

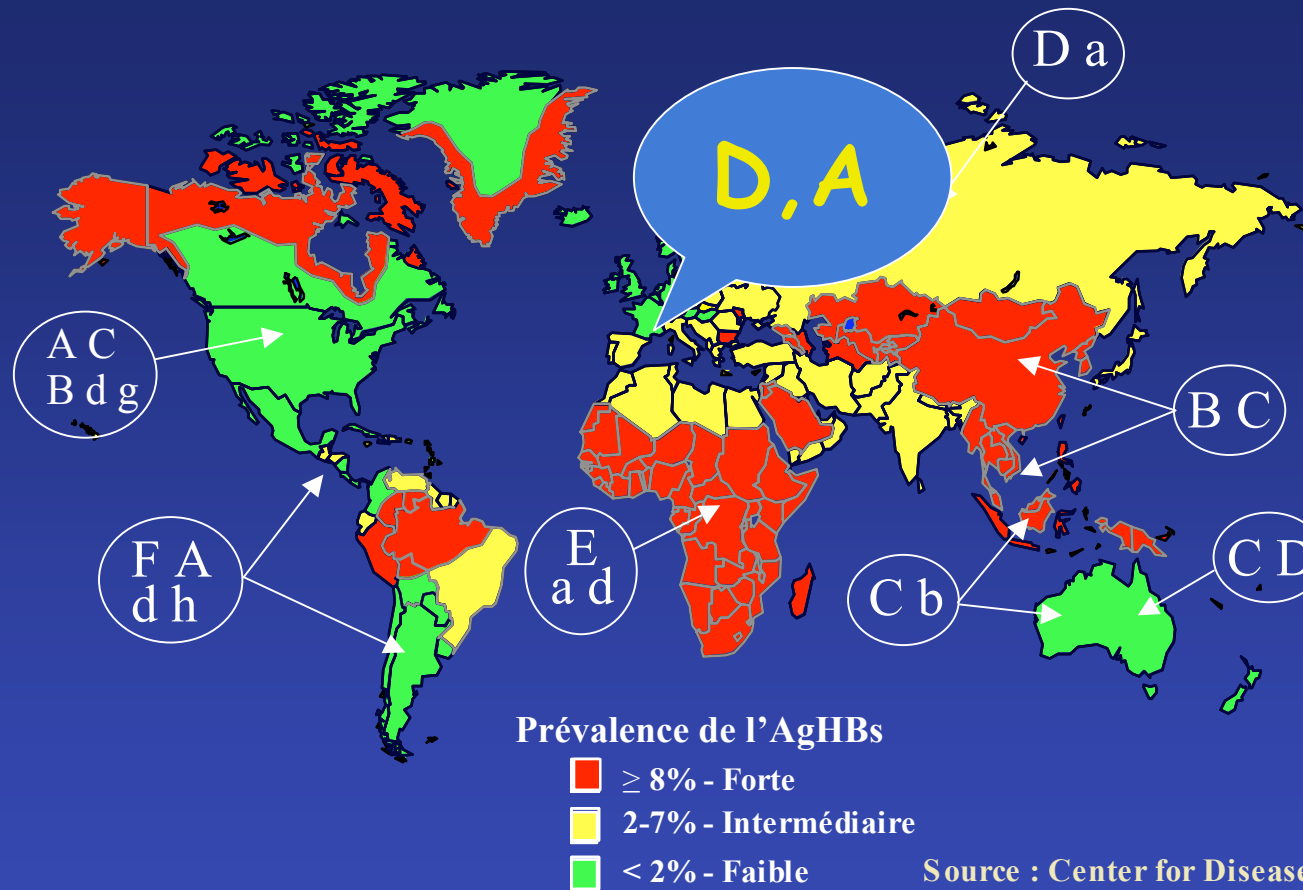
Diversité génétique du VHB chez les donneurs de sang en France

Annabelle Servant-Delmas



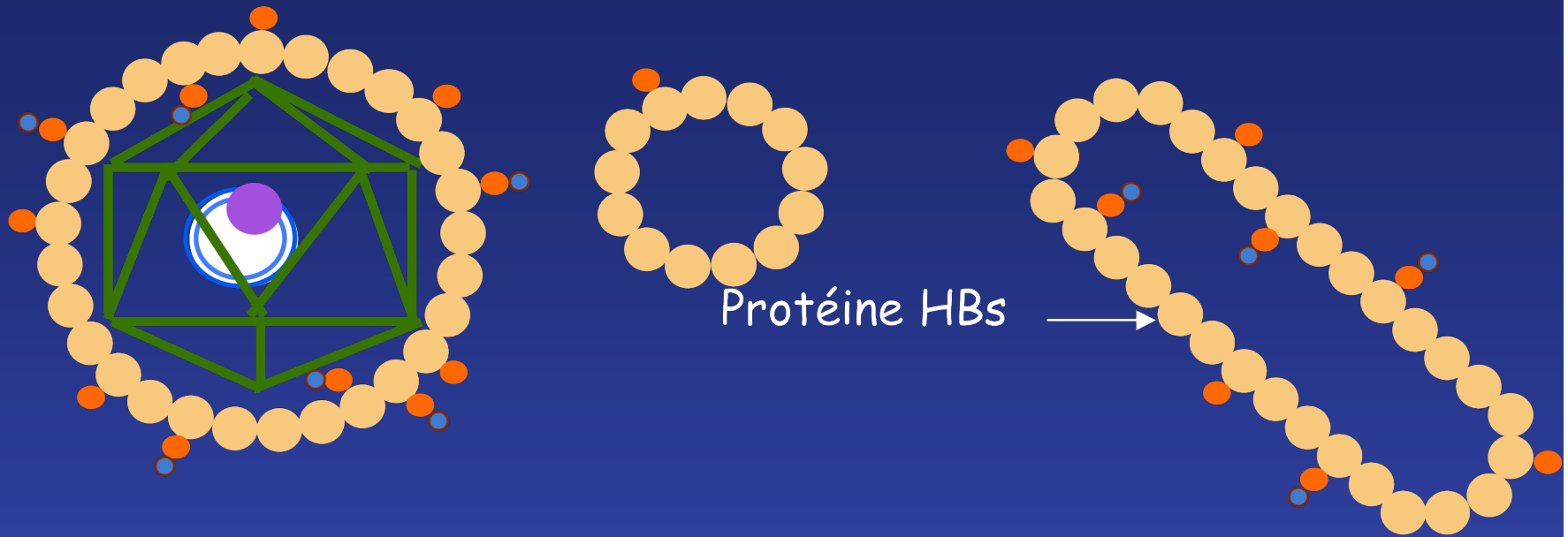
*Centre National de Référence des hépatites B et C en transfusion
Institut National de la Transfusion Sanguine*

Diversité génétique du VHB



9 sérotypes et 8 génotypes (A-H) répartis selon des régions géographiques distinctes

L'AgHBS



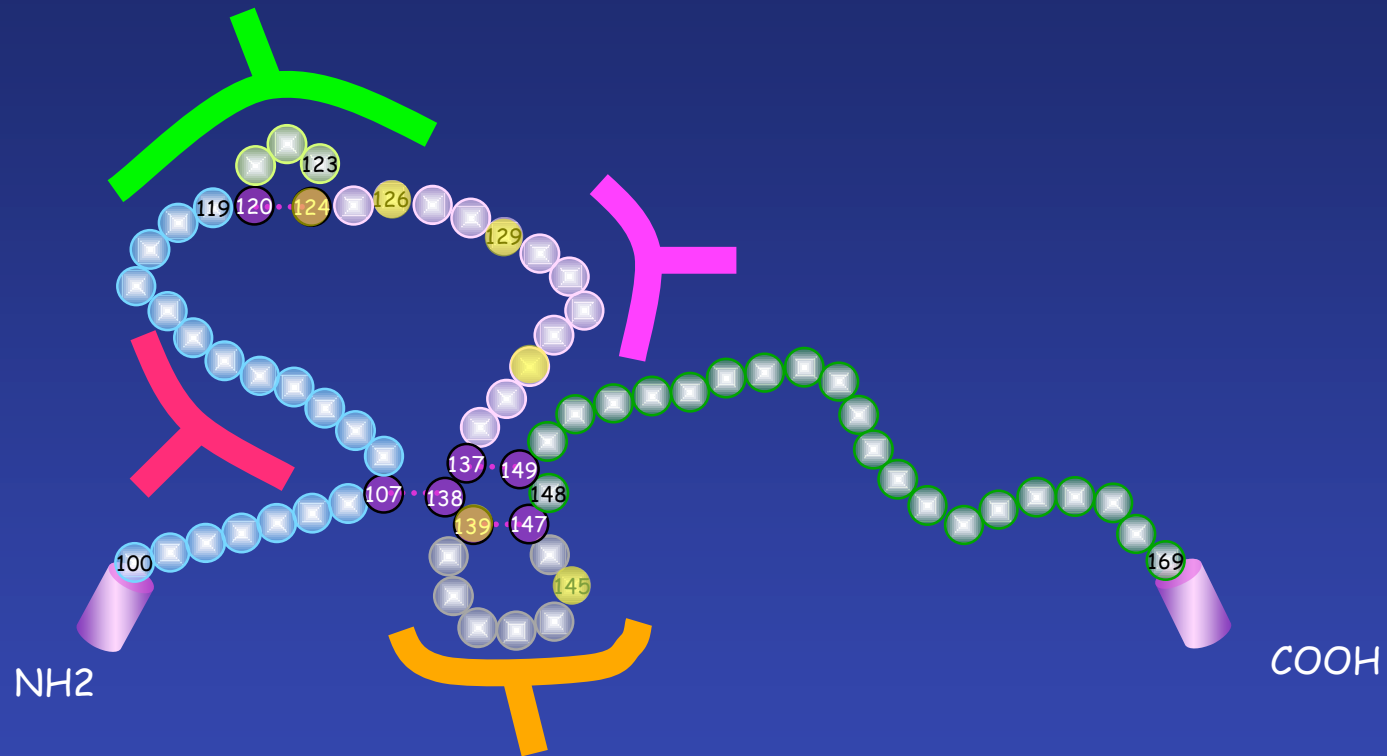
Région hydrophile majeure (aa 100-170)

- Exposée à la surface du virus
- Epitopes majeurs de neutralisation

Emergence de variants de l'enveloppe sous pression de sélection

- Système immunitaire lors d'infection chronique
- Vaccin, Immunothérapie passive, Thérapeutique

Mutations de la région hydrophile majeure de l'AgHBs



Impact diagnostique (trousses de détection de l'AgHBs)

- Sensibilité identique à une souche sauvage
- Diminution de sensibilité = sous-estimation du titre
- Absence de détection = faux négatif

Diversité génétique du VHB chez les donneurs de sang

- Analyse du sérotypage de 1999 à 2007

et du génotypage : années 2005 - 2006 - 2007

- Prévalence des variants de l'enveloppe

- Impact sur le dépistage

Patients et Méthodes

- **Patients** - Donneurs de sang **AgHBs positifs** ou **AgHBs neg/DGV pos**
 - France métropolitaine
 - + Inclusion de la Guadeloupe et Martinique (2006 - 2007)

- **Marqueurs sérologiques (AgHBe/AcHBe, IgM HBc...)**

- **Titrage et sérotypage de l'AgHBs** (Ac spécifiques des déterminants)
Laperche et al. 2001 J-Viral Hepat.

- **Détermination de la charge virale**

(Cobas TaqMan HBV test - Roche SD 6UI/ml)

- **Méthode de Génotypage**

PCR maison du gène S partiel (RHM aa 100 à 180) SD 20UI/ml

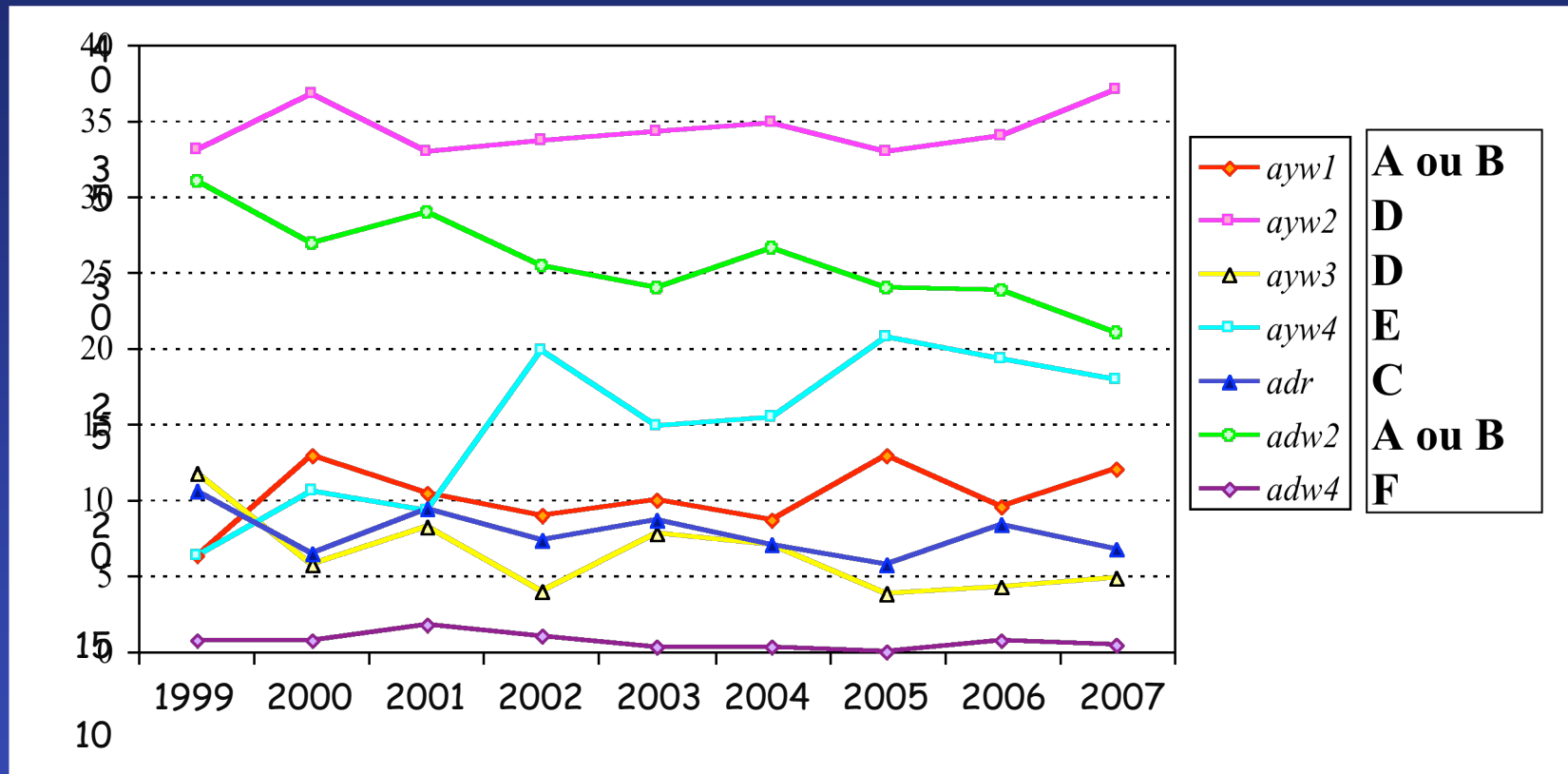
Séquençage direct

Analyse phylogénétique: Matrice de Distances (modèle évolutif Kimura 2)

(Package Phylip - reconstruction de l'arbre par Neighbor-joining)

Evolution des sérotypes du VHB chez les donneurs de sang

2506 dons sérotypés/3413 AgHBs+déclarés



⇨ du sérotype adw2 (Europe)

⇒ du sérotype ayw4 (origine africaine)

Génotypes et sérotypes - Années 2005/2006/2007

1 000 AgHBs+ déclarés

- 912 dons testés pour le génotypage

721 échantillons *génotypés* (86,3%)

114 échantillons non génotypables (13,7%) mais 73 sérotypés

77 échantillons en cours de génotypage (2007)

- 909 dons testés pour le sérotypage

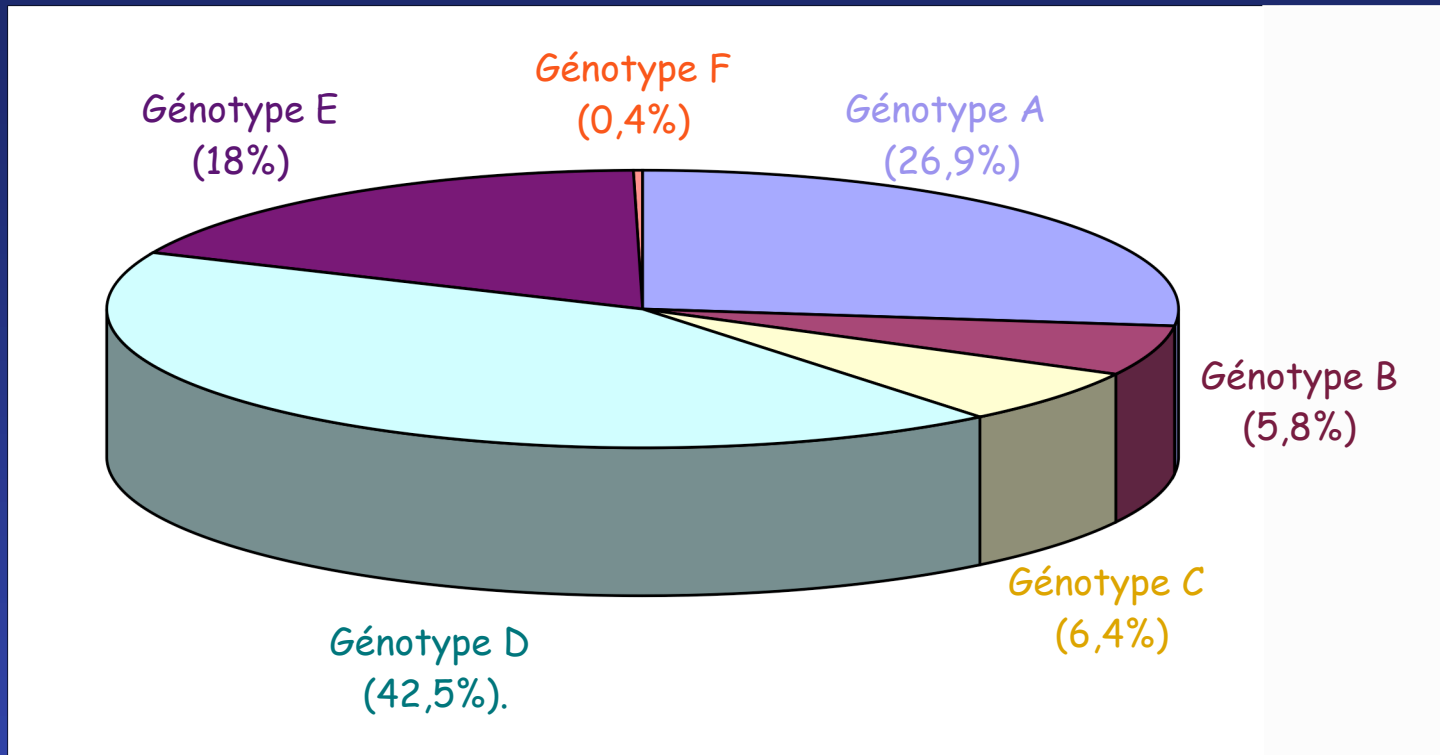
798 échantillons *sérotypés* (87,8%)

111 échantillons non sérotypables (12,2%) mais 74 génotypés

- **Discordance génotype/sérotipe:** 9 échantillons (1,4%)

dont 6 échantillons avec une mutation

Répartition des génotypes du VHB (2005 - 2007)



Génotype

Sérotype et Origine géographique majoritaires

D	ayw2	Europe/Bassin Méd.
A	adw2	Europe
E	ayw4	Afrique Sub-Saharienne
C	adr	Asie
B	ayw1	Asie
F	adw4	Europe

Souches AgHBs nég/DGV pos

Année 2007 - EFS Martinique

Don AgHBs neg/Ac HBc neg/DGV pos

Genotype	Mutations sur l'AgHBs	Ag HBs Sous-Type	Charge virale UI/mL TaqMan
A	/	trop faible	8

AgHBe neg, Ac Hbe neg

Contrôle 3 semaines plus tard
AgHBs douteux

Année 2006 - EFS Guadeloupe

Don AgHBs neg/Ac HBc pos/DGV pos

Genotype	Mutations sur l'AgHBs	Ag HBs Sous-Type	Charge virale UI/mL TaqMan
A	T118A*, P120S* M103I,G130N S174N	trop faible	<6

*mutation décrite dans le cadre d'échappement au traitement par les immunoglobulines

*mutation décrite comme pouvant affecter le diagnostic

Faux négatif (P120S)
en Axsym (Abbott)
et Etimak-4 (Diasorin)?

OU

Charge virale trop faible ?

Variabilité du VHB - Donneurs de sang AgHBS+

- Variabilité des séquences:

- Mutations observées mais non documentées: 13,7% (n=99)
- Suspicion de coinfections : 5,6% (n=47)

- Prévalence des variants de l'AgHBs: 5,5% (n=40)

7 souches avec au moins 2 mutations (17%)

Mutations observées et décrites comme

- affectant le diagnostic: T118A, P120T, G130N, T131I, M133I, M133T, Y134N, F134L, S143L, D144E, G145R
- échappant à la vaccination ou aux Ig: T116N, I126N, T126A, Q129H, G130R, S143M

Discussion (1)

Evolution de la diversité génétique du VHB chez les donneurs de sang AgHBs positifs de 1999 à 2007

Corrélation entre sérotypes, génotypes et pays d'origine

Modification de la fréquence au cours du temps

⇒ du sérotype adw2 (origine européenne)

⇒ du sérotype ayw4 (origine africaine)

- ⇒ du nbre de donneurs AgHBs+ originaires d'Afrique Sub-Saharienne

- ⇒ du nbre de dons AgHBs pos :

(couverture vaccinale de 5% en 1994 à 22% en 2002)

Modification de la répartition des génotypes du VHB qui circulent en France au cours du temps

Discussion (2)

• Répartition des génotypes en France

génotypes	Dons de Sang	Porteurs chroniques	
	Population A	Population B	Population C
	N (%)	N (%)	N (%)
A	194 (26,9%)	64 (24,5%)	99 (51%)
B	42 (5,8%)	19 (7,2%)	13 (6,7%)
C	46 (6,4%)	31 (11,8%)	11 (5,7%)
D	306 (42,5%)	70 (26,8%)	51 (26,3%)
E	130 (18%)	34 (13%)	15 (7,7%)
F	3 (0,4%)	1 (0,4%)	1 (0,5%)
G	0	2 (0,7%)	4 (2,1%)
Mixte (2 à 4 génotypes)		41 (15,6%)	
Total	721	262	194

Population A : séquençage dons de sang 2005 -2007

Population B : Porteurs chroniques non traités recrutement hospitalier multicentrique (1993-2002) Halfon et al. JCM 2006

Population C : Porteurs chroniques non sélectionnés recrutement hospitalier (1999-2004) Trimoulet et al. Gastroent.2007

Discussion (2)

- **Génotypage des dons de sang AgHBs positifs depuis 2005**

- Techniques de génotypage et sérotypage complémentaires

- Dons non génotypables: - Charge virale trop faible

- Infection par plusieurs génotypes VHB

*Halfon et al. 2006 16% d'infections mixtes de 2 à 4 génotypes
(INNO-LiPA HBV Genotyping, Innogenetics)*

*Projet en cours: Etude de la fréquence des infections mixtes VHB
chez les donneurs de sang*

- *Test Inno-LiPA : 32/200 dons - 2006 (16%)*

- *Confirmation par clonage moléculaire:*

- 11 cas d'infections mixtes (2 à 3 génotypes VHB)*

- 17 génotypes uniques*

- 4 en cours*

Discussion (3)

- Prévalence des variants de l'AgHBs: 5,5% (n=40)
 - Sous-estimation car étude d'une population AgHBs positive 28% de variants de l'enveloppe chez patients hospitalisés (traitement+++)
Roque-Afonso et al. 2007
 - Mutation **W172stop** isolée pour 2 souches (conséquence de R au traitement à l'ADV)

Transmission possible de ces souches

- Charge virale plus faible pour les souches mutées
Potentiel répliatif altéré/souches sauvages

Projet en cours: Comparaison de trousse de dépistage de l'AgHBs vis à vis d'un panel de protéines recombinantes calibrées

- Banque d'ADN et de protéines de souches VHB génotypes A à G
- Banque d'ADN et de protéines de variants de l'enveloppe

Remerciements

l'EFS et le CTSA

INVS

Josiane Pillonel

Laboratoire de Virologie - INTS

*Rémi Caparros, Nicolas Dubois, Annie Girault, Catherine Jourdain,
Syria Laperche, Mélanie Mercier, Christine Portal, Annie Razer*