

## Mutations précocore et core du Virus de l'Hépatite B : Optimisation des techniques de détection moléculaire et analyse de l'impact sur l'évolution de l'infection chronique vers la cirrhose dans la région du Centre tunisien.

I. FODHA<sup>1</sup>,  
M. RIANI<sup>1</sup>,  
S. KACEM<sup>1</sup>,  
M. BEN HAJ FREDJ<sup>1</sup>,  
S. KETATA<sup>1</sup>,  
A. LETAIEF<sup>2</sup>,  
S. AJMI<sup>3</sup>,  
N. BOUJAFFAR<sup>1</sup>,  
A. TRABELSI<sup>2</sup>

**Résumé :** L'infection chronique par le Virus de l'Hépatite B représente la principale étiologie de carcinome hépatocellulaire au niveau mondial. La progression de la pathologie hépatique se fait selon un mécanisme multifactoriel encore mal élucidé probablement influencé par les caractéristiques virologiques propres à la souche virale en cause. Les objectifs de notre étude étaient d'optimiser les outils moléculaires de détection des mutations précocore et BCP (Basal Core Promoter) du Virus de l'Hépatite B puis de comparer la fréquence de ces mutations entre porteurs asymptomatiques et porteurs chroniques ayant évolué vers la cirrhose. Notre travail a porté sur 36 patients porteurs chroniques du Virus de l'Hépatite B, parmi lesquels 18 étaient cirrhotiques et 18 ne présentaient ni cytolysse hépatique, ni cirrhose, ni carcinome hépatocellulaire. Les mutants précocore et BCP ont été détectés par techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction)-séquençage et PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), respectivement. La comparaison entre porteurs asymptomatiques et patients cirrhotiques a révélé une prévalence plus importante de mutations précocore (100% vs 83%) et BCP (44.4% vs 33.3%) parmi les patients cirrhotiques. Toutefois, la différence était statistiquement non significative. Notre travail soutient l'hypothèse que les patients porteurs de virus mutants précocore et BCP présentent un risque accru de développer une cirrhose. Cependant, des études approfondies restent nécessaires pour conforter cette théorie.

**Mots clés :** Virus de l'Hépatite B, Mutant précocore, Mutant BCP, Cirrhose.

## Optimization of molecular methodology for the detection of Hepatitis B Virus precore/BCP mutations and analysis of the risk to develop cirrhosis in the center of Tunisia

**Abstract :** Chronic hepatitis B virus infections are the major cause of hepatocellular carcinoma worldwide. Progression of liver disease seems to be adversely affected by viral strain characteristics, such as genotype, precore and basal core promoter (BCP) mutation. The aims of the present study were the optimization of molecular methodology for the detection of Hepatitis B Virus precore/BCP mutations and thereafter the comparison in frequency of detection of such mutations between asymptomatic carriers and chronic Hepatitis B Virus infected patients with cirrhosis. Thirty-six Tunisian patients with chronic Hepatitis B Virus infection were investigated : 18 were asymptomatic carriers and 18 presented with cirrhosis. Precore and core-promoter mutations were detected using PCR (Polymerase Chain Reaction)-RFLP (Restriction

<sup>1</sup> UR06SP20, Laboratoire de Microbiologie, CHU Sahloul, Sousse, Tunisie

<sup>2</sup> Service de Gastrologie, CHU Farhat Hached, Sousse, Tunisie

<sup>3</sup> Service de Gastrologie, CHU Sahloul, Sousse, Tunisie

Fragment Length Polymorphism) and PCR-sequencing methodology. The comparison between asymptomatic carriers and patients with cirrhosis showed a higher prevalence of precore (100% Vs 83%) and core-promoter mutations (44.4% vs 33.3%) in patients with cirrhosis. Nevertheless, these differences remained not significant statistically. The pathogenesis of hepatitis B infections is not completely understood. The present study supports the idea that patients with precore and BCP mutations seem to carry an increased risk for developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma independently of viral load. Further studies are needed to definitely elucidate such a hypothesis.

**Key words :** Hepatitis B virus, Precore mutant, Core-promoter mutant, Cirrhosis.

## Introduction

Le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique au niveau mondial. Selon l'OMS, 2 milliards de personnes ont été en contact avec le virus à travers le monde, avec plus de 350 millions de porteurs chroniques. L'infection par le VHB est le plus souvent bénigne, mais le passage à la chronicité, qui se fait chez 5 à 10% des adultes immunocompétents [1], peut conduire au développement d'une cirrhose voire d'un hépatocarcinome. Le VHB serait ainsi responsable de près d'un million de décès par an, par hépatite chronique active, cirrhose ou hépatocarcinome [2,3]. A ce titre, l'infection par le VHB représente la seconde cause de décès par cancer dans le monde, après le tabac [4].

Parmi les facteurs de risque susceptibles d'influencer péjorativement l'histoire naturelle de la maladie, certains sont actuellement admis : un âge jeune au moment de la contamination, une longue période d'infection, un taux élevé des transaminases sériques, le sexe masculin, la consommation d'alcool, et une co-infection par les virus de l'Hépatite C ou de l'Immunodéficience Humaine. Outre ces facteurs reconnus, il semblerait que la progression de la pathologie hépatique puisse être également influencée par les caractéristiques virologiques propres à la souche virale en cause, à savoir le génotype, la mutation précore G1896A et la double mutation BCP (Basal Core Promoter) A1762T/G1764A. Ces mutations entraînent la diminution voire l'arrêt de synthèse de l'AgHBe, alors que la répllication virale persiste et peut même augmenter [5,6]. En Tunisie,

l'hépatite B est moyennement endémique, avec un taux de portage chronique de l'ordre de 4 à 7%. De plus, un taux élevé de mutants précore et BCP a été rapporté par différentes études. [7]

Nous nous sommes proposés comme objectifs dans la présente étude d'optimiser les outils moléculaires de détection des mutations précore et BCP (Basal Core Promoter) du Virus de l'Hépatite B puis de comparer la fréquence de ces mutations entre porteurs asymptomatiques du VHB et porteurs chroniques ayant évolué vers la cirrhose dans la région du Centre tunisien.

## Patients et méthodes

### Patients

Notre travail a consisté en une étude rétrospective investiguant 36 patients porteurs chroniques du VHB (AgHBs positif ; IgM anti-HBc négatif) suivis par les services de Gastrologie des CHU Sahloul (Sousse) et Farhat Hached (Sousse) du 1<sup>er</sup> janvier 2008 au 31 mars 2009.

Pour chaque patient, un prélèvement de sérum (pour examens sérologiques) et un prélèvement de plasma (pour examens moléculaires) ont été collectés et immédiatement conservés à -20° C jusqu'à leur analyse.

Chaque prélèvement reçu était accompagné d'une fiche de renseignements dûment complétée permettant de distinguer deux différents groupes de patients pour la réalisation d'une étude «cas-témoins» : d'une part, 18 patients présentant une cirrhose à l'examen clinique ont été inclus dans le groupe dit des «Malades» ; d'autre part, 18 patients, dont le taux des transaminases sériques

était normal et n'ayant évolué jusque-là ni vers la cirrhose ni vers le carcinome hépatocellulaire (CHC), ont constitué le groupe dit des «Témoins».

Les populations «malades» et «témoins» étudiées comportaient 67% et 61% d'hommes, respectivement. La moyenne d'âge des patients «malades» et «témoins» était de 49 ans et 57 ans, respectivement.

Dans tous les cas, seuls les patients non traités pour hépatite B ont été retenus. De plus, pour garantir des conditions optimales à l'analyse moléculaire des souches de VHB, tous les patients sélectionnés pour l'étude présentaient une charge virale en ADN-VHB > 10<sup>4</sup> copies/ml. Concernant le marqueur sérologique HBe, l'antigène était présent et les anticorps absents pour un patient du groupe des «malades» versus 2 patients «témoins».

## Méthodes

Détection des marqueurs sérologiques du VHB :

Les marqueurs sérologiques du VHB (AgHbs, IgM anti-HBc, AgHbe, Ac anti-Hbe) ont été déterminés en utilisant la technique ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) automatisée sur le système VIDAS (Biomérieux).

Extraction et quantification de l'ADN viral :

L'ADN du VHB a été extrait et quantifié directement à partir du plasma au moyen d'une technique commercialisée standardisée (Cobas AmpliCor HBV Monitor, Roche).

### Détection des mutants précore du VHB :

La détection des mutants précore a fait appel dans un premier temps à une PCR nichée réalisée selon le protocole décrit par Wintermeyer et al. [8]. Le produit d'amplification a par la suite été séquencé pour permettre la mise en évidence de la mutation G1896A

caractéristique des mutants précore. Le séquençage a été réalisé à l'aide du séquenceur automatique à capillaires 3100 ABI (Applied Biosystems). L'analyse des chromatogrammes obtenus a été effectuée au moyen du logiciel Chromas et les séquences obtenues comparées aux séquences publiées sur Genbank (Figure 1).

### Détection des mutants BCP du VHB :

La détection des mutants BCP a fait appel, dans un premier temps, à une PCR nichée effectuée selon le protocole décrit par Takahashi et al. [9], suite à quoi le produit d'amplification a été soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme Sau3AI (Promega). La digestion a été réalisée dans un volume final de 10µl, en présence de 1µl du tampon de l'enzyme (10X), 0.1µl de BSA, 0.1µl d'enzyme Sau3AI (10U/µl) pour 1.5µg d'ADN. Le mélange a été incubé dans un bain-marie pendant 2 heures à 37°C puis analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% après ajout de 3µl de tampon de charge de l'ADN 6X (Loading Dye, Promega). Si la mutation BCP était présente, l'amplicon, d'une taille initiale de 306 pb, était alors coupé en 2 fragments, l'un de 190 pb et l'autre de 110 pb (Figure 2).

### Analyse statistique :

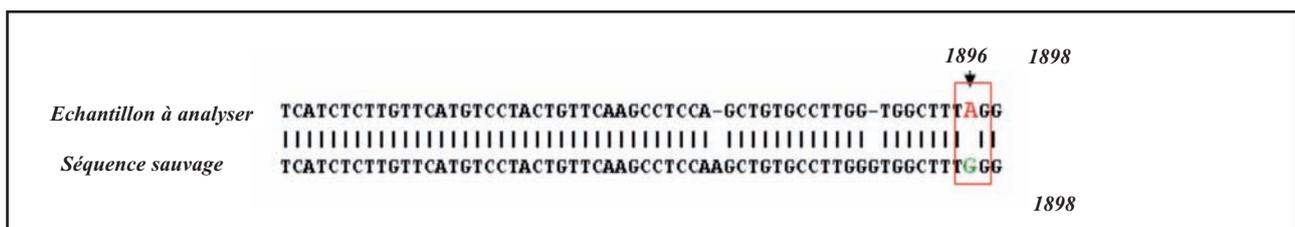
Les analyses statistiques comparatives pour les variables catégoriques ont été effectuées au moyen du test de corrélation de Pearson. L'analyse des différents résultats a été réalisée en utilisant le logiciel SPSS version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL).

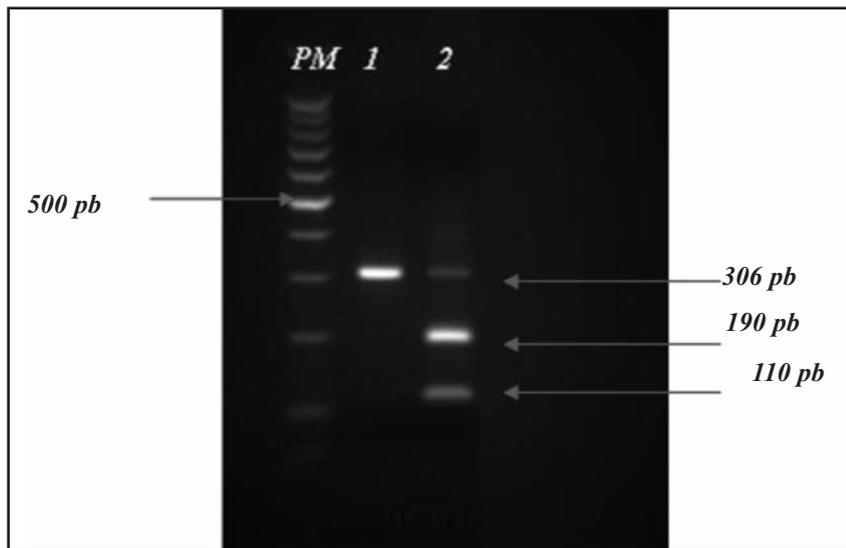
## Résultats

### Distribution des virus mutants précore et BCP :

Au total, sur les 36 patients testés, le statut concernant la

Figure 1 : Recherche de la mutation précore par analyse comparative de séquences.





**Figure 2 : Electrophorèse sur gel d’agarose à 2% du produit de digestion des amplicons de la PCR nichée par Sau3AI.**

PM : Marqueur de poids moléculaire (DNA ladder 100pb, Promega)

Puits 1 : fragment de 306 pb correspondant au VHB sauvage pour la mutation BCP.

Puits 2 : fragments de 190 pb et 110 pb correspondant au VHB mutant BCP.

mutation précore a pu être déterminé pour 21 d’entre eux, dont 9 étaient cirrhotiques et 12 porteurs asymptomatiques. Ainsi, sur 21 patients, 19 (90.5%) étaient porteurs de VHB mutants précore, alors que les 2 autres (9.5%) étaient porteurs de VHB sauvages pour la mutation précore. Le statut concernant la mutation BCP a pu être déterminé pour l’ensemble des 36 patients testés.

Ainsi, sur les 36 patients testés, 14 (38.9%) étaient porteurs de VHB mutants BCP, tandis que les 22 autres (61.1%) étaient porteurs de VHB sauvages pour la mutation BCP.

**Analyse de l’impact des mutations sur l’évolution vers la cirrhose :**

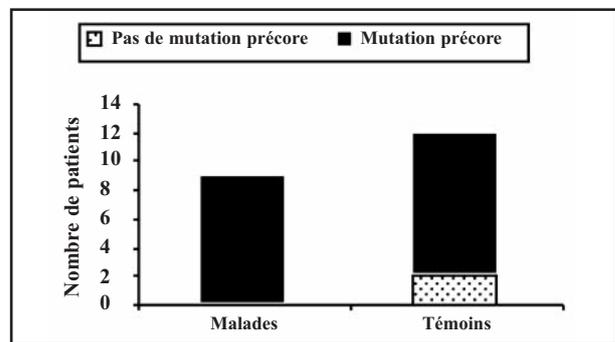
Afin d’évaluer l’impact des mutations précore et BCP dans l’évolution de l’infection par le VHB vers la cirrhose, une étude statistique a été menée par comparaison de la fréquence des mutations entre population cirrhotique et population asymptomatique témoin.

**Impact de la mutation précore dans l’évolution vers la cirrhose :**

Tous les patients cirrhotiques pour lesquels la recherche

de la mutation précore a été possible (9 cas) étaient porteurs de VHB mutants précore, soit 100% des cas.

Concernant les 12 patients témoins analysés, 10 (83%) étaient porteurs de VHB mutants précore. Ainsi, la fréquence de mutation précore était plus importante parmi



**Figure 3 : Répartition des VHB mutants précore parmi les patients cirrhotiques et témoins.**

la population de cirrhotiques que parmi les patients témoins (100% Vs 83%) (Figure 3). Toutefois, la différence s’est avérée statistiquement non significative selon le test de corrélation de Pearson.

***Impact de la mutation BCP dans l'évolution vers la cirrhose :***

Parmi les 18 patients cirrhotiques, 8 (44.4%) étaient porteurs de VHB mutants BCP, versus 6 (33.3%) parmi les 18 patients témoins asymptomatiques (Figure 4).

Ainsi, la fréquence de mutation BCP était plus élevée parmi les patients cirrhotiques que parmi les témoins. Néanmoins, le test de corrélation de Pearson n'a pas retrouvé de différence significative entre présence de mutation BCP et cirrhose.

**Discussion*****Distribution des virus mutants précocore et BCP dans la population d'étude :***

L'étude des mutants core et précocore du VHB pourrait contribuer à mieux comprendre l'évolution de la maladie et des symptômes qu'elle provoque. La mutation précocore était présente en forte proportion dans notre population d'étude (90.5%).

Ceci concorde avec les précédentes études menées en Tunisie par Triki et al. [10] (86%) et par Ayed et al. [11] (92.4%). Ces résultats sont en revanche nettement supérieurs à ceux rapportés en Asie [5] (47%) et en Amérique du Nord [12] (27%). Ceci semble pouvoir s'expliquer par la distribution différentielle des génotypes de VHB à travers le monde. En effet, d'après les données de la littérature, le génotype D, particulièrement fréquent en Tunisie au même titre que dans l'ensemble du pourtour méditerranéen, est fréquemment associé à la présence de mutation précocore. Il a été précédemment montré que cette association résultait de la stabilisation de la structure génomique du VHB du fait d'une liaison à forte affinité entre l'adénine en position 1896, caractéristique de la mutation précocore, et la thymine en position 1858, caractéristique du génotype D. [8]

Dans notre étude, les mutants BCP ont été retrouvés dans 38.9% des prélèvements. Cette fréquence, similaire à celles retrouvées en Asie (40%) [13]) et en Amérique du nord (25%) [14], est toutefois élevée par rapport à celle rapportée précédemment en Tunisie par Ayed et al. [11] (11%). Une telle différence pourrait être en partie due à

la population d'étude qui n'est pas semblable : alors que 50% des patients de notre étude étaient cirrhotiques, les patients investigués dans l'étude de Ayed et al. étaient des porteurs chroniques du VHB. Néanmoins, la fréquence de détection des mutants BCP parmi les patients porteurs non cirrhotiques de la présente étude reste tout de même supérieure à celle observée par Ayed et al. (33% Vs 11%).

***Impact de la mutation précocore dans l'évolution péjorative vers la cirrhose :***

Les résultats trouvés dans notre étude montrent que 100% des cirrhotiques étaient porteurs de virus mutants précocore, Vs 83% des témoins. Ces résultats sont en accord avec une étude menée en Asie [15], selon laquelle 31.2% des cirrhotiques étaient porteurs de mutants précocore Vs 25% de témoins. Ceci suggère une éventuelle implication de la mutation précocore dans l'évolution vers la cirrhose, bien que l'association se soit avérée statistiquement non significative. De ce fait, cette hypothèse reste à confirmer par des études approfondies réalisées à plus large échelle.

L'implication probable de la mutation précocore dans l'évolution vers la cirrhose ferait suite à un mécanisme très complexe mal élucidé. Elle serait due principalement au rôle joué par l'AgHBe comme immunorégulateur, en modulant l'action des lymphocytes T CD4+, ce qui favoriserait l'évolution de l'infection du VHB vers la chronicité [16]. Cependant, dans le cas de la présence de la mutation précocore en absence d'AgHBe, ce rôle d'immunorégulation est perdu, ce qui induit une réaction immunitaire violente causant la destruction des hépatocytes et augmentant le risque de l'évolution vers l'hépatite fulminante et/ou la cirrhose [16].

***Impact de la mutation BCP dans l'évolution péjorative vers la cirrhose :***

D'après notre étude, 44.4% des patients cirrhotiques étaient porteurs de la mutation BCP Vs 33.3% des témoins. Cette différence entre les deux populations suggère une éventuelle implication de la mutation BCP dans l'évolution vers la cirrhose, bien que l'association soit statistiquement non significative dans notre étude. Des études réalisées en Asie et en Afrique ont trouvé une

fréquence importante de mutants BCP chez des patients cirrhotiques et/ou souffrant de CHC. Selon une étude réalisée par Tong et al. [6], le portage de mutants BCP serait prédictif d'un développement de CHC. En effet, dans cette étude, 77.7% des patients souffrant de CHC étaient porteurs de mutants BCP Vs 21.2% des porteurs chroniques asymptomatiques du VHB.

La relation entre mutants BCP et cirrhose reste à ce jour mal connue. Certaines hypothèses ont toutefois été avancées : d'une part, il semblerait que le mutant BCP soit capable d'accentuer la virulence en augmentant la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, il pourrait causer une altération de la région codante de l'antigène HBe [5], or la diminution de la circulation de l'AgHBe semble exacerber la réponse immunitaire envers les hépatocytes infectés par le VHB, ce qui augmenterait l'apoptose et la régénération des hépatocytes, conduisant à un endommagement du foie [5]. De plus, la mutation BCP augmenterait l'efficacité de la réplication virale en modulant les niveaux relatifs de transcription d'ARN par la création d'un récepteur du facteur nucléaire 1 de transcription [5].

### Conclusion

La signification des infections par les virus mutants précore/core du VHB reste encore mal connue, tant pour les conséquences cliniques que pour les mécanismes physiopathologiques. Dans le présent travail, bien que l'association se soit avérée statistiquement non significative, la fréquence de détection des mutants précore et BCP était supérieure chez les patients cirrhotiques comparativement aux patients témoins. Ainsi, l'hypothèse de l'implication des mutations précore/core dans l'évolution vers la cirrhose reste vraisemblable.

Toutefois, les mécanismes impliqués dans l'évolution vers le CHC semblent être complexes et multifactoriels : ainsi, il a notamment été montré que l'antigène X interagissait directement avec le gène P53 et l'enzyme XAP-1 réparatrice d'ADN, et induisait un changement des acides aminés K130M et V131I dans l'antigène X, ce qui interférerait avec le contrôle de la croissance cellulaire et la réparation d'ADN, pouvant conduire au développement d'une

cirrhose et/ou d'un CHC [5]. Une étude à large échelle comportant des patients porteurs de CHC parallèlement aux patients cirrhotiques et asymptomatiques reste nécessaire afin d'élucider les mécanismes oncogènes conduisant au développement du CHC.

### Références

1. Hyams KC : Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection : A review. *Clin Infect Dis* 1995, 20:992-1000.
2. Liu WC, Miozokami M, Buti M, Lindh M, Young KC, Sun KT et al. Simultaneous Quantification and Genotyping of Hepatitis B virus for Genotypes A to G by real time PCR and two steps melting curve Analysis. *J Clin Microbiol* 2006, 44: 4491-4497.
3. Paul SB, Sreenivas V, Gulati MS, Madam K, Gupta AK, Mukhopadhyay S et al. Incidence of hepatocellular carcinoma among Indian patients with cirrhosis of liver : an experience from a tertiary care center in northern Indi. *Indian J Gastro* 2007, 26: 274-278.
4. Denis F, Thibault V, Alain S. Hepadnaviridae. Virus de l'hépatite B. *Virologie Médicale*. Editions ESTEM 2003, 293-305.
5. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 2008, 100:1134-1143.
6. Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WJ. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma : a comparison with chronic carriers. *Liver Int* 2007, 1356-1363.
7. Rossana BM, Colombatto P, Bonino F. Personalized therapy in chronic viral hepatitis *Molec Asp Med* 2008, 29:103-111.
8. Wintermeyer P, Gerner P, Gehring S, Karimi A, Wirth S. Prevalence of hepatitis B Virus precore stop codon mutations in chronically infected children. *World J Gastroenterol* 2006; 12:2235-8.
9. Takahashi K, Aoyama K. The precore / core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus : clinical significance and an easy method for detection. *J Gen virol* 1995;76 : 3159-3164.

10. Triki N, Said N, Ben Salah A, Arrouji A, Ben Ahmed F, Bouguerra A et al. Seroepidemiology of hepatitis B, C and delta viruses in Tunisia. *Transact Royal Soc Trop Med Hyg* 1997; 91 :11-14.
11. Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Aouadi H, Sfar I, Najjar T. Hepatitis B virus genotypes and precore/core-promoter mutations in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Infect* 2007 ; 54 :291-297.
12. Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C et al. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology* 2003; 38:619-28.
13. Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SA, Rizvi SA. Genetic variability in the precore and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi. *BMC Gastroenterol* 2006; 6:20.
14. Hussain M, Chu CJ, Sablon E, Lok AS. Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3699-705.
15. Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, Chevallier P, Pichoud C et al. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome : correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol* 2000; 33: 430-9.
16. Chen M, Sällberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV et al. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 2005 ; 79:3016-27.