



**INSTITUT
DE VEILLE SANITAIRE**

CNR DES HEPATITES B, C ET DELTA

RAPPORT d'ACTIVITES 2011-2012

TABLE DES MATIERES

DESCRIPTION DE LA STRUCTURE DU CNR ET ORGANISATION GENERALE.....	4
ORGANISATION du CNR ET REPARTITION DES ACTIVITES ENTRE LES LABORATOIRES.....	7
Expertise microbiologique.....	7
contribution a la surveillance epidemiologique.....	8
contribution a l'alerte.....	9
RESUME DES ACTIVITES.....	10
CNR COORDONNATEUR LABORATOIRE DE VIROLOGIE ET INSERM U955 HOPITAL HENRI MONDOR CRETEIL.....	13
MOYENS HUMAINS AFFECTES AU CNR.....	14
LOCAUX ET EQUIPEMENTS.....	16
THEMATIQUES DE RECHERCHE.....	18
Développement, standardisation et évaluation des techniques à visée diagnostique et de suivi thérapeutique.....	18
Epidémiologie moléculaire et surveillance des virus d'hépatites B et C.....	19
Etude de la variabilité génétique naturelle et associée à la chimiothérapie antivirale (résistance) des virus d'hépatites B et C.....	19
Autres activités de recherche du laboratoire.....	22
CAPACITES TECHNIQUES ACTUELLES DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE DU CNR.....	23
TECHNIQUES IMPLEMENTEES AU COURS DE L'ANNEE 2011.....	25
BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES DE L'ANNEE 2011-2012.....	25
Activités d'expertise dans le domaine des outils diagnostiques et de typage.....	25
Contribution à la surveillance épidémiologique ou à l'alerte : caractérisation virologique des échantillons et typage moléculaire pour la surveillance de l'épidémiologie des types viraux et l'émergence des mutants.....	31
Investigation des cas isolés et groupés de transmission.....	36
Surveillance et caractérisation de la résistance aux antiviraux.....	38
PUBLICATIONS (2011-2012).....	45
Publications internationales.....	45
Publications nationales.....	48
Chapitres de livre.....	48
Conférences sur invitation.....	49
PROGRAMME D'ACTIVITE 2012-2013.....	53

LABORATOIRE ASSOCIE HEPATITES B, C et delta en TRANSFUSION SANGUINE, INSTITUT NATIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINE PARIS	55
LABORATOIRE ASSOCIE HEPATITE DELTA HOPITAL AVICENNE BOBIGNY.....	109

**DESCRIPTION DE LA STRUCTURE DU CNR
ET ORGANISATION GENERALE**

Le CNR des hépatites virales B, C et delta est constitué d'un CNR coordonnateur et de deux laboratoires associés. Son Directeur (responsable scientifique) est le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY. Il est assisté du Docteur Stéphane CHEVALIEZ, Directeur Adjoint.

Le CNR coordonnateur est le Laboratoire de Virologie du service de Bactériologie-Virologie-Hygiène du Groupe Hospitalier Henri Mondor (Chef de Service : Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY), adossé à l'équipe de recherche "Physiopathologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques" de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (INSERM U955) et intégré au Département Hospitalo-Universitaire (DHU) "Virus, Immunité et Cancers" (Directeur : Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY), localisés à l'hôpital Henri Mondor de Créteil. Les deux laboratoires associés sont : l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS, responsable : Docteur Syria LAPERCHE), Paris, et le Laboratoire de Virologie du Service de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Avicenne (responsable : Docteur Emmanuel GORDIEN), Groupe Hospitalier Nord, Bobigny.

La structure schématique du CNR des Hépatites Virales B, C et delta est présentée sur la Figure 1. Les interactions scientifiques et techniques sont importantes entre le centre coordonnateur et les laboratoires associés et se traduisent par de nombreuses collaborations, qui seront poursuivies et amplifiées.

Le CNR, lieu d'activités médicales et scientifiques intégrées, est ouvert sur l'extérieur par le biais de multiples connexions, relations et collaborations. Ceci est en particulier le cas avec les acteurs institutionnels : Institut de Veille Sanitaire (InVS), Direction Générale de la Santé (DGS), Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), Etablissement Français du Sang (EFS), Agence de la Biomédecine (ABM), Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS), ainsi qu'au niveau Européen avec l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC).

La coopération se poursuit également avec l'ensemble des partenaires institutionnels et privés impliqués dans la surveillance ou associés à des événements

épidémiologiques liés à l'activité du CNR des Hépatites Virales B, C et delta (hôpitaux, cliniques, laboratoires d'analyse, laboratoires de recherche, etc).

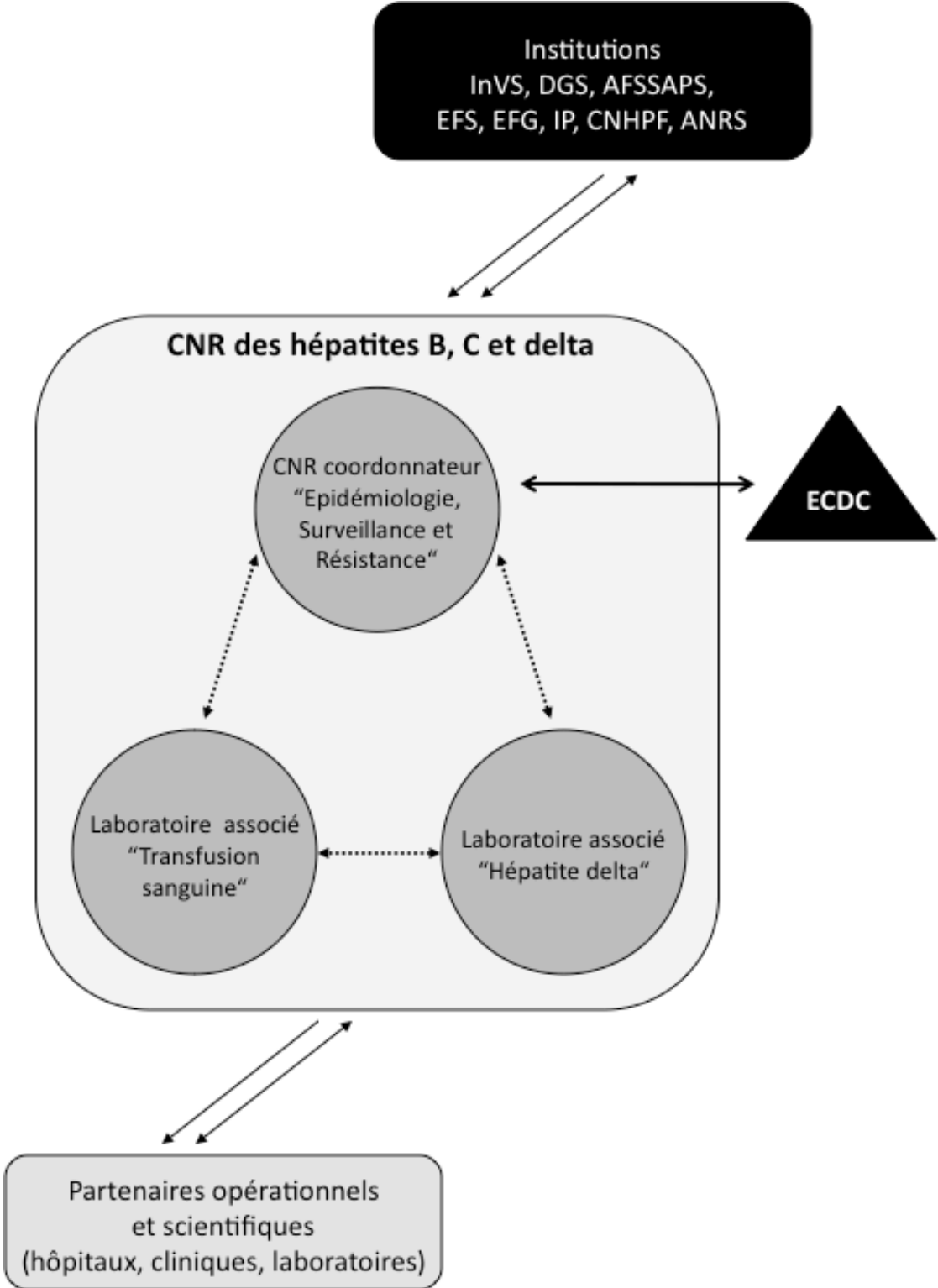


Figure 1 : Structure du CNR des hépatites B, C et delta

ORGANISATION DU CNR ET REPARTITION DES ACTIVITES ENTRE LES LABORATOIRES

Les activités des trois laboratoires constituant le CNR (le CNR coordonnateur et les deux laboratoires associés) sont organisées afin de remplir l'intégralité des missions confiées dans le cadre du cahier des charges de l'appel d'offres des CNR, dans le cadre d'un renforcement de la collaboration entre les trois laboratoires constituants.

EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE

Dans le domaine de l'expertise microbiologique, le développement, l'évaluation, la contribution au contrôle qualité des méthodes diagnostiques, de typage et de détermination des virémies sont réalisés dans le cadre d'étroites collaborations entre les trois laboratoires, qui seront poursuivies, et bénéficient de l'expertise de participants extérieurs au CNR dans le cadre du groupe de virologie médicale de l'Action Coordonnée 33 (AC33) de l'ANRS, en particulier pour la réalisation de contrôles de qualité nationaux coordonnés par le CNR.

Le développement et la validation de tests sur des matrices biologiques diverses (salive, sang total, sérum) ou sur des supports spécifiques (buvard) est principalement réalisé par le CNR Coordonnateur, tandis que les typages moléculaires et les analyses phylogéniques sont réalisés en fonction du type de prélèvement et du contexte par le CNR coordonnateur (cas isolés, cas groupés, épidémies, études, cohortes...), par le laboratoire de l'INTS (analyses en transfusion sanguine) ou par le laboratoire associé de l'hôpital Avicenne (virus de l'hépatite delta).

La détection et l'investigation de "nouveaux agents viraux" potentiellement impliqués dans la survenue d'hépatites chez l'homme est une éventualité qui ne s'est pas présentée jusqu'à présent et qui nécessitera une étroite collaboration des trois laboratoires impliqués si elle advenait au cours des cinq années du prochain exercice.

L'étude de la résistance du VHC et du VHB aux antiviraux, coordonnée par le CNR au plan national, se fait en étroite collaboration avec l'ANRS au sein de l'AC33, présidée

par le Professeur Jean-Michel PAWLITSKY, consacrée spécifiquement à ce sujet. Les objectifs de cette AC sont la mise en place d'un réseau de collaboration des virologues médicaux dédié au développement de techniques d'étude de la résistance et à la surveillance de celle-ci sur le plan national. Celle-ci s'exerce en particulier à travers la mise en place de cohortes et d'un observatoire national de la résistance auquel les trois laboratoires du CNR sont associés.

L'expertise microbiologique en sécurité transfusionnelle et des dons d'organe, comprenant l'évaluation des réactifs de dépistage et de confirmation, est assurée conjointement par le laboratoire de l'INTS pour la sécurité transfusionnelle et par le CNR coordonnateur pour celle des dons d'organes. Ce laboratoire abrite en effet le Laboratoire Central de Qualification Virologique des Organes, Tissus et Cellules de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, qui couvre un large territoire comprenant la région Ile-de-France, la région Centre et les Antilles. L'implémentation du diagnostic génomique viral en sécurité des dons d'organes et de tissus s'est inspirée de l'expérience acquise en matière de sécurité transfusionnelle.

L'évaluation des risques de transmission après un accident d'exposition est assurée principalement par le CNR coordonnateur, dans le cadre de ses activités de laboratoire diagnostique et de laboratoire d'urgence ouvert 24 heures sur 24, 7 jours sur 7.

CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

La surveillance des types viraux circulants en France et la détection de virus mutants émergents susceptibles de poser des difficultés diagnostiques, de prise en charge thérapeutique ou d'échappement à la vaccination, est assurée conjointement par les trois laboratoires du CNR dans leurs domaines de compétences respectives.

Les trois laboratoires du CNR participent aux études épidémiologiques pour lesquelles ils sont sollicités, tandis que le laboratoire de l'INTS collabore spécifiquement avec l'EFS et l'AFSSAPS pour la surveillance des infections par le VHB et le VHC dans la population des donneurs de sang en réalisant, en particulier, l'analyse de la diversité des

souches circulant en France. Le laboratoire de l'INTS a la capacité de détecter et d'identifier de nouveaux virus pouvant être responsables d'hépatites transmissibles par le sang.

Le CNR coordonnateur participe à l'investigation des cas groupés d'infections par le VHB et le VHC par comparaison d'isolats et étudie les modalités de transmission résiduelle. Ces analyses sont réalisées à l'aide de techniques développées ou validées en collaboration avec le laboratoire de l'INTS et avec des souches de référence dont certaines sont communes aux deux laboratoires.

La surveillance européenne est sous la responsabilité de l'ECDC avec lequel le CNR coordonnateur est en contact. Il n'existe cependant pas à ce jour de programme européen de surveillance actif et financé, depuis la fin du programme ViRgil, qui était financé par le FP7 de la Commission Européenne.

CONTRIBUTION A L'ALERTE

Les trois laboratoires du CNR contribuent à l'alerte en signalant à l'InVS tout événement sanitaire inhabituel (suspections de cas groupés, émergence d'une souche particulière, formes cliniques inhabituelles,...).

RESUME DES ACTIVITES

Le Centre National de Référence (CNR) des Hépatites Virales B, C et delta est localisé au sein du laboratoire de Virologie de l'Hôpital Henri Mondor de Créteil. Sa direction est assurée par le Professeur Jean-Michel PAWLLOTSKY, avec le concours du Docteur Stéphane CHEVALIEZ. Le CNR comprend également 2 laboratoires associés, localisés respectivement à l'Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris (Hépatites Virales en Transfusion Sanguine ; responsable Docteur Syria LAPERCHE), à l'hôpital Avicenne, Bobigny (Virus de l'Hépatite delta, responsable Docteur Emmanuel GORDIEN).

Le CNR des Hépatites Virales B, C et delta a pour mission d'assurer l'expertise biologique et de contribuer à la surveillance des infections par les virus d'hépatites B, C et delta et de leur résistance aux antiviraux. L'ensemble de ces activités permet d'assurer un conseil technique d'expert et, en cas de phénomènes épidémiologiques inhabituels, d'alerter la Direction Générale de la Santé et l'Institut National de Veille Sanitaire (arrêté du 29 novembre 2004, publié au JORF n°281 du 03 décembre 2004, page 20584, texte n°4).

Cette première année de fonctionnement depuis le renouvellement du CNR a été une année de collaboration entre les différents partenaires et de mise en place intense de nouvelles études et de nouvelles techniques. Elle en a vu en particulier la mise en place de l'enquête COQUELICOT et la poursuite de la surveillance nationale des patients atteints d'hépatite chronique B nouvellement pris en charge dans les Pôles de Référence et Réseaux Hépatites. L'enquête COQUELICOT est une enquête de séroprévalence du VIH et des hépatites virales B et C et de séro-incidence du VIH et du VHC chez des usagers de drogues ayant sniffé ou s'étant injecté au moins une fois au cours de leur existence. Un total de 2845 patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B a été inclus dans l'enquête de surveillance. Le volet virologique réalisé par le CNR a porté sur 625 patients dont les prélèvements ont été collectés à travers les différents laboratoires de virologie participant à cet observatoire. Cette année a également permis au CNR d'évaluer de nouvelles techniques (biologie moléculaire, optimisation de la recherche d'anticorps à partir de buvards, test rapide pour la détection d'AgHBs). Ces technologies sont essentielles à la réalisation des études en cours (enquête COQUELICOT).

Les activités d'expertise et de surveillance du laboratoire associé consacré aux hépatites virales en transfusion sanguine se sont poursuivies, en particulier l'évaluation

des performances des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) pour la détection d'anticorps anti-VHC, ainsi qu'une étude de la capacité de nombreuses trouses commerciales à détecter les mutants de l'enveloppe du VHB. La surveillance des marqueurs du VHB et du VHC chez les donneurs de sang s'est poursuivie en étroite partenariat avec l'InVS.

Le laboratoire associé du virus de l'hépatite delta a poursuivi les études en cours en particulier l'évaluation des performances de trouses pour la quantification de l'ARN du VHD, ainsi que l'évaluation d'un standard international ARN VHD. La surveillance des marqueurs du VHD s'est poursuivie en France mais également à l'étranger par la mise en place de nombreuses collaborations internationales notamment avec l'Afrique du Nord.

CNR COORDONNATEUR

LABORATOIRE DE VIROLOGIE ET INSERM U955

HOPITAL HENRI MONDOR

CRETEIL

Le CNR coordonnateur du CNR des Hépatites Virales B, C et delta est localisé au sein du laboratoire de virologie du service de Bactériologie-Virologie-Hygiène du groupe hospitalier Henri Mondor et utilise les compétences de ce laboratoire et celles de l'équipe de recherche "Physiopathologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques" (INSERM U955) qui lui est associée. Il est dirigé par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY, assisté du Docteur Stéphane CHEVALIEZ.

Le personnel, l'expertise, les équipements (en grande partie automatisés et à haut débit) du laboratoire de virologie et de l'équipe INSERM U955 sont mis à la disposition du CNR pour assurer la surveillance épidémiologique des hépatites B et C, contribuer à la veille, assurer la surveillance de la résistance aux médicaments antiviraux et participer au développement et à l'évaluation des techniques diagnostiques et des moyens de prévention, en collaboration étroite avec les autres composantes du CNR, l'InVS et les autorités sanitaires, le réseau des laboratoires nationaux et les réseaux de surveillance européens dont l'ECDC. Le laboratoire de virologie de l'hôpital Henri Mondor est ouvert et entièrement fonctionnel 24 heures sur 24, 7 jours sur 7.

MOYENS HUMAINS AFFECTES AU CNR

Le personnel du laboratoire de Virologie de l'hôpital Henri Mondor comprend (Figure 2) :

- . 1 Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
- . 1 Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier
- . 2 Praticiens Hospitaliers
- . 1 Assistant Hospitalier Universitaire
- . 1 Praticien Attaché
- . 1 Cadre Médico-Technique
- . 1 Ingénieur d'Etudes
- . 1 Assistant - Ingénieur
- . 2 Techniciens d'Etudes Biologiques
- . 16 Techniciens de Laboratoire (dont 3 affectés au laboratoire de garde)
- . 3 Internes de DES

- . 1 externe en Médecine
- . 2 Secrétaires Médicales

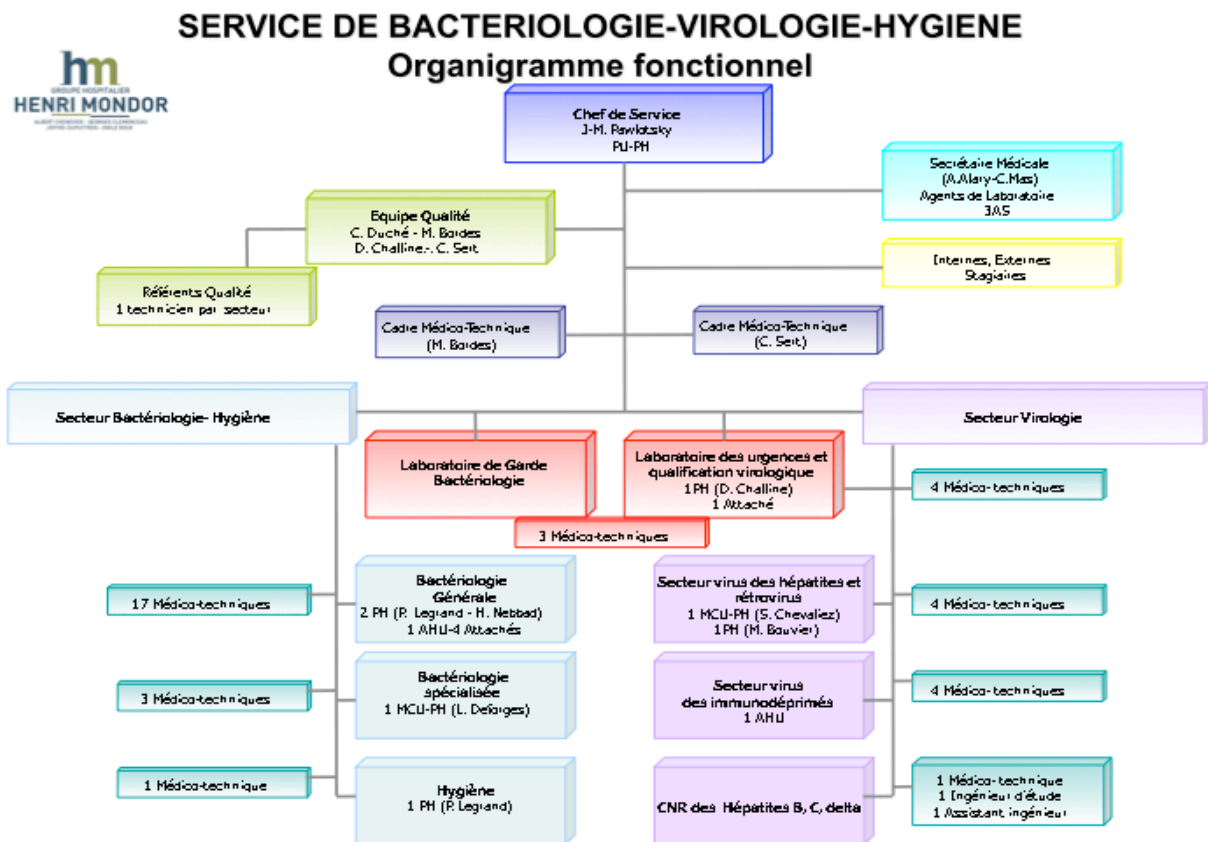


Figure 2 : Organigramme du service de Bactériologie-Virologie-Hygiène de l’hôpital Henri Mondor.

Le personnel suivant sera affecté au fonctionnement du CNR coordonnateur :

- . 0,15 Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
- . 0,60 Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier
- . 0,35 Praticien Hospitalier
- . 0,25 Praticien Attaché
- . 1,0 Ingénieur d’Etude (financement InVS)
- . 1,0 Technicien de laboratoire (financement InVS)
- . 0,10 Cadre de Santé Médico-Technique

LOCAUX ET EQUIPEMENTS

Le laboratoire hospitalo-universitaire de virologie occupe 250 m² de laboratoire, 105 m² de bureau, 175 m² de surface d'accueil, laverie et réserves, bibliothèque (certains locaux sont communs avec le secteur de Bactériologie-Hygiène) ; 30 m² sont réservés à la garde de nuit. Le laboratoire fonctionne 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Une réorganisation physique du laboratoire est prévue dans le cadre du schéma directeur des laboratoires du Pôle de Biologie, dont la date dépendra des financements accordés. Elle vise en particulier à créer, à côté de la plate-forme automatisée de sérologies déjà fonctionnelle, une plate-forme intégrée de biologie moléculaire en maladies infectieuses qui permettra de rationaliser et d'automatiser au maximum les activités actuellement réalisées au sein du laboratoire. Les activités du CNR bénéficieront grandement de cette restructuration. Par ailleurs, une plateforme de séquençage de nouvelle génération à haut débit (*next-generation sequencing*, NGS) est en cours de montage. Cette plateforme, qui bénéficie d'un investissement global de l'ordre de 3 millions d'euros, sera opérationnelle au début de l'année 2013, dans des locaux dédiés rénovés contigus au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, sous la responsabilité du Pôle de Biologie (Chef de Pôle : Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY) et de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB).

Les équipements à la disposition du CNR des Hépatites B, C et delta sont les suivants :

- Automates de sérologies virales

- . 3 VIDAS (BioMérieux),
- . 1 ACCESS II (Beckman),
- . 1 LIAISON (DIASORIN),
- . 1 VITROS 3600 (Ortho),
- . 1 ARCHITECT (Abbott),

- Automates dédiés à la détection et à la quantification des acides nucléiques

- . 1 extracteur automatique d'acides nucléiques COBAS AmpliPrep (Roche)
- . 2 extracteurs automatiques d'acides nucléiques *m2000_{SP}* (Abbott),

- . 1 extracteur QIA Symphony SP/AS (Qiagen),
- . 1 pipeteur-distributeur Cobas p630 (Roche),
- . 1 automate pour "ADN branchés" Siemens 340 (Siemens),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS Taqman 96 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS Taqman 48 (Roche),
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel *m2000_{RT}* (Abbott),
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel StepOnePlus (Applied Biosystems),
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel LighCycler 1.0 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel ABI7300 (Applied Biosystems),
- . 1 Rotor-Gene Q (Qiagen)
- . 1 thermocycleur à gradient MASTERCYCLE (Eppendorf),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 9700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2400 (Applied Biosystems),
- . 2 thermocycleurs ABI GENEAMP 9600 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur UNO II (Biometra).

- Automates dédiés à la caractérisation de la séquence des génomes viraux

- . 1 automate d'analyse des hybridations inverses AUTOBLOT 3000 (Siemens),
- . 1 Auto-LiPA 48 (Innogenetics)
- . 2 séquenceurs automatiques LONGREAD TOWER (Siemens),
- . 2 séquenceurs automatiques capillaires ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), disponibles sur la plate-forme du Centre de Recherche.

- Matériel destiné à la constitution et la conservation des thèques

- . Hottes à flux laminaires,
- . Congélateurs -80°C,
- . Chambres froides et congélateurs -20°C,
- . Cuves d'azote liquide.

- Equipements prévus pour la plateforme de NGS (ouverture début 2013)

- . 1 séquenceur haut débit HiSeq (ILLUMINA),

- . 1 séquenceur moyen débit MiSeq (ILLUMINA),
- . 2 séquenceurs moyen débit GS-FLX (Roche).

THEMATIQUES DE RECHERCHE

Les thématiques de recherche dans le domaine d'expertise du CNR coordonnateur se répartissent en 3 axes complémentaires qui couvrent largement les champs de la virologie des hépatites, de l'investigation technologique à la recherche clinique et translationnelle. Ces axes sont :

1. **Expertise technologique** : Développement, standardisation et évaluation de la performance intrinsèque et des indications des tests et des nouvelles technologies virologiques à visée diagnostique et de suivi thérapeutique des hépatites virales chroniques.
2. **Epidémiologie moléculaire** : Epidémiologie moléculaire et surveillance des virus des hépatites B et C dans le cadre du CNR des Hépatites Virales B, C et delta,
3. **Recherche clinique et translationnelle** : Etude de la variabilité génétique naturelle et associée à la chimiothérapie antivirale des virus des hépatites B et C, avec un intérêt tout particulier pour les mécanismes sous-tendant l'efficacité et l'échec thérapeutique et le rôle de la résistance antivirale dans l'échec thérapeutique.

Sur le plan plus fondamental, le laboratoire s'intéresse également au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant le VHC et aux mécanismes des lésions métaboliques et cancéreuses associées à l'infection par le VHC. Ce dernier sujet fait appel à des modèles animaux et cellulaires complexes.

DEVELOPPEMENT, STANDARDISATION ET EVALUATION DES TECHNIQUES A VISEE DIAGNOSTIQUE ET DE SUIVI THERAPEUTIQUE

Les activités de diagnostic et de suivi thérapeutique des malades atteints d'hépatites virales sont fondées sur l'utilisation de techniques virologiques comprenant des techniques immuno-enzymatiques de type ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) automatisées et des techniques de biologie moléculaire fondées sur

l'amplification génique par PCR, aujourd'hui principalement la PCR en temps réel, l'amplification du signal par les ADN branchés, l'hybridation inverse ou l'analyse de la séquence des génomes viraux par séquençage direct, clonage-séquençage ou pyroséquençage à haut débit (ultra-deep pyrosequencing, UDPS).

L'expertise du laboratoire en matière de diagnostic virologique des hépatites virales est reconnue internationalement, comme en témoignent les nombreux articles originaux et de revue publiés sur le sujet depuis de nombreuses années. Plusieurs évaluations de tests virologiques à visée diagnostique pour le VHC et le VHB, en partenariat avec les industriels qui les développent, ont été conduites. Ces évaluations ont concerné les techniques de biologie moléculaire adaptées à la détection et/ou la quantification de l'ARN du VHC et de l'ADN du VHB par PCR en temps réel, ainsi que des techniques de typage des génomes viraux par hybridation inverse ou séquençage visant à identifier le génotype et le sous-type viral ou des mutations de résistance après analyse des séquences nucléotidiques (méthodes de séquençage direct, clonage-séquençage, pyroséquençage à haut débit). Ces travaux ont donné lieu à des publications acceptées ou en préparation. Les réalisations dans ce domaine sont détaillées dans le bilan des activités du CNR sur la période 2011-2012.

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE ET SURVEILLANCE DES VIRUS D'HEPATITES B ET C

Le laboratoire hospitalier de virologie, en collaboration avec l'équipe de recherche INSERM, a développé tous les outils de typage moléculaire et d'analyse des génomes du VHB et du VHC (PCR, clonage, séquençage classique et pyroséquençage à haut débit, analyses génétiques et phylogéniques) nécessaires à la réalisation d'études en épidémiologie moléculaire des hépatites virales, en particulier dans un contexte de cas groupés ou dans un contexte épidémique. Les études réalisées dans le cadre des activités du CNR sont présentées ci-dessous dans le bilan d'activité.

ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE NATURELLE ET ASSOCIEE A LA CHIMIOOTHERAPIE ANTIVIRALE (RESISTANCE) DES VIRUS D'HEPATITES B ET C

L'échec thérapeutique et la résistance du VHB et du VHC aux molécules antivirales constituent une des principales thématiques du laboratoire et de l'équipe INSERM qui lui est associée, à la fois dans ses aspects cliniques et plus fondamentaux (étude des mécanismes moléculaires de l'efficacité et de l'échec des antiviraux).

De nombreux travaux d'investigation ont été réalisés dans cette thématique. Le laboratoire étudie ainsi les mécanismes moléculaires de l'action antivirale de la ribavirine dans le traitement des hépatites chroniques C. De nombreux mécanismes, hypothétiques, peuvent expliquer l'effet antiviral de la ribavirine dans le traitement de l'hépatite chronique C [inhibition directe de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (NS5B), inhibition de l'enzyme inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), effet mutagène, propriétés immunomodulatrices, modulation de l'expression des gènes induits par l'interféron (ISG) et des voies inhibitrices de l'interféron], le plus souvent sur la base de résultats générés *in vitro* (Lau *et al.*, 2002). Le rôle prépondérant d'aucun de ces mécanismes n'a cependant été confirmé au cours du traitement des hépatites chroniques C.

Nous travaillons actuellement sur la capacité de la ribavirine à induire des réponses cellulaires liées à l'immunité innée. Dans un premier temps, les effets de la ribavirine seule ou en association à l'interféron sur les voies de synthèse et de réponse à l'interféron ont été étudiés sur un modèle de cellules hépatocytaires immortalisées (cellules Huh7), en dehors de tout contexte d'infection virale. La ribavirine à des doses thérapeutiques (100 µg/mL) est capable d'augmenter la transcription de facteurs impliqués dans la synthèse d'interféron endogène de type I, et d'augmenter le niveau transcriptionnel de certains effecteurs de la réponse à l'interféron. L'effet le plus marquant est l'augmentation dépendante de la dose du niveau transcriptionnel des TLR (*Toll-like Receptors*), en particulier le TLR-7 (facteur 4,2), ainsi que des facteurs de transcription impliqués dans la synthèse endogène des interférons de type I, incluant l'IRF-7 (facteur 2,4), et l'IRF-9 (facteur 2,0). Il est également important de noter que le niveau de transcription des gènes codant certains effecteurs majeurs de la réponse antivirale à l'interféron, tels que GBP1 (facteur 2,6) ou IFIT2 (facteur 2,0) était également augmenté. Différentes concentrations de ribavirine (0, 1, 10, 100 et 1000 µg/mL) et différents temps (0, 30 min, 2 h, 8 h, 24 h et 48 h) ont été testés. L'effet observé était dépendant de la dose. L'effet maximum a été observé 24 heures après

traitement. Des effets additifs, voire synergiques, ont été obtenus par traitement des cellules Huh7 par la ribavirine (100 et 1000 µg/mL) en association à l'interféron alpha à la dose de 100 UI/mL. L'effet observé était d'autant plus important que la concentration en ribavirine augmentait d'un facteur 10.

Nos résultats, ainsi que d'autres récemment publiés (Thomas et *al.*, 2011), nous orientent vers l'étude du rôle d'IRF7 dans l'induction génique induite par la ribavirine. Pour cela, des cellules Huh7 cotransfectées par le réplicon subgénomique de génotype 1b (transfection stable) et un dominant négatif de l'IRF7 (transfection transitoire, Ning et *al.*, 2005) ont été traités par des doses croissantes de ribavirine (0, 10, 100 et 1000 µg/mL). A 48 heures post-traitement, le niveau de réplication du réplicon subgénomique a été mesuré par RT-qPCR à l'aide d'une sonde et d'amorces ciblant la région NS5B. La ribavirine est capable d'inhiber la réplication virale du réplicon subgénomique et ce, de façon dépendante de la dose, respectivement d'un facteur 5 et 9 pour les concentrations de ribavirine de 100 et 1000 µg/mL en l'absence d'expression du dominant négatif de l'IRF7. Cette inhibition est fortement diminuée en présence du dominant négatif de l'IRF7. Ces résultats suggèrent un rôle de l'IRF7 dans le mécanisme d'action de l'effet antiviral de la ribavirine. A partir de cellules Huh7 exprimant stablement le réplicon subgénomique de génotype 1b, Con-1 et transitoirement transfectées par des plasmides d'expression exprimant le gène rapporteur de la luciférase Firefly sous le contrôle du promoteur minimal de l'IRF7, la ribavirine était capable d'activer le promoteur du gène de l'IRF7 via l'élément régulateur IRF-E (*interferon regulatory factor element*). Cependant, aucune modification de la quantité protéique d'IRF7 ou de sa répartition subcellulaire n'a pu être mise en évidence par western blot après traitement par la ribavirine des cellules exprimant le réplicon subgénomique Con-1 de façon stable.

De plus, la ribavirine serait un agoniste du TLR-7. En effet, à partir de cellules HEK-Blue™-hTLR7 exprimant de façon stable le gène codant le TLR-7 humain et un gène rapporteur inductible codant le SEAP (*secreted embryonic alkaline phosphatase*), la stimulation par des concentrations croissantes de ribavirine induisait une activation dépendante de la dose de la production de l'enzyme SEAP. Des résultats comparables ont été observés avec le R848, agoniste puissant du TLR-7. Ces travaux vont dans le sens d'un rôle immunomodulateur de la ribavirine dans l'activation de la voie de signalisation de l'immunité innée par l'intermédiaire du TLR-7 et de l'IRF7, au carrefour des voies de signalisation de la réponse immune.

L'effet des inhibiteurs spécifiques du VHC et des analogues nucléos(t)idiques utilisés pour le traitement de l'hépatite B et leur capacité à sélectionner des variants viraux résistants est un des thèmes importants d'étude du laboratoire. Nous développons des techniques de séquençage à haut débit fondées sur le pyroséquençage et des logiciels originaux d'analyse des résultats générés par ces technologies afin de comprendre l'épidémiologie et de caractériser la résistance aux antiviraux utilisés dans le traitement de l'hépatite B et dans celui de l'hépatite C. Une plate-forme phénotypique de caractérisation de la résistance du VHC et du VHB aux antiviraux a été mise en place qui combine un certain nombre de modèles enzymatiques acellulaires et de modèles cellulaires de réplication et d'infection permettant la caractérisation de la résistance conférée par les substitutions amino acidiques observées chez les malades et l'étude du fitness des variants résistants.

AUTRES ACTIVITES DE RECHERCHE DU LABORATOIRE

Le laboratoire développe de nombreuses autres activités de recherche. Sur le plan clinique, en collaboration avec le service d'Hépatologie de l'hôpital Henri Mondor, le laboratoire a mis en place et participe actuellement à plus d'une vingtaine de protocoles cliniques testant l'efficacité et la tolérance de nouvelles molécules pour le traitement de l'hépatite C. Ces molécules incluent des inhibiteurs de protéases, des analogues nucléosidiques ou nucléotidiques, des inhibiteurs non nucléosidiques de la polymérase du VHC, des inhibiteurs de la protéine NS5A et des inhibiteurs de cyclophylane, utilisés en combinaison à l'interféron alpha et à la ribavirine, ou en combinaisons orales sans interféron.

L'équipe de recherche "Physiopathologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques", INSERM U955, poursuit également une recherche fondamentale dans deux domaines principaux. Le premier est le développement de nouvelles approches thérapeutiques et l'étude des mécanismes moléculaires de la résistance aux antiviraux développés contre le VHC. De nouveaux inhibiteurs du VHC ont été découverts au laboratoire, en collaboration avec des équipes de chimistes, et sont actuellement en phase de caractérisation pré-clinique, en particulier une toute nouvelle famille d'inhibiteurs des cyclophylines non dérivés de la cyclosporine A, des membres de la

famille des aurones, et des Flavonoïdes (ces deux derniers groupes de molécules agissant comme des inhibiteurs non nucléosidiques de l'ARN polymérase virale). Les mécanismes moléculaires de la résistance sont étudiés dans différents systèmes expérimentaux enzymatiques acellulaires, ou dans des systèmes cellulaires de réplication et d'infection par le VHC, grâce à des approches combinant mutagenèse dirigée et utilisation de cassettes comprenant les séquences virales des individus infectés et éventuellement traités.

Le deuxième thème de recherche principal du laboratoire concerne l'étude des mécanismes des lésions hépatiques associées à l'infection par le VHC à l'aide de modèles murins transgéniques et de modèles cellulaires. Les différents aspects étudiés sont la capacité de l'expression des protéines virales de jouer un rôle dans les perturbations métaboliques associées à l'hépatite chronique C (perturbations du métabolisme lipidique, insulino-résistance, diabète de type 2), dans la progression de la fibrose et dans la survenue du carcinome hépatocellulaire. L'hépatocarcinogenèse viro-induite constitue un des axes majeurs d'étude du laboratoire pour les prochaines années.

CAPACITES TECHNIQUES ACTUELLES DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE DU CNR

Les différentes techniques disponibles au laboratoire de virologie de l'hôpital Henri Mondor pour le diagnostic, le typage et l'évaluation de la sensibilité ou de la résistance aux antiviraux sont les suivantes :

- . Méthodes sérologiques automatisées permettant la détection et/ou la quantification d'antigènes viraux et d'anticorps, comme par exemple la détection et la quantification de l'antigène HBs, la détection de l'antigène HBe, des anticorps anti-HBc totaux et IgM, des anticorps anti-HBs et des anticorps anti-HBe, des anticorps anti-VHC totaux et des anticorps anti-HD IgG.

- . Méthode sérologique pour la détermination du génotype du VHC.

. Techniques de biologie moléculaire pour la détection et la quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC par PCR classique, par technique des ADN branchés, ou par PCR en temps réel artisanale et automatisée .

. Techniques de biologie moléculaire pour la détermination du génotype du VHC par séquençage direct des régions NS5B et core/E1, par technique d'hybridation inverse de seconde génération, qui inclut des sondes dirigées contre la région 5' non codante et la région codant la protéine de capsid (InnoLipa v2.0), et par technique de PCR en temps réel utilisant des amorces et sondes dans la région 5' non codante et dans la région NS5B (Abbott).

. Techniques de biologie moléculaire pour la détermination du génotype du VHB par séquençage direct de la région codant l'AgHBs et/ou la région PrÉS ou par hybridation inverse (Inno-LiPA HBV Genotyping assay).

. Techniques d'identification des VHB mutants de la région PréC/C par séquençage direct ou par hybridation inverse (Inno-LiPA HBV precore).

. Techniques de biologie moléculaire pour l'étude de la séquence des régions hypervariables HVR1 et de la glycoprotéine E1 du VHC, destinée aux études de transmission virale.

. Techniques de biologie moléculaire pour la détection des mutations de résistance du VHB associées à la chimiothérapie antivirale, fondées sur le séquençage direct du domaine transcriptase inverse de l'ADN polymérase ; l'hybridation inverse (Ino-LiPA HBV DR v3) ; la caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB par des techniques de clonage-séquençage ; et les techniques de détection des mutations de résistance et de caractérisation de leurs dynamiques par pyroséquençage à haut débit suivi de l'analyse des données par notre package de logiciels "maison" (UDPS).

. Techniques de biologie moléculaire pour la détection des mutations de résistance du VHC aux inhibiteurs directs, fondées sur le séquençage direct des

protéines NS3 (protéase), NS5B (polymérase) et NS5A; la caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB par clonage-séquençage; et les techniques de détection des mutations de résistance par pyroséquençage à haut débit suivi de l'analyse des données par notre package de logiciels "maison" (UDPS).

. Techniques de biologie moléculaire pour l'analyse de la séquence du gène S codant préS et l'AgHBs, en particulier la région hydrophile majeure (MHR) contenant des déterminants importants de la réponse humorale, appliquées aux études de transmission du VHB et à la recherche de mutants de l'AgHBs non détectés par les tests sérologiques (hépatites B dites "à virus mutant de l'AgHBs").

TECHNIQUES IMPLEMENTEES AU COURS DE L'ANNEE 2011

. Techniques de biologie moléculaire pour la détection et la quantification de l'ARN du VHC à partir de sang total recueilli sur buvard (DBS).

. Technique de détection par PCR en temps réel des polymorphismes génétiques du gène codant l'ITPA (inosine triphosphate) à partir de sérum ou de sang total, prédicteur de la survenue d'une anémie précoce chez les patients exposés à la ribavirine,.

BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES DE L'ANNEE 2011-2012

ACTIVITES D'EXPERTISE DANS LE DOMAINE DES OUTILS DIAGNOSTIQUES ET DE TYPAGE

Les activités de diagnostic et de suivi thérapeutique des malades atteints d'hépatites virales sont fondées sur l'utilisation de techniques virologiques comprenant des techniques immuno-enzymatiques de type ELISA automatisées et des techniques de biologie moléculaire fondées sur l'amplification génique par PCR (*Polymerase Chain*

Reaction), aujourd'hui principalement la PCR en temps réel, l'hybridation inverse ou l'analyse de la séquence des génomes viraux.

Plusieurs évaluations de tests virologiques à visée diagnostique pour le VHB et le VHC ont été réalisées en partenariat avec les industriels qui les développent. Ces évaluations ont concerné les techniques de biologie moléculaire adaptées à la détection et à la quantification de l'ARN du VHC par PCR en temps réel, ainsi que des techniques de typage des génomes viraux par pyroséquençage. Ces techniques visent à identifier des substitutions amino acidiques conférant la résistance du VHB ou du VHC aux inhibiteurs spécifiques. Ces travaux ont donné lieu à des publications soumises ou en préparation.

Etude des performances de la plate-forme Cobas AmpliPrep-Cobas Taqman 96 (CAP-CTM96, Roche) de seconde génération (v2.0) pour la détection et la quantification de l'ARN du VHC. Les performances intrinsèques de la plate-forme de PCR en temps réel Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan 96 (CAP/CTM, Roche Molecular Systems) de seconde génération (v2.0) ont été évaluées pour la quantification de l'ARN du VHC à partir d'échantillons sériques (n=103) provenant de patients infectés par un VHC de génotype 4 (Service d'Hépatogastroentérologie de l'hôpital Henri Mondor et Laboratoire Pasteur-Cerba, Docteur Jean-Dominique Poveda). Les résultats ont montré des performances satisfaisantes de cette nouvelle trousse vis-à-vis des souches de VHC de génotype 4. En effet, l'ARN du VHC de 4 patients infectés par un génotype 4 qui était indétectable avec la trousse de première génération (<12 UI/mL) était détectable à un niveau comparable à celui estimé à l'aide de la technique de bDNA (Versant HCV 3.0, technique de référence) ou d'une autre trousse de PCR en temps réel (*m2000*, Abbott) avec le test CAP/CTM de deuxième génération (Tableau 1). Alors qu'une sous-quantification de l'ARN du VHC était observée chez environ 30% des malades infectés par un VHC de génotype 4 avec la première génération du test CAP/CTM par rapport aux valeurs obtenues avec la technique bDNA (Figure 2A), l'ARN du VHC était très modestement surquantifié avec la seconde génération. Seuls 5 patients (6%) avaient une charge virale plus faible que celle obtenue avec le bDNA (différence maximale : -0,70 IU/mL) (Figure 2B).

Tableau 1 : Valeurs d'ARN du VHC des patients non détectés avec la version 1.0

Log ₁₀ UI/mL	CAP/CTM96 v1.0 (Roche)	CAP/CTM96 V2.0 (Roche)	m2000 (Abbott)	bDNA 3.0 (Siemens)
Patient 1 (4h)	<1,08	5,8	5,4	5,0
Patient 2 (4l)	<1,08	6,3	6,0	5,7
Patient 3 (4)	<1,08	6,7	6,5	6,2
Patient 4 (4k)	<1,08	5,4	5,7	5,8

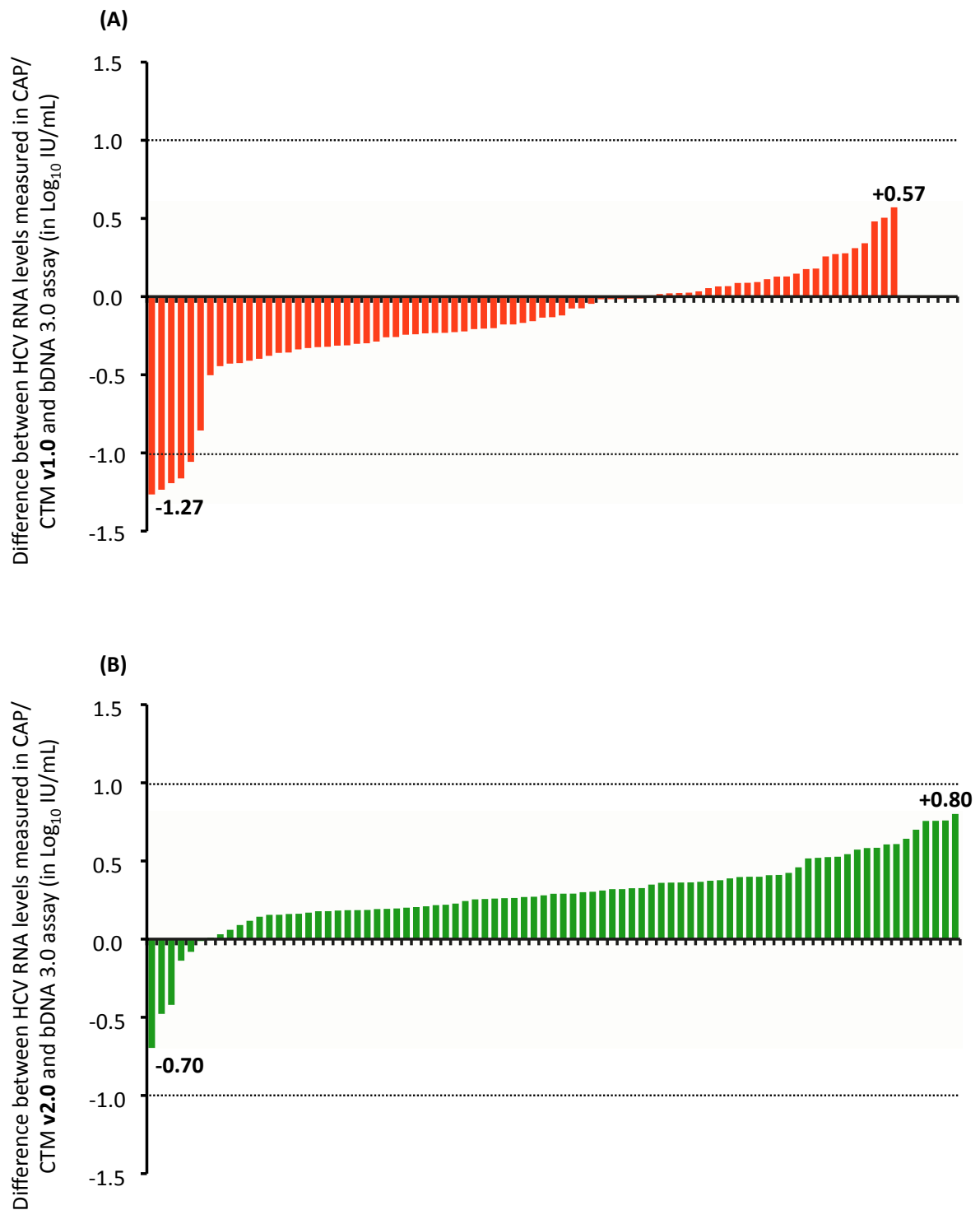


Figure 2 : Différences de charges virales (ARN du VHC) évaluées à l'aide de la trousse CAP/CTM96 HCV v1.0 (A) et v2.0 (B) et Versant HCV 3.0 (technique des ADN branchés).

Etude des performances d'un nouveau test rapide d'orientation diagnostique (TROD) pour la détection de l'antigène de surface du VHB (AgHBs).
 Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire associé de l'INTS (Dr Syria

Laperche). L'objectif était d'évaluer les performances intrinsèques d'un nouveau TROD, DRW-HBsAg v2.0 (Diagnostics for the Real World™, Ltd, UK) dans des populations variées de patients incluant des porteurs chroniques de l'AgHBs, ainsi que des sujets présentant une hépatite aiguë sévère d'étiologie inconnue et des femmes enceintes dont le statut vis-à-vis du VHB n'était pas connu testés par le laboratoire d'Urgences Virologiques de l'hôpital Henri Mondor. Le test rapide DRW-HBsAg v2.0 avait une meilleure sensibilité analytique (<1 UI/mL d'AgHBs) que l'ensemble des autres TRODs déjà commercialisées. Néanmoins, cette sensibilité n'est pas suffisante pour l'obtention d'un marquage CE/IVD. La spécificité du test, évaluée à partir d'un grand nombre d'échantillons (n=1475) était ≥98,0%. Le test DRW-HBsAg v2.0 était capable de détecter des AgHBs portant une ou plusieurs substitutions amino acidique(s) au niveau de la région MHR. Néanmoins, le test DRW-HBsAg v2.0 a été mis en défaut chez des patients chez qui le taux d'AgHBs circulant était faible (<1 UI/mL). Au total, ce nouveau test rapide est simple et suffisamment sensible pour être utilisé dans des populations à faible et fort risque d'infection B (Chevaliez et al., manuscrit soumis)

Contrôle de qualité européen de la détection-quantification de l'ARN du VHD. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire associé de l'hôpital Avicenne (Dr Emmanuel GORDIEN) et l'équipe d'hépatologie de l'Ecole de Médecine d'Hanovre, Allemagne (Pr Heiner WEDEMEYER). Elle a été motivée par l'absence de standardisation des techniques de détection-quantification de l'ARN du VHD par PCR en temps réel en l'absence de standards internationaux. L'objectif était d'évaluer les différences entre les résultats de techniques artisanales et de techniques commerciales réalisées dans les trois laboratoires experts participants. Deux couples d'amorces, deux tampons de réaction de PCR et deux appareils différents ont été utilisés pour quantifier 3 panels de standards différents. Un panel de 19 échantillons codés (dont un témoin négatif et 18 échantillons positifs de différents génotypes du VHD) ont été testés dans les trois laboratoires : le laboratoire d'Avicenne et le laboratoire d'Hanovre ont utilisé leur technique "maison" pour tester les échantillons, tandis que le CNR a testé les mêmes échantillons avec ces deux mêmes techniques importées et avec le test commercial LightMix Kit HDV (Roche). Des différences très importantes de performance des différentes méthodes, touchant la sensibilité, l'intervalle de quantification, la pente, l'efficacité de l'amplification, ont été observées entre les différentes techniques et entre

les trois laboratoires participants. Des différences de l'ordre de 1,5 à 2,0 Log₁₀ copies/mL ont été observés pour les mêmes échantillons. Les résultats dépendaient du choix des amorces, des tampons de réaction, des plateformes et des standards utilisés pour calibrer le test. Ces résultats importants soulignent la nécessité d'une standardisation des méthodes de détection et de quantification de l'ARN du VHD, car cette technique joue un rôle capital dans la prise en charge thérapeutique des malades co-infectés B-D. Ils soulignent également l'importance de la mise à disposition rapide de standards internationaux permettant de calibrer les techniques et les tests commerciaux et d'exprimer les résultats en UI/mL. La réalisation de contrôles de qualité réguliers pour cette technique est également nécessaire (Gatselis et al., manuscrit en préparation).

Contrôle de qualité national du géotypage de la résistance aux inhibiteurs de la protéine NS3 du VHC. Dans le cadre de l'AC33, présidée par le Pr. JM PAWLOTSKY, un contrôle de qualité national du géotypage de la résistance aux inhibiteurs de la protéase du VHC a été élaboré par le laboratoire de Microbiologie de Brest (Dr S. Vallet). L'objectif était d'évaluer par séquençage direct la détection des substitutions amino acidiques impliquées dans la diminution de sensibilité aux inhibiteurs de protéases dont deux (le telaprevir et le boceprevir) ont été récemment mis sur le marché aux Etats-Unis et en Europe pour le traitement de l'hépatite chronique C des patients naïfs ou en échec d'un traitement antérieur infectés par un VHC de géotype 1. Un panel de 12 échantillons codés (dont un témoin négatif et 11 échantillons positifs) a été testé dans de nombreux laboratoires français. Les résultats sont en cours d'analyse par le laboratoire de Microbiologie de Brest.

Le CNR coordonnateur a également participé au contrôle de qualité national des tests sérologiques du VHD, coordonné par le laboratoire associé de l'hôpital Avicenne.

**CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE OU A L'ALERTE :
CARACTERISATION VIROLOGIQUE DES ECHANTILLONS ET TYPAGE MOLECULAIRE
POUR LA SURVEILLANCE DE L'EPIDEMIOLOGIE DES TYPES VIRAUX ET L'EMERGENCE
DES MUTANTS**

Le laboratoire hospitalier de virologie, en collaboration avec l'équipe de recherche INSERM, a développé tous les outils de typage moléculaire et d'analyse des génomes du VHB et du VHC (PCR, clonage, séquençage, analyses génétiques et phylogéniques) nécessaires à la réalisation d'études en épidémiologie moléculaire des hépatites virales, en particulier en contexte épidémique.

Analyse systématique de génotypages du VHC ininterprétables. Une étude rétrospective, réalisée à partir d'échantillons sanguins en provenance du laboratoire d'analyses médicales Pasteur-Cerba (Docteur Jean-Dominique POVEDA) a été réalisée. Au total, 53 échantillons pour lesquels les résultats de génotypage par hybridation inverse de seconde génération étaient ininterprétables ont été analysés. Ces échantillons provenaient essentiellement de patients originaires d'Afrique subsaharienne et d'Afrique du Nord (Maroc, Maghreb, Tunisie). La détermination du génotype et du sous-type a été réalisée par séquençage direct des gènes codant les protéines NS5B et core-E1 (positions respectives 8325 à 8610 et 873 à 1265 par rapport à la souche prototype H77 de génotype 1a), suivi d'une analyse phylogénique en comparaison à des souches de référence des différents génotypes (1 à 7) et sous-types. Le type et le sous-type ont pu être déterminés chez 51 patients (96.2%). Deux échantillons n'ont pas été amplifiés au niveau des 2 régions et ce malgré des valeurs d'ARN du VHC détectables [respectivement 3,25 et 4,80 Log₁₀ UI/mL mesurées à l'aide de la méthode des ADN branchés (Versant HCV 3.0, Siemens)], et un échantillon n'a pas pu être amplifié au niveau de la région Core-E1. Sept patients (13,7%) étaient infectés par un génotype 1 dont un par un sous-type 1a, 2 par un sous-type 1b, un par un sous-type 1d, un par un sous-type 1g et un patient par un sous-type indéterminé. Parmi les patients de génotype 1, l'analyse phylogénique d'une trentaine de clones de la région core-E1 d'un des patients a montré un génotype différent de celui identifié à partir de l'analyse phylogénique de la région NS5B (4b versus 1a) avec des valeurs de re-échantillonnage élevées (respectivement 79% et 100%). Ce résultat suggérait fortement qu'un

évènement de recombinaison entre les génotypes 1a et 4b avait eu lieu. La détermination complète de la séquence nucléotidique sera nécessaire pour identifier le point de recombinaison. Vingt-quatre patients (47,1%) étaient infectés par un VHC de génotype 2. La majorité des patients, respectivement 10 et 9, étaient infectés par un sous-type 2l et 2i. Le reste des patients étaient infectés par un VHC de sous-type 2a (n=1), 2c (n=1) et trois par un sous-type indéterminé. Quatre patients (7,8%) étaient infectés par un génotype 3 dont par un sous-type 3h et un patient par un sous-type 3a. Dix patients (19,6%) étaient infectés par un génotype 4. La majorité des patients, respectivement 4 et 2, étaient infectés par un sous-type 4r et 4m. Les 4 patients restants étaient infectés respectivement par un sous-type 4f, 4g, 4l et 4o. Trois patients (5,9%) étaient infectés par un génotype 5, dont 2 patients avec un sous-type non-5a, seul sous-type disponible dans les banques de séquences de référence. Ce résultat suggère la probable existence d'un nouveau sous-type de génotype 5. Les trois patients (5,9%) restants étaient infectés par un génotype 6 avec 2 patients infectés par un sous-type 6e et un avec un sous-type 6q.

Dix souches (19,2%) étaient de génotype 4, tandis que l'on comptait 6 patients (11,5%) infectés par des souches de génotype 1, 4 (7,7%) par des souches de génotype 3, 3 (5,8%) par un génotype 5 et 2 (3,9%) par un VHC de génotype 6. Pour un échantillon, les résultats du génotypage étaient différents selon la région considérée (1a en NS5B et 4 en E1) et pourraient évoquer l'existence d'une souche de VHC recombinante. L'amplification génique des régions NS5B et E1 n'a pas été possible pour 2 échantillons, malgré des charges virales théoriquement suffisantes pour permettre une amplification par PCR (respectivement 3,3 Log₁₀ UI/mL et 4,8 Log₁₀ UI/mL). La raison évoquée est un défaut d'hybridation des amorces en raison de la présence de polymorphisme(s) nucléotidique(s). Il est important de noter que, dans 5 cas, il ne nous pas été possible de conclure quant au sous-type (3 souches de génotype 2 et 2 souches de génotype 5). Ces cas suggèrent l'existence de nouveaux sous-types de VHC de génotype 2 et 5 qui sont en cours de caractérisation (Figures 8A et 8B).

Enquête COQUELICOT. L'enquête COQUELICOT est une enquête de séroprévalence du VIH et des hépatites virales B et C et de séro-incidence du VIH et du VHC chez des usagers de drogues ayant sniffé ou s'étant injecté au moins une fois au cours de leur existence. Les résultats de cette enquête permettront d'ajuster les actions

de prévention et de disposer d'indicateurs pour évaluer leur impact. Au total, 1568 sujets ont accepté de participer à l'étude dans 5 villes (Lille, Strasbourg, Paris, Bordeaux, Marseille). Parmi les sujets ayant accepté de participer à l'étude, 886 étaient séronégatifs pour le VHC, dont 30 étaient séropositifs pour le VIH.

Mille quatre cent soixante-neuf buvards ont été reçus au mois de décembre 2011 par le CNR VIH (Pr Francis BARIN, Tours). Seuls 1320 buvards disposaient de spots utilisables. Huit cent quatre-vingt-six buvards étaient négatifs pour le VHC, dont 30 (3,4%) contenaient des anticorps anti-VIH. A partir de ces buvards, nous avons recherché l'ARN du VHC à l'aide d'une technique de PCR en temps réel standardisée (CAP/CTM96, Roche) et déterminé le génotype du VHC par analyse phylogénique d'une portion du gène codant la protéine NS5B (méthode de référence) lorsque les buvards étaient positifs en ARN. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2. La détection-quantification de l'ARN du VHC a été réalisée sur 885 buvards, soit un taux de réussite voisin de 99,9%. Parmi ces 885 buvards ne contenant pas d'anticorps anti-VHC, 54 (6,1%) contenaient de l'ARN viral. L'ARN était quantifiable dans la grande majorité des cas (moyenne de charge virale $2,62 \pm 0,88 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$) ; seuls 6 buvards avaient un ARN détectable mais non quantifiable ($< 1,20 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$). Parmi ces 54 patients qui répliquaient le VHC, 7 étaient également infectés par le VIH. La détermination du génotype viral a été possible chez 12 patients, avec la distribution des génotypes suivante : 5 patients infectés par un génotype 1, dont 3 par un génotype 1a et 2 par un génotype 1b, 2 patients infectés par un génotype 2b, 1 patient par un génotype 3a et 4 patients étaient infectés par un génotype 4, 2 par un génotype 4a et 2 par un génotype 4r. L'interprétation de ces résultats ne sera possible qu'après l'analyse des questionnaires comportementaux lorsque leur saisie sera achevée.

Surveillance des patients atteints d'hépatite chronique B nouvellement pris en charge au sein des Pôles de Référence et des Réseaux Hépatites. Au cours de la période 2008-2011, un total de 2845 patients (59% d'hommes, d'âge moyen 36,0 ans, dont 19% nés dans un pays de faible endémicité et 81% dans un pays de forte ou moyenne endémicité) a été inclus dans l'enquête de surveillance. Le volet virologique réalisé par le CNR à porté sur 625 patients dont les prélèvements ont été collectés à travers les différents laboratoires de virologie participant à cet observatoire.

Tableau 2 : Résultats de l'analyse moléculaire des buvards séronégatifs pour le VHC

Numéro	Ville	Sérologie VHC		ARN du VHC (Log UI/mL)	Repassage	Genotype VHC	Sérologie VIH
		Ratio	Interprétation				
153	Strasbourg	0,025	négatif	<1,20	TND		
60	Bordeaux	0,191	négatif	4,80		3a	
67	Bordeaux	0,272	négatif	<1,20	QI		Positif
385	Lille	0,062	négatif	4,00	QI	1a	
412	Lille	0,099	négatif	<1,20	QI		
416	Lille	0,122	négatif	5,40			
423	Lille	0,12	négatif	5,00		1a	
424	Lille	0,12	négatif	5,50			
703	Lille	0,035	négatif	3,85		2b	
710	Lille	0,06	négatif	2,30	QI	PCR négative	
1042	Lille	0,061	négatif	3,15		PCR négative	
1209	Lille	0,121	négatif	1,95	TND	4r	
1673	Lille	0,1	négatif	2,95	QI	PCR négative	
1693	Lille	0,026	négatif	3,75		2b	
487	Marseille	0,066	négatif	1,30	TND	PCR négative	
588	Marseille	0,07	négatif	2,05	TND	PCR négative	
225	Marseille	0,412	négatif	2,40		1b	Positif
308	Marseille	0,239	négatif	2,40		PCR négative	Positif
502	Marseille	0,177	négatif	4,05		1a	Positif
786	Marseille	0,461	négatif	3,10		PCR négative	Positif
860	Marseille	0,124	négatif	1,30	QI	PCR négative	Positif
880	Marseille	0,156	négatif	3,10		PCR négative	Positif
282	Paris	0,037	négatif	1,50	TND	PCR négative	
299	Paris	0,138	négatif	3,40	3,2		
316	Paris	0,05	négatif	<1,20	TND	PCR négative	
832	Paris	0,12	négatif	1,90	TND	PCR négative	
905	Paris	0,142	négatif	2,35	QI	PCR négative	
911	Paris	0,09	négatif	2,30	QI	PCR négative	
1010	Paris	0,063	négatif	2,00	TND	PCR négative	
1088	Paris	0,198	négatif	1,40	TND	PCR négative	
1145	Paris	0,066	négatif	1,80	TND	PCR négative	
1341	Paris	0,045	négatif	3,30	QI	PCR négative	
1430	Paris	0,101	négatif	2,55	QI	PCR négative	
1481	Paris	0,056	négatif	1,45	TND	PCR négative	
1482	Paris	0,145	négatif	1,50	TND	PCR négative	
1487	Paris	0,14	négatif	1,40	TND	PCR négative	
1510	Paris	0,27	négatif	2,70	2,55	PCR négative	
1524	Paris	0,054	négatif	1,80	QI	PCR négative	
1528	Paris	0,04	négatif	2,15	QI	PCR négative	
1534	Paris	0,05	négatif	3,00		4r	
1543	Paris	0,088	négatif	1,85		PCR négative	
1552	Paris	0,035	négatif	1,30		PCR négative	
1554	Paris	0,182	négatif	2,30		PCR négative	
1555	Paris	0,043	négatif	2,20		1b	
1569	Paris	0,12	négatif	2,25		4a	
1583	Paris	0,091	négatif	2,10	QI	PCR négative	
1587	Paris	0,207	négatif	3,50	QI	PCR négative	
1588	Paris	0,066	négatif	2,15	QI	PCR négative	
1591	Paris	0,233	négatif	2,30	QI	PCR négative	
1749	Paris	0,084	négatif	<1,20	TND	PCR négative	
1760	Paris	0,172	négatif	1,60	1,45	PCR négative	
1775	Paris	0,04	négatif	<1,20	TND	PCR négative	
914	Paris	0,115	négatif	1,50	QI	PCR négative	
1342	Paris	0,031	négatif	3,80	QI	4a	

Les caractéristiques virologiques des patients sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques virologiques des 625 patients infectés par le VHB identifiés dans le réseau des Centres de Référence français

AgHBe-négatif [n(%)]	550(88,0%)
ADN du VHB (Log ₁₀ UI/mL) (moyenne±DS)	3,66±1,42
ADN du VHB ≥3,30 Log ₁₀ UI/mL [n(%)]	226 (36,2%)
ADN du VHB <3,30 Log ₁₀ UI/mL [n(%)]	399 (63,8%)
ADN VHB indétectable (<1,20 Log ₁₀) [n(%)]	105 (16,8%)
Titre de l'AgHBs (Log ₁₀ UI/mL) (moyenne±DS)	3,38±0,78
Génotype du VHB [n(%)]	
Déterminés	459 (73,4%)
Non amplifié	166 (26,6%)

La grande majorité des patients (88,0%) étaient infectés par un virus mutant de la région pré-C/C (AgHBe-négatif). Près de 64% des patients avaient un ADN du VHB inférieur à 3,3 Log₁₀ UI/mL (<2000 UI/mL). Les génotypes D (32,7%), E (27,4%) et A (25,5%) étaient les plus fréquents (Figure 3).

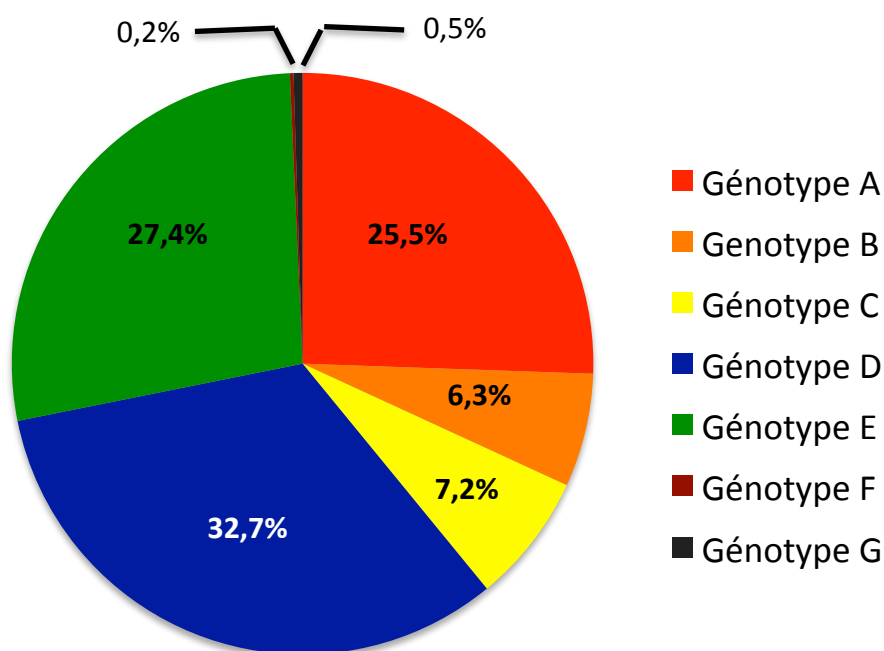


Figure 3 : Répartition des génotypes du VHB

Le titre d'AgHBs, mesuré par une méthode de chimioluminescence automatisée (Architect, Abbott), était en moyenne de $3,38 \pm 0,78 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$. Les titres d'AgHBs étaient comparable quel que soit le génotype viral. Le titre d'AgHBs sérique était positivement corrélé à la charge virale sérique et ce, indépendamment du génotype viral ($r=0,37, p<0,001$) (Figure 13). Cette corrélation était plus forte chez les patients AgHBe-positif ($r=0,56, p<0,001$) que chez les patients AgHBe-négatif ($r=0,22, p<0,001$).

Au total, en France, la plupart des patients nouvellement pris en charge pour une hépatite chronique B sont AgHBe-négatifs et ont une charge virale $<3,3 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ ($<2000 \text{ UI/mL}$). Les génotypes D, E et A sont les génotypes les plus prévalents. Bien que la production d'AgHBs par les hépatocytes infectés ne dépende pas seulement du cycle répliatif du VHB, le taux d'AgHBs sérique est corrélé au niveau de l'ADN du VHB, en particulier chez les patients AgHBe-positifs.

Nous sommes en train de caractériser la résistance primaire aux analogues nucléosidiques et nucléotidiques utilisés dans le traitement de l'hépatite chronique B par pyroséquençage ultra-sensible dans cette cohorte de patients. Ces résultats seront corrélés aux données cliniques recueillies en parallèle.

INVESTIGATION DES CAS ISOLÉS ET GROUPES DE TRANSMISSION

L'investigation de nombreux cas isolés et de quelques cas groupés de transmission du VHB et du VHC, en particulier dans un contexte de transmission nosocomiale de ces virus, a été réalisée au CNR.

Transmission du VHC au sein de l'unité d'hémodialyse du centre hospitalier de la côte Basque. L'étude génétique et phylogénique menée au niveau de 2 régions du génome viral (portion du gène NS5B et région HVR1 localisée au sein du gène codant la glycoprotéine d'enveloppe E2) chez le patient source et le cas index étaient phylogéniquement proches, avec une valeur de re-échantillonnage de 68% (Figure 4). Nous avons été dans l'incapacité et ce, malgré plusieurs tentatives, d'amplifier la région E1. Les analyses génétiques et phylogéniques des souches de VHC issues de ces deux patients permettait d'estimer que l'infection par la même souche de VHC était possible, mais ne pouvait être affirmée à 100% au vu des résultats de l'analyse et du matériel fourni.

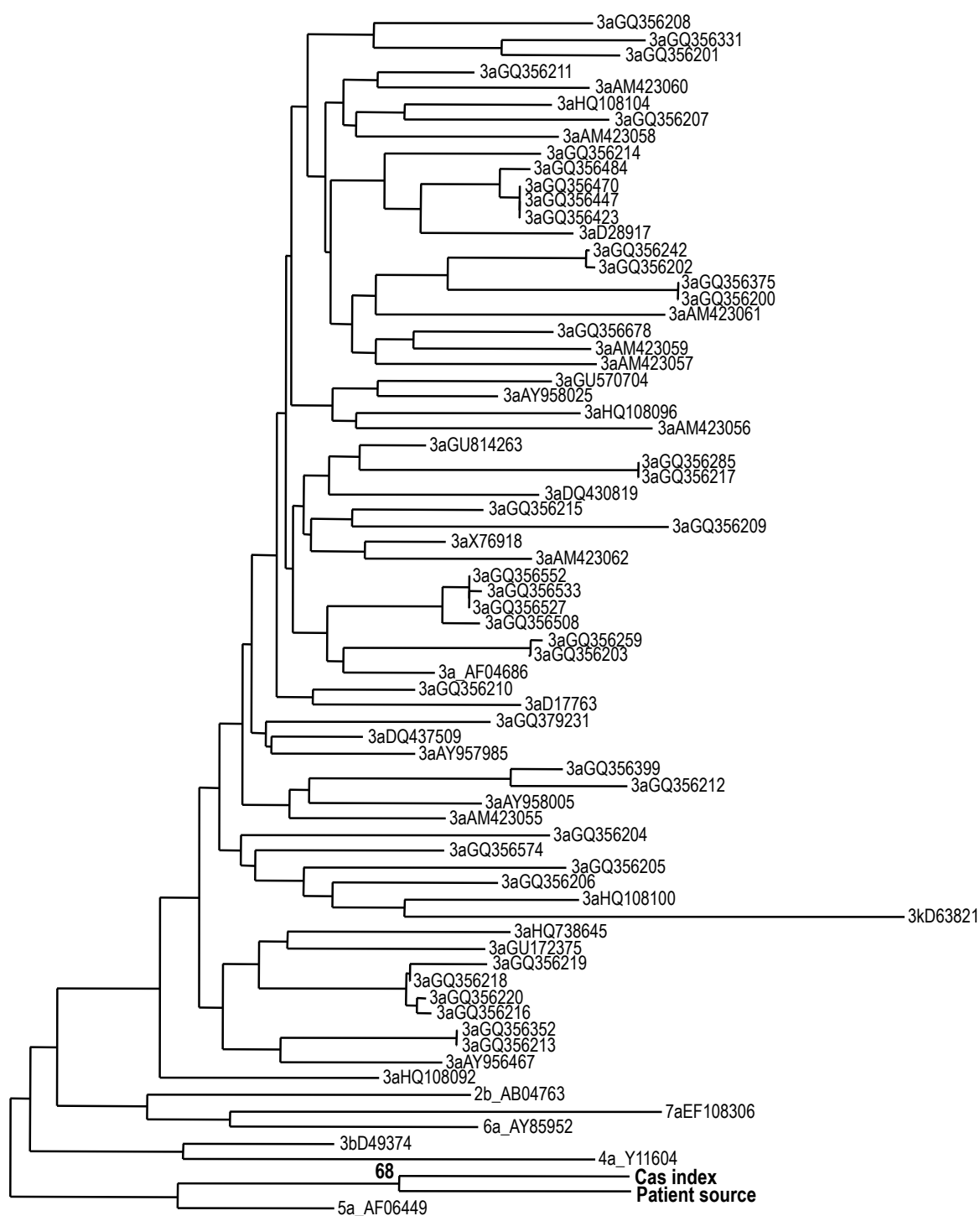


Figure 4 : Phylogénie de la région HVR1 du VHC (81 nucléotides). Analyse réalisée par DNADIST (Phylip 3.65), Kimura 2-parameter, Ts/Tv 2.0. Les chiffres indiqués au niveau des nœuds correspondent aux pourcentages de 1000 re-échantillonnages.

Transmission du VHC au sein de l'unité d'hémodialyse de la clinique AIDER à Montpellier. L'étude génétique et phylogénique menée au niveau de 3 régions du génome viral (portion du gène NS5B, intégralité de la région codant la glycoprotéine E1 et région HVR1 localisée au sein du gène codant la glycoprotéine d'enveloppe E2) chez deux patients sources et le cas index a permis de montrer que les souches isolées de deux des trois patients étaient phylogéniquement très proches, avec une forte valeur de re-échantillonnage de 98%. Le troisième patient était infecté par une souche de génotype 6e, tandis que les 2 autres étaient infectés par un génotype 1b, génotype viral le plus fréquemment isolé en Europe. Les analyses menées au niveau des régions E1, HVR1 et NS5B suggéraient donc très fortement que le cas index avait été infecté au cours d'une séance d'hémodialyse à partir du sang de l'un des 2 patients sources.

Contamination de lait maternel du lactarium de Marmande par une donneuse porteuse de l'AgHBs. Suite au signalement relatif à une possible contamination de lait maternel, les paramètres virologiques (AgHBs, anticorps anti-HBc et ADN du VHB) ont été recherchés au niveau de différents lots de lait maternel ainsi que chez la donneuse porteuse de l'AgHBs. Chez la donneuse AgHBs-positif, l'ADN du VHB était indétectable dans tous les échantillons testés (<40-80 UI/mL selon le facteur de dilution réalisé). L'AgHBs et les anticorps anti-HBc étaient absents des 9 échantillons de lait maternel. La recherche de l'ADN viral était négative dans un échantillon, positive mais non quantifiable dans 2 échantillons et positive quantifiable proche du seuil de détection dans les 6 autres échantillons. Cette recherche de l'ADN viral a été réalisée en triplicate à l'aide de 2 méthodes de PCR en temps réel (seuil de détection 15-20 UI/mL). Dans la mesure où les méthodes de biologie moléculaire n'étaient pas validées pour ce type de matrice biologique et où leur résultats pourraient correspondre à de faux positifs (étant donné que l'ADN était indétectable chez la donneuse), les résultats virologiques étaient plutôt rassurants quant au risque éventuel de transmission via le lait maternel.

SURVEILLANCE ET CARACTERISATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIVIRAUX

L'échec thérapeutique et la résistance du VHB et du VHC aux molécules anti-virales constituent une des principales thématiques d'investigation du laboratoire et de l'équipe INSERM qui lui est associée, à la fois dans ses aspects cliniques et plus fondamentaux (étude des mécanismes moléculaires de l'efficacité et de l'échec des traitements antiviraux). Un certain nombre de travaux d'investigation ont été réalisés au sein du CNR dans cette thématique. Plus largement, une action coordonnée a été créée au sein de l'ANRS, présidée par le Pr Jean-Michel PAWLOTSKY, dont une des missions est de mettre en place un réseau efficace de surveillance de la résistance des virus d'hépatites aux médicaments antiviraux en France, en relation étroite avec le CNR et l'InVS.

Recherche de mutations de résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques. Au cours de l'année 2011, plusieurs recherches de mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques utilisés dans le traitement de l'hépatite chronique B ont été réalisées par le CNR dans le cadre d'un échec thérapeutique secondaire (6 demandes au total).

Développement et utilisation des techniques de pyroséquençage à haut débit pour la surveillance et la caractérisation de la résistance du VHC aux antiviraux spécifiques. De nouvelles approches fondées sur le pyroséquençage à haut débit (UDPS) sont récemment venues compléter l'arsenal des méthodes d'étude génotypique de la résistance aux antiviraux (classiquement séquençage direct, hybridation inverse, clonage-séquençage). Ces techniques ont la particularité de générer un nombre très élevé de séquences au cours de la réaction (plusieurs milliers, voire dizaines de milliers) par échantillon analysé. Elles possèdent donc une sensibilité importante pour la détection de variants minoritaires au sein de populations virales complexes. Ces méthodes posent cependant des problèmes spécifiques, en particulier les problèmes de filtrage qualitatif des séquences générées et l'abondance des informations qui doivent être traitées et pour lesquelles aucun logiciel d'analyse adapté à la virologie n'existe. Nous avons donc développé une série de logiciels originaux (et protégés), comprenant de nombreux filtres de qualité, pour l'analyse des données virologiques générées par les techniques de pyroséquençage : PyroClass[®] permet la classification automatique des séquences générées ; PyroMute[®] permet l'analyse des mutations ;

PyroDyn® permet la mise en évidence des croissances ou décroissances exponentielles de populations virales ; PyroLink® permet d'établir les liaisons entre mutations situées sur les mêmes brins viraux. Les études ci-dessous montrent les possibilités offertes par ces technologies dans la surveillance et la caractérisation de la résistance aux antiviraux dirigés contre le VHC et le VHB.

L'effet d'un inhibiteur spécifique de la protéase NS3 du VHC, le telaprevir (Vertex Pharmaceuticals) a été étudié et la fréquence de la sélection de variants viraux résistants à ces molécules et la dynamique de ces variants a été analysée au cours du traitement et après son arrêt à l'aide d'une technique d'UDPS. L'étude de Phase II PROVE-2, coordonnée par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY et récemment publiée dans le *New England Journal of Medicine* (Hézode et al., N Engl J Med 2009 ; 360(18) : 1839-50), a évalué l'activité antivirale du telaprevir chez 320 patients naïfs de tout traitement infectés par un VHC de génotype 1 en combinaison à l'interféron alpha, avec ou sans ribavirine. Vingt malades ont été inclus dans le service d'Hépatologie de l'hôpital Henri Mondor et les dynamiques des variants viraux sensibles et résistants au telaprevir ont été étudiées par UDPS ; des résultats ont pu être générés chez 18 patients. Six patients (3 infectés par un VHC de sous-type 1a et 3 de sous-type 1b) recevant le telaprevir à la dose de 750 mg toutes les 8 heures en association à l'interféron alpha-2a pégylé à la dose de 180 µg par semaine sans ribavirine pendant 12 semaines ont rechuté sous traitement (non-répondeurs) ou après l'arrêt de celui-ci (répondeurs-rechuteurs), tandis qu'un patient sous trithérapie associant le telaprevir, l'interféron alpha pégylé et la ribavirine n'a pas éliminé le virus. Des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase pré-existaient, généralement à des taux faibles (<6,8%) chez la majorité des patients non encore exposés aux inhibiteurs de protéase (Tableau 4). Deux malades abritaient cependant une majorité de variants résistants au telaprevir avant même le début du traitement (mutations respectivement aux positions 54 et 55).

L'étude de la dynamique des variants viraux résistants au telaprevir au moment de la ré-ascension de la répllication virale a été caractérisée par UDPS. Elle était complexe et caractérisée : 1) par un enrichissement progressif en populations virales résistantes au telaprevir qui portaient de nombreuses substitutions amino acidiques comprenant à la fois des mutations de résistance à des positions connues (36, 54, 155) et des mutations à d'autres positions probablement impliquées dans le fitness du virus résistant (Figure 5 : exemple du Pt-11) ; 2) par une décroissance progressive et très

lente des populations résistantes au traitement débutant immédiatement après l'arrêt du telaprevir et leur remplacement par des populations sensibles (Figure 6 : exemple du Pt-1) (Chevaliez et al., manuscrit en préparation).

Tableau 4 : Fréquence des substitutions amino acidiques connues pour conférer la résistance aux inhibiteurs de protéase, détectées avant tout traitement chez des sujets jamais traités auparavant par pyroséquençage ultra-sensible.

Patient	Génotype H28B*	Sous-type	pegIFN	RBV	TVR	Réponse virologique	V36 A/M	T54 A/S	V55A	Q80 R/K	R155 K/T/Q	A156 S/T/V	D168 A/V/T/H	I170 A/T
Pt-1	CT	1a				NR	-	90,0%	-	-	0,1%	0,4%	0,1%	0,5%
Pt-2	CT	1a				NR	-	-	-	-	0,1%	1,1%	-	0,2%
Pt-3	CT	1b				RR	-	-	-	-	0,5%	0,5%	-	0,2%
Pt-4	TT	1b				RR	-	29,4%	-	-	-	1,3%	-	0,1%
Pt-5	CT	1a				RR	-	-	-	-	0,1%	2,9%	0,1%	-
Pt-6	CT	1b				RR	4,2%	-	-	-	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Pt-7	CT	1a				RVS	-	11,1%	-	0,7%	-	0,3%	-	0,3%
Pt-8	CT	1a				RVS	-	-	-	-	0,1%	0,5%	0,1%	-
Pt-9	CC	1a				RVS	-	-	-	-	0,6%	1,8%	-	-
Pt-10	CC	1a				RVS	-	-	-	-	0,6%	-	-	0,1%
Pt-11	TT	1a				RR	-	-	100,0%	0,1%	6,0%	3,2%	0,1%	0,3%
Pt-12	CT	1b				RVS	-	-	-	-	-	0,3%	-	0,1%
Pt-13	CT	1b				RVS	-	-	-	-	0,2%	0,2%	-	0,8%
Pt-14	TT	1b				NR	-	-	-	-	0,1%	0,2%	-	0,1%
Pt-15	CT	1b				RVS	-	-	-	-	0,4%	0,2%	0,1%	0,1%
Pt-16	CT	1a				RVS	-	-	1,3%	0,5%	7,8%	0,2%	0,1%	0,1%
Pt-17	CT	1a				RVS	-	47,4%	-	-	0,1%	0,4%	0,1%	0,1%
Pt-18	CT	1b				RVS	-	20,0%	-	-	0,1%	0,4%	0,1%	0,1%

PegIFN: interféron pégylé alpha-2a; RBV : ribavirine; TVR : telaprevir
RVS : réponse virologique soutenue; RR: répondeur-rechuteur; NR: non-répondeur
seuil=0.1% selon test statistique basé sur la loi de Poisson

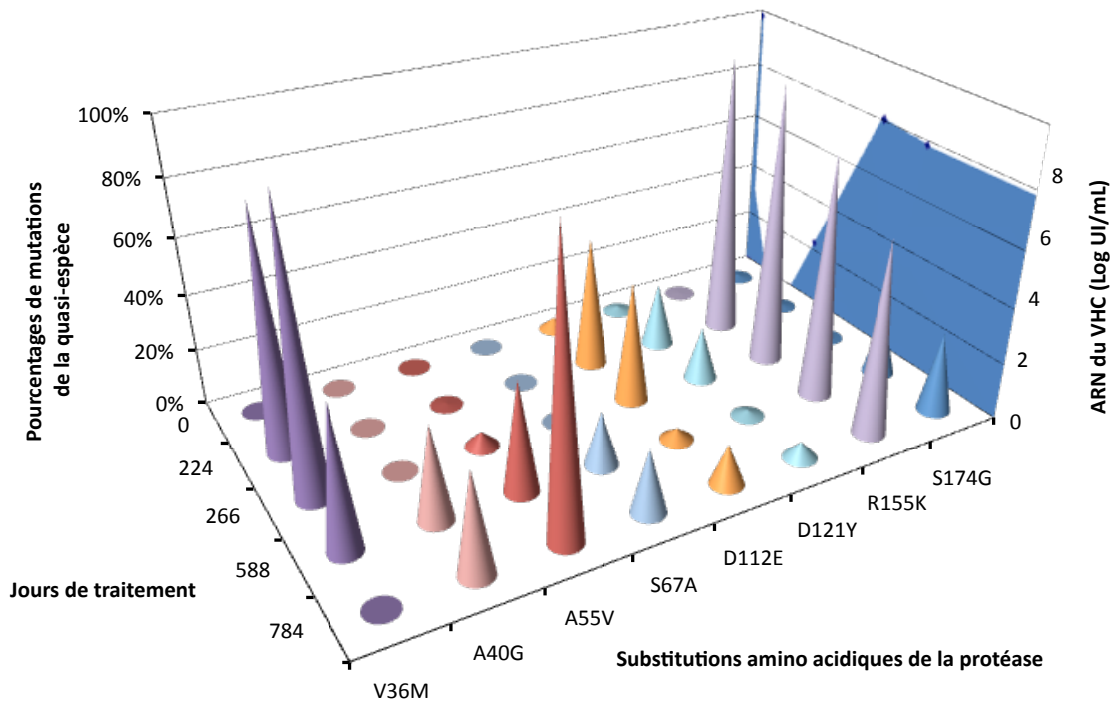


Figure 5 : Dynamique des substitutions amino acidiques associées à la résistance au telaprevir et au fitness des variants viraux résistants analysée par UDPS

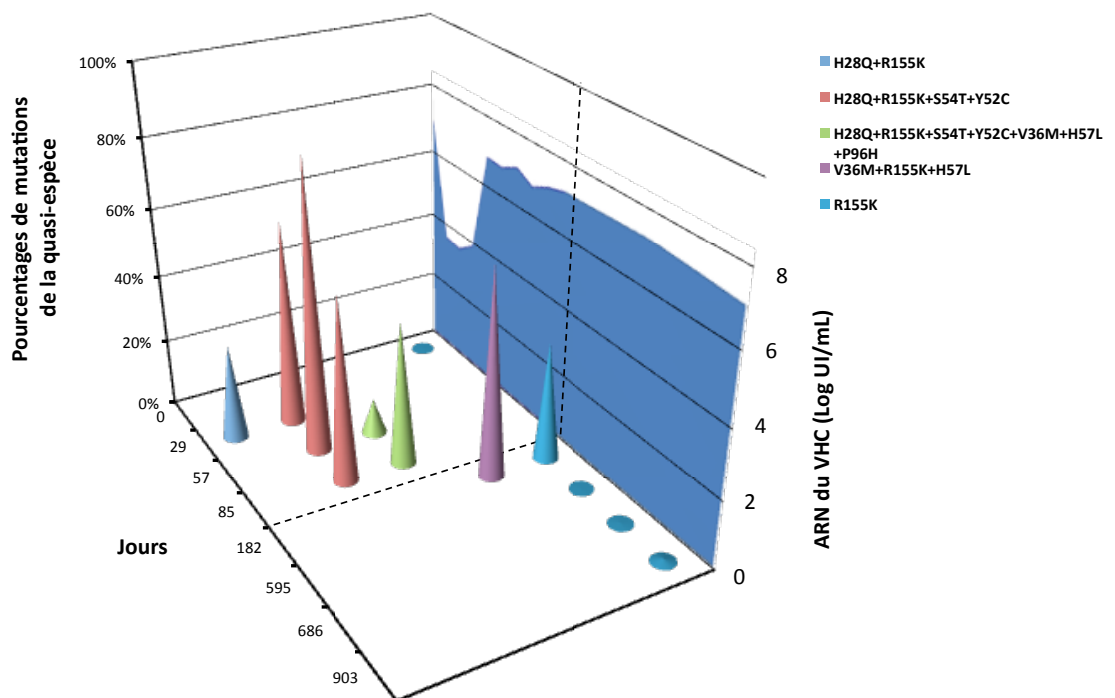


Figure 6 : Dynamiques des populations virales résistantes (étude de liaison des substitutions amino acidiques) au cours et après l'arrêt de l'administration du telaprevir.

Les techniques de séquençage ultra-sensible par UDPS ont également été utilisées pour caractériser les dynamiques des populations virales du VHB au cours du traitement par adefovir en monothérapie chez des sujets qui ont développé une résistance à cette molécule au cours du traitement. Plus de 480000 séquences (111 Mb) ont été générées à partir de 119 échantillons sériés prélevés au cours du traitement (25 à 56 mois) chez 7 malades. L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide des logiciels Pyromute[®] et Pyrotree[®] développés par le laboratoire. Elle a permis de montrer que des substitutions connues pour conférer la résistance du VHB à l'adefovir, mais aussi à la lamivudine, à la telbivudine et à l'entecavir, étaient présentes sous la forme de populations minoritaires chez tous les patients (Tableau 5). L'utilisation de la technique de pyroséquençage au cours du traitement a permis de mettre en évidence la sélection de variants viraux résistants plusieurs mois avant les techniques classiques fondées sur le séquençage direct et même le clonage et séquençage d'une vingtaine de clones par échantillon. (Rodriguez et al., manuscrit soumis).

Tableau 5 : Fréquence des substitutions amino aciques susceptibles de conférer la résistance aux analogues nucléos(t)idiques avant la mise en route du traitement par adéfovir chez des sujets jamais exposés aux analogues nucléos(t)idiques.

	rtV173L	rtL180M	rtM204V/I	rtA181V/T	rtN236T	rtT184S/A/I/L	rtS202G
Proportion de variants (intervalle, %)	ND	0,12	0,07-0,32	0,18-0,33	0,05-0,25	0,17	0,11
Nb. de patients (n, %)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)	4 (66,7%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)

Coordination de la surveillance de la résistance à l'échelon national et création de l'Action Coordonnée 33 (AC33) de l'ANRS consacrée à la "Résistance des Virus d'Hépatites B et C aux Antiviraux". L'année 2009 a vu la création d'une nouvelle action coordonnée (AC) au sein de l'ANRS consacrée à la "Résistance des virus d'hépatites B et C aux antiviraux", l'AC33, présidée par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY et à laquelle participent le Dr Stéphane CHEVALIEZ du CNR et le Dr Christine LARSEN de l'InVS. Les objectifs de cette nouvelle AC sont :

- 1- De constituer un groupe de réflexion et d'action pluri-disciplinaire sur la problématique de la résistance du VHB et du VHC aux antiviraux.

- 2- De coordonner l'action des services cliniques (en collaboration avec la Fédération Nationale des Pôles de Référence et Réseaux Hépatites), des laboratoires de virologie, et des plates-formes de recherche existantes.
- 3- De développer et mettre en place de nouvelles technologies appliquées à l'étude de la résistance des virus d'hépatites.
- 4- De mettre en place une base de données centralisées de la résistance du VHC et du VHB, en coordination avec le group HCV DRAG (Drug Resistance Advisory Group) animé par le Forum for Collaborative HIV Research.
- 5- De mettre en place un observatoire national de la résistance du VHB aux antiviraux.
- 6- De participer à la mise en place d'une cohorte de malades infectés par le VHC naïfs et non répondeurs traités, afin d'assurer de façon prospective, dans le contexte d'une montée en charge prochaine de l'utilisation des nouvelles molécules, la recherche en épidémiologie, en virologie et en thérapeutique sur la résistance du VHC.
- 7- De mettre en place un réseau d'analyse de la résistance croisée, fondé sur l'analyse systématique par les plates-formes existantes de la sensibilité aux nouveaux antiviraux de toutes les substitutions décrites comme conférant la résistance à une molécule disponible sur le marché ou en développement.
- 8- D'assurer la centralisation et la veille scientifique via un site internet dédié (publications, analyses et commentaires, résultats des études institutionnelles et industrielles, ...)

L'AC33 est une AC multidisciplinaire, qui associe cliniciens, virologues, immunologistes, chercheurs fondamentaux, biostatisticiens, pharmacologues, méthodologistes et épidémiologistes. Les premières réunions de l'AC33 ont permis de mettre en chantier un certain nombre de projets. Un groupe de Virologie Médicale de l'AC33 a été créé, qui regroupe l'ensemble des centres de virologie hospitalo-universitaires et hospitaliers impliqués dans la surveillance de la résistance des virus d'hépatites aux antiviraux. Ce groupe permettra la mise en réseau des différents laboratoires en charge de la surveillance et de la prise en charge de la résistance sur le territoire national et leur connexion avec les plates-formes génétiques, biochimiques et cellulaires d'étude de la résistance.

Les travaux de l'AC33 ont permis la mise en place d'un programme de recherche en virologie et pharmacologie associé à la cohorte CUPIC, qui accompagne l'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) du telaprevir et du boceprevir chez les sujets cirrhotiques, infectés par un VHC de génotype 1, préalablement traités et répondeurs-rechuteurs ou répondeurs partiels à ce premier traitement. Ces travaux s'appuieront également sur la constitution, sous la responsabilité de l'ANRS, de la grande cohorte nationale HEPATHER avec l'ensemble des acteurs cliniciens du champ de recherche. Cette cohorte, associée à un CRB où seront stockés l'ensemble des prélèvements réalisés de façon prospective, permettra la réalisation de nombreuses études de recherche translationnelle consacrées au développement thérapeutique et à la résistance. L'AC33 constitue ainsi une force de propositions pour la réalisation d'études cliniques à forte valeur ajoutée en recherche translationnelle, qui pourront être financées et pilotées par l'ANRS.

La cohorte nationale, lorsqu'elle sera en place, permettra à l'AC33 de mettre en place un observatoire national de la résistance des virus des hépatites B et C aux antiviraux, en collaboration avec l'InVS.

PUBLICATIONS (2011-2012)

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

2011

1. Diaz-Valdes N, Manterola L, Belsue V, Riezu-Boj JI, Larrea E, Echevarria I, Llopiz D, Lopez-Sagaseta, Lerat H, Pawlotsky JM, Prieto J, Lasarte JJ, Borrás-Cuesta F, Sarobe P. Improved dendritic cell-based immunization against hepatitis C virus using peptide inhibitors of interleukin 10. *Hepatology* 2011 ; 53 : 23-31.
2. Bocket L, Chevaliez S, Talbodec N, Sobaszek A, Pawlotsky JM, Yazdanpanah Y. Occupational transmission of Hepatitis C virus (HCV) resulting from use of the same supermarket meat slicer. *Clin Microbiol Infect* 2011 ; 17 : 238-241.
3. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus : from discovery to eradication in forty years? *Clin Microbiol Infect* 2011 ; 17 : 105-106.
4. Afdhal NH, McHutchison JG, Zeuzem S, Mangia A, Pawlotsky JM, Murray JS, Shianna KV, Tanaka Y, Thomas DL, Booth DR, Goldstein DB. Hepatitis C pharmacogenetics : state of the art in 2010. *Hepatology* 2011 ; 53 : 336-345.
5. Lagging M, Askarieh G, Negro F, Bibert S, Söderholm J, Westin J, Lindh M, Romero A, Missale G, Ferrari C, Neumann AU, Pawlotsky JM, Haagmans BL, Zeuzem S, Bochud PY, Hellstrand K. Response prediction in chronic hepatitis C by assessment of IP-10 and *IL28B*-related single nucleotide polymorphisms. *Plos One* 2011 ; 6 : e17232.

6. Laperche S, Bouchardeau F, André-Garnier E, Thibault V, Roque-Afonso AM, Trimoulet P, Colimon R, Duverlie G, Leguillou-Guillemette H, Lunel F, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM, Henquell C, Schvoerer E, Stoll-Keller F, Chaix ML, Branger M, Gaudy-Graffin C, Rosenberg AR, Pozzetto B, Vallet S, Baazia Y, Izopet J, Lefrère JJ. Interpretation of real-time PCR results for HCV when viral load is below quantification limits. J Clin Microbiol 2011 ; 49 : 1113-1115.
7. Kwong AD, Najera I, Bechtel J, Bowden S, Fitzgibbon J, Harrington P, Kempf D, Kieffer TL, Koletzki D, Kukulj G, Lim S, Pilot-Matias T, Lin K, Mani N, Mo H, O'Rear J, Otto M, Parkin N, Pawlotsky JM, Petropoulos C, Picchio G, Ralston R, Reeves JD, Schooley RT, Seiwert S, Standring D, Stuyver L, Sullivan J, Miller V. Sequence and phenotypic analysis for resistance monitoring in hepatitis C virus drug development: recommendations from the HCV DRAG. Gastroenterology 2011 ; 140 : 755-760.
8. Pawlotsky JM. The results of Phase III clinical trials with telaprevir and boceprevir presented at The Liver Meeting™ 2010 : a new standard-of-care for hepatitis C virus genotype 1 infection, but with issues still pending. Gastroenterology 2011 ; 140 : 746-754.
9. Albert ML, Casrouge A, Chevaliez S, Hézode C, Rosa I, Renard P, Mallet V, Fontanet A, Pawlotsky JM, Pol S. Plasma CXCL10 remains a useful biomarker of treatment failure in patients stratified for *IL28B* rs12979860 haplotype. Hepatology 2011 ; 53 : 1410-1411.
10. Pawlotsky JM. Has genetics eradicated the good old predictors of hepatitis C treatment response ? Clin Res Hepatol Gastroenterol 2011 ; 35 : 157-158.
11. Pawlotsky JM. Treatment failure and resistance with direct acting antiviral drugs against hepatitis C virus. Hepatology 2011 ; 53 : 1742-1751.
12. Costentin CE, Roudot-Thoraval F, Zafrani ES, Medkour F, Pawlotsky JM, Mallat A, Hézode C. Association of caffeine intake and histological features of chronic hepatitis C. J Hepatol 2011 ; 54 : 1123-1129.
13. Baylis SA, Heath AB, Collaborative Study Group. World Health Organization collaborative study to calibrate the 3rd International Standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays. Vox Sang 2011 ; 100 : 409-417.
14. Wiersma ST, McMahon B, Pawlotsky JM, Thio C, Thursz M, Lim SG, Ocamo P, Esmat G, Maimuna M, Bell D, Vitoria M, Eramova I, Lavanchy D, Dusheiko G. Treatment of chronic hepatitis B virus infection in resource-constrained settings : summary and recommendations from a technical consultation. Liver Int 2011 ; 31 : 755-761.
15. Lerat H, Higgs M, Pawlotsky JM. Animal models in the study of hepatitis C virus-associated liver pathologies. Exp Rev Gastroenterol Hepatol 2011 ; 5 : 341-352.
16. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, Muir AJ, Ferenci P, Flisiak R, George J, Rizzetto M, Shouval D, Sola R, Terg RA, Yoshida EM, Adda N, Bengtsson L, Sankoh AJ, Kieffer TL, George S, Kauffman RS, Zeuzem S, ADVANCE Study Team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2011 ; 364 : 2405-2416.
17. Chevaliez S, Hézode C, Soulier A, Costes B, Bouvier-Alias M, Rouanet S, Foucher J, Bronowicki JP, Tran A, Rosa I, Mathurin P, Alric L, Leroy V, Couzigou P, Mallat A, Charaf-Eddine M, Babany G, Pawlotsky JM. High-dose pegylated interferon alfa and ribavirin in non-responder hepatitis C patients and relationship with *IL28B* genotype. Gastroenterology 2011 ; 141 : 119-127.
18. Hézode C, Castéra L, Roudot-Thoraval F, Bouvier-Alias M, Rosa I, Roulot D, Leroy V, Mallat A, Pawlotsky JM. Liver stiffness diminishes with antiviral response in chronic hepatitis C. Aliment Pharmacol Therap 2011 ; 34: 656-663.
19. Bensadoun P, Rodriguez C, Soulier A, Higgs M, Chevaliez S, Pawlotsky JM. Genetic background of hepatocytic cell lines : are in vitro hepatitis C virus research data reliable ? Hepatology 2011 ; 54: 748.
20. Haudecoeur R, Ahmed-Belkacem A, Yi W, Fortuné A, Brillet R, Belle C, Nicolle E, Pawlotsky JM, Boumendjel A. Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. J Med Chem 2011 ; 54: 5395-5402.

21. Bochud PY, Bibert S, Negro F, Haagmans B, Soulier A, Ferrari C, Missale G, Zeuzem S, Pawlotsky JM, Schalm S, Hellstrand K, Neumann AU, Lagging M. IL28B polymorphisms predict reduction of HCV RNA from the first day of therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011 ; 55: 980-988.
22. Chevaliez S. [Antiviral activity of the new DAAs for the treatment of hepatitis C virus infection: virology and resistance.](#) *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35 (Suppl 2):S46-51.
23. Chevaliez S, Asselah T. [Mechanisms of non-response to antiviral treatment in chronic hepatitis C.](#) *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35 (Suppl 1):S31-41.
24. Chevaliez S. [Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection.](#) *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 116-21.
25. Muir AJ, Poordad FF, McHutchison JG, Shiffman ML, Berg T, Ferenci P, Heathcote EJ, Pawlotsky JM, Zeuzem S, Reesink HW, Dusheiko G, Martin EC, George S, Kauffman RS, Adda N. Retreatment with telaprevir combination therapy in hepatitis C patients with well-characterized prior treatment response. *Hepatology* 2011 ; 54: 1538-1546.
26. Bourigault C, Nael V, Garnier E, Coste-Burel M, Chevaliez S, Villers D, Abbey H, Haloun A, Pawlotsky JM, S n chal H, Thiolet JM, Lepelletier D. Acute hepatitis C virus infection : hospital or community-acquired infection ? *J Hosp Infect* 2011 ; 79: 175-177.

2012

27. Bourli re M, Ouzan D, Rosenheim M, Doffo l M, Marcellin P, Pawlotsky JM, Salomon L, Fagnani F, Rouanet S, Pinta A, Vray M. Pegylated interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in a real-life setting : the Hepatys French cohort (2003-2007). *Antivir Ther* 2012; 17: 101-110.
28. Pawlotsky JM. The invaders and the barrier. *J Hepatol* 2012; 56: 11-13.
29. Sarrazin C, H zode C, Zeuzem S, Pawlotsky JM. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2012; 56 (Suppl. 1): S88-S100.
30. Bezemer G, van Gool AR, Verheij-Hart E, Hansen BE, Lurie Y, Esteban JI, Lagging M, Negro F, Zeuzem S, Ferrari C, Pawlotsky JM, Neumann AU, Schalm SW, de Knecht RJ. Long-term effects of treatment and response in patients with chronic hepatitis C on quality of life. *BMC Gastroenterol* 2012 ; 12 :11.
31. Pawlotsky JM. New antiviral agents for hepatitis C. *F1000* 2012; 4: 5.
32. Jacobson IM, Pawlotsky JM, Afdhal NH, Dusheiko GM, Forns X, Jensen DJ, Poordad F, Schulz J. A practical guide for the use of boceprevir and telaprevir for the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 2012; 19 (suppl. 2): 1-26.
33. Pawlotsky JM, Najera I, Jacobson I. Resistance to mericitabine (RG7128), a nucleoside analogue inhibitor of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Therap* 2012 ; 17:411-23.
34. Lok AS, Pawlotsky JM. Viral hepatitis at a crossroad. *Gastroenterology* 2012;142:1261-3.
35. Pawlotsky JM. Is hepatitis virus resistance to antiviral drugs a threat? *Gastroenterology* 2012; 142: 1369-72.
36. Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky JM. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology* 2012; 142: 1303-13.
37. Pawlotsky JM. Drug resistance: prevalence and clinical implications during the treatment of chronic hepatitis C infection. *Clin Liv Dis* 2012; 1: 58-61.
35. Haudecoeur R, Peuchmaur M, Ahmed-Belkacem A, Pawlotsky JM, Boumendjel A. Structure-activity relationships in the development of allosteric hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibitors: 10 years of research. *Med Res Rev* 2012; in press.
36. Chouteau P, Defer N, Florimond A, Higgs M, Gaudin A, Merour E, Dhumeaux D, Lerat H, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus (HCV) protein expression enhances hepatic fibrosis in HCV transgenic mice exposed to a fibrogenic agent. *J Hepatol* 2012; in press.

37. Wedemeyer H, Jensen DM, Godofsky E, Mani N, Pawlotsky JM, Miller V. Recommendations for hepatitis C virus clinical trial viral response nomenclature and definitions for investigational HCV agents. *Hepatology* 2012; in press.

ARTICLES SOUMIS POUR PUBLICATION

- Pascarella S, Clément S, Conzelmann S, Lagging M, Missale G, Neumann AU, Pawlotsky JM, Zeuzem S, Bochud PY, Negro F. Intrahepatic suppressor of cytokine signalling (SOCS)-3 mRNA levels is associated with cirrhosis but not with HOMA-IR and response to therapy in chronic hepatitis C.
- Higgs MR, Lerat H, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus-induced activation of beta-catenin promotes c-myc expression and a cascade of pro-carcinogenic events.
- Rodriguez C, Chevaliez S, Bensadoun P, Pawlotsky JM. Dynamics of hepatitis B virus resistance revisited by ultra-deep pyrosequencing.
- Chevaliez S, Hézode C, Bahrami S, Grare M, Pawlotsky JM. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: finite treatment duration unlikely.
- Lawitz EJ, Janczewska E, Bassan I, Di Bisceglie A, Hassanien T, Rodriguez-Torres M, Godofsky EW, Tatum H, Foster GR, Jacobson IM, Pawlotsky JM, Heblner C, Arterburn S, Knox S, Subramanian GM, McHutchison JG, DeMicco M. The polymerase inhibitor tegobuvir (GS-9190) with peginterferon and ribavirin in patients with genotype 1 hepatitis C.
- Maqbool MA, Higgs M, Carmouse S, Pawlotsky JM, Lerat H. Regulation of hepatitis C virus replication by nuclear translocation of nonstructural 5A protein and transcriptional activation of host genes.
- Rodriguez C, Soulié C, Marcelin AG, Calvez V, Descamps D, Charpentier C, Flandre P, Bellecave P, Harrigan R, Pawlotsky JM, Masquelier B, ANRS AC11 Study Group. HIV-1 coreceptor usage prediction by ultra-deep pyrosequencing increases the proportion of patients treated with success by CCR5 inhibitors.

PUBLICATIONS NATIONALES

2011

1. **Chevaliez S.** Nouveaux outils pour le diagnostic et le suivi des hépatites virales chroniques. *Revue Francophones des Laboratoires* 2011 ; 429-bis : 48-50.
2. **Chevaliez S,** Pawlotsky JM. Méthodes alternatives au prélèvement sanguin pour le diagnostic de l'infection par le virus de l'hépatite C. *BEHWeb* 2011 (1). www.invs.sante.fr/behweb/2011/01/r-4.htm.

CHAPITRES DE LIVRES

2011

1. Wedemeyer H, **Pawlotsky JM.** Acute viral hepatitis. In: Goldman's Cecil Medicine. Goldman L, Schafer AI, eds. Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania (USA), 2011: 966-973.
2. **Pawlotsky JM,** McHutchison J. Chronic viral and autoimmune hepatitis. In: Goldman's Cecil Medicine. Goldman L, Schafer AI, eds. Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania (USA), 2011: 973-979.

3. **Pawlotsky JM**, Chevaliez S. Measuring antiviral responses. In: *Advanced Therapy for Hepatitis C*. GW McCaughan, JG McHutchison, JM Pawlotsky, eds. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2012: 60-63.

2012

4. **Pawlotsky JM**. Measuring HCV RNA and assessing virologic response. In: *Chronic hepatitis C virus: advances in treatment, promise for the future*. Springer, New York, 2011: 149-157.
5. Chevaliez S, Rodriguez C, **Pawlotsky JM**. Application of molecular biology to the diagnosis of viral hepatitis. In: *Viral Hepatitis*, 4th Edition. Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ, eds. Wiley-Blackwell, Oxford (UK), 2012: in press.

CONFERENCES SUR INVITATION

Jean-Michel PAWLOTSKY

2011

1. "Novel virology tests for HBV and HCV infections". Post-Graduate Course, 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Bangkok (Thailand), 17-20 février 2011.
2. "HCV direct acting antivirals and résistance: expected problem in the future". 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Bangkok (Thailand), 17-20 février 2011.
3. "Tackling the issue of chronic hepatitis B drug résistance to improve long-term outcomes". Gilead Symposium, 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Bangkok (Thailand), 17-20 février 2011.
4. "Clinical considérations in HCV management". 9th International Workshop on HIV and Hepatitis : Treatment Strategies and Antiviral Drug Resistance, Paphos (Cyprus), 23-25 mars 2011.
5. Role of host genetics in antiviral treatment response". 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Berlin (Germany), 30 mars-3 avril 2011.
6. "The HCV replication cycle : multiple targets for a customised approach". BMS Symposium, 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Berlin (Germany), 30 mars-3 avril 2011.
7. "Evolving treatment of chronic hepatitis C", MSD Brazil EASL Debrief, 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Berlin (Germany), 30 mars-3 avril 2011.
8. "Next-generation sequencing for viral hepatitis B and C", Gen-Probe Meeting on New Molecular Approaches for Viral Infections, San Diego (USA), 28 avril 2011.
9. "Critical scientific advances". "Virology Futures: emerging science in the therapeutics of HIV/hepatitis", Prague (Czech Republic), 6-7 mai 2011.
10. "HBV viral resistance testing". 21st European Conference on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)-27th International Conference on Chemotherapy (ICC), Milan (Italy), 7-10 mai 2011.
11. "New diagnostics for evaluating the virus". 1st World Congress on Controversies in the Management of Viral Hepatitis (C-HEP), Barcelona (Spain), 19-22 mai 2011.
12. "Does resistance testing have a clinical role in HCV therapy?". 1st World Congress on Controversies in the Management of Viral Hepatitis (C-HEP), Barcelona (Spain), 19-22 mai 2011.

13. "Early predictors of response with new DAAs". 1st World Congress on Controversies in the Management of Viral Hepatitis (C-HEP), Barcelona (Spain), 19-22 mai 2011.
14. "New drug combinations for the treatment of nonresponders and relapsers". White Nights of Hepatology, Saint-Petersbourg (Russia), 2-3 juin 2011.
15. "HCV polymerase inhibitors". White Nights of Hepatology, Saint-Petersbourg (Russia), 2-3 juin 2011.
16. "Treatment failures with current and future HCV therapies". White Nights of Hepatology, Saint-Petersbourg (Russia), 2-3 juin 2011.
17. "Hepatitis C virus: towards eradication of an oncogenic viral agent". 3rd International Meeting on Research, Palais de l'Elysée, Paris (France), 10 juin 2011.
18. Virological monitoring of chronic HBV infection and therapy. Diasorin 4th International Meeting, Torino (Italy), 21-22 juin 2011.
19. "Perspectives in HCV therapy". Grand Round, Universidad de Navarra, Pamplona (Spain), 1^{er} juillet 2011.
20. "Hepatitis C update". Lecture in Singapore General Hospital, Singapore (Singapore), 15 juillet 2011.
21. "Hepatitis C update". Lecture in Mount Elizabeth Hospital, Singapore (Singapore), 16 juillet 2011.
22. "Hepatitis C update". Lecture at Royal Perth Hospital, Perth (Australia), 18 juillet 2011.
23. "Hepatitis C update". Lecture at Flinders Hospital, Adelaide (Australia), 19 juillet 2011.
24. "Hepatitis C update". Lecture at Royal Adelaide Hospital, Adelaide (Australia), 19 juillet 2011.
25. "Case study presentations". Princess Alexandra Hospital Liver Clinic, Brisbane (Australia), 20 juillet 2011.
26. "Hepatitis C update". Lecture at Mater Hospital, Brisbane (Australia), 20 juillet 2011.
27. "Boceprevir". Presentation at MSD Advisory Board Meeting, Sydney (Australia), 21 juillet 2011.
28. "A new standard-of-care for HCV genotype 1". HCV Meeting, Sydney (Australia), 21-22 juillet 2011.
29. "New HCV drugs in development". HCV Meeting, Sydney (Australia), 21-22 juillet 2011.
30. "HCV resistance to DAAs and treatment failure". HCV Meeting, Sydney (Australia), 21-22 juillet 2011.
31. "HCV drug development: where are we headed?". 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle (USA), 8-12 septembre 2011.
32. "Genetic and virological predictors of SVR". Meeting "HBV and HCV treatment: current optimization and future perspectives", Milan (Italy), 22 septembre 2011.
33. "Side effects, treatment failure and HCV resistance: should we fear?". Fall Meeting of the Dutch Association for the Study of the Liver (NVH), Eindhoven (The Netherlands), 6 octobre 2011.
34. "Résistance". Réunion de position de l'Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) sur les trithérapies du VHC, Paris, 8-9 avril 2011.
35. "Translation". 1^{ère} Journée de Rencontres sur la Recherche Translationnelle, Lyon, 20 juin 2011.
36. "Perspectives sur les nouvelles molécules anti-VHC". 5^{ème} Workshop sur les Nouvelles Molécules et Stratégies Anti-rétrovirales, La Grande Motte, 28 juin 2011.
37. "Résistances: prise en charge et attitude". Symposium de Lancement Victrelis, Paris, 2-3 septembre 2011.
38. "Polymorphismes génétiques et VHC". 69^{èmes} Journées de l'Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF), Paris, 28-30 septembre 2011.
39. "Comprendre, prévoir et gérer les mutations de résistance". Symposium MSD, 69^{èmes} Journées de l'Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF), Paris, 28-30 septembre 2011.
40. "Quand les traitements font de la résistance". 69^{èmes} Journées de l'Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF), Paris, 28-30 septembre 2011.

41. "Monitoring virologique". Réunion PROSPECTH régionale, Paris, 13 octobre 2011.
42. "Inhibiteurs de protéase: aspects virologiques". Symposium "Foie et infection par le VIH 2011", Marseille, 23 novembre 2011.
43. "Overview of resistance and fundamental concepts". Symposium "Progress in hepatitis C: advancing patient care with current and novel treatments", Berlin (Germany), 7-8 octobre 2011.
44. "Resistance and treatment failures". Henri Mondor Physician Exchange Program (Brazil), Créteil, 17-18 octobre 2011.
45. "New therapeutic classes". Henri Mondor Physician Exchange Program (Brazil), Créteil, 17-18 octobre 2011.
46. "Henri Mondor hospital: a true translational setting". Henri Mondor Physician Exchange Program (Brazil), Créteil, 17-18 octobre 2011.
47. "Resistance and treatment failures". Henri Mondor Physician Exchange Program (Brazil), Créteil, 19-20 octobre 2011.
48. "New therapeutic classes". Henri Mondor Physician Exchange Program (Brazil), Créteil, 19-20 octobre 2011.
49. "Henri Mondor hospital: a true translational setting". Henri Mondor Physician Exchange Program (Brazil), Créteil, 19-20 octobre 2011.
50. "HCV resistance to DAAs and treatment failure". Workshop "Protease inhibitor use in practice", Stockholm (Sweden), 24 octobre 2011.
51. "Henri Mondor hospital: a true translational setting". Gen-Probe Internal Meeting, San Diego (USA), 2 novembre 2011.
52. "IL28B polymorphisms: clinical implications". Updates in Hepatology, Padova (Italy), 17-18 novembre 2011.
53. "What can a hepatologist learn from a virologist?". International Symposium "Hepatology 2011 and Beyond", Hannover (Germany), 2 décembre 2011.
54. "Understanding the HCV lifecycle". 1st Global Workshop on HCV Therapy Advances, Madrid (Spain), 9-10 décembre 2011.

2012

55. "Management of chronic hepatitis C in 2012". Viral Hepatitis Symposium, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne (Switzerland), 12 janvier 2012.
56. "Viral Hepatitis Interactive Session". 22nd Challenge in Virology, Saanen (Switzerland), 12-15 janvier 2012.
57. "Hepatitis C in the Vaccine Research Institute". Vaccine Research Institute (VRI) Kick-off Meeting, Créteil (France), 17 janvier 2012.
58. "Management of chronic hepatitis C". 2nd Gastro-Intestinal and Liver International Scientific Meeting, Yangon (Myanmar), 28-29 janvier 2012.
59. "Meet-the-expert luncheon". 2nd Gastro-Intestinal and Liver International Scientific Meeting, Yangon (Myanmar), 28-29 janvier 2012.
60. "Update on hepatitis C diagnostics and therapies". Biocartis Internal Meeting, Mechelen (Belgium), 13 février 2012.
61. "Protease inhibitor use in practice". MSD Educational Workshop, Toronto (Canada), 21 février 2012.
62. "Protease inhibitor use in practice". MSD Educational Workshop, Montréal (Canada), 21 février 2012.
63. "Direct acting antivirals for HCV and resistance". Canadian Symposium on Hepatitis C Virus, Montréal (Canada), 23 février 2012.
64. "Translational HCV research". National Canadian Research Training Program-HepCPAC Meeting, Montréal (Canada), 24 février 2012.
65. "Issues and challenges in implémentation of new HCV practice guidelines". Session on "Canadian Association for the Study of the Liver (CASL) Practice Guidelines : Viral Hepatitis",

Canadian Digestive Disease Week/CASL Winter Meeting, Montréal (Canada), 24-27 février 2012.

66. "Hepatitis C treatment success and failure". University of Michigan Grand Rounds, Department of Digestive Diseases, University of Michigan, Ann Arbor (USA), 27 février 2012.
67. "Known mechanisms for viral clearance and achieving SVR : can we optimize our targets for greater clinical success ?" American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Single Topic Conference "HCV direct antiviral agents : concepts, development and optimal use", Atlanta (USA), 16-17 mars 2012.
68. "Mechanisms of HCV DAA résistance : a primer" American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Single Topic Conference "HCV direct antiviral agents : concepts, development and optimal use", Atlanta (USA), 16-17 mars 2012.
69. "Les nouveaux traitements de l'hépatite C". 14èmes Journées Francophones de Virologie, Paris, 29-30 mars 2012.
70. "Les inhibiteurs de protéase du VHC". Réunion plénière de l'Académie Nationale de Pharmacie, Paris, 4 avril 2012.
71. "Will HCV drug resistance be an issue ?". Joint EASL-Virgil Workshop, The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
72. "Will HCV drug resistance be an issue ?". Joint EASL-Virgil Workshop, The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
73. "The future of change : all-oral therapy". Boehringer-Ingelheim Satellite Symposium. The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
74. "Profiling the ideal agent for simplifying HCV management". Novartis Satellite Symposium, The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
75. "Viral Hepatitis Summary". General Session 4, The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
76. "VHC: eradication ?". Séminaire Annuel de l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS), Institut Pasteur, Paris, 3 mai 2012.
77. "Treatment of chronic hepatitis C". Symposium "Pegasys, 10 years: a bridge to the future", Lisbon (Portugal), 5 mai 2012.
78. "New HCV therapies". Andres T. Blei Memorial Lecture, Northwestern University Medical Grand Rounds, Chicago (USA), 8 mai 2012.
79. "EASL Viral Hepatitis Summary". Hepatology Liver, Vienna (Austria), 11-12 mai 2012.
80. "New anti-HCV drugs". International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases (ISHEID) 2012, Marseille (France), 23-25 mai 2012.
81. "New anti-HCV drugs". International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases (ISHEID) 2012, Marseille (France), 23-25 mai 2012.

Stéphane CHEVALIEZ

2011

1. "Viral hepatitis diagnosis", 1st annual meeting of the hepatitis B/C surveillance network (ECDC), Stockholm, Suède, 23-24 mars 2011.
2. "Nouveaux outils pour le diagnostic et le suivi des hépatites virales chroniques", 53^{ème} Journées de Biologie Clinique Necker-Institut Pasteur, 18 janvier 2011.
3. "Les répercussions de l'hépatite B : Intérêts des nouveaux marqueurs", Hepatology Perspectives Gilead Workshop, Paris, 27 avril 2011.
4. "Dépistage du VHB : tests rapides et nouvelles techniques virologiques". Actualités et Conséquences Pratiques dans l'Hépatite B chronique (ACP), 3^{ème} édition, Paris, France, 9 juin 2011.

5. "Rôle de la génétique de l'hôte dans la réponse au traitement". Conférence dans le service d'Hépatologie et de Gastroentérologie de l'hôpital Jean Verdier, Bondy, 15 juin 2011.
6. "Diagnostic alternatif de l'infection virale C : l'exemple du buvard (DBS)". Symposium Abbott Molecular : Avancées en Biologie Moléculaire des Maladies Infectieuses, Paris, France, 22 septembre 2011.
7. "*IL28B*, IP10 ou RVR : les nouveaux marqueurs prédictifs de la réponse au traitement antiviral". 1^{er} Congrès Franco-Roumain d'Hépatologie, Bucarest, Roumanie, 2-4 octobre 2011 (Abstract : Romanian Journal of Hepatology 2011, 7(3) : 62).
8. "Nouvelles molécules anti VHC : stratégies d'utilisation chez le patient mono-infecté VHC et chez le patient co-infecté VIH/VHC". Synergie et Résistance, Aix En Provence, France, 6-7 octobre 2011.
9. "Resistance to protease inhibitors". 2nd European Young Hepatologist Workshop, Bendor, France, 6-8 octobre 2011.
10. "*IL28B* et Hépatite C : le point de vue du virologue". Workshop Roche, Saint-Cloud, France, 18 octobre 2011.
11. "Monitoring of Treatment Responses". Physician Program Exchange, Henri Mondor Hospital, Paris, 17-20 octobre 2011.
12. "La place des examens de biologie moléculaire dans le suivi des hépatites". 16^{ème} Forum National de SOS Hépatites, Lyon, France, 17 novembre 2011.
13. "Diagnostic de l'infection par le VHC : Quels outils à la disposition du clinicien?". NephroCare France National Medical Meeting, Paris, France, 18 novembre 2011.
14. "Le virus de l'Hépatite B". Symposium Variabilité Génétique Bactérienne, Virale ou Parasitaire, et Migration des Populations. 31^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), CNIT, Paris La Défense, 2 décembre 2011.
15. "How to use virological Tools for the optimal management of chronic hepatitis C". HCV – new drugs, new chances and challenges in treatment and diagnostics, University of Zurich, Zurich, 8 décembre 2011.
16. "Alternatives au prélèvement veineux pour le diagnostic des hépatites virales". Conférence dans le service d'Hépatologie et de Gastroentérologie du Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil (CHIC), Créteil, 14 décembre 2011.

2012

17. "Virological monitoring of hepatitis C therapy". 10th European Meeting on HIV&Hepatitis Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance, Barcelona, 28-30 March 2012.
18. "Intérêts de la détermination de l'*IL28B* dans la prise en charge des patients atteints d'hépatite C", Les évènements de l'année 2012 en microbiologie clinique, Paris, 27 janvier 2012.
19. "Mécanismes de non-réponse au traitement antiviral dans l'hépatite C". Conférence dans le service d'Hépatologie et de Gastroentérologie de l'hôpital Jean Verdier, Bondy, 4 avril 2012.
20. "Hepatitis C : virological Tools for monitoring new antiviral treatment". Siemens Academy Scientific Day, Bruxelles, Belgium, May 24th 2012.
21. "Hépatite B : du diagnostic au traitement". Journée Thématique Hépatites Chroniques (Siemens), Paris 30 avril 2012.

PROGRAMME D'ACTIVITE 2012-2013

Les priorités de la prochaine année seront :

1. La poursuite de l'enquête COQUELICOT avec l'étude moléculaire des souches de VHC circulantes chez les usagers de drogues en France.
2. La finalisation de la surveillance des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B avec en particulier les résultats concernant la prévalence de la résistance primaire aux analogues nucléos(t)idiques évaluée par séquençage haut-débit ultra sensible.
3. La réalisation d'études de performances analytiques et cliniques de nouvelles techniques de biologie moléculaire destinées à la détection-quantification de l'ARN du VHC et de l'ADN du VHB, en particulier l'évaluation des nouvelles troussees développées par Siemens (kPCR HCV et HBV).
4. La réalisation d'études de performances analytiques et cliniques des TROD permettant la détection des anticorps anti-VHC dans le liquide craviculaire et le sang capillaire prélevé au bout du doigt, ainsi que la détermination de nombreux paramètres virologiques du VHC à partir de sang total déposé sur buvards.
5. La mise en place de la plateforme de séquençage de nouvelle génération (NGS) et l'application de ces méthodes à l'ensemble des études du CNR.
6. La mise en place du site web du CNR, en cours de développement.

LABORATOIRE ASSOCIE

HEPATITES B, C et delta en TRANSFUSION SANGUINE

INSTITUT NATIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINE

PARIS



Rapport d'activité 2011

CNR Hépatites B, C et Delta Laboratoire associé pour les hépatites B, C et Delta en transfusion sanguine Institut National de la Transfusion Sanguine

SOMMAIRE

1/ INTRODUCTION	2
1-1 EQUIPE : PERSONNELS DEVOLUS AUX ACTIVITES DU CNR.....	3
1-2 LABORATOIRE	3
2/ ACTIVITES D'EXPERTISE :.....	4
2-1 CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....	4
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2011	5
2-2-1 <i>Expertise dans le domaine de la sécurité transfusionnelle</i>	<i>5</i>
2-2-2 <i>Expertise dans le domaine des outils de diagnostic.....</i>	<i>5</i>
2-2-3 <i>Les contrôles de qualités.....</i>	<i>7</i>
2-2-4 <i>Les enquêtes de transmission.....</i>	<i>9</i>
3/ ACTIVITES DE SURVEILLANCE DES DONNEURS DE SANG :.....	10
3.1 METHODE.....	11
3.2 RESULTATS	13
3.2.1 <i>Le VHB</i>	<i>14</i>
3.2.2 <i>Le VHC</i>	<i>31</i>
3.2.3 <i>Bilan du DGV et risque résiduel.....</i>	<i>41</i>
4/ACTIVITES DE RECHERCHE 2010-2011	45
5/ ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL :.....	48
6/ LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS RELATIVES AUX ACTIVITES DU CNR 2011	49
7/ PROGRAMME D'ACTIVITE 2012-2013	51

1/ Introduction

La surveillance épidémiologique des donneurs de sang dans notre pays a été initiée en 1985, année de la mise en place du dépistage obligatoire des anticorps anti-VIH chez les donneurs de sang. La Direction générale de la santé (DGS) avait alors élaboré un questionnaire destiné aux établissements de transfusion sanguine, afin de connaître le nombre total de dons testés et le nombre de positifs (circulaire DGS/3B/142 du 20 octobre 1985). Ce questionnaire ne comportait alors que des données agrégées, s'est rapidement étendu aux autres dépistages systématiques, notamment pour ce qui concerne les virus des hépatites à celui de l'Ag HBs, des ALAT et des anticorps anti-HBc, dont les dépistages ont été rendus obligatoires respectivement en décembre 1971, avril et octobre 1988 (le taux des ALAT n'est plus déterminé depuis décembre 2003). Cette surveillance était assurée par le bureau en charge de la transfusion sanguine à la DGS en étroite collaboration avec le Centre National de Référence de l'hépatite B déjà situé à l'Institut National de la Transfusion Sanguine.

Cette surveillance n'a cessé d'évoluer, en premier lieu pour prendre en compte les nouveaux dépistages (Ac anti-VHC à partir de mars 1990, Ac anti-HTLV1 à partir de juillet 1991 en France métropolitaine et le Dépistage Génomique Viral pour le VIH-1 et le VHC à partir du 1er juillet 2001 et pour le VHB en 2010) et en second lieu, pour collecter des informations complémentaires sur les donneurs confirmés positifs avec l'objectif d'améliorer la sélection des candidats au don et de maîtriser la sécurité transfusionnelle. C'est à partir de 1992 notamment, que des informations individuelles sur le mode probable de contamination des donneurs confirmés positifs ont été recueillies de façon systématique auprès de l'ensemble des établissements.

Ainsi depuis 1985 le laboratoire de virologie de l'Institut National de la Transfusion Sanguine assure la surveillance de l'infection à VHB dans la population des donneurs de sang en collaboration étroite avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS, antérieurement RNSP), l'Établissement Français du sang (EFS, antérieurement AFS), le Centre de Transfusion des armées (CTSA) et l'AFSSAPS. Initialement essentiellement descriptive, cette surveillance épidémiologique s'est étendue en 2000 à une surveillance virologique exhaustive visant à caractériser les souches VHB et VHC circulant chez les donneurs de sang. A cette fin, tous les échantillons plasmatiques correspondant aux donneurs de sang infectés par l'un de ces deux virus en France métropolitaine et dans les DOM, sont centralisés dans l'unité de virologie de l'INTS depuis 2000 (2006 pour les DOM). Cette collection permet d'une part de contribuer à la surveillance de la diversité génétique du VHB, virus Delta et VHC dans la population des donneurs de sang et d'autre part de disposer d'échantillons informatifs qui, inclus dans des panels pérennes, permettent d'assurer efficacement l'évaluation des réactifs de dépistage des marqueurs de l'infection par ces virus.

L'INTS est un groupement d'intérêt public financé à hauteur de 75 % par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie, le reste provenant de fonds propres. Il est indépendant dans son fonctionnement et ses missions de l'Etablissement français du Sang (EFS) opérateur national de la transfusion sanguine.

Les missions de l'INTS sont de trois ordres : recherche, enseignement et référence avec un dénominateur commun qui est celui d'assurer une veille sur la sécurité transfusionnelle.

Les activités du laboratoire d'expertise en virologie ont reçu l'accréditation du COFRAC selon la norme ISO-CEI 17025 sous le numéro 1-1950 au 1^{er} janvier 2008. L'accréditation a été confortée lors des audits de suivi, le dernier datant d'avril 2010.

1-1 Equipe : personnels dévolus aux activités du CNR

L'unité d'expertise en virologie de l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS) comprend 13 personnes :

- 8 techniciens de laboratoires,
- 3 ingénieurs dont 2 de recherche et 1 d'étude
- 1 secrétaire,
- 1 chef d'unité médecin biologiste responsable du laboratoire.

Les activités de référence (constitution et gestion de panels, activités biologiques relatives à la caractérisation des échantillons constituant ces panels, gestion informatique et secrétariat) du laboratoire équivalent en temps pleins à :

- 4 techniciens,
- 1,5 ingénieur,
- 0,1 secrétariat,
- 0,3 responsable.

1-2 Laboratoire

Trois secteurs d'activités peuvent être individualisés :

1) un secteur dit "d'expertise et de référence" comprenant des unités fonctionnelles distinctes permettant d'assurer, d'une part, les activités appartenant à l'immuno-sérologie et d'autre part, les activités dédiées à la biologie moléculaire qui bénéficient de structures individualisées et séparées les unes des autres conformément aux exigences du GBEA.

2) un secteur dédié à la constitution des sérothèques et panels (hottes à flux laminaires, congélateurs.)

3) un secteur occupé par les activités de virologie fondamentale avec notamment trois pièces dédiées à la culture virale sous un confinement de type P2 avec un projet pour la construction d'un P3 partagé

2/ Activités d'expertise :

2-1 Capacités techniques du CNR

Les outils disponibles à l'analyse virologique dans le cadre de nos activités appartiennent au domaine de :

- l'immunologie (méthodes immunoenzymatiques) : automates dédiés, incubateurs, laveurs de microplaques, spectrophotomètres,
- de l'analyse moléculaire : plateau d'analyse moléculaire des acides nucléiques comprenant des thermocycleurs, une plateforme de séquençage, des automates de PCR en temps réel (Cobas Taq Man), plateau de clonage.

Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles :

- Tous les marqueurs usuels des infections par les VHB, VHC et Delta (Ag, anticorps, quantification des charges virales VHB et VHC) sur la base d'outils commercialisés
- Sérotypage de l'Ag HBs par une technique développée au laboratoire.
- Analyse moléculaire par séquençage de diverses régions génomiques du VHB (possibilité d'analyse du génome entier), du VHC (NS5b, E1).
- Clonage (VHB).

Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

Pour le VHB :

- un panel de référence incluant les 10 principaux sous-types de l'Ag HBs est entretenu. Chacun des échantillons de ce panel a été séquençé pour toute ou partie du génome.
- le recueil prospectif d'échantillons provenant de donneurs de sang porteurs du VHB (voir plus bas) enrichit régulièrement nos sérothèques. Plusieurs dizaines d'échantillons plasmatiques sous des volumes pouvant excéder 200 ml et caractérisés (charge virale, séquence partielle du gène S, génotype) sont disponibles pour des études.

Pour le VHC :

Nous disposons de divers panels d'échantillons plasmatiques

Ceux-ci comprennent principalement :

- 70 séroconversions documentées et pour lesquelles il existe des prélèvements séquentiels.
- 200 échantillons de génotypes (1 à 5) et de charges virales différents.
- 50 échantillons d'un panel SFTS incluant, un éventail de difficultés sérologiques.
- 20 porteurs chroniques présentant des réactivités aux tests de confirmation atypiques (réactivités isolées, profils inhabituels).

Le stockage des échantillons est réalisé dans des enceintes froides à -20°C ou -80°C , pour lesquelles la température fait l'objet d'un contrôle permanent grâce à une centrale de température reliée à une alarme conformément aux exigences de la norme COFRAC. Les ressources biologiques feront l'objet d'une gestion informatisée à partir de 2011 pilotée par un logiciel dédié dont la mise en place est en cours.

2.2 Activités d'expertise de l'année 2011

2-2-1 Expertise dans le domaine de la sécurité transfusionnelle

Les échantillons plasmatiques correspondant aux donneurs de sang infectés par le VHB ou le VHC en France métropolitaine sont centralisés dans l'unité de virologie de l'INTS depuis 1996 et 2000, respectivement.

Cette collection permet d'une part de contribuer à la surveillance de la diversité génétique de ces virus dans la population des donneurs de sang et d'autre part de disposer d'échantillons informatifs qui, inclus dans des panels pérennes, permettent d'assurer efficacement l'évaluation des réactifs de dépistage des marqueurs des infections par ces virus.

L'expertise du laboratoire dans le domaine de l'évaluation ou de la réactovigilance peut être requise par les autorités sanitaires, en particulier l'AFSSaPS, à la demande des industriels dans le cadre de la constitution des dossiers destinés aux organismes notifiés européens en vue d'un marquage CE ou par l'organisme notifié lui-même (G-MED).

2-2-2 Expertise dans le domaine des outils de diagnostic

Les outils du dépistage constituent une des bases fondamentales sur lesquelles repose la sécurité des produits sanguins. La veille scientifique et la validation des méthodes utilisées permettent d'éviter les dérives qui pourraient compromettre la qualité du dépistage et, de ce fait, la sécurité transfusionnelle. De la même façon, l'évaluation et la validation des outils nouvellement développés s'inscrivent dans l'amélioration de la stratégie sécuritaire. Par ailleurs, la veille technique sur les outils biologiques de caractérisation virale sur lesquels est basée l'épidémiologie des donneurs de sang est nécessaire pour harmoniser et valider les pratiques.

1) Tests d'orientation diagnostique VHC

A la suite de résultats médiocres obtenus lors d'une opération de CNQ de la sérologie VHC avec certains tests d'orientation diagnostique, l'AFSSaPS a entrepris une étude d'évaluation du marché pour laquelle nous avons été sollicités.

Quatre tests à lecture subjective de dépistage des anticorps anti VHC ont été évalués au laboratoire (ImmunoComb II HCV, Oraquick, Signal HCV, Toyo) à l'aide d'un panel comprenant 234 échantillons dont

- 103 échantillons négatifs en anticorps anti-HCV,
- 92 positifs
- 11 échantillons pouvant être négatifs ou positifs et
- 28 échantillons des panels de séroconversion

Les résultats ont mis en exergue certains points :

- L'interprétation des réactivités faibles n'est pas précisée par le fabricant laissant la possibilité d'une interprétation subjective du laboratoire pouvant conduire à une mauvaise classification des positifs ou des négatifs
- Les 4 tests de dépistage présentent une sensibilité allant de 94.5% à 100%.
- Les résultats de spécificité sont très différents d'un test à l'autre de 84.5% à 100%

Ces résultats ont conduit à entreprendre des études cliniques sur du sang total afin d'apprécier la valeur ajoutée de ces tests dans le cadre de leurs indications.

2) Evaluation de l'impact diagnostique et sécuritaire des mutants de l'enveloppe du VHB.

Dans le cadre, d'une évaluation de l'impact diagnostique et sécuritaire des mutants de l'enveloppe du VHB, susceptibles d'induire des modifications conformationnelles de l'enveloppe virale pouvant conduire à des résultats de dépistage faussement négatifs, nous avons mené une étude comparative de 13 trousse commerciales de détection de l'AgHBs selon deux critères ; (i) la sensibilité analytique et (ii) la sensibilité clinique vis-à-vis de mutants de la RHM.

Les trousse étudiées étaient les suivantes :

Firme	Trousse
Abbott Diagnostics (Delkeneim, Allemagne)	Architect HBsAg, AxSYM HBsAg V2 Murex HBsAg V3 Prism HBsAg
Biokit (Barcelone, Espagne)	Bioelisa HBsAg colour
Biomérieux (Marcy l'étoile, France)	Hepanostika HBsAg Ultra VIDAS HBsAg Ultra
Bio-Rad (Marnes La Coquette, France)	Monolisa HBsAg ULTRA Evolis
Dade Behring-Siemens (Marburg, Allemagne)	Enzygnost HBsAg 6.
DiaSorin (Saluggia, Italie)	ETI-Mak-4, Liaison HBsAg
Ortho-Clinical Diagnostics, Buckinghamshire, UK	Vitros HBsAg ES
Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne	Modular HBsAg II

La sensibilité analytique était évaluée à l'aide du standard international WHO (00/588) et du standard national de la Société française de Transfusion Sanguine (SFTS 2007).

Quatre panels ont été étudiés :

- 1) Panel 1 : 25 mutants recombinants, préparés à 2 ou 3 concentrations différentes d'une même production en cellules HuH7 (n=73),
- 2) Panel 2 : mutants recombinants produits en HuH7, calibrés à l'aide d'une étiquette "hémagglutinine" placée en C-terminale de la protéine virale (n=8),
- 3) Panel 3 : mutants natifs issus de dons de sang VHB positif (n=16)
- 4) Panel 4 : protéines recombinantes calibrées des génotypes A à F selon les mêmes modalités que le panel 2 (n=9). Le panel 1 a été fourni par la société Bio-Rad et les panels 2, 3 et 4 ont été préparés à l'INTS.

Les seuils de détection variaient selon les trousse étudiées ; de 0,01 à 0,09 UI/mL pour le standard international et de 0,02 à 0,32 ng/mL pour le standard national. Les deux trousse les

plus sensibles étaient Monolisa HBsAg ULTRA Evolis et Prism HBsAg alors que les deux tests les moins sensibles étaient AxSYM HBsAg V2 et Bioelisa HBsAg colour.

La sensibilité clinique observée vis-à-vis des mutants des panels 1, 2 et 3 était différente selon les tests ; de 97,9% pour VIDAS HBsAg Ultra à 62,9% pour Vitros HBsAg ES. Toutes les trousse détectaient les protéines recombinantes issues des souches sauvages (panel 4) à l'exception du Bioelisa HBsAg colour.

La mutation T123N seule ou associée à d'autres mutations n'était pas détectée par AxSYM HBsAg V2 et détectée une seule fois sur 8 échantillons par Prism HBsAg. La mutation K141E seule ou associée n'était détectée qu'une fois sur 4 échantillons testés par Enzygnost HBsAg 6.0. La mutation G145R seule ou associée n'était pas toujours détectée par Enzygnost HBsAg 6.0 (5 cas positifs/8), ETI-Mak-4 (3/8) et Liaison HBsAg (2/8).

Les deux seuls tests utilisant des anticorps (Ac) polyclonaux dans la phase de capture (Bioelisa HBsAg colour et Enzygnost HBsAg 6.0) avaient un score de positivité vis-à-vis des mutants inférieur à 80% avec une sensibilité analytique estimée à 0,32 ng/mL et 0,14 ng/mL respectivement.

Cette étude menée sur un grand nombre de mutants de l'AgHBs a montré :

1) un niveau de sensibilité analytique excellent au regard des exigences européennes qui fixent le seuil à 0,13 UI/mL pour un marquage CE

2) en dépit de ces performances, des disparités dans la détection des mutants HBs qui permettent de définir 3 groupes : (i) les trousse sur lesquelles la ou les mutations portées par la RHM n'ont aucun impact pour le dépistage de l'AgHBs qui est en conformité avec le seuil de sensibilité analytique, (ii) les trousse fournissant un résultat négatif, (iii) les trousse qui détectent la mutation mais à un niveau moindre qu'une souche sauvage.

Dans le contexte d'une hépatite chronique B traitée, l'impact de l'absence de détection de l'AgHBs sera moindre que dans le cadre d'un dépistage puisque le diagnostic aura déjà été porté. L'émergence de souches mutées peut avoir un impact et compromettre certaines mesures de santé publique telles que le dépistage de l'infection dans la population des donneurs de sang ou des donneurs d'organes lorsqu'il repose uniquement sur la détection de l'AgHBs.

Servant-Delmas A, Mercier-Darty M, Ly TD, Wind F, Alloui C, Sureau C, Laperche S.
Variable capacity of 13 Hepatitis B virus surface antigen assays for the detection of HBsAg mutants in blood samples. J Clin Virol 2012 sous presse.

2-2-3 Les contrôles de qualités

1) En France

Divers panels d'échantillons contenant du VHC ont été préparés dans le cadre de contrôles de qualité organisés par l'Agence nationale de recherche sur le SIDA et les Hépatites virales (ANRS). Nous avons coordonné diverses études ces dernières années destinées à valider l'expertise des laboratoires appelés à collaborer à des protocoles multicentriques sous l'égide de l'ANRS, (groupe AC11) pour la détermination des géotypes du VHC et la détermination de la charge virale.

Les résultats de la première étude, publiée en 2007 (Laperche et al. J.Clin.Microbiol 2007 ;45 :3788-3790) impliquant 20 laboratoires avaient montré que les tests utilisés pour la détermination de la charge virale VHC fournissaient des différences non pas dues à une variation interlaboratoires mais à la nature même du réactif. Un net progrès avec des

performances accrues en termes de sensibilité, a pu être constaté avec les nouveaux outils de PCR en temps réel utilisés essentiellement dans leur version automatisée.

Ces résultats avaient conduit à réaliser une nouvelle distribution du même panel avec pour objectif de le tester exclusivement avec des techniques de PCR en temps réel. Les 2 trousseaux utilisés étaient Cobas Ampliprep/Cobas Taq Man HCV (Roche) et Real Time PCR HCV (Abbott). Les coefficients de variation interlaboratoire s'échelonnaient de 1 à 4.85% et de 1 à 6% avec Cobas Ampliprep/Cobas Taq Man HCV (7 laboratoires) et Real Time PCR HCV (11 laboratoires, respectivement). La corrélation entre les 2 techniques était bonne hormis pour un échantillon de génotype 4h, sous-estimé par Cobas.

Lors de la dernière étude, il est apparu que certains échantillons négatifs pour l'ARN VHC fournissaient des résultats positifs mais inférieurs au seuil de détection de la technique. Ceci constituait des résultats faussement positifs qui pouvaient avoir un impact dans un suivi thérapeutique. De plus, un résultat de ce type était rendu alternativement positif ou négatif en fonction du laboratoire. L'objectif d'harmoniser le rendu des résultats sur des échantillons présentant des charges virales faible ou nulles, des laboratoires inclus dans le groupe de travail AC11 de l'ANRS, nous a conduit à constituer un nouveau panel. Celui-ci comprenait 32 échantillons incluant 10 négatifs et 22 ARN-VHC positifs correspondant à 2 échantillons de génotype 1a, dilué à des concentrations théoriques s'échelonnant de 0.5 à 500 UI/ml et 3a à des concentrations théoriques de 0.5 à 300 UI/ml. Alors que les résultats fournis par les automates étaient conformes aux attentes (scores de réponses correctes 98.1%), 44% (8/18) des laboratoires fournissaient une interprétation correcte sur les négatifs et les CV inférieures au seuil de détection, indépendamment des trousseaux et 39% (7/18) ne se prononçaient pas sur les négatifs qui étaient rendus le plus souvent « inférieurs au seuil de détection » et ce indépendamment des trousseaux. Des préconisations spécifiques d'interprétation des CV faibles seront apportées par le groupe de travail.

Laperche S, Bouchardeau F, André-Garnier E, Thibault V, Roque-Afonso AM, Trimoulet P, Colimon R, Duverlie G, Leguillou-Guillemette H, Lunel F, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM, Henquell C, Schvoerer E, Stoll-Keller F, Chaix ML, Branger M, Gaudy-Graffin C, Rosenberg AR, Pozzetto B, Vallet S, Baazia Y, Izopet J, Lefrère JJ. Interpretation of real-time PCR results for HCV when viral load is below quantification limits. J Clin Microbiol. 2011; 49:1113-1115.

2) En Afrique

La sécurité transfusionnelle dans les pays émergents reste un problème préoccupant principalement lié aux ressources limitées et aux tests utilisés. Dans l'objectif d'évaluer les performances des réactifs utilisés dans la routine du dépistage des marqueurs viraux chez les donneurs de sang de certains pays d'Afrique, nous avons distribué à 5 pays d'Afrique francophone (Burkina Faso, Mauritanie, Niger, Cameroun, Gabon) un panel de 25 échantillons comprenant 8 négatifs, 5 AgHBs positifs à taux variables, 4 Ac-VHC positifs, 5 Ac-HIV positifs (4 HIV-1, 1 HIV-2), et 3 mélanges des 3 virus 2 à 2. Lors de cette étude publiée en 2009, nous avons mis en évidence un défaut de sensibilité des tests rapides particulièrement marqué pour le dépistage de l'AgHBs, puisque ceux-ci étaient dans cette étude, incapables de détecter un taux d'analyte inférieur à 13 ng/ml et ne présentaient qu'un score de sensibilité à 20%, indépendamment des laboratoires.

Ce premier contrôle de qualité a été suivi d'une nouvelle opération en 2010 élargie à d'autres pays africains (n=17) et à plusieurs laboratoires dans un même pays (60 panels seront

distribués) de manière à apporter une aide à l'amélioration de la sécurité transfusionnelle dans ces pays. Les résultats confirment ce que nous avons mis en évidence lors de l'opération pilote à savoir une sensibilité moindre des tests rapides par rapport aux test ELISA nous conduisant à recommander l'utilisation de ces derniers pour assurer la sécurité transfusionnelle.

Laperche. S on behalf of the Francophone African Group for Research in Blood Transfusion. Multinational assessment of blood-borne virus testing and transfusion safety on the African continent. Transfusion; 2012 sous presse

2-2-4 Les enquêtes de transmission

Ces enquêtes sont réalisées à la demande et en coordination avec l'InVS, les CCLIN régionaux, les DDASS et les établissements hospitaliers concernés et le cas échéant l'EFS.

La démarche biologique adoptée pour les enquêtes de transmission horizontale est la suivante : la première étape consiste à déterminer le statut sérologique des sujets vis-à-vis des virus impliqués notamment pour documenter l'infection aiguë chez le sujet nouvellement infecté.

Puis, l'analyse moléculaire consiste dans un premier temps à déterminer les génotypes des souches impliquées, qui, s'ils sont différents, clôturent l'enquête. Dans le cas contraire, deux régions distinctes du génome sont analysées.

Pour le VHB, l'analyse moléculaire est réalisée à l'aide d'une PCR maison couvrant la région hydrophile majeure de la protéine d'enveloppe « S » (région amplifiée : nucléotide 99 à 568). La transmission est écartée si le génotype est différent (comme précisé ci-dessus) ou si les séquences ne sont pas liées sur l'arbre phylogénétique. En revanche si le génotype est identique et que les souches sont proches phylogénétiquement, la poursuite des investigations moléculaires est réalisée. En pratique courante, l'analyse par PCR du génome complet est à privilégier quoique complexe à mettre en oeuvre. En cas d'échec, l'analyse d'une seconde région plus variable (région partielle du gène Core, région amplifiée : nucléotide 60 à 557) est contributive. Après séquençage direct, la phylogénie (méthode de matrice de distances, modèle Kimura2) est réalisée grâce à un alignement avec plusieurs séquences disponibles dans Genbank et représentatives de chacun des génotypes. Des banques spécifiques par exemple de souches retrouvées dans la région où se fait l'enquête peuvent être contributives. Pour le VHC, la démarche est identique, les régions génomiques analysées sont NS5b et E1.

Deux enquêtes de transmission transfusionnelles, menées respectivement en 2007 et 2008, ont fait l'objet d'une publication en 2012.

Enquête n°1 :

La transmission a été évoquée lors d'une enquête descendante menée après qu'un donneur a été trouvé porteur d'un AgHBs alors que le concentré de globules rouges issu du don antérieur (parfaitement négatif pour l'AgHBs et les anti-HBc), réalisé 2 mois auparavant, avait été transfusé.

L'analyse du gène « S » des 2 souches a permis d'identifier des souches de génotype A avec

une homologie de 100%. L'analyse du génome complet du virus n'ayant pu être réalisée en raison de la faible charge virale chez le donneur, une analyse de la région pré C/C des virus a confirmé l'homologie de séquence. Ces résultats combinés avec la chronologie des cinétiques des marqueurs virologiques observées chez les 2 individus impliqués, plaident pour une transmission transfusionnelle. A noter que les 2 individus ont chacun résolu leur infection.

Enquête n°2 :

La transmission a été évoquée lors d'une enquête descendante menée après qu'un donneur a été trouvé porteur d'un anti-HBc sans AgHBs alors que le concentré de globules rouges issu du don antérieur (parfaitement négatif pour l'AgHBs et les anti-HBc), réalisé 3 mois auparavant, avait été transfusé. L'ADN viral détecté à un taux toutefois très faible sur la sérothèque de ce don a ainsi pu être comparé à celui du receveur ayant présenté des signes biologiques d'hépatite aigüe avec virémie. Seule l'analyse comparative de la région S a pu être réalisée en raison de la charge virale trop faible chez le donneur ne permettant pas l'étude de la région C chez celui-ci. Les souches étaient de génotype B avec 100% d'homologie. Malgré une analyse limitée à une seule région génomique, la faible fréquence du génotype B en France (de l'ordre de 6%) et les cinétiques biologiques observées étaient en faveur d'un lien entre les souches évoquant une transmission transfusionnelle du VHB. A noter que le receveur a pu bénéficier d'un traitement précoce.

A. Servant-Delmas, C. Chuteau, C. Lefort, Y. Piquet, S. Chevaleyre, V. Betbeze, M. Delhoume, S. Hantz, S. Alain, S. Laperche. Two cases of transfusion-transmitted Hepatitis B virus infection in a low endemic country before implementation of HBV NAT Transfusion, 2012 sous presse

3/ Activités de surveillance des donneurs de sang :

La surveillance des donneurs de sang positifs pour les marqueurs des VHB et VHC s'inscrit dans un étroit partenariat avec l'InVS, l'Etablissement Français du Sang et le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA). Celle-ci est basée sur différents paramètres permettant de caractériser démographiquement et biologiquement la population des donneurs de sang concernés et de suivre les indicateurs épidémiologiques afférents. Elle vise également à identifier les facteurs de risque liés aux infections dans cette population pour, d'une part, permettre d'écarter les candidats au don susceptibles de compromettre la sécurité transfusionnelle en renforçant l'efficacité de l'entretien précédant le don, et pour d'autre part déterminer les risques correspondant aux nouvelles infections.

Parallèlement à cette veille épidémiologique descriptive, est menée une surveillance virologique plus spécifique. Elle a pour objectif de mieux caractériser le profil biologique des donneurs confirmés positifs pour les virus VHB et VHC et d'assurer une veille de la diversité virale des souches circulant dans la population des donneurs de sang. Cette surveillance est réalisée en prospectif depuis 2000 à partir d'un échantillon de chaque don confirmé positif. L'acheminement d'un échantillonnage de tout don trouvé positif pour un des marqueurs de l'infection par les virus VHB ou VHC depuis l'EFS vers notre laboratoire, est régi par l'arrêté du 6 février 2009 précisant les conditions de transmission de poches et d'échantillons de plasma issus de donneurs de sang prélevés par l'Etablissement français du sang au

laboratoire de virologie transfusionnelle de l'Institut national de transfusion sanguine associé des centres nationaux de référence des virus des hépatites B, C et delta et du VIH, paru au journal officiel le 19 février 2009.

Les Antilles exclues de ce recueil jusqu'en 2005 en raison de difficultés organisationnelles occasionnées par le transport des échantillons, ont été intégrées à cette surveillance en 2006. Toutefois la mise en place récente de cette mesure ne permet pas encore d'apporter des renseignements significatifs spécifiques à ces départements.

3.1 Méthode

Le **recueil des données épidémiologiques** est basé sur des questionnaires trimestriels élaborés conjointement avec l'InVS et réactualisés chaque année au sein d'un comité de pilotage regroupant différentes institutions de la transfusion, en fonction des éléments scientifiques et épidémiologiques les plus récents et des nouvelles techniques disponibles. Les informations sont fournies par les correspondants d'hémovigilance, en relation avec les responsables des plateaux de qualification virologique des dons de l'EFS et concernent les dons homologues et autologues.

Par ailleurs, les estimations du risque résiduel (RR) viral sont régulièrement mises à jour sur la base d'un modèle mathématique dont le principe est d'établir une probabilité de risque, avec le postulat qu'un donneur ayant nouvellement développé une infection, ait pu se trouver en fenêtre silencieuse lors du don antérieur (négatif de tout marqueur). Plus la fenêtre silencieuse (FS) est longue, plus grande est la probabilité du risque. Deux facteurs sont donc pris en compte dans ce calcul :

- (i) le taux d'incidence (T_i) des séroconversions pour chaque virus étudié, dans la population des donneurs ayant donné au moins deux fois durant la période de l'étude (qui est de 3 années consécutives) et,
- (ii) les estimations des durées respectives des fenêtres silencieuses publiées dans la littérature : 38 jours pour l'Ag HBs, 66 jours pour les anticorps anti-VHC et 10 jours avec le DGV-VHC.

Pour le VHB, le calcul est assujéti à un ajustement de manière à prendre en compte le caractère transitoire de l'Ag HBs sur lequel est fondée l'estimation du risque résiduel. Ce facteur d'ajustement est responsable de variations observées dans le calcul du risque résiduel lorsque le nombre de cas incidents Ag HBs est stable, voire à la baisse. Aussi, une seconde méthode de calcul du risque est réalisée en parallèle celle-ci consiste à supprimer l'utilisation du facteur de correction pour le calcul du RR VHB en évaluant le taux d'incidence de l'Ag HBs et de l'anti-HBc.

Pour prendre en compte tous les cas de figures entrant de l'histoire naturelle de l'infection décrits plus haut, le risque résiduel VHB s'obtiendrait ainsi par la formule suivante :

$$75 \% RR1 + 25 \% RR2$$

où $RR1 = FS \text{ Ag HBs} \times (T_i \text{ Ag HBs} + T_i \text{ anti-HBc})$ couvrant les cas où l'Ag HBs est présent (70% transitoire et 5% chronique), et

où $RR2 = FS \text{ anti-HBc} \times Ti \text{ anti-HBc}$ en référence à l'antigénémie HBs fugace ou indétectable (25% des cas).

La surveillance virologique du VHB comprend :

1) La détermination du **titre de l'Ag HBs** par comparaison à une gamme de référence à l'aide d'un réactif commercial ou par électroimmunodiffusion

2) La recherche de la **virémie** (débutée en 1998) par une méthode d'amplification par PCR d'un fragment de génome de la capsid virale (nucléotides 1955-2401), mise au point au laboratoire et dont la sensibilité analytique sur un échantillon de référence international (WHO) avait été estimée entre 500 et 1000 copies/ml. A partir de 2004, cette méthode a été remplacée par une PCR amplifiant une partie du gène S correspondant à la boucle antigénique de l'Ag HBs (nucléotides 256-723) et dont la sensibilité analytique a été évaluée à 500 copies/ml (référence internationale WHO). La détermination de la charge virale est réalisée depuis 2005 avec le réactif Cobas Taq Man, Roche (Limite de Quantification : 6UI/ml).

3) La détermination du **profil sérologique HBe**

1) La quantification des **anticorps anti HBs** par une technique commerciale (Murex anti HBs, Dia Sorin)

5) La détermination du **sous-type de l'Ag HBs** par un test immuno-enzymatique mis au point au laboratoire (Laperche et al J Viral Hepatitis, 2001) basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux de spécificité restreinte. La sensibilité de cette méthode obtenue par l'analyse de dilutions successives d'échantillons de différents sous-types a été estimée entre 10 et 1000 ng/ml d'Ag HBs.

6) L'analyse moléculaire par **phylogénie** des souches virales est venue compléter le sérotypage pour les souches particulières dès 2002. Elle concerne toutes les souches disponibles en quantité suffisante et dont la virémie est détectable sur tous les dons Ag HBs positifs depuis 2005. Cette analyse comprend la détermination du génotypage et la mise en évidence de mutations dans l'enveloppe virale à l'aide d'une PCR maison couvrant la région hydrophilique majeure de la protéine d'enveloppe « S » (région amplifiée : nucléotides 99 à 568) suivie d'une étape de séquençage direct.

7) La recherche des **anticorps anti-Delta** avec un réactif commercialisé, (ETI-AB-DELTA K 2, Dia Sorin, Saluggia, Italie)

La surveillance virologique du VHC comprend :

1) La recherche de l'**ARN plasmatique** pratiquée sur les dons anti-VHC positifs collectés entre le 1^{er} janvier 2000 et le 30 juin 2001, veille de la mise en place systématique du DGV du VHC. Cette recherche a été réalisée sur tous les dons anti-VHC confirmés positifs reçus au laboratoire et prélevés sur cette période de 18 mois, par le réactif AMPLICOR VHC 2.0 (Roche), dont le seuil de sensibilité annoncé était de 50 UI/ml. La quantification de la charge

virale est réalisée sur chaque don collecté à partir de 2007 par RT PCR (*Cobas TaqMan, Roche Limite de Quantification : 25 UI/ml*)

2) La détermination du **génotype** réalisée sur chaque échantillon virémique par hybridation inverse (InnoLipa VHC, BAYER, Eragny, France) et par séquençage d'un fragment d'environ 300 paires de bases de la région NS5b (voire E1) du virus pour certains échantillons disponibles.

3) La détermination du **sérotype** réalisée sur chaque échantillon non- virémique par détermination de la spécificité des anticorps anti-NS4 grâce à la trousse Murex HCV serotyping (Murex).

3.2 Résultats

Les données qui sont présentées concernent les résultats exhaustifs obtenus depuis le début de la mise en place de la surveillance virologique jusqu'à la fin de l'année 2010. L'année 2011 n'a pas été prise en compte car l'ensemble des données n'était pas disponible au moment de la rédaction de ce rapport.

Seuls les éléments les plus significatifs sont présentés.

3.2.1 Le VHB

Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHB

Le tableau 1 et la figure 1 donnent la comparaison et l'évolution des taux de positivité pour l'Ag HBs observés entre 1993 et 2010 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

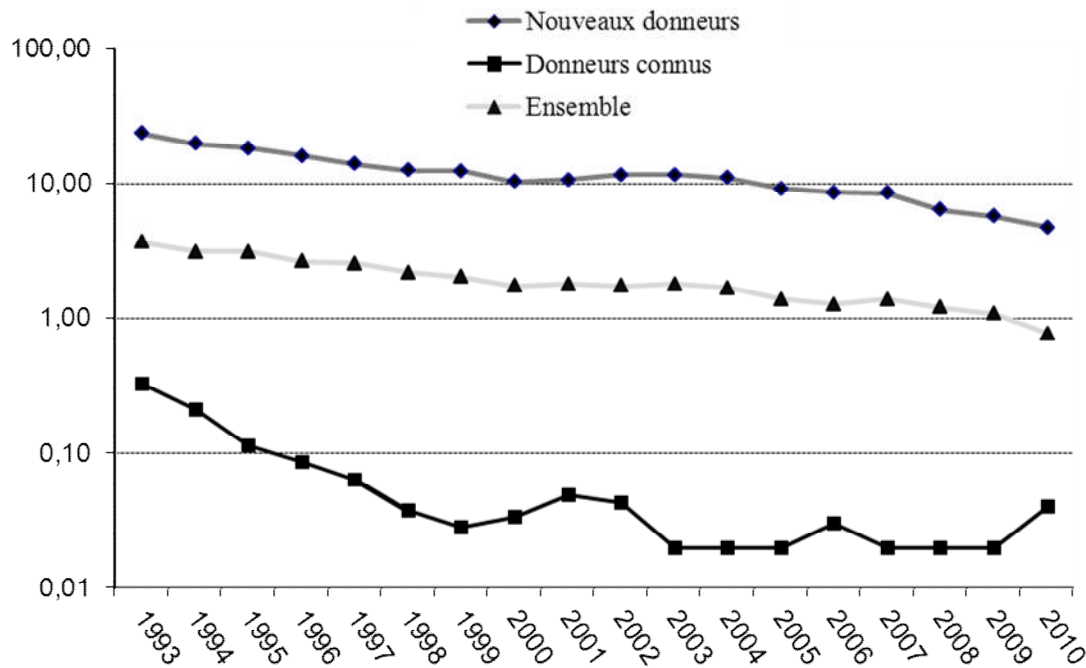
Tableau 1 : Taux de l'Ag HBs observés dans les dons de sang de 1993 à 2009.

Année	Nouveaux donneurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux p. 10000 dons
1993	1168	23,8	96	0,33	1264	3,72
1994	935	20,1	56	0,21	991	3,17
1995	885	18,6	28	0,12	913	3,14
1996	717	16,2	20	0,09	737	2,67
1997	682	14,1	14	0,06	696	2,58
1998	569	12,6	8	0,04	577	2,23
1999	511	12,5	6	0,03	517	2,06
2000	431	10,3	7	0,03	438	1,77
2001	434	10,8	10	0,05	444	1,83
2002	424	11,7	9	0,04	433	1,76
2003	447	11,7	4	0,02	451	1,83
2004	420	11,1	4	0,02	424	1,70
2005	346	9,25	5	0,02	351	1,40
2006	327	8,61	6	0,03	333	1,29
2007	376	8,57	5	0,02	381	1,40
2008	339	6,39	5	0,02	344	1,22
2009	322	5,75	5	0,02	327	1,09
2010	224 ¹	4,77	10 ²	0,04	234	0,78

¹ dont 6 AgHBs negDGV pos

² dont 1 AgHBs negDGV pos

Figure 1: Evolution des taux (pour 10.000 dons) de dons de sang AgHBs positifs de 1993 à 201 (échelle logarithmique).



Une baisse régulière des taux est observée chez les nouveaux donneurs. La diminution plus importante observée jusqu'en 1998 peut être attribuée à une pratique de plus en plus fréquente de la vaccination. Cette baisse a été suivie d'un plateau jusqu'en 2004, lui-même suivi d'une nouvelle inflexion de la prévalence particulièrement marquée depuis 2007. Le taux d'incidence a régulièrement diminué jusqu'en 1999 puis a subi des variations qui ne sont toutefois pas significatives compte tenu des faibles effectifs concernés.

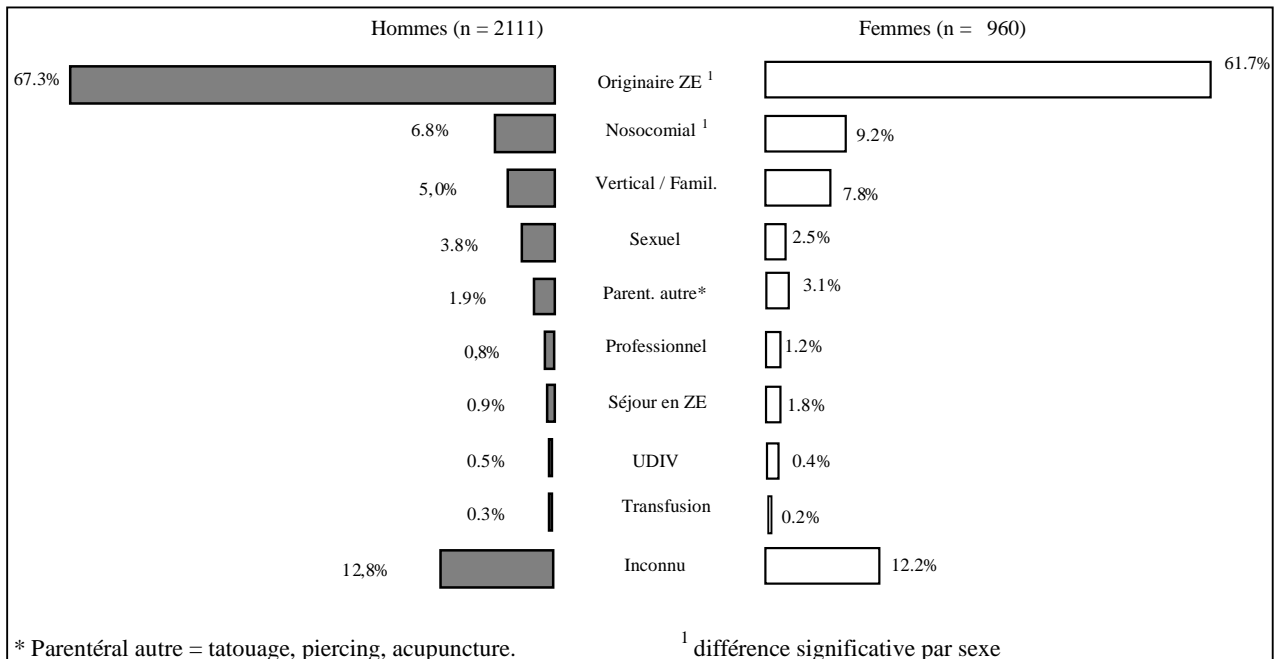
Les départements d'Outre-Mer ont une prévalence environ 10 fois supérieure à celle observée dans les autres départements.

Comme le montre la figure 2, qui fait état des facteurs de risque (hiérarchisés en fonction de leur probabilité de survenue) recherchés chez 3071 (66.2%) des 4635 nouveaux donneurs positifs pour l'Ag HBs, prélevés en France métropolitaine entre 1998 et 2010, et qui ont pu être interrogés, le facteur de risque principal est l'origine géographique, suivi du risque nosocomial.

En revanche, chez les donneurs connus de la période 1998-2010 (nombre total :84) pour lesquels un facteur de risque a pu être identifié (40 sur les 61 interrogés), le risque sexuel se retrouve au premier plan (1/4 des cas).

Il convient de souligner, que chez 12% des nouveaux donneurs et dans 34% des cas chez les donneurs connus, interrogés sur leur facteur de risque, celui-ci n'a pas été identifié.

Figure 2 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs Ag HBs positifs en France métropolitaine entre 1998 et 2010 (n= 3071).



Surveillance virologique de l'infection par le VHB

Le tableau 2 fait état de l'évolution des **titres de l'Ag HBs** dans les dons positifs pour ce marqueur entre 1998 et 2010

Ces résultats montrent que plus de 99% des dons analysés avaient un taux d'Ag HBs supérieur à 0,25 ng/ml, taux environ 20 fois supérieur aux capacités de détection des tests de dépistage de l'Ag HBs utilisés à ce jour. Les taux observés sont stables dans le temps. La corrélation entre concentration de l'Ag HBs et la charge virale en fonction des génotypes est en cours.

Tableau 2 : Evolution des titres de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1998 et 2010

Ag HBs (ng/ml)	1998		1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
< 0,25	2	0,6	0	0,0	1	0,3	0	0,0	4	1,2	0	0	2	0,5	3	1	1	0,3	5	1,4	3	0,9	1	0,3	4	2	26	3,6%
0,25-50	16	4,8	27	8,7	19	5,9	19	5,6	11	3,3	17	5,0	33	9,0	19	6,3	18	6,1	23	6,6	25	7,7	16	5,2	14	7,1	257	5,2 %
50 – 3 990	101	30,3	71	23,0	89	27,5	83	24,6	59	20,4	70	20,7	64	17,6	52	17,2	61	20,7	62	17,9	81	24,8	59	22,3	31	15,7	903	21,8 %
4 10 ³ – 10 ⁵	179	53,8	177	57,3	164	50,6	185	54,7	198	58,6	186	55,0	187	51,2	173	57,1	150	50,8	163	47,1	160	49,1	151	48,9	103	52	2176	52,5%
1,5 10 ⁵ – 7,5 10 ⁵	30	9,0	30	9,7	44	13,6	44	13,0	53	15,7	80	23,7	70	19,2	54	17,8	57	19,3	79	22,8	46	14,1	54	20,7	44	22,2	695	16,8 %
> 7,5 10 ⁵	5	1,5	4	1,3	8	2,5	7	2,1	3	0,9	10	3,0	9	2,5	2	0,7	8	2,7	14	4,0	11	4,1	8	2,6	2	0,1	91	2,2%
Total testés	333	100	309	100	325	100	338	100	338	100	363	100	365	100	303	100	295	100	346	100	326	100	309	100	198	100	4148	100,0%

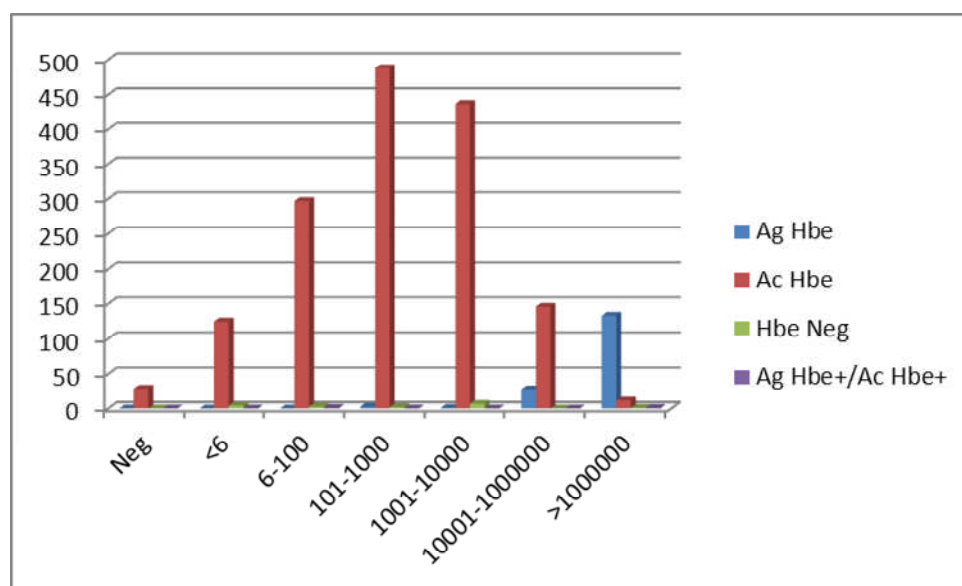
La répartition des **marqueurs HBe** sur les 4143 dons pour lesquels l'information est disponible : soit 78.8% des 5254 dons collectés dans la période 1998-2010 est fourni dans le tableau 3.

Tableau 3 : Répartition des marqueurs HBe chez les donneurs AgHBs positifs entre 1998 et 2010

	AcHBe pos		AgHBe pos		AgHBe pos / AcHBe pos		HBe neg		Total testé N
	N	%	N	%	N	%	N	%	
1998	291	86,9	39	11,6	2	0,6	3	0,9	335
1999	260	85,5	40	13,2	0	0,0	4	1,3	304
2000	269	85,7	40	12,7	1	0,3	4	1,3	314
2001	286	86,7	36	10,9	2	0,6	6	1,8	330
2002	302	89,6	34	10,1	0	0,0	1	0,3	337
2003	325	89,0	37	10,1	1	0,3	2	0,5	365
2004	321	87,9	39	10,7	1	0,3	4	1,1	365
2005	278	91,1	24	7,9	1	0,3	2	0,7	305
2006	266	89,6	29	9,8	0	0,0	2	0,7	297
2007	298	85,6	45	12,9	1	0,3	4	1,1	348
2008	291	89,0	30	9,2	1	0,3	5	1,5	327
2009	282	91,3	25	8,1	0	0	2	0,6	309
2010	181	87,4	19	9,2	0	0	7	3,4	207
Total	3650	88,1	427	10,5	10	0,2	46	1,1	4143

Il apparaît que 88.1% (3650/ 4143) des dons Ag HBs positifs sont **Ac HBe** positifs, cette proportion étant stable dans le temps. Par ailleurs, comme le montre la figure 3, les dons Ag HBe positifs présentent des charges virales plus élevées.

Figure 3: Relation entre la charge virale et le statut HBe sur 1718 dons Ag HBs positifs collectés entre 2005 et 2009 (165 AgHBe pos, 1534 Ac HBe pos, 17 HBe neg, 2 Ag et AcHBe).



Les recherche des **anticorps anti HBs** débutée en partie sur les dons de 2008 et systématisé depuis 2009 sur tous les dons AgHBs positifs était motivée par la description d'une sélection possible de souches échappant au système immunitaire lors de la coexistence des 2 marqueurs HBs (Lada O, J Virol. 2006) .

Le tableau 4 en fournit les résultats préliminaires et montre une faible fréquence (2.5% au total) des anti-HBs chez les donneurs AgHBs positifs sans liaison évidence avec l'existence de mutations du gène S. Toutefois, les effectifs sont en nombre trop faible pour être exploités.

Tableau 4 : Fréquence des anti-HBs chez les donneurs AgHBs positifs de 2008 à 2010 en fonction du génotype

Ac HBs	2008	2009	2010	Total
N testés	313	301	203	817
N Ac HBs Pos	8	5 (1,7%)	8 (3.9%)	21 (2.5%)
Taux (mUI/mL)	10-145	17-46	10- >100	10->100
Ac HBe	7	5	8	20
gt A	1 dble pop	2	1	4
gt B	0	0	1	1
gt C	1	0	1	2
gt D	3	1	4	8
gt E	1	1	0	2
gt F	1	0	0	1
ND	1	1	1	3
Mutations HBs	0	1	3	4

Sur les 4667 donneurs trouvés Ag HBs positifs entre 1999 et 2010, 3805 (81.5 %) ont bénéficié d'un **sous-typage de l'Ag HBs** et 85.4 % d'entre eux (n = 3251) ont pu être entièrement typés. Les 14.6 % n'ayant pas pu être entièrement sous typés correspondaient dans la majorité des cas à des échantillons présentant des titres d'AgHBs inférieurs au seuil de détection de la technique de sérotypage.

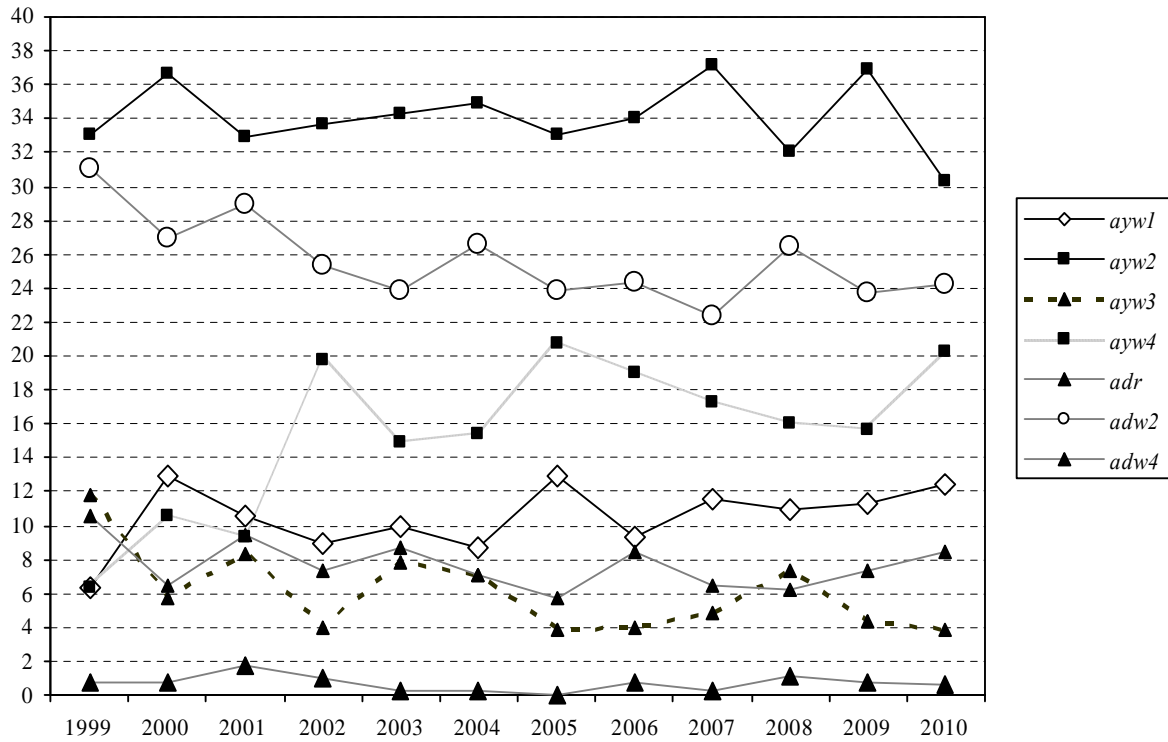
Le tableau 5 et la figure 4 montrent l'évolution de la répartition des différents sous-types de l'Ag HBs de 1999 à 2010.

Sur l'ensemble de la période 1999-2010, le sous-type *ayw2* (correspondant au génotype D, fortement prévalent dans le bassin-méditerranéen) était le plus fréquent (34.2 %), suivi du sous-type *adw2* (génotype A ou B, majoritaire en Europe occidentale) (25.7 %). Les sous-types *ayw1* (génotype A (Afrique) ou B (Asie)), *ayw4* (génotype E originaire d'Afrique subsaharienne) et *adr* (génotype C, asiatique) étaient en proportions respectives de 10.4%, 15,3 % et 7,6%. Toutefois, une dynamique des sous types a pu être observée jusqu'en 2005 comme montré dans la figure 7 puisque l'on note une diminution significative ($p=0.004$) des souches *adw2* et *ayw3* ($p=0.001$) et une augmentation des *ayw4* ($p<10^{-4}$), en probable liaison avec une augmentation des donneurs originaires d'Afrique. Depuis 2005 une relative stabilisation des proportions est observée avec toutefois des fluctuations avec notamment une baisse des *ayw2* au profit des *ayw4* qui mérite d'être confirmée dans les années à venir.

Tableau 5 : Répartition des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2010 (incluant les Antilles depuis 2006 et La Réunion depuis 2008)

Sous- types	1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>ayw1</i>	16	6,3	34	12,9	29	10,5	27	8,9	31	10,0	27	8,6	34	12,9	23	9,3	34	11,6	30	10,9	31	11,3	22	12,4	338	10,4
<i>ayw2</i>	84	33,1	97	36,7	91	32,9	102	33,7	106	34,3	109	34,9	87	33	84	34,0	109	37,1	88	32,0	101	36,9	54	30,3	1112	34,2
<i>ayw3</i>	30	11,8	15	5,7	23	8,3	12	4,0	24	7,8	22	7,1	10	3,8	10	4,0	14	4,8	20	7,3	12	4,4	7	3,9	199	6,1
<i>ayw4</i>	16	6,3	28	10,6	23	8,3	60	19,8	46	14,9	48	15,4	55	20,8	47	19,0	51	17,3	44	16,0	43	15,7	36	20,2	497	15,3
<i>adr</i>	27	10,6	17	6,4	26	9,4	22	7,3	27	8,7	22	7,1	15	5,7	21	8,5	19	6,5	17	6,2	20	7,3	15	8,4	248	7,6
<i>adw2</i>	79	31,1	71	26,9	80	28,9	77	25,4	74	23,9	83	26,6	63	23,8	60	24,3	66	22,4	73	26,5	65	23,7	43	24,2	834	25,7
<i>adw4</i>	2	0,8	2	0,8	5	1,8	3	1,0	1	0,3	1	0,3	0	0	2	0,8	1	0,3	3	1,1	2	0,7	1	0,6	23	0,7
	254	100,0	264	100,0	277	100,0	303	100,0	309	100,0	312	100,0	264	100,0	247	100	294	100	275	100	274	100	178	100	3251	100,0
N analysés	300		314		327		334		362		365		306		303		348		329		310		207		3805	
N non typables	46 (15,3%)		50 (15,9%)		50 (15,3%)		31 (9,3%)		53 (14,6%)		53 (14,5%)		42 (13,7%)		56 (18,5%)		54 (15,5%)		53 (16,1%)		36 (11,6%)		29 (14,%)		554 (14,4%)	

Figure 4 : Evolution de la part relative (en %) des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2010 (incluant les Antilles depuis 2006 et La Réunion depuis 2008)



Le tableau 6 montre la répartition des origines géographiques des donneurs Ag HBs positifs en fonction du sous-type et confirme la relation entre le sous-type ayw1 et l'Afrique Sub-Saharienne (49.0), le sous-type ayw2 avec le bassin Méditerranéen (49.1%), les sous-types ayw3 et adw2 avec l'Europe (68.3% et 62.4%, respectivement), le sous-type ayw4 avec l'Afrique sub-saharienne (78.3%) et du sous-type adr avec l'Asie (60.6%).

Tableau 6 : Proportion (%) des différentes origines géographiques des donneurs Ag HBs positifs en fonction du sous-type 1999-2010

Origine géographique	ayw1		ayw2		ayw3		ayw4		adr		adw2		adw4		Total sous typés	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Europe ¹	50	16.4	331	35.4	112	68.3	78	17.1	59	27.1	458	62.4	11	55	1099	38.8
Bassin Méditerranéen	15	4.9	459	49.1	20	12.2	6	1.3	0	0	52	7.1	0	0	552	19.5
Afrique Sub Saharienne	149	49.0	74	7.9	10	6.1	358	78.3	2	0.9	64	8.7	0	0	657	23.2
Asie	68	22.4	13	1.4	3	1.8	1	0.2	132	60.6	55	7.5	0	0	272	9.6
Autre	22	7.2	58	6.2	19	11.6	14	3.1	25	11.5	105	14.3	9	45	252	8.9
Sous total	304	100,0	935	100.0	164	100.0	457	100.0	218	100.0	734	100.0	20	100.0	2832	100.0
Ethnie inconnue	34 (10.1 %)		177 (15.9 %)		35 (17.6%)		40 (8.0 %)		30 (12.1 %)		100 (12.0 %)		3 (13.0 %)		419 (12.9%)	
Total	338 (10.4%)		1112 (34.2 %)		199 (6.1 %)		497 (15.3 %)		248 (7.6%)		834 (25.7 %)		23 (0.7%)		3251 (100%)	

¹ Bassin Méditerranéen exclu

L'analyse moléculaire a été réalisée sur 1748 dons Ag HBs positifs et/ ou ADN pos collectés de 2005 à 2010. Parmi ces 1748 dons, 213 (12.2%) n'étaient pas génotypables en raison d'une charge virale trop faible ou de chromatogrammes de séquençage ne permettant pas de conclure de façon formelle sur la séquence obtenue (doubles populations par exemple). La répartition des génotypes est donnée dans la figure 4. Comme présenté dans la figure 5, la proportion des génotypes est stable entre 2005 et 2009. En 2010, on note une inflexion du génotype D au profit des génotypes A et E. Cette tendance (non statistiquement significative) devra être confirmée dans les années à venir.

On note une prévalence globale plus élevée de génotype D (42.4%), suivie des génotypes A (27.2%) et E (16.8%) puis des génotypes B (6.3%), C (6.5%) et F (0.7%).

Cette répartition est en accord avec l'origine géographique des donneurs (A : Europe, B : Asie, C : Asie, D : bassin méditerranéen et Europe, E : Afrique). Le sexe ratio n'est pas différent en fonction des génotypes. En revanche, parmi les hommes, l'âge moyen est plus élevé chez les sujets infectés par le génotype D (34,4 ans) et les plus jeunes ont été observés dans le génotype E (24,8 ans, $p < 10^{-4}$). Les femmes infectées par le génotype A sont plus âgées que celles infectées par le génotype E (35.7 contre 23.4 ans, respectivement, $p < 10^{-4}$).

Figure 4: Répartition des génotypes du VHB chez 1575 donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2010

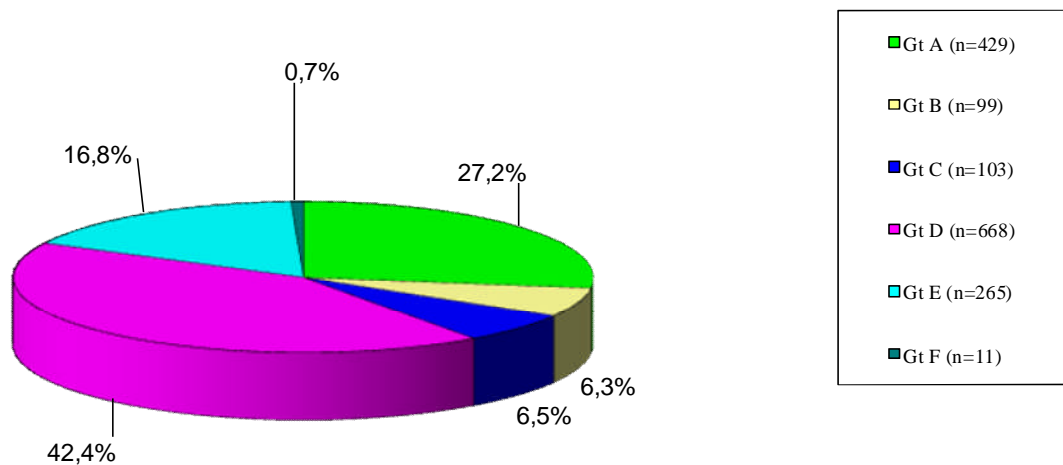
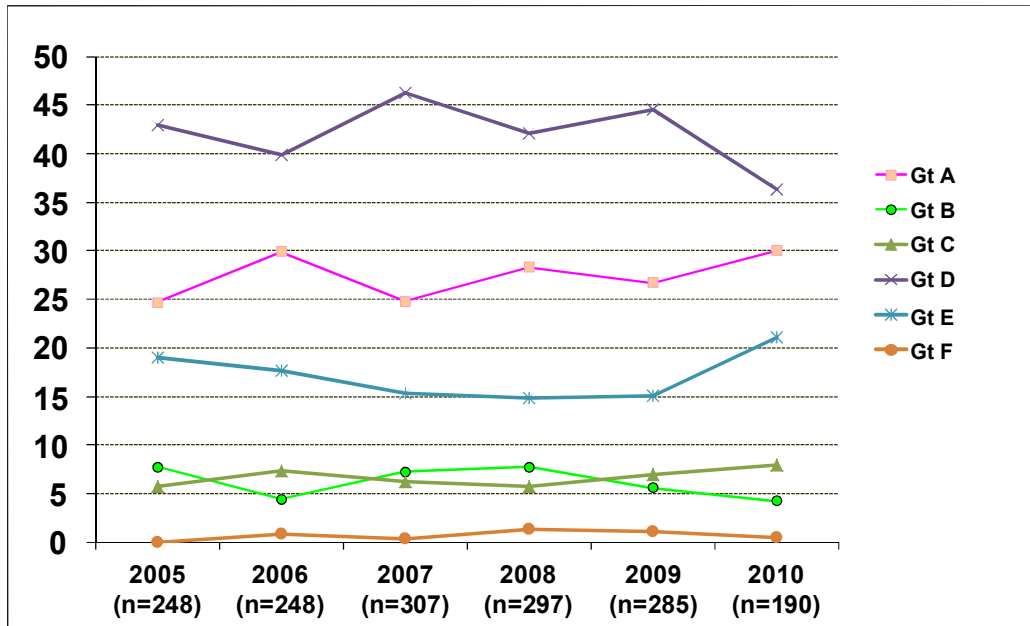


Figure 5: Evolution des proportions (%) des différents génotypes du VHB chez les donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2010



La répartition des génotypes observée dans notre population est sensiblement différente de celles décrites dans divers travaux réalisés en France puisque, même si les génotypes A et D restent les plus prévalents, leurs proportions respectives varient de 24% à 51% pour le génotype A (27.3% dans notre population) et de 18% à 42.4% (dans notre population) pour le génotype D. (Halfon P et al. J Viral Hepat 2006, Trimoulet P et al. Gastroenterol Clin Biol. 2007; Ganne-Carrie N et al, J Med Virol 2006). L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer ces différences est le biais lié au recrutement.

Le tableau 7 compare la répartition des génotypes entre les donneurs Ag HBs positifs ayant fait un don aux Antilles entre 2005 et 2010 et ceux ayant donné en Métropole entre 2005 et 2010 et à la Réunion entre 2008 et 2010. 55 (41%) des 134 dons prélevés aux Antilles dans la période d'étude ont été analysés. Bien que les effectifs soient trop faibles pour en tirer un enseignement, l'on note des différences significatives : le génotype A étant majoritaire aux Antilles avec 75% des souches dont, par ailleurs, 68.3% (n= 21) sont A1, décrites comme étant originaires d'Afrique et 17.1% (n=7) sont A2, d'origine européenne.

Tableau 7: Comparaison de la répartition des génotypes du VHB entre les souches provenant des donneurs de sang prélevés aux Antilles (2005-2010) et sur le reste du territoire (Métropole 2005-2010 et Ile de la Réunion 2008-2010)

génotype	Antilles		Métropole + Réunion		p
	N	%	N	%	
A dont	41	74.5 %	390	25.8 %	<10 ⁻⁴
A1	28 (68.3%)*		85(21.8%)**		
A2	7(17.0%)		120(30.8%)		
A autres	6(14.6%)		185(47.4%)		
B	1	1.8%	98	6.5%	NS
C	0	0%	102	6.8 %	na
D	10	18.2%	649	42.3%	<10 ⁻³
E	3	5.5%	262	17.3%	0.02
F	0	0%	11	0.7%	na
TOTAL	55		1512		

* dont 21/21 testés (100%) sont adw2

** dont 58/85 (68.2%) sont adw2

La corrélation entre sérotype et génotype figure dans le tableau 8. Sur les 1758 échantillons étudiés (4 non testés ni génotypage ni en sérotypage), 1532 (85.1%) ont été étudiés pour le sérotype et 1535 (87.3%) par génotypage. Parmi ces 1758 échantillons, 1380 (78.5%) ont été caractérisés par les 2 méthodes (encadré dans le tableau 7), 71 (4.0%) n'ont pu être caractérisés par aucune des méthodes, 155 (8.8%) uniquement par séquençage et 152 (8.7%) uniquement par sérotypage.

Parmi les 1380 échantillons caractérisés par les 2 méthodes, 23 (1.7%) étaient discordants selon la classification admise liées à des mutations modifiant le sérotype.

Tableau 8 : Répartition des génotypes du VHB et relation avec le sérotype chez 1535 donneurs de sang entre 2005 et 2010

Sous-types	ayw1	ayw2	ayw3	ayw4	adw2	adw4	adr	Total ss typés	Non typables	Non testés	TOTAL	
Génotypes												
A	104 (67.1%)	2 (0.4%)			291(89.5 %)			397	22 ¹	10	429	27,9%
B	47 (30.3%)				33 (10.2 %)			80	19	0	99	6,4%
C		1 (0.2%)					94(100%)	95	6	2	103	6,7%
D	4 (2.6%)	475 (97.5%)	61(99.4%)	4 (1.6%)				544	111	13	668	43,5%
E		9(1.9 %)	1(0.6%)	244(98.4%)	1 (0.3%)			255	6	4	265	17,3%
F						9(100%)		9	2	0	11	0,7%
Total génotypés	155	487	62	248	325	9	94	1380	126	29	1535	100%
Non génotypables	19	36	10	27	41	0	12	145	54	14	213	
Non testés	0	0	1	1	4	0	1	7	3	4	14	
TOTAL	174	523	73	276	370	9	107	1532	183	47	1762	

En gras et souligné les discordances de classification entre génotypes et sérotypes

¹ incluant 2 ADN pos/AgHBs neg

Par ailleurs, des mutations du gène S codant pour l'enveloppe virale décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination, ou aux immunoglobulines et hors polymorphisme naturel ont été retrouvées pour 65 échantillons (4.2%) (voir tableau 9). 54 souches présentaient une mutation unique dans la région analysée, et 11 des mutations multiples (2 : n=6, 3 : n=2 ; >3 n=3). La mutation majoritairement identifiée (15.4%) portait sur le résidu 133 (10 cas dont 2 en association avec une autre mutation), puis sur les résidus 130 et 134 (9 cas pour chacun). Le génotype B présente la plus forte proportion de souches mutées (8,3%) alors que le génotype E semble être plus conservé (2,7%).

Il convient de noter que les variants retrouvés ici ont été détectés par les trousseuses utilisées dans le dépistage de l'Ag HBs sur les dons de sang. Par contre, il n'est pas exclu que leur détection soit altérée avec d'autres trousseuses.

Tableau 9: Inventaire des mutations du gène S du VHB retrouvées par analyse moléculaire de 1535 donneurs de sang virémiques 2005-2010

Génotype	A	B	C	D	E	F	TOTAL
Mutations							
M113T	1						1
P120S				1			1
P120T	1	1			1		3
I/T126A		2	2				4
T126N				1			1
G129H		1					1
Q129H	1			2	1		4
G130R	1			3			4
G130N	3						3
T131I		1		3			4
M133I				2			2
M133T	3			1			4
M133L		1			1		2
F134L	1						1
Y134N				3			3
Y134F				2			2
T/S143M	2			2			4
S143L				2			2
D144E		1			1		2
G145R	1				2		3
G145A					1		1
P120S-F134I	1						1
Q129H-D144A	1						1
Q129R-G130N	2						2
G130R-S132Y				1			1
M133T-F134L	1						1
T131N-M133I-Y134F		1					1
T116N-S117K-T125M	1						1
Multiples mutations >=3	1		2				3
codon stop w172				1			1
insertion 116T	1						1
Total	22	8	4	24	7	0	65
% /génotype	33,8%	12,3%	6,1%	36,9%	10,8%	0%	4,2%

La figure 6 et le tableau 10 font état de la relation entre charge virale et génotype sur 1686 souches. Ces résultats montrent que les charges virales plus élevées sont observées pour les génotypes B et C avec une différence statistiquement significative ($p < 10^{-3}$).

Figure 6 : Proportions (%) des charges virales (log UI/ml) en fonction du génotype du VHB chez 1686 donneurs de sang en 2005 et 2010. (ND : génotype non déterminé)

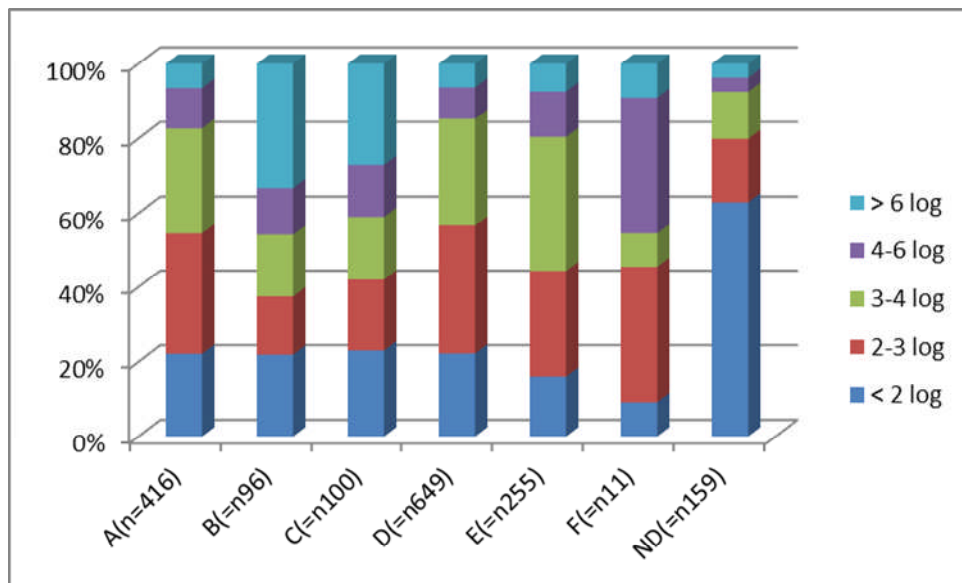


Tableau 10: Pourcentage de donneurs de sang dans les différentes tranches de charges virales en fonction des génotypes 2005-2010

CV log UI/ml	Gen A (n=416)	Gen B (n=96)	Gen C (n=100)	Gen D (n=649)	Gen E (n=255)	Gen F (n=11)	Non Typables (n=159)	Total (N=1686)
<2	22,1	21,9	23,3	22,2	16,1	9,1	62,9	25,0
2-3	32,5	15,6	19,3	34,5	28,2	36,4	17,0	29,4
3-4	28,1	16,7	17,2	28,5	36,1	9,1	12,6	26,6
4-6	10,8	12,5	13,9	8,5	12,2	36,4	3,8	9,9
>6 *	6,5	33,3	26,3	6,3	7,5	9,1	3,8	9,1
moy	3.07	4.5	4.09	3.03	3.35	3.85	1.81	3.12
Ecart Type	1.63	2.65	2.46	1.59	1.57	1.85	1.64	1.84

* Différence significative ($p < 10^{-3}$) entre génotypes (gen F et non typables exclus)

Le statut vis à vis **des anticorps anti-Delta** des donneurs Ag HBs positifs est consigné dans le tableau 11.

Parmi les donneurs Ag HBs positifs 2,04% présentent une co-infection par le virus Delta entre 1997 et 2010. L'augmentation du pourcentage de donneurs avec des anticorps anti-delta à partir 2007 après 10 ans de stabilité avec une majorité de taux faible pourrait faire penser à des réactions non spécifiques. Il conviendra de consolider ces résultats. En ne prenant en compte que les positifs francs, le taux de prévalence des anticorps Delta s'élève à 1,3%.

En collaboration avec le laboratoire associé au CNR pour l'étude du virus Delta, nous menons une étude visant à établir les fréquences des sujets virémiques pour le virus Delta parmi les donneurs présentant des anticorps anti Delta. Quarante échantillons collectés entre 1997 et 2009 et disponibles en volume suffisant pour être étudiés, ont été analysés par biologie moléculaire. Ce panel d'échantillons se composait de 31 échantillons ayant présenté un taux élevé d'anticorps anti Delta, 9 un taux faible. Les premiers résultats sont les suivants : 12 échantillons avaient de l'ARN Delta détectable, dont 11 faisaient partie des échantillons à taux élevé d'anticorps : 9 étaient de génotype 1, 2 de génotype 7 et 1 n'a pas été typé. Les 12 donneurs étaient originaires d'Afrique. Une analyse plus approfondie des résultats notamment concernant les relations épidémiologiques est en cours.

Tableau 11: Prévalence des anticorps anti-Delta chez les donneurs de sang Ag HBs positifs de 1997 à 2010

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
n testés	250	324	278	303	325	330	360	360	397	283	331	314	299	200	4354
Positifs faibles	0	0	0	0	0	0	1	1	2	11	1	3	5	8	32
Positifs francs	3	3	4	1	4	4	4	4	3	3	8	10	3	5	59
% total	1.2	0,92	1.44	0,33	1.23	1.21	1.39	1.39	1.68	4.95	2.72	4.14	2.67	6.5	2.09
PCR Pos/nb testés parmi les positifs faibles	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/3	0/0	0/4	1/1	0/1	En cours	En cours	1/9
Génotype											Gén7				
PCR Pos/nb testé parmi les positifs francs	2/2	0/0	0/0	0/0	0/3	1/3	1/3	1/2	1/1	1/2	3/6	1/9	En cours	En cours	11/31
Génotype	2xGén1					Gén7	Gén1	Gén1	Gén1	ND	3xGén1	Gén1			

3.2.2 Le VHC

Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHC

Le tableau 12 et la figure 7 donnent la comparaison des taux de positivité pour le VHC observés entre 1993 et 2010 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

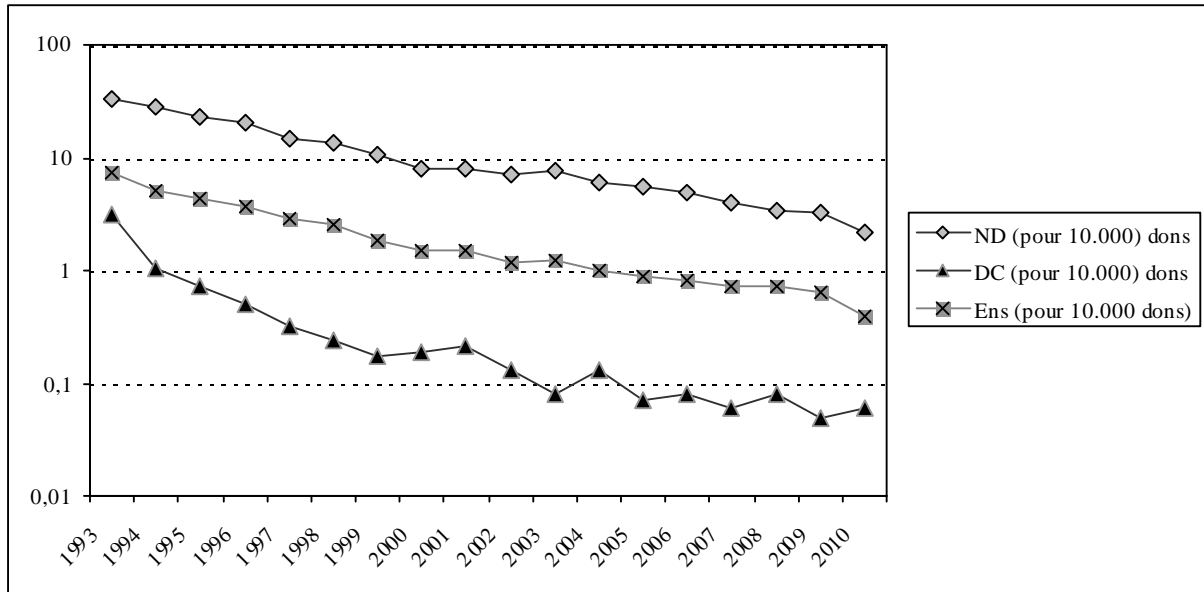
Tableau 12 : Taux des dons de sang VHC positifs de 1993 à 2010.

Année	Nouveaux donneurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons
1993	1605	32,7	902	3,1	2507	7,4
1994	1281	28,2	266	1,03	1547	5,08
1995	1106	23,3	178	0,73	1284	4,42
1996	914	20,7	118	0,51	1032	3,74
1997	720	14,9	71	0,32	791	2,93
1998	601	13,4	51	0,24	652	2,52
1999	428	10,5	36	0,17	464	1,84
2000	337	8,1	39	0,19	376	1,52
2001	322	8,0	43 ⁽²⁾	0,21	365	1,51
2002	262	7,2	27 ⁽²⁾	0,13	289	1,17
2003	290 ⁽¹⁾	7,60	16	0,08	306	1,24
2004	227	6,02	28 ⁽²⁾	0,13	255	1,02
2005	210	5,61	14 ⁽²⁾	0,07	224	0,89
2006	188 ⁽²⁾	4,95	17	0,08	205	0,80
2007	178 ⁽²⁾	4,06	14 ⁽¹⁾	0,06	192	0,71
2008	182	3,43	19 ⁽¹⁾	0,08	201	0,71
2009	181	3,23	13	0,05	194	0,65
2010	103	2,19	15 ⁽²⁾	0,06	118	0,39

⁽¹⁾ dont 2 Ac nég DGV pos

⁽²⁾ dont 1 Ac nég DGV pos

Figure 7: Evolution des taux (pour 10.000 dons) de dons de sang VHC positifs de 1993 à 2010. (ND : nouveaux donneurs, DC : donneurs connus, ens : ensemble) (échelle logarithmique)

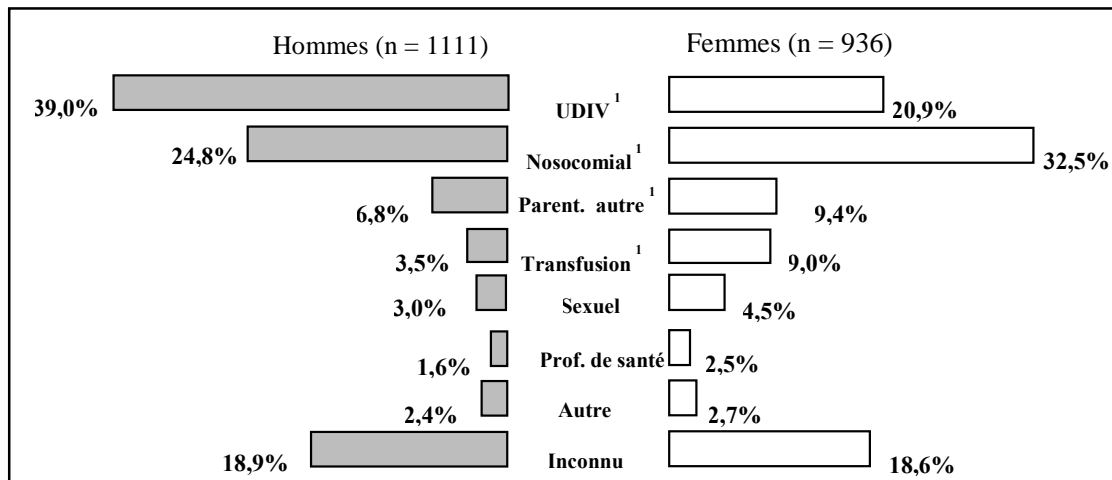


Une baisse régulière des taux est observée liée, d’une part à une sélection progressive de la population des donneurs connus, et d’autre part à une meilleure maîtrise des facteurs de risque qui a permis d’éliminer des candidats au don potentiellement à risque lors de l’entretien précédent le don. Une baisse notable de la prévalence en 2010 (-43%) est très certainement liée à un changement dans la politique de recrutement des donneurs (non montré).

Les facteurs de risque renseignés pour 58.3% (1964) des 3509 nouveaux donneurs VHC positifs entre 1998 et 2010 (figure 8) , montrent que près de 19% n’ont aucun facteur de risque identifié, et que la toxicomanie (39,0% chez les hommes et 20.9 % chez les femmes) et les expositions nosocomiales (24,8% chez les hommes et 32.5% chez les femmes) restent au premier plan des modes de contaminations potentiels retrouvés chez ces sujets.

Par contre (résultats non montrés), chez les 198 donneurs connus (87 hommes et 111 femmes) ayant présenté une séroconversion documentée et interrogés sur leur facteur de risque (soit 73,3% des 270 de cette catégorie entre 1994 et 2010), la toxicomanie par voie IV représente le facteur de risque le plus fréquemment identifié chez les hommes (22%) alors que pour les femmes il s’agit d’un partenaire connu pour être VHC positif (24%). La part des donneurs connus sans facteur de risque identifié s’élève à 30%.

Figure 8 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHC+ interrogés sur FdR 1998-2010 (n = 2047)



¹Différence significative par sexe

Surveillance virologique de l'infection par le VHC

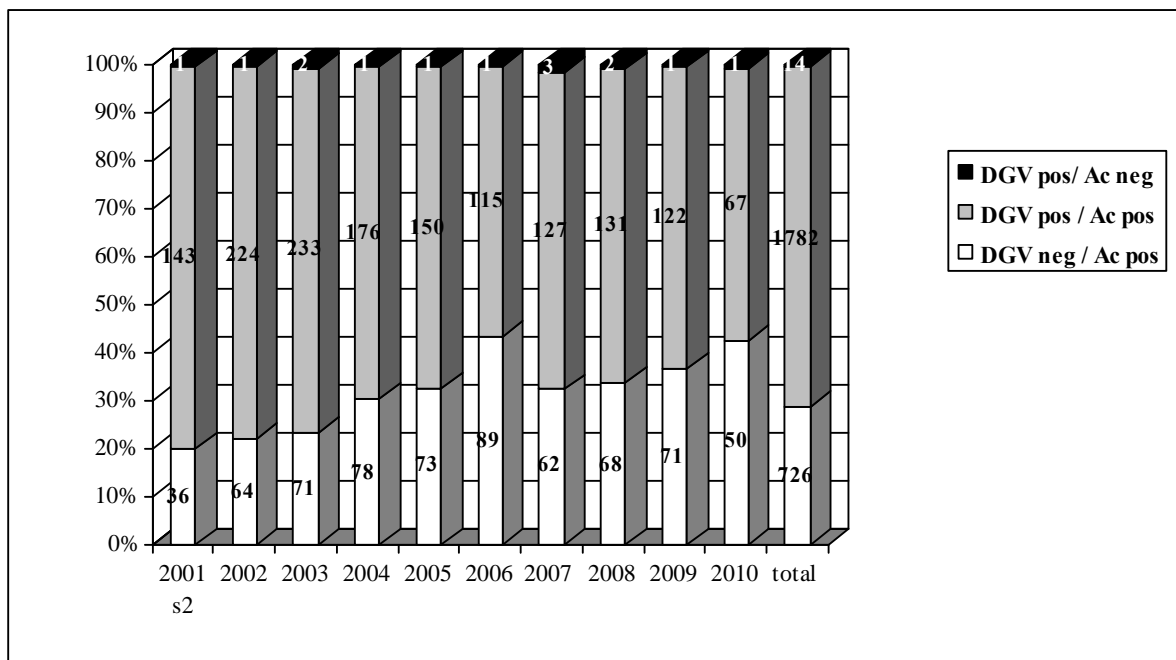
Sur la période 2000-2010, le laboratoire a reçu 2160 échantillons de donneurs VHC positifs, ce qui représente 79.2% des 2725 donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 11 ans.

Les résultats concernant la recherche de l'ARN du VHC fournis pour l'année 2000 et le 1^{er} trimestre 2001 sont issus des analyses pratiquées dans notre laboratoire, sur 64 % (358/561) des donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 18 mois et ceux fournis à partir du second semestre 2001 sont ceux du DGV et sont donc exhaustifs. Comme le montre le tableau 13, la proportion de dons VHC positifs virémiques est en moyenne de 70.7 % avec toutefois une tendance à la baisse de cette catégorie (figure 9) particulièrement marquée en 2006 et 2010. Aucune différence dans les caractéristiques démographiques et épidémiologiques entre le groupe des donneurs virémiques et celui des non virémiques n'a pu être mise en évidence pour expliquer ce phénomène.

Tableau 13 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2000 et 2010 en fonction de la virémie.

	2000		2001 (S1)		2001 (S2)		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ac +/ARN+	205	81	89	85	143	79,4	224	77,5	233	76,2	176	69,0	150	66,9	115	56,1	127	66.1	131	65.2	122	62.9	67	56.8	1782	70.7
Ac+/ARN -	48	19	16	15	36	20,0	64	22,2	71	23,2	78	30,6	73	32.6	89	43,4	62	32.3	68	33.8	71	36.6	50	42.4	726	28.8
Ac -/ARN +	0		0		1	0,6	1	0,3	2	0,6	1	0,4	1	0,5	1	0,5	3	1.6	2	1.0	1	0.5	1	0.8	14	0.5
TOTAL	253		105		180		289		306		255		224		205		192		201		194		118		2522	

Figure 9 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2001 (semestre 2 : début du DGV) et 2010 en fonction de la virémie (n=2522).



La figure 10 fournit la répartition des charges virales déterminées sur 435 donneurs prélevés en 2007 et 2010. Cinq donneurs avaient des CV inférieures au seuil de quantification de la trousse (<25 UI/ml), néanmoins dépistées par le DGV pratiqué en pool : 1 donneur était en phase de préséroconversion (Ac VHC négatif), les 4 autres étaient porteurs chroniques (Ac VHC positifs) dont 3 avec une CV faible et 1 porteur d'un génotype 4f, sous quantifié par le Cobas Taq Man (140 UI/ml Abbott). Dans le tableau 14 figure la répartition des CV en fonction des génotypes ainsi que les CV moyennes. Il existe une différence significative entre celles-ci ($p < 10^{-4}$) avec 2 groupes : 1) les CVs les plus élevées concernent les génotypes 1 (1a et 1b) et 2 (absence de différences entre les CVs moy entre ces génotypes) 2) les CVs les moins élevées observées pour les génotypes 3 et 4 (aucune différences entre ces 2 génotypes).

Figure 10: Répartition des charges virales (en UI/ml) du VHC chez 435 donneurs de sang virémiques prélevés en 2007 et 2010

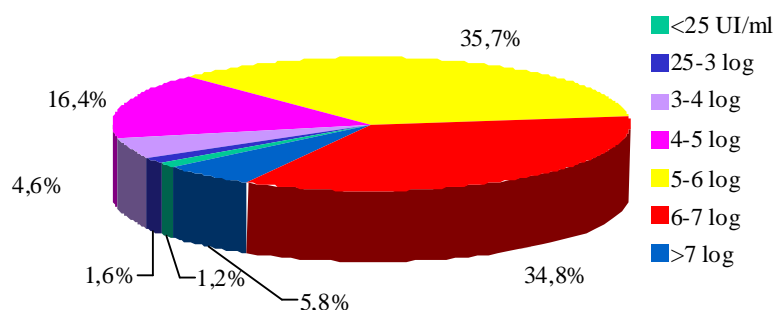


Tableau 14 : Répartition des CV VHC en fonction des génotypes (2007-2010)

CV log UI/ml	Gen1a (n=137)	Gen1b (n=116)	Gen2 (n=46)	Gen3 (n=90)	Gen4 (n=34)	Gen5 (n=5)	NG (n=5)	TOTAL (N=433)
<1.39	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,9%	0,0%	80,0%	1,2%
1.39-3	0,7%	1,7%	2,2%	2,2%	0,0%	20,0%	0,0%	1,6%
3-4*	0,7%	2,6%	6,5%	10,0%	11,8%	0,0%	0,0%	4,6%
4-5	13,1%	12,9%	10,9%	24,4%	29,4%	0,0%	20,0%	16,2%
5-6	37,9%	33,6%	23,9%	41,1%	38,2%	40,0%	0,0%	35,8%
6-7	39,5%	44,0%	43,5%	18,0%	17,6%	40,0%	0,0%	34,9%
>7	8,0%	5,2%	13,0%	2,2%	0,0%	0,0%	0,0%	5,8%
Moy	5.87	5.84	5.87	5.21	5.10	5.33	5.59	5.62
Ecart Type	0.83	0.89	1.15	1.18	1.38	1.57	2.49	1.08

NG : non génotypables

Sont exclus de ce tableau 2 échantillons de 2010 de génotypes 1d (CV : 6.90 log UI/ml) et 6 (CV : 5.68 log UI/ml) respectivement

Sur les 1796 donneurs trouvés ARN VHC positifs entre 2000 et 2010, 91.5 % (n = 1644) ont bénéficié d'une détermination du génotype. La figure 11 montre la répartition des génotypes sur l'ensemble de la période, et la figure 12 l'évolution des génotypes dans le temps.

Variabilité du VHC

Sur la période 2000-2009, le génotype le plus fréquent est le génotype 1 (57.4 %), suivi par le génotype 3 (21 %), le génotype 2 (11.5 %) et le génotype 4 (8,7 %). Cette répartition est relativement stable au cours des 5 premières années d'étude (pas de différence significative). Toutefois, en 2006 une augmentation des génotypes 4, avec une baisse des génotypes 1 ont été observées, tendances non confirmées en 2007-2009. Le génotype 1 semble amorcer une remontée en 2009 alors que l'inverse se produit pour le génotype 4.

Figure 11 : Répartition des génotypes du VHC chez 1658 donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2010

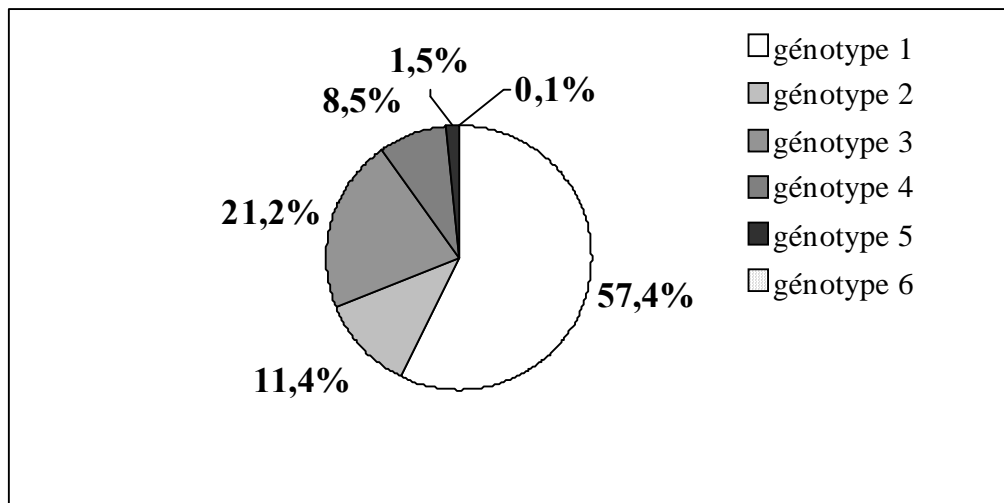
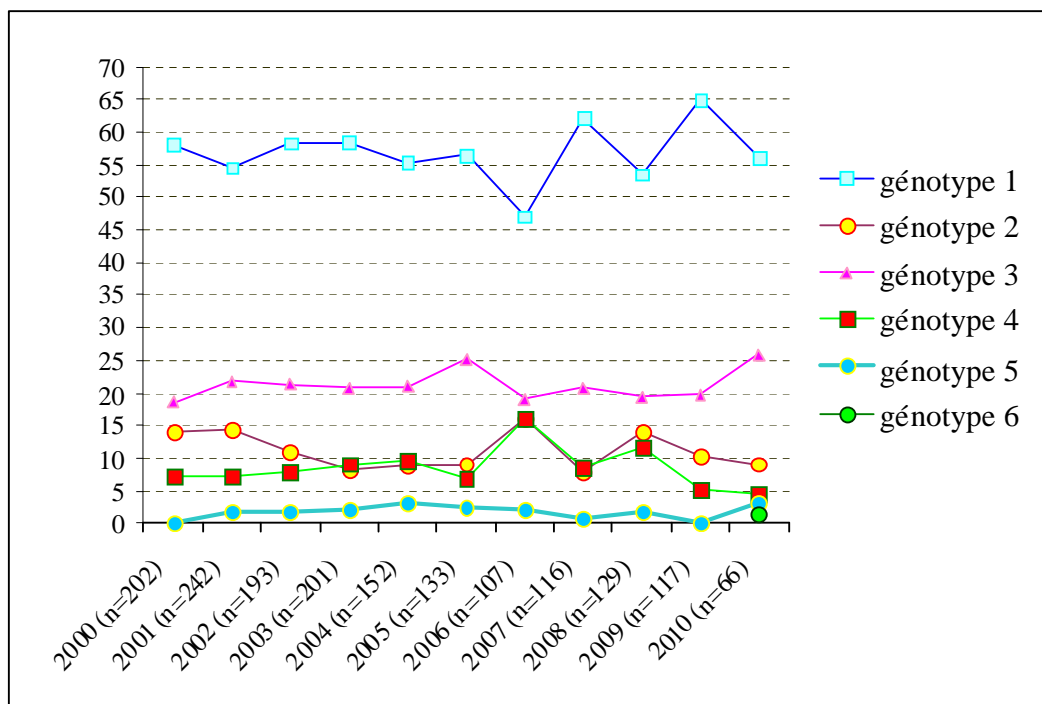


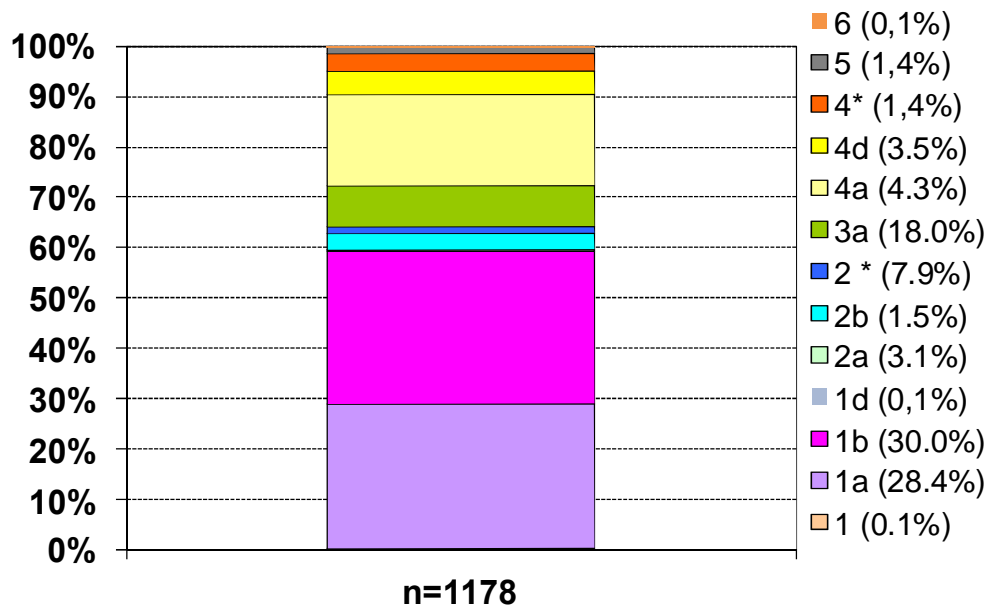
Figure 12 : Evolution des proportions relatives (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2010



L'analyse moléculaire par séquençage de 1178 souches (690 génotypes 1, 149 génotypes 2, 212 génotypes 3, 109 génotypes 4, 17 génotypes 5, 1 génotype 6) collectées durant cette même période rend compte d'une grande variabilité des sous-types, comme le montre la figure 13.

Parmi les 690 donneurs infectés par le génotype 1, 51,2% sont de sous-type 1b et 48,4% de sous-type 1a. L'analyse des 149 souches de génotype 2 montre une très grande variabilité de ce génotype avec toutefois plus d'un quart des souches appartenant au sous type 2a. Les génotypes 3 et 5 sont très homogènes : 100% des souches sont de sous type 3a et 5a respectivement. Enfin, le génotype 4 est aussi très variable en dehors des sous types 4a et 4d, qui représentent respectivement 46,8% et 38,2% des souches de ce génotype.

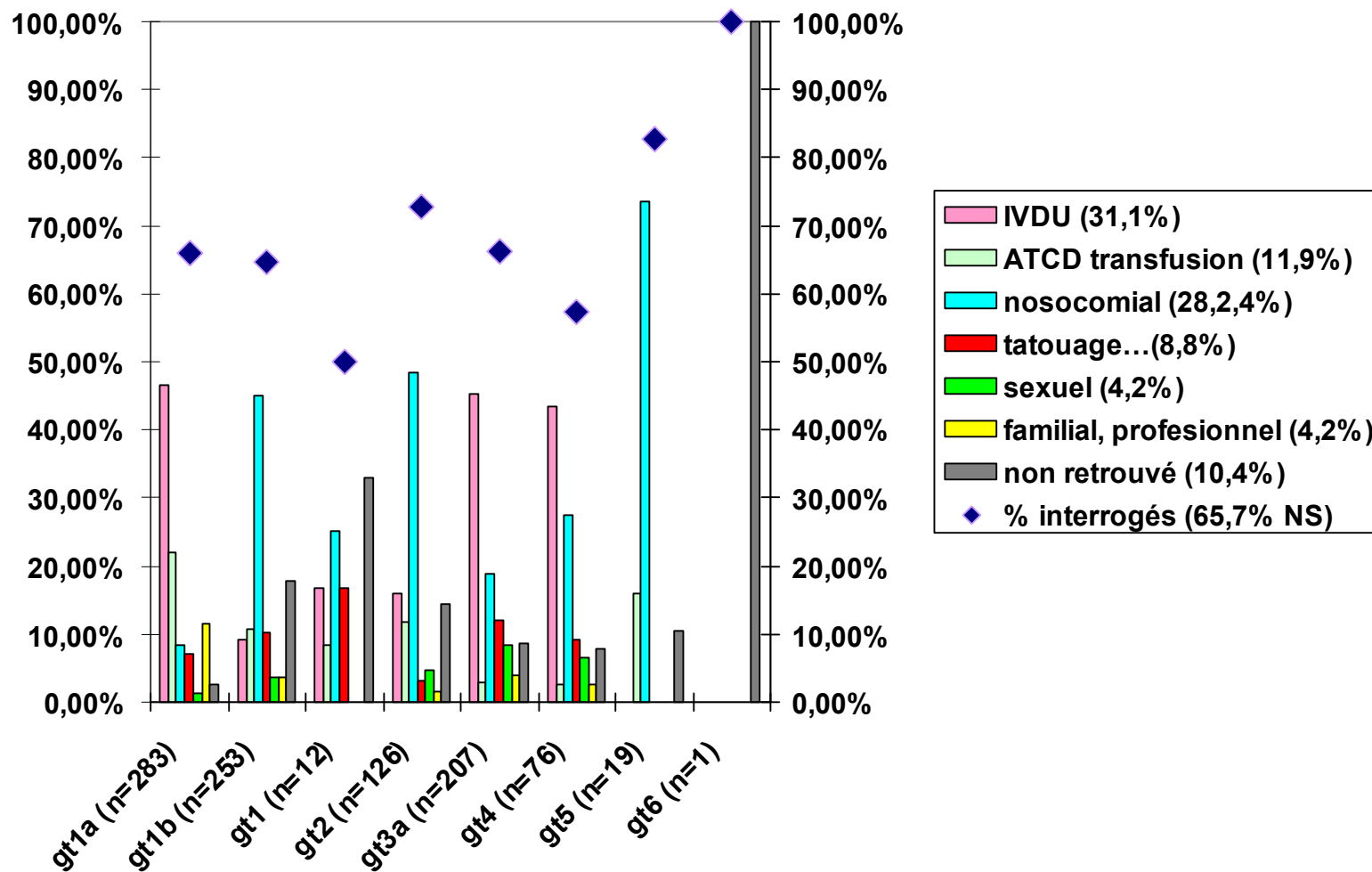
Figure 13 : Répartition des génotypes et des sous-types du VHC sur 1178 souches étudiées par séquençage moléculaire.



Les facteurs de risque ont été hiérarchisés en fonction de la probabilité d'occurrence la plus élevée. Cette hiérarchisation, adoptée au sein du comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang » chez les sujets présentant plus d'un facteur de risque, est par ordre de fréquence décroissante : usage de drogue par voie intraveineuse, antécédents de transfusion avant 1991, exposition nosocomiale, expositions parentérales autres (tatouage, piercing, acupuncture), sexuel, autre (familial, professionnel).

Cette analyse montre que génotypes et facteurs de risques sont significativement liés ($p < 10^{-4}$). Chez les donneurs ayant un génotype 1a ou 3a, une proportion plus élevée (46,7 % et 45,4% respectivement) ont été contaminés par toxicomanie intraveineuse comparativement aux autres génotypes. Chez les donneurs avec un génotype 1b ou 2, une proportion plus élevée (45,0 % et 48,4 % respectivement) ont été contaminés par voie nosocomiale, comparativement aux autres génotypes (figure 14).

Figure 14 : Répartition des facteurs de risque du VHC (hiérarchisés) chez les donneurs de sang en fonction du génotype sur la période 2000-2010



Sérotypage VHC

Parmi les 189 donneurs non virémiques que comptaient les années 2008 à 2010 (68, 71 et 50 respectivement), 119 (63%) ont été analysés pour la détermination du sérotype VHC. Les 70 échantillons restants non pas été étudiés, soit parce qu'ils n'avaient pas été reçus (1/4), soit parce qu'ils ne présentaient pas d'anti-NS4, anticorps sur lesquels est basé le sérotypage (3/4). Sur ces 119 échantillons, 69 (58%) ont été sérotypés avec succès. La répartition des sérotypes et sa comparaison avec la répartition des génotypes sur la même période sont fournies dans le tableau 15.

Tableau 15: Comparaison des proportions de sérotypes VHC et des génotypes VHC sur la période 2008-2010

Type	Sérotype (n=69)		Génotype (n=310)		P
	N	%	N	%	
1	52	75.4	179	57.8	0.006
2	3	4.3	37	11.9	NS
3	9	13.0	65	21	NS
4	3	4.3	24	7.7	NS
5	0	0	4	1.3	na
6	0	0	1	0.3	na
1+4	1	1.4	0	0	na
3+4	1	1.4	0	0	na

Il existe une différence statistiquement significative entre la répartition des génotypes et des sérotypes sur la période d'étude avec une proportion de type 1 plus importante parmi les sujets non virémiques. Diverses hypothèses peuvent être évoquées : un biais technique lié à un défaut de la technique de sérotypage qui serait plus performante pour les types 1 ; les types non-1 se retrouvant dans les non typables avec une plus forte probabilité ; une réalité physiopathologique avec les contaminations les plus anciennes et guéries à ce jour qui seraient de génotypes 1. Cette tendance devra être consolidée sur un effectif plus important.

Seuls 54 de ces 69 donneurs ont été interrogés sur leur facteur de risque : aucun facteur de risque n'a été retrouvé pour 14 (25.9%) d'entre eux. Des 40 autres : 16 avaient des antécédents de toxicomanie IV, 2 avaient été transfusés, 15 déclaraient une contamination nosocomiale possible, 2 parentérales, 3 avaient possiblement été exposés sexuellement et 2 présentaient un autre mode de contamination possible (vertical, familial, professionnel..)

3.2.3 Bilan du DGV et risque résiduel

Le dépistage génomique viral est pratiqué à ce jour à l'aide d'un test triplex (HIV, HCV, HBV), en pools pour 40% des dons et en unitaire (Automate Tigris) pour les 60% restants avec la même technologie (Ultrio Procleix, Novartis Chiron).

Depuis la mise en place du **DGV du VHC** le 1^{er} juillet 2001 et jusqu'au 31 décembre 2010 25.3 millions de dons ont bénéficié de cette mesure. Au terme de cette période, 14 dons provenant de donneurs sans anticorps spécifiques ont été identifiés (voir les caractéristiques dans le tableau 16); parmi ceux-ci 1 avait un taux élevé de transaminases et 1 présentait des anti HBc. Ces 2 dons auraient été écartés : le bilan net du DGV se porte donc à 12 dons pour les 9 premières années de pratique du DGV, soit 0,47 par million de dons.

Huit étaient des hommes (moyenne d'âge 40 ans) et 6 des femmes (moyennes d'âge 43.8 ans). Dix étaient des donneurs connus avec un délai moyen entre le don négatif et le don index de 379 jours (77-1515).

Huit donneurs étaient en phase aigüe de l'infection objectivée par une séroconversion ultérieure, un donneur était un porteur chronique sans anticorps et 5 n'ont pas été investigués. Les charges virales s'étendaient entre moins de 25 et 1.8×10^7 UI/ml.

A noter que 5 des 12 dons testés à l'aide d'un test Ag/Ac ont été trouvés positifs, montrant le bénéfice que pourrait présenter l'utilisation d'un tel test en lieu et place du DGV dans certains pays à ressources limitées ne pouvant introduire la recherche de l'ARN pour garantir un certain niveau de sécurité transfusionnelle.

La figure 15 montre le gain apporté par le DGV (exprimé par million de dons) dans différents pays l'ayant introduit). Il existe très clairement de grandes disparités entre les pays, ne serait-ce qu'en Europe, liées à de multiples facteurs tels que le nombre de dons testés (précisés pour chacun des pays en abscisse), la méthode utilisées (dépistage en pool ou en unitaire) mais avant tout l'épidémiologie locale. La France se situe dans le pays où le gain est un des plus faibles.

Figure 15: Gain du DGV (nombre de dons ARN VHC positifs et anti-VIH négatifs exprimés par millions de dons) dans différents pays (d'après la littérature et l'enquête européenne pour l'ISBT, Roth et al. 2012).

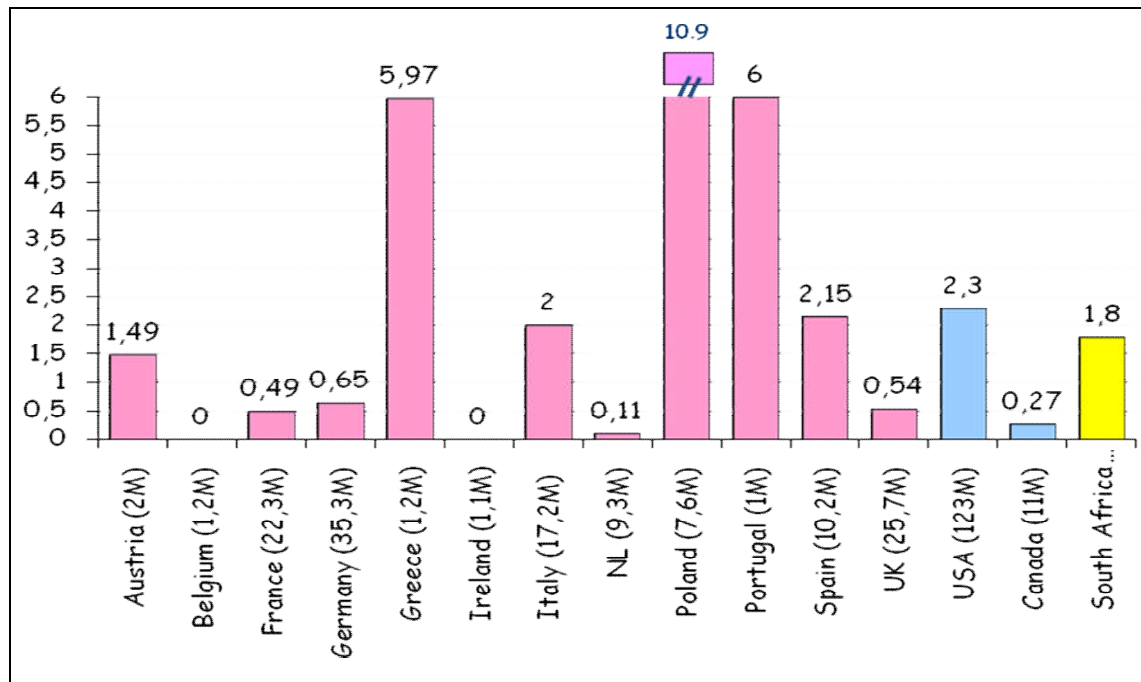


Tableau 16: Caractéristiques des donneurs dépistés ARN positifs anticorps négatif entre le 1^{er} juillet 2001 et le 31 décembre 2009

Cas	Année	Statut	Génotype	Charge Virale	Monolisa HCV Ag/Ab Pos si >1	Sexe/Age	ND/DC	Délai entre le don négatif et le don positif	Facteur de Risque	Remarques
1	2001	FS	1a	4.7x10 ⁷	0,93	M/62	DC	141	endoscopie	
2	2002	FS	3a	1.2x10 ⁵	0,10	M/35	DC	1515	?	ALT +
3	2003	?	Non testé		Non testé	M/22	ND	Na	?	
4	2003	IS	4a	> 5x10 ⁵	2,58	M/47	ND	Na	?	
5	2004	FS	1b	1.8x10 ⁷	0,50	F/58	DC	91	AES	
6	2005	FS	1a	2.2x10 ³	0,20	M/20	DC	366	Partenariat VHC+	
7	2006	?	Non testé	Pos < 25	Non testé	F/40	ND	Na	?	Anti-HBc +
8	2007	FS	1a	1,2x10 ⁵	0,44	F/39	ND	na	Partenaire VHC+ Professionnel	
9	2007	FS	1a	négatif	0.26	F/46	DC	112	Partenaire VHC+ CV : 4.3 log UI/ml (M1)	
10	2007	?	1a	3,3x10 ⁷	2,4	M/47	DC	120	Non investigué	
11	2008	?	1a	1,9x10 ⁷	1,77	M/64	DC	77	Nosocomial/sexuel ?	
12	2008	FS	1a	8x10 ³	0,5	F/37	DC	217	partenaire VHC et toxicomane	
13	2009	FS	3a	2 x10 ⁴	0.41	M/23	DC	1003	?	
14	2010	?	1a	18x10 ⁶	1.4	F/43	DC	145	Partenaire VHC	

FS : fenêtre sérologique, IS : immunosilencieux ? : inconnu ND : nouveau donneur, DC : donneur connu

Na : non applicable

Le DGV VHB est pratiqué en unitaire dans les DOM depuis janvier 2005 et au CTSA depuis 2006 et a été étendu à la métropole en 2010 avec une introduction progressive entre mai et octobre. Sur les 1.7 millions de dons en ayant bénéficié jusqu'au 31 décembre 2010, 7 dons ont été retrouvés Ag HBs négatif et DGV positif. 6 avaient des anti HBc et correspondaient probablement à une infection dite « occulte » et le second était une fenêtre sérologique comme en a attesté le suivi sérologique. Le bilan net est donc de 0.58 par million de dons testés. Il convient d'être prudent sur ce taux car le nombre de dons testés est encore trop faible pour conclure (tableau 17).

Tableau 17 : Bilan du DGV HBV de 2005 au 31 décembre 2010 dans les DOM et au CTSA

	DOM (2005-2010)	CTSA (2006-2010)	FM (2010 partiel)	total
Dons testés	217 750	108 309	1 425 162 ¹	1 751 221 ¹
DGV pos AgHBs pos	174	47	90	311 (93.1%)
DGV pos AgHBs neg	3	0	4	7 ² (2.1%)
DGV neg AgHBs pos	10	0	6	16 (4.8%)
Total	187	47	100	334

¹ estimation

² Dont 6 OBI (anti-HBc pos) 1 FS (anti-HBc neg)

Le risque résiduel sur la période 2008-2010 est de 1 pour 1/7 millions de dons (IC 5% :-0 - 1/1 100 000) pour le VHC et 1.85 pour 1 million de dons (IC 5% : 0 – 925 000) pour le VHB.

La méthode révisée pour le VHB (données jusqu'en 2008) fournit une estimation peu différente statistiquement, mais moins variable dans le temps (voir tableau 18). Cette méthode semble plus robuste que la méthode classique et montre une relative stabilité du risque VHB.

Tableau 18 : Comparaison des résultats obtenus pour chaque période en fonction de la méthode d'estimation du risque résiduel du VHB employée.

	2000-2002	2001-2003	2002-2004	2003-2005	2004-2006	2005-2007	2006-2008
Cas incidents Ag HBs	13	8	2	5	8	22	24
Cas incidents Ac HBc	12	14	16	13	4	8	11
RR avec FS de 38 jours et ajustement ¹	1.51 (0.91-2.45)	0.91 (0.50-1.66)	0.24 (0.08-0.67)	0.41 (0.18-0.94)	0.69 (0.34-1.31)	1.0 (0-1.75)	1.0 (0-1.79)
RR révisé ¹	1.06 (0.41-2.22)	1.05 (0.53-2.58)	0.94 (0.43-2.82)	0.87 (0.43-2.82)	0.49 (0.08-1.16)	0.79 (0.40-1.59)	0.91 (0.48-1.75)

¹ Exprimé pour 1 million de dons (IC 95%)

4/Activités de recherche 2010-2011

1) Infections VHB aiguës

Nous avons participé à l'étude collaborative destinée à fournir des données sur l'épidémiologie moléculaire (génotypes, présence de variants des gènes S, pré C/C, profils de résistance aux anti-viraux) des infections B aiguës dépistés en France dans le cadre de la déclaration obligatoire. Cette étude pilotée par Vincent Thibault du laboratoire de Virologie de l'hôpital Pitié-Salpêtrière et incluant outre notre unité, le laboratoire associé au CNR des hépatites B, C, et Delta, de l'hôpital Paul Brousse (Valérie Thiers) et l'InVS, a reçu un financement par l'ANRS.

L'article est soumis pour publication.

2) Mutants Pré C/Core du VHB chez les donneurs de sang

Un projet visant à établir la prévalence des mutants Pré C/Core du VHB dans la population des donneurs de sang comparativement à d'autres sujets infectés naïfs ou traités, et à analyser les facteurs virologiques (charges virales, génotypes..) et épidémiologiques y étant liés a été initié, en collaboration avec le laboratoire de virologie du CHU d'Angers dans le cadre de travaux menés dans le groupe « Agents transmissibles » de la Société Française de Transfusion Sanguine. L'analyse portant sur 100 dons de sang montre que la moyenne d'âge des donneurs est de 30 ans (35 femmes et 65 hommes). Le facteur de risque prédominant est la naissance dans un pays de moyenne ou forte endémie (41% des donneurs étaient d'origine africaine). Le phénotype mutant Pré C a été retrouvé chez 65% des dons de sang étudiés.

De manière à consolider ces données préliminaires, une nouvelle série de 100 DS est en cours d'étude. Sachant que la majorité de ces sujets sont au stade de portage inactif du virus, le rôle de la mutation Pré

C dans l'histoire naturelle de l'hépatite B reste à préciser ainsi que l'impact de ces variants Pré C/Core dans la sévérité des lésions hépatiques.

Ce travail a donné lieu à de diverses communications dans le cadre de réunions scientifiques. Par ailleurs, une thèse de médecine a été soutenue sur le sujet (Thomas Beuvelet, Faculté de médecine d'Angers, 21/10/2009). Un article est sous presse

Ducancelle A, Servant-Delmas A, Beuvelet T, Balan V, Pivert A, Maniez M, Laperche S, Lunel-Fabiani F. Results of a novel real-time PCR, sequence analysis, Inno-LiPA line probe assays in the detection of hepatitis B virus G1896A precore mutation in french blood donors.]. Pathol Biol (Paris). 2011;59 :21-7.

3) Infection multigénotypique du VHB

Entre 2005 et 2007, 5 à 6% des souches VHB isolées chez des donneurs de sang AgHBs positifs n'ont pu être génotypées par séquençage direct d'une région partielle du gène « S » (nucléotides 108 à 552). L'électrophorégramme du produit d'amplification suggérait l'existence de profils d'infections mixtes c'est-à-dire l'existence de plusieurs souches VHB de génotypes différents chez un même sujet. De telles infections ont été reportées dans la littérature à l'aide d'un test commercial (INNO-LiPA HBV genotyping assay, Innogenetics) dont le principe repose sur une hybridation inversée d'un amplicon sur des sondes spécifiques des différents génotypes du VHB (A à H) et fixées sur des bandelettes de nitrocellulose.

Ainsi, ce test permet l'identification d'infections mixtes par plusieurs génotypes du VHB, contrairement au séquençage direct qui caractérise la souche majoritairement présente dans l'échantillon analysé. Afin d'explorer le phénomène d'infection mixte à VHB dans la population des donneurs de sang infectés par ce virus et d'en établir la fréquence, nous avons entrepris une étude prospective sur 200 donneurs de sang prélevés au cours de l'année 2006, AgHBs positifs, virémiques et pour lesquels le génotypage avait été réalisé par séquençage direct.

Les échantillons ont été génotypés avec le test INNO-LiPA HBV genotyping assay. Ceux, pour lesquels une infection mixte a été mise en évidence, ont été étudiés par clonage moléculaire du produit PCR « S », et du produit PCR « INNO-LiPA » lorsque l'analyse phylogénétique des séquences clonales « S » ne confirmait pas l'existence d'une infection mixte. Dix à 20 clones par échantillons ont été analysés.

Quatorze pourcent (28/200) des échantillons ont présenté un profil d'infection mixte avec le test INNO-LiPA. Parmi elles, 25 cas de doubles infections et 3 cas de triples infections ont été observés. L'association d'un génotype D à un génotype H est la double infection la plus fréquemment rencontrée (n=6), suivie des associations A+D (n=4), A+E (n=4), C+D (n=3) et D+E (n=3). D'autre part, les génotypes mis en évidence dans le cadre des infections mixtes correspondent aux génotypes les plus prévalents en France: 75% (21/28) de génotype D, 39% (11/28) de génotype A et 32% (9/28) de génotype E. La trousse INNO-LiPA révèle également une proportion non négligeable de souches de génotypes H (9/28) non détectées par la méthode de génotypage par séquençage direct.

Le clonage du produit PCR « S » a confirmé l'existence de 11 infections mixtes parmi les 28 observées en INNO-LiPA avec 9 concordances parfaites entre les deux techniques et 2 concordances partielles (un génotype supplémentaire mis en évidence par le clonage). Pour les 17 autres échantillons, le clonage a mis en évidence un seul génotype, identique à celui déterminé par séquençage direct du produit PCR « S ». Le clonage du produit PCR « INNO-LiPA », entrepris pour ces échantillons, a confirmé un deuxième génotype minoritaire pour 4 d'entre eux. Pour les 13 autres échantillons, le second clonage conclut à une infection par un génotype unique. Les discordances entre les résultats de génotypage obtenus avec la trousse INNO-LiPA et ceux obtenus par clonage moléculaire s'expliquent notamment par des réactivités non spécifiques des sondes d'hybridation de l'INNO-LiPA. Cette hypothèse a été clairement confirmée pour les 9 échantillons pour lesquels une infection mixte avec un génotype H a été déterminée avec la trousse INNO-LiPA, alors qu'aucun des deux clonages n'a confirmé ce résultat.

Ce travail rapporte pour la première fois en France l'existence d'infections mixtes par plusieurs génotypes du VHB chez un même sujet dans une population de porteurs asymptomatiques du VHB et en dehors d'un recrutement hospitalier. La fréquence de ce phénomène dans la population des donneurs de sang est estimée avec la trousse INNO-LiPA à 10,5% (exclusion faite des doubles infections comprenant un génotype H). Néanmoins, dans cette première étude, l'analyse épidémiologique n'a pas permis d'identifier des facteurs de risque spécifiques pour les sujets infectés par plusieurs génotypes, étant donné les faibles effectifs étudiés. Ces premiers travaux ont fait l'objet d'un soutien financier de la part de l'ANRS (contrat d'initiation ANRS n°2008-048-CSS7-AO 2008 2). Aussi, la poursuite de l'exploration des infections mixtes VHB dans une population plus large de donneurs de sang est nécessaire pour déterminer des facteurs d'exposition particuliers associés à ce type d'infection.

Mercier M, Laperche S, Girault A, Sureau C, Servant-Delmas A. Overestimation of Hepatitis B Virus mixed-genotype infections using the new line probe INNO-LiPA Genotyping Assay. J Clin Microbiol. 2011; 49:1154-1156.

Doutreloigne J, Van Hecke E, Mercier M, Laperche S. Revision of interpretation criteria of the INNO-LiPA HBV genotyping assay. J Clin Microbiol. 2011;49:3446

4) Tests Ag/Ac VHC et sécurité transfusionnelle

De manière à évaluer la place respective du dépistage de l'Ag de capsid, des anticorps VHC et du DGV VHC dans leur capacité à assurer la sécurité transfusionnelle vis à vis de ce virus, une collaboration internationale visant à tester avec les 2 tests de dépistage combiné disponibles sur le marché (Monolisa HCV Ag/Ab Ultra, Bio Rad et Murex Ag/Ab HCV combination Abbott) et le test spécifique de détection de l'Ag de capsid du VHC (Architect Ag HCV Abbott), les dons DGV positifs et anticorps négatifs dans les pays ayant introduit le DGV et acceptant de participer à l'étude, ainsi que quelque panels de séroconversions informatifs est en cours sur les 366 échantillons collectés. Les premiers résultats de cette étude montre (i) une capacité des tests Ag/Ac à détecter les dons prélevés en phase précoce Ac négatifs et virémiques à hauteur d'environ 40% avec cependant des différences de détection entre les génotypes (ii) un niveau élevé de sensibilité du test spécifique de détection de l'Ag VHC (près de 90% des échantillons détectés positifs)

L'article est en préparation.

5/ Activités d'information, de formation et de conseil :

Enseignement universitaire

- Diplôme Universitaire de Transfusion Sanguine, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
- Capacité en Transfusion Sanguine, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
- DESC d'Hémodiagnostic, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
- Diplôme Universitaire de Médecine Transfusionnelle, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, depuis 1997
- Diplôme Universitaire de médecine transfusionnelle,
- Diplôme Universitaire de biologie transfusionnelle, EFS Ile de France
- Diplôme Universitaire « Principes thérapeutiques des infections virales », UFR St Antoine
- DES de Biologie, Ile de France

Enseignement médical non universitaire

- Formation continue dispensée à l'Institut National de la Transfusion Sanguine
- Formation continue aux médecins biologistes (BIOFORMA)
- Enseignement aux techniciens de laboratoires dans le cadre de la formation Bioformation
- Cours "Sécurité Transfusionnelle Infectieuse", Institut Pasteur

Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :

- Rétro-information à InVS

Comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang InVS

6/ Liste des publications et communications relatives aux activités du CNR 2011

Publications

Ducancelle A, **Servant-Delmas A**, Beuvelet T, Balan V, Pivert A, Maniez M, **Laperche S**, Lunel-Fabiani F. Results of a novel real-time PCR, sequence analysis, Inno-LiPA line probe assays in the detection of hepatitis B virus G1896A precore mutation in french blood donors.]. *Pathol Biol (Paris)*. **2011**;59 :21-7.

Akhavan S, Ronsin C, **Laperche S**, Thibault V. Genotype 4 hepatitis C virus : beware of false negative RNA detection. *Hepatology* **2011**;53:1066-7

Laperche S, **Bouchardeau F**, André-Garnier E, Thibault V, Roque-Afonso AM, Trimoulet P, Colimon R, Duverlie G, Leguillou-Guillemette H, Lunel F, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM, Henquell C, Schvoerer E, Stoll-Keller F, Chaix ML, Branger M, Gaudy-Graffin C, Rosenberg AR, Pozzetto B, Vallet S, Baazia Y, Izopet J, Lefrère JJ. Interpretation of real-time PCR results for HCV when viral load is below quantification limits. *J Clin Microbiol*. **2011**; 49:1113-1115.

Mercier M, **Laperche S**, **Girault A**, Sureau C, **Servant-Delmas A**. Overestimation of Hepatitis B Virus mixed-genotype infections using the new line probe INNO-LiPA Genotyping Assay. *J Clin Microbiol*. **2011**; 49:1154-1156.

Henquell C, Guglielmini J, Verbeeck J, Mahul A, Thibault V, Lebray P, **Laperche S**, Trimoulet P, Foucher J, Le Guillou-Guillemette H, Fouchard-Hubert I, Legrand-Abravanel F, Métivier S, Gaudy C, D'Alteroche L, Rosenberg AR, Podevin P, Plantier JC, Riachi G, Saoudin H, Coppere H, André E, Gournay J, Feray C, Vallet S, Nousbaum JB, Baazia Y, Roulot D, Alain S, Loustaud-Ratti V, Schvoerer E, Habersetzer F, Pérez-Serra RJ, Gourari S, Mirand A, Odent-Malaure H, Garraud O, Izopet J, Bommelaer G, Peigue-Lafeuille H, van Ranst M, Abergel A, Bailly JL. Evolutionary history of hepatitis C virus genotype 5a in France, a multicenter ANRS study. *Infect Genet Evol*. **2011**;1:496-503.

Laperche S, Lefrère JJ. Les agents infectieux transmissibles par transfusion de produits sanguins labiles *Hématologie* **2011**;17:225-36

Doutreloigne J, Van Hecke E, **Mercier M**, **Laperche S**. Revision of interpretation criteria of the INNO-LiPA HBV genotyping assay. *J Clin Microbiol*. **2011**;49:3446.

Launay O, Masurel J, **Servant-Delmas A**, Basse-Guérineau AL, Méritet JF, **Laperche S**, Sogni P, Rosenberg AR. High levels of serum hepatitis B virus DNA in patients with 'anti-HBc alone': role of HBsAg mutants. *J Viral Hepat*. **2011**;18:721-9.

O'Brien SF, Zou S, **Laperche S**, Brant LJ, Seed CR, Kleinman SH. Surveillance of transfusion-transmissible infections comparison of systems in five developed countries. *Transfus Med Rev*. **2012**;26:38-57.

Servant-Delmas A, **Mercier-Darty M**, Ly TD, Wind F, Alloui C, Sureau C, **Laperche S**. Variable capacity of 13 Hepatitis B virus surface antigen assays for the detection of HBsAg mutants in blood samples. *J Clin Virol* **2012** sous presse.

Servant-Delmas A, Chuteau C, Lefort C, Piquet Y, Chevaleyre S, Betbeze V, Delhoume M, Hantz S, S. Alain S, **Laperche S**. Two cases of transfusion-transmitted Hepatitis B virus infection in a low endemic country before implementation of HBV NAT, *Transfusion* **2012**, sous presse

Communications orales.

Laperche S, Tiberghien P, Pillonel J.

Bilan analytique de 10 ans de dépistage génomique viral en France.

XXVème Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Lyon, 4-6 mai 2011

Wind F, **Laperche S**, ElGhouzzi MH, Bierling P
Bilan de 10 premiers mois de dépistage génomique du VHB sur les dons de sang en Ile de France
XXVème Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Lyon, 4-6 mai 2011

Laperche S, Pillonel J
Faits marquants de l'épidémiologie des donneurs de sang en 2010
Journées d'automne de la SFTS, Paris, 20 octobre 2011

Pillonel J, Barin F, Tiberghien P, **Laperche S**.
Using new methods for estimating residual risks of transfusion-transmitted HIV-1 and HCV infections in France
21st regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Lisbon, Portugal– 18-22 Juin 2011

Laperche S
Definition of emerging infection diseases
21st regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Lisbon, Portugal– 18-22 Juin 2011

Communications affichées

Laperche S, **Leballais L**, **Razer A**, Tiberghien P, Barin F, Pillonel J. Vingt ans de surveillance épidémiologique de l'infection à VIH chez les donneurs de sang français
XXVème Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Lyon, 4-6 mai 2011

Guinard J, **Laperche S**, Velter A, Barin F
Performance of HIV Ag/Ab combo assays in HIV and HCV diagnoses using dried blood spots : usefulness for epidemiological studies
6th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, 17-20 Juillet, 2011 Rome, Italie

Chevaliez S, **Challine D**, Luu T, Naija H, **Laperche S**, Allain JP, Pawlotsky JM
Point-of-Care Detection of Hepatitis B Virus Antigen (HBsAg) in Acute and Chronic Hepatitis B patients and Pregnant Women with Unknown HBV Serological Status at Delivery
American Association for the Study of Liver Diseases Liver Meeting, 4-8 Novembre 2011 San Fransisco, USA

Séminaires et conférences sur invitation

Laperche S,
Strategies for blood safety improvement in developing countries
XIIIth International Haemovigilance Seminar Amsterdam, Pays Bas 9-11 February 2011

Laperche S,
Definition of emerging infection diseases
21st regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Lisbon, Portugal– 18-22 Juin 2011

7/ Programme d'activité 2012-2013

1) La surveillance virologique des donneurs de sang VHB et VHC positifs va être poursuivie et enrichie :

- La surveillance des dons ADN VHB positifs et AgHBs négatifs faisant suite à la mise en place du dépistage génomique viral systématisé, permettra d'établir d'une part la part du bénéfice de la mesure revenant aux infections aiguës (anti HBc négatif) et d'autre part la fréquence des infections B occultes (anti HBc positives) dans la population des donneurs de sang. L'analyse moléculaire des infections aiguës mises en évidence dans ce contexte, permettra d'identifier les caractéristiques virologiques propres à ces infections et de les comparer aux infections chroniques qu'elles soient « classiques » ou « occultes ».

Par ailleurs, cette nouvelle mesure permettra d'évaluer le taux d'incidence de l'infection à VHB dans la population des donneurs de sang ce qui constituera une nouvelle approche de l'évaluation du risque résiduel transfusionnel.

- La mise en évidence des souches VHB porteuses de mutations de résistance aux anti-viraux fera l'objet d'un nouvel axe de surveillance dans cette population et les outils moléculaires d'étude seront développés pour répondre à cette question.

- la production du test de caractérisation du sérotype VHC ayant été définitivement suspendue par l'industriel, un test sera développé au laboratoire de manière à pouvoir continuer de disposer d'un typage des sujets non virémiques permettant d'assurer le maintien de la surveillance de cette population.

2) Le virus Delta

L'analyse des donneurs (détermination de la charge virale et géotypage du virus Delta) co-infectés par le VHB et le Delta se poursuivra dans le cadre du CNR avec le laboratoire associé pour l'étude du Delta

3) Mutants de l'enveloppe du VHB et impact diagnostique

Pour évaluer la capacité des troupes de détection de l'Ag HBs à reconnaître les particules virales des différents géotypes du VHB, ainsi que des mutants de l'enveloppe virale, nous allons poursuivre la constitution d'un panel comprenant à ce jour 17 échantillons de protéines HBs recombinantes (9 échantillons de géotypes A à F et 8 échantillons porteurs d'une ou plusieurs mutations situées dans la boucle antigénique et connues pour être à l'origine de faux négatifs lors du dépistage de l'Ag HBs). Les séquences HBs sont clonées dans un vecteur d'expression eucaryote et exprimées *in vitro* après transfection de cellules hépatiques Huh7. Les protéines sécrétées en quantité suffisante dans le surnageant de culture sont retenues pour la constitution du panel, qui a été calibré grâce à la présence de l'étiquette HA placée en C terminale des protéines recombinantes. Les premiers résultats montrent un défaut de reconnaissance du mutant G145R par une des troupes étudiées. Le panel sera complété par d'autres protéines d'intérêt. Ce panel ainsi qu'un panel de 18 souches naturelles portant des mutations décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination ou aux Ig sont en cours d'étude sur un éventail de 13 réactifs de dépistage de l'Ag HBs parmi les plus utilisés en France de manière à évaluer leur capacité à détecter ces souches atypiques. Cette approche constitue une appréciation prospective des limites potentielles des tests actuellement

utilisés en transfusion pour le dépistage de l'Ag HBs et pourrait contribuer à guider un élargissement du spectre de sensibilité de ces tests.

4) Infections à VHB à génotypes multiples

L'exploration des infections mixtes chez les donneurs de sang virémiques pour le VHB afin de préciser leur fréquence, leurs caractéristiques épidémiologiques et de mieux comprendre leurs modes d'acquisition se poursuivra. Le recours à une technologie de séquençage à haut débit 454 GS-FLX sera utilisée (400 000 séquences par run, lecture 400 nt) permettant l'identification de variants minoritaires à hauteur de 1% sera privilégiée au clonage trop lourd à mener sur de larges séries. Ce projet sera mené en collaboration avec le laboratoire du CNR de Créteil qui dispose des outils de pyroséquençage, utilisés à l'heure actuelle pour la mise en évidence des mutants de résistance aux anti-viraux notamment pour le VHB. Parallèlement, des outils bio-informatiques spécifiques permettant de génotyper les séquences générées seront développés sur la base de ceux déjà utilisés. Ils seront basés sur la recherche de signatures génotypiques spécifiques de chaque génotype VHB et sur la détermination d'un pourcentage d'identité nucléotidique par rapport à des séquences de référence de génotype connu. Un essai pilote, conduit sur une vingtaine d'échantillons issus de l'étude précédente, caractérisés par INNO-LiPA et clonage moléculaire, permettra de valider la stratégie retenue. La deuxième phase du projet portera sur le génotypage de 200 dons de sang AgHBs positifs dont les facteurs d'exposition des donneurs seront renseignés. Par ailleurs, l'accès aux séquences des souches étudiées devrait également permettre d'identifier l'existence de mutants de résistances aux anti-viraux.

Par ailleurs, la méthode développée pourra être transposée au génotypage haut débit d'autres virus tels le virus de l'hépatite C ou le virus de l'immunodéficience humaine. Ce projet a fait l'objet d'une demande de financement à l'ANRS dans le cadre du 1^e appel d'offres 2011.

Enfin, les infections par plusieurs génotypes du VHB chez un même sujet étant propices aux mécanismes de recombinaison génétique, nous souhaitons rechercher l'existence de souches recombinantes chez des sujets pour lesquels une infection mixte aura été caractérisée. Ce phénomène sera exploré en ayant recours au clonage et séquençage des génomes complets des souches. Nous pourrions ainsi apprécier la fréquence des événements de recombinaison génétique dans le cas d'infections multiples et identifier de possibles sites privilégiés de recombinaison génétique dans le génome du VHB. Les souches recombinantes qui auront été identifiées feront l'objet d'une caractérisation fonctionnelle *in vitro* afin d'apprécier leurs propriétés infectieuse et répliquative en collaboration avec C. Sureau, INTS.

7) Un nouveau panel destiné au contrôle de qualité des outils de dépistage des infections virales par VIH, Ag HBs et VHC utilisés pour la qualification des dons de sang en Afrique sub-saharienne et au Maghreb a été distribué à 60 laboratoires de 17 pays. Outre d'établir un état des lieux des performances du dépistage sécuritaire dans les pays à ressources limitées, cette nouvelle opération permettra une aide au choix de la stratégie sécuritaire optimale pour chacun des participants à l'étude. L'exploitation des données est en cours. – L'extension de cette étude à d'autres pays de l'Afrique anglophone dans le cadre d'une collaboration avec le Blood Systems Research Institute, San Francisco est programmée pour l'année 2011 .

7) La mise en place d'un logiciel dédié acquis récemment, (BioLims de la société Modul bio répondant aux exigences de la Norme NF S96-900 : Système de management d'un CRB et qualité des ressources biologiques d'origine humaine et microbienne) permettra une meilleure souplesse dans la gestion des ressources biologiques du CNR, tout particulièrement pour ce qui concerne les mouvements (réception et expédition) des échantillons inclus dans nos collections.

Ce logiciel, outre le fait d'assurer une traçabilité totale des échantillons et un stockage rationalisé, permet la mutualisation et l'échange des informations entre différents centres de ressources biologiques par l'exportation de données avec une transmission cryptée et sécurisée de ces données.

Fait à Paris le 25 avril 2012
Syria LAPERCHE

LABORATOIRE ASSOCIE

HEPATITE DELTA

HOPITAL AVICENNE

BOBIGNY

**Rapport d'activité du laboratoire associé au Centre National de Référence
des hépatites B, C et Delta pour l'infection par le virus de l'hépatite Delta (HDV)
Unité de Virologie du Service de bactériologie, virologie - hygiène
(Hôpital AVICENNE)**

Année 2011

Rédigé par Emmanuel Gordien

1/ Introduction :

- **A/ Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR en terme de santé publique, son organisation, le cas échéant, la répartition des missions avec son ou ses laboratoires associés et ses principaux partenaires :**

*Au sein du CNR des hépatites B, C et Delta, le laboratoire associé de l'Hôpital Avicenne – UFR SMBH, Université Paris 13 (Bobigny) a pour mission **d'étudier la problématique de l'infection par le virus de l'hépatite Delta (HDV)**. Il a pour objectif **d'évaluer et de développer les tests diagnostiques** nécessaires au dépistage et à la prise en charge des patients infectés par ce virus. De par sa localisation dans le département de Seine - Saint-Denis, caractérisé par un taux très élevé de migrants en provenance d'Afrique, d'Asie, des Caraïbes ou d'Europe de l'Est, le laboratoire a mis en évidence la grande variabilité génétique du virus, pouvant prendre en défaut les tests moléculaires existants. Aussi, le laboratoire HDV assure depuis **2001 le typage prospectif de toutes les nouvelles souches répliquantes** qui circulent en France. Le CNR possède une collection exhaustive (plasmas ou sérums ; ARN et ADN complémentaire) de toutes ces souches.*

*En ce sens, **un contrôle national de qualité (CNQ) des techniques de diagnostic de l'HDV en sérologie et en biologie moléculaire** est désormais institué tous les 2 ans.*

- **B/ Résumé des activités de l'année N : faits marquants, points clefs, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte :**

Au sein du LA-CNR et au cours de l'année 2011, l'activité diagnostique HDV a été marquée par :

(i) Une stabilisation ou légère diminution du nombre de demandes de dépistage sérologique : -4% des recherches d'Anticorps (Ac) Totaux) et -15% des Ac Delta IgM cette dernière faisant suite toutefois à une augmentation de 28% de l'année précédente. Cependant, avec 1831 demandes de quantification de la charge virale HDV plasmatique, nous enregistrons une augmentation de plus de 56% par rapport à l'an 2010. Parmi celles-ci, 830, soit 45,3% étaient positives.

(ii) 185 nouvelles souches virales HDV, 46% de plus que l'an dernier (dont le chiffre était déjà supérieur aux 4 années précédentes) ont été caractérisées. L'origine géographique des 185 patients nouvellement dépistés en France (voir figure 2) se répartit comme suit : Afrique (60%), Europe de l'Est (17.1%), Asie (7%) et Europe de l'Ouest (6,5%). Cette année, plus de patients asiatiques que de patients européens de l'Ouest ont été présentés une infection HDV.

(iii) Les génotypes strictement « africains » : HDV-5 (n=28), -6 (n=4), -7 (n=4) et -8 (n=3) représentent toujours plus 20% des souches circulantes en France et si on y rajoute les HDV-1Afr (n=86), ce taux passe à 68,6%.

(iv) Le deuxième contrôle national de qualité (CNQ) en sérologie et en biologie moléculaire a été organisé en fin mars 2012. Fait nouveau, plusieurs laboratoires étrangers (Angleterre, Allemagne, Etats-Unis, Suisse) participent à ce CNQ-2. L'analyse et les conclusions de ce 2^{ème} CNQ seront tirées au cours du 2^{ème} semestre 2011.

(v) la comparaison des performances de 3 kits commerciaux de quantification de l'ARN Delta a été réalisée. La donnée majeure est l'incapacité pour 2 de ces 3 tests proposés, de quantifier de façon fiable les souches de génotypes africains (y compris les génotypes 1 Africains), soit donc plus de 60% des souches circulant en France. En effet, celles-ci sont largement sous-estimées voire non détectées pour de nombreux échantillons. Une publication de cette étude est en préparation.

(vi) Le LA-CNR a candidaté pour participer à l'évaluation d'un étalon HDV international OMS. Il s'agira d'une étape décisive dans l'harmonisation des techniques de quantification qui devront alors être évalués pour tous les génotypes.

(vii) Le LA-CNR est partie intégrante d'un réseau international (Hepatitis Delta International Network) et s'est proposé pour l'organisation d'un contrôle international des différentes techniques de quantification de la charge virale delta.

(viii) Enfin, le LA-CNR a développé plusieurs collaborations internationales effectives en vue de caractériser la diversité génétique du HDV et de son virus auxiliaire HBV à travers le monde, Centre Afrique, Mauritanie, Tunisie, notamment. La mise en évidence du nouveau sous-génotype HBV/D8 hautement prévalent au Niger (Abdou M. et al., J. Gen. Virol., 2010) a été aussi retrouvée en Mauritanie. Plus de 27 souches HBV/D8 mauritaniennes sont en cours de caractérisation complète. Cette nouvelle souche HBV est capable de s'associer à des souches HDV de génotypes -1 et -5.

- **C/ Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés**

o Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

Emmanuel Gordien MCU-PH, responsable, 10% ; APHP et Université Paris 13 ;

Frédéric Le Gal, Ingénieur, adjoint, AP-HP, 20%, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris ;

Ségolène Brichler, AHU, 20% ; APHP et Université Paris 13 ;

Wael Mansour, doctorant, CNR 50%.

o Organigramme :

Emmanuel Gordien : Responsable 10%

Frédéric Le Gal : Ingénieur de recherche, Responsable adjoint 20%

Ségolène Brichler : Assistante spécialiste : 20%

Wael Mansour, doctorant : 50%

o Description de la démarche qualité du laboratoire (GBEA, accréditation, CRB)

Le laboratoire associé au CNR des hépatites B, C et Delta a poursuivi la mise à jour du guide de bonne exécution des analyses (GBEA) au fur et à mesure de l'évolution des techniques depuis 2002. Ainsi toutes les approches : conservation des échantillons (sérothèques, « tissus-thèques »), techniques sérologiques et moléculaires mises en place au sein du laboratoire et du CNR sont référencées dans GBEA du laboratoire de Bactériologie, Virologie – Hygiène de l'Hôpital Avicenne. Cette démarche a permis à ce jour la collection de plus de 1500 souches HDV.

L'accréditation de l'hôpital Avicenne et du laboratoire de Bactériologie, Virologie – Hygiène est effective depuis 2003. La certification de l'établissement est toujours en cours, et de nombreuses procédures sont en cours (ex : suivi informatique et centralisé des températures des congélateurs) dans l'objectif de la prochaine accréditation V2016.

- **D/ Locaux et équipements (CNR et laboratoires associés):**

o surface, plans

Le laboratoire associé au CNR ne possède pas à proprement parler de surfaces dévolues spécifiquement à l'activité CNR. Il est localisé dans le bâtiment Lavoisier au

2^{ème} étage au sein du service de Bactériologie, Virologie - Hygiène de l'Hôpital Avicenne. Les surfaces de l'ensemble du laboratoire de Virologie sont de 100 m² répartis à raison de 60 m² à l'étage et de 40 m² au 3^{ème} étage dans le laboratoire commun de Biologie Moléculaire de l'hôpital.

Depuis l'épidémie de grippe de 2009, un laboratoire L2 avait été construit au sein du laboratoire de virologie. Le projet de la construction d'un laboratoire de type L3 vient d'être validé au sein de l'APHP, et les travaux débuteront en septembre 2012. Ceci entrainera une relocalisation et à cette occasion une mise aux normes des laboratoires du LA-CNR dans la perspective de l'accréditation (N ISO 15 189).

○ principaux équipements

- PSM, Etuves à CO₂, chaîne du froid : chambre froide à +4°C, congélateurs, -20°C, -40°C, -70°C
- Laveur ELISA, - Automate de sérologies virales nouvellement acquis en 2010 : Etimax (Diasorin) et Architect (Abbott)
- Extracteurs automatiques Abbott et Roche
- Thermocycleurs PCR sprint et ABI 9700, ABI 7000 et ABI 7500 fast (PCR temps réel)
- Séquenceur ABI3100 (4 capillaires)
- Lecteur de micro-array MWG.
- Laboratoire L2
- La mise en commun des équipements de biologie moléculaire de l'ensemble des services de biologie du pôle de biologie Avicenne – Jean Verdier, avec comme objectif la mise en place d'une plate forme de biologie moléculaire du pôle est en cours d'étude sous l'impulsion d'un groupe de travail coordonné par le Dr. GORDIEN et M. LE GAL.
- Laboratoire de sécurité L3 validée par la direction de la politique médicale de l'AP-HP et début de construction en septembre 2012.

2/ Activités d'expertise :

2-1 Capacités techniques du CNR

- **A/ Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux**

○ Techniques disponibles

Techniques Sérologiques :

D'un point de vue général, le laboratoire possède les techniques sérologiques de dépistage et de suivi des infections liées aux virus HBV, HIV, HCV, HAV, CMV, EBV, Parvovirus B19, Dengue et HTLV.

Dans le cadre du CNR Delta, le laboratoire possède les techniques sérologiques de recherche des Ac anti-delta Totaux, (ETI-AB-DELTAK-2 Sorin Biomedica) ainsi que des Anticorps anti-delta IgM (ETI-DELTA-IGMK-2 Sorin Biomedica). La recherche de l'Antigène delta (Sorin Biomedica) n'est utilisée qu'à visée de recherche. De nouveaux tests sérologiques (société InGen) sont maintenant disponibles sur le marché : EIAGEN ANTI-HDV IgM KIT (Anti Hep Delta IgM) ; EIAGEN ANTI-HDV KIT (Anti Hep Delta totaux); EIAGEN HDV Ag KIT (Ag Hépatite Delta). Ces tests ont été évalués sur différents les panels d'échantillons constitués.

Techniques de Biologie Moléculaire :

La technique de **RT-PCR quantitative** plasmatique pour le virus HDV mise en place au laboratoire en 2004, est utilisée en routine depuis 2005 (Le Gal F. et al Journal of Clinical Microbiology 2005). Devant le manque récurrent de tests équivalents

disponibles chez les industriels pour les laboratoires de diagnostic, nous avons vu au cours de l'année 2011 une augmentation des demandes d'examen (+6,5% par rapport à 2010) confirmant son intérêt majeur pour le suivi de l'infection par HDV. Il convient de noter que tous les génotypes sont également quantifiables par cette technique, à l'exception du génotype 3 « Sud Américain » pour lequel une paire d'amorces spécifiques a été définie.

Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B220 (n°4119).

La **détection qualitative de l'ARN HDV** est effectuée si le résultat de PCR quantitative est négatif pour les échantillons de patients ayant eu au préalable une détection d'ARN delta positive, ou pour confirmer la répllication virale d'un échantillon retrouvé « positif non quantifiable » par notre technique quantitative. Cette technique est une RT-PCR qui consiste à amplifier une région du génome viral (appelée R0) recouvrant la fin du gène codant la grande protéine jusqu'à la séquence du ribozyme antigénomique (Radjef et al., 2004).

Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B180 (n°4118).

La caractérisation du **génotype des souches HDV** est effectuée sur toute nouvelle souche mise en évidence, par l'amplification, **séquençage et interprétation phylogénétique** (par Distance et Neighbor-Joining) de la région R0 du génome viral (Radjef et al Journal of Virology 2004). La séquence ainsi obtenue (environ 320 paires de bases) est alignée avec des séquences de référence des différents types (clades 1 à 8) caractérisées préalablement au laboratoire ou issues de la littérature. De nombreuses autres régions du génome viral peuvent également être caractérisées sur le même modèle par l'utilisation de plusieurs autres couples d'amorces. L'ensemble de ces régions séquencées nous permet de caractériser la séquence complète du génome de certaines souches virales (Le Gal et al Emerging Infectious Diseases 2006).

Cette identification génotypique entre dans le cadre du suivi épidémiologique des souches circulantes réalisé par le CNR mais n'intervient pas encore dans le schéma de diagnostic clinique du patient.

Le LA CNR dispose d'une base de données exhaustive de plus de 1500 séquences 'R0' HDV de tous les génotypes décrits (1 à 8).

- Techniques développées l'année N: brève description (principes, validation)
- Techniques en développement : principes et état d'avancement

- En 2012, la mise en place d'un **témoin interne** de quantification permettant de valider chaque phase technique de la quantification de la charge virale HDV par la technique de RT-PCR en temps réel est encore en cours de développement et d'optimisation. Idéalement, un ARN encapsidé serait le meilleur candidat. Plusieurs essais non concluants ont été réalisés à l'aide de produits commerciaux disponibles ARN Simplexa® de la société Eurobio, notamment à la phase d'extraction automatisée, nécessitant des volumes trop importants de réactifs. Un nouveau candidat est actuellement à l'étude, il s'agit d'un bactériophage MS2, en collaboration avec l'équipe suisse du Dr Roland Sahli. Une validation définitive est prévue courant 2^{ème} semestre 2012.

- De plus la réalisation de la **RT-PCR « en un seul tube »** est aussi en cours. L'objectif est la simplification des différentes étapes intermédiaires en vue d'une automatisation plus poussée de la technique. Elle impose cependant le choix de nouvelles amorces consensus dans une région différente du génome du fait du problème critique de la dénaturation de l'ARN Delta, mais devant permettre de détecter l'ensemble des génotypes Delta.

- Le diagnostic de l'infection HDV en sérologie (Ac anti HDV totaux) et en biologie moléculaire (RT-PCR qualitative et quantitative) à partir de gouttes de sang et ou plasma séchées sur papier buvard a été validé expérimentalement au sein du LA-CNR (voir résumé soumis à congrès ci-dessous). Un projet vient d'être initié dans la « vraie vie » en partenariat avec un laboratoire de Mauritanie (Nouakchott) pays de forte endémie pour l'HDV (20 à 40% des patients HBV positifs). Les échantillons de 100 patients HBV positifs sont analysés de façon prospective à la fois sur sang total, sur plasma et sur des spots de sang total et plasma séchés sur papier buvard. Les examens seront les suivants : Ac anti HDV totaux ; RT-PCR qualitative et quantitative HDV et génotypes HDV et HBV. Les résultats seront disponibles courant 2^{ème} semestre 2012.

- Les études de **quantification de la charge virale HDV** par la technique de RT-PCR en temps réel citée ci-dessus sur d'autres prélèvements biologiques, en particulier à partir de **ponctions biopsies hépatiques (PBH)** pour le suivi des patients chroniques B-Delta a été reporté à l'année 2013 dans le cadre d'un projet de recherche sur une cohorte de patients HBV/HDV.

- **B/ Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles (Génotype HDV)**

Les marqueurs épidémiologiques pour HDV reposent sur le séquençage et l'analyse phylogénétique de différentes régions du génome viral.

Schématiquement, 3 approches sont complémentaires :

1 - Région dite R0 incluant la portion 3' terminale du gène codant pour la grande protéine delta (codons 195-214). Cette région permet la détermination de tous les génotypes viraux déjà décrits.

2 - Gène delta codant la petite protéine delta (codons 1 – 194)

3 - Séquence complète (1700 nucléotides) qui peut être obtenue par le séquençage de 3 régions chevauchantes du génome.

L'approche 1 est systématique pour tout nouvel isolat. Les approches 2 et 3 sont des approches d'épidémiologie moléculaire et de recherche pour caractériser de nouvelles souches.

- **C/ Collections de souches, antigènes ou immuns-sérums de référence :**

Pour les marqueurs sérologiques, nous conservons les échantillons reçus positifs et négatifs à -40°C pendant un an puis à -20°C le plus longtemps possible (>5 ans). Pour les marqueurs moléculaires, nous conservons les échantillons positifs et négatifs à -70°C. Enfin, une 'souchothèque' CNR-Delta est conservée -70°C pour toute nouvelle souche caractérisée génétiquement. A ce jour une collection de plus de 1400 souches a été constituée.

○ Description technique ('Souchothèque' CNR-Delta)

Pour toute nouvelle souche HDV caractérisée, un volume minimum de 500µl de sérum ou plasma est conservé dans une tube « NUNC »

○ Conditions de stockage (Souche-thèque CNR-Delta)

Ces souches sont enregistrées dans un tableau informatique, rangées et conservées dans un congélateur à -70°C.

○ Conditions de mise à disposition de ces collections

Pour les virus des différents clades (HDV-1 à HDV-8) entièrement séquencés, nous avons entrepris une collaboration avec Monsieur Camille Sureau (INTS) pour cloner les séquences d'ADN complémentaires en vecteurs plasmidiques. Cette partie du travail étant terminée, les constructions ont été vérifiées. Les séquences étant publiées, elles sont disponibles pour la communauté scientifique.

- **D/ Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-**

infectieux...) recommandées par le CNR :

- Listes des troussees existantes
 - *Ac anti-HDV totaux (technique ELISA Sorin Biomedica) (compétition)*
 - *Ac anti-HDV IgM (technique ELISA Sorin Biomedica) (immunocapture)*
 - *Ag HDV (technique ELISA Sorin Biomedica) (sandwich)(indication exceptionnelle). De nouvelles troussees sont maintenant disponibles (société Ingen), et ont été évaluées au sein du laboratoire (voir infra).*

 - Techniques moléculaires
 - *ARN delta ou ARN HDV recherche qualitative (technique RT-PCR interne au CNR)*
 - *ARN delta ou ARN HDV recherche quantitatif (technique RT-PCR sondes TaqMan® interne au CNR).*
 - *Génotypage des souches HDV par séquençage (technique interne au LA CNR)*

 - **Un algorithme simplifié d'utilisation de ces différentes techniques est proposé en première intention :**
 - Dépistage d'une infection au virus de l'hépatite delta :
 - *Recherche d'anticorps totaux anti-delta systématique chez tout patient porteur chronique de l'antigène HBs*
 - *En cas de positivité des anticorps totaux, recherche des anticorps IgM et de l'ARN viral. Cet examen peut être facultatif en dehors d'activités de recherche clinique*

 - Diagnostic d'une infection avec répllication virale :
 - *Détection de l'ARN viral par technique quantitative (éventuellement complétée par une recherche qualitative en cas de résultat douteux)*

 - Identification et génotypage
 - *Séquençage de la région R0 ou du gène codant la petite protéine delta pour toute nouvelle souche*

 - Suivi thérapeutique chez un patient traité
 - *RT-PCR quantitative*
- Depuis 2004, nous avons donc décidé au laboratoire associé au CNR B, C et Delta d'utiliser de façon exceptionnelle la détection de l'antigène delta dans l'approche du diagnostic de l'infection par ce virus. A notre sens, ce test n'a pas de pertinence dans l'approche diagnostique compte tenu du caractère fugace de ce marqueur et de la sensibilité beaucoup plus grande des techniques moléculaires et de leur inscription à la nomenclature.*
- Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees : méthode, état d'avancement, principaux résultats

2.2 Activités d'expertise de l'année N

- **A/ Décrire le nombre de souches ou prélèvements (ou fiches de données) réceptionnées, identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers...) en distinguant leur origine le cas échéant (France,**

étranger) et le niveau de caractérisation réalisé (typage phénotypique, génotypique ...)

La recherche d'anticorps totaux anti-HDV (1014 examens en 2011):

Cette recherche se fait chez le patient AgHBs positif. De façon exceptionnelle, nous avons pu démontrer rétrospectivement en collaboration avec le Dr Ph. Podevin de l'Hôpital Cochin, que le virus de l'hépatite delta pouvait surinfecter et provoquer une hépatite très sévère chez un patient porteur chronique d'un variant antigène HBs négatif (par mutation 144E et 145R), résistant à la Lamivudine (Gordien et al., Int J STD AIDS 2006).

Plus simplement, la détection des anticorps totaux anti-HDV doit être faite de principe chez tous les patients porteurs de l'antigène HBs car (i) l'HDV est responsable d'une maladie hépatique beaucoup plus grave ; (ii) entraîne en général une inhibition de la réplication de l'HBV (Williams V et al. 2010) ; (iii) et il importe d'évaluer la prévalence réelle de l'infection en France.

La détection des immunoglobulines de la classe M (IgM anti-HDV) (99 examens en 2011)

Cette recherche devrait à notre sens être réservée aux patients porteurs d'anticorps totaux. Ce marqueur, s'il ne différencie pas les infections delta aiguës des infections chroniques, a le mérite d'être retrouvé préférentiellement lorsque l'infection delta est active. Cependant, il peut être pris en défaut d'une part chez les patients immunodéprimés (en particulier lors d'une infection HIV) et d'autre part au cours d'infection par les variants nouvellement décrits au laboratoire, chez des patients africains notamment (Radjef et al., 2004 ; Le Gal et al., 2006). Ainsi, devant une hépatopathie sévère chez un patient AgHBs positif, la négativité des IgM anti-HDV ne doit pas dispenser de la recherche ponctuelle d'ARN viral HDV.

La détection de l'ARN viral (1854 examens en 2011)

Nous avons appliqué la détection quantitative de l'ARN HDV à 1854 échantillons pour l'année 2011 (+56%). Cet aspect s'inscrit dans le suivi nécessaire de la mise sous traitement immuno-modulateur (interféron alpha) ou antiviral parfois associé. Ainsi, la disponibilité de la technique ouvre des perspectives de projets multicentriques en fonction des thérapeutiques proposées.

Tableau 1. : Volume d'examens réalisés et centres demandeurs

Analyses		TOTAL 2011	%	TOTAL 2010	%
Sérologies	IgG / Totaux	1014	30,6%	1050	33,4%
	IgM	99	3%	114	3,6%
	DEIA	43	1,3%	56	1,8%
Biologie Moléculaire	Génotypes	185	5,6%	97	3,1%
	Charges virales	1854	55,9%	1734	55,1%
	PCR qualitative Delta	122	3,68%	96	3,1%
TOTAL (n)		3317	100%	3147	100,0%

- B/ Décrire le nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-

infectieux et résultats

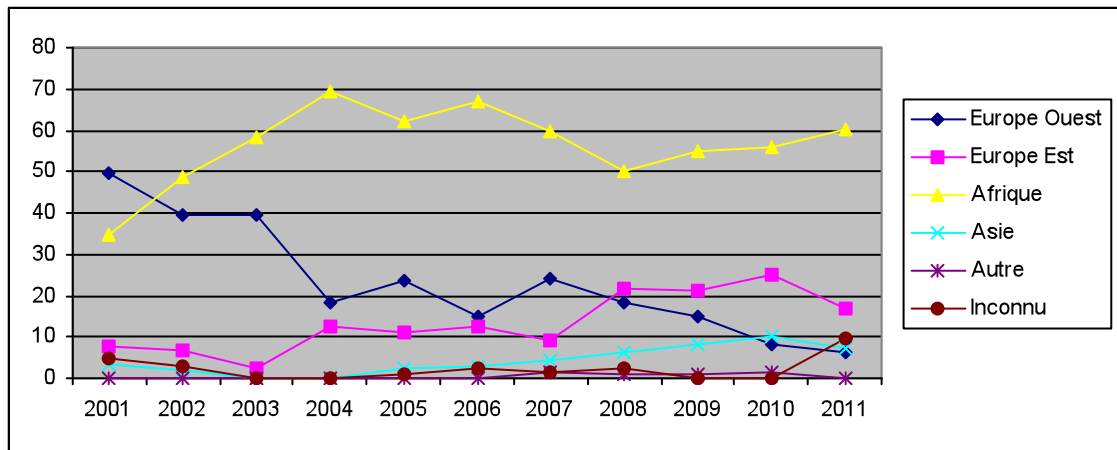
L'étude de la répllication virale des virus HBV, HCV et HDV nécessite une structure possédant un niveau de confinement de type L3. La construction d'un laboratoire de sécurité L3 au sein du laboratoire de bactériologie virologie hygiène dès le début du dernier semestre 2012, et opérationnel a priori courant 2013, devrait permettre d'envisager l'élargissement du champ de compétences du LA CNR dans cette domaine.

- **CI/ Décrire le nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués**

Nos analyses indiquent qu'en 2011, plus de 60% des isolats ont été caractérisés à partir de **patients originaires de l'Afrique de l'Ouest et du Centre**.

Ainsi, durant cette année encore, sur les 185 échantillons répliquant l'HDV et recueillis chez des nouveaux patients infectés par l'HDV, une forte majorité provenait de patients étrangers issus de pays d'endémie (Afrique sub-saharienne et Europe de l'Est). Depuis maintenant 3 années, la proportion de patients originaires d'Europe de l'Est s'est stabilisée autour de 20%. (Figure 1).

Figure 1: Origine géographique des patients infectés par l'HDV : évolution depuis 2002

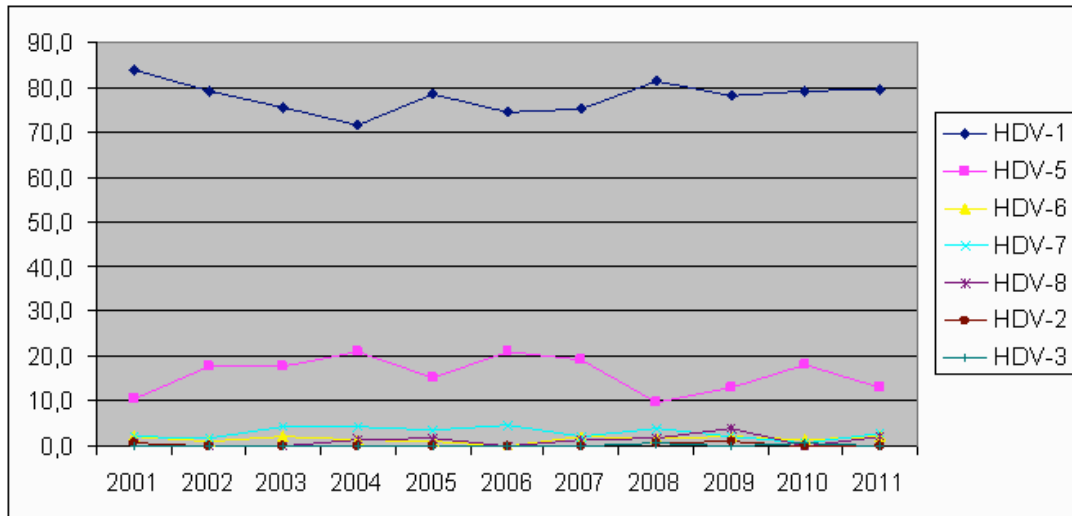


Cette situation épidémiologique en France demeure comme nous l'indiquions dans une étude précédente (Le Gal et al., Hepatology 2007) par opposition au pays européens voisins. En Allemagne, les infections par l'HDV touchent en majorité une population originaire de l'Europe de l'Est. En Angleterre dans la région de Londres, une étude récente semble montrer une situation intermédiaire, (Cross TJ et al J. Med. Virol. 2008).

En ce qui concerne les **génotypes HDV** caractérisés au sein du CNR Delta, des isolats affiliés à 2 génotypes ont été principalement mis en évidence en France (Figure 2): Génotype 1 (HDV-1) ubiquitaire : n = 146 et L'HDV-5, africain : n = 28. Cependant nous avons pu isoler des souches de HDV-6 (n=4), HDV-7 (n=4) et de HDV-8 (n=3).

Si l'HDV-1 représente toujours la majorité des infections présentes en France, les génotypes africains HDV-5, -6, et -7 (en particulier le génotype 5) représentent plus de 20 % des souches caractérisées au laboratoire (Figure 2). Ces souches n'ont, à notre connaissance, pas encore été décrites dans d'autres pays européens. Cependant, grâce à l'amélioration des outils diagnostiques développés dans notre laboratoire, il est probable que ceux-ci puissent être mis en évidence.

Figure 2 : Evolution des géotypes HDV caractérisés au CNR Delta entre 2001 et 2011



- D/ Analyse de l'évolution des tendances en termes d'activités

Le nombre de résultats positifs ou douteux en anticorps anti-delta totaux représente 11,8% des analyses effectuées chez les patients porteurs de l'antigène HBs et le nombre de patients infectés répliquant l'HDV est de 44,8% en 2011.

Nous avons pu noter une stabilisation haute des demandes de charges virales HDV (+6,5%). Ces évolutions sont le reflet d'une augmentation de la prise en compte de l'infection HDV et de l'intérêt médical porté au test de quantification de la charge virale plasmatique HDV pour le suivi des patients. De plus, la mise en place de l'algorithme décisionnel concernant les marqueurs HDV dans la routine depuis 2004, nous a permis de mieux cibler l'infection HDV au sein du centre de référence. Il convient aussi de noter la conclusion, fin 2011, d'un partenariat avec un laboratoire privé de Mauritanie pour la réalisation de la charge virale HDV pour leurs patients.

3/ Activités de surveillance :

3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

- A/ Réseau de partenaires :

o Description des partenaires :

Les laboratoires de l'AP-HP.

Les laboratoires de CHU

Les laboratoires des CHG

Le laboratoire CERBA

Certains laboratoires privés

Certains Médecins spécialistes

o Répartition par type d'activités :

Schématiquement 2 types d'envoi :

- Pour rechercher une infection delta chez un patient porteur chronique de l'HBV : analyse sérologique en première intention Ac HDV totaux suivi en cas de positivité de la recherche Ac IgM et la charge virale Delta.

- Pour une analyse moléculaire chez un patient porteur de marqueur(s) d'infection par l'HDV

○ Répartition géographique :

Bonne représentation en France-Nord

Sites un peu moins nombreux en France-Sud

Sites très ponctuels avec des pays frontaliers (ex : Belgique)

○ Estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau

- *A l'AP-HP la couverture est excellente.*

- *Pour le reste du pays, la couverture est bonne. En 2011, 29 laboratoires publics et privés dont 6 en biologie moléculaire ont participé au 2^{ème} contrôle de qualité HDV réalisé par le CNR. A noter comme indiqué plus haut, la participation supplémentaire de 4 laboratoires étrangers.*

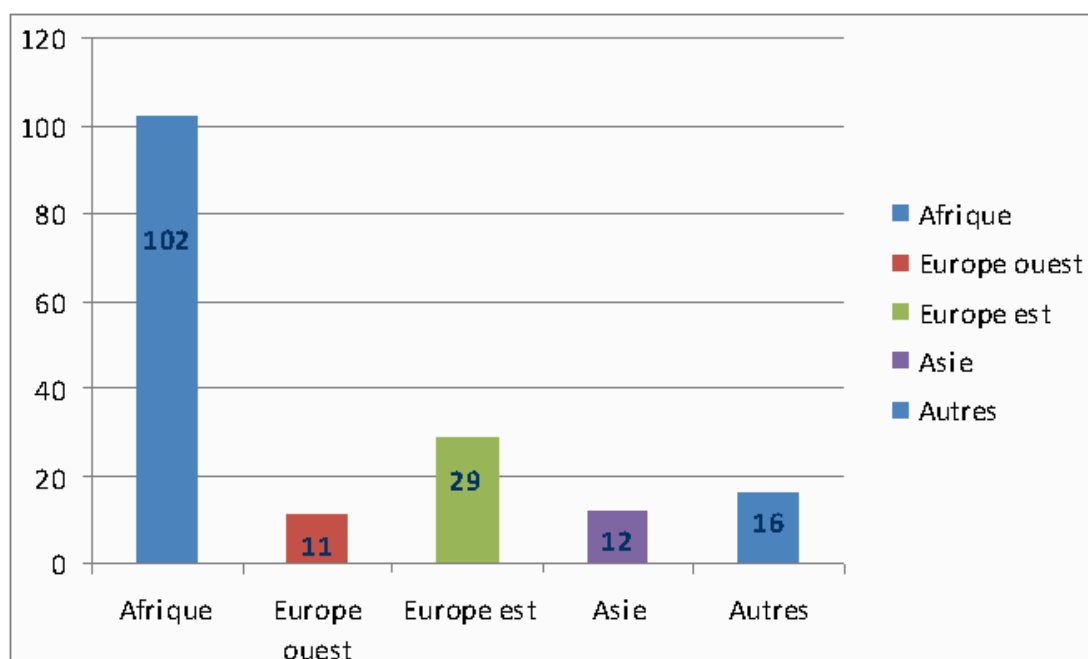
- **BI Définition de l'échantillon de souches isolées**

Sur l'ensemble des 830 échantillons positifs en 2011 pour l'ARN de l'HDV, 185 cas correspondaient à des souches nouvellement caractérisées, parmi lesquelles celles de 15 patients dont les prélèvements sont arrivés directement de Mauritanie.

- **CI Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances**

Dans le contexte de la réplication de l'HDV, on retrouve en majorité des patients de sexe masculin (65%). L'âge médian est de 44 ans pour les hommes versus 40,5 ans pour les femmes. L'origine géographique des patients infectés indique l'importance des isolats d'origine africaine sub-saharienne (Figure 2)

Figure 2 : Origine des nouveaux patients infectés par HDV et caractérisés en France au sein du CNR Delta en 2011 (n = 170)



- **D/ Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune)**
- *Rapports annuels depuis 2003 et mise en place du programme triennal lors de l'appel d'offres 2006-2009.*
- *Transmission en 2010 des rapports techniques et analytiques du premier contrôle national de qualité réalisé.*
-
- **E/ Décrire les collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines suivants : santé animale, alimentaire, environnement**

Sans objet, à notre connaissance, aucune infection satellite delta n'a été caractérisée dans des échantillons de primates sauvages malgré la présence d'HBV dans ces animaux. Il n'y a pas de transmission virale de l'HDV par l'alimentation ou l'environnement, hormis un contact familial rapproché.

3.2. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

La perspective de création d'un laboratoire L3 au sein du laboratoire de bactériologie, virologie – hygiène, autorisera la perspective du développement de l'étude de la virulence des souches virales infectant les patients. Schématiquement les étapes de pénétration n'étant pas définies, il sera nécessaire de transférer le génome complet de l'HDV sous forme d'ARN ou d'un cDNA. L'utilisation de plus d'une unité génomique s'avère nécessaire pour initier une réplication durable de l'ARN viral et étudier la résistance de cette réplication à certains composés antiviraux. L'infection cellulaire nécessitera des hépatocytes primaires ou mieux, dans notre expérience, des cellules HepaRG (cf. travaux du groupe de Camille Sureau. A cet effet, la collaboration avec le groupe de C. Sureau sera établie pour la réalisation de modèle d'infection de sérum delta infectieux sur la lignée cellulaire HepaRG.

- **A/ définition de l'échantillon de souches testées**
- **B/ définitions utilisées pour exprimer la résistance**
- **C/ résultats : distribution en fonction des critères pertinents**
- **D/ analyse des tendances**

3.3. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Brève description des événements détectés et investigués notamment nosocomiaux en décrivant les apports du CNR (détection, comparaison de souches, expertise...)

Une étude de mise en évidence d'un ou plusieurs facteurs de risque de transmission de l'infection par HDV en France a été initiée en 2007. Elle a été centrée sur les patients nés et vivant en France et dont les souches sont collectées au sein du CNR Delta. La caractérisation moléculaire de la région R0 du génome viral a déjà mis en évidence une propagation récente des souches virales entre ces patients du fait d'une divergence génétique moyenne extrêmement faible d'environ 1,93% entre les souches. Les facteurs de risques liés à ce phénomène sont en cours d'investigation.

3.4. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Lister les réseaux auxquels le CNR et ses laboratoires associés participent et leur contribution (expertise, envoi de données, de souches...)

- Le laboratoire est inclus dans des réseaux locaux (CISIH93, Groupe GERCOVIH, Réseau hépatite C Nord –Francilien) et Nationaux (HCV ANRS AC11, HIV-HBV ANRS AC11, AC33).

- Il entretient également des liens privilégiés pour l'étude de l'infection HDV avec le CNR National B, C et Delta et l'autre laboratoire associé du CNR dirigé par Syria Laperche. De même, des collaborations sont maintenues avec le Laboratoire de virologie moléculaire, INTS dirigé par Camille Sureau.

- Au niveau international, le laboratoire est en contact avec plusieurs équipes travaillant sur le HDV :

- Dr Benetti – CIBIC - Argentine / Dr Dazhuang Shang (Institute of Liver Studies King's College Hospital Denmark Hill London SE5 9RSUK). Ces équipes nous ont interpellés en tant que référent international sur la variabilité HDV pour leur fournir soit des échantillons positifs de différents génotypes, soit des plasmides de quantification en vue de la mise en place du test de PCR en temps réel.
- Le professeur Prof. Dr. Michael Roggendorf de l'Institut universitaire de Virologie de Duisburg –en Allemagne : pour la fourniture de séquences Delta de génotypes différents pour l'étude d'épitopes delta pouvant être incriminés dans l'échappement du virus au système immunitaire ;
- Le Pr Heiner Wedemeyer du département de gastroentérologie, hépatologie et endocrinologie de Hanovre en Allemagne pour la comparaison des techniques de quantification de la charge virale Delta : mise en place en 2010 d'un contrôle de qualité interne dans la quantification de la charge virale ARN de l'HDV.
- Le Dr Sahli Roland, de l'institut de microbiologie, Lausanne Suisse, pour l'amélioration des techniques de quantification de la charge virale Delta et l'évaluation de contrôles internes.
- Dr Garson (Londres)
- Dr Gish (USA)
- Pr Triki de l'institut Pasteur de Tunisie.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

A/ les objectifs de l'enquête :

Comme nous l'avons vu précédemment, du fait de flux migratoire important en particulier vers l'Europe en provenance de pays d'endémie pour HDV, il nous a paru intéressant d'aborder l'infection par HDV plus globalement au delà du territoire français et au delà du cadre du CNR Delta. Pour cette raison nous avons entrepris de nombreuses coopérations avec différents pays étrangers au sein desquels la séroprévalence des anticorps HDV était élevée. La plupart de ces études a été initiée en 2007. Elles avaient principalement pour but de caractériser au niveau moléculaire, les souches virales HDV mais également HBV circulant dans les pays concernés.

B/ les partenaires :

C/ état d'avancement :

D/ principaux résultats le cas échéant ou renvoi à une publication :

- Caractérisation de l'épidémiologie moléculaire B et delta en Turquie (article soumis) : le but du travail était de caractériser les souches d'HBV et d'HDV circulant en Turquie en particulier à l'Est du pays où près de 56% de la population AgHBs positive est infectée par l'HDV. Les principaux résultats confirment en Turquie l'association « méditerranéenne » : HBV/D et HDV-1. Il est intéressant de constater que cette association est également présente en Mongolie, traduisant peut-être une épidémiologie virale superposée aux migrations de populations.
- Suivi des charges virales plasmatiques HDV sur une cohorte en Grèce (Manesis et al Inter. Med. Press 2007)
- En 2007, nous avons finalisé cette étude internationale avec la Grèce. Elle avait pour but de quantifier l'ARN de l'HDV chez des patients traités par interféron pégylé et Lamivudine avec le Dr Manesis. Ces mesures venaient compléter différentes mesures biologiques et concluaient à l'intérêt de la quantification

combinée de l'AgHBs et de l'ARN HDV dans le suivi des patients infectés de façon chronique par HBV et HDV.

- Epidémiologie Moléculaire de l'Hépatite B-Delta en Afrique (travaux en cours)
Plusieurs coopérations ont été initiées en 2007 dans le but de caractériser les couples HBV-HDV circulant dans les pays concernés :
 - 1- La Mauritanie en partenariat avec le CHU d'Angers (Pr. F Lunel-Fabiani)
 - 2- Le Niger (Dr A. Garba et Mme M. Issoufou).
 - 3- La République Centre Africaine (Dr Narcisse Kommas)
 - 4- Le Burundi (Dr T.Niyongabo) en lien avec le Pr O. Bouchaud (service des maladies infectieuses d'Avicenne). Etude réalisée sur plus de 200 échantillons.
 - 5- L'Algérie (D.r S. Gourari). Etude réalisée sur plus de 150 échantillons.
 - 6- Le Cameroun (Dr R. N Jouom, Institut Pasteur de Yaoundé) 200 échantillons
- Caractérisation de l'épidémiologie moléculaire B et delta en Syrie
(Travaux en cours) : En lien avec un doctorant Syrien (Mr W. Mansour) réalisant ces travaux aux CHU d'Avicenne (Dr. E. Gordien) et d'Angers (Pr. F Lunel-Fabiani) environ 200 échantillons provenant de patients AgHBs positif ont été collectés sur tout le territoire syrien. Ces échantillons sont en cours de rapatriement pour réaliser les différentes analyses moléculaires et sérologiques sur les virus HBV et HDV.

- **E/ la contribution du CNR**

Au cours de chacune de ces études, il a été proposé aux pays concernés un partenariat en vue d'un transfert de technologie leur permettant d'acquérir localement les outils de diagnostic et de suivi de l'infection par HDV. Dans ce but un ou plusieurs étudiants ou médecins ont été accueillis et continueront à l'être au sein du laboratoire CNR Delta.

4. Alerte :

- **A/ décrire la procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal :**
 - La procédure d'alerte serait mise en place dans le cadre de cas groupés d'hépatites aiguës ou fulminantes survenant soit dans un contexte de facteur de risque identifié, principalement par voie parentérale chez l'adulte, soit chez des patients porteurs chroniques de l'Antigène HBs.
 - D'autre part, l'évaluation des kits commerciaux existants ou en développement permettra de déterminer leur capacité à détecter ou quantifier les différentes souches circulant en France (voir circulation des souches en France dans la figure 3).
- **B/ descriptif des phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année :**

Il n'y a pas eu de phénomène nécessitant un signalement d'infections HDV dans le cadre d'une procédure d'alerte.
- **C/ analyse des tendances et du fonctionnement du système :**

L'infection delta est responsable en règle générale d'une maladie chronique du foie ; L'alerte ne se concevrait qu'en présence de cas groupés d'hépatites aiguës ou fulminantes delta, ce qui n'a pas été le cas en 2010. Dans notre pays, il est hautement probable qu'une telle propagation ne surviendrait que dans un contexte précis de transmission et de promiscuité (Usagers de Drogues, Migrants...).

5. Activités d'information, de formation et de conseil :

- **A/ Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires :**
 - *Cours magistraux, à la faculté de médecine de Paris 13 ; de Paris 7 et à la faculté de médecine Antilles Guyane ;*
 - *Staffs, conférences sur invitation, et dans les services cliniques de l'APHP et dans les sessions scientifiques organisées par des laboratoires pharmaceutiques ;*
 - *Cours dans le cadre de la formation continue, Bioforma et laboratoires privés (Biomnis Vitry et Lyon) ;*
 - *Cours à l'Institut Pasteur de Paris (Virologie systématique) ;*
 - *Stagiaire en provenance d'Algérie (Dr. S. Gourari) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Algérie.*
 - *Stagiaire en provenance du CHU Angers (M. W. Mansour) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Mauritanie.*
 - *Stagiaire en provenance du Burundi : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant au Burundi (G. Ciza);*
 - *Stagiaire en provenance de Centrafrique : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Centrafrique. Projet financé par l'ANRS (G. Laghoe)*
 - *Stagiaire en provenance du Cameroun : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant au Cameroun (Dr R. Njouom)*
 - *Thèse de doctorat d'université (M. F. Le Gal 2007) : Diversité génétique de l'HDV en Europe et en Afrique. Caractérisation et implication en virologie médicale.*
 - *Thèse de doctorat d'université (Mlle V. Williams 2008) : Inhibition de la réplication du HBV auxiliaire ; Approche des mécanismes moléculaires spécifiques de la pathogenèse hépatique.*
 - *Thèse de doctorat d'université (Mme M. Issoufou 2010) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant au Niger.*
 - *Mémoire de M2 (Mlle Erin Khan, 2010) : Implication de la NADPH Oxydase 4 dans l'Induction du Stress Oxydant par le Virus de l'Hépatite Delta ;*
 - *Thèse de doctorat d'université (Mlle S. Brichler, 2011) : Pathogenèse spécifique du virus de l'hépatite Delta.*
 - *Thèse de doctorat d'université (M. Wael Mansour) : Prévalence et diversité génétique des souches HBV et HDV circulant au Niger et en Mauritanie.*
- **B/ Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)**
 - *Les différentes mémoires de M2 ou de thèses de sciences produits au sein du CNR-Delta, servent de support scientifique et technique en interne au laboratoire dans la mise en place des études et protocoles techniques.*
 - *Toujours en interne au laboratoire, le Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA) sert à la bonne réalisation des techniques de routine destinées au diagnostic et de suivi de l'infection par HDV.*
 - *Enfin des réunions mensuelles orientées CNR Delta sont réalisées afin de diffuser et de rendre compte de l'avancement des divers travaux, à la fois au sein même du laboratoire de Virologie d'Avicenne mais également plus largement au sein de notre l'hôpital.*
- **C/ Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :**
 - Rétro-information aux partenaires
 - Diffusion aux professionnels : conférences, Site web

- **DI/ Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)** :
- **Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)** :
ANAES pour la mise en place de la nomenclature pour les examens moléculaires de l'HDV

6. Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

Pour le LA CNR des hépatites B, C et delta pour l'infection delta, les travaux de recherche sont effectués principalement en lien avec l'unité INSERM U845 (Paris).

Pour chacun de ces travaux, décrire :

- **les objectifs,**
 - **les partenariats et l'apport du CNR**
 - **l'état d'avancement et le cas échéant les principaux résultats.**
- 1- *L'étude initiée fin 2006 avec le Dr S. Laperche de l'Institut National de Transfusion sanguine et qui portait sur l'infection delta sur les poches de sang AgHBs positif, a été complétée jusqu'à aujourd'hui. Cette étude avait pour but de déterminer la prévalence de l'infection Delta au sein de la population de donneurs de sang. En fin 2011, 113 échantillons étaient positifs en sérologie anti-HDV. Parmi ceux-ci 18 étaient ARN HDV positifs avec des charges virales comprises entre 100 et 1000 (valeurs inférieures) et jusqu'à 3×10^6 copies/ml (valeurs supérieures). 60 échantillons supplémentaires sont en cours de caractérisation.*
 - 2- *Rôle des protéines delta dans la cancérogenèse : Déterminer les interactions cellulaires et les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse liée à l'infection par l'HDV ; Interactions de la grande protéine delta et de voies de signalisation cellulaires (INSERM U845 et Hôpital Avicenne, LA-CNR des hépatites B, C et delta). La grande protéine Delta, ou p27 joue un rôle majeur à la fois dans les mécanismes d'inhibition de la réplication du virus HBV auxiliaire, fréquemment retrouvée, et aussi dans la pathogenèse spécifique propre de l'HDV, notamment par la genèse d'un stress oxydant dans la cellule avec pour conséquence l'activation des facteurs de transcription STAT-3 et NF- κ B. L'implication du gène de la NADPH oxydase-4 (Nox-4) a été montrée dans la genèse de ce stress oxydant. Ces travaux sont les résultats obtenus au laboratoire dans le cadre de la thèse d'université de Mlles Williams (J. Gen. Virol, 2010) et Brichler (J Viral Hepatitis 2012).
STAT-3 et NF- κ B sont retrouvés dans les promoteurs de nombreux gènes, dont le gène de la cycline D1 et le gène anti apoptotique BclXL. Des résultats préliminaires dans notre modèle in vitro nous ont montré que p27 activait les promoteurs de ces deux gènes. Ces travaux seront poursuivis afin d'établir le rôle de cette protéine de l'HDV dans la prolifération cellulaire et dans le blocage de l'apoptose, à l'origine de son action carcinogène.*
 - 3- *L'étude de la co-spéciation des souches B et Delta a été étudiée dans un modèle cellulaire de transfection en utilisant des plasmides codant les protéines s-AgHBs et L-HDAg de génotypes différents, permettant la formation de pseudo particules virales. Les résultats préliminaires obtenus au laboratoire dans le cadre de la thèse d'université de Mme ABDOU, ont montré une plus grande efficacité de*

l'association ente le génotype HBV/D avec le génotype HDV-1. En Afrique, le génotype HBV/E est majoritaire et pas moins de 5 génotypes Delta (1, 5, 6, 7 et 8) circulent. LA question posée : HBV/E enveloppe t'il avec la même efficacité les 5 génotypes Delta ? Et quelles sont les conséquences sur la pathogenèse des différents génotypes viraux ? Ces travaux bénéficieront de la disponibilité du laboratoire L3 à venir.

- 4- *Etude de la variabilité génétique des souches HDV et HBV en Afrique (Algérie, Burundi, Cameroun, Centre Afrique, Mauritanie, Niger et tout récemment la Tunisie) en lien avec des équipes médicales et de recherche sur place. La caractérisation de sous génotypes putatifs A HBV/Am (m pour Mauritanie) de même que des souches HBV/D8 est d'ores et déjà en cours. L'étude de la variabilité génétique B et Delta en Tunisie sera initiée en lien avec l'équipe du Pr TRIKI de de l'Institut Pasteur de Tunis. Les transferts de technologie sont réalisés avec ces différentes équipes (sérologie ; PCR qualitative, génotypage).*

7- Liste des publications et communications

Publications nationales

***Le virus de l'hépatite delta, un agent pathogène originalement d'actualité**
Frédéric Le Gal , Emmanuel Gordien & Paul Dény 2008 (Doin collection)*

Publications internationales

Prevalence and Molecular Epidemiology of Hepatitis B and Delta Virus in Blood Donors in Mauritania

W. Mansour 1,2, CT. Hamed 3, MA. Bollahi 3, S. Brichler 4, F. Le Gal 4, A. Ducancelle 1,2, B. Lo 6, E. Gordien 4, M. Rosenheim5, and F. Lunel 1,2,
*J. Clin. Virol, 2012**

Prevalence, Risk Factors and Molecular Epidemiology of Hepatitis B and Delta Virus in Pregnant Women and in Patients in Mauritania :

*Wael Mansour 1,2, F- Zahra Fall Malick 3, Ahmad Sidiya 4, Elkhalil Ishagh5, Mariama Abdou Chekaraou 6 ,Pascal Veillon 1,2, Alexandra Ducancelle 1,2, Ségoène Brichler 6 Frédéric Le Gal 6 ,Baidy Lo 3, Emmanuel Gordien 6 and Françoise Lunel-Fabiani 1,2 *
*J. Medical Virol, 2012**

Isoprenylated Large Hepatitis Delta Antigen activates STAT-3 and NF-κB via Oxidative Stress

*Virginie Williams, Ségoène Brichler, Erin Khan, Mounia Chami, Paul Dény, Dina Kremsdorf 2 and Emmanuel Gordien (*J Viral Hepatitis* 2012)*

jpHMM: recombination analysis in viruses with circular genomes such as the hepatitis B virus
*Schultz AK, Bulla I, Abdou-Chakaraou M, Gordien E, et al. (*Nucleic Acid Reseach* 2012)*

Current hepatitis delta virus type 1 (HDV1) infections in central and eastern Turkey indicate a wide genetic diversity that is probably linked to different HDV1 origins

*Le Gal F, Badur S, Hawajri NA, Akyüz F, Kaymakoglu S, Brichler S, Zoulim F, Cordien E, Gault E, Deny P. (*Arch Virol* 2012)*

A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains.
Abdou Chekaraou M, Brichler S, Mansour W, Le Gal F, Garba A, Dény P, Gordien E.
J Gen Virol. 2010 Jun;91(Pt 6):1609-20. Epub 2010 Feb 10. PubMed

Mansour W, Ducancelle A, Le Gal F, Le Guillou-Guillemette H, Abgueguen P, Pivert A, Calès P, Gordien E, Lunel F. Resolution of chronic hepatitis Delta after 1 year of combined therapy with pegylated interferon, tenofovir and emtricitabine. J Clin Virol. 2010 Jan;47(1):97-9. Epub 2009 Nov 13. PubMed

Hepatitis Delta Virus Proteins p24 and p27 Suppress Hepatitis B Virus (HBV) Replication by Trans Repression of HBV Enhancers and by Activation of the IFN- α/β Inducible MxA Gene (J Gen Virol. 2009 Nov;90(Pt 11):2759-67)
Virginie Williams, Ségolène Brichler, Nadjia Radjef, Pierre Lebon, Anne Goffard, Didier Hober, Remi Fagard, Dina Kremsdorf, Paul Dény, and Emmanuel Gordien

Le Gal F, Castelneau C, Gault E, Al Hawajri N, Gordien E, Marcellin P, Dény P. Hepatitis delta is not a vanishing disease in Europe : Reply. Hepatology. 2007 May;45(5):1332-3.

Dény P.

Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades?
Curr Top Microbiol Immunol. 2006;307:151-71. Review.

Communications nationales

Frédéric Le Gal, Elyanne Gault, Nasser Al Hawajri, Ségolène Brichler, Virginie Williams, Emmanuel Gordien, Paul Dény; Nouvelle nomenclature du virus de l'hépatite Delta : De 3 génotypes à 8 clades majeurs. VII CONGRES de la SFM. Mai, Juin 2007, Nantes

Epidémiologie moléculaire du virus de l'hépatite delta en France

Le Gal F, Rico-Garcia M, Abdou Chekaraou M, Brichler S, Gault E, Dény P, Gordien E
Journées Francophones de virologie 2008

Communications internationales

The isoprenylated large isoform of hepatitis delta virus protein activates STAT-3 and NF- κ B, via oxidative stress

BRICHLER Ségolène, WILLIAMS Virginie, KHAN Erin, DENY Paul, KREMSDORF Dina and GORDIEN Emmanuel

Communication orale au congrès international de biologie moléculaire de l'HBV, Taiwan, octobre 2010

Hepatitis delta virus (HDV) genus is composed of 8 genotypes and several subgenotypes as assessed by phylogenetic analyses of 1036 hdv strains

F. Le Gal, N. Radjef, M. Abdou Chekaraou, W. Mansour, V. Ivaniushina, M. Tamby, S. Oymak, P. Anaïs, M. Rico-Garcia, S. Gourari, E. Gault, P. Dény and E. Gordien

Communication affichée, Conférence monothématique sur le virus de l'hépatite Delta, Istanbul Turquie 24 – 26 Septembre 2010, EASL

Hepatitis Delta Virus (HDV) clade 1, 6 and 8 molecular clones prototypes: Study of replication In Huh7 cell, assembly with Hepatitis B Virus (HBV) genotype E or D surface antigens and infection of primary human hepatocytes

Mom V (1), Bloquel B (1), Falah N (2), Cortay J-C (2), Yu D (1), Sureau C (3), Hantz O (1), Kay A (1), Gordien E (4,5), Le Gal F(4), Lina B (2), Zoulim F (1,6), Deny P (1,4)
Communication orale, Conférence monothématique sur le virus de l'hépatite Delta, Istanbul Turquie 24 – 26 Septembre 2010, EASL

The isoprenylated large isoform of hepatitis delta virus protein activates STAT-3 and NF- κ B, via oxidative stress
BRICHLER Ségolène, WILLIAMS Virginie, KHAN Erin, DENY Paul, KREMSDORF Dina and GORDIEN Emmanuel
Communication orale Conférence monothématique sur le virus de l'hépatite Delta, Istanbul Turquie 24 – 26 Septembre 2010, EASL

Results of a french national quality control for hepatitis delta virus RNA quantification
F. Le Gal , S. Brichler, M. Abdou Chekaraou, P. Deny and E. Gordien
Communication affichée, Conférence monothématique sur le virus de l'hépatite Delta, Istanbul Turquie 24 – 26 Septembre 2010, EASL

High Prevalence of Hepatitis Delta Virus in Adults and Pregnant Women in Mauritania
Wael Mansour (1), Zahra Fall Malick (2), Ahmed Sidiya (3), Ishak Elkhalil (4), Mariama Abdou Chekaraou(5), Baïdy Lô (2), Alexandra Ducancelle(1), Emmanuel Gordien(5), Françoise Lunel-Fabiani(1)
Communication affichée, Conférence monothématique sur le virus de l'hépatite Delta, Istanbul Turquie 24 – 26 Septembre 2010, EASL

Evaluation d'une technique d'extraction et d'amplification de l'ARN viral Delta à partir des taches de sang et de sérums séchés sur papiers buvards
W. Mansour and C.T. Hamed, E. Ahmed-Tijani, S. Amadou-Mody, F. Le Gal, E. Gordien, A. Ducancelle, M.A. Bollahi, F. Lunel-Fabiani.
Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse ; 3 & 4 Décembre 2009 ; Paris

Evolution of epidemiology and viral diversity in hepatitis delta virus infected patients in France from 2001 to 2009
Frédéric Le Gal, Mariama Abdou-Chekaraou, Ségolène Brichler, Nora Belguerma, Paul Dény, Emmanuel Gordien.
Communication affichée au congrès international de biologie moléculaire de l'HBV San Diego, septembre 2009

The Isoprenylated Large Hepatitis Delta Antigen activates STAT-3 and NF κ B via Endoplasmic Reticulum Stress and Production of Reactive Oxygen Species
Williams V., Brichler S., I. Dusanter, I. Komla-Soukha, C. Sureau, Fagard R., Dény P. and E. Gordien
Communication orale 42 th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona, Spain, April 11-15, 2007

The isoprenylated large isoform of hepatitis delta virus protein activates STAT-3 and NF κ B, via oxidative stress
Williams Virginie, Brichler Ségolène, Komla Soukha Isabelle, Sureau Camille, Kremsdorf Dina, Dény Paul and Gordien Emmanuel
Communication orale au congrès international de biologie moléculaire de l'HBV Rome, septembre 2007

Conférences sur invitations

Conférence monothématique de l'association européenne de l'étude du foie (EASL) :

Hepatitis delta virus (HDV) genus is composed of 8 genotypes and several subgenotypes as assessed by phylogenetic analyses of more than 1000 HDV strains

E. Gordien

Conférencier invité : communication orale, Conférence monothématique sur le virus de l'hépatite Delta, Istanbul Turquie 24 – 26 Septembre 2010, EASL

Genetic diversity of delta virus genus: new strategies using PCR –RFLP and big dye terminator automated sequencing (CLIP™).

E. Gordien

Conférencier invité : communication orale au Central Europe BAYER Meeting, 20-21 March 2006, Vienne Autriche

8- Programme d'activité N+1 et N+2

Fournir les perspectives et grandes lignes du programme d'activité de l'année N+1 sur la base du présent rapport et du programme quadriennal proposé.

Notre activité à venir s'articule d'ores et déjà autour des 5 axes décrits ci-dessous afin de permettre la mise à disposition d'outils de diagnostic et de pronostic de l'infection HDV pour une prise en charge optimale des patients infectés

- *Etude prospective dans la « vraie vie » du diagnostic en sérologie et en biologie moléculaire à partir de sang séché sur papier buvard (N+1)*
- *Mise au point de la RT PCR quantitative delta consensus en 1 seul tube, avec contrôle interne, étape vers une automatisation complète de la procédure technique (N+1).*
- *Caractérisation des souches HDV et HBV mauritaniennes et tunisiennes (N+1)*
- *Mise en place d'un contrôle international de qualité en en biologie moléculaire (N+2)*
- *Mise au point de la quantification de la charge virale HDV sur des biopsies hépatiques congelées ou incluses en paraffine (N+2)*
- *Etude de la co-spéciation B et Delta en culture cellulaire (laboratoire P3) (N+2)*
- *Activité de recherche fondamentale autour de 2 axes (N+2) :*
 - 1- *HDV cycline D1 et apoptose*
 - 2- *HDV et fibrose hépatique*

Emmanuel GORDIEN

21 mai 2011

Use of Dried Serum Spots for Serological and Molecular Detection of Hepatitis Delta Virus

Wael Mansour^{1,2}, Cheikh-Tijani Hamed², Frédéric Le Gal¹, Chakib Alloui¹, Françoise Lunel Fabiani^{2†} and Emmanuel Gordien^{1†}

¹ Laboratoire de Virologie, CHU Angers; 4, rue Larrey 49933, Angers Cedex 9, France

² Laboratoire de Bactériologie, Virologie, Hygiène, associé au CNR des hépatites B, C et Delta, Hôpitaux universitaires de Paris Seine Saint Denis, site Avicenne; Université Paris 13; 125, boulevard de Stalingrad 93009 Bobigny Cedex, France

Current estimates suggest that 15–20 million people are infected with Hepatitis Delta Virus (HDV). Most of them live in developing countries, in almost of them; no adequate facilities are available for routine monitoring of HDV infection. In the present study, we tried to assess the feasibility of both serological and molecular detection or quantification of HDV RNA on dried serum spot (DSS).

Materials and methods: In serological study, eluates from sera plotted on DSS and stored at room temperature for 10 days (41 sera) or 20 days (19 sera) and were tested.

In molecular study, we analysed HDV RNA extracted from DDS plotted with positive HDVAb sera and stored for 1 or 15 days (qualitative PCR; n=24, “14 pos, 10 neg”) and 10 or 20 days (quantitative real time PCR, n=19 “16 pos, 3 neg”, genotypes 1, 2, 5, 6, 7).

Results: Storage duration for no more than 20 days had no impact on the results of serological analysis HDVAb was detected in all eluates plotted by HDVAb positive sera.

Qualitative HDVRT-PCR was able de detect HDVRNA extracted from DSS in all positive samples after an incubation period till 20 days. In quantitative RT-PCR, the viral load (VL) was detectable in all sera and quantifiable in 14/16 sera after blotting and storing for 10 days. The difference between VL in DSS incubated 10 or 20 days was less than 0.3 log indicating the ability to use DSS in the follow-up of patients. When comparing VLs in sera and in DSS-d10 and DSSd20, the difference ranged from 0-1.68 and 0.20-2.54 log copies/ml. The 1-2 log loss in sensitivity is probably attributable to a smaller sample (1/20 of the recommended serum volume) input in RT-PCRs performed with DSS.

In conclusion, this technique would be suitable for HDV serological analysis, molecular study (detection and quantification of HDV RNA) and for epidemiological studies (HDV genotyping). Samples on DSS are easy to obtain, to store and to be readily transported or posted from remote areas.

Performances of Three Commercial Assays Compared to an 'In-House' Consensus Real-Time RT-PCR Assay for Hepatitis Delta Virus RNA Quantification

Ségolène BRICHLER^{1*}, Frédéric LE GAL^{1*}, Afifaa BUTT^{1*}, Sylvie CHEVRET² and Emmanuel GORDIEN^{1, #}

¹ Laboratoire de Bactériologie, Virologie - Hygiène, Hôpitaux universitaires de Paris Seine Saint Denis, site Avicenne, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, laboratoire associé au Centre National de référence des hépatites B, C et Delta; Université Paris 13 Bobigny, France.

² Département de Biostatistique et Informatique Médicale, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris; Unité de Biostatistique et Epidémiologie Clinique, Sorbonne Paris Cité, Université Paris Diderot, UMRS 717, F-75010 Paris, France; INSERM, U717, F-75010 Paris, France.

ABSTRACT

Hepatitis D virus (HDV) infection is an important etiologic agent of fulminant hepatitis and may worsen the clinical course of chronic hepatitis B infection resulting in cirrhosis and liver failure. HDV genus is characterized by a high genetic diversity into 8 genotypes. We have developed an 'in house' consensus TaqMan real time RT-PCR method able to quantify HDV RNA with wide range linearity (from 10² to 10⁸ copies/mL) whatever the genotype of the infecting strain. The aim of this study was to evaluate the performances of 3 new commercial kits, using real time PCR technology: the Lightmix® kit HDV (designed for HDV-1); the RoboGene® HDV RNA quantification kit and the DIA-PRO HDV-RNA Quantification (designed for all genotypes). A retrospective study was conducted, using RNA from 128 samples of all genotypes except HDV-4. A longitudinal study was also performed using 5 previous samples of 6 patients infected with strains of different genotype. Consistent results to ours were obtained for European or Asian HDV-1 samples while for African HDV-1 samples, underestimation (0.5 to 1 log with Lightmix®) or non-detection (1 and 4 samples with Lightmix® and Diapro respectively) were found. Moreover, almost all non-genotype-1 strains were dramatically underestimated (about 2 to 3 log) and several highly viremic HDV-7 or -8 samples were undetected by the 3 commercial assays. In conclusion, these kits well quantify European HDV-1 strains, which represent 40% of circulating strains in European countries. However they can completely ignore a genuine viral replication in patients infected with HDV-African strains.