

CNR DES HEPATITES B, C ET DELTA

RAPPORT D'ACTIVITE 2009 - 2010

Avril 2010

I

STRUCTURE ET MISSIONS DU CNR

1- Rappel des missions du CNR

Le Centre National de Référence des hépatites virales B, C et delta et ses laboratoires associés se sont engagés à assurer les missions définies par l'arrêté du 29 novembre 2004 fixant les modalités de désignation et les missions des CNR. Dans ce cadre, le CNR dispose d'une expertise dans les domaines suivants :

- Typage moléculaire et analyse phylogénique,
- Détection et investigation virologique de "nouveaux agents viraux" potentiellement impliqués dans la survenue d'hépatites chez l'homme,
- Sécurité transfusionnelle avec notamment l'évaluation des réactifs de dépistage et de confirmation,
- Tests salivaires avec en particulier développement de tests pour le VHC,
- Résistance aux anti-viraux du VHC et du VHB,
- Processus de désinfection et de stérilisation.

Les missions du CNR définies par l'arrêté du 29 novembre 2004 sont les suivantes :

- Participer à la standardisation des méthodes diagnostiques et de typage par l'implication dans un réseau d'expertise et de surveillance internationale,
- Contribuer à la surveillance des types viraux circulants en France et à la détection de virus mutants émergents (VHB) susceptibles de poser des difficultés, diagnostiques, de prise en charge thérapeutique ou d'efficacité vaccinale,
- Contribuer à la détection et l'identification de nouveaux virus pouvant être responsables d'hépatites transmissibles par le sang,
- Contribuer à la surveillance de la résistance du VHB et du VHC aux anti-viraux,
- Contribuer, en collaboration avec l'Institut de Veille Sanitaire, à l'investigation de cas groupés d'infection par le VHB et le VHC par la comparaison d'isolats et à l'étude des modalités de transmission résiduelle,
- Contribuer au niveau national, en collaboration avec l'Institut de Veille Sanitaire, l'Etablissement Français du Sang et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), à la surveillance des infections

par le VHB et le VHC dans la population des donneurs de sang avec en particulier une analyse de la diversité des souches circulant en France,

- Participer, le cas échéant et en liaison avec l'Institut de Veille Sanitaire, aux travaux à l'échelon européen,
- Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire toute suspicion de cas groupés et à l'AFSSAPS tout problème concernant un réactif.

2- Description de la structure du CNR

Le CNR des Hépatites B, C et delta est constitué de 4 laboratoires :

- CNR des hépatites virales B, C et delta : localisée dans le service de Bactériologie-Virologie-Hygiène et de l'équipe de recherche "Physiopathologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques" (INSERM U955) de l'hôpital Henri Mondor, Créteil (Responsables : Pr. Jean-Michel PAWLOTSKY, Dr. Stéphane CHEVALIEZ),
- Laboratoire associé CNR des hépatites virales B, C et delta en transfusion sanguine : localisé à l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS), Paris (Responsable : Dr. Syria LAPERCHE),
- Laboratoire associé responsable de la recherche et du développement : localisé au sein de l'unité mixte de recherche Institut Pasteur-INSERM à l'hôpital Paul Brousse, Villejuif (Responsable : Dr. Valérie THIERS),
- Laboratoire associé pour les hépatites delta : localisé dans le service de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Avicenne, Bobigny (Responsables : Pr. Paul DENY, Dr. Emmanuel GORDIEN).

Le CNR est dirigé par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY. Le Conseil de Direction est constitué des Directeurs des 4 laboratoires. Le Conseil de Direction a pour mission d'assurer la coordination des activités du CNR entre les différents laboratoires associés, d'assurer une animation scientifique et de prendre toute décision concernant l'organisation ou le fonctionnement du CNR, en relation avec l'Institut National de Veille Sanitaire (InVs). Les collaborations scientifiques et techniques entre les différents laboratoires associés existent, comme en témoignent les publications communes à certains d'entre eux.

Le CNR, lieu d'activités médicales et scientifiques intégrées, est ouvert sur l'extérieur par le biais de multiples connexions, relations et collaborations, fonction des réseaux de liens de chaque composante. Ceci est en particulier le cas avec :

- Les acteurs institutionnels : Institut National 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 (EFG), Institut Pasteur (IP), Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS).
- Les réseaux de surveillance et de recherche Européens : réseau BOTIA de surveillance de la transmission des virus par la transfusion sanguine et la greffe.
- 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 B, C et delta comme les hôpitaux, les cliniques, les laboratoires d'analyses médicales, les laboratoires de recherche, la Fédération Nationale des Pôles de Référence et Réseaux Hépatites (FNPRRH).

3- Bilan global de la quatrième année de fonctionnement

La quatrième année de fonctionnement du CNR a été une année intense de collaboration entre les différents partenaires et de mise en place de nouvelles études. Elle a en particulier vu la mise en place de la surveillance nationale de l'infection chronique par le VHB à partir des pôles de référence et réseaux hépatites. Cette étude comporte : un versant rétrospectif concernant les patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B au cours de l'année 2008, qui a impliqué 29 des 37 pôles de référence et réseaux hépatites, avec un total de 1065 patients inclus ; un versant prospectif à partir de 2009 qui implique 32 des 37 sites et a permis l'inclusion à ce jour de 594 patients. Par ailleurs, l'enquête PREVAGAY est une enquête de séroprévalence du VIH auprès d'homosexuels masculins fréquentant des établissements de convivialité gays parisiens (étude de faisabilité PREVAGAY). Elle s'est déroulée du 28 avril au 5 juin 2009 et les analyses virologiques pour les hépatites virales B et C sont en cours.

Cette année a également permis au CNR localisé à l'hôpital Henri Mondor d'évaluer de nouvelles techniques (biologie moléculaire, recherche sérologique d'anticorps à partir de papiers buvards, tests rapides de détection de l'antigène HBs et des anticorps anti-VHC totaux). Ces technologies sont essentielles à la réalisation des études en cours (étude de faisabilité PREVAGAY) ou devront être implémentées dans des études futures (enquête COQUELICOT de prévalence du VHC, du VHB et du VIH chez les usagers de drogues, dont le projet a été déposé à l'appel d'offres de l'ANRS de mois de mars 2010). Il est cependant important de noter que la charge de travail spécifique du CNR localisé dans le service de Bactériologie-Virologie-Hygiène de l'hôpital Henri Mondor est de plus en plus importante et dépasse aujourd'hui ses capacités techniques (un Ingénieur d'Etude rémunéré par le CNR, un technicien AP-HP) et ne pourra être assurée par redéploiement interne dans un contexte de restrictions massives des emplois de techniciens au sein de l'AP-HP. Dans ces conditions, le CNR localisé à l'hôpital Henri Mondor souhaite bénéficier d'une rallonge budgétaire permettant l'emploi d'un technicien plein temps supplémentaire dédié aux activités du CNR, par augmentation du budget global du CNR et/ou redistribution entre les composantes, en fonction de l'évaluation des activités par le Comité. C'est la condition indispensable à la réalisation de l'ensemble des travaux qui ont été confiés au CNR de l'hôpital Henri Mondor par l'InVS.

Cette année a également vu la poursuite des activités du laboratoire associé en charge des hépatites virales en transfusion sanguine, tandis que le laboratoire associé consacré à la recherche et au développement a poursuivi et complété les études en cours. Le laboratoire associé en charge de l'hépatite delta a mis en place et réalisé un contrôle de qualité national sur les paramètres virologiques du diagnostic de l'hépatite delta : sérologiques (IgG et IgM) et moléculaires (quantification de l'ARN delta).

La suite de ce document présente un résumé intégré de l'ensemble des activités du CNR, suivi des rapports d'activité de chacune de ses composantes.

II

RESUME DES ACTIVITES

**CNR DES HEPATITES VIRALES B, C ET DELTA
ANNEE 2009**

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 Pawlotsky, avec le concours du Dr Stéphane Chevaliez. Le CNR comprend également 3 laboratoires associés, localisés respectivement à l'Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris (Hépatites virales en transfusion sanguine ; responsable : Dr. Syria Laperche), à l'hôpital Paul Brousse, Villejuif (Recherche et développement ; responsable : Dr. Valérie Thiers), et à l'hôpital Avicenne, Bobigny (Virus de l'hépatite delta ; responsables : Pr. Paul Dény et Dr. 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 ses 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).

La quatrième année de fonctionnement 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 a en particulier vu la mise en place de la surveillance nationale de l'infection chronique par le VHB à partir des pôles de référence et réseaux hépatites. Cette étude comporte un versant rétrospectif concernant les patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B au cours de l'année 2008, qui a impliqué 29 des 37 pôles de référence et réseaux hépatites, avec un total de 1065 patients inclus ; un versant prospectif à partir de 2009 qui implique 32 des 37 sites et a permis l'inclusion à ce jour de 594 patients. Par ailleurs, l'enquête PREVAGAY est une enquête de séroprévalence du VIH auprès d'homosexuels masculins fréquentant des établissements de convivialité gays parisiens (étude de faisabilité PREVAGAY). Elle s'est déroulée du 28 avril au 5 juin 2009 et les analyses virologiques pour les hépatites virales B et C sont en cours. Cette année a également permis au CNR localisé à l'hôpital Henri Mondor d'évaluer de nouvelles techniques (biologie moléculaire, recherche sérologique d'anticorps à partir de papiers buvards, tests rapides de détection de l'antigène HBs et des anticorps anti-VHC totaux). Ces technologies sont essentielles à la réalisation des

études en cours (étude de faisabilité PREVAGAY) ou devront être implémentées dans des études futures (enquête COQUELICOT de prévalence du VHC, du VHB et du VIH chez les usagers de drogues, dont le projet a été déposé à l'appel d'offres de l'ANRS du mois de mars 2010).

Les activités d'expertise et de surveillance du laboratoire associé consacré aux hépatites virales en transfusion sanguine se sont poursuivies, en particulier l'évaluation de la sensibilité analytique de tests rapides pour le dépistage des anticorps anti-VHC ainsi qu'une étude de la capacité de nombreuses trousse commerciales à détecter des 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 en charge de la recherche et du développement a également poursuivi ses études en cours en particulier l'étude de la diversité des génotypes du VHB et VHC des individus séropositifs et répliquants de l'enquête de veille épidémiologique menée par l'InVS auprès des assurés sociaux sur la période 2003-2004. De plus, la caractérisation moléculaire des souches de VHB isolées chez les patients ayant une hépatite aiguë B symptomatique (maladie à déclaration obligatoire auprès de l'InVS) a montré qu'elles ne différaient pas des souches isolées chez des individus atteints d'hépatite chronique B.

Le laboratoire associé du virus de l'hépatite delta a poursuivi les études en cours, en particulier la caractérisation moléculaire d'isolats de VHB et de VHD provenant de différentes régions du monde, avec la mise en évidence d'une souche recombinante du VHB (D/E) en circulation au Niger et dans la région du Sahara.

CNR des hépatites virales B, C et delta

Le CNR des Hépatites Virales B, C et delta du laboratoire de Virologie et de l'INSERM U955 de l'hôpital Henri Mondor a assuré l'évaluation technique et la mise en place de très nombreuses techniques diagnostiques et de typage viral (biologie moléculaire, recherche sérologique d'anticorps à partir de papiers buvards, tests rapides de détection de l'antigène HBs et des anticorps anti-VHC totaux). Ces

techniques concernent la détection et la quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC par les techniques de PCR en temps réel.

La capacité de différentes trousse commerciales d'identifier correctement le sous-type de plus de 500 souches de VHC de génotype 1, étape essentielle au traitement de ces malades par les nouveaux antiviraux en développement, a également été étudiée. Ces travaux ont donné lieu à des publications dans des revues internationales à Comité de Lecture. Le CNR a mis en place une plateforme complète 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. Le CNR des hépatites B, C et delta met à la disposition des cliniciens et des laboratoires qui en font la demande l'ensemble de ces outils. Dans ce cadre, une étude rétrospective réalisée à partir d'échantillons sanguins (52 au total) en provenance du laboratoire d'analyses médicales Pasteur-Cerba (Docteur Jean-Dominique Poveda) a été réalisée. 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), ce qui suggère l'existence éventuelle de nouveaux sous-types de VHC de génotype 2 et 5 qui restent à caractériser.

Le CNR a activement participé à la surveillance des patients atteints d'hépatite chronique B nouvellement pris en charge par les pôles de référence et réseaux hépatites. En ce qui concerne le volet virologique, 530 échantillons ont été collectés par les différents laboratoires de virologie participant à cet observatoire, dont 331 ont été analysés par le CNR à ce jour. La majorité des patients (63,4%) étaient des porteurs inactifs du VHB avec une charge virale inférieure à $3,30 \text{ Log}_{10}$ ($<2000 \text{ UI/mL}$). Les génotypes A et D étaient les plus fréquents. La médiane du titre en AgHBs était de $3,50 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$. Une corrélation positive a été mise en évidence entre le niveau de la charge virale au moment de la prise en charge et le titre en AgHBs et ce, quel que soit le statut AgHBe. En ce qui concerne la prévalence de la résistance primaire, un seul des 331 patients testés était infecté par un virus portant des substitutions amino acidiques associées à la résistance à la lamivudine et à la telbivudine et à une diminution de sensibilité à l'entécavir. Ce patient avait été préalablement exposé à un traitement par lamivudine.

L'investigation des cas groupés de transmission du VHB et du VHC ou des cas isolés de transmission nosocomiale de ces virus a donné lieu à plusieurs études.

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. Un certain nombre de travaux d'investigation ont été réalisés au sein du CNR dans cette thématique. Le premier travail a porté sur l'étude de l'incidence de la sélection de substitutions amino acidiques associées à la résistance au cours du traitement combiné de l'hépatite chronique B par la lamivudine et l'adefovir. La combinaison thérapeutique de *novo* par lamivudine et adefovir est associée à une forte proportion d'ADN indétectable et une incidence faible d'échappement virologique à 4 ans. Elle représente une bonne alternative thérapeutique pour les pays où les molécules puissantes, dotées d'une barrière à la résistance élevée, administrée en monothérapie (entecavir et tenofovir) ne sont pas disponibles. Dans une autre étude, nous avons utilisé les techniques de séquençage ultra-sensible par pyroséquançage 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 480 000 séquences (111 Mb) ont été générées à partir de 119 échantillons sériés prélevés au cours du traitement (25 à 56 mois) chez 7 malades. Elle a permis de montrer que chez tous ces patients, des substitutions connues pour conférer la résistance du VHB à l'adefovir, mais aussi à la lamivudine, à la telbivudine et à l'entécavir, étaient présentes sous la forme de populations minoritaires chez tous les patients.

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 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. L'AC33 est multidisciplinaire et associe cliniciens, virologues, immunologistes, chercheurs fondamentaux, biostatisticiens, pharmacologues, méthodologistes et épidémiologistes. Les travaux de l'AC33 s'appuieront sur la constitution, sous la responsabilité de l'ANRS, d'une grande cohorte nationale « Hépatites Virales » avec l'ensemble des acteurs cliniciens du champ de recherche. La cohorte 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.

Laboratoire associé : Hépatites virales en transfusion sanguine

Le Laboratoire associé en charge des hépatites virales en transfusion sanguine a réalisé des activités d'expertise dans le domaine de la sécurité transfusionnelle. Dans ce cadre, la capacité de différentes trousse commerciales de détecter les mutants de la région hydrophile majeure a été réalisée. Cette étude menée sur un grand nombre de mutants de l'AgHBs a permis de montrer un niveau de sensibilité analytique excellent au regard des exigences européennes pour le marquage CE, mais néanmoins des disparités des différentes trousse quant à la détection de ces mutants. Le CNR a élaboré différents panels d'échantillons destinés à la réalisation de contrôles de qualité et a coordonné deux études multicentriques françaises portant sur la détection-quantification de l'ARN du VHC sous l'égide de l'ANRS. Un panel de 25 échantillons incluant des échantillons séronégatifs, positifs pour l'AgHBs à des niveaux variables, séropositifs pour le VHC, séropositifs pour le VIH et des échantillons positifs pour plusieurs virus à la fois ont été également distribués dans 5 pays d'Afrique francophone. Au cours de cette étude, un défaut de sensibilité des tests rapides pour la détection de l'AgHBs a été mis en évidence. Cette opération sera reconduite en 2010 avec un élargissement à d'autres pays Africains.

Laboratoire associé : Recherche et développement

Le laboratoire associé en charge de la recherche et du développement poursuit l'étude de la diversité des génotypes du VHB et VHC des individus séropositifs et répliquants de l'enquête de veille épidémiologique menée par l'InVS auprès des assurés sociaux sur la période 2003-2004. En ce qui concerne le VHC, la détermination du génotype chez 143 individus a montré une circulation par ordre décroissant de fréquence de souches de génotype 1, 2, 3, 4 et 5. Une grande diversité des souches des génotypes 1, 2 et 4 a été observée. Des nouveaux sous-types de génotype 2 ont été identifiés, dont la caractérisation est en cours. En ce qui

concerne le VHB, la détermination des génotypes chez 64 individus, en majorité porteurs de l'AgHBs avec un ADN du VHB $<10^4$ UI/mL, a montré une circulation par ordre décroissant de fréquence des génotypes A, D et E. Les souches de génotypes B et C étaient minoritaires. La caractérisation moléculaire des souches de VHB isolées dans le cadre de l'observatoire des hépatites aiguës B a montré qu'elles ne différaient pas des souches isolées chez les individus atteints d'hépatite chronique B. En effet, la distribution des génotypes était par ordre décroissant de fréquence les génotypes A, D et E alors que les génotypes C, F, B et G étaient minoritaires.

Laboratoire associé : Virus de l'hépatite delta

Le laboratoire associé pour l'infection par le VHD a assuré la caractérisation de 100 nouvelles souches de VHD. L'origine géographique des patients chez qui ces nouvelles infections ont été diagnostiquées était : Afrique, 54% ; Europe de l'Est, 21% ; Europe de l'Ouest, 14% ; Asie, 8%. L'étude des facteurs de risque de transmission de l'infection par le VHD à partir de sujets nés et vivants en France est en cours. Le laboratoire a débuté plusieurs collaborations internationales en vue de caractériser la diversité génétique du VHD à travers le monde : Angleterre, Burundi, Niger, Cameroun, Mauritanie, Syrie, Argentine et Algérie. D'autre part, dans le cadre de ces recherches, une nouvelle souche recombinante HBV D/E hautement prévalente au Niger et en Mauritanie a été caractérisée. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans une revue internationale à comité de lecture.

III

**CNR DES HEPATITES VIRALES B, C
ET DELTA**

**Laboratoire de Virologie et INSERM U955
Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est**

1- STRUCTURE DU CNR

Le CNR des hépatites B, C et delta est localisé au sein du laboratoire de virologie hospitalo-universitaire de l'hôpital Henri Mondor de Créteil et utilise l'équipement et les compétences de ce laboratoire et celles de l'équipe INSERM qui lui est associée. Il est dirigé par le Professeur Jean-Michel PAWLITSKY, assisté du Docteur Stéphane CHEVALIEZ.

Le personnel, l'expertise, et les équipements du laboratoire de virologie hospitalo-universitaire et de l'équipe INSERM sont mis à la disposition du CNR pour assurer l'ensemble des missions et des objectifs qui lui ont été fixés. L'expertise et le personnel de l'Unité de Contrôle de l'Epidémiologie et de Prévention de l'Infection (Docteur Emmanuelle GIROU, Praticien hygiéniste, Docteur Philippe LESPRIT, infectiologue, et un Assistant Hospitalier Universitaire) et du Service de Santé Publique (Docteur Françoise ROUDOT-THORAVAL, épidémiologiste et statisticienne) de l'hôpital Henri Mondor sont également associés au travail du CNR.

L'expertise du laboratoire, la disponibilité d'un plateau technique de sérologie et de biologie moléculaire très automatisé, l'ouverture du laboratoire 24 heures sur 24, 7 jours sur 7 et l'organisation logistique du laboratoire, parfaitement fonctionnelle dans le cadre de l'urgence virologique et de la qualification des greffes d'organes (acheminement des prélèvements, rapidité d'exécution, organisation du rendu des résultats) permettent au CNR de disposer d'une large compétence et d'une réactivité adaptées aux missions de surveillance, d'évaluation et de veille.

1.1- Personnels dévolus

Le personnel du laboratoire de virologie hospitalo-universitaire de l'hôpital Henri Mondor comprend :

- Personnel médical :

- . 1 Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 1 Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 2 Praticiens Hospitaliers,
- . 1 Praticien Attaché,
- . 1 Moniteur d'Etudes Biologiques.

- Personnel non médical :

- . 1 ingénieur d'études du CNR,
- . 1 Cadre Médico-Technique,
- . 12,4 ETP techniciens AP-HP, dont 1 ETP dédié aux activités du CNR
- . 1 secrétaire.

L'Unité de Contrôle de l'Epidémiologie et de Prévention de l'Infection de l'hôpital Henri Mondor comprend :

- . 1 Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 1 Praticien Hospitalier,
- . 1 Assistant Hospitalier Universitaire,
- . 3 techniciens bio-hygiénistes,
- . 3 infirmières hygiénistes.

Les personnels suivants sont affectés au fonctionnement du CNR :

- . 0,15 Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 0,40 Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 0,40 Praticien Hospitalier,
- . 1,00 Ingénieur d'Etudes,
- . 0,30 Moniteur d'Etudes Biologiques,
- . 1,00 technicien.

1.2- Démarche qualité du CNR

Le laboratoire de virologie de l'hôpital Henri Mondor a mis en place le GBEA et l'hôpital a été certifié. L'ensemble des procédures utilisées pour les activités du CNR des hépatites B, C et delta a fait l'objet d'une rédaction de type GBEA.

Par ailleurs, les différents laboratoires de Biologie, en particulier le laboratoire de Virologie de l'hôpital Henri Mondor, se sont engagés dans la démarche d'accréditation conforme à l'application du rapport Ballereau, afin de garantir la qualité des examens réalisés dans le cadre de l'activité de qualification des donneurs d'organes de tissus et de cellules destinés à la greffe, activité à fort potentiel médico-légal, et dans celui du CNR des Hépatites Virales B, C et Delta dans ses missions d'expertise. Un état des lieux a été réalisé afin d'identifier les écarts à la norme et de

définir un plan d'action, ainsi que les moyens humains et financiers nécessaires. Un audit des secteurs impliqués dans le projet d'accréditation a été réalisé par la société Eupraxie Conseil de juillet à octobre 2008 et a fait l'objet d'un rapport détaillé. La création d'un comité de pilotage (CoPil) du projet a été préconisée, tandis que les besoins en formation, les besoins financiers et les besoins humains étaient répertoriés. Le CoPil a été mis en place à l'échelon du Pôle de Biologie de l'hôpital et des groupes de travail dans les domaines suivants ont été ainsi créés : pré-analytique, analytique, post-analytique et qualité. Les travaux en ce qui concerne le pré-analytique sont d'ores-et-déjà bien avancés et les recommandations émanant de la SFBC (Société Française de Biologie Clinique) auxquels le laboratoire de Virologie a activement participé par l'intermédiaire du Dr. Dominique Challine vont être rendues publiques très prochainement. La mise en place de l'accréditation du CNR au sein du laboratoire de Virologie se fera dans le cadre du schéma directeur du Pôle de Biologie, en cours de mise en place en collaboration avec la société ELIX.

1.3- Locaux et équipements

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 disponibles. 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.

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),
- . 1 automate intégré pour microplaques BEP 2000 (Dade-Behring).

- 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 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 LIGHTCYCLER 1.0 (Roche),
- . 1 thermocycler pour PCR en temps réel ABI7300 (Applied Biosystems),
- . 1 automate pour PCR compétitive COBAS AMPLICOR (Roche),
- . 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.

2- RESUME DES ACTIVITES DE L'ANNEE

2.1- Capacités techniques du CNR

Les techniques disponibles au sein du CNR des Hépatites B, C et delta sont nombreuses et permettent de couvrir l'ensemble des demandes émanant des services cliniques et des laboratoires de biologie de France ou de l'étranger.

Ces techniques concernent le diagnostic et le suivi des hépatites virales B, C et delta et regroupent d'une part des techniques sérologiques automatisées de type ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) permettant la détection et/ou la quantification des anticorps ou des antigènes dans les fluides biologiques tels que sérums ou plasmas, d'autre part des techniques de biologie moléculaire (amplification de la cible ou du signal, hybridation inverse et séquençage des produits d'amplification) permettant la détection et la quantification des génomes viraux, la détermination des génotypes, l'étude des mutations de résistance associées à la chimiothérapie antivirale et l'ensemble des études épidémiologiques, de surveillance et de transmission des virus d'hépatites.

- Liste des techniques disponibles au laboratoire au 1^{er} janvier 2009

. Sérologies virales automatisées pour la détection et la quantification de l'antigène HBs, pour 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,

. Techniques de détection et de quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC par PCR classique, techniques des ADN branchés et PCR en temps réel automatisée et artisanale, ainsi qu'une technique de détection et de quantification de l'ARN du VHD par PCR en temps réel artisanale utilisant le SYBR Green,

. 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),

. Détermination du génotype du VHB par séquençage direct de la région codant l'AgHBs et/ou la région PréS ou par technique d'hybridation inverse (Inno-LiPA HBV Genotyping assay),

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

. Etude de la séquence des régions hypervariables HVR1 et de la glycoprotéine E1 du VHC, destinée aux études de transmission virale,

. Détection des mutations de résistance du VHB associées à la chimiothérapie antivirale par séquençage direct du domaine transcriptase inverse de l'ADN polymérase, hybridation inverse (Ino-LiPA HBV DR v3) ; caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB ; et technique de détection des mutations de résistance d'ultra deep-sequencing ou pyroséquençage haut débit,

. Détection des mutations de résistance du VHC aux inhibiteurs directs par séquençage direct des protéines NS3 (protéase), NS5B (polymérase) et NS5A ; caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB ; et technique de détection des mutations de résistance d'ultra deep-sequencing ou pyroséquençage haut débit,

. 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, appliquée 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 implantées au cours de l'année 2009

. Technique de quantification de l'antigène HBs par chimioluminescence,
. Mise en place d'une technique de PCR ultra-sensible fondée sur l'ultra-deep sequencing (pyroséquençage) permettant la détection très précoce des variants du

VHB ou du VHC résistants à la chimiothérapie antivirale et développement de deux logiciels d'analyse des résultats (Pyromute[®] et Pyrotree[®], déposé à l'Office de la Propriété Intellectuelle),

- . Technique de RT-qPCR en temps réel pour la détection et la quantification de l'ARN du virus de l'hépatite delta,

- . Technique de recherche des génomes viraux à partir de sang total recueilli sur papier buvard,

- . Technique de détection des polymorphismes génétiques du gène codant l'IL28B, prédicteurs de la sensibilité de l'hôte à l'interféron alpha, sur sérum et sang total par PCR en temps réel.

- Techniques en développement

- . Technique de recherche de l'antigène de capsid du VHC à partir de sang total recueilli sur papier buvard,

- . Développement d'une base de données des mutations de résistance du VHB aux antiviraux.

- . Développement d'une technique de PCR en temps réel pour la détection de l'ARN du virus de l'hépatite E (VHE).

2.2- Activités de développement, de standardisation et d'évaluation des techniques 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'amplification du signal par les ADN branchés, 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/ou la quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC par PCR en

temps réel, ainsi que des techniques de typage des génomes viraux par hybridation inverse, séquençage, pyroséquençage ou PCR en temps réel. Ces techniques visent à identifier le génotype du VHC ou des substitutions amino-acidiques conférant la résistance du VHB ou du VHC aux analogues nucléos(t)idiques. Ces travaux ont donné lieu à des publications acceptées, soumises ou en préparation.

Les performances intrinsèques de la plate-forme de PCR en temps réel Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan 48 (CAP/CTM, Roche Molecular Systems) de seconde génération (v2.0) ont été évaluées pour la quantification de l'ADN du VHB dans un contexte de pratique clinique (Figure 1). Les résultats ont montré des performances intrinsèques satisfaisantes en termes de spécificité (99%, intervalle de confiance à 95% : 94,7%-100% et 94,4%-100%, respectivement pour deux cohortes de malades, l'une faite de sujets séronégatifs, l'autre de sujets ayant eu une hépatite B ancienne guérie), de précision et de reproductibilité, avec respectivement des coefficients de variation de respectivement 1,16% à 3,07% et 0,82% à 2,95%. La quantification de l'ADN du VHB était linéaire sur l'ensemble de l'intervalle de quantification (1,3 Log₁₀ UI/mL à 8,2 Log₁₀ UI/mL) et ce, indépendamment du génotype. Néanmoins, une sous-quantification modérée de l'ADN du VHB a été observée pour des valeurs d'ADN du VHB supérieures à 5 Log₁₀ UI/mL, sans impact majeur sur la prise en charge clinique et thérapeutique (Chevaliez et al., article soumis).

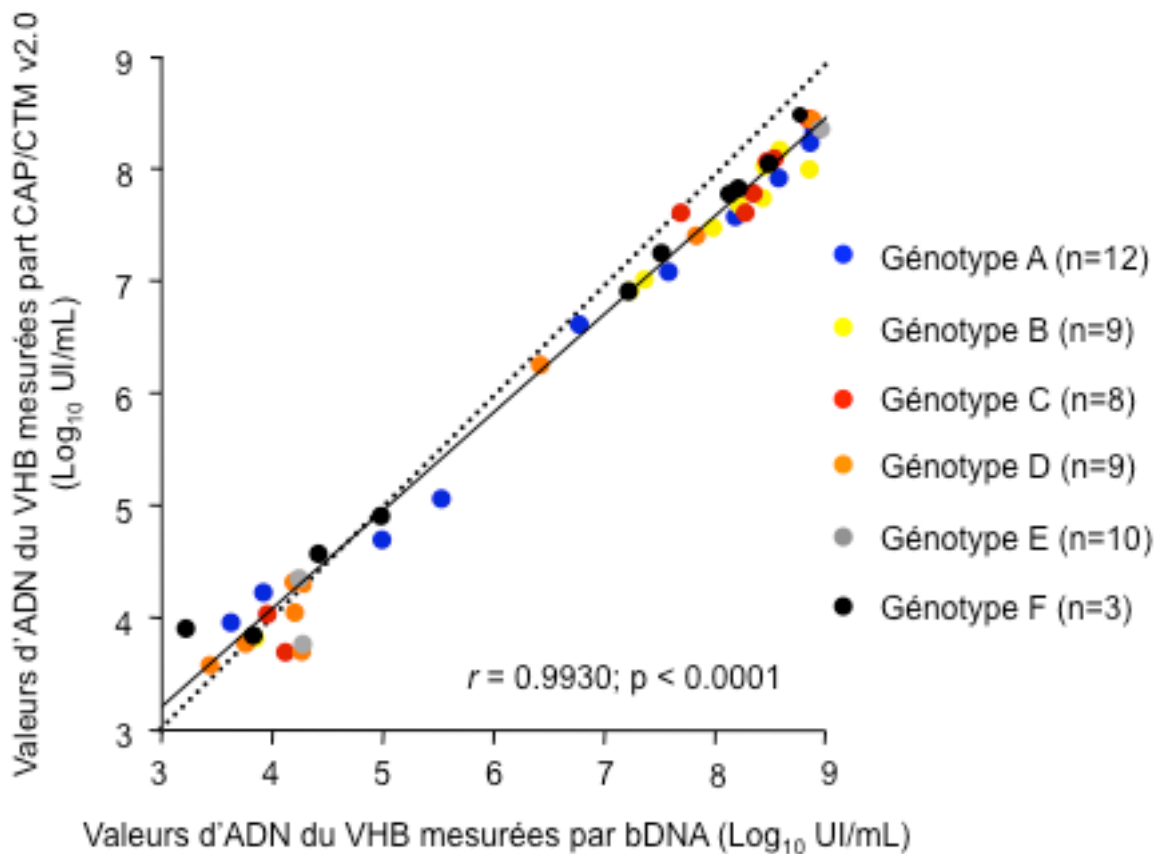


Figure 1 : Corrélation des valeurs d'ADN du VHB mesurées dans 51 échantillons plasmatiques par la plate-forme de PCR en temps réel CAP/CTM v2.0 (Roche) et le bDNA de troisième génération.

Nous avons également rapporté deux cas de malades infectés par un VHC de génotype 4 pour lesquels l'ARN du VHC était indétectable par la technique CAP/CTM de Roche, alors que la charge virale était trouvée élevée par une autre technique de PCR en temps réel (*m2000*, Abbott) et par la technique des ADN branchés de 3^{ème} génération (Chevaliez et al., *Hepatology* 2009 ; 49(4): 1397-8). L'absence de détection était liée à la présence de deux substitutions nucléotidiques au sein de la séquence nucléotidique de la région 5' non-codante (NC), région cible de la sonde Taqman et/ou des amorces, respectivement en positions 145 et 165. Afin de confirmer le rôle de ces deux polymorphismes nucléotidiques dans l'absence de détection de l'ARN du VHC par la plate-forme CAP/CTM, des ARN synthétiques obtenus par transcription *in vitro* de plasmides comportant une ou les deux substitutions nucléotidiques ont été quantifiés à l'aide des trois méthodes et les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus à partir de l'ARN synthétique ne

contenant pas de substitutions. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 1. Chacune des substitutions était responsable d'une sous-quantification d'environ 2 Log₁₀ par la plate-forme CAP/CTM par rapport aux valeurs obtenues avec les deux autres techniques. En présence des deux substitutions aux positions 145 et 165, les valeurs d'ARN VHC étaient élevées avec la plate-forme *m2000_{RT}* et le bDNA 3.0, mais l'ARN était indétectable (<1,08 Log₁₀) avec la plate-forme CTM48 (Chevaliez et al., Hepatology 2009 ; 50(5): 1681).

Tableau 1 : Quantification des ARN synthétiques transcrits in vitro à partir de plasmides contenant ou pas une ou deux substitutions nucléotidiques (positions 145 et/ou 165) à l'aide de différentes techniques de PCR en temps réel (CTM48 et *m2000_{RT}*) et bDNA (Versant 3.0).

Séquence 5'NC	Valeurs d'ARN du VHC (Log ₁₀ UI/mL)		
	Trousses de PCR en temps réel		bDNA assay
	CTM48	<i>m2000_{RT}</i>	Versant 3.0
Sauvage (G145 et A165)	5.73± 0.13	6.05± 0.10	6.43± 0.01
Simple mutant (G145A et A165)	4.02± 0.13	6.00± 0.11	6.69± 0.02
Simple mutant (G145 and A165T)	4.28± 0.35	5.88± 0.20	6.30± 0.02
Double mutant (G145A and A165T)	<1.08*	5.95± 0.25	6.60± 0.18

*Cible non détectée

Les nouveaux inhibiteurs spécifiques du VHC (inhibiteurs de protéases et de la réplication virale) peuvent avoir une activité antivirale différente vis-à-vis des différents sous-types de VHC de génotype 1. La barrière génétique à la résistance et les profils de résistance observés varient également en fonction des différents sous-types du VHC de génotype 1. La détermination précise du sous-type du génotype 1 est donc indispensable dans le contexte du développement et de l'optimisation des nouveaux traitements de l'hépatite C. Cinq cents dix-huit patients infectés par un VHC de génotype 1 inclus dans un essai thérapeutique multicentrique français ont été étudiés. L'analyse phylogénique d'une portion de la région codant la protéine non structurale NS5B (méthode de référence) a permis de montrer que 237 d'entre eux étaient infectés par un VHC de sous-type 1a et 263 par un VHC de sous-type 1b. Les

18 patients restant étaient infectés par un autre sous-type de génotype 1 ou par un autre génotype et ont été exclus des analyses. La capacité des méthodes commerciales suivantes d'identifier correctement le sous-type des souches de VHC de génotype 1 a été évaluée : (a) analyse d'une portion de la séquence nucléotidique de la région 5'NC (Trugene HCV 5'NC Assay, Siemens) ; (b) hybridation inverse avec la bandelette INNO-LiPA de première génération utilisant des sondes oligonucléotidiques ciblant la région 5'NC (LiPA HCV 1.0, Innogenetics) ; (c) bandelette INNO-LiPA de deuxième génération utilisant des sondes ciblant les régions 5'NC et codant la protéine de capsid ; (d) PCR en temps réel utilisant des amorces spécifiques du génotype et du sous-type ciblant les régions 5'NC et NS5B (Abbott). Les performances de chaque trousse dans la différenciation des souches de sous-type 1a ou 1b sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Performances de différentes trouses commerciales pour la détermination du sous-type d'une cohorte de 500 patients infectés par un VHC de sous-type 1a ou 1b.

	Analyse phylogénique de la région 5'NC (Trugene)	1 ^{ère} génération Line Probe assay (LiPA 1.0)	2 ^{ème} génération de Line Probe assay (LiPA 2.0)	PCR en temps réel (Abbott)
1a (n=237)	77,6% (n=184)	70,5% (n=167)	97,5% (n=231)	93,2% (n=220)
1b (n=263)	90,5% (n=238)	91,3% (n=240)	96,2% (n=253)	88,6% (n=233)

En conclusion, les méthodes fondées sur la seule étude de la région 5'NC doivent être proscrites pour l'identification des sous-types de VHC de génotype 1. Les méthodes ciblant au moins deux régions du génome viral doivent être préférées. La méthode d'hybridation inverse INNO-LiPA de deuxième génération est celle qui permet la meilleure différenciation entre les souches de sous-type 1a et 1b (Chevaliez et al, PLoS One. 2009; 4(12): e8209).

Des tests moléculaires standardisés ont par ailleurs été évalués sur l'Auto-LiPA 48 disponible au laboratoire :

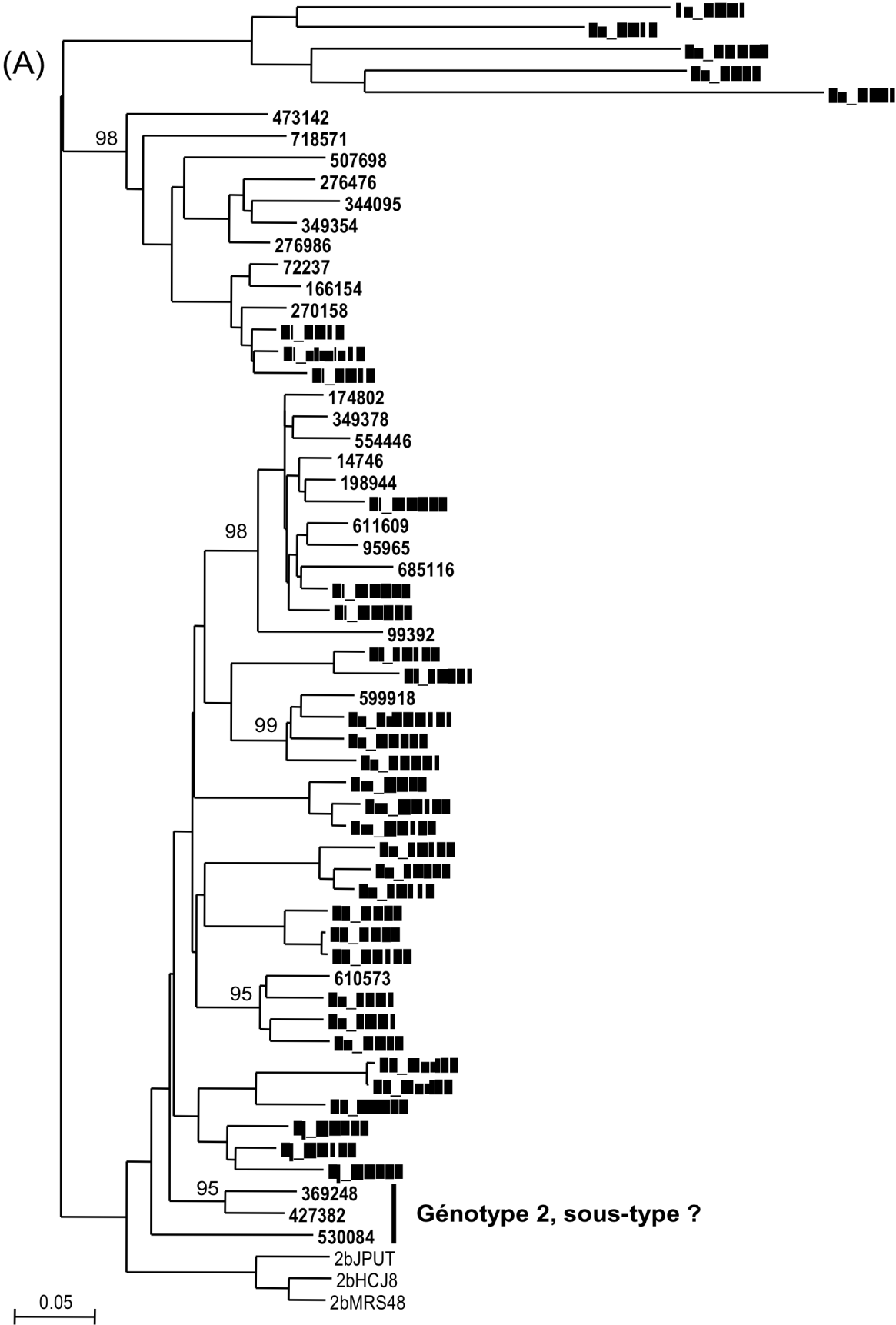
- . Technique d'hybridation inverse pour l'identification des mutants résistants à la lamivudine, à l'adéfovir et à l'entécavir (Innogenetics).

2.3- Caractérisation virologique des échantillons et typage moléculaire pour la surveillance de l'épidémiologie des types viraux et de l'émergence 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. Le CNR des hépatites B, C et delta met à la disposition des cliniciens et des laboratoires qui en font la demande l'ensemble de ces outils.

Dans ce cadre, 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, 52 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 du Nord (Maroc, Maghreb, Tunisie), d'Afrique. La détermination du génotype et du sous-type a été réalisée par séquençage direct de deux régions, respectivement les gènes codant les protéines NS5B et E1, suivi d'une analyse phylogénique. Vingt-quatre souches (45,1%) étaient de génotype 2. La majorité des souches, respectivement 11 sur 24 (45,8%) et 7 sur 24 (29,2%), étaient de sous-type 2i et 2ii. 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), qui peuvent faire

évoquer l'existence éventuelle d'un nouveau sous-type de VHC de génotype 2 et 5 qu'ils restent à caractériser (Figures 1A et 1B).



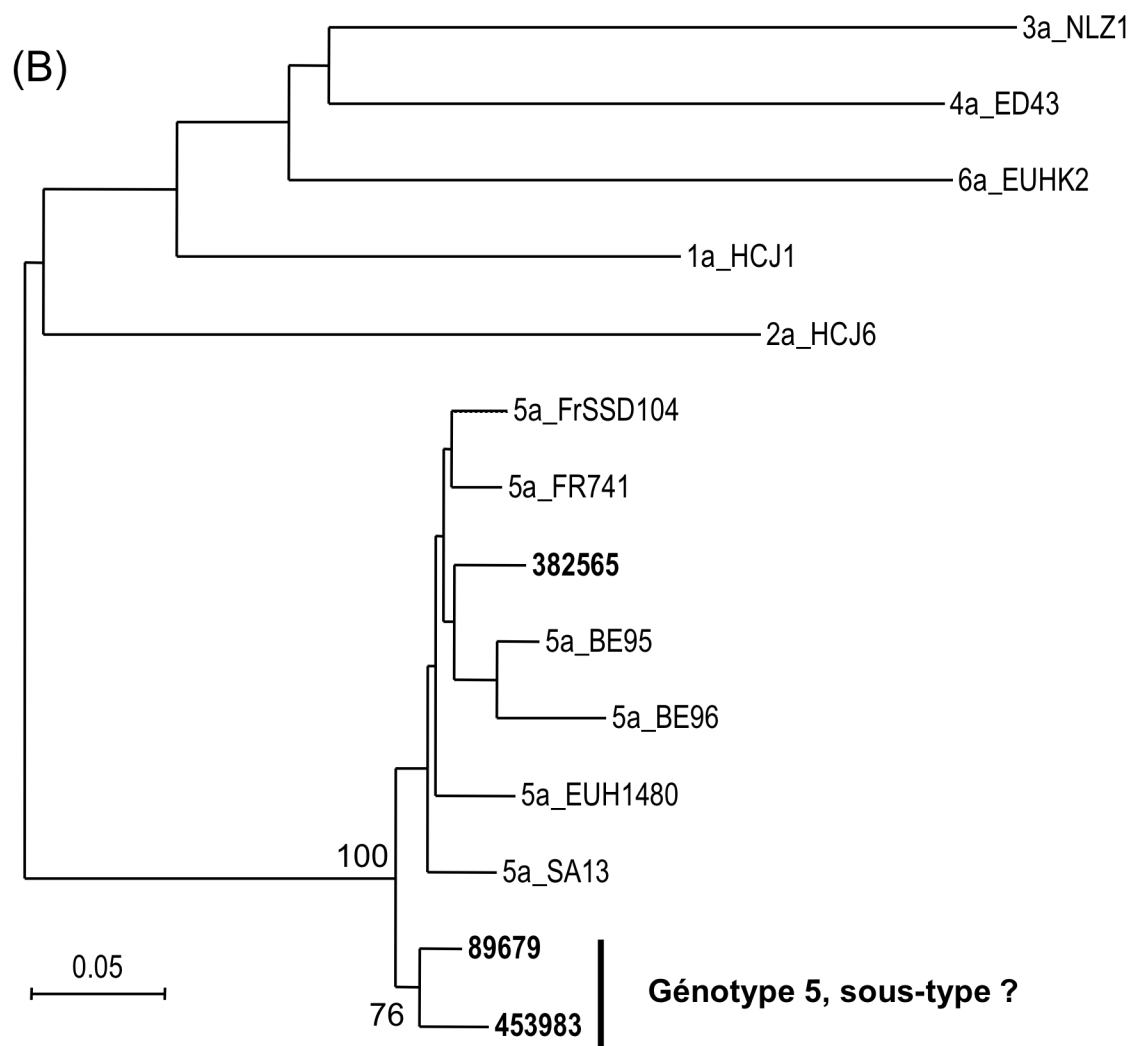


Figure 2 : Détermination du sous-type du VHC pour les souches de génotype 2 (A) et de génotype 5 (B) par analyse phylogénique d'une portion de la région NS5B (286 nucléotides). Les chiffres en gras correspondent aux valeurs de ré-échantillonnages après 1000 réplicats.

En réponse à des demandes spécifiques de services cliniques ou de laboratoires de biologie, le CNR des hépatites B, C et delta a étudié la transmission sexuelle de l'hépatite B à virus sauvage (AgHBe positif) à partir d'un partenaire sexuel atteint d'hépatite chronique à virus mutant (AgHBe négatif). En effet, Mme G. a été hospitalisée pour une hépatite aiguë B sub-fulminante avec un TP à 50% et un facteur II inférieur à 30%. L'activité sérique des transaminases était supérieure à 80N pour les ALAT et à 40N pour les ASAT. Son bilan virologique était le suivant : AgHBs positif, anticorps anti-HBc totaux et IgM positifs, anticorps anti-HBs positifs à 321

mUI/mL, AgHBe positif et ADN du VHB à 7,7 Log₁₀ UI/mL. L'interrogatoire de la patiente mentionnait des rapports sexuels non protégés avec un partenaire porteur d'une hépatite chronique B. Le bilan de son hépatite chronique a montré une hépatite B inactive à virus mutant préC-C (ADN du VHB aux environs de 2-3 Log₁₀ UI/mL, anticorps anti-HBe positifs). Une étude génétique et phylogénique des virus isolés chez les deux patients a été réalisée dont l'objectif était de caractériser les populations virales à AgHBe positif et négatif. Différentes régions du génome viral ont été étudiées : (i) la région préS-S codant les trois glycoprotéines de surface et contenant la région hydrophile majeure (MHR), au sein de laquelle on trouve le « déterminant a », un des principaux épitopes de neutralisation du VHB ; (ii) La région préC-C codant l'AgHBe et la protéine de capsid (AgHBc). La comparaison des séquences amino acide du « déterminant a » de l'AgHBs confirmait que les deux individus étaient infectés par la même souche de VHB. L'analyse après séquençage direct de la région codant l'AgHBe a permis de mettre en évidence des substitutions nucléotidiques en position 1762-1764, polymorphismes le plus fréquemment décrit dans la littérature comme responsable d'une diminution significative de la synthèse de l'AgHBe. Ce résultat était en accord avec l'absence de détection de l'AgHBe chez le sujet atteint d'hépatite chronique B. L'étude de la quasi-espèce virale du gène codant l'AgHBe après clonage dans un vecteur d'expression et la sélection de 20 à 30 clones sont en cours d'analyse.

Le CNR a activement participé à deux enquêtes : l'enquête PREVAGAY et la surveillance des patients atteints d'hépatite chronique B nouvellement pris en charge par les pôles de référence et réseaux hépatites.

L'enquête PREVAGAY est une enquête de séroprévalence du VIH auprès d'homosexuels masculins fréquentant des établissements de convivialité gays parisiens. Les résultats finaux de l'enquête intégreront l'incidence du VIH et la prévalence des hépatites B et C. Plus de 1500 hommes ont été sollicités dans 14 établissements commerciaux de convivialité gay parisiens (bars, saunas, backrooms). Au total, 917 sujets ont accepté de participer à l'étude, soit un taux d'acceptation de 58%. Ne seront présentées que les données biologiques et déclaratives concernant la prévalence des hépatites B et C. Parmi les 885 sujets inclus pour l'étude de la prévalence du VHC, 9 étaient séropositifs pour le VHC (1%), dont la moitié étaient co-infectés par le VIH et le VHC. Cette prévalence était

légèrement supérieure à celle estimée dans la population masculine au cours de la dernière enquête de séroprévalence réalisée en 2003 auprès de plus de 15 000 personnes inscrites au régime général de la Sécurité Sociale. L'analyse n'a pas montré de différence entre les sujets séropositifs et séronégatifs pour le VHC en termes de données socio-démographiques (lieu de naissance, lieu de résidence, niveau d'étude), de comportements sexuels ou de mode de vie (consommation d'alcool et autres produits), excepté la consommation de cocaïne dans l'année. En ce qui concerne la prévalence de l'hépatite B, 12 des 876 sujets inclus étaient porteurs de l'AgHBs, soit une prévalence de 1%. Ce chiffre était du même ordre que la prévalence estimée dans la population masculine au cours de la dernière enquête nationale de prévalence du VHB (1,10%). Sept des 12 patients porteurs de l'AgHBs étaient également infectés par le VIH. L'étude épidémiologique moléculaire à partir du sang déposé sur papier buvard est en cours et les résultats seront communiqués très prochainement.

Au cours de la période 2008-2009 (données partielles pour l'année 2009), un total de 1167 patients (67% d'hommes, 24% nés dans un pays de faible endémicité et 76% dans un pays de forte endémicité) ont été inclus dans l'enquête de surveillance de l'hépatite chronique B réalisée au sein des pôles de référence et réseaux hépatites. La circonstance de découverte du portage de l'AgHBs était pour 69% des individus un bilan de santé ou un bilan de grossesse. Le délai de prise en charge des patients était plus court pour les patients nés dans un pays de moyenne ou de forte endémicité. Un quart des patients avaient une activité sérique des ALAT supérieure à la normale, 11% étaient infectés par un virus sauvage (AgHBe positif) et 36% des patients pris en charge avaient un ADN du VHB supérieur à $3,3 \text{ Log}_{10}$ ($>2000 \text{ UI/mL}$). Sept pour cent des patients avaient une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (CHC). Lorsque l'évaluation biologico-histologico-virologique montrait la nécessité de l'instauration d'un traitement (ALAT $>\text{LSN}$, ADN du VHB $>3,3 \text{ Log}_{10}$, score Metavir $>\text{A2F2}$), l'entecavir et le tenofovir étaient les deux molécules les plus couramment prescrites, conformément aux recommandations de pratique clinique de l'EASL. En ce qui concerne le volet virologique, 530 échantillons ont été collectés par les différents laboratoires de virologie participant à cet observatoire, dont 331 ont été analysés par le CNR à ce jour. Les caractéristiques virologiques des patients sont présentées dans le Tableau 3. La majorité des patients (63,4%) étaient des porteurs inactifs du VHB avec une charge virale

inférieure à 3,30 Log₁₀ (<2000 UI/mL). Les génotypes A et D étaient les plus fréquents. Une forte proportion de patients avaient un génotype non identifié en raison de leur charge virale trop faible pour permettre une amplification par PCR. La médiane du titre en AgHBs était de 3,50 Log₁₀ UI/mL.

Tableau 3 : Caractéristiques virologiques des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B au sein des pôles de référence et réseaux hépatites.

	Patients (%)
ADN du VHB (Log₁₀ UI/mL)	
. Médiane (n=184 ¹)	3,73
. >3,30 Log (>2 000 UI/mL)	121 (36,6)
. <3,30 Log	210 (63,4)
Titre en AgHBs (Log₁₀ UI/mL) (n=313)	
. Médiane (<0,05 - 5,38)	3,50
Génotype du VHB (n=323)	
Génotype A	20,4%
Génotype B	3,4%
Génotype C	4,9%
Génotype D	28,2%
Génotype E	18,6%
Génotype non identifié	24,5% ²

¹147 patients à retester en PCR temps réel car ADN du VHB <2,55 Log

²Majorité des patients (70/79) a un ADN du VHB <2,55 Log

Le titre en AgHBs n'était pas significativement différent pour les différents génotypes analysés (Figure 3). Une corrélation positive a été mise en évidence entre le niveau de la charge virale au moment de la prise en charge et le titre en AgHBs, quel que soit le statut AgHBe (Figure 4). En ce qui concerne la prévalence de la résistance primaire, un seul des 331 patient testés était infecté par un virus portant des substitutions amino acidiques associées à la résistance à la lamivudine et à la telbivudine et à une diminution de sensibilité à l'entecavir (rtL180M + rtM204V). Ce

patient avait été préalablement exposé à un traitement par analogues nucléos(t)idiques.

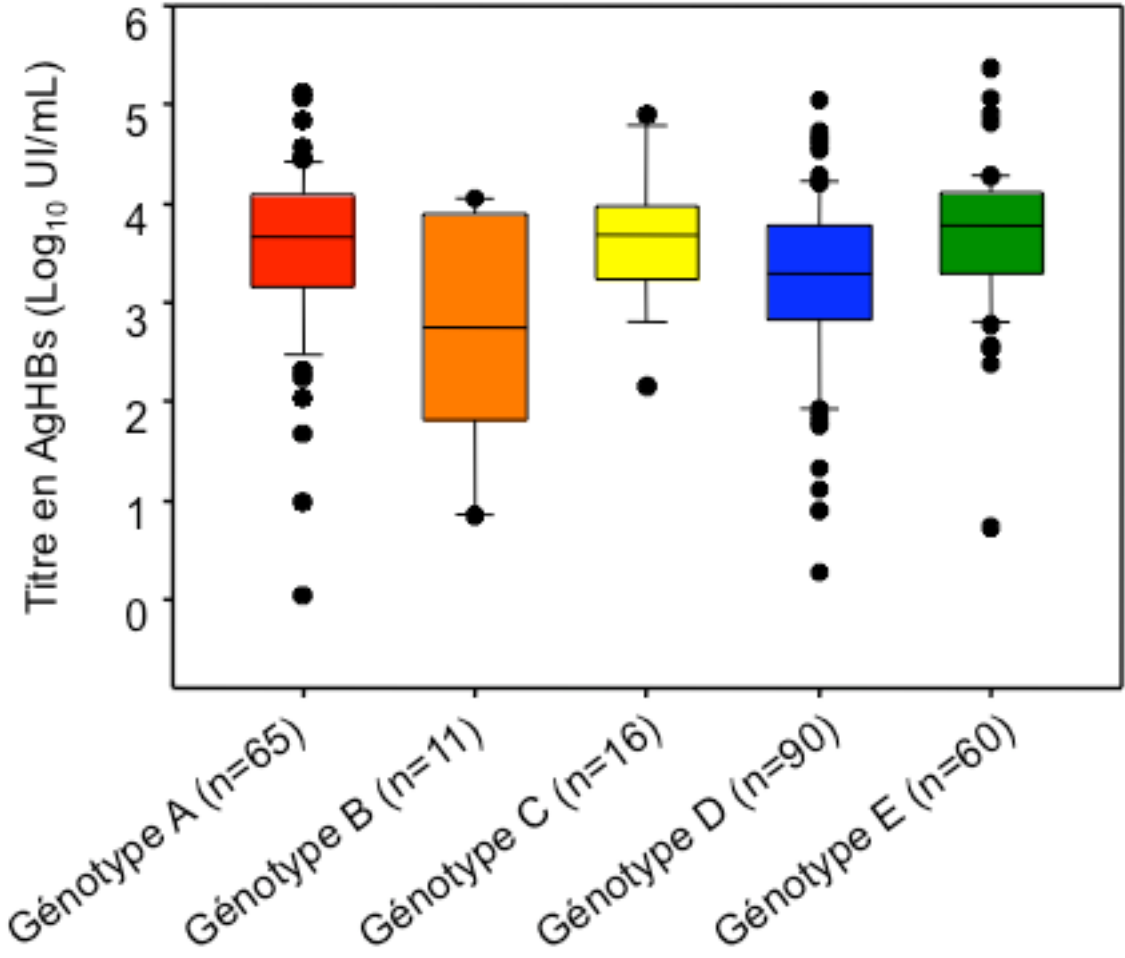


Figure 3 : Titre en AgHBs en fonction des génotypes A, B, C, D et E.

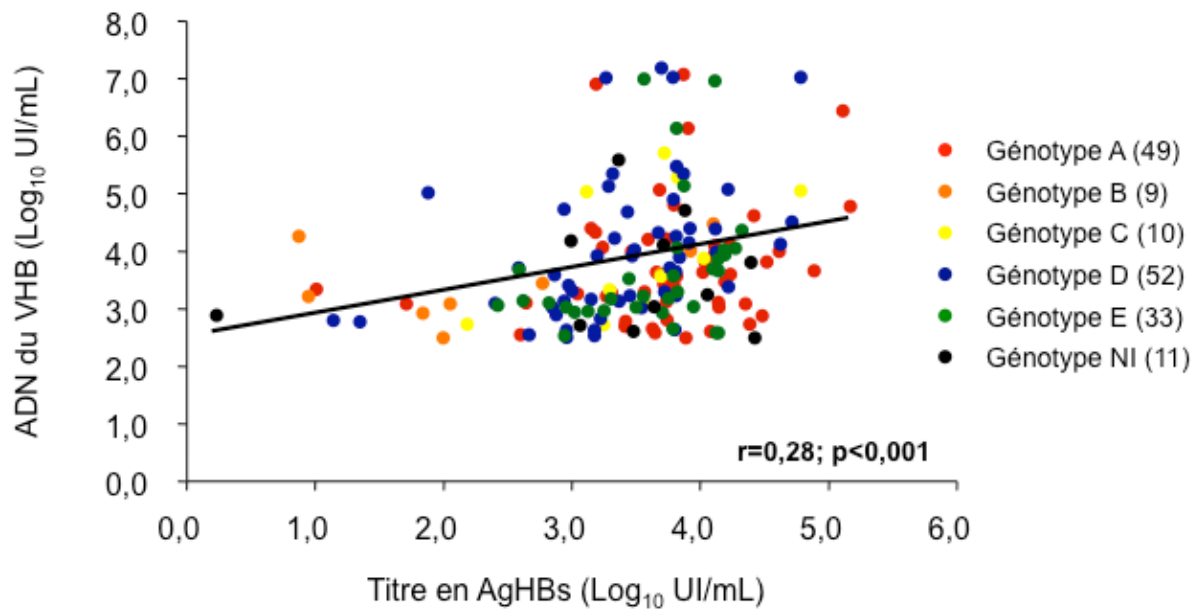


Figure 4 : Distribution des niveaux d'ADN du VHB en fonction du titre en AgHBs et du génotype. Chaque génotype (A, B, C, D, E et NI) est représenté par une couleur différente.

2.4- Investigation des cas isolés et groupés de transmission

L'investigation des cas groupés de transmission du VHB et du VHC ou des cas isolés de transmission nosocomiale de ces virus a donné lieu à plusieurs études. Une première étude a concerné un cas de transmission nosocomiale d'infection par le VHC d'un patient régulièrement dialysé au Centre Hospitalier Régional d'Orléans, en l'absence d'autres facteurs de risque. Les analyses génétique et phylogénique de trois régions du génome viral (région codant la protéine NS5B et régions codant la glycoprotéine d'enveloppe E1 et la région hypervariable HVR1) chez deux patients sources potentiels et le cas index ont montré que les trois individus étaient infectés par une souche de VHC de génotype 4. Néanmoins, le sous-type était différent chez l'un des trois patients (Figure 3). L'étude des régions E1 et HVR1, fondée sur l'alignement des séquences obtenues avec respectivement 25 et 36 séquences nucléotidiques de génotype 4 disponibles dans les banques, montrait que les souches isolées chez un des patients source potentiels et chez le cas index étaient phylogéniquement très proches, et plus proches l'une de l'autre que d'aucune autre séquence prototype incluse dans l'analyse, ainsi que de la séquence du troisième patient. Ce résultat était renforcé par une forte valeur de ré-échantillonnage

(respectivement, 100% et 98%). Le caractère nosocomial de la transmission de l'infection virale C au cours d'une séance d'hémodialyse était donc très probable.

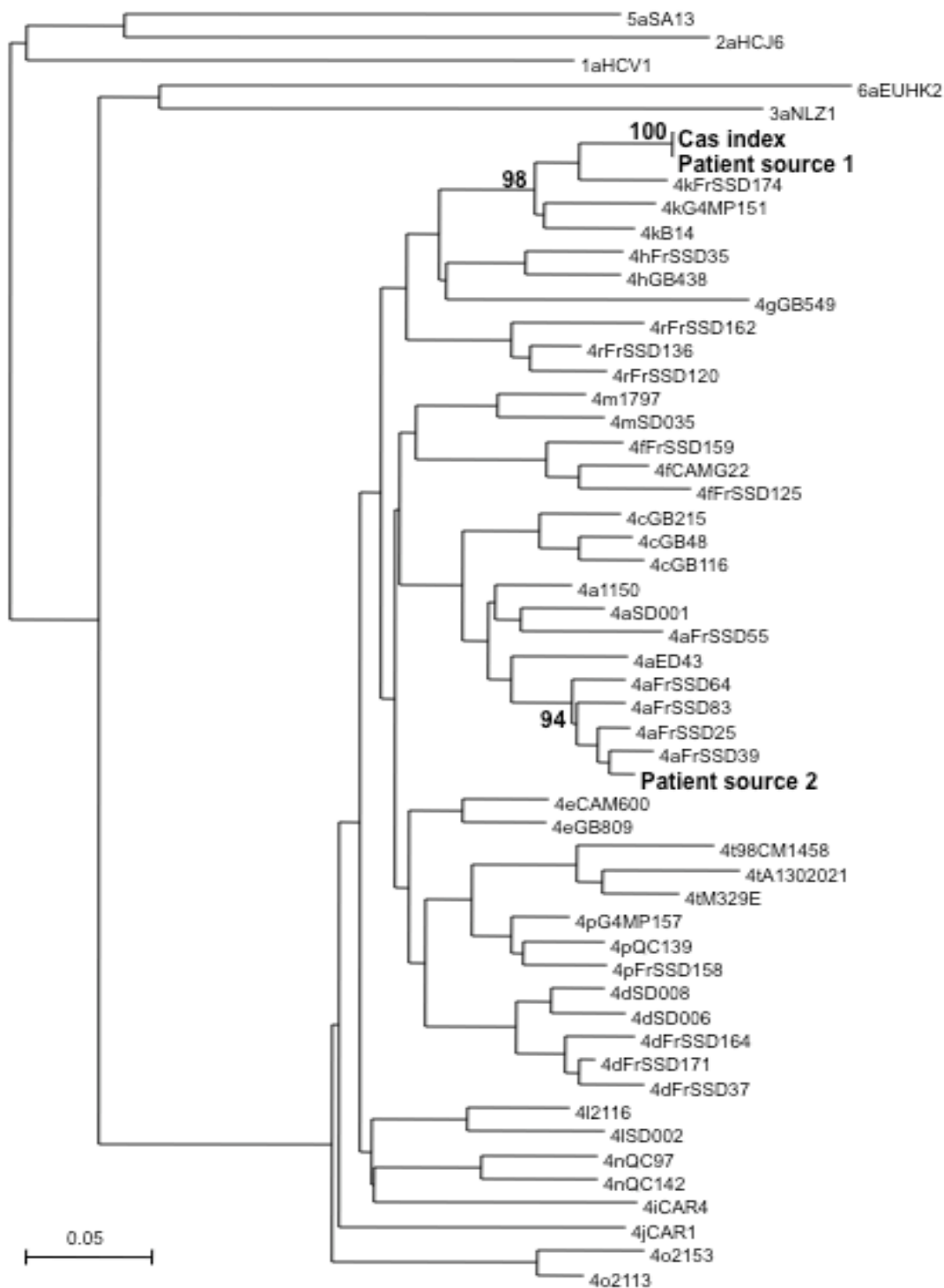


Figure 3 : Arbre phylogénique construit à partir des séquences du gène codant la protéine NS5B, d'une longueur de 286 nucléotides. La construction des arbres phylogéniques a été réalisée par la méthode des plus proches voisins, DNADist-Neighbor, implantée dans le programme PHYLIP v3.5 avec une matrice de distance Kimura 2-parameter et un taux de $Ts/Tv=2,0$. Les chiffres indiqués au niveau des nœuds correspondent aux pourcentages de 1000 ré-échantillonnages.

Une étude de transmission du VHC soignant-soigné a été réalisée au Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. En 2008, une infection aiguë par le VHC chez une patiente âgée de 29 ans atteinte de mucoviscidose a été diagnostiquée lors du bilan pré-greffe. Une investigation épidémiologique et virologique a été menée afin d'évaluer l'imputabilité de cette infection à une transmission nosocomiale au cours des différents soins dont cette patiente a bénéficié. L'investigation de cet épisode a nécessité une coordination de différents professionnels de l'établissement ainsi que d'intervenants extérieurs. La période de contamination se situait entre avril et septembre 2008, période pendant laquelle la patiente a séroconverti. Durant cette période, la patiente a été hospitalisée à deux reprises. La seule pratique à risque identifiée concernait la pose d'une chambre implantable au bloc opératoire. Les investigations réalisées (audit des pratiques, dépistage des patients opérés durant les mêmes sessions, dépistage des professionnels de santé ayant pris en charge la patiente) n'ont pas mis en évidence d'éléments en faveur d'une contamination nosocomiale par le VHC au cours de ces deux séjours à l'hôpital. En revanche, la mise en évidence d'une séropositivité vis-à-vis du VHC de l'un des infirmiers libéraux qui prenait en charge cette patiente à domicile a permis de réaliser une analyse génétique et phylogénique des souches virales issues de chacun des deux individus. Cette analyse moléculaire a montré que les souches de VHC de la patiente et du soignant étaient proches, ce qui suggérait une éventuelle contamination de l'un par l'autre au cours d'un soin. L'évaluation des pratiques de soins à domicile reste nécessaire afin d'évaluer le risque encouru par les personnes soignées dans le cas d'un professionnel séropositif. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le BEH (Bourigault et al., sous-presse).

2.5- Surveillance et caractérisation de la résistance aux antiviraux

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). 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.

2.5.1- Etudes réalisées par le CNR dans le cadre de la surveillance de la résistance

Le premier travail a porté sur l'étude de l'incidence de la sélection de substitutions amino acidiques associées à la résistance au cours du traitement combiné de l'hépatite chronique B par la lamivudine et l'adefovir. Cent soixante-seize patients (77% d'hommes, d'âge moyen 49 ± 11 ans, 60% AgHBe-négatif, 48% avec un score Metavir F3-F4) ont été traités par la combinaison de lamivudine, 100 mg/jour, et d'adefovir, 10 mg/jour, pendant une durée moyenne de $45,9 \pm 16,6$ mois.

(i) Le groupe A comprenait 62 patients naïfs de tout traitement et a reçu la combinaison de *novo*. L'ADN du VHB était indétectable (< 12 UI/mL) chez 56 patients (90,3%). Aucun des 6 autres patients n'a présenté d'échappement virologique (augmentation de plus de 1 Log de l'ADN du VHB au-dessus du nadir).

(ii) Le groupe B comprenait 12 patients traités par lamivudine seule, chez lesquels l'adefovir a été ajouté (stratégie « add-on ») en l'absence d'échappement virologique. Deux patients n'ont pas répondu à la bithérapie. L'analyse de la séquence amino acidique n'a été possible que chez un d'entre eux et a montré la sélection de variants viraux portant les substitutions suivantes : rtM204V+rtL180M+rtA181V.

(iii) Le groupe C comprenait 68 patients qui ont échappé à un premier traitement par lamivudine et chez lesquels une stratégie add-on a été réalisée avec l'ajout de l'adefovir. L'ADN du VHB était indétectable chez 54 patients (79,4%). Les 14 autres patients avaient un ADN du VHB détectable et un échappement virologique a été constaté chez un d'entre eux. L'analyse de la séquence du domaine RT montrait la présence de variants viraux portant les substitutions amino acidiques suivantes : rtA181V, rtN236T. La substitution en position 181 est responsable d'une résistance croisée à la lamivudine et à l'adefovir.

(iv) Le groupe D comprenait 34 patients traités par adefovir en monothérapie. L'ADN du VHB était indétectable chez seulement 21 patients (61,8%). Les 13 autres patients conservaient un ADN du VHB détectable et un échappement virologique a été observé dans 3 cas. L'analyse de la séquence amino acidique a permis de mettre en évidence des substitutions amino acidique en position 181 et/ou

236 conférant la résistance à l'adefovir. En conclusion, la combinaison thérapeutique de *novo* par lamivudine et adefovir est associée à une forte proportion d'ADN indétectable et une incidence faible d'échappement virologique à 4 ans. Elle représente une bonne alternative thérapeutique pour les pays où les molécules puissantes, dotées d'une barrière à la résistance élevée, administrée en monothérapie (entecavir et tenofovir) ne sont pas disponibles. (Hézode C, Chevaliez S, et al., manuscrit en préparation).

Dans une autre étude, nous avons utilisé les techniques de séquençage ultrasensible par pyroséquençage 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 480 000 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 chez tous ces patients, des substitutions connues pour conférer la résistance du VHB à l'adefovir, mais aussi à la lamivudine, à la telvudine et à l'entecavir, étaient présentes sous la forme de populations minoritaires chez tous les patients (Tableau 4). 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. Cette étude est actuellement étendue à un groupe contrôle de sujets traités par l'adefovir n'ayant pas développé de résistance au cours du traitement (Rodriguez C, Chevaliez S, Pallier C, Pawlotsky JM, manuscrit en préparation).

Tableau 4. Prévalence des variants viraux portant des substitutions amino acidiques associées à la résistance du VHB aux analogues nucléosidiques/nucléotidiques avant le début du traitement par adefovir en pyroséquençage (ND : indétectable).

	ADN du VHB (Log IU/mL)	V173L	L180M	A181V/T	T184S/A/I/L	R202G	M204V/I	N236T
Pt 1	7.8	0.05%	0.05%	0.42%	0.28%	ND	0.13%	ND
Pt 2	6.8	ND	ND	0.55%	0.15%	ND	0.40%	ND
Pt 3	7.6	ND	ND	0.07%	0.17%	ND	0.14%	0.04%
Pt 4	6.6	ND	ND	0.45%	0.11%	ND	0.45%	0.11%
Pt 5	6.1	ND	0.12%	0.51%	0.37%	ND	0.35%	ND
Pt 6	6.2	échec	échec	échec	échec	échec	échec	échec
Pt 7	5.4	0.1%	ND	0.40%	0.30%	ND	0.09%	ND

Nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur spécifique de la protéase NS3 du VHC, le telaprevir (VX-950, Vertex Pharmaceuticals) et avons analysé la fréquence de la sélection de variants résistants à ces molécules et la dynamique de ces variants au cours et après le traitement à l'aide d'une technique de séquençage classique. L'analyse des mêmes échantillons par une technique de pyroséquençage est en cours.

Dans 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), évaluant l'activité antivirale du telaprevir chez 320 patients naïfs de tout traitement infectés par un VHC de génotype 1, 20 malades ont été inclus dans le service d'Hépatologie de l'hôpital Henri Mondor. Six patients (4 de sous-type 1a et deux 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 que deux patients sous trithérapie associant le telaprevir, l'interféron alpha pégylé et la ribavirine n'ont pas éliminé le virus. Pour chaque patient, la population virale sauvage a été remplacée par un mélange complexe de variants viraux portant des substitutions amino acidiques connues pour conférer la résistance au telaprevir (V36L/M/A, T54A/S, R155K/E/T/A). Ces populations fluctuaient au cours du temps en fonction de la pression de sélection imposée par le traitement. De plus, la plupart des variants résistants sélectionnés par le traitement portaient des changements amino-acidiques supplémentaires (R26K, A40T, T42S, Y56F, T91A, G174S). La modélisation tridimensionnelle de la protéase NS3 suggèrait qu'aucune de ces mutations nouvellement identifiées n'affectait la liaison du telaprevir à son site catalytique, à l'exception peut-être des mutations en positions 42 et 40. Dans le système du réplicon subgénomique du VHC, ces mutations supplémentaires ne semblaient pas modifier la sensibilité au telaprevir, ce qui suggère que leur sélection est associée à une augmentation des capacités répliquatives des variants résistants au telaprevir. En conclusion, les rechutes en cours de traitement par telaprevir et interféron pégylé associé ou non à la ribavirine ou après l'arrêt de celui-ci sont associées à la sélection de mélanges complexes de variants viraux portant des substitutions amino acidiques qui confèrent une résistance au telaprevir avec une augmentation du fitness des souches résistantes au telaprevir (Chevaliez et al., manuscrit en préparation). Une nouvelle substitution amino acidique conférant la résistance a été identifiée en position 36 (V36C) chez un patient sous trithérapie ayant arrêté son traitement précocement. Cette nouvelle mutation augmente d'un facteur 8,6 la concentration de telaprevir nécessaire pour inhiber 50% de la réplication virale (IC50). Les autres paramètres (capacité de réplication in vitro et paramètres pharmacocinétiques) ne sont pas modifiés par rapport à la souche sauvage (Barbotte et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2010, sous presse).

Au cours de l'année 2009, de nombreuses recherches de mutations de résistance à différentes molécules antivirales utilisées dans le traitement des hépatites B chroniques ont été demandées dans le cadre du diagnostic étiologique de l'échec thérapeutique secondaire (22 demandes au total). Les échantillons

provenaient essentiellement d'hôpitaux de l'AP-HP (Saint Antoine, Bicêtre, Henri Mondor) et de l'hôpital Intercommunal de Créteil.

Dans ce cadre, le CNR a poursuivi la mise en place des outils de la plateforme de surveillance de la résistance des virus d'hépatites aux antiviraux, en particulier les outils d'étude phénotypiques : tests enzymatiques pour l'étude de la résistance du VHC aux anti-protéases et anti-polymérase, tests cellulaires fondés sur le réplicon subgénomique associé à la mutagenèse dirigée ou à l'utilisation de vecteurs navettes, et système infectieux JFH1 en culture cellulaire. Le laboratoire travaille également à la mise au point d'un nouveau système d'étude phénotypique de la résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques.

2.5.1- Création de l'Action Coordonnée N°33 (AC33) de l'ANRS "Résistance des Virus d'Hépatites 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 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 Nationales 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. Les travaux de l'AC33 s'appuieront sur la constitution, sous la responsabilité de l'ANRS, d'une grande cohorte nationale « Hépatites Virales » 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 constituera 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. Les groupes de virologie médicale de l'AC11 consacrés aux hépatites virales seront regroupés au sein d'un groupe unique de « Virologie médicale », associé à l'AC33. 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.

Une réflexion de fond a débuté sur la mise en place d'une base de données étendue, permettant d'associer informations cliniques et données de séquences et connectées avec l'ensemble des systèmes en place ou destinés à le devenir dans un futur proche. Cette base de données servira d'appui à la constitution de la cohorte nationale. Les nouvelles techniques d'étude de la résistance seront développées,

validées et leur utilisation sera étendue. Par exemple, une réflexion a débuté concernant le séquençage haut débit et la mise en place d'une plate-forme commune pour le VIH et les hépatites virales est envisagée.

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.

3- CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPPENS

Les activités du CNR en matière de surveillance sur le plan national qui étaient connectées jusqu'à fin 2008 avec le réseau d'excellence européen ViRgil (Combating Viral Resistance to Treatments) sont désormais connectées avec les travaux du réseau allemand HepNet, dirigé par le Professeur Michael MANNS et le Docteur Heiner WEDEMEYER (Hochschule Hanover, Hanovre, Allemagne). La mise en place d'un réseau similaire au Royaume Uni laisse envisager un élargissement de la collaboration internationale sur le sujet. La meilleure structuration des activités sur le territoire national est néanmoins un préalable indispensable à la mise en place d'un réel réseau de collaboration européen. La création de l'AC33 rentre dans ce cadre et devrait permettre une structuration rapide.

4- LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

2009

1. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Interferons and their use in persistent viral infections. **Handb Exp Pharmacol** 2009; 189: 203-41.
2. Pallier C, Rodriguez C, Brillet R, Nordmann P, Hézode C, Pawlotsky JM. Complex dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir dipivoxil. **Hepatology** 2009; 49: 50-59.
3. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Castéra L, Pawlotsky JM. The Cobas Ampliprep/Cobas Taqman real-time PCR assay fails to detect hepatitis C virus RNA in highly viremic genotype 4 clinical samples. **Hepatology** 2009; 49(4): 1397-1398.
4. Pawlotsky JM. EASL Clinical Practice Guidelines. **J Hepatol** 2009; 50: 243.
5. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. **J Hepatol** 2009; 50: 227-242

6. Chevaliez S, Pawlotsky JM. How to use the virological tools for the optimal follow-up of chronic hepatitis C. **Liver Int** 2009; 29(s1): 9-14.
7. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virological techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B and C. **Ann Hepatol** 2009; 8(1): 7-12.
8. Morice Y, Ratinier M, Miladi A, Germanidis G, Chevaliez S, Wedemeyer H, Laperche S, Lavergne JP, Pawlotsky JM. Seroconversion against hepatitis C virus alternate reading frame protein during the acute infection. **Hepatology** 2009; 49(5) : 1449-1459.
9. Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, Bronowicki JP, Bourlière M, Gharakhanian S, Bengtsson L, McNair L, Kauffman RS, Alam J, Pawlotsky JM, Zeuzem S. Telaprevir and peginterferon-alfa-2a with or without ribavirin in chronic hepatitis C. **N Engl J Med** 2009; 360(18) : 1839-1850.
10. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM. Performance of the Abbott *m2000_{SP}/m2000_{RT}* real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus RNA quantification. **J Clin Microbiol** 2009; 47: 1726-1732.
11. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus variability, immune pressure and resistance to antivirals. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 2009 ; 6 : 383-385.
12. Pawlotsky JM. Therapeutic implications of hepatitis C virus resistance to antiviral drugs. **Ther Adv Gastroenterol** 2009 ; 2 : 205-219.
13. Chevaliez S, Fix J, Soulier A, Pawlotsky JM. Underestimation of hepatitis C virus genotype 4 RNA levels by the Cobas Ampliprep/Cobas Taqman assay. **Hepatology** 2009 ; 50 : 1681.
14. Lerat H, Kammoun HL, Hainault I, Merour E, Higgs MR, Callens C, Lemon SM, Foufelle F, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce lipogenesis and defective triglyceride secretion in transgenic mice. **J Biol Chem** 2009 ; 284 : 33466-74.
15. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus (HCV) genotype 1 subtype identification in new HCV drug development and future clinical practice. **Plos One** 2009; 4: e8209.
16. Moreno C, Deltenre P, Pawlotsky JM, Henrion J, Adler M, Mathurin P. Shortened treatment duration in treatment-naive genotype 1 HCV patients with rapid virological response: a meta-analysis. **J Hepatol** 2009; 52: 25-31.
17. Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, van der Merwe S, Haffar S, Gadano A, Zein N, Lai CL, Pawlotsky JM, Heathcote J, Dusheiko G, Marcellin P. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. **Liver Int** 2009; 30: 342-355.

2010

18. Pawlotsky JM, Cocquerel L, Durantel D, Lavillette D, Lerat H, Pécheur EI, Polyak SJ, Tautz N, Thimme R. HCV research 20 years after discovery : a summary of the 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. **Gastroenterology** 2010; 138: 6-12.

19. Ahmed-Belkacem A, Ahnou N, Barbotte L, Wychowski C, Brillet R, Pohl RT, Pawlotsky JM. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. **Gastroenterology** 2010; 138: 1112-1122.
20. Pawlotsky JM, Chevaliez S. Preventing HCV recurrence in liver transplant recipients: a role for adoptive immunotherapy? **Hepatology** 2010; 51: 1072-1076.
21. Lukasiewicz E, Gorfine M, Freedman LS, Pawlotsky JM, Schalm SW, Ferrari C, Zeuzem S, Neumann AU. Prediction of Non-SVR to Therapy with Pegylated Interferon- α 2a and Ribavirin in Chronic Hepatitis C Genotype 1 Patients after 4, 8 and 12 Weeks of Treatment. **J Viral Hepat** 2010; in press.
22. Askarieh G, Pugnale P, Negro F, Ferrari C, Neumann AU, Pawlotsky JM, Schalm SW, Zeuzem S, Westin J, Söderholm J, Hellstrand K, Lagging M. Systemic and intra-hepatic IP-10 predicts the first phase decline in HCV RNA and overall viral response to therapy in chronic hepatitis C. **Hepatology** 2010; in press.
23. Monto A, Schooley RT, Lai JC, Sulkowski MS, Chung RT, Pawlotsky JM, McHutchison JG, Jacobson IM. Lessons from HIV therapy applied to viral hepatitis therapy: summary of a workshop. **Am J Gastroenterol** 2010; in press.
24. Pawlotsky JM. More sensitive hepatitis C virus RNA detection: what for? **J Hepatol** 2010; in press.
25. Barbotte L, Ahmed-Belkacem A, Chevaliez S, Soulier A, Hézode C, Wajcman H, Bartels DJ, Zhou Y, Ardzinski A, Mani N, Rao G, George S, Kwong A, Pawlotsky JM. Characterization of V36C, a novel amino acid substitution conferring hepatitis C virus (HCV) resistance to telaprevir, a potent peptidomimetic inhibitor of HCV protease. **Antimicrob Agents Chemother**, in press.

PUBLICATIONS NATIONALES

2009

1. Pawlotsky JM. Le foie et l'Europe. **Gastroenterol Clin Biol** 2009; 33: 903-907.

CHAPITRES DE LIVRES

I- LIVRES INTERNATIONAUX

1. Davis GL, Pawlotsky JM. Current and future therapy for hepatitis B and C. In: *The Liver: Biology and Pathobiology* (5th Edition). Arias I, Alter H, Boyer J, Cohen D, Fausto N, Shafritz D, Wolkoff A, eds. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey (USA), 2009: 899-919.

II- LIVRES FRANCOPHONES

2009

1. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Marqueurs virologiques de l'hépatite B et utilisation des tests. In : Hépatite B. Pawlotsky JM, Dhumeaux D, eds. EDK, Paris, France, 2009.
2. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Prévention, diagnostic et prise en charge de la résistance aux analogues nucléos(t)idiques. In : Hépatite B. Pawlotsky JM, Dhumeaux D, eds. EDK, Paris, France, 2009.
3. Pawlotsky JM. Variabilité génétique du virus de l'hépatite B. In : Hépatite B. Pawlotsky JM, Dhumeaux D, eds. EDK, Paris, France, 2009.
4. Hézode C, Mallat A, Pawlotsky JM, Dhumeaux D. Traitement de première ligne de l'hépatite chronique B. In: Hépatite B. Pawlotsky JM, Dhumeaux D, eds. Editions EDK, Sèvres (France), 2009: 241-264.

COMMUNICATIONS ORALES

I- INTERNATIONALES

2009

1. Lerat H, Kammoun H, Hainault I, Mérour E, Callens C, Lemon SM, Foufelle F, Pawlotsky JM. Lipogenesis activation does not depend on endoplasmic reticulum stress in a mouse model of hepatocellular steatosis induced by hepatitis C virus. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Washington (USA), 20-24 mars 2009.
2. Dusheiko G, Hézode C, Forestier N, Pawlotsky JM, Zeuzem S, Alves K, Kauffman R, Ferenci P. Final results of PROVE2: a phase 2 study of telaprevir in combination with peginterferon alfa-2a with or without ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Washington (USA), 20-24 mars 2009.
3. Chevaliez S, Soulier A, Barbotte L, Ahmed-Belkacem A, Pawlotsky JM. Identification of novel amino acid substitutions in the HCV NS3 protease domain in subjects who received telaprevir (VX-950) in combination with peginterferon alpha-2a without ribavirin. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Washington (USA), 20-24 mars 2009.
4. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlotsky JM. HCV genotype 1 subtype identification, a crucial step in new HCV drug development. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen (Denmark), 22-26 avril 2009 (abstract : J Hepatol 2009 ; 50 (suppl. 1): S9).

5. Chevaliez S, Ahmed-Belkacem A, Barbotte L, Soulier A, Bartels D, Zhou Y, Ardzinski A, Mani N, Rao G, Hézode C, George S, Kwong A, Pawlotsky JM. Molecular characterization of HCV resistance to telaprevir, a novel, potent HCV protease inhibitor. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen (Denmark), 22-26 avril 2009 (abstract : J Hepatol 2009 ; 50 (suppl. 1): S36).
6. Hézode C, Foucher J, Bronowicki JP, Leroy V, Tran A, Larrey D, Mathurin P, Rosa I, Alric L, Dhalluin-Venier V, Nani A, Bouvier-Alias M, Rouanet S, Couzigou P, Mallat A, Charaf-Eddine M, Pawlotsky JM. Efficacy and safety of an intensified regimen of pegylated interferon alfa-2a plus ribavirin in HCV genotype 1 non-responders : an interim analysis of the SYREN trial. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen (Denmark), 22-26 avril 2009 (abstract : J Hepatol 2009 ; 50 (suppl. 1): S50).
7. Higgs M, Lerat H, Pawlotsky JM. Expression of the growth arrest and DNA damage protein Gadd45 beta is inhibited by hepatitis C virus. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Nice (France), 3-7 octobre 2009.
8. Lerat H, Kammoun H, Hainault I, Merour E, Callens C, Lemon S, Foufelle F, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce lipogenesis and defective triglyceride secretion in transgenic mice expressing the full-length HCV open reading frame. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Nice (France), 3-7 octobre 2009.
9. Chouteau P, Pic I, Defer N, Merour E, Lerat H, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus (HCV) proteins are fibrogenic in the absence of hepatic inflammation in a transgenic mouse model expressing the full-length HCV open reading frame. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Nice (France), 3-7 octobre 2009.
10. Ahmed-Belkacem A, Brillet R, Ahnou N, Barbotte L, Pallier C, Wychowski C, Guichou JF, Pohl RT, Pawlotsky JM. Silibinin and other flavonoids are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Nice (France), 3-7 octobre 2009.
11. Livingston S, Bruden DL, Townshend-Bulson LJ, Homan CE, McMahon Pawlotsky JM, Chevaliez S, Bruce M, Rosen HR, Gretch DR. Genotype 1 versus genotypes 2 and 3, female gender and younger age are associated with recovery from hepatitis C virus infection in Alaska native and American Indian persons. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston (USA), 30 octobre-3 novembre 2009 (abstract: Hepatology; 2009; 50 (suppl.): 342A).
12. Ahmed-Belkacem A, Ahnou N, Barbotte L, Wychowski C, Brillet R, Pohl RT, Pawlotsky JM. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston (USA), 30 octobre-3 novembre 2009 (abstract: Hepatology; 2009; 50 (suppl.): 412A).

I- NATIONALES

2009

1. Chouteau P, Merroux E, Lerat H, Pawlotsky JM. Le virus de l'hépatite C induit la fibrose hépatique sans inflammation chez des souris transgéniques exprimant la totalité du cadre de lecture ouvert viral. Réunion Annuelle du Réseau National Hépatites, Paris, 23-24 janvier 2009.
2. Barbotte L, Ahmed-Belkacem A, Chevaliez S, Soulier A, Bartels D, Zhou Y, Ardzinski A, Mani N, Rao G, Hezode C, Kwong A, George S, Pawlotsky JM. Caractérisation d'une nouvelle mutation de résistance (V36C) chez un patient traité avec une trithérapie de telaprevir, d'interferon alpha pégylé et de ribavirine. 11^e Journées Francophones de Virologie, Paris, 27-28 mars 2008 (Abstract: Virologie 2009 : S30).

CONFERENCES SUR INVITATIONS

I- INTERNATIONALES

2009

3. **Pawlotsky JM.** "How to use virological tools for the optimal follow-up of chronic hepatitis C ?". 3rd Paris Hepatitis Conference, Paris (France), 19-20 janvier 2009.
4. **Pawlotsky JM.** "Progress and challenge in the development of small molecule inhibitors of HCV". 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Montreal (Canada), 8-11 février 2009.
5. **Pawlotsky JM.** "The role of HBV DNA monitoring". 19th Conference of the Asian-Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Hong Kong (China), 13-16 février 2009.
6. **Pawlotsky JM.** "Nomenclature and diagnosis of HBV resistance". 19th Conference of the Asian-Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Hong Kong (China), 13-16 février 2009.
7. **Pawlotsky JM.** "French HCV screening policy". Annual Meeting of the Israeli Society for the Study of the Liver, Kfar Blum (Israel), 5-6 mars 2009.
8. **Pawlotsky JM.** "EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B". Annual Meeting of the Israeli Society for the Study of the Liver, Kfar Blum (Israel), 5-6 mars 2009.
9. **Pawlotsky JM.** "Progress and challenges in hepatitis C therapy". Biotica, Cambridge (UK), 10 mars 2009.
10. **Pawlotsky JM.** "Development of small molecule HCV inhibitors". Merck Advisory Meeting, Annapolis (USA), 19 mars 2009.
11. **Pawlotsky JM.** "What is the mechanism of interferon's antiviral action against HCV and mechanisms of resistance". Roche Research Advisory Board Meeting, Washington, 20 mars 2009.
12. **Pawlotsky JM.** "Future approaches to therapy of HCV infection". 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases, Washington (USA), 20-24 mars 2009.

13. **Pawlotsky JM.** "Monitoring of treatment efficacy and antiviral drug resistance". EASL-ViRgil Joint Workshop, The International Liver Congress 2009, 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen (Denmark), 22-26 avril 2009.
14. **Pawlotsky JM.** "Optimizing screening, diagnosis and referrals". IC-3 Meeting, Paris (France), 9 mai 2009.
15. **Pawlotsky JM.** "Definition of treatment responses and strategies to overcome resistance", European Association for the Study of the Liver (EASL) Chinese HBV Clinical Practice Guidelines Workshop, Beijing (China), 29 mai 2009.
16. **Pawlotsky JM.** "Definition of treatment responses and strategies to overcome resistance", European Association for the Study of the Liver (EASL) Chinese HBV Clinical Practice Guidelines Workshop, Beijing (China), 30 mai 2009.
17. **Pawlotsky JM.** "Definition of treatment responses and strategies to overcome resistance", European Association for the Study of the Liver (EASL) Chinese HBV Clinical Practice Guidelines Workshop, Shanghai (China), 31 mai 2009.
18. **Pawlotsky JM.** "Perspectives on HBV and HCV resistance". VIRCO Symposium, Mechelen (Belgium), 11 juin 2009.
19. **Pawlotsky JM.** "Rôle de la mesure de la charge virale dans la prise en charge de l'hépatite C". Congrès National Tunisien de Gastroentérologie, Tunis (Tunisie), 11-13 juin 2009.
20. **Pawlotsky JM.** "Future therapeutic approaches for hepatitis B". EASL Clinical School of Hepatology "Viral Hepatitis", Paris (France), 12-14 juin 2009.
21. **Pawlotsky JM.** "Future therapeutic approaches for hepatitis C". EASL Clinical School of Hepatology "Viral Hepatitis", Paris (France), 12-14 juin 2009.
22. **Pawlotsky JM.** "HCV testing and resistance". EASL Clinical School of Hepatology "Viral Hepatitis", Paris (France), 12-14 juin 2009.
23. **Pawlotsky JM.** "HBV resistance to nucleoside/nucleotide analogues: molecular mechanisms and clinical consequences". White Nights in Hepatology, Saint-Petersbourg (Russia), 18-20 juin 2009.
24. **Pawlotsky JM.** "Novel HCV inhibitors". White Nights in Hepatology, Saint-Petersbourg (Russia), 18-20 juin 2009.
25. **Pawlotsky JM.** "No HBV resistance = no disease progression". White Nights in Hepatology, Saint-Petersbourg (Russia), 18-20 juin 2009.
26. **Pawlotsky JM.** "Overview of HBV Treatment: treatment endpoints". Chinese Post-Annual Meeting EASL Tour, Beijing (China), 3 juillet 2009.
27. **Pawlotsky JM.** "HBV resistance to nucleoside/nucleotide analogues: molecular mechanisms and clinical consequences". Chinese Post-Annual Meeting EASL Tour, Beijing (China), 3 juillet 2009.
28. **Pawlotsky JM.** "Overview of HBV Treatment: treatment endpoints". Chinese Post-Annual Meeting EASL Tour, Beijing (China), 4 juillet 2009.

29. **Pawlotsky JM.** "HBV resistance to nucleoside/nucleotide analogues: molecular mechanisms and clinical consequences". Chinese Post-Annual Meeting EASL Tour, Beijing (China), 4 juillet 2009.
30. **Pawlotsky JM.** "Overview of HBV Treatment: treatment endpoints". Chinese Post-Annual Meeting EASL Tour, Shanghai (China), 5 juillet 2009.
31. **Pawlotsky JM.** "HBV resistance to nucleoside/nucleotide analogues: molecular mechanisms and clinical consequences". Chinese Post-Annual Meeting EASL Tour, Shanghai (China), 5 juillet 2009.
32. **Pawlotsky JM.** "Overview of HBV Treatment: treatment endpoints". Chinese Post-Annual Meeting EASL Tour, Guangzhou (China), 6 juillet 2009.
33. **Pawlotsky JM.** "HBV resistance to nucleoside/nucleotide analogues: molecular mechanisms and clinical consequences". Chinese Post-Annual Meeting EASL Tour, Guangzhou (China), 6 juillet 2009.
34. **Pawlotsky JM.** "Should we treat every Hbe antigen-negative patient with a viral load >2000 IU/ml with or without histology and ALT?". 12th International Symposium on Viral Hepatitis, Salvador de Bahia (Brazil), 22-25 juillet 2009.
35. **Pawlotsky JM.** "How can we avoid nonresponders?". 12th International Symposium on Viral Hepatitis, Salvador de Bahia (Brazil), 22-25 juillet 2009.
36. **Pawlotsky JM.** "Global perspective on factors contributing to treatment success in patients with chronic hepatitis C". Breakfast Program at MetroHealth Medical Center, Cleveland, Ohio (USA), 8 septembre 2009.
37. **Pawlotsky JM.** "Global perspective on factors contributing to treatment success in patients with chronic hepatitis C". Lunch Program at The Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio (USA), 8 septembre 2009.
38. **Pawlotsky JM.** "Global perspective on factors contributing to treatment success in patients with chronic hepatitis C". Evening Program at Baricelli Inn, Cleveland, Ohio (USA), 8 septembre 2009.
39. **Pawlotsky JM.** "Global perspective on factors contributing to treatment success in patients with chronic hepatitis C". Lunch Program at Albert Einstein Medical Center, Philadelphia, Pennsylvania (USA), 9 septembre 2009.
40. **Pawlotsky JM.** "Global perspective on factors contributing to treatment success in patients with chronic hepatitis C". Afternoon Program at Drexel University School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania (USA), 9 septembre 2009.
41. **Pawlotsky JM.** "Global perspective on factors contributing to treatment success in patients with chronic hepatitis C". Evening Program at Prime Rib, Philadelphia, Pennsylvania (USA), 9 septembre 2009.
42. **Pawlotsky JM.** "Global perspective on factors contributing to treatment success in patients with chronic hepatitis C". Evening Program at Monterrey Bay Fish Grotto, Pittsburgh, Pennsylvania (USA), 10 septembre 2009.

43. **Pawlotsky JM.** "Global perspective on factors contributing to treatment success in patients with chronic hepatitis C". Temple University Hospital, Philadelphia, Pennsylvania (USA), 11 septembre 2009.
44. **Pawlotsky JM.** "Current management of chronic hepatitis B". Annual Meeting of the Swiss Society of Gastroenterology, Zurich (Switzerland), 17-18 septembre 2009.
45. **Pawlotsky JM.** "Advancing options for HCV: where are we now?". Boehringer-Ingelheim Standalone Meeting, Prague (Czech Republic), 23 septembre 2009.
46. **Pawlotsky JM.** "HCV drug development: improving response rates in naive and nonresponder patients". Japanese Digestive Disease Week, Kyoto (Japan), 14-17 octobre 2009.
47. **Pawlotsky JM.** "Cutting edge of hepatitis C treatment". Schering-Plough Evening Seminar, Kyoto (Japan), 16 octobre 2009.
48. **Pawlotsky JM.** "Cutting edge of hepatitis C treatment". Kyusyu Hepatitis C Study Group Special Lecture, Fukuoka (Japan), 17 octobre 2009.
49. **Pawlotsky JM.** "A shorter journey? Potential impact of STAT-Cs on duration of HCV therapy". AASLD Satellite Symposium "Smoother waters ahead ? New directions in the management of HCV", Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, Massachusetts (USA), 30 octobre-3 novembre 2009.
50. **Pawlotsky JM.** "Hepatitis C treatment: managing today's challenges". Symposium "Solutions and innovations in the treatment of hepatitis C", Lisbon (Portugal), 14 novembre 2009.
51. **Pawlotsky JM.** "Future HCV therapies and resistance". United European Gastroenterology Week (UEGW) 2009, London (UK), 21-25 novembre 2009.
52. **Pawlotsky JM.** "The future for therapeutics: impact on decision making today?". United European Gastroenterology Week (UEGW) 2009, London (UK), 21-25 novembre 2009.
53. **Pawlotsky JM.** "New HCV therapeutic developments". Roche Molecular Systems Seminar, Pleasanton, California (USA), 4 décembre 2009.
54. **Pawlotsky JM.** "HCV treatment, screening and monitoring: 2009-2012". HepDart 2009, Kohala Coast, Hawaii (USA), 6-10 décembre 2009
55. **Chevaliez S.** "Early monitoring of viral responses in viral hepatitis treatment decisions". Early Morning Workshop, 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen, Danemark, 25 avril 2009.
56. **Chevaliez S.** "Hepatitis B virus testing and resistance". EASL Clinical School of Hepatology, Course 12, Viral Hepatitis, Créteil, France, 12-14 juin 2009.
57. **Chevaliez S.** "Diagnostic virology update". Satellite Meeting: Clinical Update on Management of Hepatitis B and D, International Meeting, The Molecular Biology of Hepatitis B Virus, Tours, France, 30 août 2009.
58. **Chevaliez S.** "Drug development and resistance to antiviral drug : poster summary". 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France 3-7 octobre 2009.

59. **Chevaliez S.** "Update on resistance to HCV drugs & clinical implications". Third International Workshop of the European AIDS Treatment Group on « Clinical Trial Design : Experimental HCV Drugs for HIV/HCV Coinfected People », Bruxelles, Belgique, 20 novembre 2009.
60. **Chevaliez S.** "HCV Genotyping : Current and Future Directions". Roche Molecular Systems, Workshop, Pleasanton, California, 4 décembre 2009.

2010

61. **Pawlotsky JM.** "Current and evolving therapies for hepatitis C". Challenges in Viral Hepatitis 2010, Lausanne (Switzerland), 14 janvier 2010.
62. **Pawlotsky JM.** "Current and evolving therapies for hepatitis C". 20th Challenge in Virology, Saanen (Switzerland), 15-17 janvier 2010.
63. **Pawlotsky JM.** "What treatment for nonresponders to standard-of-care ?". Viral Hepatitis ANRS Research Site in Egypt Annual Scientific Meeting, Cairo (Egypt), 23-24 janvier 2010.
64. **Pawlotsky JM.** "New targets and therapeutic developments in HCV infection". Glasgow Virology Workshop 2010, 6 février 2010.
65. **Pawlotsky JM.** "Direct Acting Antivirals: past, present future". Theory and Practice in Hepatitis C Therapy, Vienna (Austria), 25 février 2010.
66. **Pawlotsky JM.** "New targets and therapeutic developments in HCV infection", Seminar at the London Royal Hospital, London (UK), 2 mars 2010.
67. **Pawlotsky JM.** "New targets and therapeutic developments in HCV infection", Seminar at the London Royal Hospital, London (UK), 2 mars 2010.
68. **Pawlotsky JM.** "Hope for the future in chronic hepatitis B". Gilead Pan-London Hepatitis B Meeting, London (UK), 2 mars 2010.
69. **Pawlotsky JM.** "New targets and therapeutic developments in HCV infection", Seminar at the King's College, London (UK), 3 mars 2010.
70. **Pawlotsky JM.** "New targets and therapeutic developments in HCV infection", Seminar at the Birmingham University Hospital, London (UK), 4 mars 2010.
71. **Pawlotsky JM.** "Hope for the future in chronic hepatitis B". Gilead Birmingham Hepatitis B Meeting, London (UK), 4 mars 2010.
72. **Chevaliez S.** "New tools for the virological diagnostic and management of hepatitis C". Abbott Hepatitis C symposium, Beijing, China, 25 mars 2010.
73. **Chevaliez S.** "Virological tools for chronic HCV". Siemens Academy meeting, Vienna, Austria, 13 avril 2010.
74. **Chevaliez S.** "Early monitoring of viral responses in viral hepatitis treatment". Early Morning Workshop, 45rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Vienna, Austria, 16 avril 2010.

II- NATIONALES

2009

3. **Chevaliez S.** "Prise en charge de l'hépatite B : Comprendre et diagnostiquer les résistances". Workshop Bristol-Mayers Squibb, Paris, 9 février 2009.
4. **Chevaliez S.** "Résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques". Conférence dans le service d'Hépatologie et de Gastroentérologie de l'hôpital Henri Mondor, Créteil, 1 avril 2009.
5. **Chevaliez S.** "Efficacité et résistance à court et long terme des nouveaux analogues nucléos(t)idiques chez les patients naïfs de tout traitement". Conférence dans le service d'Hépatologie et de Gastroentérologie du Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil, 23 septembre 2009.
6. **Chevaliez S.** "Quelles avancées pour le dépistage et la prise en charge de l'hépatite chronique B : Actualisation des méthodes pour le diagnostic virologique". Workshop Bristol-Mayers Squibb, Paris, France, 15 octobre 2009.
7. **Chevaliez S.** "Actualités sur les résistances aux antiviraux et impact clinique ». 4^e journées de Perspectives et Optimisation du Suivi et de la Prise en Charge du Traitement de l'Hépatite C (PROSPECT'H), Cannes, France, 17-18 octobre 2009.
8. **Chevaliez S.** "Cinétiques virales et prédictibilité de la réponse au traitement du VHC". Workshop Schering-Plough, Boston, Etats-Unis, 30 octobre 2009.
9. **Chevaliez S.** "VHB et résistance". 14^e journée annuelle du Groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP), Paris, France, 19 novembre 2009.
10. **Chevaliez S.** "Le Virus de l'hépatite B et ses Résistance". Hepatology Perspectives Gilead Workshop, Paris, France, 1^{er} décembre 2009.
11. **Pawlotsky JM.** "Nouveaux agents HCV et résistance". Synergies Résistance, Aix-en-Provence, 1-2 octobre 2009.

2010

12. **Pawlotsky JM.** "Hépatites virales et recherche translationnelle". Forum Interdisciplinaire sur la Prise en Charge des Hépatites Virales, Aix-en-Provence, 21 janvier 2010.
13. **Chevaliez S.** "Hépatite C : Enjeux actuels et futurs de son diagnostic". Biomérieux, Marcy l'Etoile, France, 7 janvier 2010.
14. **Chevaliez S.** "Actualités sur les résistances du VHB aux analogues nucléos(t)idiques : post-AASLD 2009". Workshop Gilead, Paris, France, 10 février 2010.
15. **Chevaliez S.** "Résistance génotypiques du VHB chez les patients ayant une hépatite chronique B". Conférence dans le service d'Hépatologie et de Gastroentérologie de l'hôpital Jean Verdier, Bondy, 19 mai 2010.

5- PROGRAMME D'ACTIVITE 2010-2011

Les priorités des prochaines années seront :

1- La poursuite et l'extension de l'enquête nationale de surveillance des patients atteints d'hépatite chronique B nouvellement pris en charge, en collaboration avec la FNPRRH, ainsi que la mise en place de toute enquête nationale décidée par l'InVS.

2- Le démarrage de l'enquête nationale COQUELICOT.

3- La réalisation d'études des 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 de la nouvelle trousse de détection quantification de l'ARN du VHC (HCV RNA v2.0, Roche) vis-à-vis de souches de VHC de génotype 4, ainsi que les nouvelles trousse développées par Siemens pour la détection quantification respectivement de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC.

4- La réalisation d'études des performances analytiques et cliniques des tests sérologiques rapides permettant la détection de l'AgHBs et la détection des anticorps anti-VHC à partir de prélèvements salivaires (en collaboration avec les équipes de R&D de plusieurs firmes industrielles), ainsi que des performances de détection-quantification de l'antigène de capsid du VHC à partir de sang total déposé sur buvards.

5- La mise en place de l'action coordonnée AC33 "Résistance des virus d'hépatites aux antiviraux" au sein de l'ANRS et la mise en place d'un observatoire de la résistance accolé à la grande cohorte nationale « Hépatites Virales » qui permettra la structuration de la surveillance de la résistance aux antiviraux à l'échelon national.

6- La mise en place d'une collaboration européenne avec le Dr Heiner Wedemeyer pour l'uniformisation des techniques de biologie moléculaire pour la détection-quantification de l'ARN du virus de l'hépatite delta

IV

**LABORATOIRE ASSOCIE
CNR DES HEPATITES VIRALES B, C
ET DELTA EN TRANSFUSION
SANGUINE**

**Institut National de la Transfusion Sanguine
Paris**



Rapport d'activité 2009
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
2/ ACTIVITES D'EXPERTISE :.....	3
2-1 CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....	3
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2009	4
3/ ACTIVITES DE SURVEILLANCE DES DONNEURS DE SANG :	8
3.1 METHODE.....	8
3.2 RESULTATS	10
3.2.1 <i>Le VHB</i>	10
3.2.2 <i>Le VHC</i>	23
3.2.3 <i>Bilan du DGV et risque résiduel</i>	31
4/ACTIVITES DE RECHERCHE	33
5/ ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL :	35
6/ LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 2009.....	36
7/ PROGRAMME D'ACTIVITE 2010	38

1/ Introduction :

Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés

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

- 8 techniciens de laboratoires,
- 1 assistant ingénieur
- 2 ingénieurs de recherche,
- 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.

L'INTS est un groupement d'intérêt public en partie financé par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie.

Les activités du laboratoire ont reçu l'accréditation du COFRAC selon la norme ISO-CEI 17025 sous le numéro 1-1950 à compter du 1^{er} janvier 2008. L'accréditation a été confortée lors de l'audit de suivi d'octobre 2008.

Les locaux abritant le plateau technique de Virologie ont bénéficié d'une rénovation en 2000 ayant impliqué une restructuration totale des laboratoires. Ces travaux ont été dictés par les exigences de mise en conformité pour un fonctionnement compatible avec des activités de référence. La surface des locaux comprenant les laboratoires, les zones de stockage ambiant et froid et les bureaux est de 314 m².

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.

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).

Stockage en enceintes à -20°C ou -80°C .

2.2 Activités d'expertise de l'année 2009

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).

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.

A ce titre 2 tests à lecture subjective de dépistage des anticorps anti HCV ont été étudiés sur le panel SFTS destiné à l'évaluation des performances de la sensibilité. Ces études réalisées à la demande des industriels ont montré que ces tests restent moins sensibles que les tests ELISA et méritent des améliorations s'ils devaient être utilisés à des fins de qualification des dons de sang dans les pays à ressources limitées.

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 trousseaux commerciaux 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 trousseaux fournissant un résultat négatif, (iii) les trousseaux 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.

Cette étude est en cours de publication.

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 terme 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 géotype 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 géotype 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. Cette étude soumise à publication.

1) 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 sera suivi d'une nouvelle opération en 2010 élargie à d'autres pays africains (n=18) et à plusieurs laboratoires dans un même pays (74 panels seront distribués) de manière à apporter une aide à l'amélioration de la sécurité transfusionnelle dans ces pays.

Les enquêtes de transmission

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.

Aucune **enquête de transmission** n'a été réalisée en 2009. Toutefois les 4 enquêtes de transmission détaillées dans le compte rendu de 2008, et réalisées en coordination avec l'InVS, les CCLIN régionaux, les DDASS, les établissements hospitaliers concernés et le cas échéant l'EFS, dont 3 concernaient le VHB (2 enquêtes de suspicion de transmission

nosocomiale et 1 enquête de transmission transfusionnelle) et une concernant le VHC dans une unité d'hémodialyse ont fait l'objet de multiples communications en 2009.

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 épidémiologique** 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 (Ti) 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 :

$$75 \% \text{ RR1} + 25 \% \text{ RR2}$$

où RR1 = FS Ag HBs x (Ti Ag HBs + Ti anti-HBc) couvrant les cas où l'Ag HBs est présent (70% transitoire et 5% chronique), et

où RR2 = FS anti-HBc x Ti 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.

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**

4) 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.

5) 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 hydrophile majeure de la protéine d'enveloppe « S » (région amplifiée : nucléotides 99 à 568) suivie d'une étape de séquençage direct.

6) 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.

3.2 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 2008. L'année 2009 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 ci-dessous donne la comparaison des taux de positivité pour l'Ag HBs observés entre 1993 et 2008 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 2008.

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

Une baisse régulière jusqu'en 2005 des taux est observée aussi bien chez les nouveaux donneurs que chez les donneurs connus. La diminution plus importante observée jusqu'en 1998 peut être attribuée à une pratique de plus en plus fréquente de la vaccination. Depuis 1998, le taux d'incidence et de prévalence semblent s'être stabilisés.

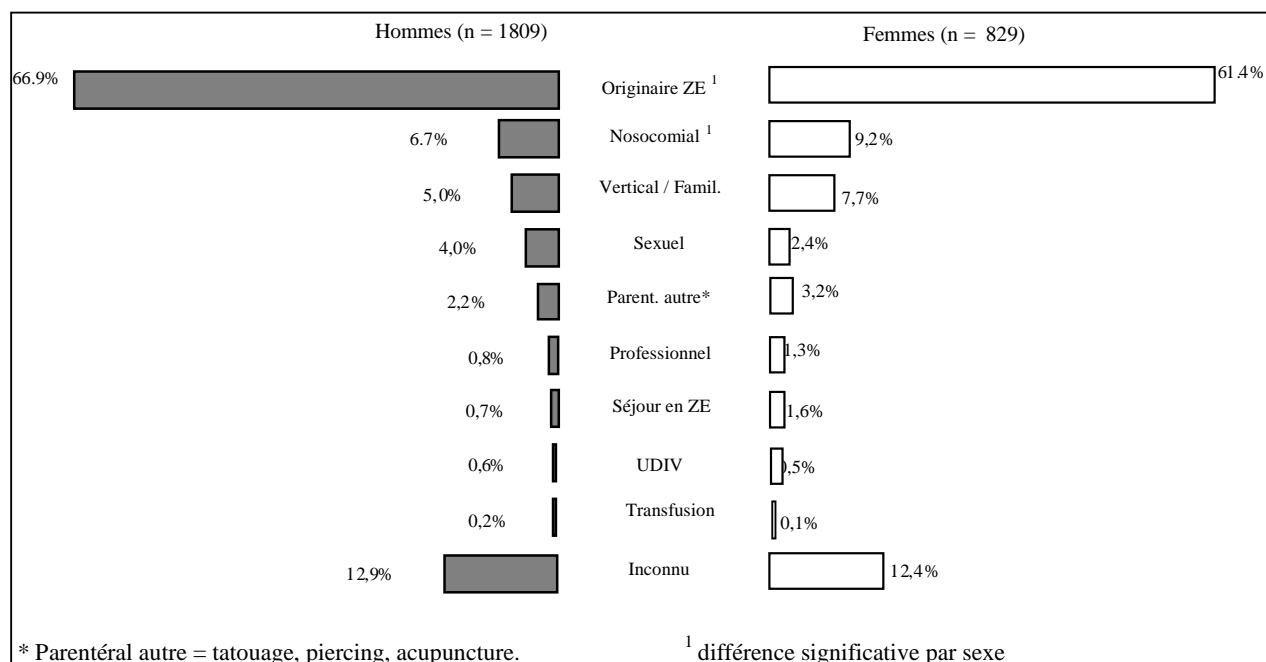
Les départements d'Outre-Mer ont une prévalence environ 10 fois supérieure à celle observée dans les autres départements.

Comme le montre la figure 1, qui fait état des facteurs de risque (hiérarchisés en fonction de leur probabilité de survenue) retrouvés chez 2638 (63.6%) des 4148 nouveaux donneurs positifs pour l'Ag HBs, prélevés en France métropolitaine entre 1998 et 2008, 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 pour la période 1998-2008 (n=54), le risque sexuel se retrouve au premier plan.

Il convient de souligner, que chez 13% des nouveaux donneurs et dans 32% des cas chez les donneurs connus, interrogés sur leur facteur de risque, celui-ci n'a pas été identifié.

Figure 1 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs Ag HBs positifs en France métropolitaine entre 1998 et 2008 (n=2638).



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 1996 et 2008

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.

Tableau 2 : Evolution des titres de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1998 et 2008

Ag HBs (ng/ml)	1998		1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		Total	
	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	21	0,6%
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	227	6,2%
50 – 3 990	101	30,3	71	23,0	89	27,5	83	24,6	69	20,4	70	20,7	64	17,6	52	17,2	61	20,7	62	17,9	81	24,8	803	22,1%
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	1922	52,8%
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	587	16,1%
> 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	81	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	3641	100,0%

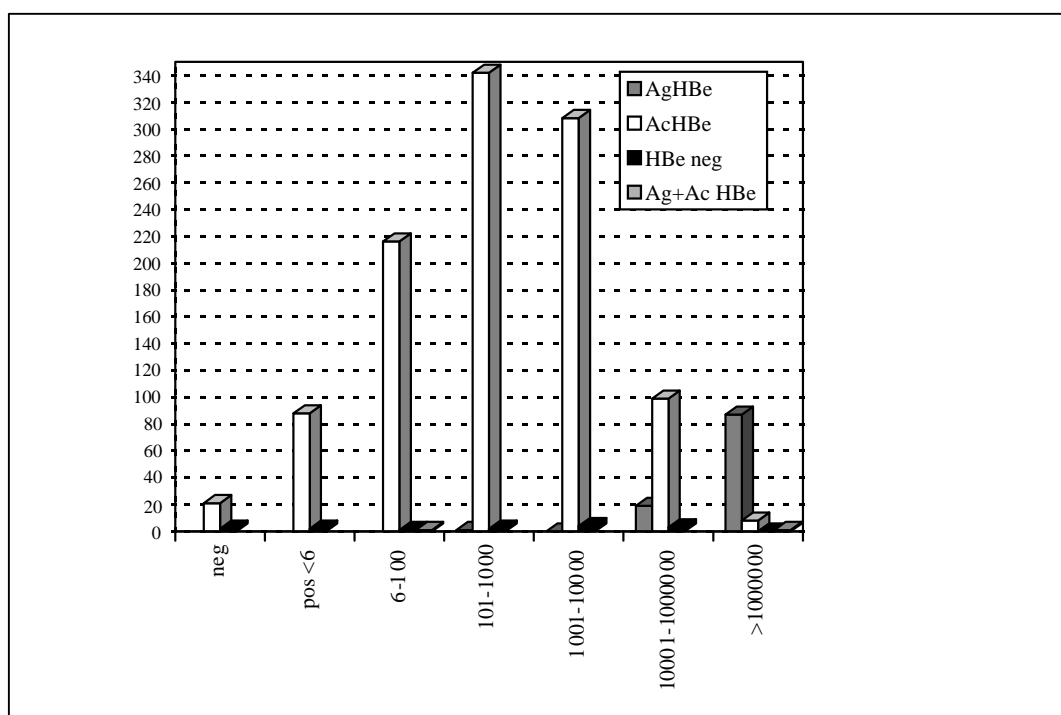
La répartition des **marqueurs HBe** sur les 3627 dons pour lesquels l'information est disponible : soit 77,3% des 4693 dons collectés dans la période 1998-2008 est fourni dans le tableau 3.

Tableau 3 : Répartition des marqueurs HBe chez les donneurs AgHBs positifs entre 1998 et 2008

	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
Total	3187	87,9	393	10,8	10	0,3	37	1,0	3627

Il apparaît que 87,9% (3187/3627) des dons Ag HBs positifs sont **Ac HBe** positifs, cette proportion étant stable dans le temps. Par ailleurs, comme le montre la figure 2, les dons Ag HBe positifs présentent des charges virales plus élevées.

Figure 2 : Relation entre la charge virale et le statut Hbe sur 1205 dons Ag HBs positifs collectés entre 2005 et 2008 (107 AgHBe pos, 1082 Ac HBe pos, 14 HBe neg, 2 Ag et AcHBe).



Sur les 4116 donneurs trouvés AgHBs positifs entre 1999 et 2008, 3287 (79.9%) ont bénéficié d'un **sous-typage de l'Ag HBs** et 85,1% d'entre eux (n = 2798) ont pu être entièrement typés. Les 14,8% 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.

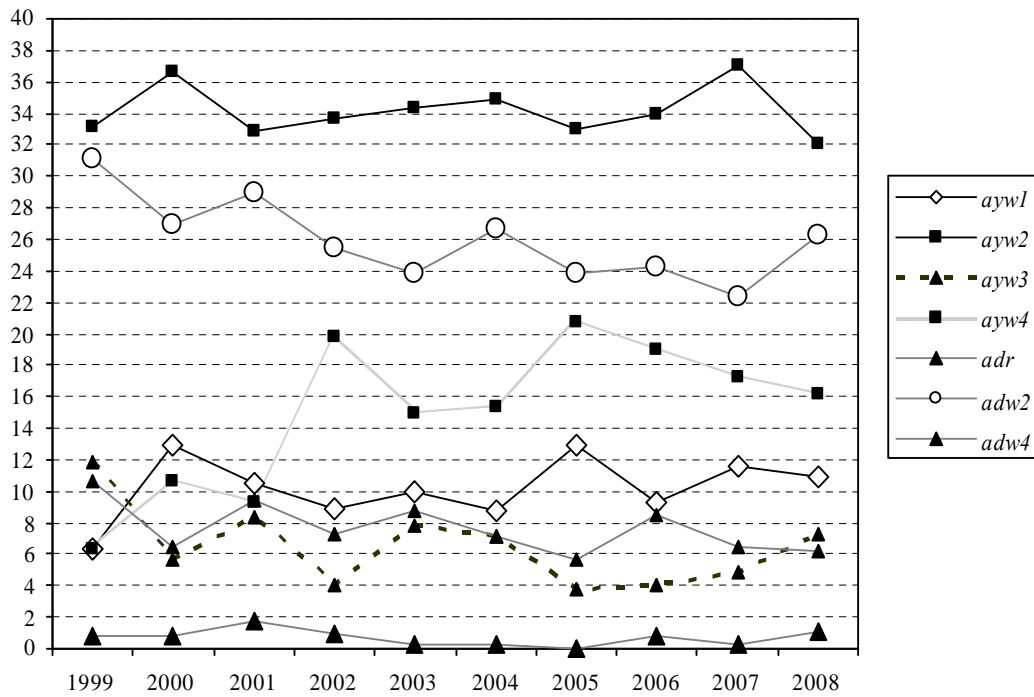
Le tableau 4 et la figure 3 montrent l'évolution de la répartition des différents sous-types de l'Ag HBs de 1999 à 2008.

Sur l'ensemble de la période 1999-2008, 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) (25,9 %). 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 10,2%, 14,9% et 7,6%. Toutefois, une dynamique des sous types a pu être observée au cours du temps comme montré dans la figure 3 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 2002 une relative stabilisation des proportions est observée.

Tableau 4 : Répartition des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1998 et 2008 (incluant les Antilles entre 2006 et 2008)

Sous- types	1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		total	
	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	285	10,2
<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	32,1	957	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	180	6,4
<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	16,1	418	14,9
<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	213	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	72	26,3	725	25,9
<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	20	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	274	100	2798	100,0
N analysés	300		314		327		334		362		365		306		303		317		328		3287	
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%)		54 (16,5%)		489 (14,9%)	

Figure 3 : Evolution de la part relative (en %) des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2008 (incluant les Antilles entre 2006 et 2008)



Le tableau 5 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 (45,4%), le sous-type ayw2 avec le bassin Méditerranéen (50,4%), les sous-types ayw3 et adw2 avec l'Europe (67,6% et 63,4%, respectivement), le sous-type ayw4 avec l'Afrique sub-saharienne (78,8%) et du sous-type adr avec l'Asie (61,7%).

Tableau 5 : Proportion (%) des différentes origines géographiques des donneurs Ag HBs positifs en fonction du sous-type 1999-2008

Origine géographique	ayw1		ayw2		ayw3		ayw4		adr		adw2		adw4		Total sous typés		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Europe ¹	43	17.1	270	34.6	98	67.6	59	15.6	47	25.7	396	63.4	9	52.9	922	38.8	
Bassin Méditerranéen	12	4.8	393	50.4	19	13.1	6	1.6	0	0	42	6.7	0	0	472	19.8	
Afrique Saharienne	Sub	114	45.4	59	7.6	8	5.5	298	78.8	1	0.5	50	8.0	0	0	530	22.3
Asie		62	24.7	11	1.4	3	2.1	1	0.3	113	61.7	50	8.0	0	0	240	10.1
Autre		20	8,0	47	6.0	17	11.7	14	3.7	22	12.0	87	13.9	8	47.1	215	9.0
Sous total		251	100,0	780	100.0	145	100.0	378	100.0	183	100.0	625	100.0	17	100.0	2379	100.0
Ethnie inconnue		34 (11.9%)		177 (18.5%)		35 (19.4%)		40 (9.6%)		30 (14.1%)		100 (13.8%)		3 (15.0%)		419 (15.0%)	
Total		285 (10.0%)		957 (34.0%)		180 (6.0%)		418 (15.0%)		213 (8.0%)		725 (26.0%)		20 (1.0%)		2798 (100%)	

¹ Bassin Méditerranéen exclu

L'analyse moléculaire a été réalisée sur 1275 dons Ag HBs positifs collectés de 2005 à 2008. Parmi ces 1275 dons, 176 (13.8%) 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 2008.

On note une prévalence plus élevée de génotype D (43,0%), suivie des génotypes A (26,8%) et E (17,2%) puis des génotypes B (6,8%), C (6,2%) et F (0,6%).

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, $p < 10^{-4}$).

Par ailleurs, il existe une différence ($p < 10^{-4}$) dans les charges virales observées entre les génotypes : les génotypes B avaient en effet une moyenne de la charge virale la plus élevée (4,7 log IU/ml) et les génotypes D la moins élevée (3,1 log IU/ml).

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 (26,2% dans notre population) et de 18% à 41% (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 6 compare la répartition des génotypes entre les donneurs Ag HBs positifs ayant fait un don aux Antilles entre 2006 et 2008 et ceux ayant donné en Métropole entre 1999 et 2008 et à la Réunion (2006-2008). 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 80% de celles pour lesquelles le sous type a pu être déterminé sont A1 et 90,5% (19/21) sont de sérotype adw2.

La corrélation entre sérotype et génotype figure dans le tableau 6. Sur les 1281 échantillons étudiés, 1078 (84,1%) ont été sérotypés et 1099 (85,8%) génotypés. Parmi ces échantillons, 957 (74,7%) ont été caractérisés par les 2 méthodes (encadré dans le tableau 7), 61 (4,8%) n'ont pu être caractérisés par aucune des méthodes, 142 (11,1%) uniquement par séquençage et 121 (9,4%) uniquement par sérotypage.

Parmi les 957 échantillons caractérisés par les 2 méthodes, 13 (1,3%) étaient discordants selon la classification admise liées à des mutations modifiant le sérotype.

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 ont été retrouvées pour 66 échantillons (5,9%). Toutefois, il convient de noter que les variants retrouvés dans cette population ont été détectés par les troupes 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 troupes.

Tableau 6: Comparaison de la répartition des génotypes du VHB entre les souches provenant des donneurs de sang prélevés aux Antilles (2006-2008) et sur le reste du territoire (Métropole 1999-2008 et Ile de la Réunion 2006-2008)

génotype	Antilles		Métropole		p
	N	%	N	%	
A	30	75%	263	24,9%	<10-3
B	1	2.5%	74	7.0%	NS
C	0	0%	68	6,4%	na
D	7	17.5%	465	44.0%	<10-3
E	2	5,0%	180	17,0%	0.05
F	0	0%	7	0.7%	na
TOTAL	40		1057		

Figure 4: Répartition des génotypes du VHB chez 1099 donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2008

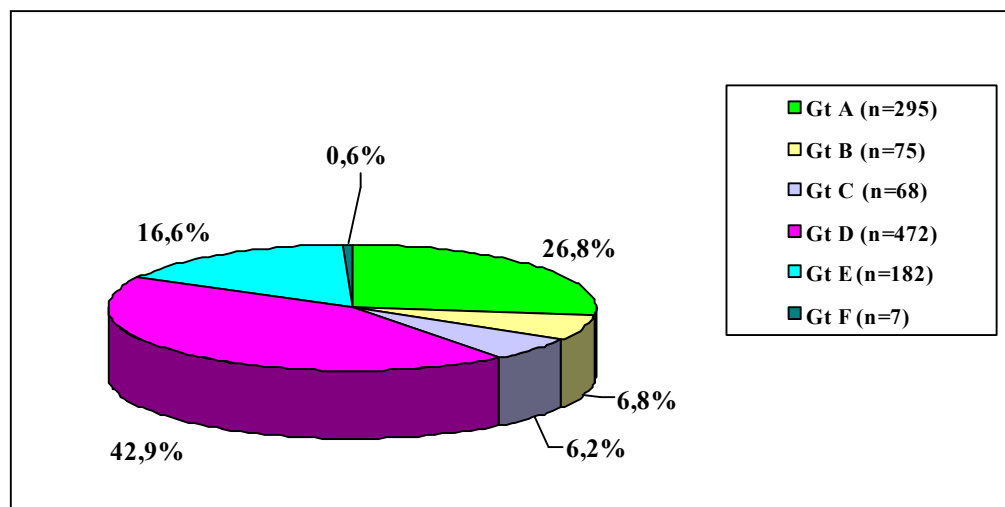


Figure 5: Evolution des proportions (%) des différents génotypes du VHB chez les donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2008

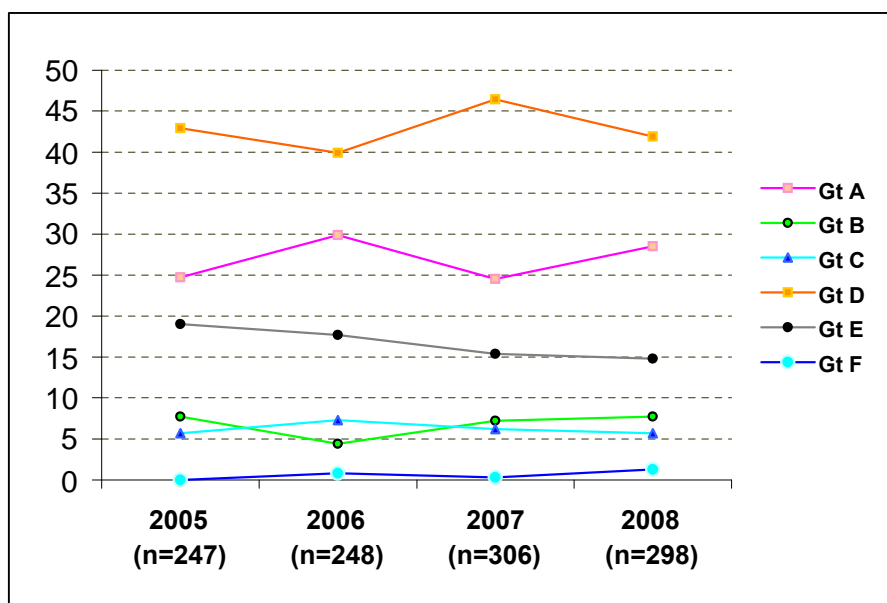


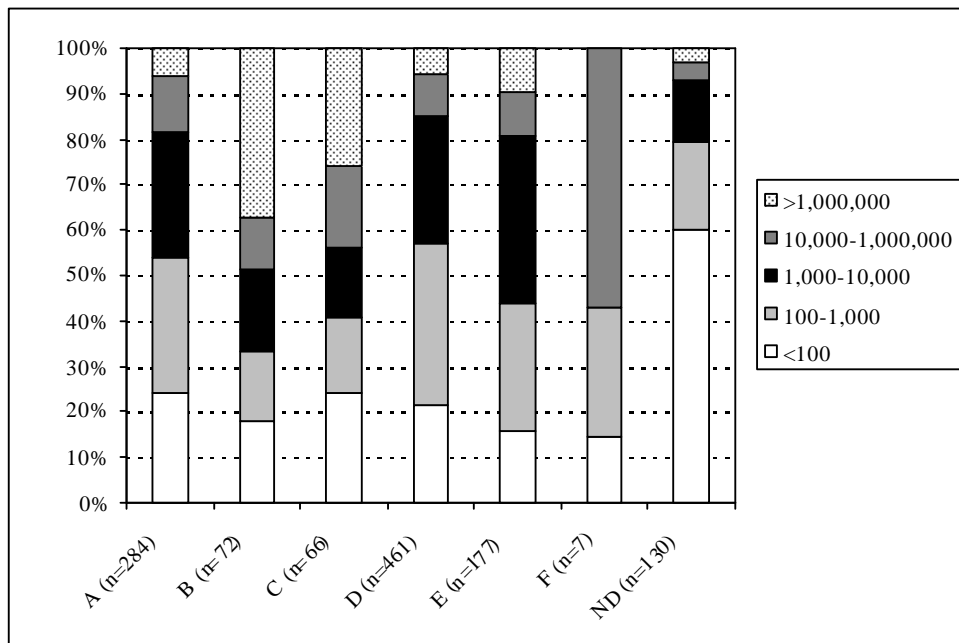
Tableau 7 : Répartition des génotypes du VHB et relation avec le sérotype chez 1074 donneurs de sang entre 2005 et 2008

Sous- types	Génotypes							Total				
	ayw1	ayw2	ayw3	ayw4	adw2	adw4	adr	ss typés	Non typable	Non testés	TOTAL	
A	66 (63.4%)	2 (0.6%)			202 (88.3%)			270	17	8	295	26.8%
B	37 (35.6%)				26 (11.3%)			63	12		75	6.8%
C		1 (0.3%)					62 (100%)	63	4	1	68	6.2%
D	1 (1.0%)	329 (96.8%)	45 (100%)	4 (2.3%)				379	84	9	472	43.0%
E		8 (2.3%)		167 (97.7%)	1 (0.4%)			176	4	2	182	17.2%
F						6 (100%)		6	1		7	0.6%
Total genotypés	104	340	45	171	229	6	62	957	122	20	1099	100%
Non génotypables	17	28	8	25	30	0	9	117	50	9	176	
Non testés	0	0	0	1	2	0	1	4	2	4	10	
TOTAL	121	368	53	197	261	6	72	1078	174	33	1285	

En gras les discordances de classification entre génotypes et sérotypes

La figure 6 fait état de la relation entre charge virale et génotype sur 1197 souches. Cette représentation montre que les charges virales se situent majoritairement entre moins de 100 et 10^4 UI/ml pour les génotypes les plus fréquemment rencontrés, A, D et E (79.9,5%, 83.4% et 77,1% respectivement). Les charges virales les plus élevées ont été observées chez les donneurs contaminés par le génotype B (moyenne 4,67 log UI/ml) et C (moyenne 3,99 log UI/ml) contre une moyenne générale de 3.0 log UI/ml (différence statistiquement significative).

Figure 6 : Proportions (%) des charges virales en fonction du génotype du VHB chez 1197 donneurs de sang en 2005 et 2008 en fonction du génotype.(ND : génotype non déterminé)



Le statut vis à vis des anticorps anti-Delta des donneurs Ag HBs positifs est le suivant :

Tableau 8: Prévalence des anticorps anti-Delta chez les donneurs de sang Ag HBs positifs de 1997 à 2008

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Total
n testés	246	326	282	305	318	336	359	350	294	274	331	313	3734
Positifs	3	3	4	1	4	4	4	4	3	4	9*	13**	56
%	1,22	0,92	1,42	0,33	1,26	1,19	1,11	1,14	1,04	1,4	2,72	4,15	1,49

* 3/9 taux faible

** 9/13 taux faible

Parmi les donneurs Ag HBs positifs 1,49 % présentent une co-infection par le virus Delta entre 1997 et 2008. L'augmentation du pourcentage de donneurs avec des anticorps anti-delta

en 2007 et 2008 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 collaboration avec le laboratoire associé au CNR pour l'étude du virus Delta, nous avons mené une étude visant à caractériser de manière rétrospective les donneurs présentant des anticorps anti Delta. Trente cinq échantillons collectés entre 1997 et 2006 et disponibles en volume suffisant pour être étudiés, ont été analysés par biologie moléculaire. Ce panel d'échantillons se composait de 14 échantillons ayant présenté un taux élevé d'anticorps anti Delta, 4 un taux faible et 17 un taux douteux. Les premiers résultats sont les suivants : 7 échantillons avaient de l'ARN Delta détectable, tous faisaient partie des échantillons à taux élevé d'anticorps : 5 étaient de génotype 1, 1 de génotype 7 et 1 n'a pas été typé. Les 7 donneurs étaient originaires d'Afrique. Une analyse plus approfondie des résultats notamment concernant les relations épidémiologiques est en cours. Par ailleurs l'étude moléculaire des souches de 2007 à 2008 est en cours.

3.2.2 Le VHC

Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHC

Le tableau 9 et la figure 7 donnent la comparaison des taux de positivité pour le VHC observés entre 1993 et 2008 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

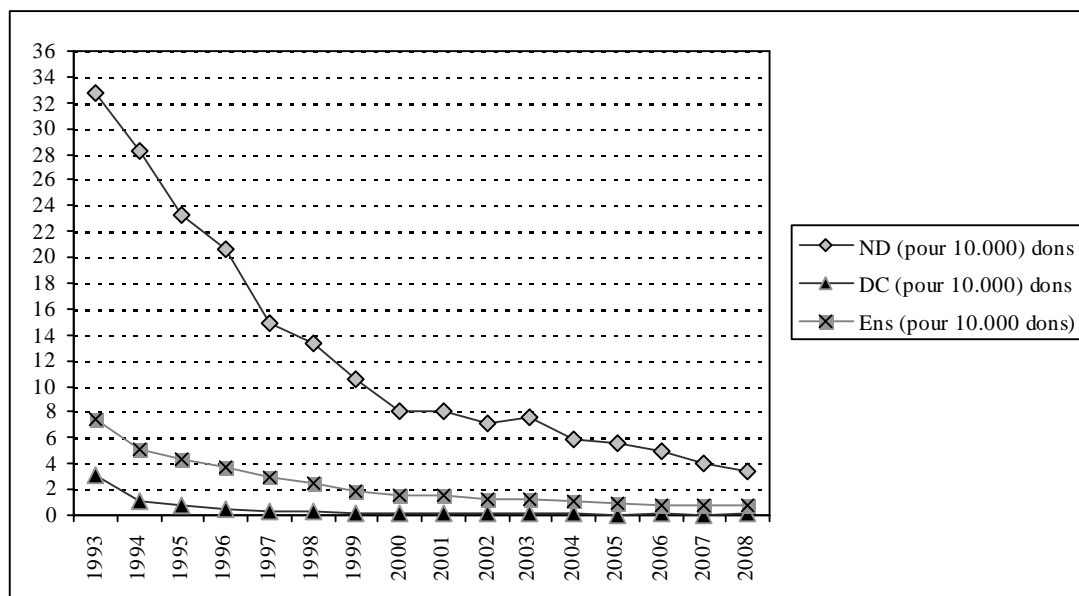
Tableau 9 : Taux des dons de sang VHC positifs de 1993 à 2008.

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	225	5,97	28 ⁽²⁾	0,13	253	1,01
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

⁽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 2008. (ND : nouveaux donneurs, DC : donneurs connus, ens : ensemble)

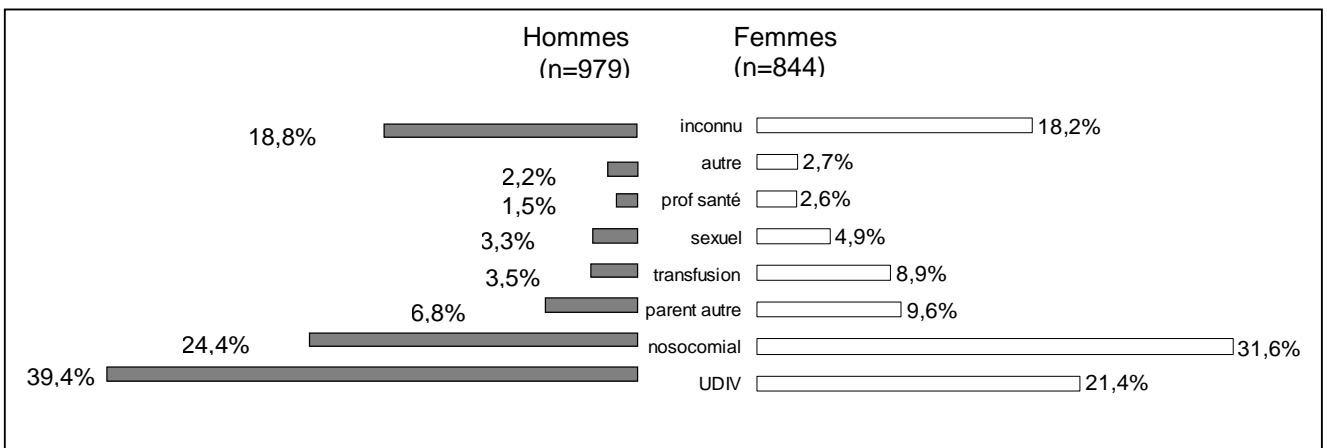


Une baisse régulière des taux est observée liée, d'une part à une sélection progressive de la population des donneurs connus, et d'autre part à une meilleure maîtrise des facteurs de risque qui a permis d'éliminer des candidats au don potentiellement à risque lors de l'entretien précédent le don.

Les facteurs de risque renseignés pour 59.9% (1823) des 3045 nouveaux donneurs VHC positifs entre 1998 et 2008 (figure 8) , montrent que près de 20% n'ont aucun facteur de risque identifié, et que la toxicomanie (39,4% chez les hommes et 21.4 % chez les femmes) et les expositions nosocomiales (24,4% chez les hommes et 31.6% chez les femmes) restent au premier plan des modes de contaminations potentiels retrouvés chez ces sujets.

Par contre (résultats non montrés), chez les 179 donneurs connus (80 hommes et 99 femmes) ayant présenté une séroconversion documentée et interrogés sur leur facteur de risque (soit 72% des 249 de cette catégorie entre 1994 et 2008), la toxicomanie par voie IV représente le facteur de risque le plus fréquemment identifié chez les hommes (23%) 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 28%.

Figure 8 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHC+ interrogés sur FdR 1998-2008 (n = 1 823)



Surveillance virologique de l'infection par le VHC

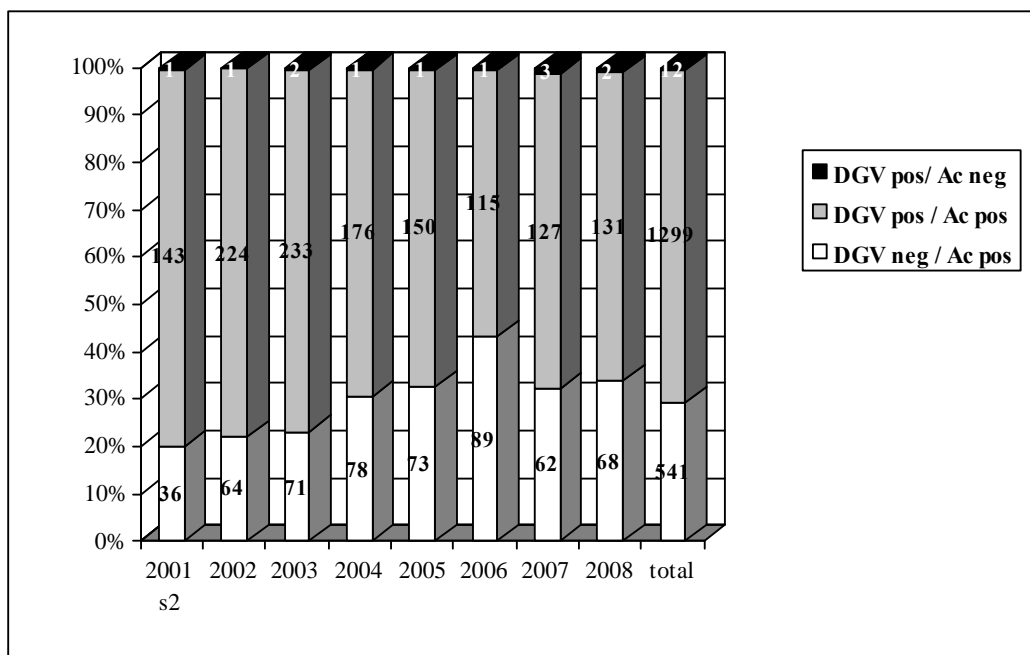
Sur la période 2000-2008, le laboratoire a reçu 1853 échantillons de donneurs VHC positifs, ce qui représente 77% des 2411 donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 9 ans.

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 10, la proportion de dons VHC positifs virémiques est en moyenne de 75.6 % avec toutefois une tendance à la baisse de cette catégorie (figure 9). 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 10 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2000 et 2008 (semestre 1) en fonction des résultats de la virémie.

	2000		2001 (S1)		2001 (S2)		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		total	
	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	1593	72,4
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	605	27,0
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	12	0.6
TOTAL	253		105		180		289		306		255		224		205		192		201		2210	

Figure 9 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2001 (semestre 2 : début du DGV) et 2008 (semestre 1) en fonction de la virémie (n=1852). (s2 : 2^{ème} semestre)



La figure 10 fournit la répartition des charges virales déterminées sur 248 donneurs prélevés en 2007 et 2008. Deux 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 et le second était porteur chronique avec une CV faible. Dans le tableau 11 figure la répartition des CV en fonction des génotypes. Il existe une différence significative dans cette répartition en fonction des génotypes ($p < 0.05$) : les génotypes 1b, 2 et 5 présentant des valeurs plus élevées. Cette observation demande néanmoins d'être confirmée sur un effectif plus élevé et corrélée avec des données épidémiologiques et démographiques.

Figure 10 : Répartition des charges virales du VHC chez 248 donneurs de sang virémiques prélevés en 2007 et 2008

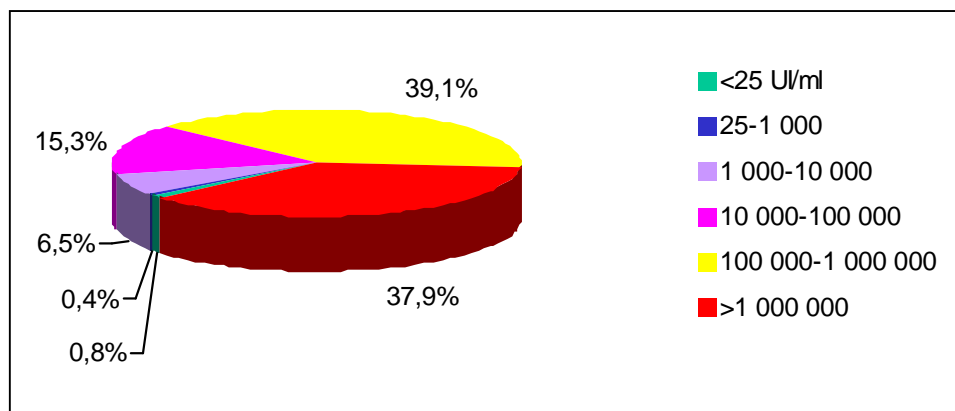


Tableau 11 : Répartition des CV VHC en fonction des génotypes (2007-2008)

CV log UI/ml	Gen1a (n=78)	Gen1b (n=63)	Gen2 (n=27)	Gen3 (n=50)	Gen4 (n=25)	Gen5 (n=3)	NG (n=2)	TOTAL (N=248)
<1.39	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	4,0%	0,0%	50,0%	0,8%
1.39-3	0,0%	1,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%
3-4*	2,6%	1,6%	7,4%	14,0%	16,0%	0,0%	0,0%	6,5%
4-5	10,3%	12,7%	7,4%	24,0%	28,0%	0,0%	50,0%	15,3%
5-6	46,2%	38,1%	25,9%	44,0%	28,0%	33,3%	0,0%	39,1%
>6*	41%	46,0%	59,3%	18,0%	24,0%	66,7%	0,0%	37,9%

NG : non génotypables

*différence significative ($p < 0.05$)

Sur les 1593 donneurs trouvés ARN VHC positifs entre 2000 et 2008, 92,6 % (n = 1475) 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.

Sur la période 2000-2008, le génotype le plus fréquent est le génotype 1 (56,5 %), suivi par le génotype 3 (21,3 %), le génotype 2 (11,9 %) 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 2007-2008. Une analyse des facteurs en cause est en cours.

Figure 11 : Répartition des génotypes du VHC chez 1475 donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2008

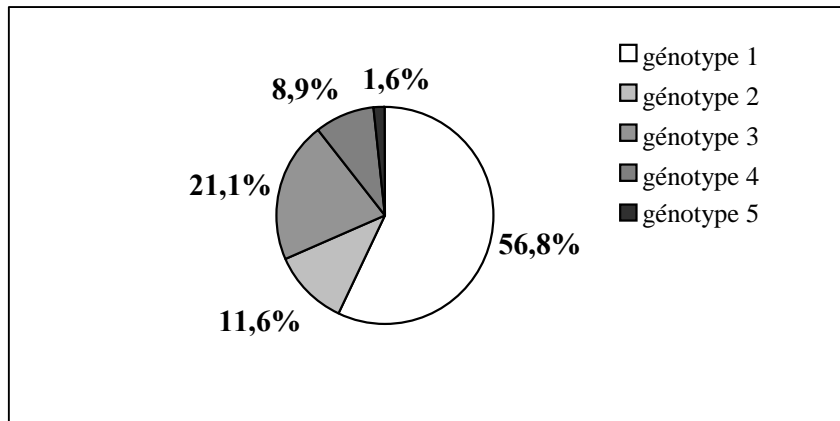
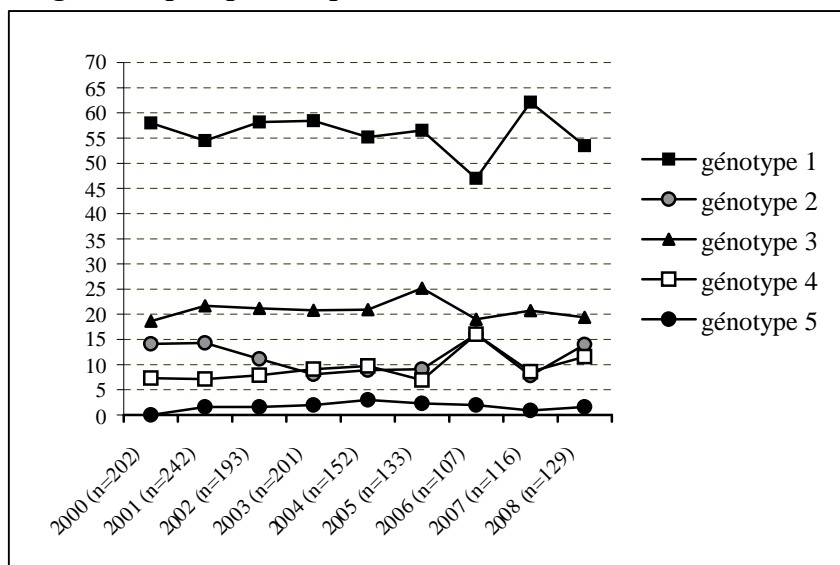


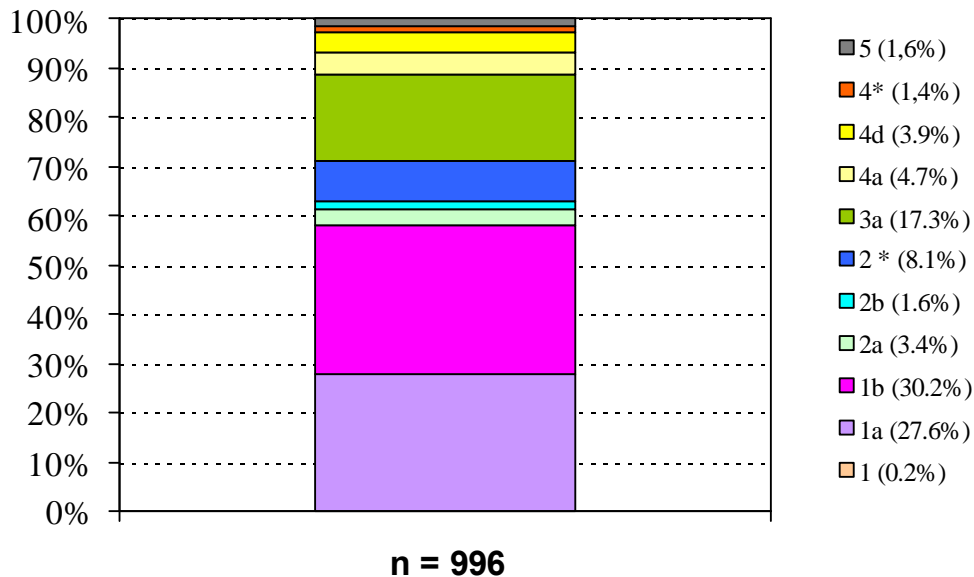
Figure 12 : Evolution de la répartition (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2008



L'analyse moléculaire par séquençage de 996 souches (578 génotypes 1, 130 génotypes 2, 172 génotypes 3, 100 génotypes 4, 16 génotypes 5) collectées durant cette même période rend compte d'une grande variabilité des sous-types, comme le montre la figure 13.

Parmi les 577 donneurs infectés par le génotype 1, 52,1% sont de sous-type 1b et 47,6% de sous-type 1a. L'analyse des 130 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 47,0% et 39,0% des souches de ce génotype.

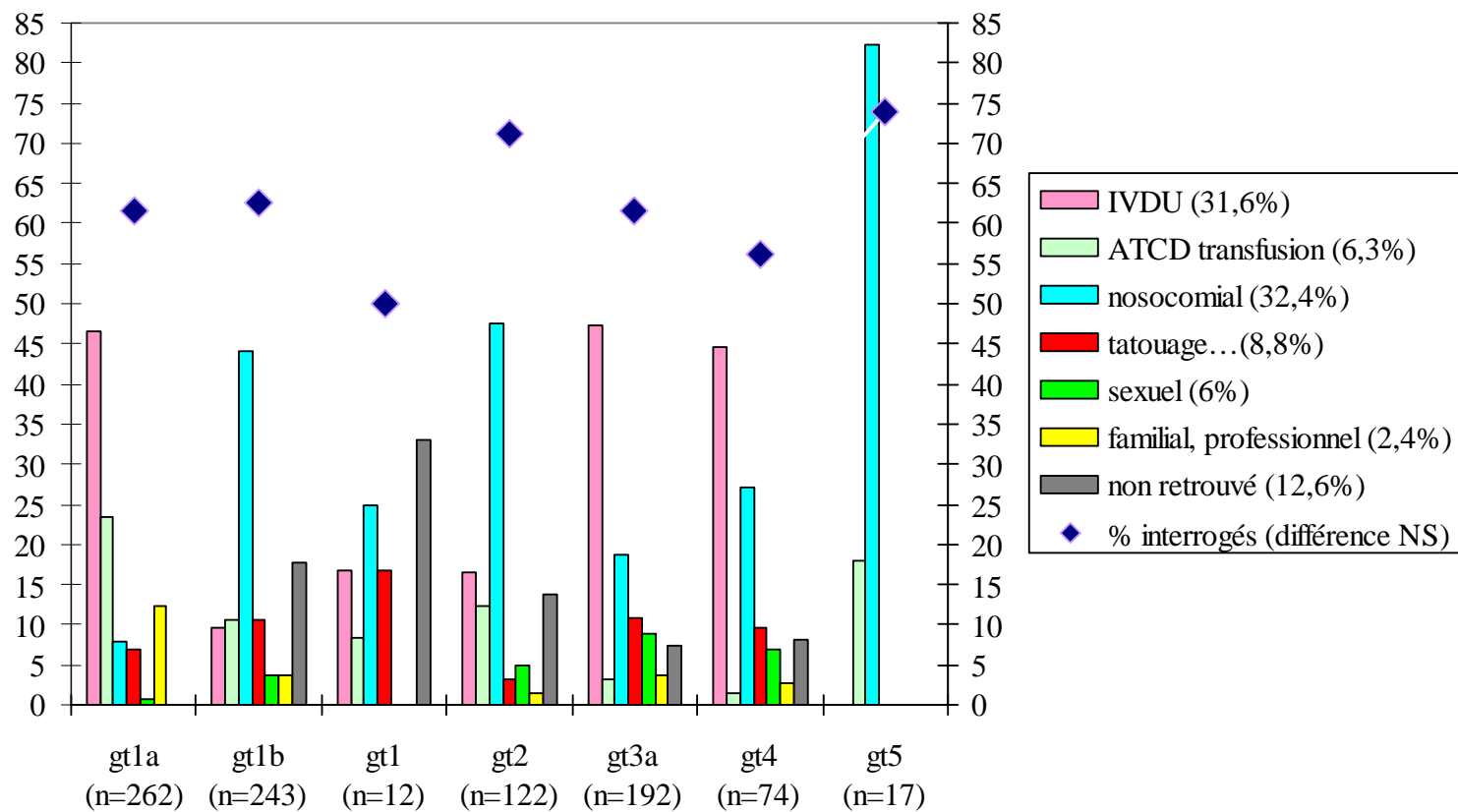
Figure 13 : Répartition des génotypes et des sous-types du VHC sur 996 souches étudiées par séquençage moléculaire.



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 (46,6 % et 47,4 % respectivement) ont été contaminés par toxicomanie intraveineuse comparativement aux autres génotypes. Chez les donneurs avec un génotype 1b ou 2, une proportion plus élevée (44,0 % et 47,5 % 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 2000-2008.



3.2.3 Bilan du DGV et risque résiduel

Depuis la mise en place du **DGV du VHC** le 1^{er} juillet 2001 et jusqu'au 31 décembre 2008 19.3 millions de dons ont bénéficié de cette mesure. Au terme de cette période, 12 dons provenant de donneurs sans anticorps spécifiques ont été identifiés (voir les caractéristiques tableau 12); 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 10 dons pour les 7 premières années de pratique du DGV, soit 0,52 par million de dons.

A noter que 4 des 10 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.

Tableau 12 : Caractéristiques des donneurs dépistés ARN positifs anticorps négatif entre le 1^{er} juillet 2001 et le 30 juin 2008

Cas	Année	Statut	Génotype	Charge Virale	Monolisa HCV Ag/Ab Pos si >1	Sexe/Âge	ND/DC	Facteur de Risque	Remarques
1	2001	FS	1a	4.7x10 ⁷	0,93	M/62	DC	endoscopie	
2	2002	FS	3a	1.2x10 ⁵	0,10	M/35	DC	?	ALT +
3	2003	?	Non testé		Non testé	M/22	ND	?	
4	2003	IS	4a	> 5x10 ⁵	2,58	M/47	ND	?	
5	2004	FS	1b	1.8x10 ⁷ UI/ml	0,50	F/58	DC	AES	
6	2005	FS	1a	2.2x10 ³ UI/ml	0,20	M/20	DC	Partenariat VHC+	
7	2006	?	Non testé	Pos < 25 UI/ml	Non testé	F/40	ND	?	Anti-HBc +
8	2007	FS	1a	1,2x10 UI :ml	0,44	F/39	DC	Partenaire VHC+ Professionnel	
9	2007	FS	1a	négatif	0.26	F/46	DC	Partenaire VHC+ CV : 4.3 log UI/ml (M1)	
10	2007	?	1a	3,3x10 ⁷ UI/ml	2,4	M/47	DC	Non investigué	
11	2008	?	1a	1,9x10 ⁷ UI/ml	1,77	M/64	DC	Nosocomial/sexuel ?	
12	2008	FS	1a	8050 UI/ml	0,5	F/37	DC	partenaire VHC et toxicomane	

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

Le DGV VHB est pratiqué en unitaire dans les DOM depuis janvier 2005 et au CTSA depuis 2006: sur les 193841 dons en ayant bénéficié jusqu'au 31 décembre 2008, 2 dons ont été retrouvés Ag HBs négatif et DGV positif. L'un avait un anti HBc et correspondait 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 5.2 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 13).

Tableau 13 : Bilan du DGV HBV de 2005 au 31 décembre 2008

	DOM (2005-2008)	CTSA (2006-2008)	Total
Dons testés	126313	67528	193841
DGV pos AgHBs pos	1181	34	152 ¹ (93.9%)
DGV pos AgHBs neg	22	0	2 ² (1.2%)
DGV neg AgHBs pos	8	0	8 (4.9%)
Total	128	34	1623

¹ Dont 3 anti-HBc neg

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

³ 158/162 anti-HBc pos

Le risque résiduel sur la période 2006-2008 est de 1 pour 1/8,2 millions de dons (IC 5% : -0 - 1/1 200 000) pour le VHC et 1 pour 1 million de dons (IC 5% : 0 – 560 000) pour le VHB.

La méthode révisée pour le VHB fournit une estimation peu différente statistiquement, mais moins variable dans le temps (voir tableau 14). Cette méthode semble plus robuste que la méthode classique et montre une relative stabilité du risque VHB.

Tableau 14 : 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

1) Infections VHB aigües

Nous avons poursuivi notre participation 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.

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.

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.

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 quelques 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)

La corrélation avec les CV est en cours d'étude

5) Test d'incidence du VHC

A l'instar du VIH pour lequel des « tests d'infection récente » ont été développés de manière à évaluer l'incidence de l'infection, le VHC fait l'objet de développements similaires. Le laboratoire de Virologie du CHU de Tours (Catherine Gaudy) a entrepris la mise au point d'un test d'avidité des anticorps anti-VHC visant à étudier l'incidence de l'infection. Nous avons fourni des échantillons de sujets prélevés dans différentes phases de l'infection pour valider ce test.

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'Hémodiagnostique, 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 2009

Publications

Laperche S, Boukatou G, Kouegnigan L, Nébié Y, Boulahi MO, Tagny CT, Yahaya R, Tapko JB, Murphy E, Lefrère JJ. Transfusion safety on the African continent: an international quality control of virus testing in blood banks. *Transfusion*. **2009** 49: 1600-8

Pillonel J, Brouard C, Laperche S, Barin F, Bernillon P, de Valk H; Groupe de Travail Afssaps, EFS, INTS et InVS Quantitative estimate of the risk of blood donation contamination by infectious agents *Transfus Clin Biol*. **2009** 16 :138-145

Thibault V, Laperche S, Akhavan S, Servant-Delmas A, Belkhiri D, Roque-Afonso AM. Impact of hepatitis B virus genotypes and surface antigen variants on the performance of HBV real time PCR quantification. *J Virol Methods*. **2009** 159:265-270.

Morice Y, Ratinier M, Miladi A, Chevaliez S, Germanidis G, Wedemeyer H, Laperche S, Lavergne JP, Pawlotsky JM. Seroconversion to hepatitis C virus alternate reading frame protein during acute infection. *Hepatology*. **2009** ;49(5):1449-1459.

Nathalie Floret N, Marquant A, Laperche S, Coignard B, Poujol I, Lot F Nosocomial transmission of hepatitis B from an infected healthcare worker to a patient, France, *BEH* **2009** n°18-19.

Communications orales.

Le risque résiduel lié au VHB, Laperche S, Pillonel J
XXIV^{ème} Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Strasbourg, 23-25 juin 2009

Etude de la diversité virale du VHB chez les donneurs de sang en France
Servant-Delmas A, Girault A, Mercier M, Jourdain C, Caparros R, Dubois N, Razer A, Portal C, Laperche S
Journée d'automne de la SFTS, Paris, 14 novembre 2009

Prévalence de la mutation G1896A du virus de l'hépatite B chez 100 donneurs de sang français. Ducancelle A, Dupuits E, Maniez M, Beuvelet T, Pivert A, Pierre MM, Laperche S, Lunel-Fabiani F.
29^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse. Paris 3-4 décembre 2009,

El Ekiaby M, Laperche S, Moftah F, Burnouf T, Lelie N The impact of different HCV blood screening technologies on the reduction of transfusion transmitted HCV infection risk in Egypt
XIXth Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Le Caire, Egypte– 21-25 mars 2009

Communications affichées

Polymorphisme génétique du virus de l'hépatite B chez les donneurs de sang en France (2005-2007) Mercier M, Servant-Delmas A, Girault A, Jourdain C, Razer A, Portal C, Caparros R, Laperche S
XXIV^{ème} Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Strasbourg, 23-25 juin 2009

Deux enquêtes descendantes de transmission transfusionnelle du virus de l'hépatite B. Servant-Delmas A, Chuteau C, Lefort C, Piquet Y, Chevaleyre S, Betbeze V, Delhoume M, Laperche S
XXIV^{ème} Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Strasbourg, 23-25 juin 2009

Enquête descendante d'hémovigilance : transmission transfusionnelle du virus de l'hépatite B (VHB) Lefort C, Boureille G, Chuteau C, Folléa G, Betbeze V, Laperche S, Servant-Delmas A
XXIV^{ème} Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Strasbourg, 23-25 juin 2009

Mercier M, Servant-Delmas A, Girault G, Jourdain C, Razer A, Portal C, Caparros R, Laperche S. Genetic polymorphism of Hepatitis B virus (HBV) IN French blood donors.
International meeting for the molecular biology of hepatitis B viruses, Tours, France 30 août - 2 septembre 2009

Sensitivity of 8 Hepatitis B surface Antigen assays Ly TD, Servant-Delmas A, Wind F, Mercier M, Laperche S
XXth Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Nagoya, Japon - 14-18 novembre 2009

Séminaires et conférences sur invitation

- *IPFA/PEI¹ 6th workshop on « Surveillance and screening of blood borne pathogens » Brussels, Belgique, 26-27 Mai 2009*
NAT and HCV Ag testing performance for reducing the HCV window phase
Laperche S.

- *Roche infectious diseases symposium Barcelona 8 th October, 2009*
Roche infectious diseases symposium Barcelona 8 th October, 2009
Simultaneous detection of anti-HCV Ab and HCV core antigen
Laperche S.

7/ Programme d'activité 2010

1) La surveillance virologique des donneurs de sang va être poursuivie.

Celle-ci, étendue aux anticorps anti-HBs pour une partie des dons collectés en 2008 sera systématisée pour la surveillance des donneurs AgHBs positifs collectés à partir des dons de 2009. En effet, la coexistence des 2 marqueurs HBs pourrait témoigner de la sélection de souches échappant au système immunitaire (Lada O, J Virol. 2006) qu'il conviendra d'explorer. La détermination de la spécificité des antiHBs présents dans de tels échantillons pourrait faire l'objet d'études spécifiques permettant d'expliquer le phénomène.

2) Le virus Delta

L'analyse des donneurs 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 trousse de détection de l'Ag HBs à reconnaître les particules virales des différents génotypes 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 génotypes 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 trousse 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

La mise en évidence d'infection par plusieurs génotypes du VHB dans la population des donneurs de sang nous incite à poursuivre l'exploration des infections mixtes sur un plus grand nombre d'échantillons, afin de déterminer des facteurs d'exposition particuliers qui leur seraient associés. En effet, les infections multiples pourraient être le résultat d'une surinfection par des souches de génotypes différents, à la faveur d'expositions multiples, phénomène possible en particulier chez les sujets provenant de zones d'endémie. L'étude chez les donneurs de sang se poursuit donc actuellement sur 100 dons supplémentaires avec la même méthodologie.

L'objectif est de comprendre le mode d'acquisition des infections mixtes: sont-elles le résultat d'une co-infection ou d'une sur-infection? La recherche d'infections mixtes chez des sujets présentant une hépatite B aiguë d'une part, et chez des sujets présentant une hépatite chronique d'autre part, permettra de préciser leur mode d'acquisition. La comparaison de la fréquence de ce phénomène dans les deux populations permettra également de déterminer si les patients

infectés chroniquement sont plus sujets à une sur-infection. Les donneurs de sang étant majoritairement des porteurs chroniques asymptomatiques du VHB, l'étude sera étendue à des sujets récemment infectés et recrutés dans le cadre de la déclaration obligatoire de l'infection aiguë à VHB (collaboration avec V. Thibault) ainsi qu'à des malades présentant une infection chronique et faisant l'objet d'un recrutement hospitalier (collaboration avec V. Thibault ; A. Ducancelle, Laboratoire de Virologie, Angers ; le laboratoire associé au CNR des hépatites B, C, et Delta, Hôpital Avicenne, Bobigny, E. Gordien). L'interprétation des résultats de génotypage INNO-LiPA étant parfois délicate en raison de réactivités non spécifiques et de profils d'hybridation incomplets d'une part, et la confirmation par clonage moléculaire restant une approche contraignante techniquement d'autre part, le pyroséquençage haut débit, l'Ultra Deep Pyrosequencing (UDPS) offre une alternative intéressante pour la recherche d'infection mixte des populations présentées précédemment.

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 pourrons 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.

Ce projet a fait l'objet d'une demande de financement à l'ANRS dans le cadre du 2^e appel d'offres 2010.

5) Mutants Pre C/Core du VHB chez les donneurs de sang

Le projet visant à établir la prévalence des mutants Pre 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 est en cours, 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 se poursuit actuellement sur 100 nouveaux dons, en collaboration avec Alexandra Ducancelle, CHU-Angers.

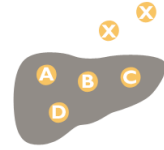
6) Un nouveau panel destiné au contrôle de qualité des outils de dépistage des infections virales par VIH, Ag HBs et VHC utilisés pour la qualification des dons de sang en Afrique sub saharienne et au Maghreb sera distribué à 74 laboratoires de 18 pays. Outre d'établir un état des lieux des performances 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.

Fait à Paris le 6 avril 2010
Syria LAPERCHE

V

**LABORATOIRE ASSOCIE
RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT**

**Hôpital Paul Brousse
Villejuif**



LABORATOIRE ASSOCIE

Epidémiologie Moléculaire
et
Recherche et Développement

RAPPORT D'ACTIVITE SCIENTIFIQUE

2009

Dr Valérie THIERS
Directeur Adjoint
CNR Hépatites B, C et D

1/ Introduction

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du laboratoire associé

Le laboratoire associé au CNR pour les hépatites B, C et Delta dispose d'une expertise dans le typage moléculaire et analyse phylogénique. Ainsi parmi les missions du CNR définies par l'arrêté du 29 novembre 2004, ses missions sont plus particulièrement de

- Contribuer à la surveillance des types viraux VHB et VHC circulants en France et à la détection de virus mutants émergents (VHB) susceptibles de poser des difficultés, diagnostiques, de prise en charge thérapeutique ou d'efficacité vaccinale,
- Contribuer à la surveillance de la résistance du VHB et du VHC aux anti- virus,
- Contribuer, à l'étude des modalités de transmission résiduelle,

1.2 Résumé des activités de l'année 2009

Contribution à la surveillance nationale

L'enquête de veille épidémiologique menée par l'InVS sur des assurés sociaux (âgés de 18 à 80 ans) de 2003 à 2004 indique que dans cet échantillon national 36% des sujets dépistés anti-VHC(+) sont négatifs pour l'ARN du VHC, dont 21% étaient naïfs de tout traitement. Parmi les sujets non traités, 43% ont une charge virale supérieure à 5.9 log₁₀ IU/ml. La prévalence de l'ARN du VHC était plus élevée chez les hommes que chez les femmes (75% vs 58%) sans différence en ce qui concerne le niveau de la charge virale. La fréquence de détection de l'ARN du VHC diminue avec l'âge des sujets (<40ans : 85% vs >60ans: 58%). L'analyse de la diversité des souches VHC confirme la circulation en France d'une grande diversité de sous-type des types 1, 2 et 4. Des types 2 de sous-type inconnu ont été identifiés dont la caractérisation est en cours. Pour le VHB, les données moléculaires montrent que plus de 90% des assurés sociaux AgHBs(+) ont une multiplication virale faible (93% <10⁴ UI/ml). L'analyse de la diversité des génotypes de cet échantillon restreint montre la prédominance du génotype A pour lequel nous avons observé la plus grande hétérogénéité avec la détection de 6 sous-types (A2, A1, A3, A4, A6 et A5) suivi du génotype D représenté par quatre de ses sous-types (D7, D1, D3 et D2). Le génotype E est le troisième par ordre de fréquence. Enfin, les génotypes B (B4, B2), C (C2, C1) et F sont minoritaires. Des mutations pouvant affecter la détection de l'AgHBs par les trousseaux de dépistage et conférant une résistance aux analogues nucléos(t)idiques, ont été identifiées respectivement chez 5 et 4 sujets. L'analyse globale des données débutée pour le VHC (épidémiologiques et moléculaires) permet de mieux interpréter l'extrême diversité des isolats du VHC et VHB observée dans cette enquête. Dans l'échantillon national analysé les sujets bénéficiant de la CNU sont surreprésentés. Ils étaient en majorité nés en zone d'endémie intermédiaire ou élevée, jeunes, de sexe féminin et présentaient plus fréquemment des comportements à risques.

L'observatoire national des hépatites aiguës, mené en collaboration avec l'InVS, avait pour objectif de fournir des données moléculaires sur les souches de VHB responsables d'hépatites B aiguës en France. Les données de ce travail collaboratif indiquent que les caractéristiques moléculaires des isolats VHB dans le groupe des hépatites aiguës sont similaires à celles du groupe des infections chroniques en France. Des mutations de préC ou du promoteur basal du gène C (BCP) n'étaient pas associées à une maladie plus sévère. Aucun mutant de résistance aux traitements antiviraux n'a été la source d'infection d'une hépatite aigue dans le groupe étudié.

1.3 Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés

1.31 Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

Personnel Médical

- 0,1 Professeur des Universités- Praticien Hospitalier
- 0,1 Praticien Hospitalier (APHP)

Personnel non-médical

- 0,5 ETP Ingénieur de recherche (IP)
- 1 ETP technicien supérieur (IP)
- 0,5 ETP technicien supérieur (Inserm)
- 0,2 aide de laboratoire (Faculté)

1.32 Organigramme Laboratoire Associé

- Valérie THIERS, directeur adjoint du CNR pour les hépatites virales B, C et Delta
- François Rimlinger, AI

Les activités de recherche sont réalisées grâce à du personnel temporaire, un technicien supérieur (CDD Inserm), des étudiants qui ont été recrutés sous le couvert de l'unité U785.

1.33 Description de la démarche qualité du laboratoire :

Le laboratoire associé ne délivrant pas de résultats de biologie clinique n'est pas soumis à une accréditation. Il a néanmoins initié une démarche qualité dans laquelle il a instauré

- Traçabilité des prélèvements et des analyses (cahiers de laboratoire, référencement des réactifs).
- Contrôle volumétrique annuel des pipettes, des PSM par des sociétés extérieures.
- Sauvegarde informatique en miroir (type RAID1) des données de tous les ordinateurs du CNR (base de donnée de séquence).

Cette démarche sera poursuivie en 2010 par

- mise en place d'un contrôle informatique des températures de congélateurs -80°C (relevé journalier des températures et alarme ; matériel acheté à installer).
- rédaction type GBEA des procédures utilisées pour les activités d'expertise de notre laboratoire.

1.4 Locaux et équipements (CNR et laboratoires associés)

1.41 Surface, plan,

Le laboratoire associé au Centre national de Référence sur les Hépatites Virales B, C et Delta est dirigé par Valérie Thiers. Il est hébergé dans les locaux de l'unité INSERM U 785 dirigée par le PR. Didier Samuel - *Pathogenèse et traitement des hépatites fulminantes et du cancer du foie* -, Cette unité se situe sur le campus du CHU Paul Brousse au 2^{ème} étage (aile Sud) du Centre Hépatobiliaire (CHB). Son interaction étroite avec les chercheurs de l'unité Inserm U785 et les cliniciens du centre hépatobiliaire, centre spécialisé dans le traitement des maladies du foie, le situe dans un contexte scientifique de haut niveau.

Le Laboratoire Associé est constitué de 3 modules (double module de bureau et module laboratoire de post-PCR). Il possède en propre tout l'équipement nécessaire à la réalisation de sa mission (détaillé ci-dessous). Il a par ailleurs libre accès aux équipements de l'unité Inserm U 785 (250 m²) et au plateau de l'IFR. En effet, la spécificité des techniques utilisées conduit à utiliser des locaux spécialisés

appartenant à l'unité 785. Ces locaux particuliers ou « modules PCR » répondent aux critères stricts d'un « L2 », (35m² situés au 1^{ier} sous-sol du CHB pièce d'extraction, pièce de MIX), et permettent d'assurer en toute sécurité (expérimentateur et échantillon) la manipulation de sérums et de tissus infectieux. Les modules PCR sont sous sa responsabilité.

1.42 Principaux équipements

- Laboratoire type L2 pré-PCR équipé pour l'extraction des acides nucléiques (PSM, Centrifugeuses, Congélateurs -20 C°, -80°, spectrophotomètre)
- Laboratoire de type L2 pré-PCR (pièce de mix équipée hotte flux positif, congélateurs -20°C..)
- Accès à l'extracteur automatisé du laboratoire de virologie pour les grosses séries d'échantillons.
- Thermocycleurs ABI GENEAMP 9700, 2400
- PCR en temps réel : lightcycler, lightcycler 480 et Cobas Taqman 96 (disponibles sur la plateforme de l'IFR)
- Laboratoire équipé dédié au clonage moléculaire
- Séquenceur automatique 16 capillaires (ABI 3130 disponible sur la plateforme de l'IFR).

2/ Activités d'expertise

2.1 Capacités techniques du CNR

2.11 Liste des techniques de référence

- Techniques et marqueurs épidémiologiques disponibles

- Le laboratoire associé possède une expertise reconnue dans le domaine du typage et de l'épidémiologie moléculaire des virus des hépatites B et C. Cette expertise fait principalement appel à des techniques maison de biologie moléculaire (**PCR**, **RT-PCR** incluant la capacité d'amplifier de longs fragments, la sélection d'amorces, **clonage** moléculaire, **séquençage**) et **d'analyse bioinformatique des séquences** incluant l'interrogation des banques de données, leur analyse phylogénétique, leur caractérisation physico-chimique et l'identification de mutations d'échappement. Notre laboratoire a également accès, si nécessaire, au plateau technique du laboratoire de virologie pour effectuer l'analyse sérologique des prélèvements.

- Marqueurs d'une infection active par le VHB et VHC : détection qualitative et/ou quantitative de la charge virale VHB et VHC à l'aide d'automates et de KIT commercialisés.

- Typage et sous-typage, des isolats par séquençage direct de régions informatives du génome VHC (NS5b et Core_E1), VHB (PréS, S et Polymérase).

Le laboratoire associé réalise une caractérisation moléculaire d'isolats VHB ou VHC par l'intermédiaire de techniques de référence. Cette identification se fonde sur une analyse phylogénétique des séquences virales obtenues en suivant la méthodologie établie par le comité d'experts pour le classement des isolats. Deux sous régions distinctes du génome viral, représentatives du génotype viral sont étudiées. Pour chaque isolat, la séquence nucléotidique consensus est déduite par utilisation de la suite logicielle du DNASTAR (Lasergene® v8.0). L'analyse phylogénétique (Neighborjoining avec le modèle Kimura 2-Parameters) compare les souches étudiées à des souches de référence extraites des banques de données. Un arbre phylogénétique est ensuite modélisé et la fiabilité de la structure des branches est mesurée par une analyse de « Bootstrap » (n=1000). L'ensemble des programmes utilisés pour cette analyse est inclus dans le logiciel MEGA (2).

- Techniques développées l'année 2009

Identification des types et sous-type du VHB par analyse d'une région sous génomique

Huit génotypes du VHB (A-H) et 34 sous-types ont été identifiés. Récemment, deux nouveaux génotypes identifiés en Asie (Vietnam et Japon) ont été provisoirement assignés comme I (3, 4) et J (5). L'alignement de séquences complètes montrent que les 8 génotypes (A-H) ont une divergence intergroupe de plus de 8% (6). À l'exception des génotypes E et G tous les autres types peuvent être maintenant divisés en sous-types qui montrent une divergence > 4% (6). Cependant, pour la désignation des types et sous-types un certain flou persiste dans la classification du VHB et la tenue d'une conférence internationale de taxonomie du VHB serait nécessaire (7).

Rationnel : Récemment la recherche clinique s'est centré sur l'influence de la variabilité génétique variabilité génétique du VHB. De plus en plus de travaux font état d'évolution clinique de la maladie ou de réponse au traitement interféron (IFN) différentes selon le génotype VHB (cf. § 3). En Allemagne, le typage du VHB est recommandé avant de démarrer un traitement par interféron. Par ailleurs les directives récentes de la conférence de consensus soulignent l'importance du typage du VHB dans les algorithmes thérapeutiques pour le traitement de l'hépatite chronique par l'IFN.(8)

Objectif : Déterminer s'il est possible d'identifier une signature moléculaire caractéristique des types et sous-types du VHB en analysant une portion du génome viral.

Résultats : Nous avons choisi un fragment du gène de la polymérase virale déjà ciblé pour la recherche de mutations de résistance aux traitements antiviraux (AA 60-294). Cette région, par l'existence de gènes chevauchants sur le génome du VHB, correspond au gène de l'enveloppe S, sur lequel la présence de mutants d'échappement (S 52-226), en particulier dans la région hydrophile majeure (MHR) est recherchée. Nous avons effectué une analyse phylogénétique comparative des séquences de génomes complets (n=124) représentatives des types et sous-types publiés du VHB et des sous fragments de 700pb et de 500pb. Les arbres phylogénétiques obtenus sont présentés sur la figure 1 jointe en annexe. La topologie des arbres obtenus avec les deux sous régions du gène de la polymérase est similaire à celle de l'arbre construit à partir des séquences complètes. Les deux sous régions permettent donc une identification fiable des différents types et sous-types du VHB.

Modélisation d'amorces

Les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C sont caractérisés par une variabilité génétique importante conduisant à l'identification de nombreux génotypes et sous types. Afin d'identifier les zones conservées du VHB et du VHC nous réalisons une séquence consensus par alignement des séquences complètes non recombinantes du VHB (n= 105 ;A1 à A6, B1à B4, C1 à C8, D1 à D7, E, F1 à F4, G, H) et du VHC (1a, 1b, 1c,1d,1e, 1f 2a n=4, 2b n=3, 2c, 2k, 3a n=4, 3b, 3k, 4a n=7, 4d, 5a n=2, 6a, 6b, 6g, 6h, 6k, 6g, 7a). Ces séquences consensus sont régulièrement enrichies par les isolats viraux nouvellement caractérisés du VHB comme les types I (3, 4) et J (5). A partir de ces alignements des amorces sont régulièrement dessinées selon la nécessité des projets en cours.

- Techniques en développement : principes et état d'avancement

Mise en place d'une PCR grand fragment VHB

Afin d'explorer la présence de recombinants ou d'une infection multi génotypique chez certains sujets, il est nécessaire de disposer de la séquence du génome complet afin d'identifier le point de recombinaison. La PCR génome complet, adaptée de la méthode publiée par Gunther, a été mise en place dans notre laboratoire (9). Elle permet d'obtenir de façon reproductible un fragment amplifié de 3200pb pour des échantillons dont la charge virale est de l'ordre de 10^4 copies.

Pour améliorer la sensibilité de cette PCR génome complet nous avons prévu de combiner une étape de pré amplification basée sur l'utilisation l'ADN polymérase phi29 selon la méthode publiée en 2008(10). Pour l'instant cette optimisation a été différée.

2.12 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Les marqueurs Epidémiologiques pour le VHB et le VHC reposent d'une part sur

- Les marqueurs sérologiques usuels des infections par les VHB et VHC utilisant des trousse commerciales (AgHBs, AgHBe, anticorps anti-HBc, anticorps anti-HBs, anticorps anti-HBe).
- Le génotypage et sous-typage par séquençage d'au moins deux régions virales (VHB gènes S/polymérase, capsid ; VHC gènes NS5b, Core-E1) puis analyse phylogénétique ;
- Clonage possible des génomes complets en cas d'identification d'un nouveau sous-type ou de recombinant.

2.13 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

- Description : nombre de souches, caractérisation

- Tous les échantillons constituant les différentes expertises que nous avons réalisées sont conservés. Les échantillons sériques sont caractérisés au niveau moléculaire (charge virale, génotype, analyse de deux régions virales distinctes). Pour les nouveaux génotypes ou sous-type un clonage de sauvegarde des produits PCR générés pour l'analyse phylogénétique est réalisé (TA-Cloning). L'ensemble de ces prélèvements et clones sont classés et stockés dans les conditions appropriées.

- Collection de clones de Capside d'isolats VHC issus de prélèvements clinique bien caractérisés. Dans le cadre de l'activité de recherche du CNR nous poursuivons la constitution d'une banque plasmidique de séquences de Capside du VHC. (c.f. Activité de recherche § 5.1)

- Nos collections de séquence de référence des types et sous type du VHB et du VHC sont régulièrement enrichies par les nouveaux isolats découverts dans le monde. Les séquences qui sont incluses dans ces fichiers ont été évaluées par analyse phylogénétique (génom complet et sous régions génomiques informatives pour le typage) et la présence de génome recombinant est vérifiée.

- Collection d'amorces pour les VHB et VHC.

- Conditions de stockage

VHB collection stockée à -40°C

VHC collection stockée à -80°C

Glycérols des clones viraux conservés à -80°C

- Conditions de mise à disposition de ces collections

Nos collections d'échantillons sont constituées d'échantillons de volume restreint et dans la mesure du possible nous pouvons fournir aux laboratoires qui le demandent des échantillons sériques de charge virale et génotype connus.

Fichiers de séquence de référence des types et sous type du VHB et du VHC et collection d'amorces sont disponibles sur demande.

Les clones viraux issus des isolats que nous avons caractérisés sont disponibles aux académiques et hospitaliers sur demande.

Les séquences de tous les isolats d'intérêt sont déposées dans les banques de données de séquences et sont ainsi à la disposition de la communauté scientifique.

2.14 Liste des techniques recommandées par le CNR :

- Listes existantes

- Recherche sérologique d'une infection par le VHB ou le VHC à l'aide de tests commerciaux bien validés par de nombreux travaux scientifiques (cf. rapport CNR hépatites en transfusion sanguine)

- Recherche des génomes viraux par PCR qualitative et /ou quantitative en temps réel à l'aide de kits commerciaux qui sont validés (cf. rapport CNR coordonnateur des hépatites virales B, C et Delta)
 - Typage des génomes viraux : La méthode de référence pour la caractérisation moléculaire des isolats viraux est le séquençage partiel de régions informatives ou complet du génome viral. Il existe toutefois des kits commerciaux pour le VHB et le VHC qui identifient les types majeurs avec une certaine robustesse (11, 12, 13). La confirmation du sous-type doit toujours être effectuée par séquençage. En cas d'identification d'un nouveau sous-type, le séquençage d'une seconde région informative est obligatoire et la séquence du génome complet est appréciée pour une classification définitive.
 - Recherche de mutations de résistance : La méthode de référence pour la caractérisation moléculaire des isolats viraux est le séquençage de la région ciblée par la thérapie antivirale. Toutefois des trousse commerciales basées sur une hybridation inverse ont été développées, mais n'identifient que les mutations déjà répertoriées (11, 14).
- Techniques transférées vers d'autres laboratoires
 - Marqueurs d'une infection active par le VHB et VHC : détection qualitative des acides nucléiques du VHB et VHC par des techniques maison dans le sérum, le foie, les cellules du sang périphérique. Détection quantitative du VHB ou du VHC dans le sérum et dans des tissus ou cellules à l'aide de trousse commerciales.
 - Typage et sous-typage, des isolats par séquençage direct de régions informatives du génome VHC (NS5b et Core_E1), VHB (PreS, S et Polymérase) et analyse phylogénétique.
 - Recherche de mutations de résistance par séquençage direct de la région d'intérêt ciblée par les traitements antiviraux.

2.2 Activités d'expertise de l'année 2009

2.21 Décrire le nombre de prélèvements, provenance, origine et le niveau de caractérisation

VHB, Tunisie, 150 échantillons, caractérisation génotypique
VHB, France (patients Africains), 4 échantillons caractérisation génotypique (Laboratoire hospitalier)
VHC, Egypte, 50 échantillons caractérisation génotypique
VHC France, caractérisation phylogénétique 10 échantillons (Laboratoire hospitalier)

Analyse phylogénétique
CPAM VHB n= 65 reprise d'analyse de séquences
CPAM VHC n=150 reprise d'analyse de séquences

2.22 Décrire le nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats

Ces tests phénotypiques ne rentrent pas dans le cadre de nos compétences. Ces tests sont réalisés par le CNR coordonnateur des hépatites virales B, C et Delta

2.23 Décrire le nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués

Fourniture de façon ponctuelle de contrôles VHC et/ou VHB positifs et négatifs à divers laboratoire de recherche de l'Institut Pasteur.

2.24 Analyse de l'évolution des tendances en termes d'activités

Nous poursuivons une activité extrêmement ciblée ayant pour objectif d'étudier des populations sélectionnées, bien caractérisées sur le plan clinique et épidémiologique. Notre volume d'activité est resté identique à celui de l'an passé.

3/ Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections B et C au niveau national en collaboration avec l'InVS

Nous avons participé à deux enquêtes réalisées en France en collaboration avec l'InVS concourant à la surveillance nationale. L'échange de données s'effectue par le biais du rapport annuel d'activité du laboratoire et par un échange régulier d'informations avec les responsables du secteur hépatite de l'InVS (cf. § 3.11, 3.12)

3.11 Surveillance des infections chroniques B et C au niveau National

Une enquête de prévalence nationale et régionale des marqueurs sériques des infections dues aux virus des hépatites B (VHB) et C (VHC) réalisée de 2003 à 2004, sous l'égide de la DGS et de l'InVS, à partir d'un échantillon national d'assurés sociaux (âgée de 18 à 80 ans) du régime général de l'assurance maladie a montré que pour la séropositivité anti-VHC le niveau de prévalence observé (0.9%) est proche de celui de 1994. En revanche pour l'infection chronique par le VHB, un niveau de prévalence de l'AgHBs (0,68%) supérieur à ce qui était proposé jusqu'à maintenant a été observé. (29, 30)

La compilation des fichiers VHC contenant les données moléculaires (CNR-Hépatites), avec les données épidémiologiques (E. Delaroque et C. Larsen, InVS) est en cours, et sera poursuivi en 2010 pour le VHB. Les données moléculaires brutes pour le VHC et le VHB ont déjà été présentées dans les rapports 2007 et 2008 respectivement.

Dans cette population considérée comme représentative de la population générale, l'analyse des données moléculaires et épidémiologiques indique :

- Pour le VHC, parmi les 219 assurés sociaux âgés de 18 à 80 ans dépistés anti-VHC positifs, 36% étaient négatifs pour l'ARN du VHC dont 21% étaient naïfs de tout traitement et 15% avaient été traités par le passé. Une multiplication virale active a été détectée chez 65% des sujets. Parmi les 124 sujets naïfs de tout traitement 43% avaient une charge virale supérieure à 5.9 log₁₀ IU/ml. La prévalence de l'ARN du VHC était plus élevée chez les hommes que chez les femmes (75% et 58% respectivement) mais il n'y avait pas de différence en ce qui concerne le niveau de la charge virale. La fréquence de détection de l'ARN du VHC semblerait diminuer avec l'âge des sujets (18-39 ans : 85% comparé à 60-80 ans: 58%).

Le génotypage du VHC a été effectué pour 143 individus et montre la détection des principaux génotypes du VHC avec le génotype 1 (53%) suivi des génotypes 2 (25%), 3(12%), 4(9%) et 5(0,3%). L'analyse de la diversité des souches VHC de l'échantillon confirme la circulation en France d'une grande diversité de sous-type des types 1, 2 et 4, initialement décrits chez des sujets originaires d'Afrique Centrale et d'Egypte (1d, 1e, 1h, 1l, 1i, 2j, 2k, 2l, 4f, 4k) (31, 32, 33). Nous avons également observé des types 2 de sous-type inconnu dont la caractérisation est en cours.

- Pour le VHB, l'analyse des **données brutes** (compilation des données épidémiologiques à venir) montre que plus de **90%** des assurés sociaux dépistés positifs pour l'antigène HBs sont porteurs d'une multiplication virale faible (93% <10⁴ UI/ml). L'analyse de la diversité des génotypes de cet échantillon (figures 2 à 3 en annexe), malgré la faiblesse des effectifs (n=64), confirme la prédominance du génotype A pour lequel nous avons observé la plus grande hétérogénéité avec la détection de 6 sous-types (A2 n=7, suivi des A1, A3, A4 de même effectif (n=4), A6 (n=2) A5 (n=1)). Le génotype D est le second plus fréquent génotype et quatre de ses sous-types ont été détectés (D7

n=7, D1 n=5, D3 n=3 et D2 n=3). Le génotype E est le troisième par ordre de fréquence (n=14) et n'a pas de sous-type de décrit. Enfin, comme précédemment observé en France les génotypes B (B4 n=3, B2 n=2), C (C2 n=2, C1 n=1) et F (n=1) sont minoritaires. Des mutations dans le gène de l'enveloppe virale (aa87-226), pouvant affecter la détection de l'antigène HBs par les trousse de dépistage ont été identifiées chez 5 sujets. Des mutations de la polymérase virale (aa 95 à 295) conférant une résistance aux analogues nucléotidiques, ont été identifiées chez 4 sujets. L'analyse des données épidémiologiques permettra de déterminer si leur émergence est liée à un traitement antiviral. Comme pour le VHC, la grande diversité des sous-types du VHB identifiés dans cette étude indique la présence probable de sujets originaires d'Afrique sub-saharienne (A2), d'Afrique de l'Ouest (A3), mais aussi d'Afrique du Nord (D7 récemment identifié en Tunisie) et d'Afrique Centrale ou de l'ouest (VHB-E). Par ailleurs les génotypes C sont caractéristiques d'immigrants originaires d'Asie ou des îles du Pacifique (C1 et C2).

L'analyse globale des données (épidémiologiques et moléculaires) permet de mieux interpréter la diversité des isolats du VHC et VHB observée dans cette enquête. Dans l'échantillon national analysé, les sujets bénéficiant de la CNU étaient surreprésentés. Ils étaient en majorité, des sujets nés en zone d'endémie intermédiaire ou élevée (36% vs. 8%), jeunes (60% < 40 ans) de sexe féminin (56% vs. 49%) et présentaient plus fréquemment des comportements à risques (30).

3.12 Observatoire des hépatites aiguës B en France

Le projet d'une surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France, coordonné par le Dr Thibault (SERVI, GH Pitié-Salpêtrière) est mené en collaboration avec l'InVS (D. Antona). Ce projet a obtenu un soutien financier de l'ANRS (co-membres du projet E. Delarocque, S. Laperche, V. Thiers) et l'accord de la CNIL.

L'objectif de ce projet est de recueillir des données moléculaires sur les souches de VHB responsables d'hépatites B aiguës en France. Les informations obtenues seront ainsi les premières à concerner la population générale pour ce type de maladie. Le recueil des prélèvements a été effectué de Mars 2007 à Avril 2008. Au total 150 prélèvements ont été reçus au SERVI provenant de toutes les régions de France. L'index développé par V. Thibault, (mesure d'avidité des anti-HBc et niveau des transaminases) a été utilisé pour identifier les hépatites aiguës.

Les données de ce travail collaboratif indiquent que globalement les 2/3 des échantillons (n=87) reçus correspondraient à une hépatite B en phase aiguë. Dans le groupe des aiguës la moyenne d'âge était de 39 ans et les hommes plus fréquents (71%). La distribution des génotypes était A (49%), D (19%) et E (15%) alors que les génotypes C (6%), F (5%), B (3%) et G (1%) étaient plus minoritaires. Il ne semble pas y avoir de différence très marquée dans la répartition des génotypes du VHB en fonction du stade aigu ou chronique. La moyenne des transaminases était significativement plus élevée (2096 IU/L) dans le groupe des aiguës que dans le groupe des infections chronique (77 IU/L), ($p < 0.0001$). La moyenne des charges virales était comparable dans les deux groupes (5.7 vs. 5.9 log₁₀ IU/mL). Dans le groupe des hépatites aiguës des mutants du preC ou du promoteur basal du gène C, ont été observés chez 25 à 35 % des patients, mais n'influençaient ni le niveau des transaminases ni celui de la charge virale. Aucune des mutations conférant la résistance aux analogues nucleos(t)idiques (gène polymérase) ou responsables d'échappement immunitaire (gène S) n'ont été identifiées dans les deux groupes.

En conclusion, les caractéristiques moléculaires des isolats VHB dans le groupe des hépatites aiguës sont similaires à celles décrites dans le groupe des infections chroniques en France. Des mutations de preC ou du promoteur basal du gène C n'étaient pas associées à une maladie plus sévère. Aucun mutant de résistance aux traitements antiviraux n'a été la source d'infection d'une hépatite aiguë.

3.13 Enquêtes ponctuelles

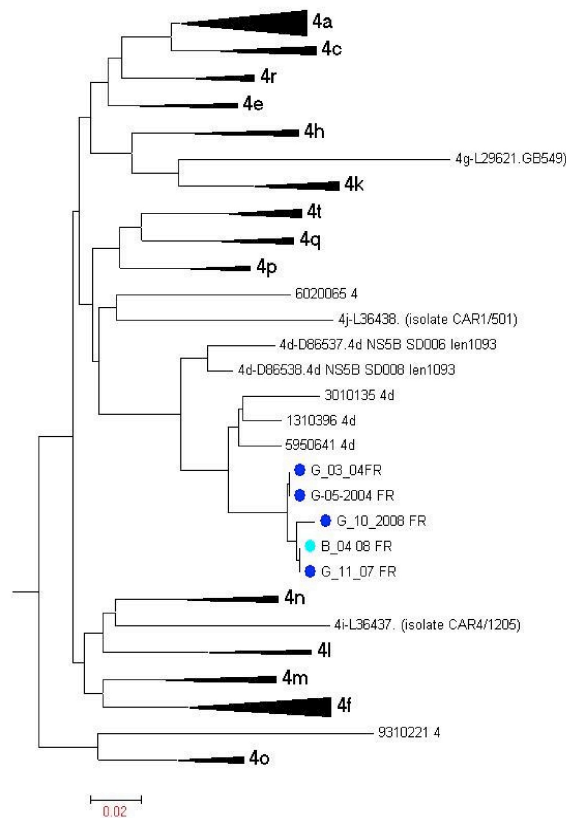
À la demande de laboratoires externes (LABM ou hospitalier), nous avons réalisé une caractérisation moléculaire d'isolats du VHC dans le cadre de notre domaine d'expertise.

- Recherche de génomes recombinants VHC

Deux isolats nous ont été transmis (LABM et laboratoire hospitalier) qui avaient été séquencés dans la région 5'NC et NS5B et pour lesquels de possibles recombinants 2c/4a et 4a/4r avaient été évoqués. Nous avons refait pour chacun le séquençage direct de deux régions distinctes NS5B et Core-E1 et identifié dans ces deux régions un même sous-type 2c et 4r. La comparaison avec les séquences NS5B initiales montre une divergence de plus de 15% qui indique que les séquences ne sont pas dérivées du même échantillon et suggère un problème de manipulation.

- Réinfection ou rechute VHC?

Patient G infecté par un VHC de type 4 ayant négativé sa charge virale après traitement par Interféron et Ribavirine en 2004. En 2007 la charge virale se positive et cela peut correspondre soit à une rechute tardive après traitement, soit à une réinfection. Nous avons comparé les deux séquences NS5B avant traitement (G03/2004 et G05/2004), après repositivation (G11/2007 et G10/2008) et la séquence de son partenaire B, 1 an après la repositivation (B04/2008). L'analyse phylogénétique incluant les séquences de référence de type 4 montre que les séquences de G et de B appartiennent au sous-type VHC-4D. L'arbre partiel ci-dessous indique que les 2 séquences majoritaires de G de 2007 et 2008 sont plus proches de la séquence de son partenaire B de 2008 que de ses propres séquences avant traitement (2003, 2005). Néanmoins, le groupement monophylétique des séquences de G et B montre que ces deux sujets étaient déjà porteurs d'un isolat très similaire en 2004.



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

Les traitements de l'infection chronique par le VHB repose pour la majorité des malades sur l'utilisation des analogues nucléos(t)idiques. L'utilisation de la lamivudine en monothérapie dans les pays industrialisés, puis dans les pays en développement est responsable de l'émergence d'un groupe important de malades porteurs de mutants résistants (15). Chez ces malades, la barrière génétique de résistance à d'autres molécules antivirales comme l'Entécavir ou l'Adéfovir est abaissée (16, 17). L'émergence de VHB résistants aux analogues nucléos(t)idiques pose un problème majeur en pratique clinique et doit être diagnostiquée de façon précoce, afin d'adapter les traitements antiviraux.

Dans le cadre de cette surveillance, des travaux en collaboration avec le laboratoire de Virologie de l'hôpital Paul Brousse (Pr Dussaix) sont réalisés pour la caractérisation génotypique de variants du VHB isolés chez des patients résistants à la Lamivudine.

- Deux patients, d'origine Africaine, porteurs d'un VHB de génotype E ont présenté un échappement virologique après une durée moyenne de traitement de trois ans par la Lamivudine. Le séquençage direct du gène de la polymérase a identifié les substitutions suivantes : rtL180M+rtA181V avec en plus pour l'un d'entre eux rtI233V. Ces deux sujets, naïfs pour l'Adéfovir, sont porteurs de substitution(s) amino-acidique (rtA181V et rtI233V) conférant la résistance à cette molécule. Afin d'estimer le niveau de résistance (IC50 et IC90) de ces isolats nous avons effectué en 2009 le clonage (système TA-cloning) du gène de la polymérase (1030pb) à deux temps du suivi (avant traitement, au moment de l'échappement) et pour un patient un point tardif était disponible. Afin d'estimer la diversité de la quasi-espèce chez ces 2 sujets une vingtaine de clones par point vont être analysés. Pour le moment nous avons séquencé pour l'ensemble des deux patients environ une quarantaine de clones. Le niveau de résistance (IC50 et IC90) sera réalisé dans un système de culture in vitro en collaboration.
- Mutations de résistance chez des patients soumis à une monothérapie au long cours par la lamivudine en Tunisie (population décrite au § 3.5). Une analyse de la nature et la fréquence des mutations de résistance au 3TC a été effectuée chez 31 patients (21 hommes, 10 femmes) chroniquement infectés par le VHB de la région de Sousse-Monastir. L'ADN viral était indétectable chez 9 des 31 patients (29%). Près de la moitié des patients (45%) ayant une charge virale détectable sous lamivudine ont des mutations de résistance. La mutation en position rtM204, signant la résistance génotypique à la lamivudine, était toujours associée à d'autres polymorphismes: M204I+Q215S (4 patients), L80V+T184F+S202C+M204I (1 patient), M204V+L80V+Q215S (1 patient), M204I+L80I (2 patients), L180M+M204V (2 patients). L'émergence de ces mutations est associée à la durée du traitement (45 mois de traitement vs 12 mois).

Ces deux études confirment l'accumulation des mutations lors de traitements prolongés inefficaces et soulignent l'intérêt de réaliser une caractérisation génotypique avant modification du traitement antiviral. Ces mutations peuvent entraîner une résistance croisée à d'autres antiviraux comme l'adéfovir ou l'entécavir (17).

3.3 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Cette année nous nous sommes plus particulièrement intéressés au génotypage du VHB qui est devenu un des centres d'intérêt de la recherche clinique. La variabilité génétique du VHB, comme pour le VHC, pourrait avoir un impact sur l'évolution clinique de la maladie ou la réponse aux traitements antiviraux.

3.31 Rappel. Impact des génotypes du VHB ?

Les génotypes et sous-types du VHB présentent une répartition géographique distincte et sont fortement corrélés avec l'origine ethnique. Des travaux récents rapportent une :

- Différence d'évolution clinique de l'infection en fonction des génotypes : Ces données sont bien établies pour les génotypes C qui auraient une progression plus rapide vers la cirrhose et le CHC comparé au VHB-B. En revanche, pour les génotypes A, supposés d'évolution plus bénigne que les D, les données sont moins claires (18, 19, 20, 21). Des études longitudinales en Europe et USA fondées sur l'impact du génotype et prenant en compte l'origine géographique des sujets sont nécessaires pour déterminer s'il existe une différence significative d'évolution clinique entre les génotypes A et D.
- Différence de réponse au traitement antiviral : les patients infectés par les génotypes C et D auraient un moins bon taux de réponse à l'interféron alpha standard comparé aux patients de génotypes A ou B (22). Pour l'IFN- α -2a pegylé, les patients porteurs d'un VHB-D ont peu de chance de développer une réponse soutenue. Les facteurs prédictifs d'une réponse à long terme qui ont été mis en évidence sont des transaminases élevées et/ou ADN viral faible pour le VHB-A, transaminases élevées pour le VHB-B et ADN viral faible pour le VHB-C (23). En revanche, la réponse aux analogues nucléosidique/nucléidiques n'est pas influencée par les génotypes (24).

3.32 Caractérisation moléculaire d'isolats VHB circulant en Tunisie

L'épidémiologie des génotypes du VHB et VHC est en continuelle évolution, comme nous le montre l'enquête de prévalence réalisée chez les assurés sociaux en France (cf. § 3.6). La caractérisation de souches plus atypiques pour la France et pour lesquelles on dispose de peu d'information de séquence est importante.

La Tunisie est un pays où la prévalence de l'hépatite B est intermédiaire (4 à 7% de la population générale est AgHBs positive). Les données sur les aspects moléculaires de l'infection VHB en Tunisie sont limitées. Cette enquête est effectuée en collaboration avec le Dr Imène Mathlouthi dans le cadre de son travail de thèse et A.M. Roque-Afonso (S^{cc} de virologie Hôpital Paul Brousse).

Objectif

caractériser sur le plan moléculaire les souches de VHB circulants dans le centre Tunisien et les comparer aux souches de même génotype décrites dans le monde.

Méthodes

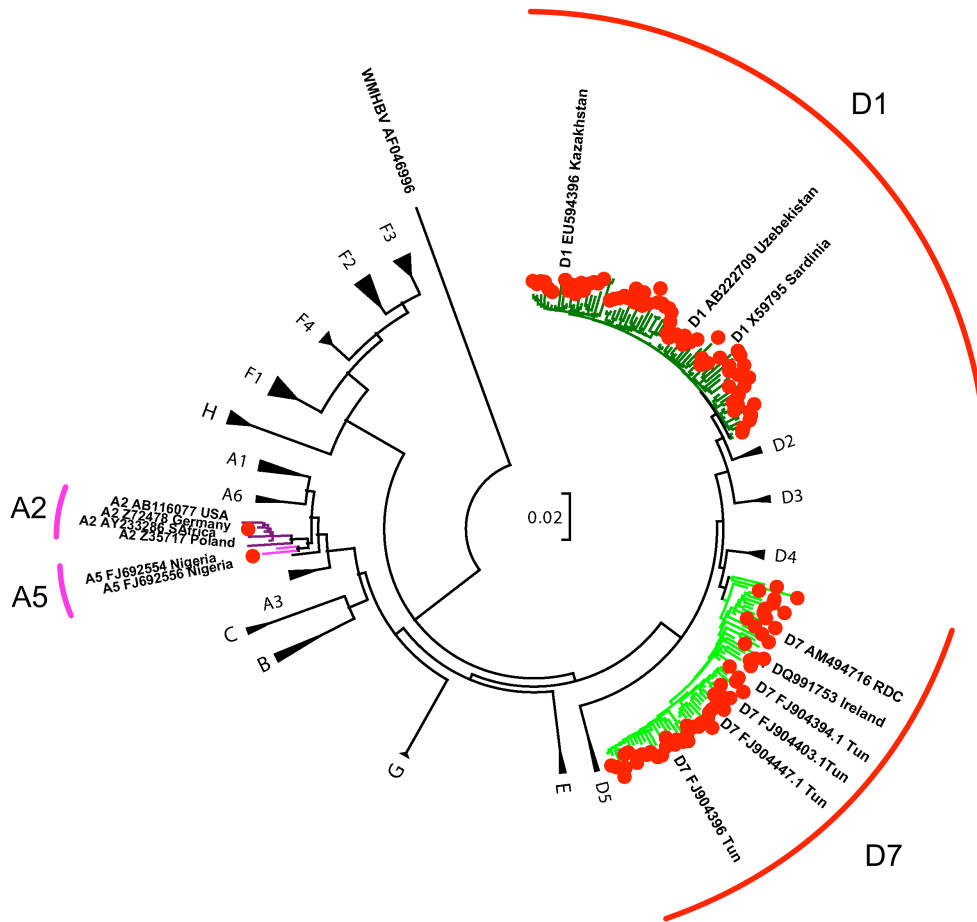
Les sérums de 158 sujets porteurs chronique du VHB (60% d'hommes) consultants dans un service d'infectiologie de la région de Sousse-Monastir entre 2007 et 2009 ont été analysés. L'âge médian des sujets était de 45 ans. Un tiers de ces sujets était traité par la lamivudine. Un fragment du gène codant pour la polymérase (nt :299-1019) a été séquencé. Les types et sous-types du VHB ont été identifiés par le biais d'une analyse phylogénétique basée sur le même fragment (cf §. 2-Activité d'expertise).

Résultats

L'analyse phylogénétique a porté sur 126 des 158 patients pour lesquels une séquence a pu être obtenue. La majorité des isolats tunisiens (98%) appartenait au génotype D (n=124) et deux isolats appartenait au génotype A (A2 et A5). Dans le groupe des génotypes D, 57 isolats appartenait au sous-type D1 et 67 se groupaient avec les séquences d'un sous-type récemment caractérisé en Tunisie, le sous-type D7 (figure ci-dessous : les isolats Tunisiens sont symbolisés par un point rouge).

Conclusions

Cette étude montre la circulation presque exclusive du génotype D en Tunisie. Il se subdivise en deux sous-types majoritaires D1 (54%) et D7 (46%). L'HBV-D7 a été identifié chez des donneurs de sang tunisiens porteurs asymptomatiques de l'AgHBs (25) et potentiellement chez des patients porteurs chronique du VHB en Algérie du Nord-Est (séquences non disponibles) (26). Ce VHB-D7 semble prévalant dans les pays du Maghreb (Maroc, Algérie, Tunisie).



3.33 Etude des facteurs de risque associés à la transmission du VHC en Egypte

Ce travail a été initié dans le cadre d'un projet Européen (INCO-MED/HEPMED coordonné par B Larouzé 2001-2006) dont l'objectif était de déterminer la prévalence des hépatites C et E dans les pays méditerranéens. Il a été poursuivi grâce à la collaboration de plusieurs équipes et le soutien de l'ANRS : Arnaud Fontanet (IP), MK Mohamed (université du Caire) co-responsables du site ANRS Egypte et Laurent Abel (Inserm U555). Participant aussi à cette étude : F. Rimlinger (AI IP CNR), Dr Cyrille Feray (DR2 Inserm), M. El Dali (Université du Caire) (Adela Paez, postDoc IP) (Sylvia Taylor, postDoc, IP) .

- Étude de la transmission intra-familiale du VHC en Egypte

L'objectif principal de ce volet de recherche était d'étudier la transmission intrafamiliale du VHC en zone hyper endémique par l'examen des cas d'hépatite C chronique au sein de la population du village de Zwyat Razin, situé dans le Delta du Nil au nord-ouest du Caire (études ANRS coordonnées A. Fontanet, Mostafa Kamal Mohamed et Laurent Abel).

Plusieurs études successives ont été réalisées dans lesquelles le CNR a effectué la caractérisation moléculaire des isolats :

(1) Diversité des isolats VHC circulants dans une population rurale en Egypte. Ces résultats ont été présentés dans les rapports précédents de 2007 et 2008. Nous avons montré que le génotype 4a était majoritaire, mais qu'il existait une certaine diversité à l'intérieur des types 4 avec notamment l'identification d'un nouveau sous-type 4 classé de façon provisoire comme 4u. Un article est en cours de finalisation présentant la caractérisation moléculaire de ce nouveau sous-type (*El Dali & Thiers et al. en préparation*)

(2) La combinaison de l'analyse phylogénétique des isolats et du test de Mantel a montré que les souches identifiées chez les membres d'une même famille étaient plus proches entre elles que de celles de sujets non apparentés. Un second article scientifique en collaboration avec C. Feray (CIC-0004 Inserm, Nantes) illustrant l'apport du test de Mantel est en cours d'évaluation (*Feray et al. en préparation*).

(3) Par ailleurs, une analyse basée sur l'utilisation de méthodes épidémiologiques adaptées à l'analyse de données corrélées a étudié la dépendance familiale à l'infection par le VHC sur la totalité de la cohorte (4000 sujets). Cette autre approche confirme une contamination entre enfants d'âges rapprochés, mais aussi des parents à leur progéniture (1). L'hypothèse de prédisposition génétique a été soulevée par les données du premier travail. Une analyse de ségrégation de l'infection VHC dans la même population a alors été effectuée. Les résultats indiquent la présence d'un gène dominant majeur conférant une prédisposition génétique à l'infection VHC particulièrement chez les sujets de moins de 20 ans. (27)

- Surveillance des hépatites aiguës C en Egypte

L'étude de cohorte a souligné l'importance de la transmission intrafamiliale, mais n'a pas identifié son importance actuelle, et les circonstances associées. Deux nouvelles études ciblant la phase initiale de l'infection, les hépatites aiguës, ont été réalisées en zone urbaine et en zone rurale.

- En zone urbaine

Objectifs : Evaluer la fréquence actuelle de la transmission intrafamiliale du VHC et les facteurs de risque qui lui sont associés en zone urbaine.

Une étude cas-témoins conduite dans les « fever hospital » au Caire de 2002 à 2007 a comparé des porteurs d'hépatite aigue C symptomatique et leur l'entourage familial chroniquement infectés à un groupe témoin d'hépatites aiguës A et les membres de leur famille. L'analyse multivariée a montré que les procédures médicales invasives (cathéter, perfusion, piqûre, soins dentaires), et l'illettrisme étaient indépendamment associés à un risque augmenté d'infection par le VHC. Sur les 100 cas d'hépatite aiguë, 18 avaient un membre familial VHC(+) et la comparaison des souches a montré que trois des sujet porteurs d'hépatite aigue étaient infectés par une souche apparentée à celle de leur conjoint. Le seul facteur de risque déclaré pour ces derniers cas étant d'être marié (<10ans) à un porteur chronique. Cette étude est en cours de publication (Paez-Jimenez A., 2010 révision favorable GUT)

En conclusion, au Caire moins de 5% des nouvelles infections VHC peuvent être attribuées à une transmission intrafamiliale, la majorité des nouveaux cas (34,6%) serait associé à une transmission iatrogénique. Ces données soulignent la nécessité de renforcer des campagnes de prévention pour le respect des précautions standard d'hygiène au cours des soins médicaux en pays endémique.

- En zone rurale

Objectif : Déterminer l'incidence et les facteurs de risque associés à la transmission du VHC en zone rurale.

La cohorte de villageois séronégatifs (n=3580) a été suivie pendant 4 ans. Une analyse cas-contrôle a été menée dans laquelle chaque cas incident d'hépatite C a été appareillé à quatre contrôles séronégatifs. Un taux d'incidence de 2,4 cas pour 1000 personnes-années a été observé avec un âge

moyen de séroconversion de 26 ans pour les hommes et 20 ans pour les femmes. Le seul facteur de risque identifié pour ces cas était les injections. Parmi les 25 séroconversions, 17 étaient virémiques et la comparaison des souches VHC a montré que 2 (12%) étaient infectés par une souche apparentée à celle d'un des membres de la famille (soit la mère, soit la fratrie) signant encore une fois l'importance de la transmission intrafamiliale. Ces résultats sont publiés dans *Liver international* (28).

Cette étude confirme l'importance des injections dans la propagation du VHC en zone rurale en Egypte, mais suggère aussi que la transmission domestique pourrait jouer un rôle plus important que la transmission sexuelle dans la transmission intrafamiliale.

4/ Conseil et collaborations

4.1 Réponse aux demandes d'expertise de l'administration en accord avec le ministère chargé de la santé.

Le laboratoire participe à des enquêtes ponctuelles, missionné par l'InVS « Analyse de la distribution des virus des hépatites en France »

4.2 Collaborations Nationales et Internationales

4.21 Collaboration avec l'unité Inserm U 806 - Prévention et traitement des infections virales chroniques par vaccination spécifique.

Le travail de l'équipe dirigée par ML Michel est orienté vers la prévention et l'immunothérapie des infections chroniques dues aux virus de l'hépatite B (VHB). L'équipe a montré que des réponses T spécifiques du VHB peuvent être induites ou réactivées chez des patients porteurs chroniques du virus. Dans ce projet, nous effectuons la caractérisation de la région PréC/gène HBx du VHB de patients porteurs chroniques du VHB, ayant une faible charge virale ou ayant contrôlé l'infection et pour lesquels une réponse T CD4+ spécifique d'HBx prédominante a été mise en évidence.

4.22 Épidémiologie et traitement des infections par le VHC en Égypte (Projet ANRS)

Ces projet, dont A. Fontanet (Unité d'épidémiologie des Maladies Emergentes – Institut Pasteur) et M.K. Mohamed (faculté du Caire) sont les responsables scientifiques, grâce à la création d'un site ANRS au Caire à pour but de poursuivre la surveillance des hépatites en Egypte.

Dans ces projets, nous effectuons la caractérisation moléculaire des isolats du VHC des sujets étudiés.

4.23 Surveillance des hépatites aiguës B en France

Le projet d'une surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France mené en collaboration avec l'Institut de veille sanitaire (D. Antona, E. Delarocque), le laboratoire de virologie du CHU Pitié-Salpêtrière (V. Thibault) l'Institut National de Transfusion Sanguine (S. Laperche).

4.24 Diversité des géotypes du VHC en Roumanie

Dans le cadre d'un Projet Transversal de Recherche (PTR) soutenu en 2007 par l'institut Pasteur de Paris qui était coordonné par P. Mavromara, une collaboration avec l'Institut Pasteur de Roumanie (Institut Cantacuzène) a été mise en place.

L'objectif de ce PTR « **Contribution de la diversité du VHC sur le développement des outils diagnostiques** » était d'évaluer l'implication de la diversité génétique du VHC dans le diagnostic des infections virales en Europe du Sud Est et en Asie du Sud Est. Après la formation Dr Gabriela Oprisan

aux techniques de caractérisation moléculaire du VHC, un travail d'analyse de la diversité des isolats VHC en Roumanie est en cours.

4.3 Information, Publication générale, formation

4.31 Formation de stagiaires

Le CNR assure la formation de stagiaires issus de pays étrangers. Par son appartenance à l'Institut Pasteur notre CNR bénéficie de relations privilégiées avec des laboratoires étrangers. Par le biais du réseau des Instituts Pasteur plusieurs collaborations internationales ont été initiées. L'objectif de ces collaborations est de favoriser les échanges entre ces différents laboratoires afin de pouvoir implanter sur place des tests de caractérisation du VHC et ainsi de pouvoir recueillir des informations sur les isolats du VHC et VHB circulants dans ces pays. Au cours de l'année 2009 une étudiante en thèse de l'université de Sousse a été formée aux techniques de caractérisation moléculaire d'isolats viraux. Une étudiante de l'IP du Maroc est attendue courant 2010.

4.32 Formation de PH

Participation à la Formation sur l'épidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses. Formation organisée par le Département des maladies infectieuses de l'InVS « Illustration d'une application des méthodes d'épidémiologie moléculaire et des limites pour l'investigation des épidémies virales ».

5/ Activité de recherche

Parallèlement à notre activité de laboratoire associé notre groupe s'intéresse à l'impact de la variabilité génétique des virus B et C sur l'évolution de la maladie hépatique. En effet, des résultats récents de notre laboratoire suggèrent que certaines protéines virales mutées, isolées à partir de cellules tumorales de patients avec CHC, comme la protéine X du VHB et la protéine de capsid du VHC, pourraient être impliquées dans la persistance virale.

5.1 Modulation des effets biologiques du TGF- β par des variants de protéine de capsid de l'hépatite C : Conséquences sur le développement de la fibrose hépatique et du carcinome hépatocellulaire

Objectif

Poursuivre la caractérisation de variants naturels de la protéine capsid du VHC par clonage de façon à élargir la banque de séquences et pouvoir établir une corrélation entre l'hétérogénéité des séquences et une fonction biologique.

Rationnel

Plusieurs études, ont mis en évidence l'implication de la protéine de capsid dans les mécanismes d'apoptose, dans la réponse immunitaire et dans la transformation cellulaire (34-36). L'infection chronique par le VHC entraîne la production d'une quantité anormale des composants de la matrice extracellulaire aboutissant au développement d'une fibrose intensive. Parmi les cytokines impliquées dans le développement de la matrice extracellulaire, le TGF- β joue un rôle essentiel. Une augmentation de l'expression du TGF- β au cours de l'infection par le VHC a été corrélée avec l'apparition de la fibrose et a aussi été observée dans le développement d'un CHC (37). Le TGF- β joue un rôle complexe dans les cancers épithéliaux. En effet, il agit comme un suppresseur de tumeurs au cours des stades précoces de la tumorigenèse en inhibant la prolifération et en provoquant l'apoptose des cellules précancéreuses. Au cours de la tumorigenèse, les cellules présentent une expression accrue de TGF- β , et perdent leur capacité

à répondre aux effets antiprolifératifs ou apoptotiques de cette cytokine (38-40).

En partant des constatations suivantes :

- Augmentation de l'hétérogénéité des quasi-espèces de la capsidite du VHC avec la sévérité de la maladie associée une distribution différente de la quasi-espèce dans le foie tumoral. Les divergences de séquence nucléotidique entre la zone tumorale et non tumorale sont plus fréquemment retrouvées dans la région de la capsidite par comparaison avec une autre région virale de référence (NS5b) (41-43).
- Mutations ponctuelles du gène de la capsidite pourraient intervenir dans certaines étapes de la carcinogenèse, suggérant une influence de la variabilité de la capsidite du virus de l'hépatite C sur la carcinogenèse hépatique liée à l'infection par le VHC) (44 -47).
- Quatre variants naturels de la capsidite isolés à partir du tissu tumoral peuvent inhiber les voies de signalisation du TGF- β (48).

On peut donc suggérer une influence de la variabilité génétique et de la compartimentation des variants viraux dans les mécanismes de survenue d'un carcinome hépato cellulaire. Les résultats obtenus avec les 4 séquences tumorales nous incitent à poursuivre le clonage de variants de la protéine de capsidite de façon à établir une corrélation entre l'hétérogénéité des séquences et une fonction biologique.

Rôle du CNR et Partenariat

Notre rôle est d'élargir la banque de séquences de capsidites de patients infectés par le VHC. En collaboration avec l'équipe de cliniciens du centre hépatobiliaire (Dr Duclos-Vallée, Dr Sobesky), des sujets infectés par le VHC et porteurs de pathologie hépatique bien caractérisée ont été sélectionnés.

Cette année, les clones isolés par microdissection laser de la zone Tumorale et non tumorale de 7 patients avec CHC ont été insérés dans un vecteur d'expression pCMV-3Tag, afin d'améliorer la détection de ces protéines capsidite sur membrane et en immunofluorescence (43). Parallèlement, nous avons continué le clonage en vecteur d'expression (pCMV-3Tag) d'isolats VHC identifiés chez 7 sujets transplantés VIH/VHC ayant développé une hépatite fibrosante cholestatique (HFC) sévère (génotype 1a, 2 et 4). Trois points sont en cours de clonage (sérum avant TH, au moment de l'HFC et Foie avant TH). Ces échantillons seront comparés à 7 sujets transplantés VIH/VHC sans HFC de même génotype. La caractérisation phénotypique de ces clones pour leur activité sur la voie de signalisation cellulaire sera effectuée par l'unité INSERM U785 en collaboration avec le groupe de M. Bourgeade (Inserm U785). Ce groupe a mis en place un test haut débit utilisant une batterie de plasmides reporters présentant différentes séquences promotrices en amont du gène de la luciférase. Il est ainsi possible de déterminer rapidement l'impact d'une mutation sur la réponse à la voie spécifique du TGF- β , ainsi que sur d'autres voies de signalisation.

5.2 Étude des voies du trafic intracellulaire exploitées par le VHC et conséquence sur la polarité cellulaire.

Objectif

Ce projet de recherche a pour objectif d'élucider la nature des acteurs et les mécanismes moléculaires impliqués dans le trafic et la propagation intracellulaire du virus de l'hépatite C (VHC). Le but étant l'amélioration des traitements existants et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Rationnel

L'entrée du virus dans les hépatocytes est complexe et implique plusieurs récepteurs cellulaires : le récepteur aux LDL (low density lipoprotein), les molécules SR-BI (scavenger receptor BI) et les molécules CD81 participeraient à la liaison du virus aux cellules cibles (49). Des protéines des jonctions serrées, les claudines 1, 6 et 9 et l'occludine, seraient également impliquées dans l'entrée du VHC (50, 51). Le virus pénétrerait dans la cellule hôte par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (52). Suite à l'infection, le virus est capable de modifier le trafic des protéines des jonctions serrées vers le cytoplasme de la cellule, perturbant très probablement la polarité cellulaire des hépatocytes. Ainsi l'occludine semble être délocalisée des jonctions serrées vers le réticulum endoplasmique (RE) (53).

Les mécanismes moléculaires de l'entrée et de la propagation cellulaire du virus restent peu connus. Peu de données concernent son trafic intracellulaire et son adressage membranaire à partir de sa biosynthèse dans le RE de la cellule hôte. En particulier, les mécanismes concernant le transit par l'appareil de Golgi, la caractérisation des vésicules d'exocytose impliquées, la polarisation du trafic vésiculaire (adressage pôle apical ou basolatéral des hépatocytes) et l'association avec les gouttelettes lipidiques pendant ce trafic restent assez énigmatiques.

Rôle du CNR et Partenariat

Dans ce travail dirigé par le Dr A. Gassama de l'U785 nous allons construire des ADNcs de protéines virales (capside, Enveloppe, protéines non structurales) de différents génotypes du VHC en fusion avec des protéines fluorescentes pour étudier le trafic intracellulaire de ces protéines virales dans des expériences sur cellules vivantes (hépatocytes primaires).

6/ Programme 2010 - 2011

Ce programme aura pour objectif de compléter et finaliser les études qui ont été poursuivies depuis quatre ans.

- Diversité des génotypes du VHB et du VHC circulants en France dans une population de 18 à 80 ans (Enquête CPAM/InVS 2002-2003). Nous poursuivons la synthèse des données moléculaires, des données démographiques et biochimiques obtenues pour le VHB et VHC en collaboration avec par les différents intervenants [niveau moléculaire (CNR-Hépatite), épidémiologique (E. Delarocque et C. Larsen, InVS)].
Caractérisation moléculaire de nouveaux isolats de type 2 identifiés au cours de cette étude. Une requête de classification est en cours. Séquence de la région Core-E1 et E1E2.
- Diversité des isolats du VHC circulants en Egypte et étude de la transmission intrafamiliale. Finalisation du manuscrit et soumission
Caractérisation d'un nouveau sous type de type 4 provisoirement classé en 4v identifié dans l'étude de surveillance des hépatites aiguës « les fever hospitals ». Séquence de la région Core-E1 et E1E2.
- Diversité des isolats du VHC circulants en Roumanie. Préparation d'un article sur la comparaison de méthodes de génotypage « maison » pour le typage du virus de l'hépatite C.
- Épidémiologie moléculaire du VHB, étude à partir de la déclaration obligatoire des hépatites aiguës B en France. Ce projet de surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France est mené en collaboration avec le laboratoire de virologie de CHU Pitié-Salpêtrière (V. Thibault, coordinateur), l'InVS (D. Antona, E. Delarocque), l'Institut National de Transfusion Sanguine (S. Laperche).
- Diversité des isolats du VHB circulants en Tunisie et analyse de la nature et la fréquence des mutations de résistance au 3TC (comparaison de 100 pts traités au long court par la Lamivudine vs 100 pts non traités). Recherche de mutants du gène S sur les séquences déjà effectuées. Recherche de mutants du gène Core du VHB (préc et BCP).

7/ Publications 2009-2010

Revue Internationale

Is the hepatitis C virus epidemic over in Egypt? Incidence and risk factors of new hepatitis C virus infections. Mostafa A, Taylor SM, El-Daly M, El-Hoseiny M, Bakr I, Arafa N, Thiers V, Rimlinger F, Abdel-Hamid M, Fontanet A, Mohamed MK. Liver Int. 2010. 30 (4) (April 2010) : 560-66.

Identical HCV strains within households in Egypt. Paez-Jimenez A, Mohamed MK, El-Daly M, Rimlinger F, El-Hariri, El-Hoseiny M, Reckacewicz C, Sharaf N, Mohsen A, Abdel-Hamid M, Fontanet A., Thiers V. Gut (révision favorable)

Articles en préparation

Feray C, Falissard B, Mohamed MK, Arafa N, Bakr I, Colman H, Di Liberto G, El Daly M, Plancoulaine S, Abdel-Hamid M, Thiers V, Fontanet A., A novel method to identify routes of viral transmission: Application to hepatitis C virus in Egypt.

A. Carbonne, V. Thiers, S. Kerneis, M. Aggoune, H. Creusvaux, P. Astagneau. Transmission of hepatitis C Virus from patient to patient of different operating rooms through general anesthetic products.

Thiers V*, El Dali M*, El-Kafrawy S., Rimlinger F, Reckacewicz C., Fontanet A., Mohamed MK, Feray C., Abdel-Hamid M. Intrafamilial Clustering of subtype 4 u, a new hepatitis C subtype in a rural village of the Nile delta. (*first co-authors)

Communications orales

I. Mathlouthi, V. Thiers, A. Trabelsi³, I. Fodha³, N. Boujaafar³, A. Graube¹, E. Dussaix²⁻¹, A.M. Roque-Afonso. Génotypes du Virus de l'hépatite B et mutations de résistance chez des patients soumis à une thérapie au long court par la lamivudine en Tunisie. RICAI (Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse). PARIS, 3 & 4 DECEMBRE 2009

I. Mathlouthi, V. Thiers, A. Trabelsi³, I. Fodha³, N. Boujaafar³, A. Graube¹, E. Dussaix²⁻¹, A.M. Roque-Afonso. Génotypes du Virus de l'hépatite B et mutations de résistance chez des patients soumis à une thérapie au long court par la lamivudine en Tunisie. 14 ième journée annuelle du Gemhep (groupe français d'études moléculaires des hépatites) Paris 19/11/2009.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Plancoulaine S, Mohamed MK, Arafa N, Bakr I, Rekeciewicz C, Tregouet DA, et al. Dissection of familial correlations in hepatitis C virus (HCV) seroprevalence suggests intrafamilial viral transmission and genetic predisposition to infection. *Gut*. 2008 Sep;57(9):1268-74.
2. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004 Jun;5(2):150-63.
3. Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*. 2008 Jun;82(11):5657-63.
4. Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis*. 2008 Nov;14(11):1777-80.
5. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 2009 Oct;83(20):10538-47.
6. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004 Nov-Dec;47(6):289-309.
7. Schaefer S, Magnius L, Norder H. Under construction: classification of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. *Intervirology*. 2009;52(6):323-5.
8. European Association For The Study Of The L. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2009 Feb;50(2):227-42.
9. Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol*. 1995 Sep;69(9):5437-44.
10. Margeridon S, Carrouee-Duranteil S, Chemin I, Barraud L, Zoulim F, Trepo C, et al. Rolling circle amplification, a powerful tool for genetic and functional studies of complete hepatitis B virus genomes from low-level infections and for directly probing covalently closed circular DNA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3068-73.
11. Tran N, Berne R, Chann R, Gauthier M, Martin D, Armand MA, et al. European multicenter evaluation of high-density DNA probe arrays for detection of hepatitis B virus resistance mutations and identification of genotypes. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2792-800.
12. Pas SD, Tran N, de Man RA, Burghoorn-Maas C, Vernet G, Niesters HG. Comparison of reverse hybridization, microarray, and sequence analysis for genotyping hepatitis B virus. *J Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1268-73.
13. Verbeeck J, Stanley MJ, Shieh J, Celis L, Huyck E, Wollants E, et al. Evaluation of Versant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0. *J Clin Microbiol*. 2008 Jun;46(6):1901-6.
14. Niesters HG, Zoulim F, Pichoud C, Buti M, Shapiro F, D'Heuvaert N, et al. Validation of the INNO-LiPA HBV DR assay (version 2) in monitoring hepatitis B virus-infected patients receiving nucleoside analog treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):1283-9.
15. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*. 2009 Nov;137(5):1593-608 e1-2.

16. Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM, et al. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol.* 2007 Apr;81(8):3992-4001.
17. Brunelle MN, Jacquard AC, Pichoud C, Durantel D, Carrouee-Durantel S, Villeneuve JP, et al. Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1391-8.
18. Taylor BC, Yuan JM, Shamliyan TA, Shaikat A, Kane RL, Wilt TJ. Clinical outcomes in adults with chronic hepatitis B in association with patient and viral characteristics: A systematic review of evidence. *Hepatology.* 2009 May;49(5 Suppl):S85-95.
19. Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, et al. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *J Infect Dis.* 2007 Jan 1;195(1):5-11.
20. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol.* 2008 Feb;48(2):335-52.
21. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2009 May;49(5 Suppl):S45-55.
22. Wiegand J, Hasenclever D, Tillmann HL. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther.* 2008;13(2):211-20.
23. Buster EH, Hansen BE, Lau GK, Piratvisuth T, Zeuzem S, Steyerberg EW, et al. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. *Gastroenterology.* 2009 Dec;137(6):2002-9.
24. Raimondi S, Maisonneuve P, Bruno S, Mondelli MU. Is response to antiviral treatment influenced by hepatitis B virus genotype? *J Hepatol.* 2010 Mar;52(3):441-9.
25. Meldal BH, Moula NM, Barnes IH, Boukef K, Allain JP. A novel hepatitis B virus subgenotype, D7, in Tunisian blood donors. *J Gen Virol.* 2009 Jul;90(Pt 7):1622-8.
26. Khelifa F, Thibault V. [Characteristics of hepatitis B viral strains in chronic carrier patients from North-East Algeria]. *Pathol Biol (Paris).* 2009 Feb;57(1):107-13.
27. Laouenan C, Plancoulaine S, Mohamed MK, Arafa N, Bakr I, Abdel-Hamid M, et al. Evidence for a dominant major gene conferring predisposition to hepatitis C virus infection in endemic conditions. *Hum Genet.* 2009 Nov;126(5):697-705.
28. Mostafa A, Taylor SM, El-Daly M, El Hoseiny M, Bakr I, Arafa N, et al. Is the hepatitis C virus epidemic over in Egypt? Incidence and risk factors of new hepatitis C virus infections. *Liver Int.* 2010 Jan 29.
29. Meffre C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau E, Antona D, Desenclos JC. Estimation des taux de prévalence des anticorps anti-VHC et des marqueurs du virus de l'hépatite B chez les assurés sociaux du régime général de France métropolitaine, 2003-2004: INVS Rapport préliminaire2005.
30. Meffre C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau E, Dubois F, Antona D, Lemasson JM, et al. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus infections in France in 2004: social factors are important predictors after adjusting for known risk factors. *J Med Virol.* 2010 Apr;82(4):546-55.
31. Morice Y, Roulot D, Grando V, Stirnemann J, Gault E, Jeantils V, et al. Phylogenetic analyses confirm the high prevalence of hepatitis C virus (HCV) type 4 in the Seine-Saint-Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. *J Gen Virol.* 2001 May;82(Pt 5):1001-12.

32. Thomas F, Nicot F, Sandres-Saune K, Dubois M, Legrand-Abravanel F, Alric L, et al. Genetic diversity of HCV genotype 2 strains in south western France. *J Med Virol.* 2007 Jan;79(1):26-34.
33. Cantaloube JF, Gallian P, Laperche S, Elghouzzi MH, Piquet Y, Bouchardeau F, et al. Molecular characterization of genotype 2 and 4 hepatitis C virus isolates in French blood donors. *J Med Virol.* 2008 Oct;80(10):1732-9.
34. Irshad M, Dhar I. Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract.* 2006;15(6):405-16.
35. Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene.* 2006 Jun 26;25(27):3834-47.
36. Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Aug 21;202(2):149-56.
37. Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10 Suppl 1:S59-67.
38. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 22;100(15):8621-3.
39. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Nov;3(11):807-21.
40. Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene.* 2005 Aug 29;24(37):5764-74.
41. Ruster B, Zeuzem S, Krump-Konvalinkova V, Berg T, Jonas S, Severin K, et al. Comparative sequence analysis of the core- and NS5-region of hepatitis C virus from tumor and adjacent non-tumor tissue. *J Med Virol.* 2001 Feb;63(2):128-34.
42. Sakai A, Kaneko S, Honda M, Matsushita E, Kobayashi K. Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatology.* 1999 Aug;30(2):556-61.
43. Sobesky R, Feray C, Rimlinger F, Derian N, Dos Santos A, Roque-Afonso AM, et al. Distinct hepatitis C virus core and F protein quasispecies in tumoral and nontumoral hepatocytes isolated via microdissection. *Hepatology.* 2007 Dec;46(6):1704-12.
44. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, et al. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2007 Nov;46(5):1357-64.
45. Fishman SL, Factor SH, Balestrieri C, Fan X, Dibisceglie AM, Desai SM, et al. Mutations in the hepatitis C virus core gene are associated with advanced liver disease and hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009 May 1;15(9):3205-13.
46. Hu Z, Muroyama R, Kowatari N, Chang J, Omata M, Kato N. Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2009 Dec;100(12):2465-8.
47. Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Hosaka T, Sezaki H, Suzuki Y, et al. Influence of amino-acid polymorphism in the core protein on progression of liver disease in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol.* Jan;82(1):41-8.
48. Pavio N, Battaglia S, Boucreux D, Arnulf B, Sobesky R, Hermine O, et al. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway. *Oncogene.* 2005 Sep 8;24(40):6119-32.

49. Helle F, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jan;65(1):100-12.
50. Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, et al. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol.* 2008 May;82(10):5007-20.
51. Mee CJ, Grove J, Harris HJ, Hu K, Balfe P, McKeating JA. Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J Virol.* 2008 Jan;82(1):461-70.
52. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 2006 Jul;80(14):6964-72.
53. Benedicto I, Molina-Jimenez F, Barreiro O, Maldonado-Rodriguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, et al. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology.* 2008 Oct;48(4):1044-53.

Figure1 : Analyse phylogénétique comparative des séquences de génomes complets (FL) représentatives des types et sous-types publiés du VHB et des sous fragments du gène de la polymérase 700pb et de 600 pb.

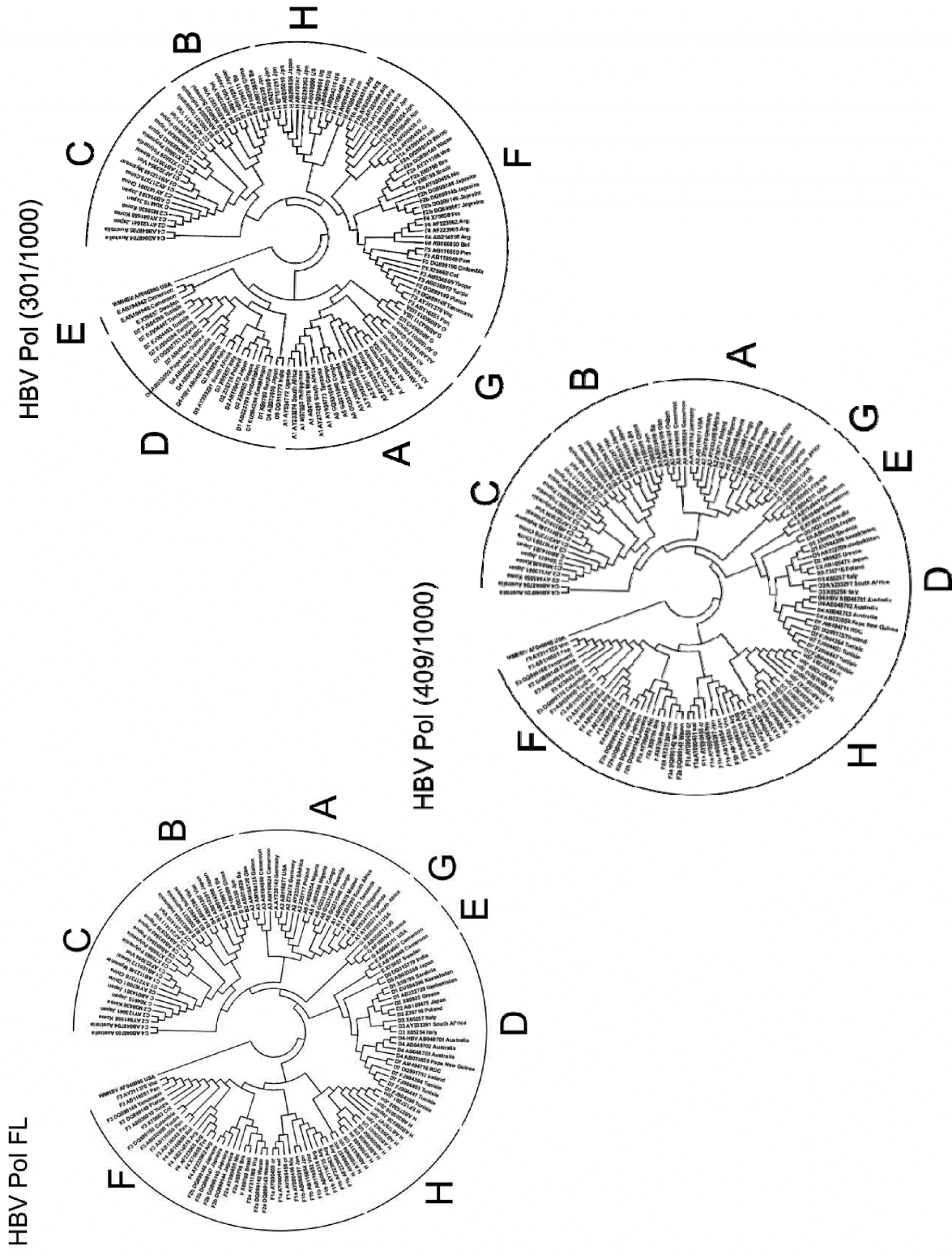


Figure 2. Analyse phylogénétique des infections chroniques B au niveau national. Arbre partiel détaillant les génotypes A, B, C et G

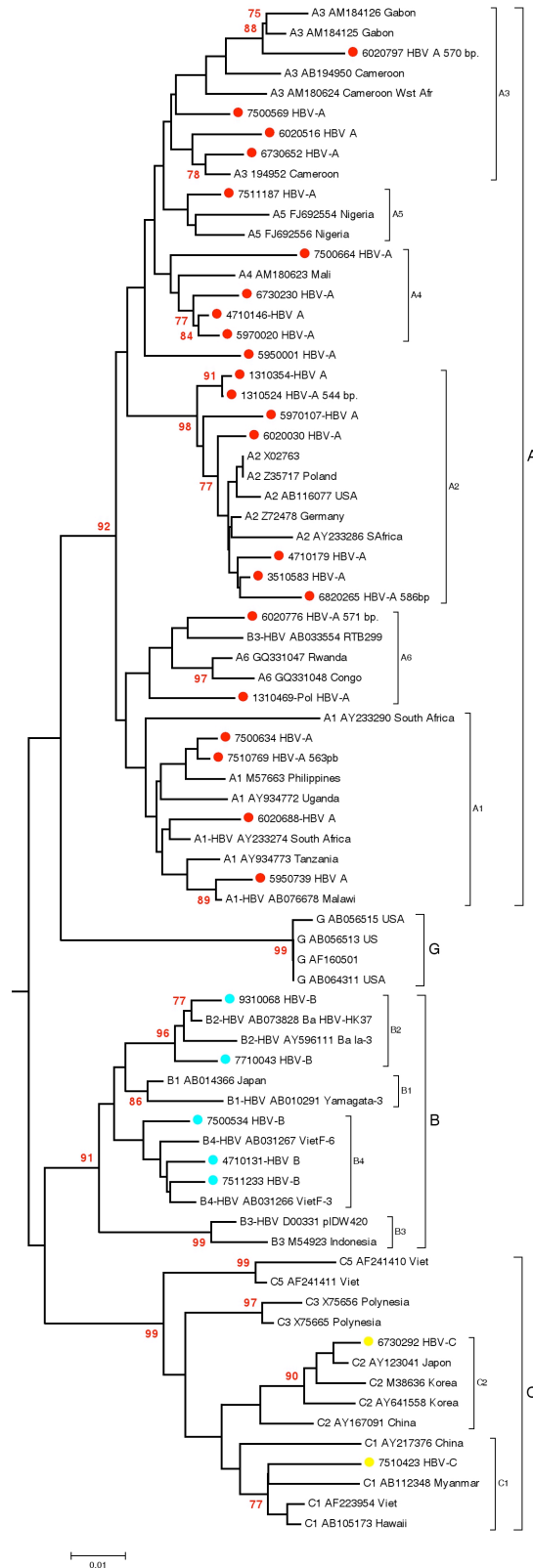
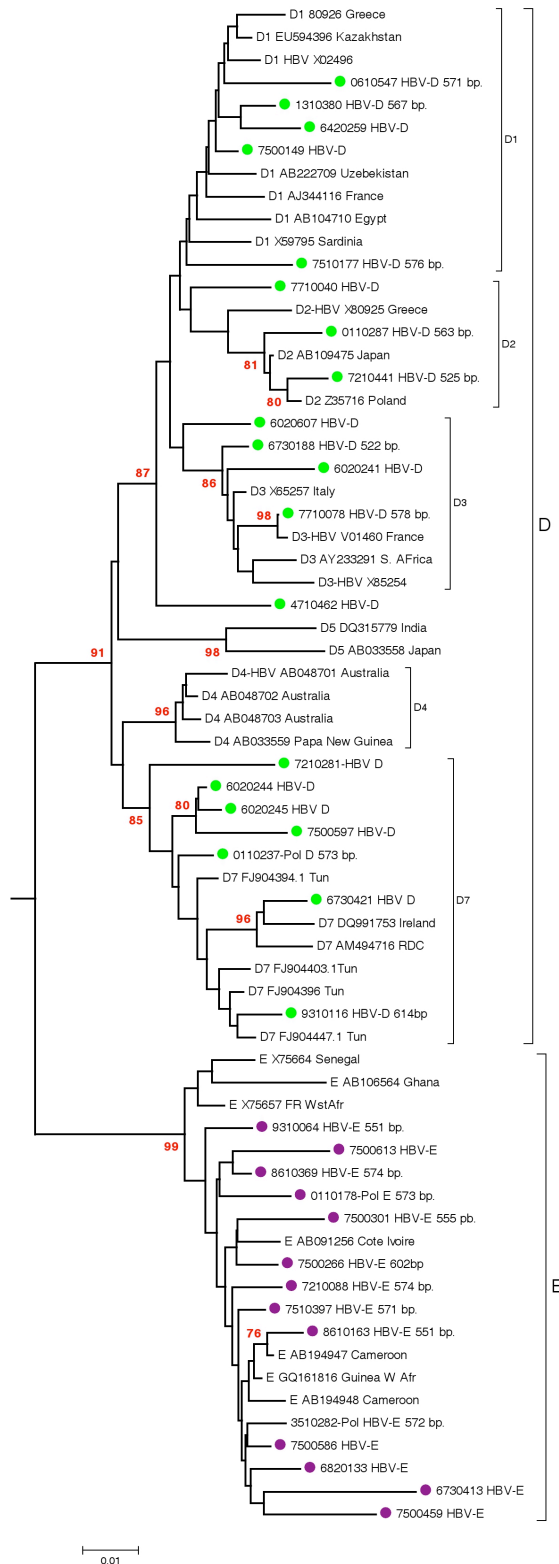


Figure 3. Analyse phylogénétique des infections chroniques B au niveau national. Arbre partiel détaillant les génotypes D et E



VI

**LABORATOIRE ASSOCIE
CNR DES HEPATITES VIRALES
DELTA**

**Laboratoire de Bac teriologie-Virologie
Hôpital 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 2009**

Rédigé par Emmanuel Gordien, Frédéric Le Gal, Paul Dény

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 également pour objectif d'évaluer et de développer les tests de diagnostic nécessaires au dépistage et à la prise en charge des patients infectés par ce virus. La localisation du laboratoire dans le département de Seine - Saint-Denis donne également l'opportunité d'étudier cette infection virale dans la population générale, caractérisée par un taux très élevé de migrants en provenance d'Afrique, d'Asie, des Caraïbes ou d'Europe de l'Est.

- **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 2009, l'activité de diagnostic du HDV a été marquée par : (i) une stabilisation du nombre de demandes de dépistage sérologique (Anticorps (Ac) Totaux) (ii) une augmentation de 16% des demandes de quantification de la charge virale HDV plasmatique par rapport à l'an 2008. (iii) La caractérisation de 100 nouvelles souches virales HDV (chiffre comparable aux 2 années précédentes). L'origine géographique des patients chez qui ces nouvelles infections ont été diagnostiquées était : Afrique 54 % (contre 61% en 2008), Europe de l'Est 21% (11% en 2008), Europe de l'Ouest 14% (24% en 2008) et Asie 8% (4% en 2008). Soit donc une augmentation significative de souches de patients d'Europe de l'Est et d'Asie et parallèlement une diminution des souches d'Europe de l'Ouest. A noter que 3% des souches provenant de patients du moyen Orient et 2 d'Amérique du Sud. Les génotypes spécifiquement africains (HDV-5, -6, -7 et -8) représentent toujours 25% des souches caractérisées. (iv) Une étude épidémiologique est en cours, afin de tenter de mettre en évidence un ou plusieurs facteurs de risque de transmission de l'infection HDV en France, chez les patients nés et vivant en France. (v) Enfin, le LA-CNR a débuté plusieurs collaborations internationales effectives en vue de caractériser la diversité génétique du HDV à travers le monde : Angleterre, Burundi, Niger, Cameroun, Mauritanie, Syrie, Argentine et Algérie. Une nouvelle souche recombinante HBV D/E hautement prévalente au Niger et retrouvée aussi et dans la région du Sahara (Mauritanie) a été caractérisée (M. ABDOU, J. Gen. Virol, 2010).

- **C/ Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés**
 - Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

Paul Dény, PU-PH, 10%, (dans le cadre d'un contrat d'interface INSERM)
Emmanuel Gordien MCU-PH, 15%, Université Paris 13
Mariama Issoufou, TEC, 50%, ANRS
Frédéric Le Gal, Tec AP-HP, 25%, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris

- Organigramme

- 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 en place du GBEA au fur et à mesure de l'évolution des techniques depuis 2002. Ainsi toutes les approches : sérothèques, tissuthèques, techniques sérologiques et moléculaires mises en place au sein du laboratoire et du CNR sont référencées dans le guide de bonne exécution des analyses du laboratoire de Bactériologie, Virologie – Hygiène de l'Hôpital Avicenne. Cette démarche a permis à ce jour de référencer près de 1500 souches HDV. Dans son rôle de CNR, le laboratoire associé a réalisé un contrôle de qualité national à partir d'un panel de 8 échantillons de sang de patients des techniques sérologiques et moléculaires utilisées dans le diagnostic de l'infection 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.

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

- surface, plan

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. Manque cruellement un laboratoire de type P3 permettant la transfection en culture cellulaire des génomes complets de HDV et de HBV.

- principaux équipements

*- PSM, Etuves à CO₂, chaîne du froid congélateurs +4°C, -20°C, -40°C, -70°C
- Laveur ELISA, BEP 3 (Dade Behring), Vitros (Ortho Diagnostics system)
- Extracteurs automatiques Abbott et Roche
- Thermocycleurs PCR « sprint » et ABI 2700, ABI 7000 et ABI 7500 Fast (PCR temps réel),
- Séquenceur ABI3100 (4 capillaires)
- Lecteur de microarray MWG.
- Demande de création d'un laboratoire de sécurité P3 formulée auprès de l'Hôpital Avicenne, l'UFR SMBH, Université Paris 13 à Bobigny, l'AP-HP et le Conseil général de Seine Saint-Denis.*

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, ParvovirusB19, Arbovirus et HTLV.

Dans le cadre du CNR Delta, le laboratoire possède les techniques sérologiques de recherche des Ac anti-delta Totaux, (ETI-AB-DELTA-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).

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 de tests commerciaux équivalents pour les laboratoires de diagnostic et du fait d'une stabilisation au cours de l'année 2009 des demandes à un niveau élevé confirmant son intérêt majeur pour le suivi de l'infection par HDV, nous avons décidé d'améliorer encore ce test. L'adjonction d'un témoin interne dès l'étape d'extraction ainsi qu'une extraction automatisée de l'ARN seront bientôt réalisés.*

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

*La **détection qualitative de l'ARN HDV** peut-être effectuée si le résultat de PCR quantitative est négatif pour les échantillons de patients ayant eu au préalable une détection d'ARN delta positive. Cette technique est une RT-PCR qui consiste à amplifier une partie du génome viral (appelée R0) recouvrant la fin du gène codant la grande protéine jusqu'à la séquence du ribozyme antigénomique.*

Cet examen est aussi 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) caractérisés 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 permettent de caractériser la séquence complète du génome de certaines souches virales.*

Cette identification génotypique entre dans le cadre épidémiologique du CNR mais n'intervient pas encore dans le schéma de diagnostic clinique du patient.

- Techniques développées l'année N : brève description (principes, validation)
- *En 2009, dans le cadre du contrat d'interface de P Dény à l'U 871 Lyon (Pr Fabien Zoulim), nous avons reconstruits les clones moléculaires de 3 clades de l'HDV dont 2 spécifiquement africains, nous avons mis au point des techniques de transfection en cellules hépatiques et abordons maintenant des approches d'infection (HepaRG, Primary Human hépatocytes).*
- *Nous nous sommes également centrés sur le contrôle de qualité des techniques de diagnostic en sérologie et biologie moléculaire (cf infra).*

- Techniques en développement : principes et état d'avancement

En 2010, nous avons prévu la mise au point de différentes techniques pour l'amélioration des techniques existantes :

- *la validation de l'extraction de l'ARN viral sur les automates d'extraction Abbott (M2000spTM).*
- *la mise au point 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.*
- *La mise au point de la RT PCR HDV quantitative en un seul tube.*
- *La validation des techniques de sérologie et de mesure de la charge virale HDV à partir de sérum, plasma ou sang total déposé sur papier buvard.*
- *Egalement en 2010, la quantification de la charge virale HDV par la technique de RT-PCR en temps réel citée ci-dessus sera réalisée sur d'autres prélèvements biologiques, en particulier à partir de ponctions biopsies hépatiques (PBH) pour le suivi des patients chroniques B-Delta. Nous sommes actuellement la phase de validation de l'extraction de l'ARN Delta dans les différents prélèvements, à la fois sur biopsies congelées mais aussi sur biopsies incluses en paraffine. Toutes ces techniques sont en cours et nous en prévoyons la validation pour le dernier trimestre 2010.*

- **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)*
- 2 - Gène delta codant pour la petite protéine delta (codons 1 – 194)*
- 3 - Séquence complète (1700 nucléotides)*

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

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

- Description technique ('Souchothèque' CNR-Delta)

Pour toute nouvelle souche HDV caractérisée, un volume minimum de 500ml 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 -80°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 d'expression. Les niveaux d'expression in vitro de ces constructions sont en cours d'analyses et d'optimisation. Elles seront bientôt disponibles pour la communauté

scientifique.

- **D/ Liste des techniques (diagnostic / identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR :**

o 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 de dépistage sérologique sont maintenant disponibles (société Ingen), et ont été évaluées et validées au sein du laboratoire (voir infra).

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 CNR)

Un algorithme simplifié d'utilisation de ces différentes techniques peut être proposé en première intention :

Dépistage d'une infection au virus de l'hépatite delta :

- *Recherche d'anticorps totaux anti delta avec la trousse Diasorin chez un patient porteur chronique de l'antigène HBs*
- *En cas de résultat « douteux » (« zone grise ») avec la trousse Diasorin, réalisation de la recherche d'anticorps totaux anti delta avec la trousse Ingen*
- *En cas de positivité des anticorps totaux, recherche des anticorps de type IgM avec la trousse Diasorin*

Diagnostic d'une infection avec réplication virale :

- *Détection de l'ARN viral par technique quantitative (éventuellement complétée par une recherche qualitative en cas de résultat négatif)*

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 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 ne devrait logiquement pas être utilisé à titre diagnostique, compte tenu de la présence fugace de ce marqueur et de disponibilité et de la grande sensibilité des approches moléculaires et de leur inscription récente à la nomenclature.

- o *Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees : méthode, état d'avancement, principaux résultats*

2.2 Activités d'expertise de l'année N

- **AI 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 (IgM et IgG) (1204 examens en 2010) :

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 devrait être faite lors de tout dépistage de patients porteurs de l'antigène HBs, pour d'une part sur le plan personnel éliminer ou confirmer une infection delta et d'autre part déterminer avec précision la prévalence de marqueurs HDV chez le patient porteur de l'Ag HBs en France.

La détection des immunoglobulines de la classe M (IgM anti HDV) (89 examens en 2010)

Cette recherche devrait à notre sens être réservée aux patients porteurs d'anticorps anti-HDV totaux. Ce marqueur, s'il ne différencie pas les infections delta aiguës ou 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). Ainsi, devant une hépatopathie sévère chez un patient AgHBs positif, la négativité des IgM anti-HDV ne doit pas dispenser de la recherche de l'ARN viral HDV.

La détection de l'ARN viral (1566 examens en 2010)

Nous avons appliqué la détection quantitative de l'ARN HDV à 1566 échantillons pour l'année 2010, analyse indispensable pour de la mise en route et la surveillance des traitements immuno modulateurs (interféron alpha) ou antiviral parfois associé. L'accès à des formes retard d'interféron (IFN-PEG) a contribué à améliorer l'efficacité du traitement anti-HDV. Ainsi, la disponibilité de la technique ouvre des perspectives de projets multicentriques en fonction des thérapeutiques proposées.

Provenance des demandes de Sérologies

Les demandes de sérologies virales HDV sont issues essentiellement d'hôpitaux de l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris : 130 pour Avicenne ; 1024 pour l'APHP et 50 pour les autres hôpitaux

Provenance des demandes de quantification de la charge virale plasmatique HDV

Outre les hôpitaux Avicenne, Jean Verdier et René Muret, (AP-HP du département de Seine Saint-Denis, 93), le laboratoire est référent HDV pour l'ensemble des

hôpitaux de l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, des hôpitaux d'Ile-de-France (Créteil intercommunal, Montreuil, Saint-Denis ...); de plus nous recevons un nombre croissant de prélèvements en provenance de centres de Province. Les prélèvements adressés au laboratoire d'analyses Pasteur Cerba (dont des échantillons de plus en plus nombreux en provenance directe de centres hospitaliers de pays africains) pour la recherche de l'ARN de l'HDV nous sont toujours systématiquement ré adressés en 2010. Enfin, durant cette année 2010, des demandes de quantification de la charge virale plasmatique HDV nous sont parvenues de l'étranger et plus précisément de Belgique, de Suisse et des Etats Unis. Cette analyse moléculaire est à la nomenclature (JO de Mars 2005). Ainsi 32 ARN HDV ont été réalisés pour Avicenne ; 773 pour l'APHP et 727 pour les autres hôpitaux.

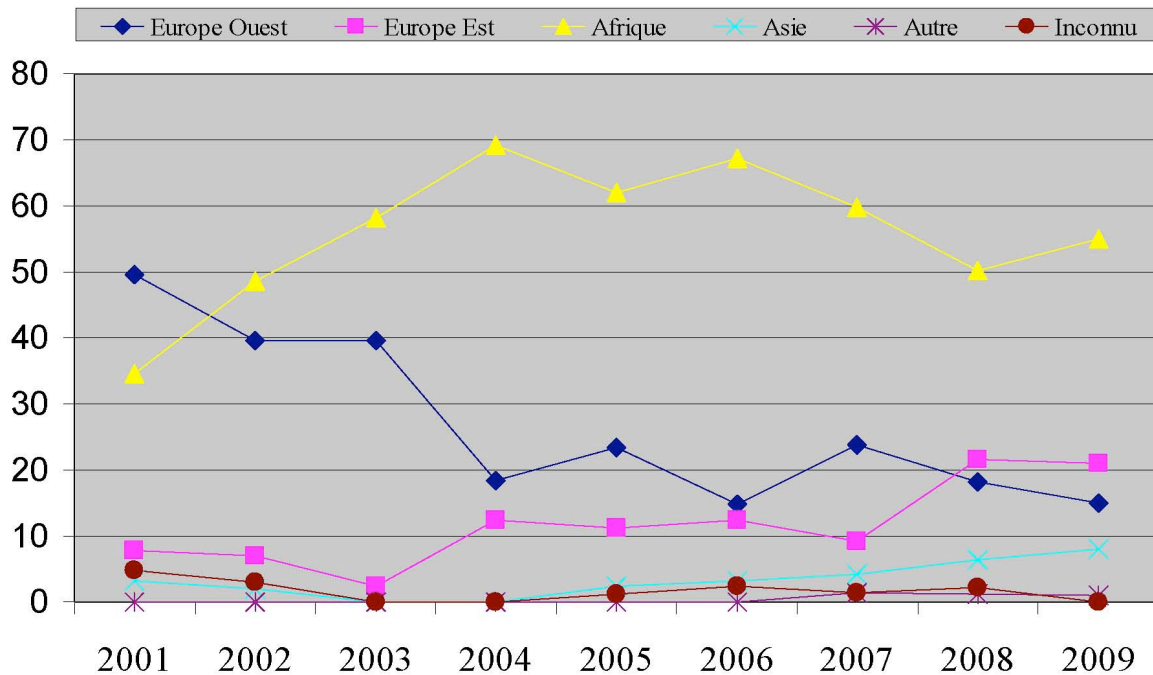
- **BI Décrire le nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats**

Toujours sans objet en 2009. Rappelons que l'étude de la réplication virale des virus HBV, HCV et HDV nécessite une structure possédant un niveau de confinement de type L3, absente de l'hôpital Avicenne et du site de Bobigny. Le contrat d'Interface INSERM actuel en cours (2009 - 2011) aborde la réplication du virus en culture de cellule pour appliquer ces approches au Laboratoire associé au CNR pour les hépatites B, C et Delta. Cette technologie nous permettra de tester la sensibilité des souches virales HDV aux anti-infectieux et de mettre au point un véritable test phénotypique

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

Nos analyses indiquent qu'également en 2009, entre 60 à 70% 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 100 échantillons répliquant HDV et recueillis chez des nouveaux patients infectés par l'HDV, une forte majorité provenaient de patients étrangers issus de pays d'endémie (Afrique sub-saharienne et Europe de l'Est) (Figure 1).

Figure 1 : Evolution du pays d'origine des patients nouvellement suivis au CNR Delta entre 2001 et 2009

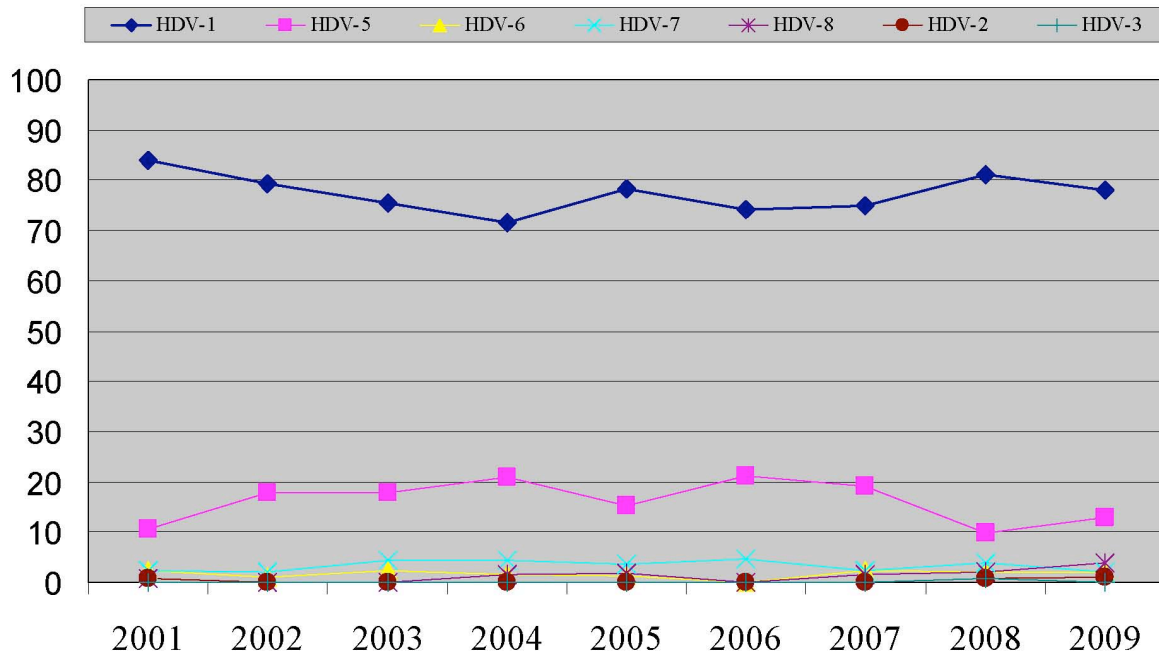


L'évolution sur les 5 dernières années nous a incité à répondre à une lettre publiée dans « Hepatology » permettant de comparer les situations épidémiologiques des infections Delta en France et en Allemagne (Le Gal et al Hepatology 2007) ; 2 situations bien différentes : en France, la majorité des infections recensées touche une population d'origine africaine ; en Allemagne, les infections par l'HDV touchent en majorité une population originaire de l'Europe de l'Est. Une étude très récente semble montrer cette ré-émergence du dépistage de l'infection HDV dans les pays industrialisés (Wedemeyer - J. Hepatology 2010 March).

Pour 2009, en ce qui concerne les génotypes HDV caractérisés au sein du CNR Delta (Figure 2), des isolats ont été retrouvés par ordre de fréquence suivant : Génotype I ou clade 1 (HDV-1) ubiquitaire : n = 76 ; le Clade 5 (HDV-5) africain : n = 12 ; le Clade 8 (n = 4) ; le Clade 6 (n = 2), de Clade 7 (n = 2) et le clade 2 : n=1).

Si les souches HDV-1 sont toujours responsables de la majorité des infections présentes en France, le clade (12%), bien qu'ayant été retrouvé dans 12% des cas (contre 25% l'an dernier) représente le clade africain le plus présent (Figure 2). Ces virus n'ont, à notre connaissance, pas encore été décrits dans d'autres pays européens. Cependant il est possible que l'amélioration des outils diagnostics développés dans notre laboratoire puisse contribuer à les mettre en évidence.

Figure 2 : Evolution des génotypes HDV caractérisés au CNR Delta entre 2001 et 2009



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

Entre l'année 2008 et 2009, nous avons pu noter une stabilisation des demandes de sérologie de dépistage (-2,7%), mais une augmentation des demandes de charges virales HDV (+15,8%). Ces évolutions sont le reflet d'une augmentation de la prise en compte de l'infection HDV sur notre territoire 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.

3/ Activités de surveillance :

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

A/ Réseau de partenaires :

- description des partenaires :

Les laboratoires de l'AP-HP.

Les laboratoires de CHU

Les laboratoires des CHG

Le laboratoire Pasteur Cerba

Certains laboratoires privés

Certains Médecins spécialistes

- répartition par type d'activités :

Schématiquement 2 types d'envoi :

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

- Pour rechercher une infection delta chez un patient porteur chronique de l'HBV.

- répartition géographique :

Bonne représentation en France Nord

Sites un peu moins nombreux en France Sud

Sites très ponctuels avec des pays frontaliers (ex : Belgique, Suisse, Etats Unis)

- 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 assez bonne. Une PCR quantitative delta différente de celle de Bobigny existe à Toulouse et à Bordeaux. Des contacts ont été conduits pour étalonner ensemble ces techniques « maison » (voir ci dessous).

- **B/ Définition de l'échantillon de souches isolées**

Sur l'ensemble des 1533 échantillons positifs pour l'ARN de l'HDV en 2009, 100 cas correspondaient à des souches nouvellement caractérisées

- **C/ 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 (72%). L'âge médian est de 39 ans pour les hommes versus 38 ans pour les femmes. L'origine géographique des patients infectés indique l'importance des isolats d'origine africaine sub-saharienne (Tableau 1)

Tableau 1 : **Origine géographique des patients nouvellement caractérisés en 2009**

Europe Ouest = 14 France = 12	Italie = 2 Portugal = 1
Europe Est = 22 Kosovo = 2 Moldavie = 1 Tchéchénie = 2 Daghestan = 1	Roumanie = 6 Russie = 6 Georgie = 2 Turquie = 2
Afrique = 54 Burkina Fasso = 1 Angola = 2 Liberia = 1 Cameroun = 15 Congo Brazzaville = 2 Cote d'Ivoire = 3 Egypte = 2 Gabon = 3	Mali = 4 Maroc = 1 Mauritanie = 5 République de Centrafrique = 6 République Démocratique du Congo = 2 Sénégal = 1 Tchad = 3 Togo = 2 Tunisie = 1
Asie = 8	Mongolie = 5 Vietnam = 1 Chine = 2
Moyen-Orient = 2 Koweït = 1 Liban = 1	

- **D/ Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune)**

Rapport annuel depuis 2003 et mise en place du programme triennal lors de l'appel d'offres 2006-2009.

- **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 caractérisé 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

Sans objet. L'étude des résistances nécessitera un laboratoire L3 (programme triennal). Schématiquement, 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 nécessite des hépatocytes primaires ou des cellules HepaRG (cf. travaux du groupe de Camille Sureau), cellules difficiles à utiliser dans un contexte de routine ou semi-routine. A cet effet, une collaboration active est en cours avec le Pr. Dény dans le cadre de son contrat d'interface au sein de l'unité INSERM de Lyon pour la réalisation de modèle d'infection de sérum delta infectieux sur la lignée cellulaire HepaRG. D'autre part les projets en cours de constructions de plasmides d'expression spécifiques de chaque clade africain (dimères) dans le cadre du projet d'interface, permettront, une fois ce modèle d'infection mis au point avec la cotransfection d'un plasmide exprimant l'AgHBs, d'analyser la réplication des différents clades HDV et de tester la résistance à différents antiviraux.

- **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 suivi au sein du CNR Delta (ceci nous laisse supposer une contamination sur le territoire français à partir d'un cas index). La caractérisation moléculaire de la région R0 du génome viral a déjà mis en évidence un 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 et les résultats finaux donneront lieu à une publication scientifique.

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). Il entretient également des liens privilégiés pour l'étude de l'infection HDV avec C Sureau (INTS).

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 Londond SE5 9RSUK). Ces équipes nous ont interpellé 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.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- **A/ les objectifs de l'enquête :**
 1. Mise en place **d'un contrôle national de qualité** des techniques diagnostiques en sérologie et en biologie moléculaire.
Un contrôle national de qualité a été réalisé. 14 hôpitaux publics de Paris et Province,

le laboratoire de virologie de l'INTS, 2 laboratoires privés, ainsi qu'un laboratoire suisse y ont participé (voir tableau 2 ci-dessous). Il consistait en 4 échantillons pour les analyses sérologiques anticorps anti delta IgM et Totaux ; et 4 échantillons pour les tests de biologie moléculaire quantitative ou qualitative. 17 laboratoires ont réalisé les tests sérologiques, avec une concordance parfaite des résultats, hormis pour un test IgM rendu « douteux » par un laboratoire et positif par les 16 autres avec une DO faible. Seuls 6 laboratoires réalisent les tests moléculaires (dont 1 la RT-PCR qualitative uniquement). Un laboratoire parisien trouvait des résultats concordants aux nôtres pour les 4 échantillons ; et le laboratoire suisse 2 sur les 4 échantillons à tester. Ces deux laboratoires utilisent la même technique que le LA CNR. L'échantillon africain de génotype 7 a été sous quantifié par 2 laboratoires avec 1 et 4 log de différence respectivement, et rendu négatif par deux autres laboratoires. Le mélange génotype 1 + génotype 7 a aussi été sous quantifié par 2 laboratoires de 1 log et 2 log, et quantifié de façon identique au LA CNR par les 2 autres laboratoires. L'échantillon de génotype 1 pur est bien quantifié par tous les laboratoires sauf 1 qui sous quantifiait avec plus de 2,5 log de différence. Il y avait une bonne concordance des résultats de la RT PCR qualitative avec ceux du LA CNR. En résumé, une harmonisation des techniques de quantification de la charge virale delta s'avère nécessaire compte tenu des résultats globaux divergents obtenus.

Tableau 2 : **Laboratoires ayant participé au contrôle de qualité**

Hôpital Pellegrin - Service de Virologie (Bordeaux)	Hôpital Henri Mondor - Service de Virologie (Créteil)
Laboratoire Pasteur Cerba (Cergy Pontoise)	Laboratoire Biomnis (Ivry sur Seine)
Hôpital Dupuytren - Service de Virologie (Limoges)	Laboratoire Biomnis (Lyon)
Unité INSERM U871 (Lyon)	Hôpital Archet - Service de Virologie (Nice)
Hôpital Beaujon - Service de Virologie (Paris)	Hôpital Bicêtre - Service de Virologie (Paris)
Hôpital Bichat - Service de Virologie (Paris)	Hôpital Paul Brousse - Service de Virologie (Paris)
Hôpital Pitié Salpêtrière - Service de Virologie (Paris)	Institut Nationale de Transfusion Sanguine (Paris)
Hôpital Charles Nicolle - Service de Virologie (Rouen)	CHUV Lausanne (Suisse)
Hôpital Purpan - Service de Virologie (Toulouse)	Faculté de Médecine de Tours

2. Caractérisation des souches Delta dans diverses cohortes :

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 LA CNR. 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 ont été initiées en 2007 et d'autres ont été finalisées. 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 en préparation) : 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 ou publiés)

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 (Abdou Chekaraou M et al . J. Gen Virol 2010).
- 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 (Dr. S. Gourari). Etude réalisée sur plus de 150 échantillons.

Caractérisation de l'épidémiologie moléculaire B et delta en Syrie (travaux en cours de finalisation) : En lien avec un doctorant Syrien (Mr W. Mansour) réalisant ces travaux aux CHU Avicenne (Dr. E. Gordien) et 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.

Mise au point de techniques sérologiques HDV et de recherche de l'ARN HDV sur des prélèvements de sang ou de sérums séchés sur papier buvard (Pr. F Lunel-Fabiani). Travaux présentés à différents congrès nationaux et internationaux et une publication est en cours.

- **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 en 2009 et continueront à l'être au sein du laboratoire associé au CNR.

Bien évidemment, parallèlement en France, et avec le groupe Deltavir, nous souhaitons mettre au point le suivi virologique des patients infectés en France dans le cadre d'une étude thérapeutique multicentrique qui serait nationale et /ou européenne. Il s'agirait d'une étude pilote pour étudier le bénéfice potentiel d'une association d'un analogue nucléos(t)idique anti HBV puissant et de barrière génétique élevée avec l'interféron Pégylé au cours de l'infection delta.

4. Alerte :

- **AI 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
- **BI 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.
- **CI 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 2009. Dans notre pays, il est hautement probable qu'une telle propagation ne survienne que dans un contexte précis de transmission et de promiscuité (Usagers de Drogues, Migrants...). L'étude de ces facteurs de risques de transmission chez les patients nés et vivant en France a été initiée en 2007 et se poursuivra en 2010.

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

- **AI Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires :**
 - *Cours magistraux, à la faculté de médecine de Paris 13 ; de Paris 7 ;*
 - *Staffs, conférences sur invitation, et dans les services cliniques de l'APHP et dans les sessions scientifiques organisées par des laboratoires pharmaceutiques*
 - *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 (Mr W. Mansour) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Mauritanie.*
 - *Etudiants ayant soutenu leur thèse d'université au sein du laboratoire :*

- Mme M. Issoufou : *Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant au Niger. (Janvier 2010)*
 - Mlle V. Williams : *Inhibition de la réplication du HBV auxiliaire ; Approche des mécanismes moléculaires spécifiques de la pathogenèse hépatique. (Mars 2008)*
 - M. F. Le Gal : *Diversité génétique du HDV en Europe et en Afrique. Caractérisation et implication en virologie médicale. (Octobre 2007)*
- **B/ Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)**
Les différentes thèses de sciences produites au sein du LA CNR, servent de support scientifiques et techniques en interne au laboratoire dans la mise en place des études et protocoles techniques (voir ci-dessus).
- Toujours en interne au laboratoire, le Guide de Bonne Exécution de Analyses (GBEA) peut servir à la bonne réalisation des techniques de routine destinée 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
Compte-rendu annuel, publications scientifiques et didactiques
- **DI Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)** :
Géré par la réception ou le secrétariat qui renvoie sur les techniciens ou les médecins du Laboratoire Associé en fonctions des renseignements demandés.
- **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 les Unités INSERM U845 (Paris) et U871 (Lyon).

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.**
- *L'étude initiée fin 2006 avec le Dr S. Laperche de l'Institut National de Transfusion sanguine et qui portait sur des poches de sang positives pour AgHBs a été complétée en 2007. Cette étude avait pour but de déterminer la prévalence de l'infection Delta au sein de cette population de donneurs de sang. En 2006, nous avons retrouvé 45 échantillons*

positifs ou douteux pour la recherche des Ac Totaux HD entre 1997 et 2004. Parmi ceux-ci, 6 avaient des charges virales HDV élevées. Ces patients étaient tous d'origine africaine et les virus détectés étaient de génotypes HDV-7 (n=1) et HDV-1 sous-type « africain » (n=5). En 2007 sur 9 nouveaux échantillons positif ou douteux en Ac. Totaux HD, un seul était retrouvé positif en ARN delta. Le génotype de la souche correspondante était de génotype HDV-1 et a été isolée chez un militaire de retour de mission en Afrique. En 2010 l'étude sera poursuivie sur les nouveaux échantillons retrouvés.

- Rôle des protéines delta dans la cancérogenèse : Déterminer les interactions cellulaires et des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse liée à l'infection par l'HDV ; Interactions de la grande protéine delta et de voies de signalisation cellulaires (EA3406 ; 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 retrouvé, et aussi dans le pathogénèse spécifique propre de l'HDV. Ces travaux sont les résultats obtenus au laboratoire dans le cadre de la thèse d'université de Melle WILLIAMS. L'implication du facteur de transcription STAT-3 a été démontrée, et les travaux en cours mettent en exergue des mécanismes spécifiques de cancérogenèse liés au virus HDV. L'inhibition de l'apoptose liée à bax et l'activation de Bcl-xL ; l'activation de la cycline D1 ; la médiation du stress oxydant avec l'activation de STAT-3 et NF- κ B par la grande protéine delta (ou p27) ont été clairement identifiées. Ces travaux ont été présentés en communication orale à différents congrès internationaux et deux publications sont en cours.
- Déterminer le rôle de l'HDV dans l'inhibition de la réplication du B en fonction de la variabilité génétique des souches virales (INSERM U871 ; INTS ; Université Paris 13 et Hôpital Avicenne, L.A-CNR des hépatites B, C et delta) (contrat d'Interface 2007-2009) : Construction des clones delta répliquant les génotypes spécifiques africains (HDV-5, -6, -7 et -8).

7- Liste des publications et communications

Publications nationales

1- Le virus de l'hépatite Delta

Frédéric Le Gal, Emmanuel Gordien, Paul Dény

In Hépatites virales, Progrès en hépato-gastroentérologie, 9 ; Chapitre 24, Page 355 ; Editions DOIN, 2008. Coordinateurs Patrick Marcellin et Tarik Asselah

Publications internationales

1. A new Hepatitis B virus subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains.

Mariama Abdou Chekaraou, Ségolène Brichler, Waël Mansour, Frédéric Le Gal, Aminata Garba, Françoise Lunel Fabiani, Paul Dény and Emmanuel Gordien
Journal of General Virology Feb ; 2010 (sous presse)

2. 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. 2009 Nov 12.

3. Williams V, Brichtler S, Radjef N, Lebon P, Goffard A, Hober D, Fagard R, Kremsdorf D, Dény P, Gordien E.
Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene.
J Gen Virol. 2009 Nov; 90(Pt 11):2759-67.
4. 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.
5. Vallet S, Gouriou S, Nkontchou G, Hotta H, Vilerio M, Legrand-Quillien MC, Beaugrand M, Trinchet JC, Nousbaum JB, Dény P, Gaudy C, Goudeau A, Picard B, Payan C.
Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma?
J Viral Hepat. 2007 Feb;14(2):96-106
6. 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

- 1- Frédéric Le Gal, Elyanne Gault, Nasser Al Hawajri, Ségolène Brichtler, 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
- 2- *Epidémiologie moléculaire du virus de l'hépatite delta en France*
Le Gal F, Rico-Garcia M, Abdou Chekaraou M, Brichtler S, Gault E, Dény P, Gordien E
Journées Francophones de virologie 2008

Communications internationales

7. *Évaluation 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 buvard*
W. Mansour, C.T. Hamed, E. Ahmed-Tijani, S. Amadou-Mody, F. Le Gal, E. Gordien, A. Ducancelle, M.A. Bollahi, F. Lunel-Fabiani.
RICA 2009, 3 & 4 Décembre 2009 Paris, France
8. *Prévalence et épidémiologie moléculaire de l'infection par les virus de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite Delta (VHD) en Mauritanie*
W. Mansour, E. Ishagh, P. Veillon, F. Le Gal, B. Lô, M. Aye, E. Gordien, F. Lunel
14ème Journée annuelle du GEMHEP, Paris, France. 19 Novembre 2009
9. *Resolution of Chronic Hepatitis Delta after one year of combined therapy with Pegylated Interferon, Tenofovir and Emtricitabine.*
W. Mansour, A. Ducancelle, F. Le Gal, A. Pivert, H. Le Guillou-Guillemette, P. Calés, E. Gordien, F. Lunel
13th International symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, March 20–24, 2009 Washington, DC, USA (Communication affichée)
10. *Impact of co infection with B+Delta viruses on liver fibrosis measured by transient elastography or FibroMeter.*

F. Lunel, W. Mansour, X. Causse, F. Le Gal, E. Gordien, I. Fouchard-Hubert, S. Ahmed et le Groupe de Fontevraud.
13th International symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, March 20–24, 2009
Washington, DC, USA (Communication affichée)

11. The Large Hepatitis Delta Antigen Promotes Cell Proliferation by activating Cyclin D1 and Inhibits Apoptosis by activating Bcl-xL and sequestering Bax
Gordien E., Williams V., Brichler S., Dény P., Kremsdorf D.
Oral presentation at the International Meeting of The molecular biology of Hepatitis B viruses.
San Diego (USA), August 16 – 20, 2008

12. Impact of B+Delta viruses co infection on the liver stiffness measurement (LSM) by transient elastography
S. Ahmed, W. Mansour, X. Causse, F. Le Gal, E. Gordien, I. Fouchard-Hubert, F. Lunel et le Groupe de Fontevraud
43rd Annual Meeting of the European Association For The Study Of The Liver EASL April 23-27, 2008 Milan, Italy (Communication affichée)

13. The isoprenylated large isoform of hepatitis Delta virus protein activates STAT-3 and NFkB, via oxidative stress
Williams Virginie, Brichler Ségolène, Komla Soukha Isabelle, Sureau Camille, Kremsdorf Dina, Dény Paul and Gordien Emmanuel
Oral presentation at the International Meeting of The molecular biology of Hepatitis B viruses.
Roma (Italia), September 16 – 20, 2007

Conférences sur invitation

1- 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 en 2005 pour les années 2006-2009.

Notre activité à venir s'articulerait autour des axes listés 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

- *Optimisation de la technique de la quantification de la charge virale HDV (contrôle interne ; extraction automatisée ; RT-PCR « one step ») et harmonisation des techniques avec les autres laboratoires au niveau national et européen.*
- *Application sur des prélèvements biologiques autres que le sang (foie, cellules mononuclées du sang périphérique, ...)*
- *Application sur des prélèvements sanguins réalisés sur papier buvard*
- *Mise au point d'un modèle d'infection delta in vitro, à partir de sérum infectieux sur des cellules HeparG en culture.*
