

Le patient positif pour les anti-HBe à transaminases normales ; diagnostic du portage asymptomatique et de l'infection par un mutant Pré-C



Christian TREPO

HOTEL DIEU – 69288 LYON et INSERM U.271

Le patient positif pour l'antigène HBs et l'antigène Hbe, selon le génotype viral et l'existence ou non de mutations Pré-C, a un risque de réactivation et/ou de progression vers la cirrhose et le CHC très différent. Ce risque est important en cas de mutation Pré-C alors qu'il est très faible, voire nul, en l'absence de co-facteur chez un porteur sain d'antigène HBs.

Six points essentiels

1 - Le VHB n'est pas cytopathique : les lésions sont à médiation immune cellulaire et l'histoire naturelle de l'infection classique due au virus sauvage évolue en trois phases successives :

- Une phase de tolérance immune avec répllication forte AgHBe sans lésions.
- Une phase d'élimination virale, immunologique, de durée et intensité variable, avec diminution de l'ADN VHB et augmentation des ALT ainsi que des lésions.
- Une phase d'inhibition de la répllication, plus ou moins complète ou définitive, avec intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire, avec ou sans séquelles hépatiques.

La séroconversion anti-HBe est le résultat de la clairance immune du VHB.

L'immunité anti-HBe ainsi établie empêche les réactivations mais peut aboutir à sélectionner des mutants d'échappement Pré-C (-), produits par les hépatocytes qui n'expriment plus l'AgHBe et échappent ainsi aux processus d'immunocytotoxicité.

2 - La variabilité génomique du VHB, bien que moindre que celle du VIH ou VHC, explique l'existence

- a - de 7 génotypes A, B, C, D, E, F, G, qui conditionnent les mutations du génome viral ;
- b - de fréquentes mutations dont les plus habituelles dans l'histoire naturelle siègent dans la région Pré-C qui devient inactive (-) ;
- c - de la présence simultanée de plusieurs populations virales sauvages et mutées chez un même malade.

3 - Il existe deux mécanismes moléculaires responsables de l'inactivation fonctionnelle = Pré-C (-) :

- Soit création d'un stop au niveau du codon 28 par mutation ponctuelle en position 1896, ce qui abroge la production d'AgHBe et s'observe surtout pour les génotypes de B à E et notamment le D, prévalent dans le pourtour méditerranéen.
- Soit mutations dans le promoteur Pré-C, double mutation ponctuelle en position 1762/64 qui réduit la synthèse de l'AgHBe, ce qui s'observe aussi bien pour le génotype A que pour les autres (B à E)

4 - Ces mutations Pré-C(-) ont des conséquences clinico-biologiques :

- Elles invalident la valeur pronostique favorable de la séroconversion anti-Hbe ;
- Réduisent le niveau de répllication du VHB ;
- Altèrent profondément l'histoire naturelle de l'hépatite B ;
- Compliquent l'évolution, le diagnostic et le traitement ;
- Ne changent pas la nature non cytopathique des virus ni la pathogénie à médiation immune de la maladie.

Hépatites virales

5 – Si bien qu'à un instant donné le profil AgHBs/Anti-HBe/ALAT=N peut avoir une signification ambiguë que seule l'évolution tranchera.

6 – Deux alternatives évolutives possibles :

6 a – S'il s'agit d'une infection par VHB sauvage :

- Les ALAT restent normales ;
- L'ADN du VHB reste indétectable par les méthodes classiques, y compris le bDNA ou de titre faible en PCR ;
- L'ADN du VHB est intégré dans le génome hépatocytaire ;
- Si la biopsie est normale, il s'agit d'un porteur sain d'AgHBs.

6 b – S'il s'agit d'une infection à VHB avec mutation(s) Pré-C(-) Il s'agit d'une phase de quiescence entre des poussées évolutives successives plus ou moins espacées et caractérisées par :

- des élévations récurrentes, voire cycliques, des ALAT, parfois intenses ;
- la possibilité de manifestations symptomatiques et/ou biologiques plus ou moins importantes, pouvant parfois générer une insuffisance hépatocellulaire ;
- l'augmentation de la virémie > 10⁵Eg
- des lésions histologiques plus ou moins sévères : nécrose / inflammation / fibrose.

EN PRATIQUE, QUAND SOUPÇONNER LA MUTATION PRÉ-C ?

La mutation Pré-C est très probable si :

- L'anamnèse révèle des élévations récurrentes ou des fluctuations des ALAT
- L'examen clinique suggère une hépatopathie (hépatomégalie et splénomégalie, angiomes, érythrose palmaire) ;
- l'imagerie le confirme, à fortiori s'il existe une HTP ;
- La biologie révèle une augmentation des Ig, GGT et acide hyaluronique
- La virologie :
 - ADN du VHB > 10⁵
 - AgPréS est élevé, PréS/HBs > 10%
 - Anti HBc IgM (test ultrasensible) positif
 - L'histologie révèle une hépatite chronique et/ou une cirrhose plus ou moins active
 - L'AgHBc est détectable avec localisation cytoplasmique

La preuve formelle de la mutation est moléculaire

La mutation doit être soupçonnée à priori :

- Si infection ancienne sporadique chez un sujet issu du bassin méditerranéen et à fortiori d'Afrique ou d'Asie
- N'ayant pas la preuve de transaminases normales à plusieurs examens répétés avec ADN du VHB indétectable dans son dossier ou à l'anamnèse.

La mutation Pré-C(-) peut être éliminée si

- Contexte évocateur d'une infection plus ou moins récente, bien identifiée (infirmière, transmission sexuelle).
- Sujet du nord de la France, non issu de l'immigration
- Preuve de transaminases antérieures normales à plusieurs reprises et biologie hépatique normale.
- Et/ou ADN VHB indétectable (PCR exceptée)
- Anti-HBc IgM ultrasensible négatif et préS/Ag HBs < 5%- Histologie hépatique normale
- Pas d'Ag HBc détectable dans le foie ou, exceptionnellement, quelques très rares noyaux

Les ambiguïtés du profil agHBs / antiHBc / ALT normales

Les manifestations cliniques de l'infection à VHB sont très variables et notamment l'évolution. Celle-ci est dominée par le risque de passage à la chronicité, fonction de l'âge puisqu'elle est de 90% dans la première année de la vie et de 10% à l'âge adulte. Ceci évoque fortement l'interaction entre l'infection virale et la réponse immune qui conditionne le déterminisme des manifestations cliniques. En effet, le VHB n'est pas cytopathogène et les lésions résultent de la réponse immune à médiation cellulaire qui tend à éliminer les cellules infectées qui répliquent le virus (1).

L'antigène cible essentiel est constitué d'épitopes qui sont communs aux antigènes HBc et HBe, d'où le rôle essentiel joué par ce dernier antigène dans la modulation de la réaction immune et le rôle clé de la réponse immune anti-HBe dans le contrôle de l'infection à VHB. On pense en particulier que chez le nouveau-né, c'est la transmission de l'antigène HBe de la mère à l'enfant qui est susceptible de faciliter grandement le passage à la chronicité et contribue à la tolérance immune induite à la naissance, d'où l'histoire naturelle très particulière des infections acquises de façon périnatale (2).

C'est dans ce contexte que se situe le schéma classique de l'histoire naturelle de l'infection à VHB en trois phases :

- Une phase de tolérance immune avec répllication forte (antigène HBe sans lésions hépatiques) ;
- Une phase d'élimination virale immunologique qui implique

d'une part des réponses immunitaires humorales vis-à-vis des antigènes d'enveloppe pré-S et HBs aussi bien que les réponses cellulaires T (3) vis à vis des épitopes HBc/HBe. Le maintien de ces réponses CTL se fait durant la vie entière par la présence de stimuli continus résultant de traces d'antigènes HBV qui peuvent être détectées dans le foie et/ou les cellules mononuclées circulantes qui confirment qu'il n'y a pratiquement jamais d'élimination complète du VHB même après guérison apparente et séroconversion anti-HBs. Le même processus se poursuit au cours des infections persistantes au cours desquelles on peut aboutir dans le cas le plus favorable à :

- La troisième phase, dite inactive, qui permet un contrôle permanent de la réplication du VHB qui se traduit par la présence d'antigène HBs, d'anti-HBe, la présence de particules virales complètes infectieuses en très faible quantité dans le sérum, comme en témoigne le titre faible de l'ADN du VHB, généralement indétectable par les méthodes classiques, excepté la PCR ainsi que le faible ratio Ag préS / AgHBs puisque l'antigène Pré-S est spécifique des seuls virions. Il n'y a pratiquement pas d'antigène HBc dans le foie et l'histologie hépatique est normale. On qualifiait autrefois à juste titre ces sujets de porteurs sains d'AgHBs.

La séroconversion anti-HBe est une étape clé résultat de cette phase de clairance immune virale. Elle établit une immunité anti-HBe qui empêche les cellules de répliquer le VHB. Compte tenu que ce processus peut s'étaler sur des décennies en fonction de facteurs viraux et immunologiques, il n'est pas surprenant d'observer l'émergence de mutants d'échappement pré-C(-) correspondant à des virions bénéficiant d'une inactivation fonctionnelle de la région pré-C. Celle-ci aboutit à ce que les hépatocytes qui les produisent et n'expriment plus l'antigène HBc et/ou HBe à la membrane, ne sont plus la cible des processus d'immunité cellulaire (4). On se retrouve donc confronté à une nouvelle catégorie d'infections à VHB correspondant à la présence simultanée, en proportion variable, de deux populations de virus : le virus sauvage généralement réprimé par l'immunité anti-HBe et le virus mutant pré-C(-), responsable de poussées évolutives génératrices de cirrhoses et de cancers.

La caractéristique de l'histoire naturelle des infections dues aux variants/mutants Pré-C(-) est d'évoluer rarement d'un seul tenant mais le plus souvent par exacerbations récurrentes plus ou moins espacées et sévères (5).

Mécanismes moléculaires et conséquences de l'émergence des mutants antigène HBe négatifs du VHB

Dès le début des années 1980, on avait remarqué que la présence d'anticorps anti-HBe n'était pas toujours accompagnée d'un arrêt de la réplication virale et d'une résolution de l'hépatite B. Ce n'est que dix ans plus tard que ce phénomène a été expliqué grâce à l'existence de la variabilité génomique du VHB. Cette variabilité est à l'origine de la diversification du génome

VHB en 7 génotypes (A à G). Des mutants qui ne sont pas déficients seront sélectionnés s'ils bénéficient d'un avantage répliatif par rapport au virus sauvage sous la pression de sélection de la réponse immune ou des traitements antiviraux. Ces mutants peuvent donc avoir des répercussions importantes en clinique en étant à l'origine d'hépatopathies plus sévères ou en mettant en défaut les tests sérologiques et diagnostiques ou encore en échappant aux schémas thérapeutiques classiques, voire aux mesures prophylactiques vaccinales. Les mutants Pré-C sont les plus fréquemment rencontrés en pratique clinique. Ils correspondent aux infections dues aux variants qui n'expriment pas ou peu l'antigène HBe(-). Ils représentent actuellement près de 45% des hépatites chroniques B en France avec une progression constante et bien davantage dans le monde, puisque ces mutations dominent dans les zones d'endémie, le bassin méditerranéen, l'Afrique et l'Asie, c'est-à-dire les grands réservoirs du VHB dans le monde. Les mutations correspondent (6) soit à un codon stop dans la région Pré-C qui code pour l'antigène HBe, à l'origine de la synthèse de l'HBe, soit à des mutations dans le promoteur Pré-C à l'origine d'une diminution de l'expression de l'antigène HBe qui le rend indétectable et facilite la réponse immune anti-HBe mais qui hélas est du même coup invalidée par le contrôle de la sous-population virale concernée.

Ces deux profils de mutation sont responsables de 90% des cas d'hépatite chronique liée à un variant HBe(-) Pré-C(-). Ces mutants sont généralement sélectionnés lors de la séroconversion anti-HBe et s'accumulent avec le temps. Cette catégorie d'infection est associée à une infection de plus longue durée, à une plus grande fréquence de cirrhose, une évolution fluctuante des transaminases et de la réplication virale, et la présence d'antigène HBc intra-cytoplasmique sur la biopsie hépatique, ce qui constitue un test diagnostique très précieux et peu onéreux. Une des conséquences de la faible réplication VHB lors de ces mutations est que les tests classiquement utilisés, d'hybridation moléculaire, ne les détectent pas de façon régulière, y compris le test d'amplification du signal bDNA, sauf au moment des poussées d'exacerbation (7). Il faut faire appel à la PCR pour détecter des niveaux de réplication qui se situent généralement en dessous de 10⁴ génomes lors des phases de quiescence. A cet égard, la détection de l'antigène Pré-S1 et la mesure du rapport entre les antigènes d'enveloppe Pré-S1 et HBs (Pré-S1/HBs) est très précieuse et permet assez facilement de distinguer les deux situations. Il n'y a hélas pas de test commercialisé (8).

Un autre marqueur très étudié par les auteurs italiens est la quantification fine des anti-HBc IgM par des tests ultrasensibles. Dans les cas d'hépatite chronique à variant Pré-C(-), on observe au moment des poussées, mais également de façon étalée (avant celles-ci et à leur décours), des élévations plus ou moins importantes. Il faut préciser que la pathogénie des lésions dues au variant Pré-C(-) est identique à celle du VHB et il n'y a aucune preuve d'une pathogénicité directe du virus. Les cas d'hépatites sévères ou fulminantes sont dues aux interactions entre des niveaux de réplication virale très fluctuants et l'expression des épitopes immunogènes. La conséquence pratique essentielle de ces infections dues aux mutants Pré-C est le taux élevé de cirrhose qui atteint 40% et s'associe à une forte proportion de CHC.

Hépatites virales

Le caractère très variable de l'histoire naturelle des infections à VHB se trouve donc particulièrement compliqué par l'émergence de ces mutations. Au plan moléculaire, celles-ci sont favorisées d'une part par le génotype D du VHB qui prédomine dans toute la région méditerranéenne mais aussi par d'autres mécanismes concernant tous les autres génotypes.

Comment établir un diagnostic et un suivi adaptés

Chez un patient donné pour lequel on ne dispose pas de l'histoire de son infection à VHB, on se trouve dans une situation ambiguë qui est l'objet du thème discuté. En effet, si un patient est antigène HBs et antigène HBe positifs, que ses transaminases sont normales et que son ADN n'est pas détectable par les tests d'hybridation classique y compris le bDNA, on peut être devant deux situations très différentes :

1 Soit être à la phase inactive d'une infection à VHB qui a été totalement contrôlée dans un délai plus ou moins ancien et dont le risque de progression est pratiquement nul. Le plus souvent il s'agit, lorsque le processus de clairance immune a été rapide et efficace, d'un portage sain d'antigène HBs. Ce profil peut être également le fruit d'un traitement antiviral réussi, dans ce cas il est facile de le documenter. Plus rarement le processus a pu être laborieux et se faire au prix de lésions hépatiques importantes, voire d'une cirrhose devenue inactive.

2 A l'inverse, il peut s'agir d'une hépatite chronique due à des mutations Pré-C(-) qui se trouve en phase de quiescence avec des transaminases temporairement normales. Si l'anamnèse ne permet pas de reconstituer l'histoire clinique, on peut être égaré par ce profil si on n'a pas mis en œuvre un bilan complet : clinique et para-clinique, biologique et virologique. Il existe heureusement des circonstances épidémiologiques qui doivent rendre plus attentif le clinicien averti. Devant la moindre discordance, il faut savoir compléter le bilan et en fonction du contexte, pratiquer une biopsie hépatique avec immuno-marquage de l'antigène HBc qui peut apporter facilement une aide au diagnostic en montrant une hépatopathie avec expression cytoplasmique de la capsule du VHB (AgHBc).

La méthodologie formelle d'identification du variant Pré-C se fait par la mise en évidence moléculaire directe de la mutation et de son type exact.

Savoir distinguer ces deux situations est capital non seulement pour le pronostic mais également pour le traitement et/ou la surveillance puisque selon le génotype viral et l'existence ou non de mutations Pré-C ainsi que le stade évolutif, le risque de réactivation et/ou de progression vers la cirrhose et le CHC peut être important dans le cadre de la mutation Pré-C, alors qu'il est très faible, voire nul, en l'absence de co-facteur chez un porteur sain d'antigène HBs.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Hoofnagle, J.H., D.A. Shafritz, and H. Popper. 1987. Chronic type B hepatitis and the healthy HBs Ag carrier state. *Hepatology* 7 :758-763
- 2 - Chisari, F. 1991. Analysis of hepadnavirus gene expression, biology, and pathogenesis in the transgenic mouse. *Current Topics in Microbiology* 168 :85-101
- 3 - Nayarsina R, Fowler P, Guilhot S, Missale G, Cerny A, Schlicht HJ, et al. HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1993 : 150 :4659-71
- 4 - Lamelin, J.P., and C. Trépo. 1990. The hepatitis B virus and the peripheral blood mononuclear cells : a brief review. *J. Hepatol.* 10 :120-124
- 5 - Tong, S., J. Li, L. Vitvitski, and C. Trépo. 1990. Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an inactive pre-C region. *Virology.* 176 :596-603
- 6 - Li, J.-S., S.-P. Tong, Y.-M. Wen, L. Vitvitski, Q.Zhang, and C. Trépo. 1993. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an Hbe-minus mutant : possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J. Virol.* 67:5402-5410
- 7 - Milich, D. 1988. T-and B-cell recognition of hepatitis B viral antigens. *Immunol. Today* 9:380-386
- 8 - Pichoud C., F. Berby, L. Stuyver, MA Petit, C. Trépo, F. Zoulim. 1999. Persistence of viral replication after anti-HBe seroconversion during antiviral therapy for chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* In press