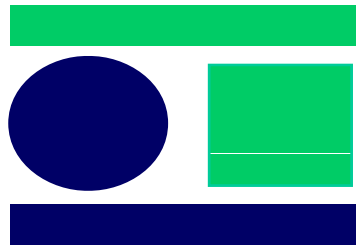




# **HEPATITES VIRALES B**

## **Dépistage et suivi biologique**

### **Apports des techniques de biologie moléculaire**



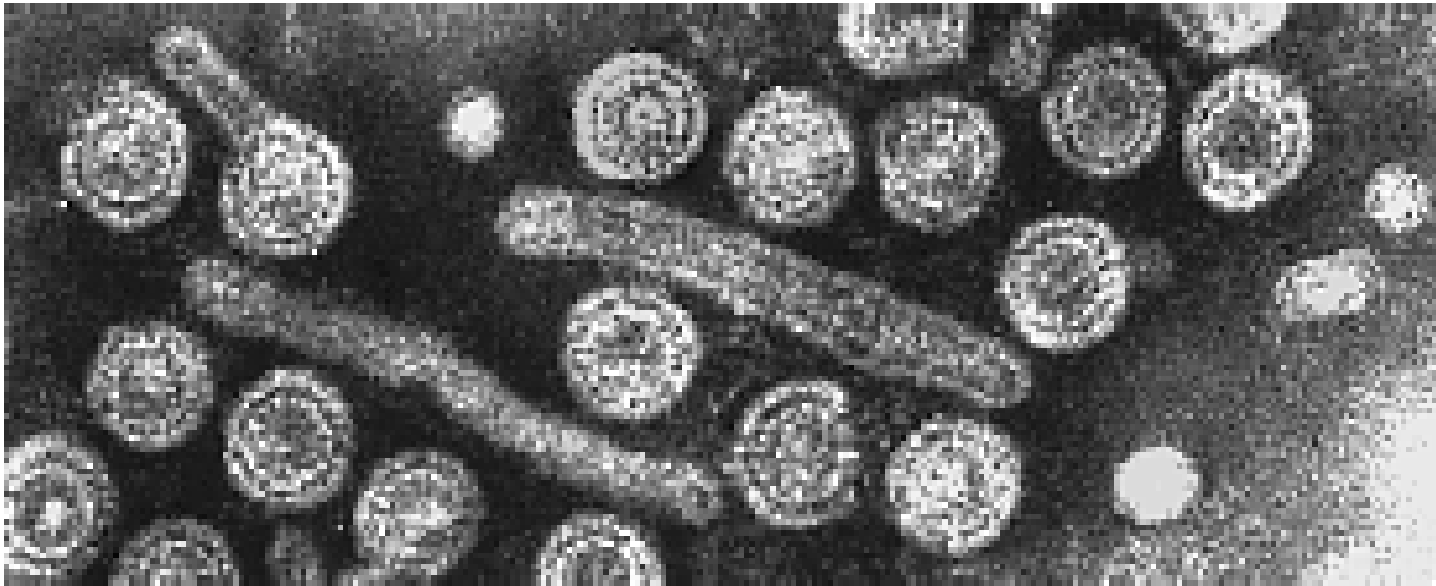
**Jean Dominique Poveda**

Laboratoire Pasteur Cerba

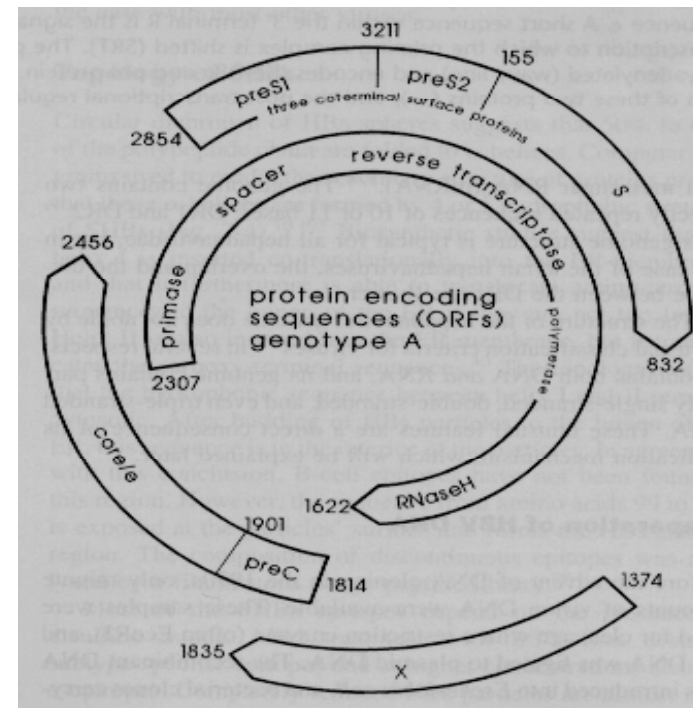
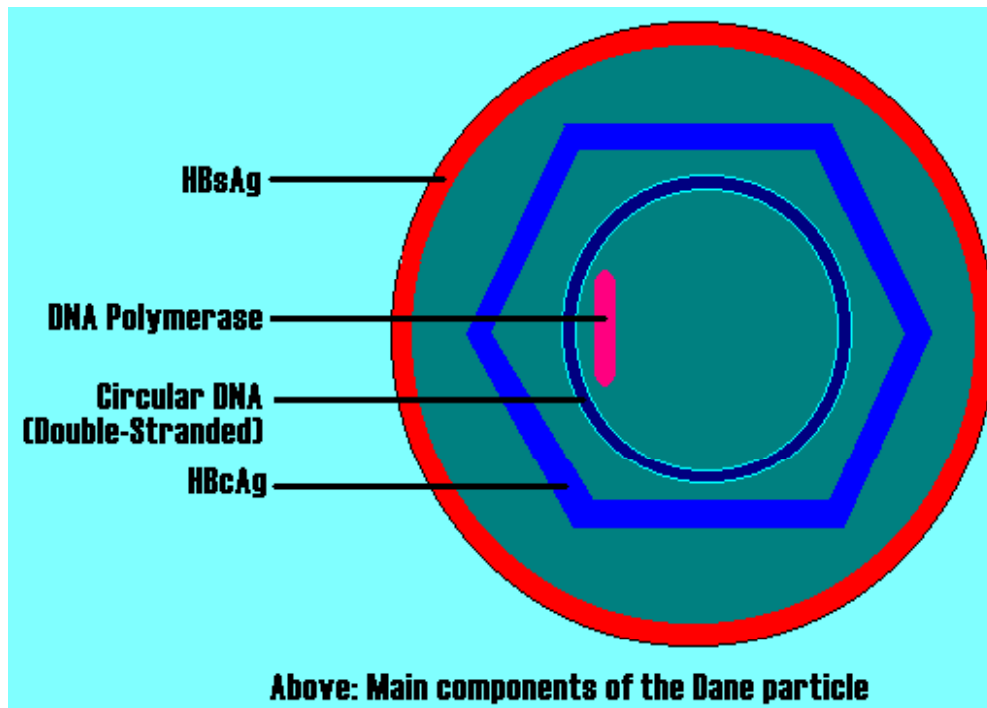
**Tunis, février 2008**



# *Virus de l'hépatite B*

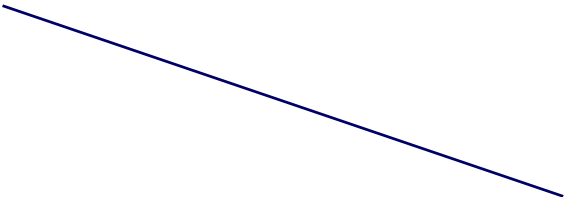
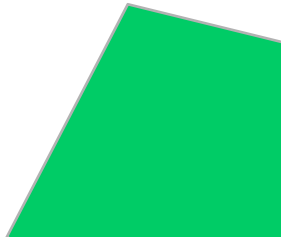


# *Le virus de l'hépatite B et son génome*



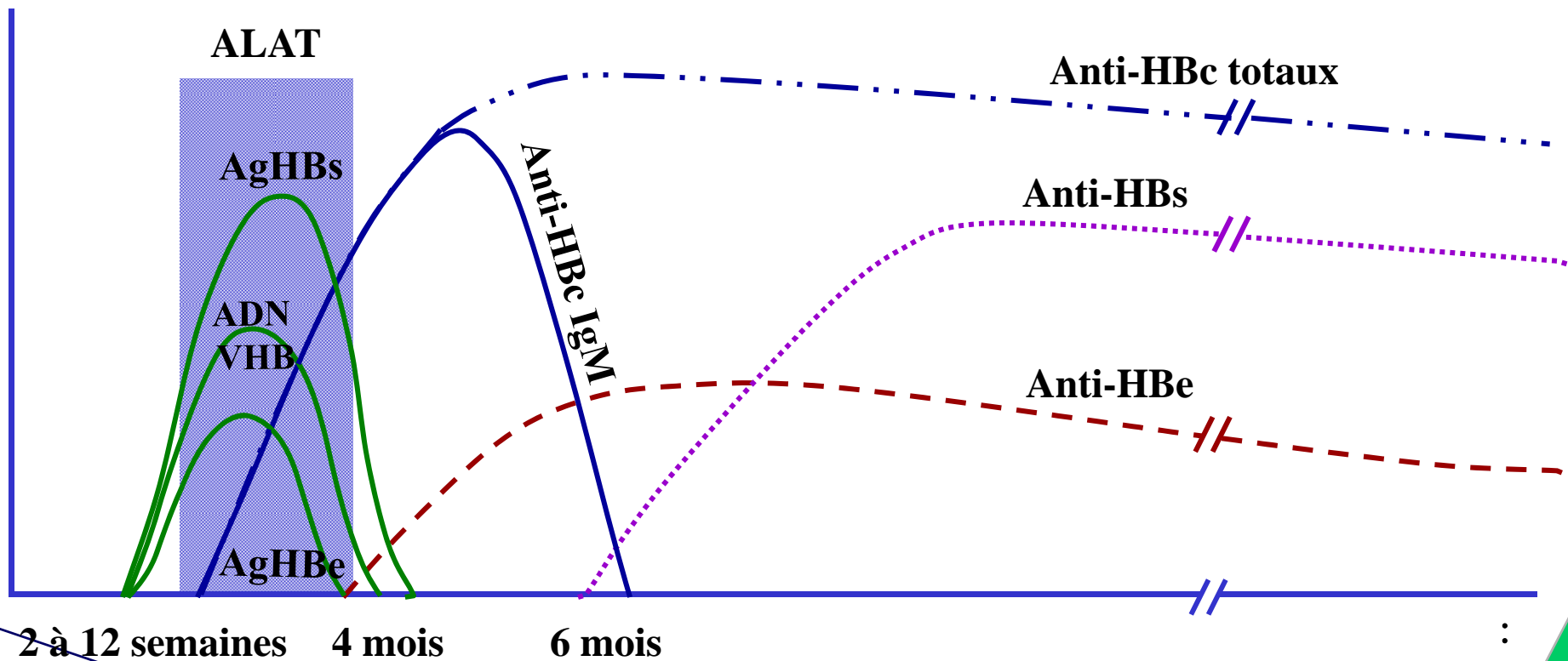


## *L'intérêt du dépistage des hépatites B aiguës et chroniques*

- Diagnostic et surveillance des hépatites aiguës
  - Dépistage chez la femme enceinte : prévention de la transmission mère-enfant par séro-protection et vaccination.
  - Traitement des hépatites chroniques avant évolution vers une fibrose avancée et vers la cirrhose
- 
- 

# Evolution dans le temps des différents marqueurs du VHB

## Lors d'une hépatite aiguë B





# *Les marqueurs d'une hépatite B aiguë*

## En phase initiale :

- Ag HBs et anti-HBc IgM +++
- **Ag HBs faiblement positif à confirmer par neutralisation**
- ADN inutile

## En phase de convalescence :

- Ag HBs, Ac anti-HBs,
- Ac anti-HBe et si négatif Ag HBe.
- **La persistance de la positivité de l'Ag HBe est prédictive d'une évolution vers la chronicité**
- ADN inutile

## En phase de guérison, après négativation des antigènes :

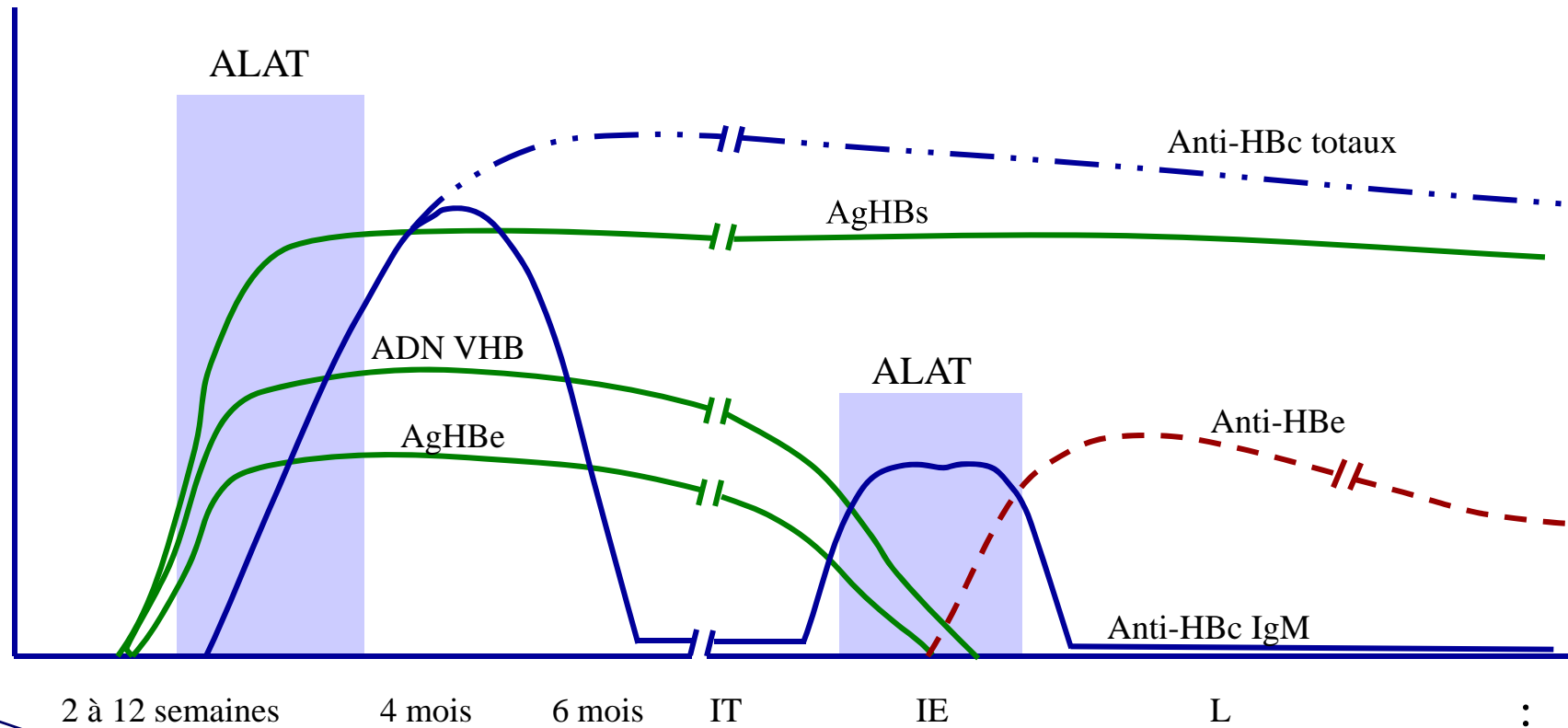
- Ac anti-HBs,
  - ADN inutile
- 
- 

## *Les marqueurs d'une hépatite B aiguë*

	Précoce	Aigu	Etat	Conva- lescence	Conva- lescence	Infection guérie	Infection ancienne	Infection ancienne
<b>Ag HBs</b>	+++	+++	+++	±	-	-	-	-
<b>Ac anti-HBc</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Ac anti-HBc IgM</b>	-	++	++	+	±	-	-	-
<b>Ac anti-HBs</b>	-	-	-	-	-	+	+	±
<b>Ag HBe</b>	++	++	++	±	-	-	-	-
<b>Ac anti-HBe</b>	-	-	-	+	+	+	±	-
<b>ADN viral</b>	++	++	++	++	±	±	-	-

# Evolution dans le temps des différents marqueurs du VHB

Lors d'une hépatite chronique liée à un virus dit « sauvage »





# *Les hépatites chroniques B*

1

## Les différentes phases d'une hépatite chronique B

### ⇒ Phase de tolérance immunitaire

- Réplication virale intense
- Ag HBe positif
- ADN viral détectable ( $> 10^5$ )
- Pas de lésions hépatiques

### ⇒ Phase d'immuno-élimination

- Réponse immune intense
- Lésions hépatiques
- Ag HBe positif
- ADN viral détectable ( $> 10^5$ )

## Les différentes phases d'une hépatite chronique B

### ⇒ Phase de latence virale

→ Immuno-élimination efficace = portage « inactif »

- Ac anti-HBe positif, Ag HBe négatif
- ADN viral indétectable ou très bas ( $< 10^5$ )
- Transaminases normales
  - Possibilité de séroconversion Ag HBs → Ac anti-HBs
  - Possibilité de réactivation
  - Possibilité de sélection de virus mutant

→ Virus mutant : mutation de la région pré-C

- Ac anti-HBe positif, Ag HBe négatif
- ADN viral détectable
- Transaminases anormales

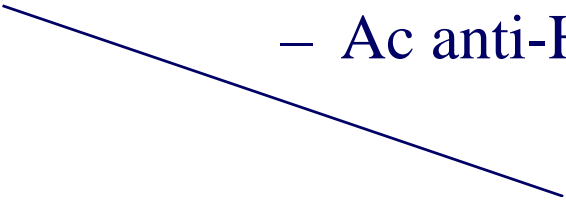
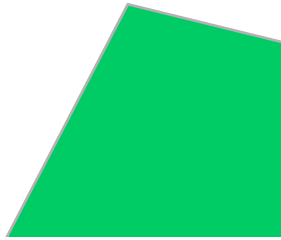


## *Les marqueurs d'une hépatite B chronique*

### **Découverte systématique :**

- Ag HBs, Ac anti-HBc totaux, Ac anti-HBs
- Confirmation de l'Ag HBs
- Persistance de l'Ag HBs plus de 6 mois
- Ac anti-HBc IgM négatifs ou limites

### **Bilan d'évaluation :**

- Ag HBs,
  - Ac anti-HBe et si négatif Ag HBe.
  - ADN circulant +++
  - Ac anti-Delta
  - Ac anti-HBc et anti-HBs inutiles
- 
- 

## *Les marqueurs d'une hépatite B chronique*

	Immuno tolérance	Immuno élimination	Latence	Réactivation	Mutant pré-Core	Mutant Ag HBs ??
<b>Ag HBs</b>	++	++	++	++	++	++
<b>Ac anti-HBc</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Ac anti-HBc IgM</b>	-	±	-	±	-	-
<b>Ac anti-HBs</b>	-	-	-	-	-	+
<b>Ag HBe</b>	+	+	-	±	-	± ou +
<b>Ac anti-HBe</b>	-	-	+	±	+	± ou +
<b>ADN viral</b>	+++	++	± ou +	++	++	++
<b>Transaminases</b>	normales	élevées	normales	élevées	élevées	variables



# *VHB : Les tests moléculaires*



- Détection et quantification de l'ADN viral circulant :
  - Hybridation
  - PCR
- Analyse qualitative du génome détecté
  - Détermination du génotype : intérêt ?
  - Recherche de mutations ponctuelles
    - Mutants pré-core
    - Mutants d'échappement
    - Mutants de résistance au traitement

# *Intérêt de la mesure de l'ADN viral*

- **Evaluation d'un niveau de la réplication virale**
  - Directement lié à l'activité virale
    - Premier bilan d'une hépatite B chronique
    - Bilan après dépistage positif chez une femme enceinte
    - Bilan d'un Ac anti-HBc isolé
    - Suivi annuel d'un porteur chronique « inactif »
  - Suivi régulier d'un patient répliatif non traité
  - Suivi d'un patient traité
    - Détection précoce d'une résistance
    - Suivi de la cinétique : prédictif de la réponse
- **Inutile en hépatite aiguë**
- **Inutile si Ag HBe positif (hors pré-thérapeutique)**



## *Les tests de détection d'ADN viral*

- **Les tests d'hybridation**
  - 2.000 - 100.000.000 copies/mL
- **La PCR « classique »**
  - 60 - 38.000 UI/mL
  
- **La PCR en temps réel**
  - TaqMan Roche, Realtime Abbott
- **Sensibilité : 10-12 UI/mL**
- **Linéarité : 110.000.000 UI/mL**





# *Les tests de quantification de l'ADN viral*



# *Les traitements des hépatites chroniques B*

## ⇒ Qui traiter ?

→ En fonction de la charge virale en ADN VHB (seuil  $10^5$  copies/ml), des transaminases, des données cliniques et de la fibrose hépatique (PBH, marqueurs sériques),

## ⇒ Quel traitement ?

➤ Interféron

➤ Anti-viraux :

Lamivudine

Adefovir

Entecavir, emtricitabine, autres

➤ Monothérapies, bithérapies



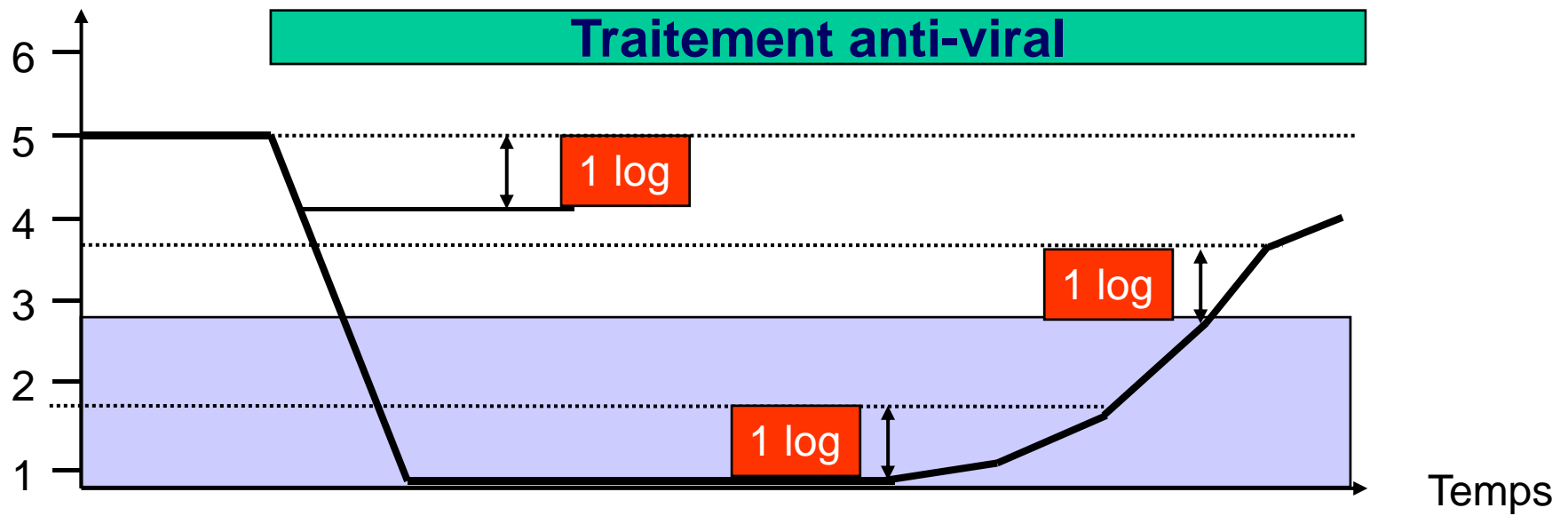
## *Evaluation et suivi des traitements*

- Evaluation initiale : Ag HBe, Ac anti-HBe
- ADN viral : charge virale  $> 5$  log
- Charge virale  $> 8$  log = mauvais pronostic
- Evaluation et suivi
  - Réponse initiale :  $> 1$  log de décroissance
  - Décroissance de la charge virale à 2 mois sous Adefovir
    - bons répondeurs : 5 à 6 log (80% séroconversion)
    - mauvais répondeurs : 1,5 à 2 log (0% séroconversion)
  - Réponse maintenue :  $< 3$  log
  - Echec : augmentation  $> 1$  log

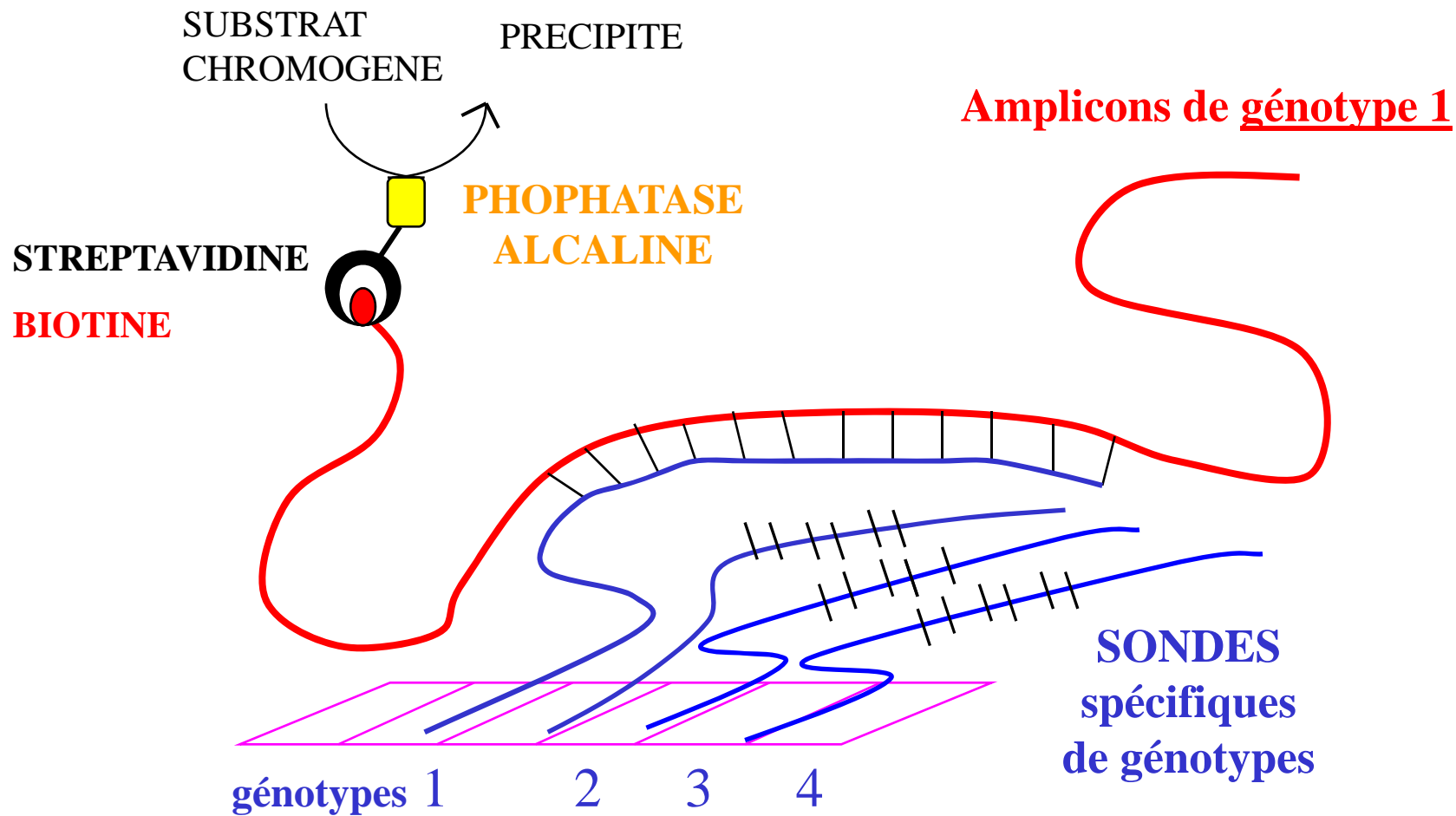
# Les tests de quantification de l'ADN viral

- Intérêt d'un large domaine de mesure

Log HBV DNA



# Génotypage par la technique InnoLiPA™



# *Génotypage par la technique InnoLiPA™*



# *Détection automatique de mutations par PCR et séquençage*



*Système Trugene Siemens*

# Détection automatique de mutations par PCR et séquençage

**GeneObjects**

- Info ▶
- Document ▶
- Edit ▶
- Format ▶
- Tools ▶
- Librarian ▶
- Windows ▶
- Print... p
- Services ▶
- Hide h
- Quit q

Curve views for GeneLibrarian Case

labuser5199909151026 - Training HCV Database

Query: labuser1199907121428,5-8a & labuser1199907121428,5-8b

Name	Score	Similarity	Indels	Mismatch
3a_NZL1_D17763.seq	78/78	99.47	0	1
3a_FU99010VGI.seq	77/78	98.94	0	2
3a_T1787_L29467.seq	77/78	98.94	0	2

```

Q = Merge of Query Sequences
1 = labuser1199907121428,5-8b Unknown dir 3' LR980115 2 UNTR Unanalyzed Processed
2 = labuser1199907121428,5-8a Unknown dir 5' LR980115 2 UNTR Unanalyzed Processed
W = 3a_NZL1_D17763.seq
U = union of HCV_5'NC.gnl sequences

Q 1 AcGAGTGTcGTGCAGCCTCCAGGA-cTCCCTCCCGGAGAG-CCATAGTGGTCTG@GGAACC-GGTGAGTACACCGGAATCGCTG@GGTGACCGGGTCCCTTTC- 102
1 16 ASGAGTGTcGTGCAGCCTCCAGGA-FC1CCCTCCCGGAGAG-CCATAGTGGTCTG@GGAACC-GGTGAGTACACCGGAATCGCTG@GGTGACCGGGTCCCTTTC- 116
2 20 YGTGCAGcTCCAGG-RC1CCCTCCCGGAGAG-CCATAGTGGTCTG@GGAACC-GGTGAGTACACCGGAATCGCTG@GGTGACCGGGTCCCTTTC- 111
W 1 AcGAGTGTcGTGCAGcTCCAGG#CC1CCCTCCCGGAGAG#CCATAGTGGTCTG@GGAACC-GGTGAGTACACCGGAATCGCTG@GGTGACCGGGTCCCTTTC# 102
U 1 AYGAGTRTYGHRcAGCCTCCA#GN###CYCYCCYCCGGAGAG##CATRGTGTCTK@GSAACC#KKYGA@WACSSAATYRBYRRRHGACYGRTCCCTTTC# 98
1 28 58 88

Q 103 -TTGGAG-CAA@CCGCTCAATACCCAGAAATTTGG-GCGTGC@CCCGCGAG@TCACTAGCCGAGTAGTGTG@GTCGCGAAAAG 183
1 117 -TTGGAG-CAA@CCGCTCAATACCCAGAAATTTGG-GCGTGC@CCCGCGAG@TCACTAGCCGAGTAGTGTG@GTCGCGAAAAG 185
2 112 -TTGGAG-CAA@CCGCTCAATACCCAGAAATTTGGAGCGTG@CCCGCGAG@TCACTAGCCGAGTAGTGTG@GTCGCGAAAAG 192
W 103 #TTGGAG#CAA@CCGCTCAATACCCAGAAATTTGG-GCGTGC@CCCGCGAG@TCACTAGCCGAGTAGTGTG@GTCGCGAAAAG 183
U 99 ##TGRN#HWMCCRCCTWRTRYHRRHVATTTGG-RCRYGCCCCCGC@WAGAYRYRCC@KAGTRGYRTTGTGYCGGAAM## 176
118 148 157 178
                    
```

Show Amino Acids  Wrap

10:30:19  
WED SEP 15

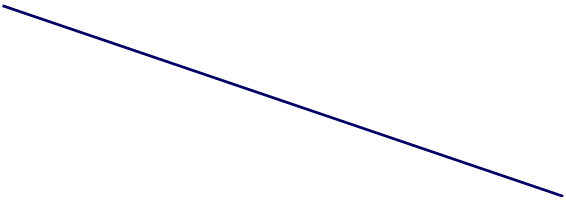
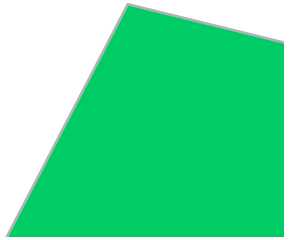
**TRAINING**





## *Les génotypes du VHB et leur répartition*

### Les 7 génotypes du VHB (A-G) :

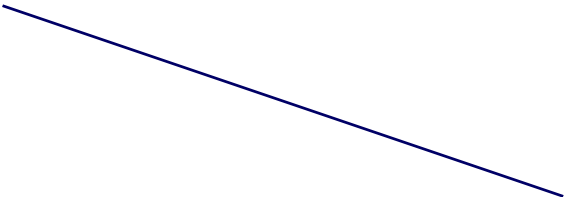
- A - D : Europe du nord, Amérique du nord, Inde, Afrique, Australie
  - B – C : Asie
  - E : Afrique sud et ouest
  - F : Amérique centrale et du sud
  - G : Europe du nord, Amérique du nord
- 
- 

## *Génotype du VHB : intérêt clinique ?*

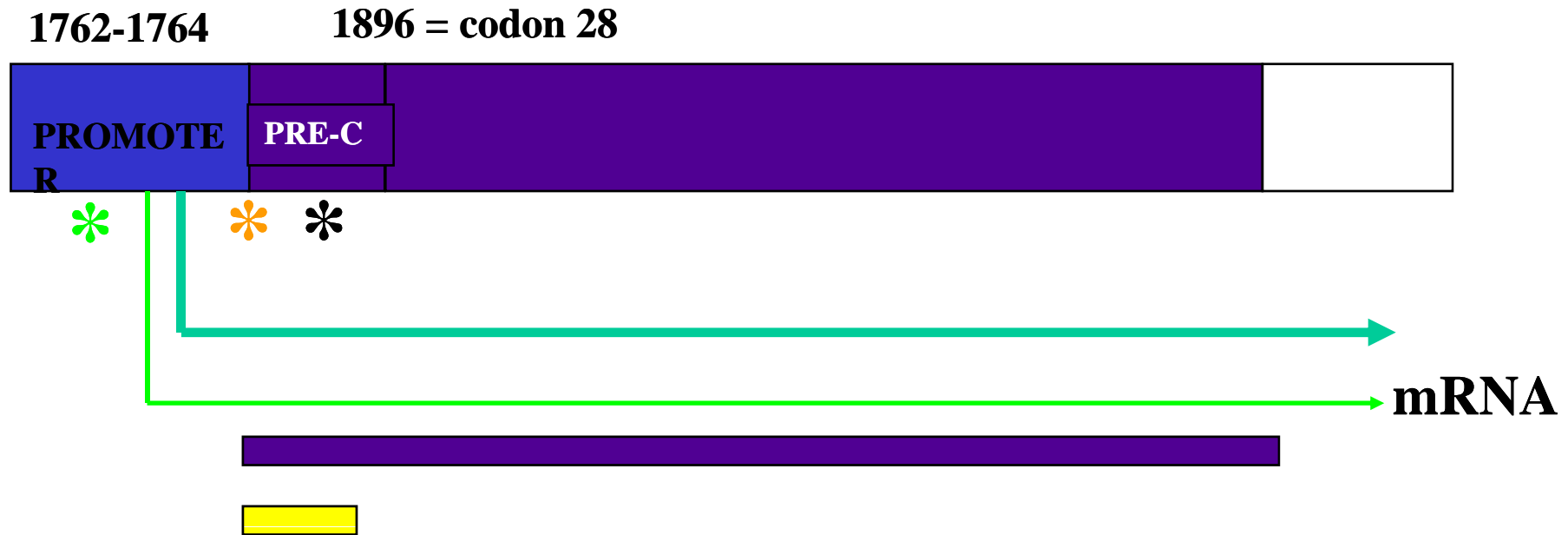
- Maladie plus sévère avec le génotype C par rapport au génotype B
  - Meilleure réponse à l'IFN des génotypes A par rapport aux génotypes D
  - Meilleure réponse à l'IFN des génotypes B par rapport aux génotypes C
  - Peu de données pour la réponse aux antiviraux
- 
- **Par PCR et hybridation LiPA**
  - **Par séquençage**



## *Les mutants pré-core*

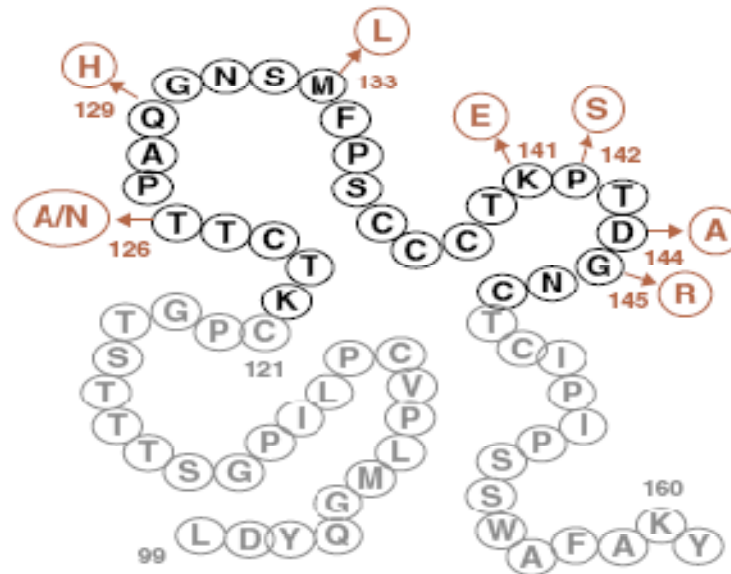
- Hépatites B chroniques répliquatives sans Ag HBe détectable
  - Apparition tardive au cours de l'infection
  - 22% des patients en France avant 1990, plus de 70% en 2007
  - Implications pour le suivi et le traitement : importance du suivi sur l'ADN viral
- 
- **Par PCR et hybridation LiPA**
  - **Par séquençage**
- 

# *Génotype des mutants pré-core*



# Les mutants du gène S

B



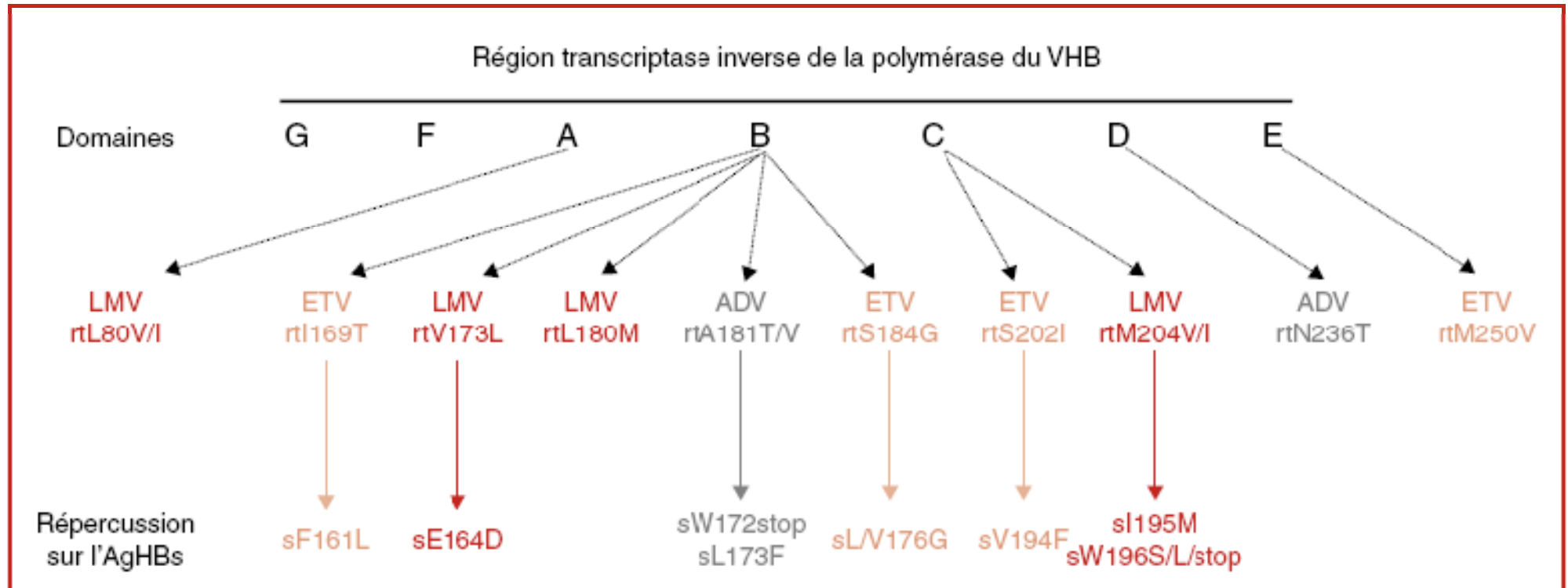
C



- Par séquençage

Source : Servant et al, virologie 2007

# Les résistances au traitement



**Figure 5.** Représentation schématique des principales mutations de résistance associées à la lamivudine (LMV), à l'adéfovir (ADF) et à l'entécavir (ETV) sur le domaine transcriptase inverse de la polymérase du VHB et répercussion sur la séquence en acides aminés de l'AgHBs. D'après Bartholomeusz *et al.* [55], Locarnini [56] et Thibault [57].

## *Les résistances au traitement*

- **Monothérapie 3TC : 24% de résistance à 1 an, 50% à 3 ans, 70% à 4 ans**
- **Monothérapie Adefovir : 6% à 3 ans, 18% à 4 ans**
- **Résistances croisées Emtricitabine - lamivudine**

	<b>Lamivudine</b>	<b>Emtricitabine</b>	<b>Adefovir</b>	<b>Entecavir</b>
<b>Mutations</b>	<b>M204V/I</b>	<b>M204V/I</b>	<b>N236/T</b> <b>A181V/T</b>	<b>S202G/I</b> <b>T184G</b> <b>M250V</b>



# *Conclusion*

*Evolution parallèle et liée des thérapeutiques antivirales et des technologies de biologie moléculaire permettant la détection et l'étude des virus des hépatites*

*Augmentation régulière de la sensibilité des techniques de détection*

*Amélioration régulière des traitements disponibles*

*L'utilisation raisonnée des différents tests en tenant compte de leurs apports dans les différentes situations de diagnostic, de suivi thérapeutique, d'évaluation des résistances permet une meilleure efficacité au meilleur coût*

