

Le diagnostic face à la variabilité du virus de l'hépatite B

Depuis une dizaine d'années, alors que l'hépatite B demeure un réel problème de santé publique, on observe l'apparition de mutants du virus en cause (le VHB), dont certains peuvent ne pas être détectés par des kits de diagnostic présents sur le marché. Quelles sont les conséquences de ce phénomène pour les patients, pour les fabricants de réactifs, et pour les biologistes ? Peut-on prévoir une évolution des performances du diagnostic prenant en compte les progrès de la biologie moléculaire ? Quels sont les critères réglementant la commercialisation des trousse de diagnostic et leurs performances ? Telles sont quelques-unes des questions abordées lors de cette table ronde organisée par Abbott Diagnostics France et *Spectra Biologie*, le 29 juin 2006.

Les participants :

- **Pr Christian TRÉPO**, Directeur de l'unité Inserm 271 « Virus des hépatites et pathologies associées », Chef du service d'hépatologie et gastro-entérologie, Hôtel Dieu, Lyon
- **Dr Syria LAPERCHE**, Médecin Biologiste, responsable de l'unité d'expertise en virologie, centre national de référence des hépatites B et C en transfusion, Institut national de la transfusion sanguine (INTS), Paris
- **Dr Vincent THIBAULT**, Praticien Hospitalier, laboratoire de virologie - CERVI, GH Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
- **Dr Thoai Duong LY**, Biologiste du laboratoire Claude Lévy (LCL), Ivry-sur-Seine
- **Dr Francis POISSON** et **Eric LAFORGERIE**, unité d'évaluation et contrôle du marché, Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps)

Contribution additionnelle :

(Encadré III - Combiner tests sérologiques et tests génétiques)

- **Pr François DENIS**, laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène - CHU Dupuytren 2, Avenue Martin Luther King - 87042 Limoges

Animation et compte-rendu :

- **Jean-Jacques PERRIER**, Journaliste Scientifique

Spectra Biologie : Il semble que le regard des spécialistes sur l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) et sur son diagnostic ait évolué ces dernières années. Pouvez-vous expliquer en quoi ?

Christian TRÉPO : Classiquement, on décrit l'évolution de l'infection par le VHB en plusieurs phases : phase de latence, de tolérance immunitaire durant laquelle le virus se réplique fortement sans induire de lésions significatives et qui peut durer une ou plusieurs décennies en cas de contamination périnatale ; phase de rupture de tolérance (réaction immune) caractérisée par le rejet des hépatocytes infectés et l'apparition de lésions hépatiques inflammatoires et nécrosantes ; et enfin hépatite chronique inactive.

La stratégie thérapeutique consistait à n'intervenir qu'à partir de la phase inflammatoire pour que les médicaments qui « s'appuient sur la réaction immune », comme l'interféron, soient les plus efficaces possible. Or de grandes études menées à Taïwan et en Chine sur des milliers de patients suivis pendant dix ans ont montré récemment qu'on peut simplifier et rationaliser cette histoire naturelle, en mesurant tout simplement le taux d'ADN viral dans le sang : les patients ont un risque de cirrhose et de cancer hépatique proportionnel à l'intensité de la réplication du VHB, donc à la charge virale. Dans cette analyse de risque à l'échelon d'une population, les transaminases, marqueurs classiques dont la quantité augmente fortement après la rupture de tolérance, n'importent absolument pas dans l'évaluation statistique du risque.

En outre, ces études montrent que le traitement de patients par les analogues de nucléosides, qui font baisser la réplication virale, annule quasiment le risque d'évolution vers l'hépatite chronique. Puisque l'on dispose de médicaments capables de bloquer efficacement la réplication, il faudrait pouvoir détecter le taux d'ADN chez toutes les personnes à risque et, en cas de résultat positif, les traiter dès lors qu'il dépasse 4 log (10 000 copies/mL). Or cette révolution du diagnostic moléculaire est en marche. Nous disposons en effet d'outils très sensibles pour rechercher et quantifier l'ADN dans le sang.

Pr Christian Trépo



S. B. : En pratique, qu'est-ce que cela signifie pour le diagnostic ?

C. TRÉPO : Actuellement, le diagnostic de l'infection par le VHB repose principalement sur la mise en évidence de l'antigène de surface (AgHBs) et/ou des anticorps dirigés contre des antigènes de la capsid virale (Ac anti-HBc) par des tests immuno-enzymatiques (Elisa). Or, certains cas d'infection ne présentent pas d'antigène HBs ou d'anticorps anti-HBc détectables. C'est l'absence d'AgHBs malgré la présence de virus circulant décelée par l'ADN du VHB qui caractérise l'infection « occulte ». Selon la littérature scientifique, il faudrait donc rechercher systématiquement l'ADN du VHB devant toute suspicion d'infection à VHB, même si la détection de l'AgHBs et de l'anticorps anti-HBc est négative. Au plan diagnostique, cette tactique est rentable : la prévalence de l'infection occulte dans les pays d'Europe du Sud, dont la France, chez des patients chroniques HBs négatifs, donc sans cause identifiée, est de l'ordre de 10 % dans les hépatites chroniques, de 40 % dans le cas des hépatites fulminantes, de 60 % dans les cancers du foie.

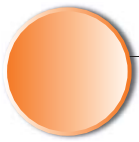
Encadré I - Une infection silencieuse mais redoutable

Dans plus de 90 % des cas, la primo-infection par le virus de l'hépatite B (VHB) guérit spontanément chez l'adulte immunocompétent. Mais elle peut aboutir dans 5 à 10 % des cas adultes (plus de 80 % dans la petite enfance) à une infection chronique, qui se traduit chez 70% de ces patients par une hépatite chronique et un risque important d'évolution vers la cirrhose du foie et un cancer hépatique.

L'infection chronique par le VHB concerne plus de 350 millions de personnes dans le monde sur 2 milliards infectées, et cause 500 000 à 1,2 million de décès chaque année, dont 320 000 par suite d'un cancer du foie (près de 0,1 %). En France, l'Institut national de veille sanitaire (InVS) a révisé à la hausse les précédentes estimations concernant la prévalence du portage de l'antigène HBs : le nombre de cas serait aujourd'hui de l'ordre de 300 000 (0,68 % de la population âgée de 20 à 80 ans), contre une évaluation de 100 000 dans les années 1990.

Syria LAPERCHE : Il faut noter que la prévalence de l'infection B occulte varie énormément puisque les chiffres vont de 0,5 % à 25 % dans la littérature. Ces taux dépendent en effet de la situation épidémiologique de la population étudiée ; par exemple, ils sont faibles chez les donneurs de sang français (de l'ordre de 0,1 % d'après nos travaux), mais plus importants dans les régions de forte endémie comme l'Asie, par exemple. Ils dépendent aussi des techniques utilisées d'une part pour détecter l'AgHBs (moins celle-ci est sensible, plus on a de chances d'obtenir des taux élevés d'infections occultes), d'autre part pour détecter l'ADN viral (plus la technique est sensible et plus élevé sera le taux).

Toutefois, il convient d'être très prudent dans l'interprétation des résultats obtenus avec les techniques



de biologie moléculaire ultrasensibles, car des faux positifs peuvent être à l'origine d'une surestimation des taux d'infections B occultes observés. La détection de l'ADN viral constitue une aide au diagnostic incontestable. Cependant, il faut avoir à l'esprit que tous les patients porteurs d'AgHBs ne sont pas détectés porteurs du virus avec les outils moléculaires à ce jour disponibles. Ainsi, dans notre expérience, dans un groupe de donneurs de

Dr Syria Laperche



Encadré II - Quelle prévalence des mutants ?

Il existe peu d'études sur le taux de mutants d'antigènes HBs dans la population européenne. En France, le groupe d'Anne-Marie Roque-Afonso et Elisabeth Dussaix (hôpital Paul-Brousse, Villejuif) a testé 55 échantillons issus de sérums infectés. Il a trouvé que 29 % présentaient « des substitutions susceptibles (...) de mettre potentiellement en défaut certains tests diagnostiques » **(1)**. Plus récemment, lors de la conférence 2006 de l'EASL (Association européenne d'étude du foie), A.M. Roque-Afonso a mentionné des prévalences de 16 % en ville et 27 % à l'hôpital. En Espagne, l'équipe de Ana Avellon et José Echevarria (Institut Carlos III, Madrid) a trouvé, parmi 272 échantillons de sérums issus de porteurs chroniques du VHB, une prévalence de 39 % de mutants, et les mutations connues pour n'être pas détectées par certains tests représentaient 12,5 % des cas **(2)**. En avril 2004, une réunion de consensus concluait que « la prévalence des mutants AgHBs est probablement plus élevée que ce que l'on croyait » et recommandait d'utiliser les tests susceptibles de « détecter avec fiabilité les mutants les plus fréquemment observés », c'est-à-dire concernant les positions 139-145 du « déterminant a » **(3)**. Il semble que la situation n'a guère changé.

- (1)** ROQUE-AFONSO A.-M., FERREY M.-P., BELKHIRI D., DUSSAIX E., Les mutants de l'antigène HBs : prévalence, impact diagnostique et clinique HBs antigen mutants: prevalence, clinical and diagnostic implications, *Pathol. Biol.* (Paris), 2005, 53(8-9), 563-568.
- (2)** AVELLON A. & ECHEVARRIA J.M., Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers, *J. Med. Virol.*, 2006, 78(1), 24-36.
- (3)** GERLICH W.H., Diagnostic Problems Caused by HBsAg Mutants - A Consensus Report of an Expert Meeting. *Intervirology*. 2004, 47, 310-313.

sang AgHBs positifs, nous avons obtenu un résultat positif pour l'ADN dans 80 % (détection de l'ADN sur pools) à 98 % (détection de l'ADN en unitaire) des cas. Cela signifie qu'au mieux 2 % des infections ne sont pas détectées avec les outils actuels de la biologie moléculaire.

Vincent THIBAUT : La plupart des études évoquées par Syria Laperche pêchent par le fait qu'elles ne mentionnent pas les tests utilisés pour la détection de l'AgHBs ou bien parce que les tests sont de première génération, avec une sensibilité et des performances inférieures à ceux qui sont commercialisés aujourd'hui. On peut donc supposer qu'avec des kits plus performants, ces infections dites « occultes » auraient été correctement diagnostiquées et identifiées comme « classiques ». En clair, dans cet amalgame d'analyses, on trouve pêle-mêle de vraies infections B occultes, des contaminations qui n'ont pas été détectées par les tests par suite de mutations des virus, ou bien des infections classiques par un virus sauvage dont les antigènes HBs sont faiblement positifs et qui n'ont pas été repérées en raison du manque de sensibilité des tests.

J'adhère aussi à la vision de Christian Trépo : puisque les traitements deviennent efficaces sur la réplication virale, c'est elle qu'il faudrait désormais mesurer. N'oublions pas que le nombre de cas risque d'augmenter dans notre pays, la France étant un mauvais vaccinateur contre l'hépatite B : 29 % des enfants de l'âge d'un an sont vaccinés, selon les derniers chiffres de l'OMS, alors que la majorité des pays européens sont au-delà de 70-80 %. Il faut également rappeler que la vaccination protège également contre le virus de l'hépatite Delta qui est parfois associé au VHB et peut provoquer une pathologie au moins aussi sévère.

Dr Vincent Thibault



S. B. : Comment explique-t-on les infections occultes par le VHB ?

C. TRÉPO : La cause la plus commune, nous allons y revenir, est la mutation du gène S codant pour les protéines HBs ou celle du gène de la polymérase, dont dépend la réplication virale. Un deuxième cas de figure provient du freinage ou du masquage de la réplication du VHB par le virus

Le diagnostic face à la variabilité du virus de l'hépatite B

de l'hépatite C (VHC). Vingt pour cent des hépatites chroniques C seraient ainsi associées à des infections B occultes. D'ailleurs, tous les spécialistes s'accordent pour dire que toutes les hépatites chroniques C devraient faire l'objet d'une recherche ultrasensible d'ADN du VHB.

Encadré III - Combiner tests sérologiques et tests génétiques

Pr François DENIS*

Cela fait plus de trente ans que je travaille sur le VHB et, plus le temps passe, moins je comprends ce virus. S'il possède un petit génome de 3 200 paires de bases, il est astucieux : il élargit son information génétique grâce aux différents cadres de lecture chevauchants. Il peut avoir un taux de réplication considérable permettant l'émergence de mutants. Lesquels peuvent porter sur différents gènes et pas seulement sur le gène S ou sur celui de la polymérase.

Les variants portant notamment sur la « boucle a » sont fréquents, et ne se limitent pas à la mutation G145R. Il existe souvent plusieurs mutations et dans certains cas des sujets infectés restent AgHBs négatifs même avec les trousseaux censés détecter ces mutants, les mutations se situant ailleurs, notamment au niveau de gènes de régulation.

Par ailleurs, les hépatites B occultes (Ag HBs-, anti-HBc±) sont rares chez les mono-infectés, mais fréquentes chez les co-infectés VHB + VHC, ou VHB + VIH, et chez les tri-infectés VHB + VHC + VIH.

Il m'apparaît évident que les outils diagnostiques de demain devront combiner tests sérologiques et tests génétiques pour diagnostiquer et surveiller les infections à VHB ; ces deux approches connaissent toutes deux des limites et seule leur combinaison limitera les faux négatifs.

Nous avons une bonne sécurité transfusionnelle en France ; mais l'on ne peut nier que si l'on considère les trois grands virus transmissibles par le sang : VIH, VHC, VHB, le risque résiduel actuellement le plus élevé concerne le VHB. En attendant cette double approche sérologique - génomique, il est évidemment souhaitable d'utiliser les trousseaux AgHBs les plus aptes à détecter les mutants S les plus fréquents.

Nous connaissons tous des cas de sujets guéris (AgHBs-, anti-HBc+, anti-HBs+, anti-HBe+) qui, à la faveur d'une immuno-dépression, deviennent anti-HBc isolés puis dans un troisième temps AgHBs+, anti-HBc+... Il s'agit soit d'une surinfection, soit plutôt d'une persistance à bas bruit d'une réplication qui profite de l'immuno-dépression pour passer à un niveau supérieur.

Il existe aussi des co-infections par des souches différentes, voire par plusieurs génotypes distincts, avec parfois recombinaison génétique, spécialisation de souches, existence de quasi-espèces, variants ou mutants dans des compartiments différents qui peuvent constituer des réservoirs participant à l'échappement des souches.

Tous ces aspects méritent réflexion alors que nous sommes à l'aube du traitement curatif : celui-ci devra probablement être plus précoce et administré à des patients sélectionnés, car à plus fort risque d'évolution vers la chronicité, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Il est probable que le traitement évoluera, comme dans le cas du VIH vers des tri, voire des quadrithérapies... avec usage systématique de la biologie moléculaire pour surveiller la charge virale, les génotypes, les mutants... et optimiser le choix thérapeutique.

On doit avoir le triomphe modeste. Beaucoup de choses restent à faire dans le domaine de l'hépatite B, dans la compréhension de la maladie, de son histoire naturelle, dans le domaine du diagnostic et du traitement préventif et curatif. Sur tous les points énumérés, la variabilité du VHB et la sélection de variants interviennent considérablement.

* Laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène - CHU Dupuytren
2, Avenue Martin Luther King - 87042 Limoges

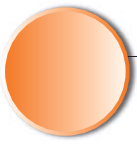
V. THIBAUT : Indépendamment de cet effet de masquage par le VHC, la non-détection des antigènes viraux est d'abord due à la variabilité génétique intrinsèque du VHB qui fait que certaines souches évoluent différemment. On dénombre de ce fait huit génotypes (A à H) du VHB qui diffèrent pour plus de 8 % du génome viral. Ces génotypes, qui se sont propagés au fil du temps dans les populations, sont eux-mêmes sujets à une variabilité du simple fait de la réplication virale extrêmement importante et des erreurs générées à chaque cycle répliatif. Des phénomènes de recombinaison ont également été décrits : une souche A se combine avec une souche B, donnant une souche AB, etc. Ce potentiel de variation est infini, la seule condition étant que le virus soit viable et puisse donner des particules stables et infectieuses.

Une fois le virus installé chez l'hôte, sa variabilité génétique est liée à ce que l'on appelle les pressions de sélection. L'individu infecté se défend, donc induit une sélection des virus les mieux adaptés à sa réaction immunitaire : réponse humorale, par l'intermédiaire des anticorps, et réponse cellulaire, par les lymphocytes. Les protéines de l'enveloppe virale, les antigènes HBs principalement, mutent ainsi sous l'influence des anticorps dirigés contre les particules virales.

S. B. : Les traitements et la vaccination représentent-ils une autre forme de pression de sélection ?

V. THIBAUT : Effectivement, des variants de l'antigène HBs ont été particulièrement décrits dans les régions de forte endémie où une vaccination de masse a été entreprise. L'introduction d'une pression vaccinale importante a sélectionné progressivement des variants viraux non reconnus par les anticorps induits par la vaccination. De même, chez les transplantés hépatiques greffés en phase terminale d'une hépatite B, pour éviter l'infection du greffon indemne d'hépatite B, on administre au patient de grandes quantités d'immunoglobulines anti-HBs et des médicaments antiviraux ; le seul virus qui pourra éventuellement infecter le foie greffé sera celui dont les mutations de l'AgHBs ne seront pas reconnues par les anticorps anti-HBs et dont la polymérase virale aura acquise des mutations lui conférant une résistance aux antiviraux.

Cependant, cette sélection est plus complexe que pour d'autres virus : les gènes qui codent les différentes protéines sont chevauchants si bien que la sélection d'un variant pour un gène donné peut avoir des conséquences sur deux protéines virales différentes. L'interféron, en agissant sur la réponse immunitaire, induit la sélection de variants sans antigène HBe. Mais si l'on utilise des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques, on sélectionne des variants qui résistent à ces médicaments par suite de mutations au niveau du gène de la polymérase. Comme ce gène chevauche celui de l'antigène HBs, la variation affecte aussi parfois l'enveloppe du virus et la protéine HBs, qui peut ainsi échapper à la détection.



En tant que virologues cliniciens, la variabilité génétique du VHB nous intéresse surtout dans la mesure où elle pose problème pour la prise en charge des patients, un peu comme les médecins s'inquiètent de la progression des résistances aux antibiotiques parmi les bactéries pathogènes.

C. TRÉPO : Je suis bien d'accord pour que l'on se pose la question de l'infection par le VHB avant tout en termes de conséquences pathologiques. Ainsi, le fait de ne pas détecter de marqueur viral par les techniques classiques, l'AgHBs par exemple, ne signifie pas que le patient n'aura pas de complications telles que le cancer du foie. Le « VHB occulte » comme générateur de cancer est un scénario assez bien reconnu : ainsi au Canada, les Esquimaux étudiés par Gerald Minuk (université du Manitoba) ont un taux de cancer notable, alors que les taux de transaminases mesurés les classent comme « non à risque ».

S. B. : Peut-on imaginer qu'un patient traité développe une mutation non détectable et une résistance aux traitements, et qu'il infecte son entourage ?

C. TRÉPO : Le scénario catastrophe d'un échappement massif du VHB à tout traitement ou vaccin est peu probable et moins inquiétant que dans le cas du VIH. En fait, il aurait déjà dû se produire s'il était vraisemblable. Des études en Gambie sur des sujets vaccinés ont mis en évidence un échappement viral mais sans « effet boule de neige ». De plus, il a été montré chez le chimpanzé que les virus mutés redeviennent repérables par suite d'un effet de réversion vers un phénotype sauvage chez un nouvel hôte non soumis à la pression de sélection.

V. THIBAUT : Il est vrai que l'on créera forcément de nouveaux variants si de plus en plus de molécules sont mises sur le marché. Mais auront-ils la virulence nécessaire pour infecter une population ? Pour l'instant, on peut en douter. En effet, la majorité des variants sélectionnés sous la pression des médicaments n'a pas la capacité de se répliquer aussi bien qu'un virus sauvage. S'ils peuvent exceptionnellement être plus virulents dans l'organisme où ils ont été sélectionnés, la forme sauvage, sans mutation particulière, redevient prédominante dans un organisme non soumis à une pression de sélection particulière, non traité par exemple. On peut cependant émettre l'hypothèse, qui n'a cependant jamais été observée chez un patient, qu'un variant particulièrement virulent sélectionné par un traitement donné chez un individu puisse être transmis à un autre individu soumis au même traitement et induise une pathologie sévère. On entre là dans des considérations très théoriques et peu probables qui ne seront, je l'espère, jamais observées en pratique clinique. De plus, certaines mutations de l'antigène HBs réduisent la capacité du virus à se lier aux hépa-

toctes, si bien que les variants correspondant à ces mutations sont généralement moins infectieux qu'un virus sauvage.

S. B. : Quels sont actuellement les mutants du VHB répertoriés ? A-t-on une idée de leurs fréquences respectives ?

S. LAPERCHÉ : La question reste peu étudiée. Pour obtenir la fréquence d'une mutation donnée, il faudrait mettre en place des études systématiques dans diverses populations et exhaustives dans une population définie. Or aujourd'hui, la question n'est étudiée que par souci diagnostique lorsqu'un test de dépistage a été pris en défaut, donc ponctuellement. Nous savons seulement que la mutation la plus souvent observée est la substitution d'une glycine par une arginine en position 145 de la protéine HBs, la mutation G145R. D'autre part, il convient de préciser que des mutations ayant été décrites dans la littérature comme pouvant affecter le diagnostic peuvent n'avoir aucun impact sur certaines troupes de dépistage. A titre d'exemple, sur une population de plus de deux cents donneurs de sang dépistés positifs pour l'AgHBs, la recherche systématique de variants de l'enveloppe a mis en évidence 5 % de souches mutées qui n'ont pas eu d'impact sur le dépistage pratiqué.

C. TRÉPO : On sait aussi, grâce aux séquençages réalisés en cas de non-détection de l'antigène HBs, qu'il existe des « monstres », des virus B ayant plus de dix mutations dans cette protéine. Ils ne sont pas repérés par les tests, mais ils ne se répliquent pas bien, et sont lents à provoquer des dommages. Toutefois, de temps à autre, ils relancent une répllication complète après recombinaison avec un virus sauvage et provoquent alors des lésions hépatiques. Sans que cela soit un problème de santé publique, c'est un problème diagnostique caractérisé, surtout pour les populations de type dialysés, greffés hépatiques ou les patients sous chimiothérapie.

S. B. : Quelles sont les conséquences de ces mutations pour les industriels qui fabriquent les tests de détection et pour les biologistes utilisateurs ?

Thoai Duong LY : Les troupes de recherche d'AgHBs doivent avoir deux qualités déterminantes : une excellente sensibilité pour l'AgHBs du virus sauvage et une capacité à reconnaître les mutants surtout les plus fréquents comme ceux présentant la mutation G145R, qui touche le principal déterminant antigénique du VHB, le déterminant « a » du gène S.

D'après les différentes évaluations, toutes les troupes récentes testées ont une sensibilité de l'ordre de 0,1 ng/mL (panel d'AgHBs de l'Afssaps), une performance suffisante dans la grande majorité des cas. En revanche, les troupes qui n'utilisent qu'un

anticorps monoclonal dans la phase de capture de l'AgHBs peuvent ne pas détecter des mutants dont la (ou les mutations) est apparue dans l'épitope, cible de cet anticorps monoclonal.

Mais il faut garder en tête que ce défaut ne pose problème que chez les patients qui n'ont plus de virus sauvage, ou chez qui le taux du virus sauvage est sous le seuil de détection du kit, ce qui est probablement rare à l'échelle de la population générale. C'est pourquoi de nouveaux kits à base de cocktails d'anticorps monoclonaux ont été mis sur le marché ; ils sont efficaces pour détecter la plupart des mutations.

Dr Thoai Duong Ly



S. B. : Existe-t-il cependant des trousses qui « passent à travers » et restent utilisées couramment ?

T. D. LY : Oui, car le marquage CE des trousses d'AgHBs n'a pas inclus de critères concernant la détection des mutants. Si cela pose vraisemblablement rarement problème à l'échelle de la population générale, il faut ajouter que l'on devrait rechercher si possible à la fois l'AgHBs et l'anticorps anti-HBc chez les patients provenant de zones à forte prévalence ou chez les populations particulières comme les dialysés pour éviter de passer à côté de mutants, vraisemblablement plus fréquents dans ces populations. Plusieurs études récentes (voir Bibliographie citée (1-3)) ont pointé la faiblesse des trousses qui utilisent un seul anticorps monoclonal. C'est pourquoi la stratégie adoptée actuellement par les industriels est d'utiliser une combinaison de deux, trois voire quatre anticorps monoclonaux différents pour mieux détecter les mutants les plus fréquents.

S. B. : Qu'en est-il du don du sang ?

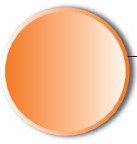
S. LAPERCHÉ : La sécurité des produits sanguins est principalement assurée par le dépistage de l'AgHBs, réalisé depuis 1971 en France. Par ailleurs, en France depuis 1988, et dans certains autres pays de faible endémie pour le VHB, il existe une double sécurité grâce à la recherche simultanée de l'AgHBs et des anticorps anti-HBc. Le risque de transmission virale par transfusion est

de ce fait extrêmement bas. La détection des anticorps anti-HBc a, en réalité, été instaurée, non pas pour se protéger du VHB mais pour éviter la transmission de l'agent des hépatites classées à l'époque non A non B. En effet, il avait été montré que l'on diminuait le risque de transmission de l'agent non A non B (en réalité le VHC, découvert en 1989) si l'on éliminait du don du sang les sujets présentant des anti-HBc – cela tient à ce que le VHB et le VHC partagent certains modes de transmission. En revanche, dans les pays de forte et moyenne endémies, qui ne pratiquent pas la détection des anticorps anti-HBc au risque d'être confrontés à une pénurie de sang, le risque de transmission du VHB par le don du sang est, en théorie, plus élevé. C'est la raison pour laquelle le dépistage de l'ADN viral sur les dons de sang se met en place dans les pays qui disposent de ressources suffisantes pour le faire.

Actuellement, la préoccupation majeure des transfuseurs est la phase aiguë de l'infection, c'est-à-dire la période qui sépare le contact avec le virus et la possibilité de détecter le premier marqueur. C'est pourquoi la sensibilité des réactifs pour la détection de l'AgHBs est primordiale pour assurer la sécurité transfusionnelle. Les trousses de dépistage utilisées en transfusion font l'objet d'appel d'offres tous les dix-huit mois environ, les critères évalués étant multiples : performances (sensibilité et spécificité), qualité de l'automatique, maintenance, adaptabilité à l'environnement organisationnel existant, coût, etc.

Selon moi, l'un des principaux critères biologiques de choix d'un test de dépistage de l'AgHBs, aussi bien pour le dépistage des dons de sang que pour le diagnostic clinique doit être sa capacité de détecter les antigènes HBs avec la plus grande sensibilité analytique possible. On repèrera ainsi la majorité des souches qui circulent. Tant que des études n'auront pas démontré que les mutations de l'antigène HBs posent un réel problème de santé publique, la question de la variabilité génétique du VHB, quoique nécessitant une vigilance particulière, m'apparaîtra certes importante, mais non prioritaire. Par ailleurs, chaque laboratoire doit adapter son choix en fonction du recrutement de patients qui constitue son activité. Si celui-ci s'adresse à une population chez laquelle les variants de l'enveloppe sont susceptibles d'être rencontrés (patients originaires de zones de moyenne et forte endémie, patients dialysés, greffés, patients sous chimiothérapie, etc.), le biologiste devra être attentif à ce que le réactif choisi soit à même de les détecter, même si la trousse est par ailleurs d'une grande sensibilité.

C. TRÉPO : Dans un contexte très changeant de pratiques médicales, de mondialisation et de flux migratoires, la vigilance doit rester constante. Ainsi les performances des tests concernant le génotype F, surtout prévalent en Amérique latine, doivent être davantage étudiées.



V. THIBAUT : Il faut quand même tirer les leçons de l'histoire de la mutation G145R. Il a fallu plus de dix ans pour que les tests la prennent en compte. La plupart des mutations décrites sont reconnues par les troupes mais certaines, dont la plus fréquente, la G145R, ne le sont pas toujours. Tant que les industriels, lors de la mise sur le marché de leurs troupes, ne fourniront pas la preuve que celles-ci détectent correctement au moins cette mutation G145R, mieux vaut rester prudent et utiliser un test pour lequel les données de la littérature indiquent une bonne détection des variants les plus prévalents.

De plus, comme nous l'avons dit, en cas de nouveau traitement anti-hépatite B, une nouvelle mutation pourrait affecter une partie de la protéine HBs reconnue jusque-là par les anticorps. Il me semble qu'il serait de la responsabilité des fabricants de nous assurer que leurs tests sont capables ou ne sont pas capables de détecter une telle mutation ! Parallèlement, c'est à nous, les cliniciens et les virologues, d'assurer une sorte de veille, en tirant la sonnette d'alarme le cas échéant. Cette alerte pourrait par exemple être lancée lorsqu'une hépatite B est identifiée alors que le test antigénique utilisé est négatif et que la recherche du génome viral est positive. La mise en défaut du test devra bien sûr être validée par la caractérisation génétique de la souche et l'analyse du prélèvement par d'autres troupes commerciales disponibles. Ce type de situation a déjà été rencontré dans nos laboratoires et cette information doit être diffusée largement auprès des biologistes.

En pratique, on peut recommander en seconde intention le recours à des tests de biologie moléculaire pour la détection du génome viral du VHB si une situation clinique évoquait une hépatite due à un variant AgHBs particulier.

S. B. : N'est-il pas tout de même anormal que des troupes dont on sait qu'elles ne détectent pas la mutation la plus fréquente soient encore sur le marché ? Ce n'est peut-être pas un problème de santé publique mais cela peut affecter des individus...

Encadré IV - Le marquage CE

En France, depuis le 7 décembre 2005, en application de la directive 98/79/CE du 27 octobre 1998 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* et de l'ordonnance du 1^{er} mars 2001 relative à la transposition de cette directive, un dispositif est marqué CE soit par l'industriel dans le cadre d'une auto-certification soit, pour des paramètres bien précis comme l'AgHBs, après une certification par un organisme notifié. Le contrôle de l'Afssaps n'intervient qu'a posteriori si l'agence reçoit un retour d'information questionnant la qualité d'un test ou un risque d'utilisation.

Les organismes notifiés - en France il s'agit du LNE/G-MED (Laboratoire national de métrologie et d'essais / Groupement pour l'évaluation des dispositifs médicaux) - vérifient entre autres que l'industriel a bien respecté les « spécifications techniques communes » (STC), qui établissent les critères d'évaluation des performances, de libération des lots, les méthodes et les matériaux de référence.

Francis POISSON : La directive européenne 98/79/CE concernant le « marquage CE » des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* précise que l'industriel doit concevoir et fabriquer son test en fonction de l'état de l'art et annoncer les performances de son produit (encadré IV). Chaque fabricant doit en fonction de l'évolution des technologies et des connaissances se reposer régulièrement la question pour les produits qu'il met sur le marché : existe-t-il des éléments de connaissance nouveaux, et par exemple quel est le risque de mettre sur le marché un test qui ne détecte pas telle mutation ?

L'une des missions de l'Afssaps est de vérifier la conformité des troupes au marquage CE grâce à des contrôles a posteriori. Ces contrôles permettent de s'assurer que les performances annoncées par le fabricant sont vraies et, quand un état de l'art est défini, d'inciter les industriels dont les troupes ne répondent pas à cet état de l'art à les améliorer, s'il existe un risque à l'utilisation de ces troupes. Ce type de contrôle peut aussi conduire à proposer une évolution de l'état de l'art.

Le marquage CE ne prend pas en charge la pratique. C'est aux biologistes de faire le choix du meilleur test en fonction de l'affichage des performances, de leurs besoins et des indications diagnostiques. De même que circulent sur la route des 2CV et des voitures puissantes, il est logique que l'on trouve dans le commerce des tests de performances différentes à partir du moment où l'utilisateur est informé des performances et des limites du test, et s'il n'y a pas de risque avéré d'utilisation. En cas de besoin, l'Afssaps peut fixer des restrictions d'utilisation ou proposer des conditions de réalisation des analyses.

Dr Francis Poisson



C. TRÉPO : On touche là, avec la question de l'adéquation des performances annoncées à la réalité, à la notion de « perte de chances » pour le malade. Il me semble que les industriels ont la responsabilité de signaler clairement les faiblesses de leurs troupes.

E. POISSON : Le marquage CE impose à l'industriel de décrire les performances du réactif

Le diagnostic face à la variabilité du virus de l'hépatite B

ainsi que les limites de la méthode. Si se fait jour l'existence d'une problématique de santé concernant la non-reconnaissance des mutants AgHBs, l'Afssaps pourra, lors d'une opération de contrôle de marché, soit évaluer les performances des tests avec un panel d'échantillons pouvant contenir des mutants, soit demander aux fabricants leur positionnement par rapport à l'évolution de l'épidémiologie ou l'apparition de nouveaux mutants.

Eric LAFORGERIE : En fait, il existe plusieurs « points d'appel » permettant de lancer des contrôles du marché. Par exemple, les résultats du contrôle national de qualité qui est organisé par l'Afssaps, les signalements de réactovigilance transmis à l'Afssaps par des laboratoires ou des industriels, les problématiques de santé publique. Concernant les signalements de réactovigilance, il y en a eu seulement une dizaine sur des trousse de détection des antigènes HBs depuis 1999, mais ils ne concernaient pas la problématique des mutants AgHBs. De même, les spécifications techniques communes (STC) des tests, prévues par la réglementation européenne, concernent notamment la sensibilité des tests, mais pas du tout, pour l'instant, la capacité de détection des mutants. La mise à jour des STC, en cours de discussion, ne prendra pas en compte ce point.



Eric Laforgerie

E. POISSON : J'ajoute que les STC définissent que les performances globales d'un nouveau dispositif de diagnostic doivent être « au moins équivalentes à celles d'un dispositif reconnu, aux performances acceptables ».

S. B : L'Afssaps pourrait-elle faire retirer des trousse qui ne détectent pas certains mutants du virus ?

E. LAFORGERIE : Dans le cadre de ses missions de sécurité sanitaire, s'il s'avère qu'il y a un risque sanitaire à l'utilisation d'un réactif ne détectant pas des mutants identifiés, l'Afssaps peut interdire ou restreindre son utilisation. Ensuite, il faudrait introduire des modifications relatives aux mutants HBs dans les STC prévues par la directive.

BIBLIOGRAPHIE CITÉE

- (1) MOERMAN B., MOONS V., SOMMER H., SCHMITT Y., STETTER M., Evaluation of sensitivity for wild type and mutant forms of hepatitis B surface antigen by four commercial HBsAg assays. *Clin. Lab.* 2004, 50(3-4), 159-162.
- (2) LA'ULU SL, ROBERTS WL, The analytic sensitivity and mutant detection capability of six hepatitis B surface antigen assays. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2006, 125(5), 748-51.
- (3) LY TD, SERVANT-DELMAS A., BAGOT S., GONZALO S., FERREY MP, EBEL A., DUSSAIX E., LAPERCHE S., ROQUE-AFONSO AM., Sensitivities of four new commercial hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) Assays in Detection of HBsAg Mutant Forms. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44(7), 2321-2326.
- (4) WEBER B., VAN DER TAELEM-BRULÉ N., BERGER A., SIMON F., GEUDIN M., RITTER J., Evaluation of a new automated assay for hepatitis B surface antigen (HBsAg) detection VIDAS HBsAg Ultra. *J Virol Methods.*, 2006, 135(1), 109-117.

POUR EN SAVOIR PLUS

• InVS, Dossier sur l'hépatite B

http://www.invs.sante.fr/surveillance/hepatite_b/index.htm

« Estimation des taux de prévalence des anticorps anti-VHC et des marqueurs du virus de l'hépatite B chez les assurés sociaux du régime général de France métropolitaine, 2003-2004 ». Assurance maladie, InVS, Janvier 2005

http://www.invs.sante.fr/publications/2005/analyse_descriptive_140205/index.html

• Afssaps, Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV)

<http://agmed.sante.gouv.fr/hm/10/dm/sdm/hbs.htm>

<http://agmed.sante.gouv.fr/hm/10/dm/sommaire.htm>

• « HBV DNA (viral load) Predicts Liver Cirrhosis », 40th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 13-17, 2005, Paris

http://www.natap.org/2005/EASL/easl_28.htm

• CHEN CJ, YANG HI, SU J., JEN CL, YOU SL, LU SN, HUANG GT, ILOEJE UH; REVEAL-HBV Study Group, Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*, 2006, 295(1), 65-73.

• A noter le N° special du Journal of Medical Virology dédié aux variants VIH et VHB : vol. 78:Supplement 1 (2006) (S1-S70)

• KRAMVIS A., KEW M., FRANCOIS G., Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*, 2005, 23, 2407-2421.

• WAGNER A., DENIS F., RANGER-ROGEZ S., LOUSTAUD-RATTIV., ALAIN S., Génotypes du virus de l'hépatite B. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2004, 19, 330-342.