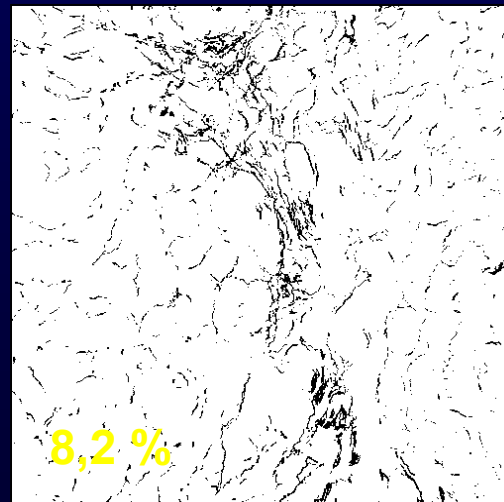
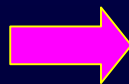
Tests quantitatifs

- Diagnostic du degré précis de fibrose
- Un test sanguin :

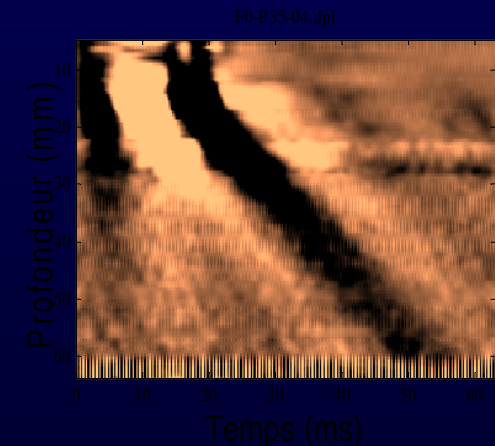
FibroMètre aire (%) + Fibroscan (KPa)



**Stade Métavir F
par pathologiste**



**Aire de fibrose hépatique
par analyse d'image**



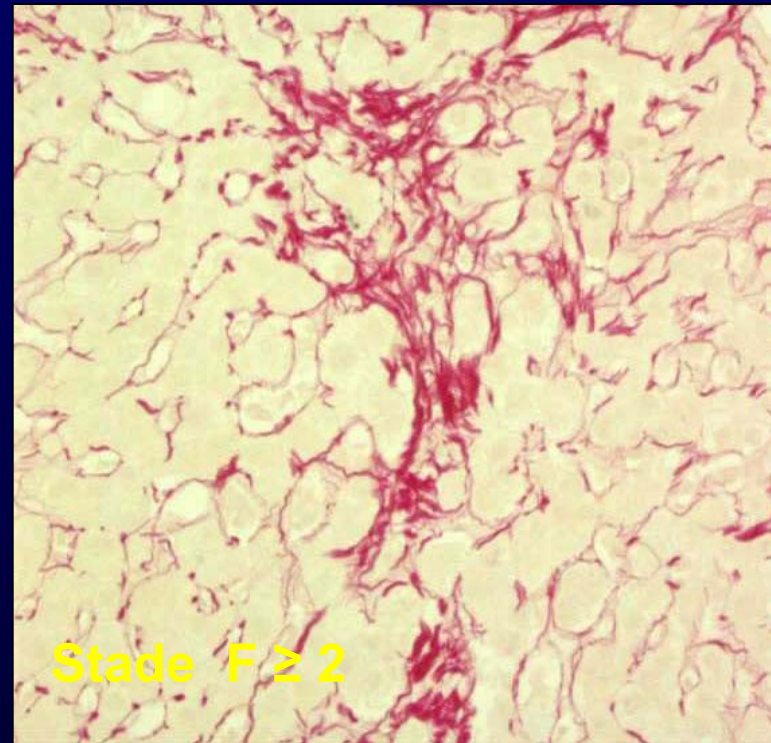
**Fibroscan
25,4 KPa**

③ **Fibromètre**

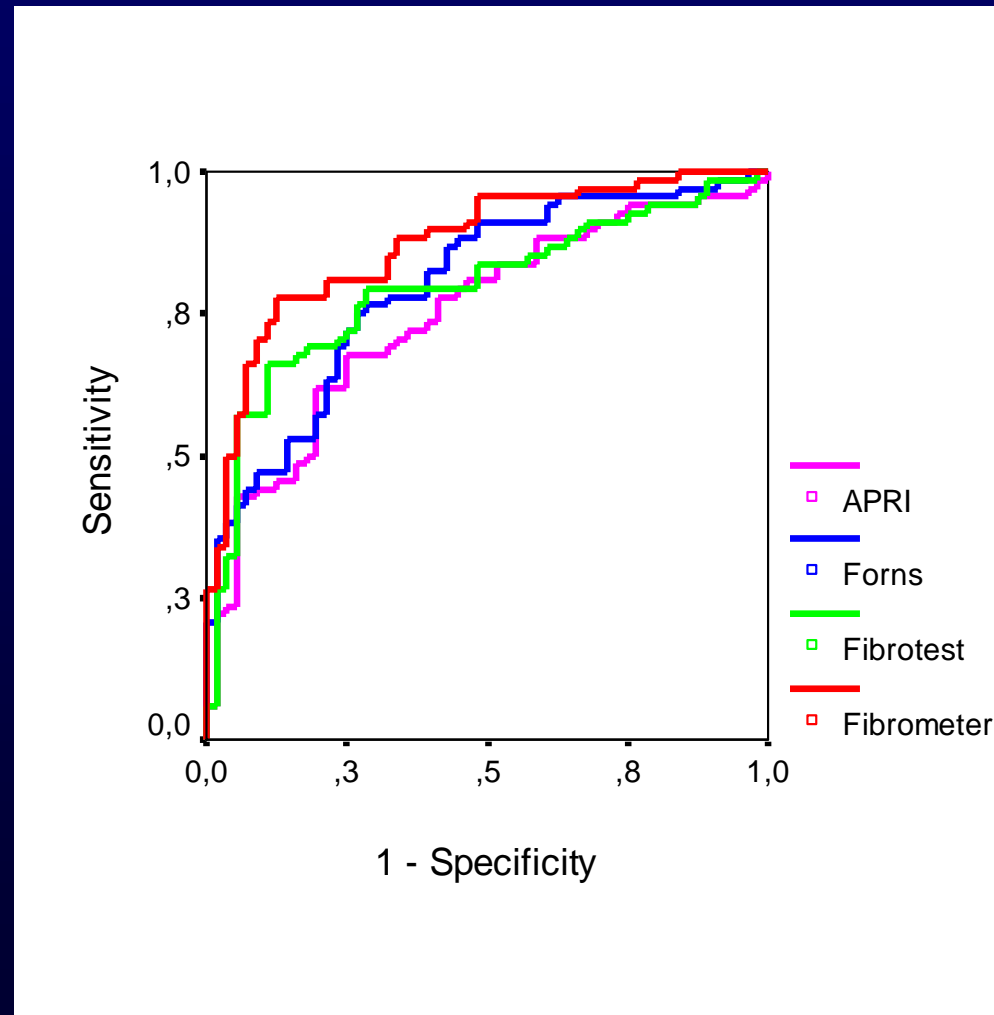
- Score non invasif de diagnostic de la gravité (degré de fibrose) des maladies du foie
- Validé pour les pathologies d'origine virale ou alcoolique
- Marqueurs biologiques : TP, plaquettes, urée, ASAT, bilirubine, alfa 2 macroglobuline, Hyaluronate
- Test gratuit → Amélioration de la prise en charge diagnostique et thérapeutique

Fibromètre F : test qualitatif

- Virus :
- Hyaluronate
- A2M
- TP
- Plaquettes
- ASAT
- Urée
- Age
- (Sexe)



Comparaison Fibromètre F Virus vs autres tests (1)



FibroMètre:

0,883

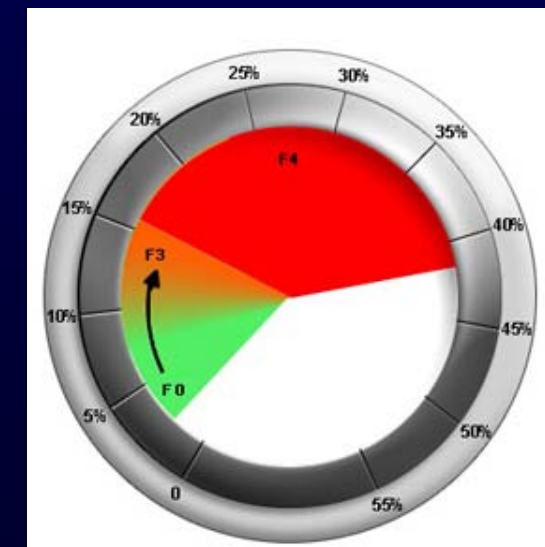
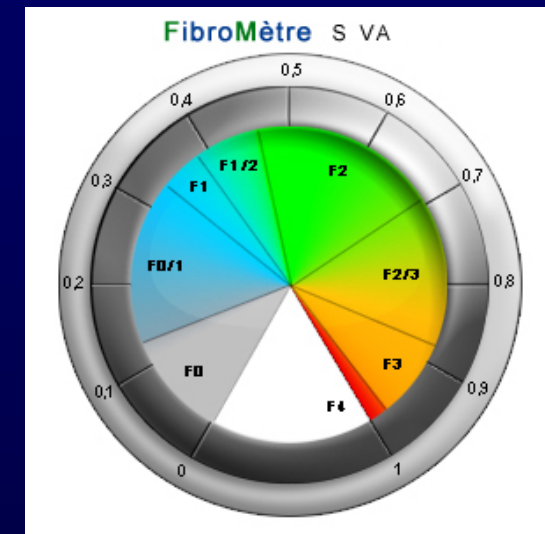
Fibrotest:

0,808

p=0,01

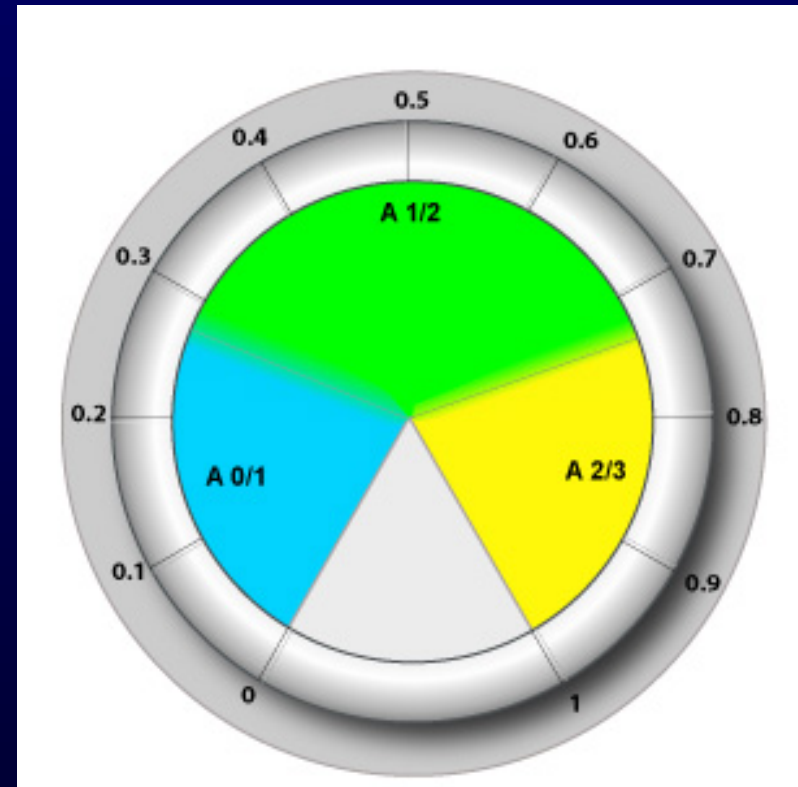
ETUDE DES VARIANTS DU VHB CHEZ LES DONNEURS DE SANG

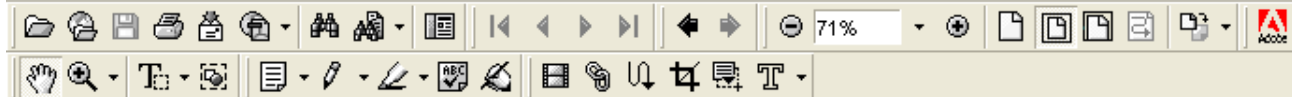
- ③ **Fibromètre**
 - **Score de fibrose** :
interprétation
donnée en
équivalence du
stade Métavir
 - **Aire de fibrose**
Pourcentage de
fibrose



Score d'activité virus : InflaMètre

Hépatites virales C
Variables : ALAT,
plaquettes, TP, A2M





FREDERIQUE GUESDON
 BIOLIVSCALE 49000 ANGERS
 Tél : 02 41 36 07 19 – Fax : 02 41 36 18 94

Prescripteur : DR FREDERIQUE GUESDON
 Patient : Pierre MARTIN
 Né(e) le : 01/01/1942
 Examen : 0603-0203-7B4 du 29/03/2006

DR FREDERIQUE GUESDON
 BIOLIVSCALE FACULTE DE MEDECINE D'ANGERS
 49000 ANGERS

Date du prélèvement sanguin : 29/03/2006 Age du patient à la date du prélèvement : 64 ans

Valeurs marqueurs sanguins

Marqueur	Valeur	Valeurs normales
Plaquettes	280 G/L	180.00 à 350.00
ASAT	35 U/L	0.00 à 35.00
Urée	5.0 mmol/l	3.60 à 7.10
Hyduronate	45 µg/L	9.00 à 45.00
Taux de prothrombine	100 %	90.00 à 112.00
Alpha2 macroglobuline	1.96 g/L	1.30 à 2.63

Résultats FibroMètre F : 0.52

Commentaires: FibroMètre F V **0.52**

Le **FibroMètre F** exprime un score de fibrose (échelle de 0 à 1) dont la correspondance avec le stade histologique Métavir est donnée, à titre seulement indicatif, dans le compteur ci-contre.

Le système expert n'a pas détecté de résultat discordant.



Interprétation - Les tests sanguins évaluent l'état fonctionnel de la fibrose. Par conséquent, de par leur construction, ils ne reflètent bien la fibrose hépatocirrhothologique (type F4) que si la cause est présente. Ils apportent alors une information diagnostique. Si la cause cesse, les tests sanguins décroissent plus rapidement que la fibrose hépatocirrhothologique. Dans ce cas, ils ne reflètent pas la fibrose mais indiquent sa régression. Ils apportent donc dans ce cas une information pronostique. Le score du FibroMètre F exprime la probabilité d'avoir une fibrose de sévérité équivalente.

Système expert - Le FibroMètre fait l'objet d'un validation par « un système expert ». Celui-ci détecte la plupart des faux positifs et faux négatifs. Le cas échéant, il les signale en vert dans le tableau de la colonne « Commentaires ».

Précision diagnostique - Les tests sanguins ne font pas partie d'un diagnostic. Comme pour tout examen médical, la performance diagnostique n'est pas de 100 %. Leur résultat doit être confronté aux autres données cliniques et paracliniques. Il est conseillé de recourir à un avis externe dans les circonstances suivantes: discordance des données, résultats paradoxaux ou inhabituels. La place des tests n'est pas faite dans le diagnostic de la fibrose hépatocirrhothologique (à ne pas confondre avec la cirrhose) et les recommandations s'accroissent. Cependant, plusieurs valeurs ont prouvé leur pertinence et un diagnostic peut être établi si 2 examens non-connexes indépendants et concordants.

Pour plus d'informations sur le FibroMètre, consultez le site Internet www.biolive.fr

RESULTATS ATTENDUS

- **Première étude en collaboration avec le GATT : prévalence des génotypes et des mutants PréC** chez les donneurs de sang en France
- **Diversité génétique des souches** qui circulent chez les donneurs de sang français et dans notre cohorte de l'ouest
- **Intérêt du génotypage** et de la recherche des mutants PréC dans la prise en charge des infections par le virus de l'hépatite B
- Rôle de la **variabilité de la région préC/C** dans la sévérité de la maladie hépatique
- **Apport d'un test non invasif d'appréciation de l'atteinte hépatique dans la prise en charge de la séropositivité**



C'est Fini!

- Méthodes :

- **① Détection de la mutation G1896A**

- Extraction manuelle de l'ADN viral du VHB (QIAmp DNA Blood Mini Kit)
- PCR temps réel
 - Automate MX4000 (Stratagène)
 - Chimie SYBR®Green
 - Détection simultanée du virus précore sauvage et/ou muté

① **Détection de la mutation G1896A**

- **Avantages de la technique**
 - **Screening rapide de la présence de mutation G1896A**
 - **Facile d'utilisation, coût réduit**
 - **Sensibilité de 300 copies /ml (57 UI/ml)**

- **Logistique : transport des échantillons**
 - Entreprise TSE Express Médical
 - Emballages type poolbox
 - Prix : 37,88 euros HT par poolbox expédié
 - Demande d'enlèvement transmise à TSE par fax, avant 17 heures la veille de l'enlèvement



ETUDE DES VARIANTS DU VHB CHEZ DES PORTEURS CHRONIQUES DU VHB

- Etude **rétrospective** sur des sérums congelés provenant de patients atteints d'une infection chronique par le VHB (1995-2005)
- Cohorte : Angers et Groupe de Fontevraud

ETUDE DES VARIANTS DU VHB CHEZ DES PORTEURS CHRONIQUES DU VHB

Etude longitudinale rétrospective

Patients non traités

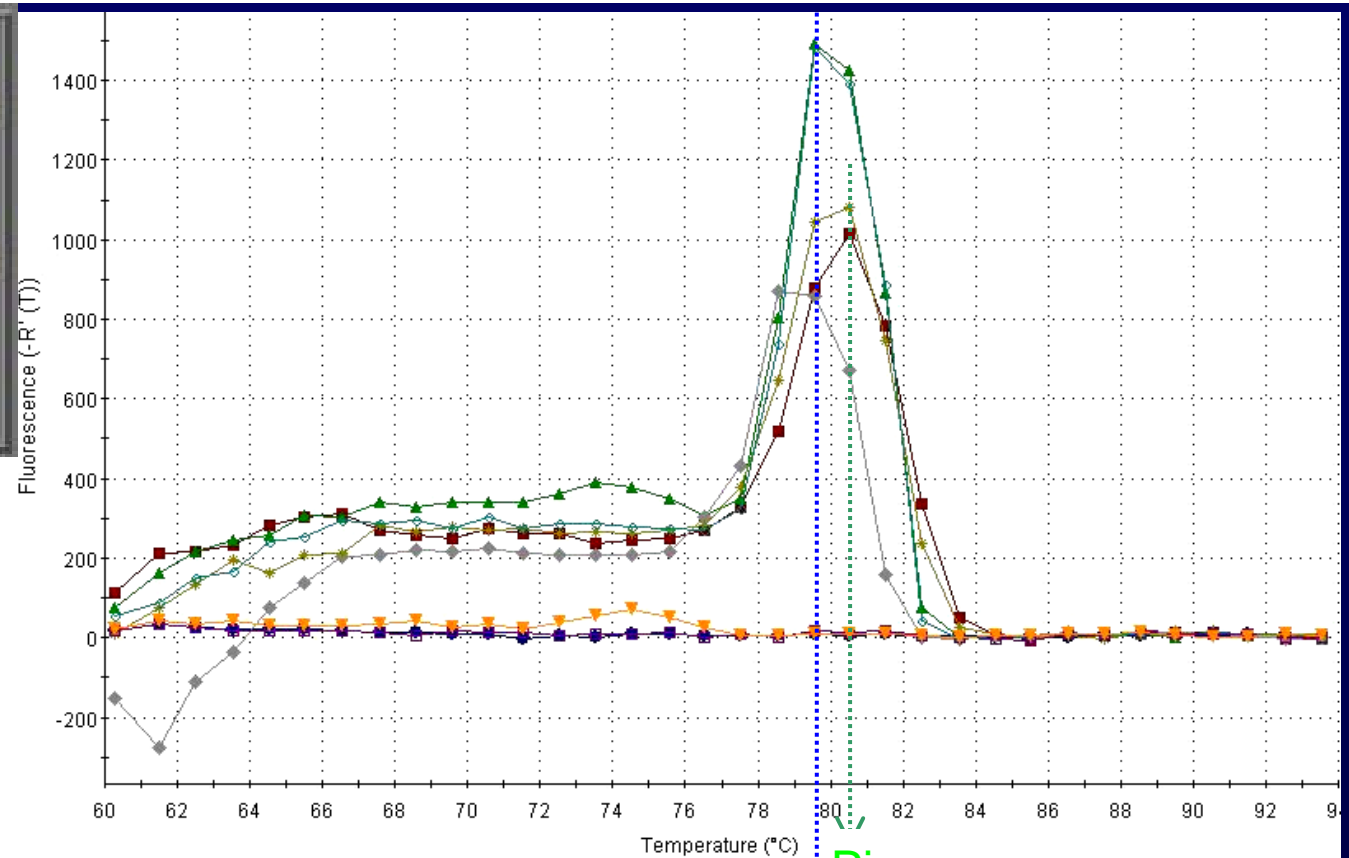
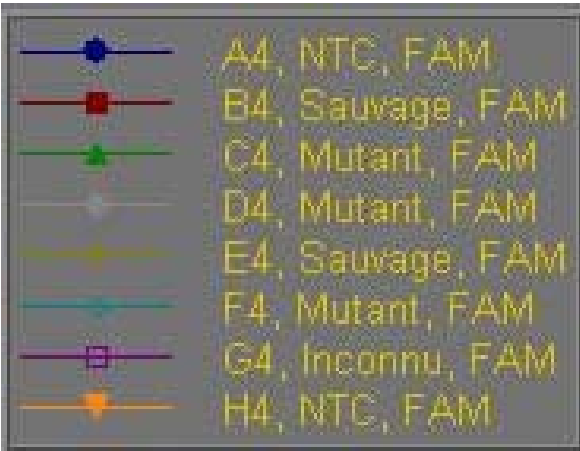
Patients traités

Recueil des données épidémiologiques
Evaluation du degré de la cirrhose
Etude virologique :

- **Génotypage des souches virales**
- **Evolution des marqueurs AgHBe/anti-HBe**
- **Cinétique de la charge virale VHB**
- **Etude de la variabilité de la région pré-C et C dans le temps**

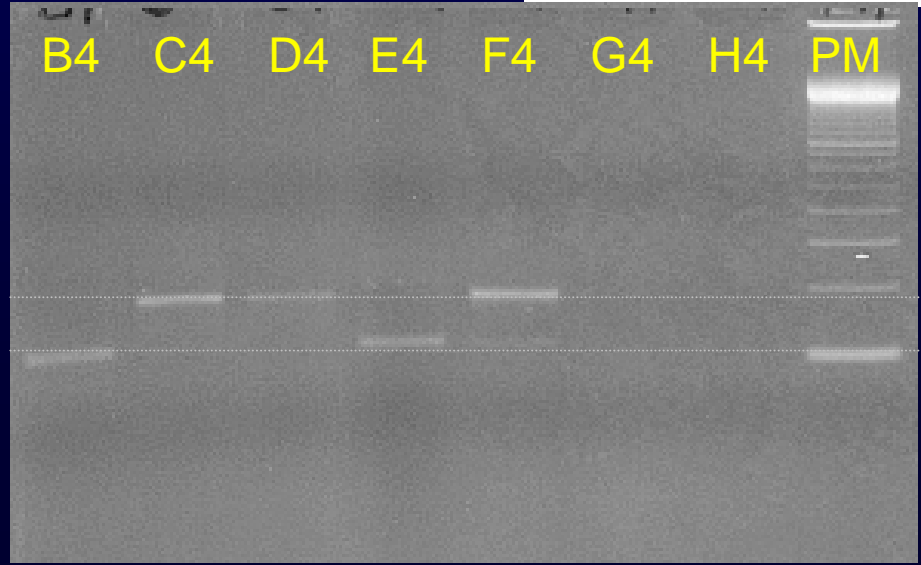
Etude de la variabilité des régions pré-C et C par séquençage
- Avant et après la séroconversion antiHBe

Etude de la variabilité des régions pré-C et C par séquençage
- Avant et après la mise sous traitement



Pic « sauvage » :
Tm = 80,5°C

Pic « mutant » :
Tm = 79,5°C

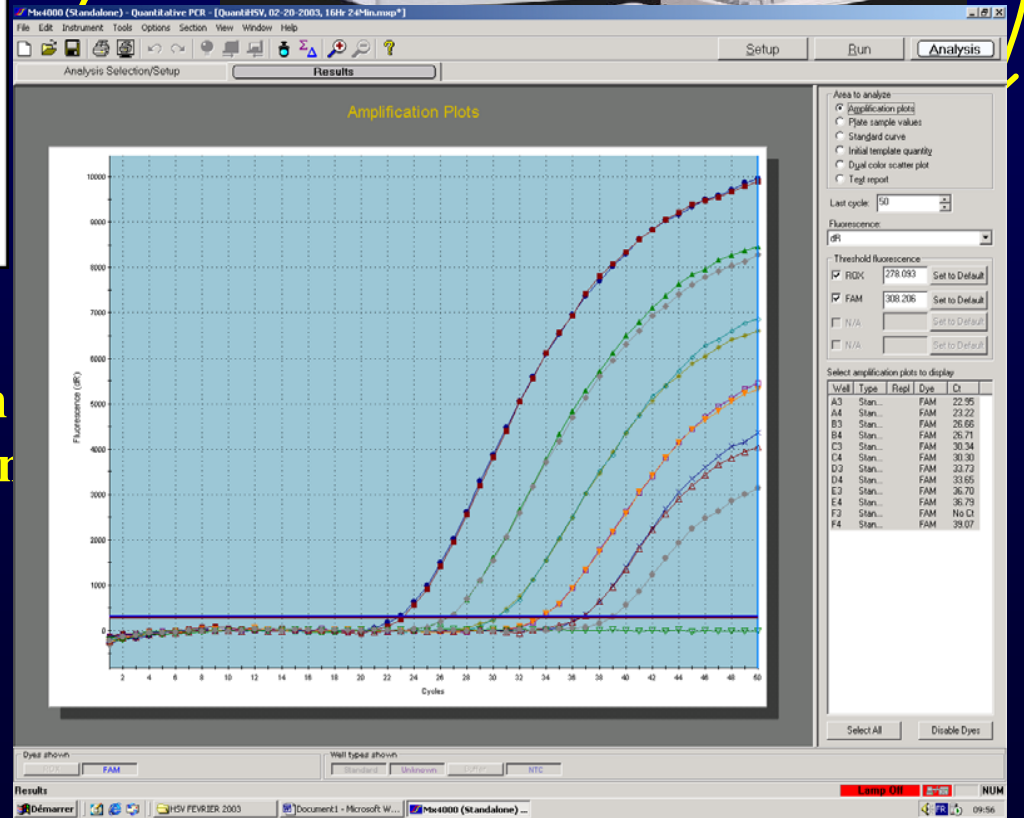
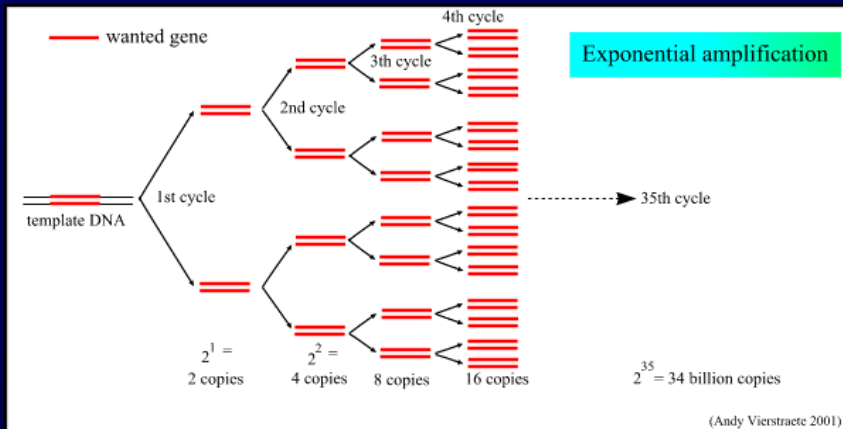


- Bande « mutant » = 192 pb
- Bande « sauvage » = 116 pb

REAL-TIME PCR STEPS

Automate

PCR (60-95°C 40-50 cycles)

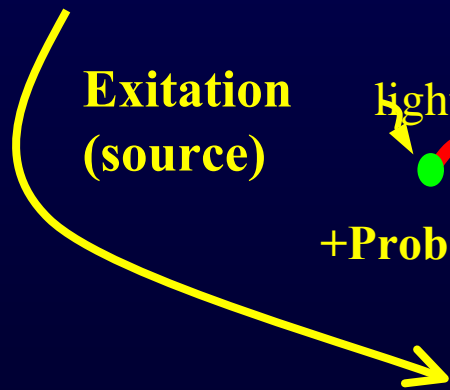
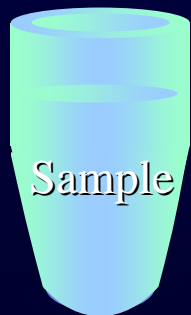


Excitation (source)

light

+Probe

Emission (detection)



① Détection de la mutation G1896A

- Validation à l'aide du Panel VHB GEMHEP 2005

	CV Taq Man (log copies/ml)	Mutant PC Gemhep	Mutant PC Angers
CQ221	2,78	G1896A	-
CQ418	7,4	WT	WT
CQ526	3,2	WT	WT
CQ564	4,63	G1896A	G1896A
CQ690	4,72	G1896A	G1896A
CQ866	9,11	WT	WT