

Michelle Martinot-Peignoux *, Bach-Nga Pham **, Patrick Marcellin *

VHB : implications cliniques des nouveaux tests ADN VHB

RÉSUMÉ

Les tests de laboratoire basés sur des techniques de biologie moléculaire sont des outils inestimables pour le suivi des patients atteints d'hépatite chronique B. Ils peuvent être utilisés pour les dons de sang, le diagnostic de l'infection en fonction de la charge virale (active ou inactive), ils aident à établir le pronostic hépatites chroniques à virus sauvage ou à virus mutant (m'exprimant pas l'Ag HBe), la sévérité de la maladie et enfin, ils sont des guides utiles pour l'indication et le suivi des patients traités (identification du génotype, recherche de mutations de résistance).

MOTS-CLÉS

VHB, quantification, génotype, mutations de résistance,

HBV : Clinical relevance of the new assays

SUMMARY

Molecular biology based assays are invaluable tools for the management of chronic viral hepatitis B. They can be used to test blood bank donations, diagnose active or inactive infection, help to establish the prognosis, guide for the treatment decisions and assess the virological response to therapy. This article reviews current molecular biology based techniques and assays, and their practical use in the management of chronic hepatitis B.

KEYWORDS

HBV, quantification, genotype, HBV resistance,

I - Quantification du VHB

Les progrès de la biologie moléculaire ont conduit au développement de tests avec une limite de détection de plus en plus basse (< 100 copies/mL). Ces techniques sont basées sur l'amplification du signal après une hybridation moléculaire ou une amplification de la cible (PCR-TMA) (1, 2). Les tests de quantification de l'ADN du VHB actuellement disponibles figure dans tableau I (3-11). Un effort de standardisation de la quantification de l'ADN-VHB a été récemment menée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et devrait permettre de définir un facteur de conversion pour chaque technique afin d'uniformiser le rendu de résultats (12).

1 - Quand doit-on faire une mesure de la charge virale du VHB?

1.1 - Hépatite aiguë

Le diagnostic repose sur des tests sérologiques spécifiques. La mesure de la charge virale n'est donc pas utile.

1.2 - Hépatite chronique

Hépatite chronique AgHBe positif, la mesure de la charge virale ne s'impose pas (AgHBe est un marqueur de réplication virale)(2).

Hépatite chronique AgHBe négatif, la mesure de la charge virale permet d'identifier :

- Un porteur inactif de AgHBs (charge virale <10⁵)

* Unité de Recherche INSERM U- 481 et Service d'Hépatologie - Hôpital Beaujon - 100 Bd. du Général Leclerc - 92110 Clichy
Tél. : 01 40 87 55 45 - Fax : 01 47 30 94 40 - E-Mail : martinot@bichat.inserm.fr

** Département d'Immunologie Microbiologie des Maladies Infectieuses (DIMPI) - Hôpital Beaujon, 92110 Clichy.

VHB : Implications cliniques des nouveaux tests ADN VHB

Tableau I

Tests de quantification ADN du VHB.

Test	Méthode	Région	Intervalle linéaire de Quantification	Disponibilité
Ultra-Sens HBV Digene Hybrid-Capture DigeneCorp, Gaithersburg USA	Amplification du signal (hybridation)		4700 à 5,7x10 ⁷ copies/ml	oui
Versant HBV DNA 3.0 Assay (bDNA) (Bayer Diagnostics USA)	Amplification du signal (hybridation)	Génome complet	3000 à 10 ⁸ copies/ml	oui
Amplicor HBV Monitor* (Roche Molecular Systems USA)	Amplification de la cible (PCR manuelle)	PréC/C	103 à 4x10 ⁶ copies/ml	oui
Cobas Amplicor HBV Monitor* (Roche Molecular Systems USA)	Amplification de la cible PCR semi-automatisée	PréC/C	200 à 2x10 ⁶ copies/ml	oui
Cobas TaqMan HBV IVD (Roche Molecular Systems USA)	Amplification de la cible PCR en temps réel	PréC/C	35 à 6x10 ⁸ copies/ml	oui

* La limite supérieure de quantification n'étant pas suffisamment haute, la dilution au 1/10^{ème} ou au 1/100^{ème} des échantillons est nécessaire.

copies/ml) (2, 13-14).

- Un patient en phase de rémission (ALT normales - faible répllication virale <10⁵ copies/ml) (15-16).
- Un patient avec une hépatite chronique à virus mutants (répllication virale 10⁵- 10⁷copies/ml) (15-16).

1.3 - Sévérité de la maladie

La persistance d'une répllication virale (importante) est associée à un risque évolutif significatif vers la cirrhose ou le développement d'un hépatocarcinome. Ce risque est faible en l'absence de répllication virale (2, 14-15).

1.4 - Traitement

La quantification de l'ADN VHB est un outil clé pour la décision et la surveillance d'un traitement (16).

Décision de traiter :

- Une charge virale >10⁵ copies/mL est un indicateur de traitement.
- Une charge virale >10⁸ copies/mL est un facteur prédictif de mauvaise réponse au traitement.

Surveillance du traitement :

La mesure de la charge virale va permettre d'évaluer :

- l'efficacité du traitement ;
- l'éradication du virus ;
- le suivi à long terme d'un patient ayant répondu au traitement ;
- la mise en évidence d'un échappement (résistance virale).

En résumé, la quantification de l'ADN du VHB est un outil important pour la prise en charge des patients atteints d'hépatite chronique B. Cependant il est encore difficile d'établir des recommandations d'utilisation en l'absence de données concernant la valeur des seuils cliniquement significatifs.

NOTE

Cet article constitue l'adaptation de l'atelier «VHB : implications cliniques des nouveaux tests ADN VHB » du XXXI^{ème} Colloque du SNBH (St-Nazaire, 2003).

II - Mutants pré-core

Le variant VHB le plus fréquemment rencontré est celui dont le profil phénotypique correspond à la perte de l'antigène HBe (AgHBe) associée à une diminution de la répllication virale chez les malades porteurs chroniques de l'antigène HBs (AgHBs). Ces mutations surviennent spontanément dans la région pré-core. Les deux mutations les plus importantes sont représentées d'une part par l'apparition d'un codon stop en position 1896 (G1896A) et la double mutation, A1762T et G1764A, appelée mutant basal core promoteur ou BCP (17, 18). Ces mutations aboutissent à un arrêt de la synthèse de l'AgHBe, mais n'empêchent pas la répllication virale, qui est cependant plus faible. Ces mutants évoluent vers une forme chronique de manière tout à fait distincte de la forme sauvage. Les différentes techniques permettant la mise en évidence des mutations pré-core et BCP sont décrites dans le tableau 2, page suivante (19-21).

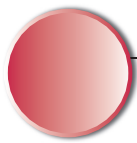
1 - Quand doit-on faire une recherche de mutants pré-Core ou BCP?

1.1 - Hépatite chronique

La recherche de mutations peut permettre de différencier les patients infectés par un virus mutant des patients en phase de rémission.

1.2 - Sévérité de la maladie

Des études réalisées dans le bassin Méditerranéen et en Asie ont montré une association entre présence de mutants pré-core ou BCP et sévérité de la maladie hépatique. Ces résultats restent controversés (22).



Test	Méthode	Région	Disponibilité
Séquençage direct	Amplification Séquençage	Pré-Core et BCP	non
Polymorphisme de taille de fragments de restriction	Amplification Digestion enzymatique	Pré-Core et BCP	non
Line probe assay InnoLipa	Amplification Hybridation spécifique Lamelle de nitrocellulose	Pré-Core et BCP	oui
Enzyme linked minisequence assay	Amplification Hybridation dans microplaque	pré-Core et BCP	non

1.3 - Traitement

Plusieurs études ont rapporté, chez les patients avec une hépatite chronique B à virus mutants, un taux de réponse au traitement par interféron, plus bas (23).

En résumé, l'interprétation du rôle clinique ou pathogène des mutations pré-core et BCP doit être tempérée par l'influence de facteurs confondants additionnels (hôte et viraux). La recherche de la présence de mutations, pré-core et BCP, doit être réalisée dans un but de recherche et ne doit pas, actuellement, être recommandée pour le suivi en routine des patients atteints d'hépatite chronique B.

III - Mutations de résistance

Depuis quelques années une avancée importante a été réalisée dans le traitement de l'hépatite chronique B avec l'utilisation d'anti-viraux inhibant la reverse transcriptase. Chez les patients traités par lamivudine on observe une diminution importante de la charge virale (3 à 4 log). La limitation majeure de ce traitement est l'apparition de mutations de résistance : 14 % à 32 % après 1 an de traitement et 38 % à 58 % après 2 ans de traitement. Le développement de cette résistance est associé à un échappement (augmentation de la charge virale) au traitement dans les 6 mois qui suivent l'apparition de la première mutation de résistance (24, 25). Ces mutations peuvent être détectées par séquençage direct, par hybridation inverse et/ou

polymorphisme de taille de fragments de restriction après amplification et digestion enzymatique. Le tableau III résume les différentes mutations décrites (26-28).

1 - Quand doit-on faire une recherche de mutations de résistance ?

1.1 - Traitement

Chez les patients traités par Lamivudine, la recherche précoce de mutations de résistance permet d'anticiper la réactivation de l'hépatite chronique par une adaptation du traitement (ajout de l'Adéfovir dès la détection de mutations de résistance) (29, 30). Pour les autres molécules anti-rétrovirales (Adéfovir, Entécavir, Clévidine, Ténofovir.....), il n'y a actuellement pas suffisamment de données bibliographiques pour recommander une recherche de mutations de résistance (31, 32).

IV - Génotypage HBV

La classification internationale a récemment établi 7 génotypes du VHB, classés de A à G. Les génotypes du VHB ont une distribution géographique particulière (voir tableau IV). Les génotypes les plus fréquemment rencontrés en Europe et Amérique sont les génotypes A et D, en Afrique les génotypes A et E, en Asie les génotypes B et C (33). Les techniques de génotypage reposent sur des

Tableau II
Techniques de détections des mutations pré-core et BCP.

Tableau III
Mutations responsables de résistance au traitement.

	Lamivudine	Emtricitabine	Adéfovir dipivoxil	Entécavir
Mutations de résistance	M204V M204I	M204V M204I	N236T A181V/T	S202G S202I T184G M250V
Mutations compensatoires	V173L L180M			
Molécules actives sur les résistances	Adéfovir Ténofovir Entécavir	Adéfovir Ténofovir Entécavir	Lamivudine Emtricitabine Entécavir	

VHB : Implications cliniques des nouveaux tests ADN VHB

A	B	C	D	E	F	G
Europe du Nord USA Canada Inde Afrique Australie	Asie	Asie	Universelle Forte prévalence Europe du Nord Australie	Afrique Sud / Ouest	Amérique Centrale / Sud	Europe de Nord USA

Tableau IV

Distribution des génotypes du VHB.

techniques exploitant la variabilité génétique du VHB. Séquençage direct TRUGENE HBV genotyping kit (Bayer)(28), utilisation d'amorces spécifiques puis, hybridation inverse (LiPA; INNO-LIPA HBV genotyping assay Innogenetics) (34), ou polymorphisme de restriction après digestion enzymatique.

1 - Quand doit-on faire une recherche du génotype VHB?

Il y a actuellement peu de données bibliographiques disponibles sur l'implication clinique du génotype VHB (35).

1.1 -Traitement

Le rôle du génotype sur la réponse au traitement par interféron a été étudié de façon rétrospective. Une étude Européenne (36) rapporte un meilleur taux de réponse chez des patients infectés par le génotype A que chez des patients infectés par le génotype D. Une étude Asiatique (37) rapporte un meilleur taux de réponse chez des patients infectés par le génotype B que chez des patients infectés par le génotype C. Des résultats similaires (non publiés) ont été rapportés pour l'interféron pegylé. Le rôle du génotype sur la réponse au traitement par les nucléosides ou les nucléotides analogues reste encore à définir.

1.2 - Sévérité de la maladie

Des études préliminaires ont montré que le génotype C serait associé à une maladie plus sévère, et que le génotype B serait associé au dévelop-

pement de carcinome hépato cellulaire chez les Asiatiques. (38, 39).

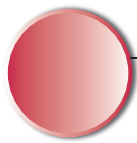
En résumé, certains génotypes VHB pourraient être des facteurs prédictifs de réponse au traitement par interféron et/ou interféron pegylé. Cependant, il est nécessaire de conduire des essais thérapeutiques contrôlés pour vérifier ces hypothèses. En attendant les résultats de ces études, l'identification du génotype VHB doit rester dans le domaine de la recherche.

V - Conclusion

Les nouvelles techniques de biologie moléculaire, sont des outils importants pour le management des patients atteints d'hépatite chronique B. La quantification de l'ADN du VHB, par des techniques sensibles, apporte de nombreuses réponses mais soulèvent de nouvelles interrogations. Des études supplémentaires sont nécessaires pour la standardisation de la quantification de l'ADN VHB et établir les différents seuils cliniques, (portage inactif de AgHBs, réactivation spontanée, réponse virologique soutenue, échappement au traitement,) cela, afin de pouvoir définir une ligne de conduite face aux patients. Une meilleure connaissance des mécanismes de résistance aux antiviraux et de l'implication des génotypes à la réponse au traitement permettra le développement de nouvelles thérapeutiques et l'optimisation des traitements.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) PAWLITSKY JM, BASTIE A, HEZODE C, et al. Routine detection and quantification of hepatitis B virus DNA in clinical laboratories: performance of three commercial assays. *J. Virol. Methods*, 2000, **85**, 11-21.
- (2) PAWLITSKY JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*, 2002, **122**, 1554-1568.
- (3) LOPEZ VA, BOURNE EJ, LUTZ MW et al. Assessment of the COBAS Amplicor HBV Monitor test for quantitation of serum hepatitis B virus DNA levels. *J Clin, Microbiol.*, 2002, **40**, 1972-76.
- (4) WEISS J, WU H, FARRENKOPF B, et al. Real time TaqMan PCR detection and quantitation of HBV genotypes A-G with the use of an internal quantitation standard. *J. Clin. Virol.* 2004, **30**, 86-93.
- (5) SHYAMALA V, ARCANGEL P, COTTRELL J, et al. Assessment of the target-capture PCR hepatitis B virus DNA quantitative assay and comparison with commercial HBV DNA quantitative assays. *J. clin. Microbiol.*, 2004; **42**, 5199-5204.
- (6) STEZL E, MULLER Z, MARTH E, et al. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by automated sample preparation and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2004; **42**, 2445-2449.
- (7) YAO JD, BELD MG, OON LL, et al. Multicenter evaluation of the VER-SANT hepatitis B virus DNA 3.0 assay. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 800-806.
- (8) Yuan HJ, Yuen MF, Wong DK, et al. Clinical evaluation of the Digene hybrid capture II test and COBAS AMPLICOR monitor test for determination of hepatitis B virus DNA levels. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 3513-3517.
- (9) DAI CY, YU ML, CHEN SC, et al. Clinical evaluation of the COBAS Amplicor HBV monitor test for measuring serum HBV DNA and comparison with the Quantiplex branched DNA signal amplification assay in Taiwan. *J. Clin. Pathol.*, 2004, **57**, 141-145.
- (10) LEB V, STOCHER M, VALENTINE-THON E, et al. Fully automated, internally controlled quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR by use of the MagNA Pure LC and light Cyler instruments. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**: 585-590.



- (11) KESSLER HH, PREININGER S, STEZL E, et al. Identification of different states of hepatitis B virus infection with a quantitative PCR assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, **7**, 298-300.
- (12) SALDANHA J, GERLICH W, LELIE N, et al. An internal collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang*, 2001; **80**, 63-71.
- (13) MARTINOT-PEIGNOUX M, BOYER N, Colombat N, et al. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *J. Hep.*, 2002; **36**, 543-546.
- (14) CHU CJ, LOK ASF. Clinical utility in quantifying serum HBV DNA using PCR assays. *J. Hep.*, 2002, **36**, 549-551.
- (15) CHU CJ, HUSSAIN M, LOK ASF. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology*, 2002, **36**, 1408-1415.
- (16) MOMMEJA H, MONDOU E, BLUM MR et al. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: analysis and review of the literature. *Hepatology*, 2003, **37**, 1309-1319.
- (17) BUCKWOLD VE, XU Z, CHEN M, et al. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J. Virol.*, 1996, **70**, 5845-5851.
- (18) SCAGLIONI PP, MELEGARI M, WANDS JR. Biologic properties of the hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology*, 1997, **233**, 374-381.
- (19) SABLON E, DE GENDT S, DOUTRELOIGNE J, et al. New sensitive assays for the study of the clinical relevance of HBV genomic variation. *J. Hepatol.*, 2002, **36** (suppl 1):127.
- (20) CAMERON-WILSON CL, MUIR L, BALLARD AL, et al. Evaluation of a line probe assay for identification of hepatitis B virus precore variants in serum from chronic hepatitis B carriers. *J. Virol. Methods*, 2003, 97-103.
- (21) LINDH M, HORAL P, DHILLON AP, et al. Hepatitis B virus carriers without pre core mutations in hepatitis B e antigen negative stage show more severe liver damage. *Hepatology*, 1996 **24**, 494-501.
- (22) CHAN HLY, HUSSAIN M, LOK ASF. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology*, 1999, **29**, 976-984.
- (23) LOK ASF, MCMAHON BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2001, **34**, 1225-1241.
- (24) HEATHCOTE J. Results of Lamivudine therapy for HBe antigen positive hepatitis (in the West). *J. Hepatol.*, 2003, **39**, S 106-S110.
- (25) LIAW YF. Results of Lamivudine trials in Asia. *J. Hepatol.*, 2003, **39**, S111-S115.
- (26) STUYVER L, VAN GEYT C, DE GENDT S, et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*, 2001, **33**(3), 7517-57.
- (27) STUYVER L, VAN GEYT C, DE GENDT S, et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus infected patients during anti-viral therapy. *J Clin Microbiol.*, 2000, **38**, 702-07.
- (28) ROQUE-AFONSO AM, FÉREY MP, MACKIEWICZ V, et al. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during Lamivudine therapy in human immunodeficiency coinfecting patients: performance of CLIPTM sequencing and lone probe assay. *Antiviral Therapy*, 2003, **8**, 627-634.
- (29) NAFA S, AHMED S, TAVAN D, et al. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated with lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2000, **32**, 1714-1722.
- (30) MARTINOT-PEIGNOUX M, CASTELNAU C, BOYER N, et al. Evaluation of Trugene HBV genotyping kit, a sequence based genotyping assay for determination of mutations and viral genotype. *Hepatology*, 2003; **38** (Suppl 2) p115.
- (31) LAU DT, KHOKHAR MF, DOO E, et al. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology*, 2000; **32**, 828-34.
- (32) ZOULIM F. Hepatitis B virus resistance to antivirals: clinical implications and management. *J. Hep.*, 2003, **39**, S133-S138.
- (33) HALFON P, POL S, BOURLIÈRE M, et al. Les génotypes du virus de l'hépatite B : Implications cliniques, épidémiologiques et thérapeutiques. *Gastroenterol. Clon. Biol.*, 2002; **26**, 1005-1012.
- (34) OSIOWY C, GILES E. Evaluation of INNO-LiPA HBV genotyping assay for determination of hepatitis B genotype. *J Clin Microbiol.* 2003, **41**, 5473-5477.
- (35) WAI CT, FONTANA RJ. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants, and mutants. *Clin. liver dis.*, 2004; **8**, 321-352.
- (36) ERHART A, REINEKE U, BLONDIN D, et al. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology*, 2000; **31**, 716-725
- (37) WAI CT, CHU CJ, HUSSAIN M, et al. HBV genotype B is associated with a better response to interferon therapy in HBeAg (+) chronic hepatitis B than genotype C. *Hepatology*, 2002, **36**, 1425-1430.
- (38) KAO JH, CHEN PJ, LAI MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2000, **118**, 554-559.
- (39) SUMI H, YOKOSUKA O, SEKI N, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003, **37**, 19-26.