

FIGURES

Figure 1 : Les trois types de particules présentes dans le plasma d'un sujet infecté par le VHB

Figure 2 : Génome du virus de l'hépatite B

Figure 3 : Cycle de réplication du VHB

Figure 4 : Distribution géographique de l'AgHBs

Figure 5 : Risques d'évolution de l'infection aiguë vers les formes chroniques

Figure 6 : Caractéristiques cliniques et biologique de l'hépatite B aiguë

Figure 7 : PCR qualitative

Figure 8 : Principales évolutions entre le test HC et HC II

Figure 9 : Corrélation HC II versus PCR sur 234 sérums

Figure 10 : Corrélation HC II versus PCR sur 200 sérums (virémies élevées)

Figure 11 : Corrélation HC II ultra sensible et PCR dans les basses valeurs

TABLEAUX

Tableau 1 : Modes de transmission du VHB

Tableau 2 : Paramètres sérologiques du VHB

Tableau 3 : Profils sérologiques rencontrés lors d'une infection chronique par le VHB

Tableau 4 : Tests commerciaux d'hybridation moléculaire de quantification de l'ADN

VHB

Tableau 5 : Principales évolutions entre les tests HC II et HC

Tableau 6 : Gammes de linéarité de trois tests commerciaux de quantification d'ADN

VHB

Tableau 7 : Critères d'interprétation des tests HC II et PCR Monitor

Tableau 8 : Limites de linéarité des tests HC II et PCR

Tableau 9 : Répartition des résultats HC II et Pcr sur les 200 sérums

Tableau 10 : Répartition des résultats obtenus par HC II ultra sensible et PCR sur 34

sérums

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION :

A. Le Virus de l'Hépatite B

1. Caractéristiques générales
2. Morphologie
3. Génome
4. Cycle réplication

B. Modes de transmission et épidémiologie

C. Infection humaine

1. Pouvoir pathogène chez l'homme
2. Hépatite aiguë

3. Hépatite chronique et complications
4. Facteurs modifiant l'histoire naturelle du VHB
 - a. Surinfection Delta
 - b. Co-infection VHC
 - c. Immunosuppression
5. Variabilité génomique
 - a. Mutants pré-C
 - b. Mutants d'échappement à la vaccination

D. Traitement

II. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'HEPATITE B

A. Tests immuno-enzymatiques

1. Généralités
2. Diagnostic d'une hépatite aiguë
3. Contrôle de guérison
4. Contrôle de l'immunité
5. Suivi d'une hépatite B chronique

B. La charge virale dans l'infection par le VHB

1. Introduction
2. Choix des marqueurs de réplication du VHB

3. Tests moléculaires de quantification de l'ADN VHB
 - a. Principes
 - b. Performances de trois tests commerciaux de quantification de l'ADN VHB
4. Interêts et indications de la charge virale

III. OBJECTIFS DU TRAVAIL

IV. MATERIEL ET METHODES

A. Patients

1. Caractères de la population étudiée

B. Méthodes

1. Amplicor VHB Monitor
 - a. Principes
 - b. Procédures techniques
2. Digene HBV Test, Hybrid Capture II
 - a. Comparaisons des performances du test HC II versus HC
 - b. Principes
 - c. Procédures techniques

V. RESULTATS

- A. Etude de la sensibilité du test HC II versus PCR sur les échantillons sélectionnés

- B. Etude de la corrélation des test HC II et PCR sur 234 sérums
- C. Etude de la corrélation des tests HC II et PCR sur 200 sérums ($>10^5$ copies/ml)
- D. Etude de corrélation des tests HC II ultra sensible et PCR sur 34 sérums
- E. Performances du test HC II dans le suivi des patients traités

VI. DISCUSSION

VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. INTRODUCTION :

Le virus de l'hépatite B (VHB) demeure aujourd'hui un agent infectieux de premier ordre.

350 millions d'individus sont porteurs chroniques du VHB dans le monde (près de la moitié de la population mondiale vit en zone de forte endémie) ce qui pose un problème de santé publique.

La quantification de l'ADN du VHB (charge virale) apparaît comme le meilleur marqueur de réplication virale, c'est aussi le paramètre virologique le plus fiable pour le suivi des patients porteurs chroniques du VHB sous traitement antiviral.

Les progrès réalisés en biologie moléculaire durant ces dernières années ont permis le développement de techniques moléculaires très sensibles permettant de quantifier l'ADN VHB dans le sérum des patients.

Par conséquent, plusieurs trousse de quantification d'ADN VHB sont actuellement commercialisées (utilisées par les laboratoires de virologie de routine), basées sur des techniques moléculaires différentes présentant de très bonnes performances analytiques.

En revanche, le manque de standardisation de ces techniques moléculaires entre elles fait entrave à la comparaison des résultats, souvent exprimés dans des unités différentes.

Dans ce travail, nous avons tenté d'évaluer les performances d'une trousse de quantification d'ADN VHB récemment commercialisée, basée sur l'hybridation moléculaire avec amplification de signal (Hybrid Capture II), dans le suivi de patients porteurs chroniques du VHB inclus dans un protocole thérapeutique d'évaluation d'un nouvel analogue nucléosidique.

A. Le Virus de l'Hépatite B :

1. Caractéristiques générales :

C'est en 1945 que des agents ultra-filtrables ont été incriminés dans la transmission de la maladie hépatique; en 1947, furent introduits les termes d'hépatite A et B par Mc Callum (1). La découverte en 1964 de l'antigène Australia (futur antigène HBs) revient à Blumberg et le lien existant entre l'antigène Australia et l'hépatite de la seringue (B ou transfusionnelle) fut établi par Prince et Viernucci (2,3). En 1970, Dane décrit le virion ou « particule de Dane ». En 1976, Maupas et al. Publient les premiers essais mondiaux d'un vaccin contre l'hépatite B préparé à partir d'antigène viral (AgHBs) extrait de plasma humain. En 1986, le premier vaccin mondial obtenu par génie génétique fut commercialisé. Le virus de l'hépatite B (VHB) appartient à la famille des hépadnavirus (en raison de son tropisme hépatique et de la nature ADN de son génome) où il figure à côté du virus de l'hépatite de la marmotte (WHV), de l'écureuil terrestre (GSHV), du canard de Pékin et du héron cendré (4). Il ne possède aucune parenté ou communauté antigénique avec les autres virus des hépatites humaines.

2. Morphologie :

L'analyse en microscopie électronique du sang de malades porteurs du VHB montre l'existence (figure1) :

- de particules sphériques de grande taille (42 nm) correspondant aux particules virales complètes (virus infectant) appelées particules de Dane.
- de particules plus nombreuses (1013 versus 108 particules de Dane /ml de serum) de deux types : les unes sphériques et de petite taille (22 nm) appelées sphérules et les autres en forme de bâtonnets de 22 nm de diamètre et de longueur variable appelées tubules.

Ces sphérules et tubules correspondent à un excès d'enveloppe virale (AgHBs) dépourvus de génome viral. Le virion comprend une enveloppe lipoprotéique portant les déterminants de l'antigène de surface AgHBs qui entoure une nucléocapside (core de 27 nm) dont le déterminant antigénique est l'AgHBc. Dans la capside se trouve l'ADN du virus de l'hépatite B.

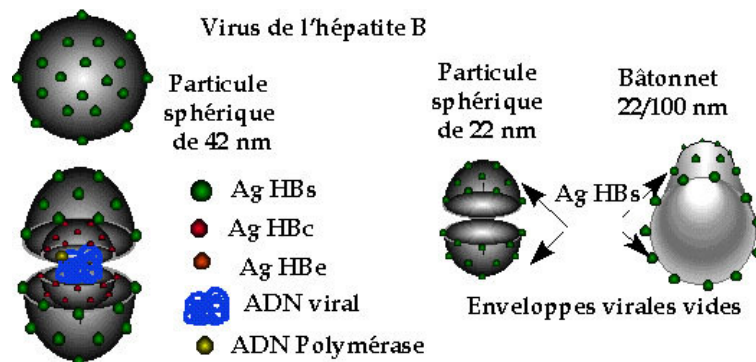


Figure 1 : les trois types de particules présentes dans le plasma d'un sujet infecté par le VH

3. Génome :

Le génome viral est constitué d'une molécule d'ADN de 3200 nucléotides (3,2 kb) circulaire et bicaténaire sur les trois quart de sa circonférence et il est organisé en quatre gènes potentiels : S, C, P et X.

Les deux brins d'ADN ont des longueurs différentes : le brin long (brin L ou brin -) a une longueur fixe de 3,2 kb et, à l'exception d'une très courte interruption, forme un cercle continu. Le brin court (brin S ou brin +) a une longueur variable qui représente 50 à 100 % du brin long avec une extrémité fixe en 5' alors que l'extrémité 3' est libre et variable.

La position des extrémités 5' et 3' du brin long et la position de l'extrémité 5' du bras court sont fixes. La structure circulaire du génome est assurée essentiellement par un segment de 220 nucléotides de l'extrémité 5' de chaque brin, appelé région cohésive.

La longueur du génome varie selon le sous-type du virus. Il existe plusieurs sous-types dont la prévalence varie selon la localisation géographique : un déterminant « a » est commun à tous les sous-types et deux paires de déterminants exclusifs sont associés au déterminant « a » définissant les sous-types classiques : adw, adr, ayw et ayr. Les déterminants sont liés à des mutations nucléotidiques d'une région immunologiquement compétente de l'AgHBs.

Le génome est constitué de 4 phases de lecture ouverte conservées, situées sur le brin long et qui se chevauchent dans la même orientation transcriptionnelle palliant ainsi à la petitesse du génome (5) :

- la région **S_{surface}** : divisée en régions S, pré-S1 et pré-S2 qui codent pour les protéines de l'enveloppe virale. Les trois protéines d'enveloppe sont présentes en quantité différente à la surface des particules virales. La protéine S qui code pour l'AgHBs est majoritaire. La protéine moyenne codée à partir des régions S et pré-S2 est présente à un taux de 5 à 10% dans les virions.

La grande protéine est codée par les régions pré-S1 , pré-S2 et S. Elle est abondante dans les tubules et les virions mais rare dans les sphérules. Cette grande protéine est essentielle pour la reconnaissance et la pénétration virale.

- la région **C**ore : l'extrémité 3' du gène C code pour une protéine de 22 Kda qui est la protéine du core ou de la nucléocapside. Dans la portion terminale 5' du gène C, il existe deux séquences AUG, donc deux phases de lecture ouverte : la séquence nucléotidique allant du premier au second triplet AUG est appelée pré-C. L'AgHBe est codé à partir du premier triplet AUG et correspond à la lecture en continu de la région pré-C + C. Les premiers nucléotides de la région pré-C codent pour 19 acides aminés qui correspondent à la synthèse d'un peptide signal facilitant la sécrétion d'AgHBe dans le sérum après passage dans le réticulum endoplasmique endocellulaire.
- la région **P**olymerase : qui couvre 80 % du génome, code pour une protéine correspondant à l'ADN polymérase virale dont l'activité sert à la synthèse d'un nouvel ADN à partir de l'ARN pré-génomique (similitudes avec les transcriptases inverses des rétrovirus).
- la région **X** : code pour un polypeptide de 145 à 154 acides aminés qui a des propriétés transactivatrices s'exerçant sur les promoteurs de l'ADN du VHB ou du génome de l'hôte.

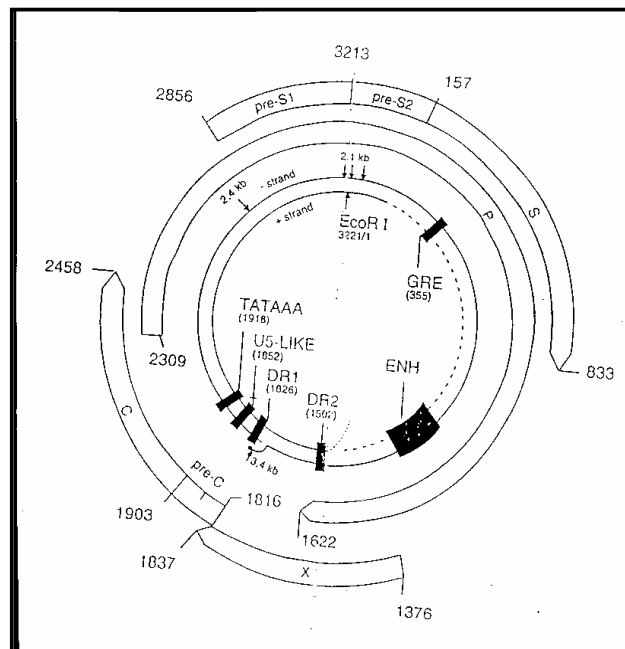


Figure 2 : Génome du virus de l'hépatite B

4. Cycle de réplication :

L'absence de système cellulaire permettant la culture du VHB fait entrave à la compréhension du cycle viral dans les cellules.

Le VHB a un tropisme hépatocytaire essentiellement, mais il peut être retrouvé en petite quantité dans toute sorte de liquides biologiques : salive, urines, selles, sécrétions génitales et dans différents types cellulaires tels que la moelle osseuse, les monocytes, les lymphocytes B et T (réservoirs extra-hépatique), pancréas, reins et peau. Cependant, les formes répliquatives sont rarement retrouvées dans des cellules extra-hépatiques.

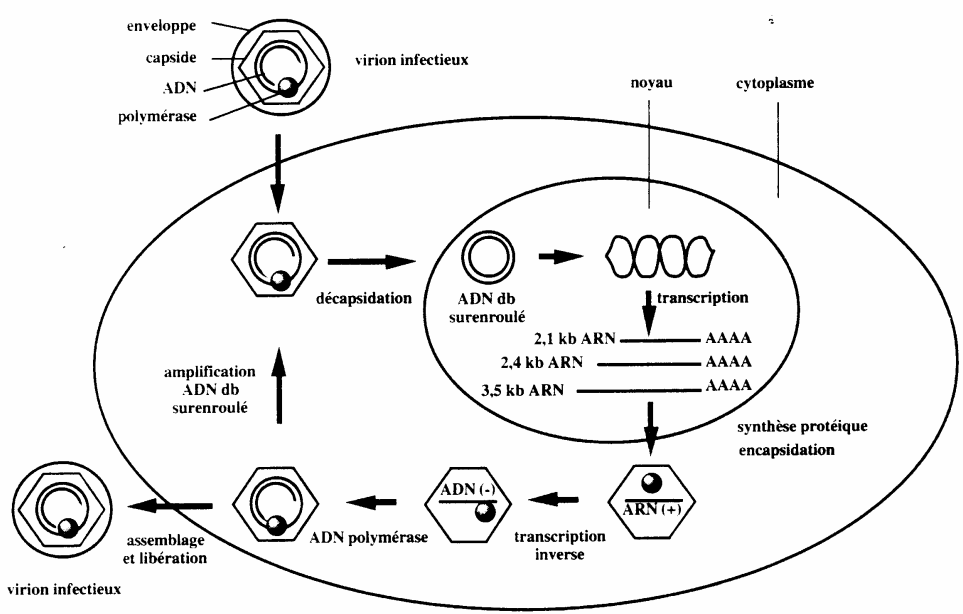
Le cycle viral comporte plusieurs phases (6) (figure 3). Il débute par l'adhésion du virus à la surface cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur cellulaire (non clairement identifié) qui a la capacité de se lier aux différentes protéines d'enveloppe du virus (HBs, Pré-S2 et/ou Pré-S1). Cette étape précède la pénétration du virus dans la cellule cible. Après décapsidation dans le cytoplasme, le génome pénètre dans le noyau de la cellule, l'ADN viral partiellement double brin est complété en ADN circulaire entièrement bicaténaire

super-enroulé. Cette forme super enroulée, non intégrée au génome de la cellule hôte, sert de matrice à la transcription des ARNm viraux pour l'ARN polymérase II de l'hôte. La synthèse intra-nucléaire de la molécule d'ADN super enroulée est un événement clé dans la réplication du VHB car c'est une forme de génome viral extrêmement stable qui va persister sous forme épisomale au sein des hépatocytes et autres cellules permissives. Le maintien de cette molécule dans les cellules explique en partie le fait qu'il soit possible de détecter le génome viral même après la perte de l'AgHBs sérique, de plus, il constitue l'origine du portage chronique et des phénomènes de réactivations virales.

La transcription est initiée dans le noyau et produite à partir du brin (-), un ARN pré-génomique de 3,5 kb et des ARNm sub-génomiques de 2,4 ; 2,1 et 0,5 kb qui codent pour les protéines de capsid, d'enveloppe ainsi que P et X. Après encapsidation de l'ARN pré-génomique dans le cytoplasme, la transcriptase inverse virale produit un brin d'ADN (-) qui sert de matrice pour la synthèse partielle du brin (+).

Ces étapes précèdent l'acquisition de l'enveloppe au niveau du réticulum endoplasmique avec sortie de la cellule par bourgeonnement. L'implication d'une enzyme de type transcriptase inverse dans le cycle réplcatif serait à l'origine d'un taux de mutations plus élevé que celui rencontré dans la réplication des virus à « ADN » classiques et aurait un rôle dans l'apparition de VHB mutants.

Les mécanismes précis de la réplication virale ne sont toutefois pas encore tous compris.



Cycle de réplication du virus de l'hépatite B

B. Modes de transmission et épidémiologie :

Le virus de l'hépatite B est présent dans de nombreux liquides ou sécrétions des individus infectés, cette large diffusion du virus dans l'organisme et les concentrations virales souvent élevées rendent compte des modalités de transmission du VHB (tableau1) :

Verticale	horizontale
Mère-enfant	Enfant-enfant Famille Personnes à personnes
Parentérale	Sexuelle
Transfusion Produits dérivés du sang Activité professionnelle Toxicomanie, Tatouage, Piercing	Homosexuelle Hétérosexuelle

Les expositions au sang sont donc un mode majeur de transmission ; de même l'échange de matériel contaminé (seringues, aiguilles) entre toxicomanes par voie intra-veineuse serait responsable d'un quart des cas d'hépatite B en Occident.

Le virus est également présent dans le sperme, les sécrétions génitales et la salive ce qui explique le risque de transmission vénérien de l'hépatite B considérée alors comme une MST.

On considère que la contagiosité sanguine du VHB est 10 fois supérieure à celle du virus de l'hépatite C et 100 fois plus élevée que celle du virus de l'immunodéficience humaine.

Le mode de contamination le plus fréquent au niveau mondial est la transmission périnatale qui expose à un risque important d'infection par le VHB en particulier dans les pays d'Asie du Sud Est et d'Afrique. Le risque est d'autant plus élevé si la mère est porteuse d'un virus répliquant (AgHBe+ et ADN+): le taux de transmission est de 90 à 100 % si les marqueurs de réplication sont présents et de 10 à 20 % en leur absence. L'enfant court un risque d'infection dans 50 % des cas d'hépatite B aiguë maternelle durant le troisième trimestre de grossesse. Pour un nouveau-né infecté le risque de complications tardives graves est de 40 % après 30 ou 40 ans de vie (8).

L'infection par le VHB réalise un véritable fléau mondial car on estime qu'environ 5 % de la population mondiale est porteur chronique du VHB (9) soit 200 à 300 millions d'individus. Néanmoins, la répartition mondiale et les modes de transmission du VHB sont hétérogènes. En effet, en fonction du taux de prévalence de l'AgHBs, on distingue trois niveaux de zones d'endémie (10) (figure 4) :

-Zone de forte endémie :

Ce sont les régions suivantes : Asie du Sud-Est, Afrique Sub-saharienne, bassin Amazonien, pourtour du cercle arctique, certaines régions du Moyen-Orient, République d'Asie Centrale et certains pays de l'Europe de l'Est : 70 à 90 % de la population présente des marqueurs sérologiques témoins d'une infection passée ou en cours par le VHB. La prévalence de l'AgHBs est de 8 à 20 %. Le mode de transmission est surtout vertical (périnatal et pernatal) et horizontale (intra-fratrie).

-Zone de moyenne endémie :

Ce sont les régions suivantes : Europe de l'Est, Union soviétique, pays méditerranéens et Proche Orient. La prévalence de l'AgHBs est de 2 à 7 % et moins de 20 % de la population a des marqueurs d'infection ancienne.

-Zone de faible endémie :

Ce sont les régions suivantes : Australie, Amérique du Nord et Europe de l'Ouest. La prévalence de l'AgHBs est inférieure à 2 %.

La France se situe dans une zone de faible endémie, on estime que le taux de porteurs de l'AgHBs se situe entre 0.1 et 0.5 % . On considère qu'il y a environ 100 000 cas d'hépatite B par an, dont 3100 hépatites aiguës symptomatiques (BEH n°9, 1999) .Le nombre de nouveau cas par an est de 12 pour 100 000 habitants avec un sex ratio de 1,6 et un âge médian de 32 ans.

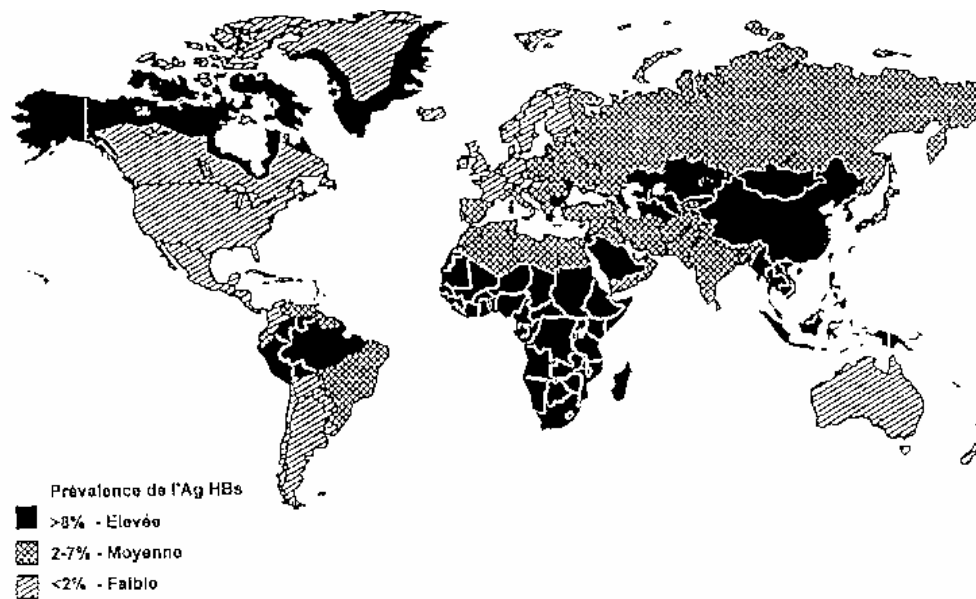


Figure 4 : Distribution géographique de l'AgHBs

C. Infection humaine :

1. Pouvoir pathogène chez l'homme :

Le virus de l'hépatite B est peu cytotoxique, c'est l'intensité variable de la réponse immunitaire, à médiation principalement cellulaire, de l'hôte face à cette stimulation virale qui va déterminer la gravité de l'infection et le polymorphisme de la maladie hépatique. En effet, les défenses immunitaires mettent en jeu deux mécanismes : les lymphocytes T qui détruisent les hépatocytes infectés et les lymphocytes B qui synthétisent des anticorps

spécifiques neutralisant les virus circulants. Il en découle alors plusieurs modalités évolutives de l'infection chez l'adulte immunocompétent (11) (figure 5) :

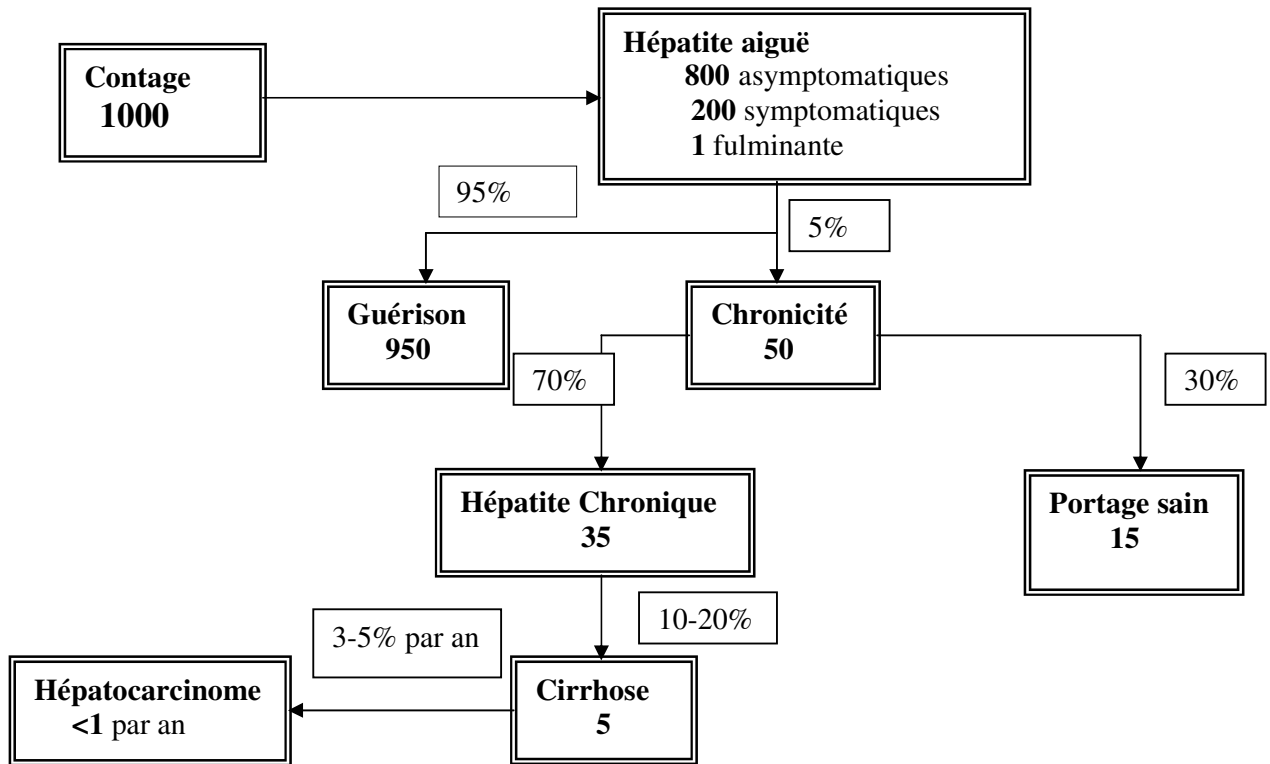


Figure 4 : Risque d'évolution de l'infection aiguë vers les formes chroniques

2. Hépatite aiguë :

Elle ressemble aux autres hépatites virales. La durée d'incubation est longue variant de 1 à 3 mois (en moyenne 10 semaines). La plupart des infections aiguës (environ 90 %) sont asymptomatiques.

L'hépatite aiguë symptomatique peut se décomposer en trois phases successives : une phase pré-ictérique insidieuse (associant asthénie, nausée, anorexie) de 3 à 7 jours, puis une phase ictérique précédée par l'apparition d'urines brunâtres et se prolongeant pendant

2 à 3 semaines. Enfin, une période de convalescence avec régression progressive des signes cliniques et biologiques.

L'hépatite B aiguë est le plus souvent bénigne. Plus rarement (0.1 % des cas), la réponse immunitaire est explosive entraînant une nécrose hépatique sévère, c'est l'hépatite aiguë sévère qui doit conduire à une hospitalisation rapide en milieu spécialisé, devant le risque d'évolution vers l'hépatite fulminante (associée à une mortalité de 80 % en l'absence de greffe hépatique (12) qui complique 1% des hépatites aiguës symptomatiques. Le VHB est la plus grande cause d'hépatite fulminante d'origine virale dans le monde (13) et, en France, le VHB est à l'origine de 70 % des cas d'hépatites fulminantes d'origine virale.

3. Hépatite chronique et complications :

Elle se développe au décours d'une hépatite B aiguë symptomatique ou anictérique et elle est classiquement définie par la persistance du portage de l'AgHBs six mois après l'infection aiguë (14). La réaction immunitaire de l'hôte est incomplète ou inadaptée, permettant la persistance de la production virale entraînant la destruction progressive du tissu hépatique.

Le risque d'évolution vers la chronicité dépend de l'âge du patient et de son système immunitaire. Le taux d'évolution vers la chronicité est de 6 à 10 % chez l'adulte immunocompétent. Ce taux est beaucoup plus élevé chez le nouveau-né infecté (90 %) ou chez l'immunodéprimé (15).

Les trois quarts de ces formes sont spontanément résolutive et deviennent des hépatites chroniques persistantes, alors qu'environ un quart de ces formes évoluent vers des hépatites chroniques actives avec destruction massive des cellules hépatiques. Les cellules

détruites sont progressivement remplacées par du tissu cicatriciel aboutissant progressivement à la constitution d'une cirrhose.

Il s'agit d'un évènement fondamental dans l'histoire naturelle de l'hépatite B chronique. En effet, la cirrhose expose à des complications qui lui sont propres : hypertension portale, insuffisance hépatocellulaire, carcinome hépatocellulaire et qui rendent compte d'une grande partie de la morbidité et de la mortalité de l'infection virale B (16).

Les hépatites chroniques sont souvent asymptomatiques et il n'est pas rare que la maladie soit découverte au stade de cirrhose.

L'incidence de la survenue de cirrhose au cours de l'infection virale B est de 2 % par an. La survie à 5 ans des patients atteints de cirrhose virale B est de 30 à 80 % selon les stades d'évolution de la maladie. Les délais d'apparition d'une cirrhose après une infection virale B est de 20 à 30 ans après le contage. L'existence d'une immunosuppression, d'une surinfection virale par le virus Delta ou le virus C et/ou la présence de virus mutants pourrait être liée à une évolution vers une hépatopathie plus sévère (17, 18, 19).

A plus long terme, certaines cellules peuvent se transformer et initialiser un cancer primitif du foie ou carcinome hépatocellulaire. Il s'agit du huitième cancer, par ordre de fréquence, dans le monde et le plus fréquent dans certaines régions d'Afrique et d'Asie. Il survient dans plus de 80 % des cas sur une cirrhose sous-jacente. L'incidence annuelle du carcinome hépatocellulaire chez les sujets ayant une cirrhose est de 3 % (20).

Les mécanismes de l'oncogénèse ne sont pas complètement élucidés mais l'interaction directe au génome de l'hôte du génome du VHB, à l'origine de mutations par insertion et de transactivation de gènes par les protéines virales X et pré-S2/S associée à d'autres facteurs étiologiques tels que l'alcool, le VHC, la cirrhose (par l'intermédiaire de ses nodules de régénération qui en augmentant la prolifération des hépatocytes accroît le risque

de réarrangement chromosomique) sont probablement impliqués dans la survenue de carcinome hépatocellulaire (21).

4. Facteurs pouvant modifier l'histoire naturelle du VHB :

a. Surinfection par le virus Delta :

Le virus Delta (VHD) est un virus à ARN défectif nécessitant la présence du VHB pour pénétrer dans l'hépatocyte. La prévalence de ce virus est élevée dans certaines régions d'endémie tropicales et sub-tropicales et dans certaines populations (toxicomanes IV, homosexuels).

La co-infection VHB-VHD induit un risque relatif accru d'hépatite fulminante avec une prévalence de 5 à 10 % des cas. L'évolution vers la chronicité en cas de co-infection est rare. A l'inverse, la surinfection par le VHD d'un patient ayant une hépatite B chronique ou un portage de l'AgHBs est caractérisée par des lésions hépatiques plus sévères et une évolution plus fréquente vers la cirrhose. Le risque d'évolution vers la chronicité est alors de 75 % (22, 23).

b. Co-infection VHC :

Elle est associée à des lésions histologiques plus sévères et habituellement à une inhibition de la réplication du VHB. Le déséquilibre de réplication virale peut expliquer certains cas de réactivations de l'hépatite B après traitement de l'hépatite C chez certains sujets co-infectés.

c. Immunosuppression :

Elle est responsable d'une augmentation de la réplication virale, de l'élévation du taux de passage à la chronicité, d'une diminution du nombre de séroconversions spontanées, d'une augmentation des cas de réactivations virales avec dans ce cas, un effet délétère surajouté en cas d'arrêt de l'immunosuppression avec accentuation de la sévérité des lésions hépatiques et une évolution plus rapide et fréquente vers la cirrhose (14).

Chez les transplantés rénaux, la prévalence de l'infection virale B est de 5 %, le passage à la chronicité survient dans 100 % des cas (14).

90 % des sujets infectés par le VIH ont été exposés au VHB, 10 % d'entre eux sont porteurs de l'AgHBs. La défaillance immunitaire des personnes infectés par le VIH se traduit par des formes asymptomatiques et un passage à la chronicité plus fréquent. Cependant, les études à long terme des formes chroniques d'hépatite B chez les sujets co-infectés par le VIH ne rapportent pas de façon constante une augmentation de la mortalité (24).

Chez les transplantés hépatiques pour infection virale B, en l'absence d'immunoprophylaxie, un taux de récurrence d'infection sur le greffon de l'ordre de 75 à 80 % est observé principalement en cas de réplication virale pré-existante à la transplantation.

5. Variabilité génomique :

Il existe plusieurs génotypes du VHB dont la répartition géographique varie et qui pourraient rendre compte de la variabilité épidémiologique, histologique et de réponses aux traitements antiviraux. De nombreuses mutations spontanées ou favorisées par les

vaccinations sont observées dans toutes les régions du génome (notamment pré-S1, S et pré-C). Leur impact n'est pas encore clairement établi si ce n'est pour les mutants pré-C et d'échappement à la vaccination .

a. Mutants pré-C :

Certains mutants du VHB peuvent modifier l'histoire naturelle de l'infection par le VHB. Les mutants pré-C sont caractérisés par des mutations ponctuelles dans le gène pré-C empêchant, du fait de l'introduction mutationnelle d'un codon stop AUG, la synthèse de l'AgHBe (modification du signal peptide de la protéine). Les sujets ayant un virus mutant pré-C, dont la fréquence serait d'au moins 20 % dans certains pays méditerranéens, ont une multiplication virale persistante. Ces mutants sont caractérisés par une évolution plus sévère de l'hépatite avec dans 30 % des cas la constitution d'une cirrhose, une réplication virale plus faible et une absence d'arrêt spontané de la multiplication virale (14).

b. Mutants d'échappement à la vaccination :

L'utilisation de la vaccination dans les pays de forte prévalence pour l'hépatite B, a mis en évidence l'émergence de souches portant des mutations sur le gène « s ». Le plus souvent , l'arginine en position 45 est remplacée par une glycine, ce qui modifie le déterminant antigénique majeur de la protéine « s » qui n'est alors plus reconnue par les anticorps dirigés contre l'AgHBs vaccinal. Ces variants sont peu fréquents et ont été rapportés en Italie, en Gambie et à Singapour (25). La modification du déterminant antigénique peut aussi remettre en question la détection des protéines « s » mutées par les tests de dépistage de l'AgHBs utilisés dans les laboratoires.

D. Traitement :

Le traitement de l'hépatite B a pour objectif de bloquer la multiplication virale afin d'arrêter l'activité de la maladie et de prévenir l'évolution vers la cirrhose et ses complications. Le traitement s'adresse donc aux malades ayant une hépatite B active, définie par des transaminases élevées, la présence d'une multiplication virale (ADN sérique détectable) et des signes d'activité histologiques.

Trois molécules ont obtenues l'AMM dans le cadre du traitement de l'hépatite B : l'interféron α , la vidarabine et la lamivudine.

La réponse au traitement est définie par la négativation de l'ADN viral sérique associée à une séroconversion HBe (négativation de l'AgHBe et apparition d'Ac ant-Hbe). Cette réponse virologique est habituellement associée à une réponse biochimique (normalisation des transaminases) et histologique.

- Vidarabine (adénine-arabinoside):

C'est un analogue de l'adénosine dont le dérivé monophosphate (araAMP®), hydrosoluble, peut être administré par voie I.M. Les essais cliniques confirment son effet inhibiteur de la réplication virale, mais la réponse reste transitoire. De plus, le traitement au long cours entraînant des risques significatifs de neuropathies périphériques, elle n'est pratiquement plus utilisée.

- Interféron α :

Jusqu'à récemment, l'interféron α (cytokine), qui exerce un effet antiviral direct et un effet immunomodulateur, était le seul traitement ayant un effet bénéfique à long terme démontré

avec 20 à 30 % de séroconversions HBe durables. L'interféron α est surtout efficace chez les patients ayant des transaminases élevées et un taux d'ADN du VHB sérique bas. Les résultats à long terme sont moins bons chez les malades atteints d'une hépatite chronique B avec AgHBe négatif (virus B mutant) du fait de fréquentes réactivations après l'arrêt du traitement. Les facteurs de mauvaises réponses sont : une infection ancienne, un déficit immunitaire, un taux de transaminases bas, une forte multiplication virale, un virus mutant et une activité histologique faible. La surveillance à long terme des patients atteints d'hépatite chronique B ayant répondu au traitement par interféron montre une réponse soutenue dans environ 80 % des cas.

L'interféron α est d'utilisation délicate du fait de ses modalités d'administration (5 à 6 M.U /semaine par voie sous-cutanée uniquement pendant plusieurs mois) et de ses effets secondaires importants (syndrome grippal, irritabilité, syndrome dépressif, anomalies hématologiques..).

- **Lamivudine** :

Très récemment, de nouvelles molécules antivirales actives sur le VHB ont été développées. Il s'agit le plus souvent d'analogues nucléosidiques (26) telle que la lamivudine.

La 2',3'_didéoxy_3' thiacytidine ou 3TC, dont le métabolite actif (lamivudine 5' triphosphate) inhibe la transcriptase inverse du VHB et stoppe l'élongation de la chaîne d'ADN virale. Cette molécule a l'avantage considérable d'être donnée par voie orale à la dose de 100mg/j et de ne pas avoir d'effet secondaire. L'effet inhibiteur de la réplication virale s'accompagne d'une normalisation des transaminases et une amélioration histologique. Quatre grandes études ont montré une séroconversion HBe chez 17 à 21 % des patients après un an de traitement (27, 28).

Chez les virus ayant un mutant pré-C, 65 % ont un ADN du VHB négatif après un an de traitement par lamivudine. Les résultats à long terme sont moins bien connus et l'on peut estimer que le taux de réponse prolongée est de l'ordre de 20 %. Les facteurs prédictifs de bonne réponse à la lamivudine sont les mêmes que pour l'interféron α .

Le risque d'apparition d'un VHB mutant résistant est augmenté par l'existence d'une forte multiplication virale avant le traitement (ADN VHB élevé). L'utilisation au long cours de la lamivudine qui agit essentiellement au niveau de la polymérase virale, entraîne la sélection de souches résistantes. Le séquençage du gène de la polymérase des souches résistantes à la lamivudine révèle généralement des mutations dans le site catalytique, en particulier sur le motif YMDD (29, 30, 31). Aussi dans les essais internationaux les plus récents chez des sujets immunocompétents, l'incidence de la résistance est d'au moins 15 à 20 % après un an de traitement par lamivudine, pour atteindre plus de 67 % à 4 ans (32, 33). Une incidence annuelle de 20 % a été observée chez les sujets co-infectés par le VIH (34).

Les virus mutants pourraient être sensibles aux nouveaux antiviraux en cours d'évaluation (adéfovir, entécavir) mais cela reste à confirmer par les essais en cours.

Dans l'avenir, du fait de leur facilité d'administration (per os), de leur bonne tolérance et de leur efficacité antivirale sur le virus sauvage et le virus mutant pré-C, les analogues nucléosidiques devraient avoir un rôle important dans le traitement de l'hépatite B chronique.

Leur utilisation en monothérapie entraîne l'émergence rapide de souches résistantes, c'est pourquoi comme dans l'infection par le VIH, l'utilisation de nouveaux antiviraux en

association avec la lamivudine pourrait diminuer le risque d'émergence de résistance virale et d'augmenter l'efficacité antivirale par un effet synergique.

Des immunomodulateurs pourraient alors être des adjuvants utiles.

II. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'HEPATITE B :

Nous avons vu que l'infection par le VHB pose un réel problème de santé publique, du fait du nombre important de patients infectés, des modes de transmission de l'infection, de l'incidence du passage à la chronicité, de la gravité des complications (cirrhose/ carcinome hépatocellulaire) et des résultats insuffisants des traitements actuels.

L'histoire naturelle de l'hépatite B est caractérisée par la diversité des profils clinico-virologiques. Dans ce cadre, le diagnostic virologique de l'infection par le virus B prend toute son importance. L'évolution récente des techniques a permis le développement de moyens diagnostiques et de prise en charge de l'infection chronique B ainsi que la mise en place d'un dépistage efficace des infections virales B, réalisables par les laboratoires de biologie médicale.

En effet, la détermination des profils sérologiques imputables au VHB peut être réalisée soit par des tests immuno-enzymatiques (ELISA, MEIA) détectant des marqueurs directs (Ag viral) ou indirects (Ac spécifiques de l'hôte dirigés contre le virus) de l'infection, soit par des tests moléculaires détectant, quantifiant ou caractérisant la séquence de l'ADN du VHB (35).

La combinaison de ces marqueurs associée au dosage des transaminases (+/- histologie hépatique) sont indiquées dans le diagnostic et le suivi de l'évolution de la maladie hépatique.

A. Tests immuno-enzymatiques :

1. Généralités :

Ils reposent sur la fixation du marqueur recherché (Ag, Ac) à une phase solide (puits de microplaque, billes, micro-particules), grâce à des antigènes viraux pour la détection des anticorps, grâce à des anticorps monoclonaux pour la détection des antigènes. La révélation de la présence d'antigène-anticorps est assurée par la fixation d'une enzyme transformant un substrat spécifique en composé coloré ou émettant un signal. La détection du signal est ensuite assurée par spectrophotomètre, un fluorimètre ou un chimioluminomètre selon le type de réaction. Les résultats sont le plus souvent exprimés par un « ratio » qui correspond au rapport du signal de l'échantillon sur le signal du seuil établi pour chaque trousse utilisée. Le ratio est proportionnel à la quantité de marqueur présente dans le sérum ou inversement proportionnel pour les techniques par compétition. De nombreux réactifs aux performances sensiblement équivalentes et pouvant être utilisés sur des automates ouverts ou fermés sont disponibles pour la détection des marqueurs du VHB (tableau 2) :

<p>Paramètres du VHB détectables par immuno-enzymologie (ELISA, ELIFA, chimiluminescence)</p>

<i>DIRECTS</i>	<i>INDIRECTS</i>
Ag HBs	Ac anti-HBs
	Ac anti-HBc totaux
	IgM anti-HBc
Ag HBe	Ac anti-HBe

Tableau 2 : Paramètres sérologiques du VHB.

Le choix et la combinaison pertinente de ces différents marqueurs viraux permettent de définir plusieurs cadres nosologiques pour le diagnostic des hépatites virales B.

2. Diagnostic d'une infection récente :

L'AgHBs apparaît pendant la période d'incubation (généralement entre 2 et 12 semaines après l'infection et peut être détecté 3 semaines environ avant les signes cliniques) et atteint son maximum pendant la phase aiguë de la maladie. L'AgHBe apparaît ensuite mais sa recherche n'est pas utile au diagnostic dans ce contexte. Les anticorps anti-HBc sont les premiers anticorps qui apparaissent pendant la phase aiguë. L'Ac anti-HBc est le meilleur marqueur sérologique d'infection par le VHB (marqueur de séroconversion). La présence d'IgM anti-HBc permet d'affirmer l'étiologie virale B de

l'hépatite aiguë lorsqu'elle est associée à l'AgHBs (figure 6). Les Ac anti-HBc de type IgM peuvent dans certains cas être seuls présents lorsque l'AgHBs a déjà disparu du serum (10% des cas). L'existence d'une augmentation importante des transaminases, d'un anticorps anti-HBc de type IgM et l'apparition quelques semaines plus tard des Ac anti-HBs permettent de confirmer l'étiologie virale B de l'hépatite aiguë (14,36).

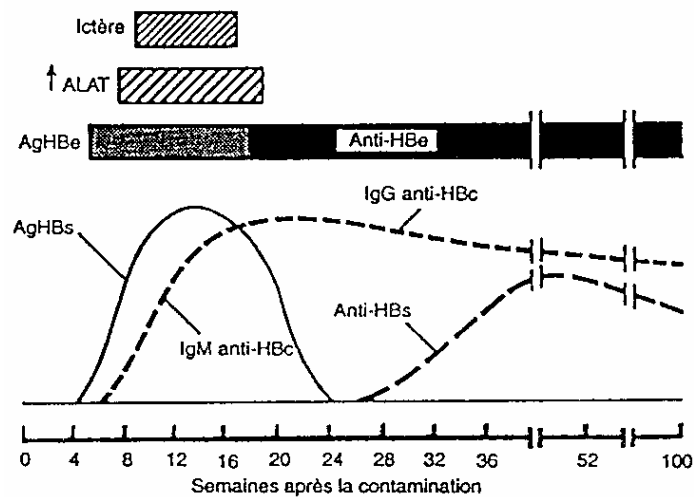


Figure 6 : Caractéristiques virologiques et biologiques de l'évolution de l'hépatite B aiguë

Les trousse détectant l'Ag HBs ont une sensibilité exigée de : 0,5 ng/ml et en terme de spécificité, le pourcentage moyen de faux positifs est égal à 0.2 % sur un panel transfusionnel.

3. Contrôle de guérison :

Nous avons vu que dans environ 95 % des cas chez l'adulte, l'hépatite aiguë B évolue vers la disparition spontanée de l'AgHBs dans un délai de 4 à 6 mois. Cette disparition est suivie 2 à 8 semaines plus tard par l'apparition des anticorps anti-HBs, marqueur classique de guérison. En parallèle, les IgM anti-HBc disparaissent et une séroconversion HBe survient (disparition de l'Ag HBe et apparition des anticorps anti-HBe). Le profil sérologique d'une hépatite guérie à distance de l'épisode aiguë associe la présence des Ac anti-HBs et des Ac anti-HBc. Dans certains cas et tardivement, les Ac anti-HBs peuvent devenir indetectables. Par ailleurs, le profil atypique parfois retrouvé avec présence d'Ac anti-HBc totaux isolés peut poser des problèmes d'interprétations. En effet, ce profil peut correspondre à celui d'un sujet très anciennement guéri mais il peut aussi correspondre à un portage chronique (avec un taux d'AgHBs indetectable), d'une infection par un variant du gène S non détecté par les techniques usuelles (37).

4. Contrôle de l'immunité :

Après vaccination, il s'agit du titrage des Ac anti-HBs (il existe 5 % de non répondeurs), seul marqueur présent dans ce contexte.

L'administration du vaccin anti-VHB, constitué d'AgHBs recombinant induit la production d'Ac anti-HBs neutralisants et protecteurs. Le seuil de protection ayant été fixé par l'Organisation Mondiale de la Santé à 10 mUI/ml.

Le contrôle de l'immunité n'étant indiqué que chez les sujets à risque d'infection.

5. suivi d'une hépatite B chronique :

L'infection chronique par le VHB est classiquement définie par le portage de l'AgHBs six mois après l'hépatite aiguë (environ 5 % des cas).

L'infection chronique par le VHB est de présentation variable, incluant l'existence de porteurs sains de l'AgHBs, d'une modification de la réplication au cours du temps avec des arrêts spontanés de multiplication virale mais aussi des épisodes de réactivations. Environ 1/3 des porteurs chroniques de l'AgHBs sont porteurs asymptomatiques défini ainsi : absence de signe clinique, absence d'anomalies biologiques (aminotransférases normales à plusieurs reprises), présence d'Ac anti-HBe et ADN viral en hybridation négative. La moitié des porteurs asymptomatiques du VHB ont cependant de l'ADN viral détectable par des tests moléculaires plus sensibles.

La prévalence de lésions histologiques sévères chez les porteurs asymptomatiques est inférieure à 3%. Une séroconversion AgHBs peut être observée chez ces patients avec une prévalence de 3 à 5% par an. Des épisodes de réactivations sont cependant possibles chez ces patients qui nécessitent une surveillance régulière (38, 39, 40).

Les 2/3 des patients porteurs de l'AgHBs vont développer des lésions histologiques d'hépatite chronique associant : nécrose, inflammation et fibrose sur une biopsie hépatique pratiquée au moins six mois après l'hépatite aiguë.

Deux formes d'hépatite chronique sont classiquement distinguées : l'hépatite chronique persistante considérée comme bénigne et l'hépatite chronique active avec un risque d'évolution vers des lésions de cirrhose élevée. En fait, l'hétérogénéité de répartition des

lésions histologiques et des formes de passage entre ces deux entités dans le temps en font deux entités de distinction moins évidente.

L'histoire naturelle de l'hépatite chronique B peut se décomposer en trois phases de durée variable (41, 42) :

La première (durant de quelques mois à plusieurs années) est marquée par une multiplication active du virus avec présence des marqueurs de réplication (AgHBe et ADN viral) dans le sérum et absence de forte réponse immunitaire (tolérance immunitaire). Durant cette phase la contagiosité est importante, les lésions hépatiques essentiellement liées à la réponse immunitaire sont peu importantes.

La deuxième phase est marquée par l'arrêt progressif et spontané de la multiplication virale parfois associée à une accentuation de la nécrose hépatocytaire (élévation des transaminases) probablement liée à la réponse immunitaire cytotoxique. Il s'agit de la phase de séroconversion dans le système « e » qui est définie par l'apparition d'anticorps anti-HBe chez un sujet initialement porteur de l'AgHBe. Son incidence annuelle est de 5 à 25 % , elle est simultanée à un arrêt de la multiplication virale associée à une diminution de l'activité de l'hépatite. Chez 30 à 50 % des sujets, elle est précédée d'une exacerbation de l'hépatite (hépatite de séroconversion). C'est au cours de cette phase que peuvent se constituer des lésions sévères : fibrose extensive, voire cirrhose. Cette phase de séroconversion est de durée variable , elle peut être prolongée et marquée par plusieurs épisodes succesifs de séroconversion abortive avec des épisodes d'exacerbation virale. En effet, la séroconversion n'est stable que si l'Ac anti-HBe véritable verrou immunologique est apparu.

La période de séroconversion dans le système « e » est suivie d'une troisième période (latence virale), résultat d'une immuno-élimination efficace, caractérisée par l'absence de marqueurs de réplication virale : absence d'AgHBe et d'ADN viral sérique associée à la

présence d'Ac anti-HBe. Cependant, chez la plupart des patients, l'ADN viral est toujours présent dans le noyau des hépatocytes intégré au génome de la cellule hôte et il est possible de mettre en évidence une réplication virale par des tests moléculaires ultra-sensibles. Durant cette phase, l'activité de la maladie hépatique est faible ou nulle. Lorsqu'une cirrhose s'est développée au cours de la phase précédente, elle peut évoluer pour son propre compte.

Les différents profils sérologiques rencontrés lors d'une infection chronique sont figurés ci-dessous (tableau 3) :

Tableau 3 : Profils biologiques rencontrés lors d'une infection chronique par le VHB

	AgHBs	Ac anti-HBs	Ac anti-HBc		AgHBe	Ac anti-HBe	ADN VHB
			IgG totaux	Ig M			
<i>Hépatite chronique à virus sauvage</i> Immuno tolérance	+	-	+	-	+	-	+
<i>Hépatite chronique à virus sauvage</i> Immuno élimination	+	-	+	+/-	+ → -	- → +	+/-
<i>Hépatite chronique à virus sauvage</i> Latence	+	-	+	-	-	+	-
<i>Hépatite chronique à virus sauvage</i> Réactivation	+	-	+	+/-	+	-	+
<i>Hépatite chronique à virus mutant</i> Immuno tolérance	+	-	+	-	-	+	+
<i>Hépatite chronique à virus mutant</i> Immuno élimination	+	-	+	+/-	-	+	+/-
<i>Hépatite chronique à virus mutant</i> Latence	+	-	+	-	-	+	-
<i>Hépatite chronique à virus mutant</i> Réactivation	+	-	+	+/-	-	+	+

B. La charge virale dans l'infection par le virus de l'hépatite B :

1. Introduction :

La quantification des virus est depuis longtemps un outil essentiel pour la recherche en virologie. La quantification virale est devenue aujourd'hui un outil indispensable pour la prise en charge médicale des infections virales chroniques notamment celles liées au VHB. Les données obtenues par la quantification de l'ADN viral permettent une meilleure

compréhension de la physiopathologie de l'infection (VHB non cultivable in vitro), une meilleure évaluation du pronostic et une meilleure analyse de la réponse aux thérapeutiques antivirales toujours en plein essor.

Aujourd'hui, avec les progrès remarquables réalisés durant ces dix dernières années en biologie moléculaire, il existe des outils sensibles, fiables et simples d'utilisation pour apprécier la charge virale (quantité de virus circulant) dans un laboratoire de virologie de routine.

Toutes les techniques de détection et de quantification virale s'appuient sur des principes dérivés de la connaissance de la réplication virale qui engendre l'apparition de particules ou de molécules virales qui sont autant de marqueurs pour en mesurer l'intensité (43).

Nous allons voir quels sont les marqueurs de réplication du VHB qui permettent le mieux d'apprécier la charge virale puis, les différentes techniques de quantification de l'ADN du VHB et leurs applications en virologie clinique.

2. Choix des marqueurs de réplication du virus de l'hépatite B :

- l'antigène HBs :

Nous avons vu qu'en plus du virion, sont excrétées de la cellule infectée deux autres types de particules constituées uniquement d'excès d'enveloppe (sphérules et filaments de 22 nm de large). Ces différentes particules sont présentes en quantité variable dans le sérum d'un

sujet infecté mais peuvent atteindre des concentrations très importantes : jusqu'à 10^{13} particules d'excès d'enveloppe par millilitres.

La détection de l'AgHBs par des techniques qualitatives est indispensable pour poser le diagnostic d'hépatite B en cours mais sa quantification ne présente pas d'intérêt puisqu'elle ne préjuge pas de la proportion de virus complet et ne permet donc pas d'apprécier la charge virale du VHB.

- **La protéine de capsid et l'antigène HBe :**

- **L'antigène HBc :**

Plusieurs études ont tenté d'évaluer l'utilité d'une quantification par EIA ou RIA de l'AgHBc dans le plasma des sujets infectés par le VHB (44, 45). Ce marqueur ne peut être utilisé en routine du fait du fort titre d'Ac anti-HBc entravant l'immunodétection de l'AgHBc sérique. D'autre part, l'AgHBc n'est pas présent uniquement sous forme de nucléocapside au sein du virion mais il peut exister sous forme de capsides ou de nucléocapside libres (non enveloppées) probablement relarguées de la cellule infectée au cours de la cytolyse. Par conséquent, l'AgHBc ne peut être utilisé comme marqueur de réplication du VHB.

- **L'antigène HBe :**

Moins immunogène que l'AgHBc, l'AgHBe n'induit pas de titres élevés d'Ac anti-Hbe risquant de masquer son immuno-détection plasmatique. En effet, une antigénémie HBe est

généralement associée à une absence de détection des Ac anti-HBe, qui n'apparaissent qu'à la suite de la négativation de l'AgHBe sérique. L'AgHBe est utilisé en routine depuis 20 ans comme marqueur de répllication du VHB (38). Cependant, n'étant pas associé au virion mais sécrété, il est actuellement considéré comme un marqueur indirect et par « défaut » de la répllication du VHB puisque son absence ne signifie pas l'absence de répllication virale. Les mutants pré-C illustrent bien l'insuffisance du paramètre immunologique « AgHBe », en tant que marqueur de répllication du VHB, puisqu'il y a absence de synthèse de l'AgHBe du fait de la mutation avec cependant persistance d'une répllication virale. La corrélation entre la présence d'AgHBe et de virions varie en fonction de l'âge, de l'origine ethnique et géographique du sujet : chez les caucasiens d'Amérique et d'Europe du Nord, la corrélation est assez bonne, en revanche, elle l'est beaucoup moins chez les sujets africains, asiatiques et caucasiens d'Europe du Sud. Cette absence de corrélation s'explique par l'existence de mutant pré-C considéré davantage comme une quasi-espèce du VHB que comme un variant et qui peut devenir prédominant au fur et à mesure de l'évolution de l'infection.

- L'ADN et l'ADN polymérase du VHB :

Ces deux marqueurs représentent les meilleurs marqueurs sériques de la répllication du VHB parce qu'ils sont exclusivement rencontrés dans le virion . En effet, au cours de la maturation virale, l'ARN pré génomique et l'ADN polymérase virales sont encapsidés dans l'AgHBc avant que cette enzyme ne convertisse l'ARN viral en ADN simple brin par

une activité transcriptase inverse, puis en ADN double brin par une activité ADN polymérase. La synthèse du brin complémentaire cesse au moment du bourgeonnement viral expliquant le caractère partiellement bicaténaire du génome du VHB. De ce fait, seules les nucléocapsides dans lesquelles la synthèse du second brin d'ADN a débutée sont aptes à bourgeonner avec l'enveloppe virale. L'ADN ou l'ADN polymérase détectables dans le sérum témoignent donc de la présence de particules infectieuses et non pas de virions défectifs.

- L'ADN polymérase :

Son activité peut être semi-quantifiée, mais nécessite une étape de pré-purification des virions par ultra-centrifugation du plasma. L'activité enzymatique est mesurée par incorporation de nucléotides radiomarqués dans le brin complémentaire de l'ADN du VHB. Cette technique très lourde a été utilisée pour apprécier la charge virale jusqu'au milieu des années 1980.

- L'ADN viral :

La recherche de l'ADN du VHB est le meilleur marqueur de réplication virale et sa quantification, accessible par des tests moléculaires, est la meilleure approche pour évaluer la charge virale du VHB.

3. Tests moléculaires de quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B :

a. Principes :

Les premières techniques utilisées reposent sur l'hybridation des acides nucléiques dont le principe est basé sur la complémentarité des bases nucléotidiques. Cette complémentarité permet l'appariement spécifique entre une séquence de l'acide nucléique matrice simple brin (ADN) obtenu à partir du prélèvement et une sonde de référence (ADN) qui porte la séquence complémentaire. L'hybride matrice-sonde est ensuite révélée par divers procédés utilisant en général un marquage de sonde par un composé radioactif ou un ligand de référence non radioactif. Ce dernier est détecté par une réaction immunoenzymatique évitant ainsi l'utilisation de procédés radioactifs non adaptés aux laboratoires de virologie clinique.

Les premières techniques d'hybridation moléculaires classiques appliquées à la détection (et dans une moindre mesure à la quantification) de l'ADN du VHB ont été des Southern-Blot qui étaient effectués sur des volumes importants de plasma et qui étaient des techniques lourdes réservées à quelques laboratoires spécialisés (46). Des méthodes de Dot-Blot simplifiées ont ensuite été développées, dans lesquels le dépôt direct d'un volume minimal de sérum dénaturé sur un film de nito-cellulose était hybridé avec une sonde ADN marquée au phosphore radioactif P32 (47). Cette méthode, pouvant être semi-quantitative, le spot généré par chaque sérum pouvant être comparé à une gamme de dilution d'ADN du VHB cloné. Cette technique avait une sensibilité se situant entre 10 et

50 pg/ml (3.10^6 - $1,5.10^7$ virions/ml). L'inconvénient majeure de ces techniques d'hybridation moléculaire classiques était le manque de sensibilité (48).

Pour augmenter la sensibilité de ces techniques d'hybridation classiques, qui quantifient l'ADN du VHB par l'analyse précise des signaux de détection comparée à ceux d'une gamme d' « étalonnage » d'ADN du VHB, une amélioration considérable a été la mise au point de techniques d'hybridation avec amplification de signaux chimioluminescents soit par l'utilisation de sondes ramifiées servant elles-même de matrice pour d'autres sondes marquées : technique de l'ADN branché ou soit après hybridation par une sonde à ARN : technique de capture d'hybrides (hybrid capture) (figure 7). Ces deux méthodes, d'hybridation moléculaire en milieu liquide, standardisées de quantification d'ADN du VHB sont actuellement commercialisées : ADNbranché Quantiplex® HBV-DNA et Hybrid Capture® (Digene). Un troisième test d'hybridation moléculaire est commercialisé : Génostics® (Abbott) qui repose sur l'utilisation d'une sonde ADN marquée à l'iode radioactif ^{125}I nécessitant une quantification en compteur à scintillation gamma ce qui rend difficile son utilisation en laboratoire de virologie de routine (tableau 4) :

Tests d'hybridation moléculaire de quantification de l'ADN du VHB	
<ul style="list-style-type: none"> • Hybridation – radioisotopes • Hybridation • Hybridation + amplification du signal (ADNbranché) 	<ul style="list-style-type: none"> • Genostics (Abbott Laboratories) • Digène Hybrid-Capture (Abbott laboratories) • Quantiplex HBV DNA (Bayer diagnostic systeme)

Tableau 4 : Tests commerciaux d'hybridation moléculaire de quantification de l'ADN du VHB

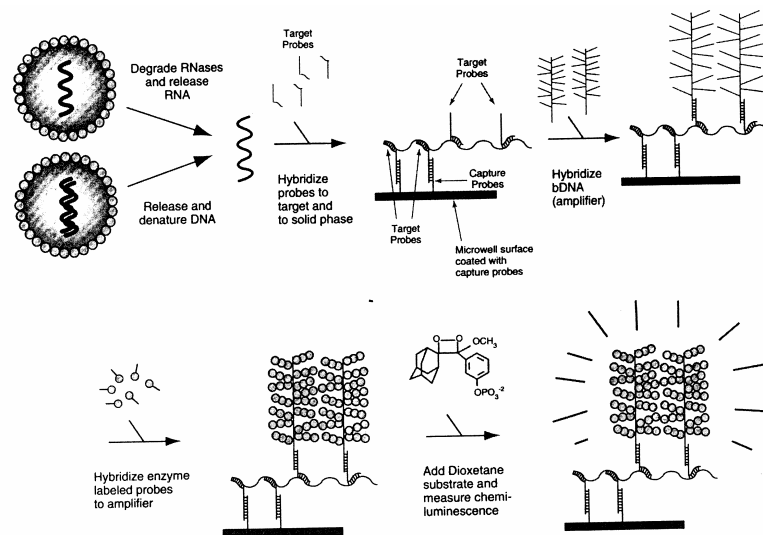


Figure 7 : Principe technique :ADN branché

Les progrès des techniques de biologie moléculaire avec l'avènement de l'amplification génique (Polymerase Chain Reaction) à permis un gain considérable en terme de sensibilité dans la détection des acides nucléiques (49). Son principe repose non plus sur l'amplification d'un signal de détection mais sur l'amplification de la cible c'est à dire du fragment du génome viral recherché afin de mieux le détecter. La détection des produits amplifiés se fait par utilisation de techniques d'hybridation. La caractéristique majeure est la grande sensibilité de l'amplification génique associée à une bonne spécificité dépendant étroitement de l'étape d'appariement des amorces.

Pour une application quantitative de ces techniques d'amplification génique, deux facteurs sont à prendre en considération : d'une part se trouver dans les conditions de relation exponentielle entre la quantité de matrice et la quantité de produits amplifiés et d'autre

d'être part dans des conditions de relation linéaire entre la quantité de produits amplifiés et le signal de détection. Du fait de variations expérimentales, les coefficients de cette relation ne sont pas identiques d'une manipulation à l'autre, il est alors nécessaire d'introduire dans chaque série de mesure, un ou plusieurs étalons ayant une concentration connue et stable en composants viraux pour définir

précisément la relation entre signal et quantité de composants viraux. Les étalons permettent d'extrapoler la valeur de l'échantillon étudié par proportionnalité avec les valeurs étalons.

L'usage d'un étalon interne, c'est à dire introduit dans chaque tube réactionnel, est nécessaire pour une application quantitative de ces techniques d'amplification génique. Pour la distinction entre les produits amplifiés obtenus par l'étalon interne et ceux obtenus par l'échantillon, les étalons internes, actuellement utilisés dans les trousse commerciales de quantification, portent des séquences internes particulières qui permettent leur détection par hybridation avec une sonde spécifique ne réagissant pas avec le produit amplifié obtenu à partir de l'échantillon aboutissant ainsi à deux réactions distinctes (figure 8). L'utilisation d'étalon interne permet donc une application quantitative des techniques d'amplification géniques qui à priori sont peu favorables à une telle utilisation.

La trousse actuellement commercialisée pour la quantification de l'ADN du VHB par génique (Polymerase Chain Reaction) est le test Amplicor HBV Monitor™ (*Roche Diagnostic Systems*).

AMPLICOR HBV MONITOR™

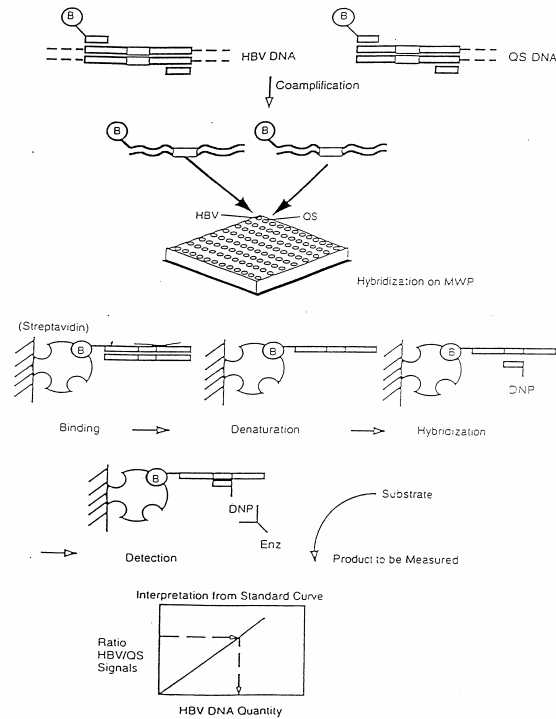


Figure 8 : PCR compétitive et quantitative

b. Performances de trois tests commerciaux de quantification d'ADN VHB :

Nous avons vu qu'il existe plusieurs tests moléculaires [(Quantiplex HBV DNA (ADNb), Digene Hybrid-Capture et Amplicor HBV Monitor (PCR)] commercialisés pour

la quantification de l'ADN du VHB et dont les performances cliniques et analytiques ont fait l'objet de nombreuses études :

La gamme de linéarité et le seuil de sensibilité constatés sont différents pour ces trois tests :

- ADNb : 7.10^9 à 5.10^9 copies/ml ou 0,7 à 5,7 Meq/ml
- Hybrid Capture (**HC**) : $1,4.10^6$ à $5,8.10^8$ copies/ml ou 5 à 2000 pg/ml
- Amplicor HBV Monitor (**PCR**) : 10^3 à 10^7 copies/ml

La sensibilité des deux tests reposant sur l'amplification de signal (Hybrid Capture (HC) et ADNb) est assez voisine, environ 10^6 copies/ml et que la PCR est significativement plus sensible que les deux autres tests (50). Une étude plus récente menée sur un nombre conséquent de sérums a comparé les performances de ces 3 tests (51) et a montré que l'ADNb avait une sensibilité légèrement supérieure à l'Hybrid Capture et que la PCR est le test de quantification d'ADN VHB le plus sensible puisqu'il permet de détecter de très faible niveau de virémie (non détecté par ADNb et Hybrid Capture) correspondant aux formes intégrées ou latentes du virus mais dont la signification clinique en terme d'évolution de la maladie hépatique reste à définir. Cette étude montre que l'avantage de la PCR en terme de sensibilité par rapport aux techniques d'hybridation moléculaire n'est pas retrouvé en ce qui concerne la spécificité et la reproductibilité. En effet, les tests ADNb et HC ont une spécificité équivalente de 99,2 % tandis que la PCR à une spécificité de 97,8 % (problèmes de faux négatifs inhérents à l'ultra-sensibilité de la technique).

L'ADNb a été comparé à la PCR dans le suivi de patients AgHBe négatif et traités par interféron (52) il s'avère qu'en terme de sensibilité, de spécificité et reproductibilité, il s'agit d'un test performant dans le suivi thérapeutique des malades porteurs chronique du VHB.

Nous avons vu que de nombreuses études ont évalué et comparé les performances analytiques et cliniques de ces trois tests commercialisés mais nous remarquons que la comparaison des résultats de ces différents tests est souvent difficile car toutes ces méthodes reposent sur la comparaison de signaux des échantillons avec ceux d'une gamme d'étalonnage et qui est différente entre chaque test. L'absence d'étalon international contre lequel paramétrer ces différents tests entre eux fait encore (mais plus pour longtemps (53)) défaut. L'expression des résultats dans des unités différentes où 1 génome copie/ml en HC, 1 génome copie/ml en PCR et 1 génome Eq/ml en ADNb ne représentent pas la même quantité d'ADN VHB et illustrent assez bien le problème du manque de standardisation des tests de quantification d'ADN VHB actuellement commercialisés (51).

4. Intérêts et indications de la charge virale VHB :

➤ Suivi thérapeutique :

La charge virale VHB représente un bon marqueur prédictif d'une réponse aux traitements et d'autre part un bon marqueur de suivi des patients traités. Le seuil de 200pg/ml avant traitement de l'adulte AgHBe positif par l'interféron α est souvent présenté comme pertinent, les patients dont le seuil est inférieur répondant mieux au traitement (50 % de réponse au traitement contre moins de 10 % pour les sujets dont le seuil est supérieur à 200 pg/ml (54). Une réponse favorable au traitement peut être ensuite prédite rapidement dans les semaines ou les mois qui suivent le début du traitement, sur la base d'une diminution de la quantité d'ADN sérique (55). La recherche de l'ADN du VHB vient ainsi

compléter précieusement les classiques marqueurs biochimique (transaminases) et histologique (ponction biopsie hépatique) utilisés comme facteurs d'évaluation de la réponse au traitement.

Concernant les malades infectés par les mutants pré-C, la mesure de la charge virale est le seul paramètre virologique de réplication disponible pour assurer leur suivi thérapeutique.

➤ Patients atteints d'infection chronique B (traités ou non) :

Nous avons vu que parmi les porteurs chroniques du VHB, environ un tiers sont des porteurs sains de l'AgHBs, un tiers ont une hépatite chronique persistante et un tiers ont une hépatite chronique active. Cependant, les sujets peuvent fluctuer d'une catégorie à une autre au cours de l'évolution de leur infection. La détermination de la charge virale du VHB dans le suivi à très long terme de ces malades (traités ou non) permet de mieux préciser leur statut virologique (en terme de réplication virale) tout au long de l'évolution de la maladie, et de pouvoir mettre en évidence une reprise de la réplication virale (réactivation, résistance virale au traitement) et/ou de poser l'indication d'un traitement (virus répliquant).

➤ Au décours d'une hépatite aiguë :

La persistance de l'ADN du VHB au delà de huit semaines constitue un marqueur pronostique de l'évolution vers la chronicité (56). La valeur pronostique d'une persistance de l'ADN est moindre par PCR (ultra-sensible) que par hybridation moléculaire.

➤ Compléter et/ou se substituer au système « e » :

La détermination de la charge virale du VHB permet de mieux caractériser les profils sérologiques, rencontrés chez les porteurs chroniques du VHB, en distinguant les profils sérologiques liés au virus « sauvage » de ceux liés au virus mutant pré-C:

Deux profils sérologiques peuvent être rencontrés chez les porteurs chroniques du VHB :

-AgHBs (+) / AgHBe (-) et Ac anti-HBe (+) :

La présence de l'AgHBe chez un porteur chronique de l'AgHBs est le signe d'une réplication virale active (objectivée par la recherche d'ADN viral qui est positive). La présence d'AgHBe associée à la réplication virale indique que l'infection est liée à un virus de l'hépatite B « sauvage ».

- AgHBs (+) / AgHBe (-) et Ac anti-HBe (+) :

Dans ce cas les marqueurs immunologiques de réplication utilisés seuls ne permettent pas d'interpréter fiablement ce profil. Par contre, couplée à la recherche de l'ADN viral par des techniques de biologie moléculaire, plusieurs interprétations sont possibles :

→ si l'ADN viral est absent avec les tests les plus sensibles, il s'agit du portage chronique du VHB en phase de latence (virus « sauvage » ou « mutant »). Si l'infection est liée à un virus « sauvage », la séroconversion AgHBe / Anti-HBe a été le résultat d'une immun-oélimination spontanée efficace.

→ si l'ADN viral est présent (au moins 20 % des cas), il s'agit d'un virus « mutant de la région pré-C » caractérisé par l'absence de production d'AgHBe quelque soit le niveau de répllication. On peut les rencontrer soit en phase aiguë, lorsque le virus à l'origine de la contamination était un tel variant, soit lors de la phase chronique lorsqu'il y a sélection naturelle d'un variant pré-Core. La répllication virale ne pourra être appréciée que par la quantification de l'ADN du VHB.

➤ Sérologies non informatives :

- *Mutants d'échappement à la vaccination :*

Certaines techniques actuellement commercialisées peuvent être mises en défaut pour la détection de l'AgHBs des mutants « S » dont le déterminant antigénique « S » est modifié. Le recours à la détection de l'ADN du VHB par des tests moléculaires peut s'avérer nécessaire.

- *Présence d'un anticorps anti-HBc isolé :*

Le profil atypique où seule la présence d'Ac anti-HBc est détectée (IgM HBc négatif) peut poser des problèmes d'interprétation. Outre un sujet très anciennement guéri, il peut aussi s'agir de porteurs chroniques du VHB ayant un AgHBs à un taux indétectable, d'une infection par un variant du gène « s » non détecté par les techniques usuelles. La recherche d'ADN du VHB dans ce contexte peut se révéler nécessaire.

➤ Pré et post-transplantation hépatique :

La recherche d'ADN VHB par les tests moléculaire avant transplantation hépatique a une valeur pronostique de rejet du greffon. Chez les patients transplantés hépatiques les profils sérologiques sont souvent atypiques et difficilement interprétables (AgHBs souvent masqué du fait de l'immunoprophylaxie anti-VHB) et la recherche de l'ADN virale constitue un paramètre virologique indispensable au monitoring de ces patients sous traitement (ou non).

III. OBJECTIFS DU TRAVAIL :

Au cours de l'infection chronique par le VHB, la réplication virale a été appréciée de façon qualitative, depuis deux décennies, par l'étude des marqueurs sérologiques du système « e ». Le clonage du génome du VHB associé aux perfectionnements des techniques de biologie moléculaire ont permis l'élaboration d'outils très sensibles capables d'apprécier quantitativement la réplication virale par la détection et la quantification de l'ADN du VHB qui lui est corrélée.

La quantification de l'ADN du VHB ou charge virale représente à l'heure actuelle le meilleur paramètre virologique pour le suivi à long terme de l'évolution de l'infection chez les patients porteurs chroniques du VHB, traités ou non (57, 58).

Il existe plusieurs tests moléculaires de quantification de l'ADN du VHB commercialisés, avec d'excellentes performances, mais qui n'ont pas encore fait l'objet d'une standardisation d'unités.

Une seconde génération du test Hybrid Capture vient d'être commercialisée (Hybrid Capture II) présentant d'excellentes performances analytiques.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer les performances du nouveau test Hybrid Capture II en les comparant à celles du test Amplicor HBV Monitor qui nous a servi de test de référence, dans la détection et la quantification de l'ADN VHB dans une série de 235 sérums obtenus à partir de 35 patients porteurs chroniques du VHB, suivis dans le cadre d'un protocole thérapeutique d'évaluation de l'efficacité d'un nouvel analogue nucléosidique.

Cette étude nous apparaît fondamentale car ces tests moléculaires sont largement utilisés dans les laboratoires de virologie. De plus, l'apparition de nouvelles molécules antivirales nécessitera un monitoring de la réplication virale plus précis.

IV. MATERIEL ET METHODES :

A. Patients :

1. Caractères de la population étudiée :

Les sérums analysés dans cette étude provenaient d'une population de 35 patients porteurs chroniques du VHB résistant à la lamivudine, co-infectés HIV, inclus dans une étude pilote ouverte évaluant l'efficacité et la tolérance d'un nouvel analogue nucléosidique (adéfovir dipivoxy) sur la réplication du VHB résistant à lamivudine.

Les patients ont reçu 10 mg/j d'adéfovir dipivoxyyl tout en maintenant la prise de lamivudine à la dose de 150 mg x 2/j (thérapie anti-VIH) pendant la durée de l'essai.

Cette étude a été menée par les services de Gastro-entérologie, de maladies infectieuses et de virologie du Groupe Hospitalier de la Pitié-Salpêtrière, à Paris.

- Les caractères principaux des 35 patients inclus dans le protocole sont représentés dans le tableau suivant :

Age (ans)	41.2+/- 1,5
Femme/Homme	1/34
Mode de contamination :	
- Sexuel (%)	30 (86)
- Parentérale (%)	3 (8,6)
- Inconnu (%)	2 (5,7)
Histologie hépatique (METAVIR) :	
n=23	
- Activité	1,4 +/- 0,2
- Fibrose	2 +/- 0,2
-Cirrhose (%)	5 (22,7)

- Les caractéristiques virologiques à l'inclusion sont représentées dans le tableau suivant :

Marqueurs sérologiques du VHB	(moyenne ou nombre de patients)
- AgHBe positif (%)	33 (94,3)
- Ac anti-Hbe positif (%)	2 (5,7)
- HBV DNA (Hybrid Capture)	
- 24 semaines avant l'inclusion (pg/ml)	1583+/-108
- 12 semaines avant l'inclusion (pg/ml)	1631+/-90
- Inclusion (pg/ml) / (log10 copies/ml)	1620+/-107 / 8,64+/-0,08

Génotypes du VHB	
- A	30
- B	4
- C	1
Durée du traitement par lamivudine (300mg/ml) (mois)	44,5+/-2,3
Délai entre résistance à la lamivudine et traitement par adéfovir (mois)	23,6+/-2
Charge virale VIH (log10 copies/ml)*	2,88+/-0,13
Numération CD4 (cell./ml)	423+/-35
* Amplicor HIV-1 Monitor test, version 1,5	

Les 35 patients étaient porteurs de VHB résistants à la lamivudine avec des mutations sur le site YMDD documentées et présentaient à l'inclusion dans le protocole, une charge virale VHB positive en Hybrid Capture (première génération) associée à une positivité de l'AgHBe dans 94,3 % des cas. En effet, deux patients présentaient un profil sérologique correspondant probablement à un virus B mutant pré-C [AgHBe (-) , Ac anti-HBe (+) et ADN VHB (+)].

Nous avons choisi cette population de patients afin d'obtenir un panel assez large de niveaux de réplication du VHB nécessaire à l'étude des performances du test HC II dans le suivi thérapeutique des porteurs chronique de VHB.

B. Méthodes :

Un total de 234 sérums obtenus à partir des 35 patients ont bénéficié parallèlement d'une détermination de la charge virale VHB par les tests Amplicor HBV Monitor (PCR) et Hybrid Capture II au rythme imposé par le protocole: J0 = niveau de réplication de base (avant mise en route du traitement) puis à S4, S8, S12, S16, S20, S24 et S28.

1. Amplicor™ VHB Monitor (Roche) :

a. Principes :

Ce test est une PCR compétitive quantitative dans lequel un même couple d'amorce permet une co-amplification d'ADN VHB (étalons titrés ou échantillons) et d'ADN de standard de quantification (Q.S) inclus dans le « MasterMix ». Le calcul de la charge virale des échantillons s'effectue en reportant le ratio HBV/QS échantillons sur la courbe d'étalonnage tracée à partir des ratios HBV/QS étalons titrés.

b. Procédures techniques :

La procédure suivie est celle du fabricant :

Une première étape de préparation et distribution du « MasterMix » qui contient les amorces (dont une est biotinylée), l'ADN polymérase (Amplitaq™), l'uracyl N glycosilase (AmpErase™), les dNTP (dont dUTP) et l'ADN du standard de quantification (QS).

La reconstitution du MasterMix s'effectue par l'ajout de 450 µl de MgCl₂ dans un tube de MasterMix, puis il faut en distribuer 75 µl dans chaque tube MicroAmp. Le kit est prévu pour effectuer des séries de 9, 25 ou 41 patients et chaque série d'amplification comprend l'amplification de 6 étalons à 0, 10, 10², 10³, 10⁴, et 10⁶ copies d'ADN VHB/ml et l'amplification des échantillons de patient : 1 amplification/patient.

La deuxième étape est l'extraction de l'ADN VHB des échantillons de plasma : il faut distribuer 25 µl de solution A (polyéthylène glycol) dans chaque tube et ajouter 50 µl de sérum ou plasma, centrifuger 5 minutes à 12500 g, puis éliminer le surnageant sans toucher au culot de précipitation de virus. Il faut ajouter 25 µl de solution B (soude) dans chaque tube et incubé 1h à 60° (étape de lyse alcaline NaOH des particules virales). Il faut ajouter 25 µl de solution C (HCl) dans chaque tube, puis incubé 10 minutes à 100° et centrifuger 15 minutes à 1500g à température ambiante (étape de neutralisation).

Il faut ensuite répartir dans les tubes d'amplification, 25 µl de chacun des six étalons prêts à l'emploi et 25 µl de chaque « ADN VHB patient extrait » (l'ADN VHB reste en suspension dans la phase aqueuse).

La troisième étape est l'amplification, les tubes d'amplification sont placés dans un thermocycleur 2400 ou 9600 et incubés pendant 2 minutes à 50° pour permettre à l'enzyme Uracyl-N-glycosilase (UNG ou AmpErase™) de catalyser la destruction des amplicons potentiellement contaminants (pour limiter les faux positifs). La PCR se poursuit ainsi : 5 minutes à 96°C, 30 cycles à 96°C pendant 20 secondes, 58°C pendant 20 secondes et 72°C pendant 30 secondes, 58°C pendant 20 secondes et 72°C pendant 10 minutes. Immédiatement après l'extraction des tubes d'amplification du thermocycleur, il faut ajouter dans chaque tube 100 µl de Binding Buffer puis incubé 10 minutes à température ambiante.

L'étape suivante est la détection des amplicons : distribuer 50 µl d'amplicons biotinylés double brin dans les cupules de la micoplaque de détection recouverte de streptavidine, incubé 15 minutes à température ambiante sur l'agitateur, puis il faut ajouter 50 µl d'éluant dans chaque cupule (sauf celle réservée au blanc substrat), puis incubé une minute à température ambiante, puis laver 5 fois pour éliminer les brins d'ADN non biotinylés simple brin . L'hybridation des amplicons à des sondes spécifiques (VHB ou QS) se fait par l'ajout de 50 µl de sonde VHB dans les cupules « VHB » et 50 µl de sonde QS dans les cupules « QS », ces sondes sont marquées au diNitroPhenyl (DNP) puis agiter 15 minutes à température ambiante et laver 5 fois pour éliminer les sondes non hybridées. Il faut ajouter 50 µl de conjugué (anti-DNP marqué à la phosphatase alcaline) dans toutes les cupules (sauf celles réservées au blanc substrat) puis laver 5 fois pour éliminer l'excès de conjugué.

Il faut ensuite distribuer à la pipette multicanaux 100 µl de substrat (PNPP/para-nitro-phenyl-phosphate) puis placer la plaque sur l'agitateur et démarrer le chronomètre puis lire la plaque à 405 nm à 4, 10, 30 minutes.

La dernière étape est le calcul des résultats qui est effectué à partir des ratios VHB/QS (étalon titré) puis les ratios VHB/QS échantillons sont calculés et reportés sur la courbe d'étalonnage on en déduit alors le nombre de copies mis en amplification . La charge virale d'ADN VHB patient/ml est calculée ainsi :

Charge Virale = nombre de copies VHB par réaction X facteur de dilution (40).

La charge virale est exprimée en nombre de copies d'ADN VHB/ml.

2. Digene HBV Test, Hybrid Capture II :

a. Comparaisons des performances analytiques du test Hybrid Capture II HBV DNA (seconde génération) versus Hybrid Capture HBV DNA :

Cette évaluation du test HC II avait été menée au sein du laboratoire de virologie du groupe hospitalier de la Pitié Salpêtrière en 1999 (par le Dr V.Thibault et V.Boutonnet) avant la commercialisation du test HC II (2000) afin d'évaluer les gains en terme de performances analytiques du test HC II par rapport à sa version précédente:

La technique Hybrid Capture II (HC II) effectuée en microplaque utilise le même principe d'amplification de signal que la version précédente en tube: Hybrid Capture (HC) c'est à dire une hybridation spécifique du génome de l'hépatite B puis une capture des hybrides avec détection secondaire par réaction chimioluminescente. Les principales évolutions entre les deux techniques se trouvent représentées dans le tableau suivant (tableau 5):

	Hybrid capture	Hybrid Capture II
Supports	Tubes	Microplaque (96 puits)
Incubation	3h50mn	3h15mn
Seuil	2,5 pg/ml ($0,7 \cdot 10^6$ copies/ml)	0,5 pg/ml ($1,42 \cdot 10^5$ copies/ml)
Gamme	4 points / 8 tests <i>Contrôle négatif : 2</i> <i>PS1 : 2</i> <i>PS2 : 2</i> <i>PS3 : 2</i>	5 points / 12 tests <i>Standard 1 : 3</i> <i>Standard 2 : 3</i> <i>Standard 3 : 2</i> <i>Standard 4 : 2</i> <i>Standard 5 : 2</i>
Contrôles internes	NON	OUI (2) PC2 & PC3
Procédure Ultra-sensible	NON	OUI
Seuil		0,017 pg/ml ($4,7 \cdot 10^3$ copies/ml)

Tableau 5 : Principales évolutions entre le test HC et la nouvelle version HC II

Il existe une procédure Ultra-Sensible (US) incluse dans le test HC II qui au moyen d'une étape préalable d'ultra-centrifugation des échantillons permet une augmentation de la concentration des particules virales d'un facteur 30.

Les limites analytiques des 3 tests (HC, HC II et Monitor (PCR)) sont figurées dans le tableau ci-dessous (tableau 6) :

test	SEUIL INFÉRIEUR		SEUIL SUPÉRIEUR	
	pg/ml	copies/ml	pg/ml	copies/ml
Hybrid Capture	2,5	$0,7 \cdot 10^6$	2000	$5,6 \cdot 10^8$
Hybrid Capture II	0,5	$1,42 \cdot 10^5$	6000	$1,7 \cdot 10^9$
Hybrid Capture II (US)	0,017	$4,7 \cdot 10^3$	200	$5,7 \cdot 10^7$
Monitor	nc	400	nc	10^7

nc : non communiqué

Tableau 6 : Gammes de linéarité de 3 tests commerciaux de quantification de l'ADN VHB

Les résultats de cette évaluation ont montré que la corrélation entre les deux techniques HC / HC II est excellente (coefficient de corrélation : 0,995). Le gain en sensibilité a permis de quantifier 9 sérums qui donnaient une réactivité limite ou négative avec la version HC précédente. Le gain en sensibilité obtenu par la technique HC II s'approche du seuil sensibilité de la technique Amplicor™ HBV Monitor™ (PCR). L'évaluation de la linéarité qui a été effectuée sur deux panels internationaux différents (BBI / Eurohep) (dont l'un comprenait deux génotypes) est très satisfaisante. L'étude des virémies basses (inférieures à 5.10^5 copies/ml) a montré le très bon comportement du test en méthode ultra-sensible. La technique HC II a montré une bonne reproductibilité aussi bien intra qu'inter-essais avec des coefficients de variation compris entre 5,6 et 22,9 %.

Cette nouvelle version du test de capture d'hybrides en microplaque fabriqué par la société Digene représente donc une nette amélioration par rapport au test précédent HC avec : un gain en sensibilité et l'accès à un protocole « ultra-sensible », l'inclusion de contrôles positifs calibrés, une meilleure reproductibilité, le format microplaque simple à manipuler, un temps d'incubation réduit permettant un gain de 35 minutes par rapport à la version précédente et le traitement de l'information directement par informatique.

D'autres études, qui ont évalué les performances analytiques (linéarité, précision, reproductibilité) du test HC II étaient en accord avec les résultats obtenus dans notre laboratoire (59, 60).

b. Principes :

Il s'agit d'un test d'hybridation moléculaire en microplaque avec amplification de signal par hybridation spécifique du génome du VHB puis capture et détection des hybrides par

réaction chimioluminescente. Ce test est utilisable sous deux formats, standard et ultrasensible avec des gammes de linéarités différentes (cf tableau 6), qui peuvent être utilisés ensemble au cours d'une même manipulation.

c. Procédures techniques :

La procédure suivie a été celle du fabricant :

Pour démarrer la manipulation, les échantillons, contrôles et calibrants doivent être conservés dans la glace et le rester tout au long de la manipulation.

30 µl de chacun des 5 standards, des deux contrôles et des échantillons patients sont distribués sur la microplaque (96 cupules) de distribution, puis 30 µl d'agent dénaturant sont distribués dans tous les puits et la plaque est placée sur un agitateur pendant 1 minute, puis incubée à 65°C pendant 30 minutes. La préparation des sondes HBV d'hybridation (HBV probe mix) se fait durant ce temps d'incubation. 30 µl d'HBV probe Mix sont ensuite distribués dans tous les puits de la microplaque qui est agitée pendant une minute puis incubée à 65°C pendant 60 minutes, c'est l'étape d'hybridation.

L'étape de capture d'hybride est ensuite effectuée en transférant 75 µl de chaque puits de la microplaque dans la microplaque de capture d'hybrides (coatée avec des anticorps anti-hybrid ARN-ADN) qui est agitée pendant 60 minutes à température ambiante. La solution de lavage peut être préparée pendant ce temps. Le liquide contenu dans chaque puit de la microplaque de capture d'hybride est retiré prudemment par aspiration avec une multipipette.

75 µl de réactif de détection **1** (conjugué phosphatase alcaline anticorps anti-hybrid ARN-ADN) sont distribués dans tous les puits, puis la microplaque est incubée à 20-25°C pendant 30 minutes, la microplaque est ensuite lavée six fois. 75 µl de réactif de détection **2** (CDP-Star™

=substrat chimioluminescent) sont distribués dans tous les puits, la microplaque est incubée pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

La microplaque est ensuite passée dans le luminomètre (DML 2000™Luminometer) et les résultats sont immédiatement traités par le système informatique auquel il est relié (PC système). Les résultats sont rendus en pg/ml et convertis par le logiciel (DML 2000™Software) en copies d'ADN VHB/ml.

V. RESULTATS :

A. Etude de la sensibilité du test Hybrid Capture II (version standard et ultrasensible) versus le test Amplicor VHB Monitor (PCR) sur les échantillons sélectionnés :

Les 35 patients ont été prélevés entre 3 et 8 fois au rythme d'une fois par mois après le début du traitement par adéfovir dipivoxyil et pendant 28 semaines. Nous avons sélectionné dans un premier temps, les 200 sérums qui avaient préalablement une charge virale $>10^5$ copies d'ADN VHB/ml en PCR (Amplicor HBV Monitor), correspondant au seuil inférieur de détection du test HC II (format standard) et nous avons déterminé la charge

virale VHB de ces 200 sérums en technique HC II dans son format standard uniquement. Dans un deuxième temps, nous avons testé les 34 sérums restants dont la charge virale VHB était inférieure à 10^5 copies /ml (en PCR) par le test HC II dans son format ultrasensible.

Les limites de linéarités et les critères d'interprétation des deux techniques sont rappelées dans les tableaux ci-dessous (tableau 7 et 8):

Interprétation Test	Hybrid Capture II (copies ADN VHB /ml)	Amplicor VHB Monitor (copies ADN VHB /ml)	Hybrid Capture II Ultra-sensible(US)
Négatif	$< 1.42.10^5$	< 400	$< 4.7.10^3$
Positif	$> 1.42.10^5$	>400	$> 4.7.10^3$

Tableau 7 : Critères d'interprétation des tests (HC II et PCR Monitor)

Test	Seuil inférieur (copies ADN VHB /ml)	Seuil supérieur (copies ADN VHB /ml)
Hybrid Capture II	$1,42.10^5$	$1,7.10^9$
Hybrid Capture II (US)	$4,710^3$	$5,7.10^7$
Amplicor VHB Monitor	$4,10^2$ * * seuil AFFSAPS : 10^3	10^7

Tableau 8 : Limites de linéarité des deux tests [HC II (+ US) et PCR Monitor]

- Répartition des valeurs obtenues (tableau 10 et 11) :

Hybrid Capture II	Amplicor VHB Monitor		Total
	Positif	Négatif	
Positif	201	0	201
Négatif	0	0	0
Total	201	0	201

Tableau 9 : Répartitions des résultats HC II et PCR (Monitor) sur 200 sérums

Hybrid Capture II Ultra-Sensible	Amplicor VHB Monitor		Total
	Positif	Négatif	
Positif	34	0	34
Négatif	0	0	0
Total	34	0	34

Tableau 10 : Répartition des résultats HC II format Ultra-Sensible et PCR 34 sérums (virémies basses)

Les charges virales (ADN VHB) ont été détectables dans tous les sérums analysés (n=234) par les deux tests HC II et PCR tout au long de la durée de l'essai thérapeutique. 36 sérums ont obtenus des valeurs de charge virale qui ont dépassé le seuil supérieur de linéarité du test PCR et qui ont nécessité une réanalyse après dilution. Par contre, la totalité des niveaux de charges virales détectées dans les 234 sérums étaient compris dans la gamme de linéarité du test HC II. Aucun sérum n'a eu de charge indétectable par l'une ou l'autre des techniques.

Les résultats ont donc été concordants pour les 234 sérums (100 %) analysés par les deux tests.

- Analyse statistique :

L'étude des corrélations a été effectuée par l'analyse de régression linéaire ($p < 0.0001$).

B. Etude de la corrélation des test Hybrid Capture II (standard et US) et Amplicor VHB Monitor (PCR) sur 234 sérums :

L'étude de la corrélation des techniques HC II (+ US) et Amplicor VHB Monitor a été effectué sur la totalité des 234 sérums provenant des 35 patients prélevés aux différents temps du protocole thérapeutique (figure 10) :

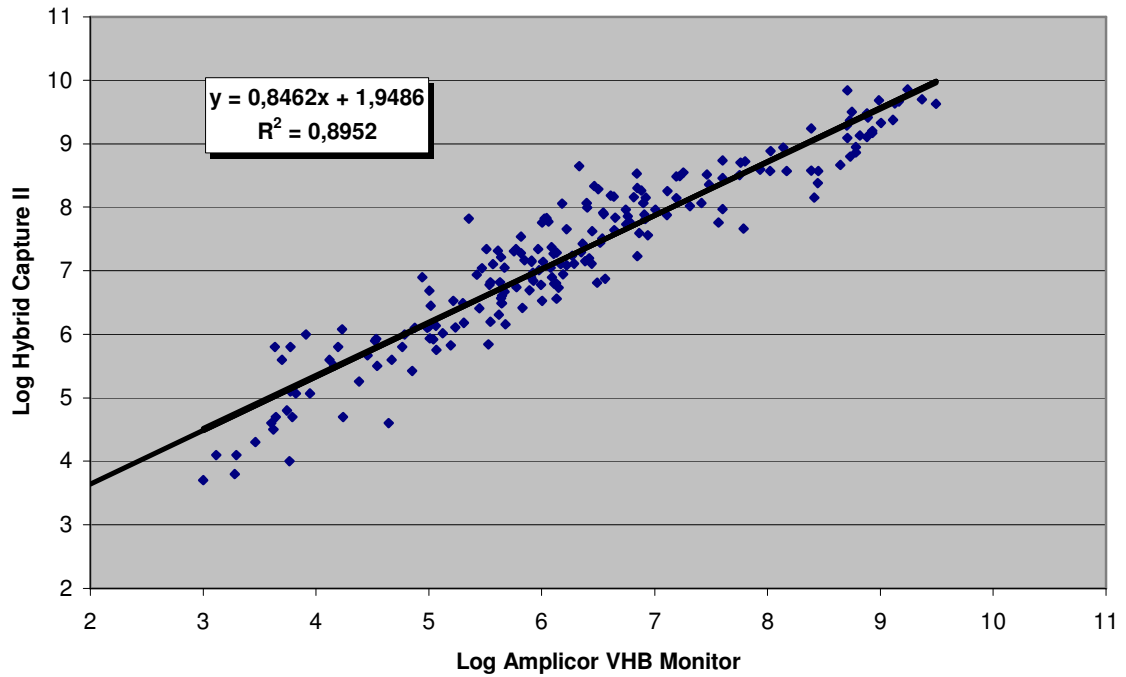


Figure 10 :Corrélation HC II et PCR sur 235 sérums

C. Etude de la corrélation des tests HC II et Amplicor VHB Monitor (PCR) sur 200 sérums ayant une charge virale VHB > 10⁵ copies/ml en PCR:

Nous avons étudié plus précisément la corrélation des deux tests dans la gamme de linéarité du test HC II (format standard) en comparant les charges virales déterminées par les deux techniques sur les 200 sérums dont la charge virale était préalablement $> 10^5$ copies/ml en PCR (figure 11) :

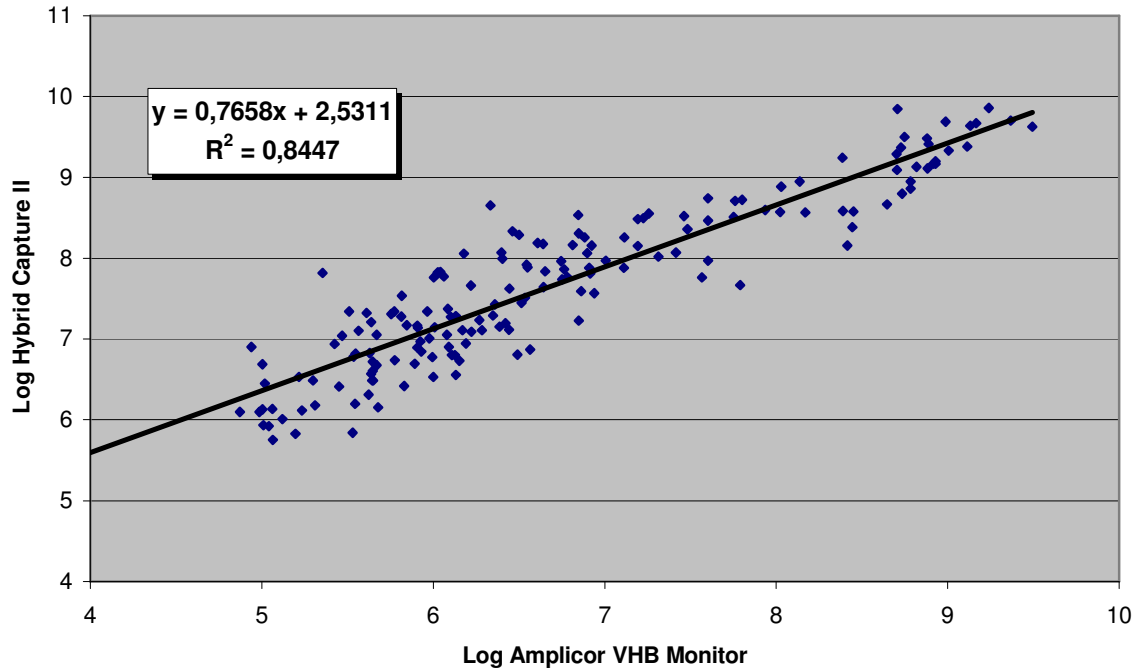


Figure 11 :Corrélation HC II et PCR sur 200 sérums (virémies élevées)

D. Etude de la corrélation des tests Hybrid Capture II ultra-sensible et Amplior VHB Monitor (PCR) sur 34 sérums ayant une charge virale basse ($< 10^5$ copies/ml en PCR) :

Nous avons sélectionné 34 sérums ayant des charges virales basses, préalablement déterminées par le test PCR : entre 10^3 et 10^5 copies/ml, afin d'évaluer les performances du format Ultra-Sensible du test HC II (figure 12) :

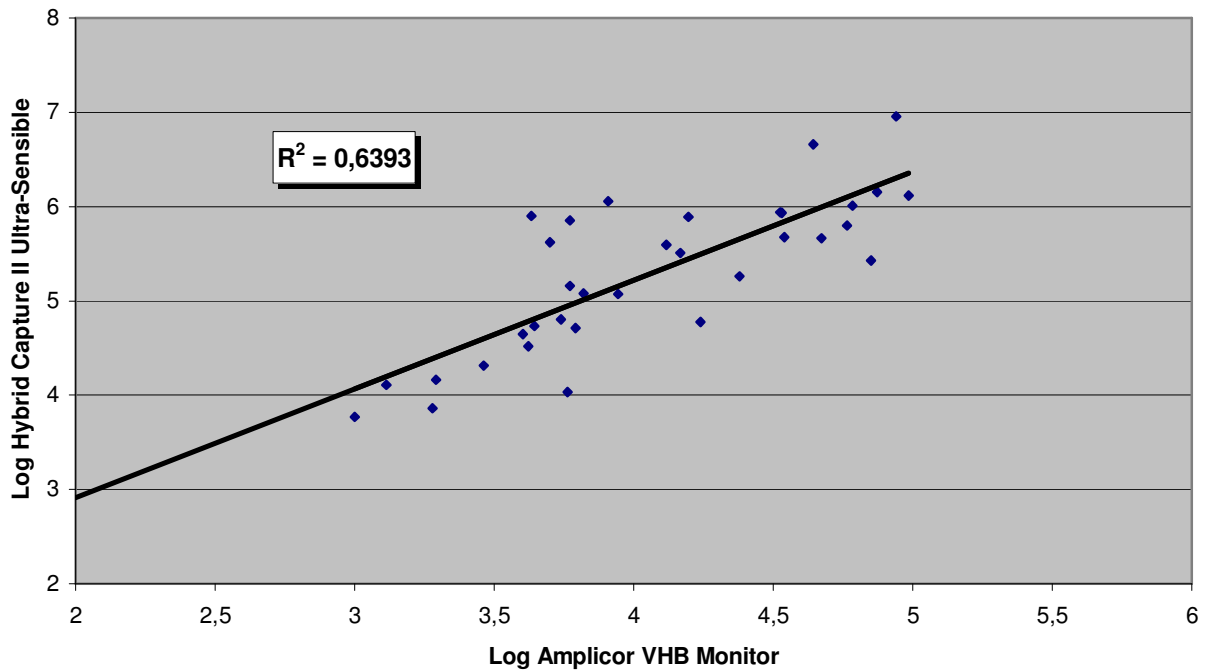
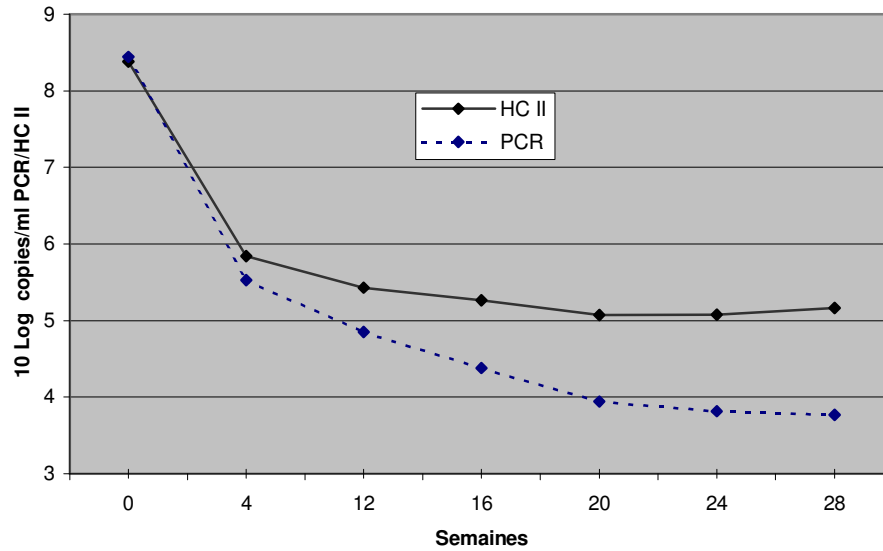


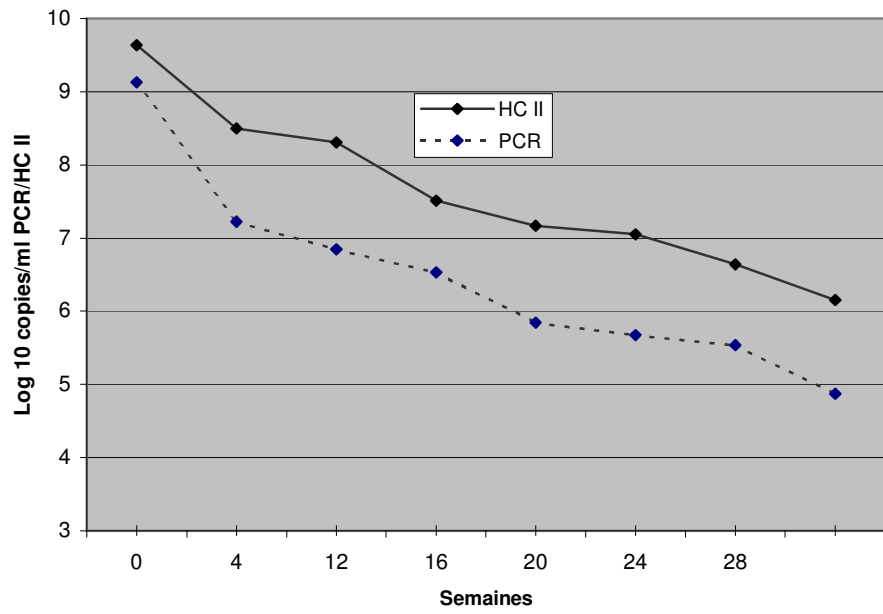
Figure 12 : Corrélation HC II Ultra-Sensible et PCR dans les basses valeurs sur 34 sérums

E. Performances du test Hybrid Capture II dans le suivi des malades traités :

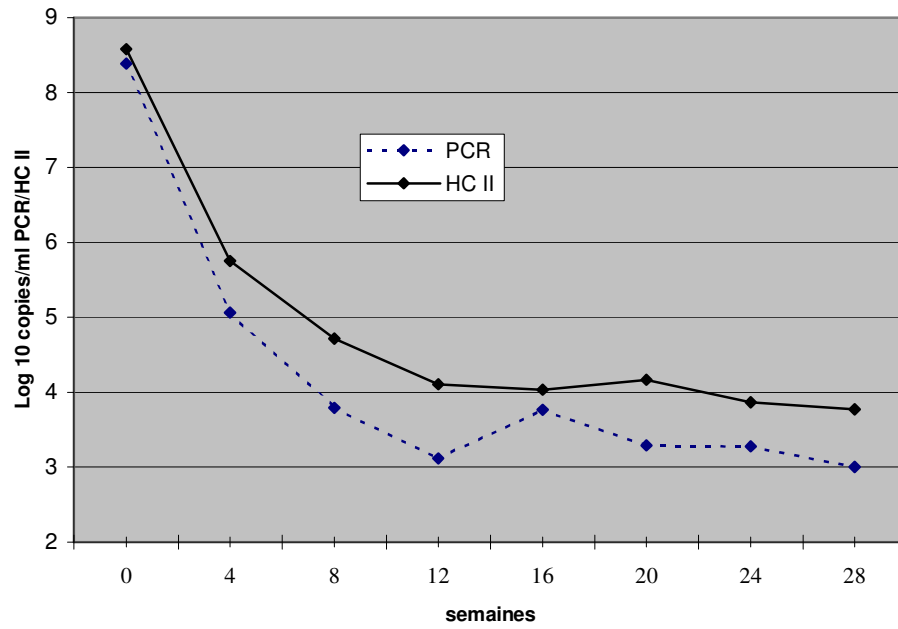
L'évolution de l'ADN VHB, sous traitement antiviral, de chacun des 7 patients qui ont bénéficié des 8 déterminations de charge virale par les deux tests durant la période de l'essai thérapeutique est représentée sur les graphes suivants :



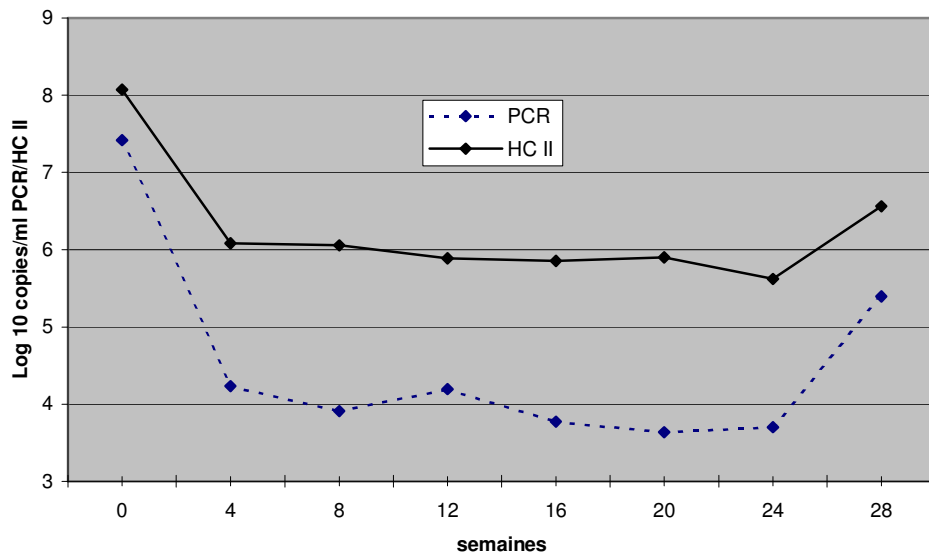
Graph 1 : suivi ADN VHB PCR/HC II patient 1 pendant 28 semaines de traitement



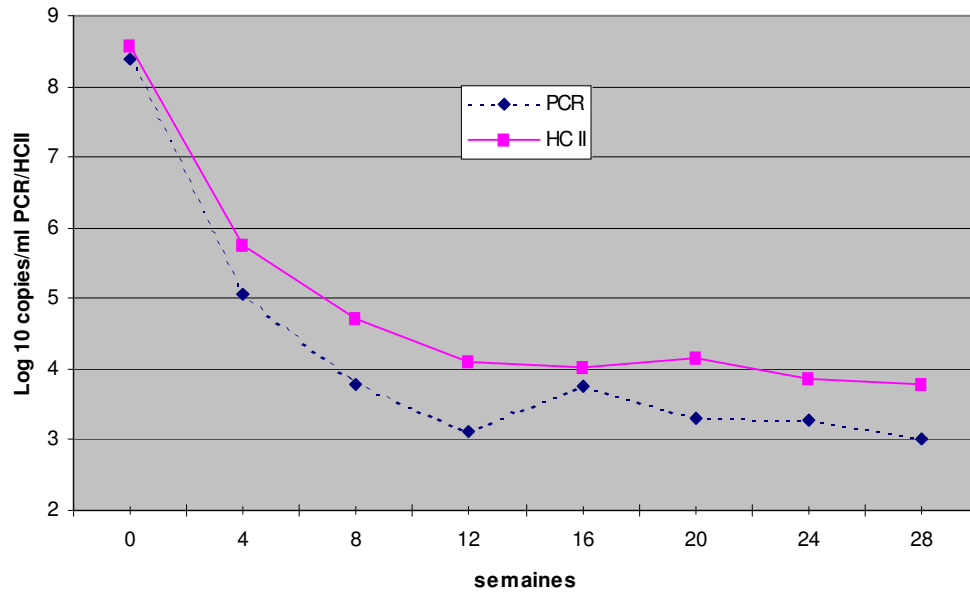
Graphe 2 : suivi ADN VHB PCR/HC II patient 2 pendant 28 semaines de traitement



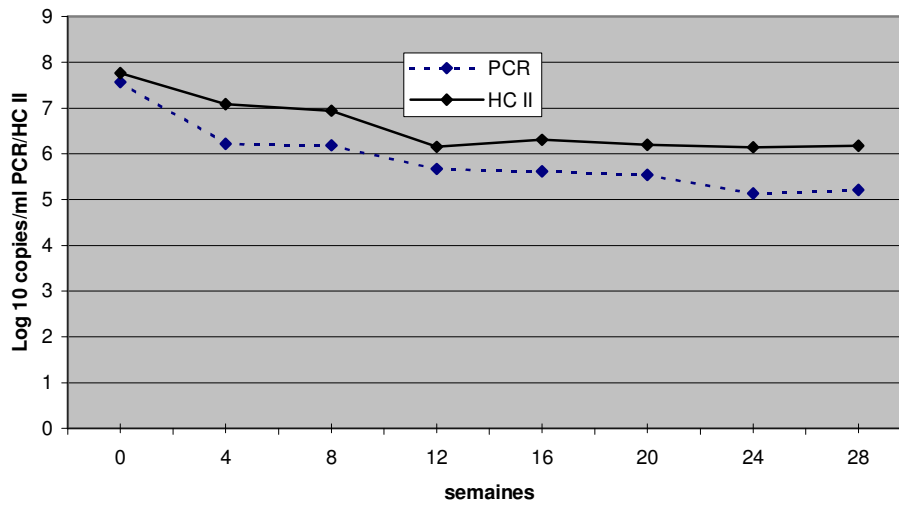
Graphe 3 : suivi ADN VHB PCR/HC II patient 3 pendant 28 semaines de traitement



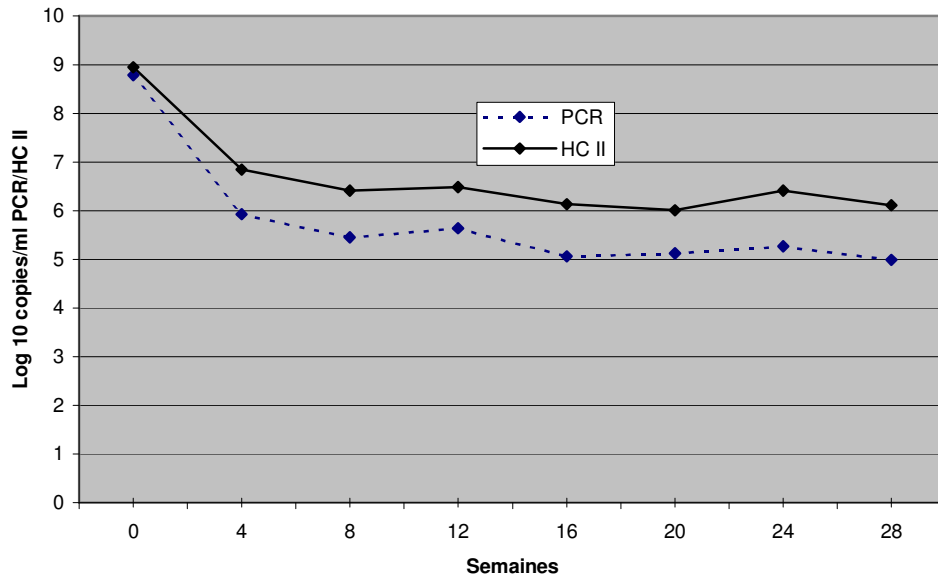
semaines de **Graph 4** : suivi ADN VHB PCR/ HC II patient 4 pendant 28 traitement



semaines de **Graph 5** : suivi ADN VHB PCR/HC II patient 5 pendant 28 traitement



de **Graphe 6** : suivi ADN VHB PCR/HC II patient 6 pendant 28 semaines
traitement



de **Graphe 7** : suivi ADN VHB PCR/HC II patient 7 pendant 28 semaines
traitement

VI . DISCUSSION :

L'ensemble de notre travail avait pour objectif d'évaluer les performances cliniques de la nouvelle version du test de quantification d'ADN VHB utilisant la technique d'hybridation

moléculaire en milieu liquide, Hybrid Capture II (HC II), dans le suivi des patients porteurs chroniques du VHB traités et dans les conditions de routine.

Notre étude a été menée sur une population de 35 patients, co-infectés VIH, porteurs chroniques du VHB (résistant à la lamivudine) inclus dans un protocole thérapeutique évaluant l'efficacité d'un nouvel analogue nucléosidique sur une période de 28 semaines.

Nous avons déterminé, en parallèle, les charges virales VHB sur un total de 234 sérums à différentes périodes du protocole, par le test HC II (+ ultra-sensible) et le test Amplicor VHB Monitor (PCR), qui nous a servi de test de référence dans cette étude.

Les performances analytiques du test HC II (sensibilité, spécificité, linéarité et précision) n'ont pas spécifiquement été évaluées dans notre travail dans la mesure où des études précédentes s'y sont déjà appliquées. Ces études ont révélé une nette amélioration des performances du test HC de seconde génération (HC II) en termes de sensibilité ($\times 10$) et de reproductibilité par rapport à sa version précédente Hybrid Capture en tube, (60 et étude interne au laboratoire *cf p57*). Les performances analytiques de la trousse HC II constatées dans une étude multicentrique récente sont les suivantes : spécificité de 98,7 %, une gamme de linéarité étendue couvrant 6 log ($1,4 \cdot 10^3$ à $4,7 \cdot 10^9$ copies/ml) et une excellente précision avec un coefficient de variation inter et intra-essai faible aux alentours de 13 % (59). Contrairement à sa version précédente, les performances analytiques et cliniques du test HC II sont supérieures (meilleure sensibilité dans la détection des virémies basses) à celles du test ADN branché (Chiron), couramment utilisé dans les laboratoires (62). En terme de praticabilité, la trousse Hybrid Capture II est aussi plus simple à utiliser et à un temps d'exécution court de 3 heures alors que le test d'ADN branché requiert une nuit d'incubation.

Le test Hybrid Capture II s'est révélé performant en terme de sensibilité (définie par la capacité de détecter et de quantifier l'ADN VHB dans le sérum des patients) dans cette étude puisque la charge virale a pu être déterminée dans les 234 sérums, avec une parfaite concordance des résultats (100 %) entre les tests HC II et Amplicor VHB Monitor (tableaux 9 et 10). En effet, l'étendue de la gamme de linéarité du test HC II, qui en incluant son format ultra-sensible couvre 6 log, a permis la détermination de la charge virale VHB des 234 sérums sans avoir recours à des dilutions d'échantillons. Par contre, 37 sérums ont obtenus des taux d'ADN VHB allant au-delà du seuil supérieur de linéarité de la PCR (2 log de moins par rapport à HC II) et ont été réanalysés après dilution au 1/100 dans du sérum AgHBs négatif.

Une bonne corrélation globale entre les deux tests ($r^2 = 0.89$, $n = 234$, $p < 0.0001$) a été observée (figure 10). Une des rares étude qui ait comparé ces deux trousse de quantification d'ADN VHB a montré également une corrélation significative entre ces deux tests (61).

Nous avons ensuite étudié la corrélation des tests HC II et PCR dans la gamme de linéarité du test HC II ($>10^5$ copies/ml ou « virémies élevées ») et nous avons également obtenu une bonne corrélation ($r = 0,85$, $n = 200$, $p < 0.001$) (figure 11). Pour les virémies basses ($<10^5$ copies/ml), nous avons utilisé le protocole ultra-sensible du test HC II et la corrélation obtenue avec la PCR a été moindre ($r^2 = 0.64$, $n = 34$, $P < 0.0001$) (figure 12). Ces résultats peuvent suggérer que le test HC II dans son protocole ultra-sensible présente de moins bonnes performances en termes de précision. L'étape préalable de concentration des virions par ultra-centrifugation des échantillons, à partir d'une prise d'essai de 1 mL, peut induire des variabilités de rendement de concentrations. De plus, les techniques qui utilisent l'amplification de cible (PCR) sont, dans leur concept même, plus performantes en

termes de sensibilité et de linéarité dans les valeurs basses que les techniques d'hybridation moléculaire avec amplification de signal (HC II).

Les résultats de notre étude ont montré les bonnes performances du test HC II dans le suivi des patients porteurs chroniques du VHB sous traitement. En effet, une diminution « significative » de la réplication virale (2 à 3 log), dès le premier mois de traitement a été constatée pour les patients 1, 3, 4, 5 et 7 (graphes :1, 3, 4, 5, 7); un « décrochage » plus progressif a pu être mis en évidence pour le patient 2 (graphe 2) ; une très bonne réponse au traitement pour le patient 3 (graphe 3) ; une réponse incomplète au traitement ont été observées pour le patient 6 (graphe 6) et une réascension de la charge virale à S 24 pour le patient 4 (graphe 4), suggérant l'apparition d'une résistance virale ou d'une non compliance au traitement. Les cinétiques des charges virales VHB déterminées pour chaque patient, sur une période de 28 semaines, par les deux tests étaient sensiblement les mêmes. Le suivi précis de l'évolution des charges virales des patients sous traitement antiviral a donc pu se faire de façon identique par les tests HC II et PCR.

Nous avons observé que l'ensemble des valeurs de charges virales obtenues avec le test HC II étaient toutes « surestimées » (0.5 à 2 log de plus) par rapport à celles obtenues par la PCR. Cette différence est particulièrement flagrante lorsque nous analysons le suivi des charges virales de chaque patient. Nous nous apercevons que la différence entre les virémies est faible pour les fortes valeurs de charge virale (virémies à J0), puis augmente au fur et à mesure de la diminution de la charge virale. Nous n'avons pas eu le temps d'investiguer plus profondément ces différences qui soulèvent le problème du suivi longitudinal des patients. En effet, l'absence de standardisation des techniques moléculaires de quantification de l'ADN VHB doit faire proscrire le suivi d'un patient par

des méthodes différentes, même si celles-ci ont des performances équivalentes. En effet, une stratégie qui pourrait être fondée sur un suivi où la détermination de la charge virale aux différentes périodes de la maladie se ferait avec des trousse différentes, ne permettrait pas d'apprécier fidèlement l'évolution de la réplication virale. En effet, une différence moyenne de 1,042 log a été constatée parmi les résultats obtenus par les deux techniques HC II et PCR (des différences allant jusqu'à 2 log ont été observées pour le patient 4). Par contre, l'utilisation d'une technique qui permet la détermination de la charge virale dans une gamme de linéarité étendue (HC II par exemple) peut tout à fait être utilisée en première intention dans le suivi des patients. Lorsque les virémies ne sont plus appréciables par cette première technique, le recours à une technique plus sensible (PCR par exemple) capable de détecter des réplifications faibles peut alors être indiquée. Par ailleurs, les deux inconvénients de la PCR (mis à part son coût) sont le risque de contamination des échantillons (d'autant plus élevé lorsque les virémies sont importantes) et le manque de reproductibilité. Dans cette logique, l'utilisation en premier lieu d'un test basé sur l'amplification de signal comme la trousse HC II, parfaitement adapté sur le plan pratique pour une utilisation en laboratoire de virologie de routine, paraît être indiquée. Un standard international de calibration pour les techniques moléculaires de quantification de l'ADN du VHB est en cours d'évaluation (53). Cet étalon devrait permettre la standardisation des tests moléculaires de quantification de l'ADN VHB comme cela a été récemment fait pour l'hépatite C (U.I/ml) (63). Les charges virales pourront ainsi être comparées, quelque soit le test moléculaire utilisé, puisqu'elles seront exprimées dans une même unité internationale.

Notre étude a été menée sur une période courte de 6 mois, ce qui ne nous a pas permis d'obtenir des virémies inférieures au seuil de détection du test HC II. En effet, rétrospectivement et au delà de nos six mois d'étude, nous avons observé que certains

patients ont présenté des charges virales indétectables en HC II et détectables par PCR. Cela indique, qu'un test plus sensible est indispensable pour s'assurer de l'efficacité d'un traitement et/ou dépister une résistance virale au traitement. Parmi les 35 patients que nous avons étudié, deux patients ont présenté un profil sérologique de virus B mutant-Pré C (AgHBe -, Ac anti-HBe + et ADN +) et il serait intéressant d'évaluer les performances du test HC II dans la détection des réplifications virales des mutants pré-C sur un plus grand nombre de patients. En termes de sensibilité, les tests HC II et PCR présentent des seuils inférieurs de détection relativement bas : $4,7 \cdot 10^3$ et 10^3 copies/ml respectivement, mais pour une prise d'essai de 1 mL de sérum suivie d'une étape de concentration des virions par ultra-centrifugation du sérum pour le test HC II et une prise d'essai uniquement de 50 μ L pour la PCR. Cela indique la supériorité du test PCR en termes de sensibilité. Nous avons travaillé sur des sérums de malades et il aurait été intéressant d'étudier la linéarité de chacun des deux tests par des dilutions en série d'un échantillon qui présenterait une forte virémie. Les gammes de linéarités des tests moléculaires sont souvent évaluées par l'utilisation de standards de calibration (BBI, Eurohep) qui donnent de bons résultats en termes de linéarité mais dont la composition diffère de celui d'un sérum.

L'ensemble des résultats de notre étude a montré une grande homogénéité des tests Hybrid Capture II et Amplicor VHB Monitor (PCR) dans la quantification de l'ADN VHB. Ces deux techniques présentent l'inconvénient d'impliquer de nombreuses manipulations (dilution, ultra-centrifugation) qui sont autant de facteurs de risque de contamination d'échantillons et d'erreurs de manipulation. Le test HC II est simple à manipuler (format microplaque), a un temps d'exécution réduit à 3 heures parfaitement adapté à un laboratoire de virologie de routine, contrastant avec la lourdeur du plateau technique inhérent aux techniques d'amplification géniques (pièces séparées, risque de contamination).

Notre étude nous conduit à penser que le test Hybrid Capture II est une alternative intéressante au test Amplicor VHB Monitor (PCR). Ses performances analytiques et cliniques associées à sa simplicité et sa durée limitée d'exécution en font un outil fiable, parfaitement adapté à un laboratoire de virologie de routine, et il peut être utilisé en première intention pour la quantification de l'ADN VHB dans le suivi des patients porteurs chroniques du VHB traités ou non.

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

La quantification de l'ADN du VHB (charge virale) est aujourd'hui un outil indispensable à la prise en charge médicale de l'infection par le virus de l'hépatite B. Elle permet une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection (virus non cultivable). Elle permet également de surveiller objectivement l'efficacité des molécules antivirales (développement important des chimiothérapies). Elle présente un caractère prédictif d'évolution de la maladie et peut ainsi permettre d'anticiper une intervention thérapeutique, voire de sélectionner un traitement. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que les marqueurs biochimiques (amino-transférases) et histologiques (ponction biopsie hépatique) sont indispensables pour l'évaluation de l'activité de la maladie hépatique.

Les trousse de quantification de l'ADN VHB actuellement disponibles sont nombreuses et présentent d'excellentes performances analytiques. Nous avons ainsi évalué dans cette étude les performances d'une nouvelle trousse de quantification d'ADN VHB basée sur l'hybridation moléculaire en milieu liquide, Hybrid Capture II, et nous avons montré qu'elle pouvait être utilisée dans les laboratoires de virologie de routine au même titre que la trousse Amplicor VHB Monitor dans le suivi des patients porteurs chroniques du VHB sous traitement antiviral.

Aujourd'hui, avec le développement des techniques d'amplifications géniques toujours plus sensibles des problèmes d'interprétations et de conduites à tenir peuvent se poser, en particulier la détermination de virémies extrêmement basses. Dans cette logique, les

auteurs s'accordent à penser qu'il est indispensable d'évaluer précisément la place de la charge virale et d'essayer de déterminer un « seuil clinique » de quantification de l'ADN VHB ou cut-off. La mise en place de la standardisation des tests moléculaires devrait faciliter l'établissement d'un seuil clinique de quantification de l'ADN VHB au-dessous duquel il n'y aurait pas d'évolution de la maladie hépatique et ainsi de repreciser la place de l'éradication virale.

Les futures techniques de quantification de l'ADN VHB devront avoir une plus grande sensibilité et une gamme de linéarité plus étendue. Dans cette optique, la PCR en temps réelle semble être la candidate idéale (64) et des études sont encore nécessaire pour définir sa place en pratique clinique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 – Hollinger .F.B.1996 .Hepatitis virus.In :Fields B.N, *et al.*, eds .*Fields Virology*.
Philadelphie :Lippincott-Ravern Publishers, 2739-2807
- 2 – Blumberg .B.S, Gerstley. B.J.S., Hurgerford. D.A, LondonW.T., Sutnick A.I.1967. A
serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrom, leukemia and hepatitis. *Ann Intern
Med* 66 :924-931
- 3 – Prince .A.M.1968. An antigen detected in te blood during the incubation period of serum
hepatitis. *Proc Nath Acad Sci USA* 60 : 814-821
- 4 – Maupas .P., Goudeau A., Cousaget P., Drucker J., Bagros P.1976. Immunization against
hepatitis B in man. *Lancet* : 1367-1370
- 5 – Shih .C., *et al.*1987. Tights clustering of human hepatitis B virus integration site in
hepatomas near a triple strand region .*J.Virol* 61 :3491-3498
- 6 – Kim. C.M., Koike .K., Sacko. J., Miyamura T., Jay G,1991.HB X gene of hepatitis B
virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351 :317-320
- 7 – Zoulim F. Hépatite B : réponse antivarale de l'organisme, *mt* vol.4 n°1, janvier 98 .p13-19
- 8 – Denis. F., Ranger. S., Les virus transmissibles de la mère à l'enfant .p 90-91
- 9 – Lee .W.M. Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.*,1997,337, :1733-1745
- 10 – Wright T.L., Lan J.Y.N.1993.Clinical aspect of hepatitis B virus infection. *Lancet*
342 :1340

- 11 – Zoulim. F., Trepo C.,1996.Virologie de l'hépatite B. *Encyclopédie Medico-chirurgicale, Hepatology 7-015-B-30,p 19*
- 12 – Berneau. J.,*et al.*1986. Multivariate analyses of prognostic factors in fulminant hepatitis B. *Hepatology 6* : 648-651
- 13 – Sarraco .G., Macagno. S., Rosina. F., Antinori. S.,Rizzeto M.1988. Serologics markers with fulminant hepatitis in persons positive for hepatitis B surface antigen. A worldwide epidemiology and clinical survey. *An Intern Med 108* :380-383
- 14 – Zylberberg. H., Pols.-Histoire naturelle de l'infection virale B. *Medecine thérapeutique*,1998,4,21-29
- 15 – Tassopoulos .N.C., Papaevangelou .G.J., Sjogren. M.H., Guerin. J.L., Purcell .R.H.1987. Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greeks adults. *Gastroenterology 92* :1844-1850
- 16 – Marcellin. P. Histoire naturelle et traitement de l'hépatite virale B. *In* : Trepo. C., Valla D. progrès en hépatologie : hépatites virales, p :33-49.Paris, Edition Doin, 1993
- 17 – Weresberg .J., *et al* .1984.Survival in chronic hepatitis B. *Ann Intern Med 101* :613-616
- 18 – Liaw .Y.F., Tai D.I., Chu .C.M., Chen .T.J.1988. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis : a prospective study. *Hepatology 8* :493-496
- 19 – Fattowitch. G., *et al* .1991. Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis B.*Gut 32* :294-298
- 20 – Liaw .Y.F.,Tai .D.I.,Chu .C.M., Chen. T.J.1989. Natural course after te development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis : a prospective study. *Liver 9* :235-241
- 21 – Brechot. C.1987. Hepatitis B virus (HBV) and hepatocellular carcinoma. HBV DNA status and its complications. *J Hepatol 312* :270-276
- 22 – Govindarajan .S., Chin K.P.,Redeker. A.G., Peers R.L.1984. Fulminant B viral hepatitis : Role of delta agent. *Gastroenterology 81* :992-997
- 23 – Smedile. A., *et al.*1981.Infection with te delta agent in chronic HbsAg carriers.*Gastroenterology 81* :992-997
- 24 – Horvath. J., Raffanti S.P.1994. Clinical aspects of te interactions between human immunodeficiency virus and te hepatotropic viruses.*Clin .infect .Dis* :339-347
- 25 – Carman .W.F., *et al.*1990. Vaccine-induced mutant of hepatitis B virus. *Lancet 336* :325-329
- 26 – Marcellin. P. Traitement pharmacologique de l'hépatite B. *mt vol.4 n°1,janv .1998* :31-35

- 27- Lai.C.L., Chine.R.W., Leung.N.W.Y. *et al.* A one year trial of lamivudine for chronic hepatitis B.N
Engl J Med 1998 ; 339 : 61-68
- 28- Dienstag.jl., Schiff.e.,Wright T *et al.* Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in te United States *N Engl J Med* 1999 ; 341 :1256-63
- 29 – Allen. M.J,Deslauriers H., Andrews C.W *et al.* Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998 ; 27 :1670-1677
- 30 – Zoulim .F., Trepo. C. Nucleotides analogues in te traitement of chronic viral hepatitis .Efficiency and complications. *J. Hepatology.* 1994 ; 21 :142-144
- 31 – Zoulim. F,Trepo C.Drug therapy for chronic hepatitis B : antiviral efficacy and influence of hepatitis B virus polymerase mutations on te outcome of te therapy. *J .Hepatology* 1998 ; 29 :151-168
- 32 – Chang .T., Lai.C., Liaw.Y.,Guan,R.,Lin.S., Lee.C., Ky.N. ,Leung.N., Nicolls.G.Pearce.M., and Dent.J .2000. Incremental increases in HbeAg seroconversion and continued ALT normalization in Asian chronic HBV patients treated with lamivudine for four years, *Antiviral therapy* 5,44
- 33 – Liaw.Y.F., Leung.N.W., Chang. T.T., Guan.R., Tai.D.I.,Ng.K.Y., Chien.R.N., Dent.J., Roman.L
Edmundson, S., and Lai.C.L. 2000. Effects of extended lamivudine therapy in asians patients in
With chronic hepatitis B .*Gastroenterology* 119,172-180
- 34 – Benhamou.Y., Bochet.M., Thibault.V., Di Martino.V., Caumes.E., Bricaire.F., Opolon.P.,
Katlama.C., and Poynard.T. 1999 Long term incidence of hepatitis B virus resistance to lamivudine
In human immunodeficiency virus infected patients.*Hepatology* 30, 1302-1306
- 35 – Pawlotsky.J.M., Bouvier-Alias.M.,Diagnostic biologique des hépatites B et C : techniques et indications. *Spectra Biologie.* Vol.19 n° 110.Mai 2000 :36-42
- 36 – Cadranel .J.F., Caron. C., Collot. G, Van Botten. C., Dumontel P.-Hépatite B :épidémiologie
histoire naturelle, biologie et surveillance du traitement.*Path .biol.* 1999, 47, n°9,917-927
- 37 – Roingard.P., Dubois.F., Biologie du virus de l'hépatite B.*mt* vol.4 n°1, janv.98 :5-11
- 38 – Werner. BG., O'Connell.A., Summers.J., Association of e antigen with Dane particule DNA in sera from asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen.*Proc Nath Acad Sci USA*
1977, 47 : 2149-2151

- 39 – Villeneuve. J.P., Desrochers M., Infante-Rivard L., Willems.B., Raymond.G., Boursier.M., A long term follow-up study of asymptomatic hepatitis B surface antigen positive carriers in Montreal. *Gastroenterology*, 1994, 106, 1000-1005
- 40 – De Franchis .R., Meucci.G., Vecchi.M., Tatarella.M.,Colombo.M., Dell Nino.E., *et al.* The natural history of asymptomatic B surface antigen carriers.*Ann .Intern .Med* .1993, 118, 191-194
- 41 – Chu.C.M., Karayannis.P., Fowler.M.J.F., Monjardino.J., Liaw.Y.F.,Thomas H.C.,1985. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan : studies of hepatitis B virus DNA in serum.*Hepatology* 5 : 431-434
- 42 – Realdi.G. ,*et al* .1980 .Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-Hbe in chronic hepatitis B virus infection.*Gastroenterology* 79 :195-199
- 43 – Agut.H., Calvez.V., Barin.F., Quantification des virus .*Virologie*,vol.1,n°spécial,nov.1997 :20-30
- 44 – Rizzeto.M., Shish JWK, Verne.G.,Guerin JL. A radioimmunoassay for HBcAg in the sera of HbsAg carriers : serum HBcAg, serum DNA polymerase activity and liver HBcAg immunofluorescence as markers of chronic liver disease. *Gastroenterology* 1981 ; 80 :1420-1427
- 45 – Pontisso.P., Chemello.L., Fattovich.G., Alberti.A., Realdi.G., Brecho.C., Relationship between HBcAg in serum and liver and HBV replication in patient with HbsAg positive chronic liver disease. *J. Med. Virol* .1985 ; 17 : 145-152
- 46- Brechot.C., Scotto.J., Charnay.p. *et al* Detection of hepatitis B virus in liver and serum : a direct appraisal of the chronic carriers states *Lancet* 1981 ; ii :765-768
- 47- Scotto.j., Hadchoual.H., Hey.C. ; Yvart.J., Tiollais.P., Brechot.C. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization : comparaison with results for other viral markers. *Hepatology* 1993 ; 3 :279-84
- 48- Zaaijer.HL., Borg.F.T., Cryupers HTM.,Hernus.MCAH.,Lelie PN. Comparaison of methods for detection of hepatitis Bvirus DNA. *J Clin Microb* 1994 ; 32 :2088-91
- 49 – Roingard.P.,La charge virale dans l'infection par le virus de l'hépatite B.*Virologie*,vol.1, n° spécial, nov.1997 :55-61
- 50- Pawlotsky, J. M., Bastie, A., Lonjon, I., Remire, J., Darthuy, F., Soussy, C. J., and Dhumeaux, D. (1997). What technique should be used for routine detection and quantification of HBV DNA in clinical samples? *J Virol Methods* 65, 245-53.
- 51- Pawlotsky, J. M., Bastie, A., Hezode, C., Lonjon, I., Darthuy, F., Remire, J., and Dhumeaux, D. (2000). Routine detection and quantification of hepatitis B virus DNA in clinical laboratories: performance of three commercial assays. *J Virol Methods* 85, 11-21.

52- Habersetzer. F., Zoulim. F., Jusot. JF., Zhang. X., Trabaud. MA., Chevallier. P., Chevallier. M., Ahmed. SNS., Sepetjan. M., Comanor.J., Minor.J., Trepot. C linical evaluation of te branched DNA assay for hepatitis B lacking hepatitis B e antigen and treated with interferon α Journal Of Viral Hepatitis, 1998 ; 5 : 407-414

53- Saldanha. J., Gerlich. W., Lelie.N., Dawson.P.,Heermann.K., Heath.A., et te WHO Collaborative Study Group An international collaborative study to establish a World Organisation international standard for hepatitis B virud DNA nucleic acid amplification techniques *Vox Sanguinis* 2001; 80 :63-71

54- Perillo. R., Schiff.ER., Danis. GL., et al. A randomized controlled trial of interferon α -2b alone and after prednisone withdrawal for te treatment of chronic hepatitis B N Engl J Med 1990; 323 :295-301

55- Dienstag.JL., Perillo.RP., Schiff.E., Bartholonew.M.,Vicary.C., Rubin.M., A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1995 ; 333 :1657-61

56- Fong.TL.,Aksiadis.EA.,Gavindarajan.S.,Valinbuck.B., Redecker.AG., Serum hepatitis B viral DNA in acute viral hepatitis *Ann Intern Med* 1989 ; 110 :936-937

57- Hodinka, R. L. (1998). The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. *Clin Diagn Virol* 10, 25-47.

58- Berger.AM., Preiser.W., Doerr.HW., Te role of viral load determination for te management of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Virol* 2001 ; 20 : 23-30

59- Niesters, H. G., Krajden, M., Cork, L., de Medina, M., Hill, M., Fries, E., and Osterhaus, A. D. (2000). A multicenter study evaluation of the digene hybrid capture II signal amplification technique for detection of hepatitis B virus DNA in serum samples and testing of EUROHEP standards. *J Clin Microbiol* 38, 2150-5.

60- - Chan, H. L., Leung, N. W., Lau, T. C., Wong, M. L., and Sung, J. J. (2000). Comparison of three different sensitive assays for hepatitis B virus DNA in monitoring of responses to antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 38, 3205-8.

61- Poljak, M., Marin, I. J., Seme, K., Brinovec, V., Maticic, M., Meglic-Volkar, J., Lesnicar, G., and Vince, A. (2001). Second-generation Hybrid capture test and Amplicor monitor test generate highly correlated hepatitis B virus DNA levels. *J Virol Methods* 97, 165-9.

62- Ho, S. K., Chan, T. M., Cheng, I. K., and Lai, K. N. (1999). Comparison of the second-generation digene hybrid capture assay with the branched-DNA assay for measurement of hepatitis B virus DNA in serum. *J Clin Microbiol* 37, 2461-5.

63- Pawlotsky JM., Bouvier-Alias M., Hezode C., Darthuy F., Remire J and Dhumeaux D
Standardieation of hepatitis C Virus RNA quantification *Hepatology* 2000 Vol. 32 n°3

64- Abe. A., inoue. K., Tanaka. T., Kato. J., Kajiyama.N., Kawaguchi. R., Tanaka.S.,
Yoshiba.M., and Kohara. M. Quantification of hepatitis B virus genomic DNA by real-time
detection PCR *Journal of Microbiology* 1999, vol 37 n°9 : 2899-2903