



**INSTITUT
DE VEILLE SANITAIRE**

CNR DES HEPATITES B, C ET DELTA

RAPPORT d'ACTIVITES 2012-2013

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

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

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

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

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

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

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

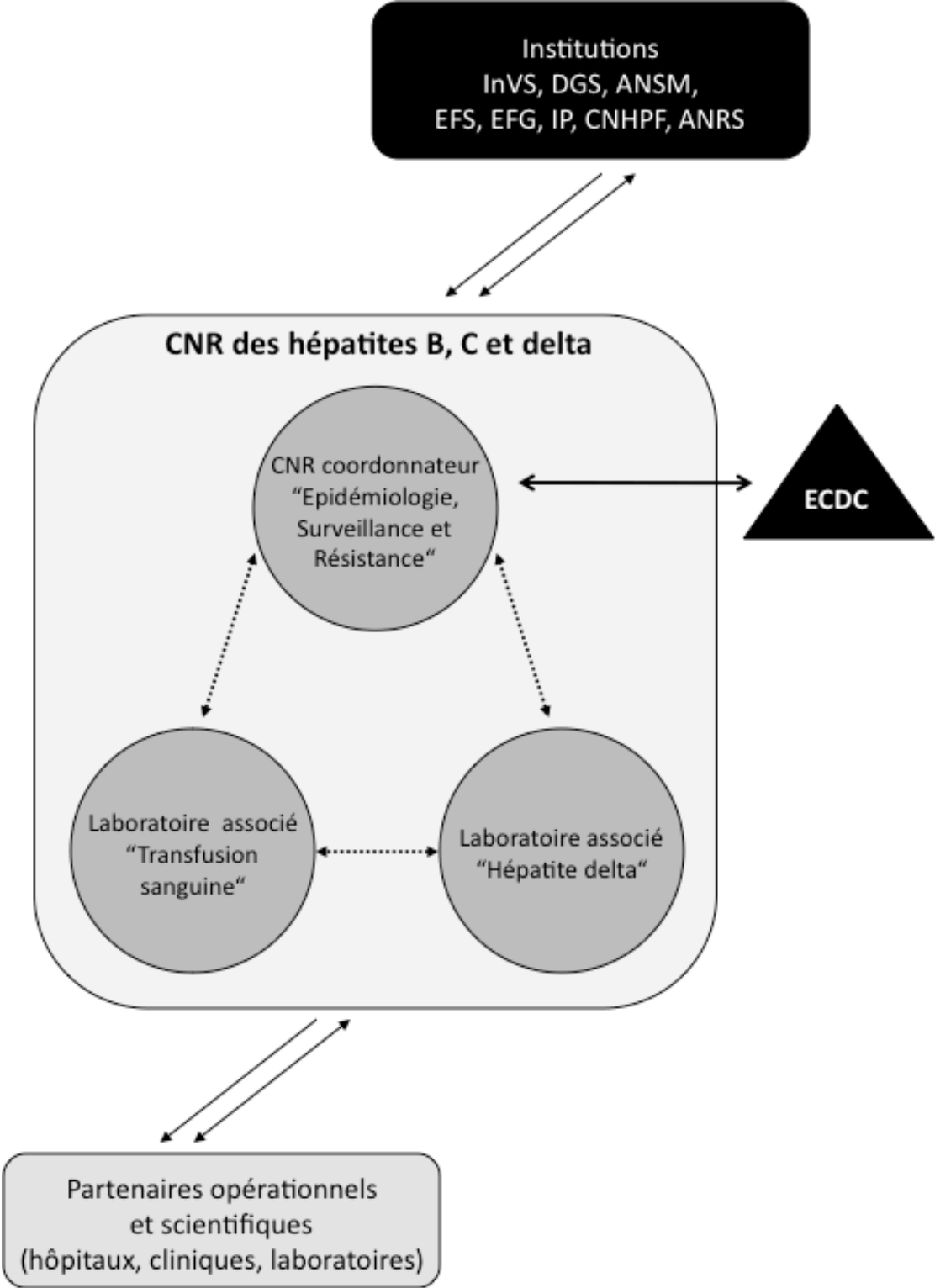


Figure 1 : Structure du CNR des hépatites B, C et delta

ORGANISATION DU CNR ET REPARTITION DES ACTIVITES ENTRE LES LABORATOIRES

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

EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE

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

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

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

L'étude de la résistance du VHC et du VHB aux antiviraux, coordonnée par le CNR au plan national, se fait en étroite collaboration avec l'ANRS au sein de l'AC33, présidée par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY, consacrée spécifiquement à ce sujet. Les

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

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

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

CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

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

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

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

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

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

CONTRIBUTION A L'ALERTE

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

RECHERCHE

Les liens entre le CNR Coordonnateur et le CNR associé de l'hôpital Avicenne se sont renforcés avec l'intégration du Dr Emmanuel GORDIEN et du Dr Ségolène BRICHLER, du CNR associé consacré au virus de l'hépatite delta, au sein de l'équipe de recherche « Physiopathologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques » (INSERM U955) dirigée par le Pr Jean-Michel PAWLITSKY à l'hôpital Henri Mondor de Créteil.

RESUME DES ACTIVITES

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

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

Cette deuxième année de fonctionnement depuis le renouvellement du CNR a été une année de collaboration accrue entre les partenaires du CNR et d'intense mise en place de nouvelles études et de nouvelles techniques. Elle a vu en particulier : la mise en place de l'étude VHC TROD, qui évalue les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) de l'infection virale C à partir de matrices biologiques originales, telles que le liquide cravculaire ou le sang total capillaire ; la poursuite de l'enquête COQUELICOT et la fin de la surveillance nationale des patients atteints d'hépatite chronique B nouvellement pris en charge dans les Pôles de Référence et Réseaux Hépatites. L'enquête COQUELICOT est une enquête de séroprévalence du VIH et des hépatites virales B et C et de séro-incidence du VIH et du VHC chez des usagers de drogues ayant sniffé ou s'étant injecté au moins une fois au cours de leur existence. Cette année a également permis au CNR d'évaluer de nouvelles techniques (optimisation de la recherche d'anticorps et de génome viral à partir de buvards, tests rapides pour la détection des anticorps anti-VHC et test rapide pour la détection d'AgHBs). Ces technologies sont essentielles à la réalisation des études en cours (étude TROD VHC, enquête COQUELICOT).

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

des performances des TROD pour la détection d'anticorps anti-VHC à la demande de l'ANSM. Quatre tests ont été évalués (ImmunoComb II HCV, OraQuick, Signal HCV et Toyo HCV). Les résultats montraient une sensibilité satisfaisante (>94%), mais une spécificité variable selon les tests (84,5% à 100%). Rappelons que la matrice utilisée lors de cette évaluation était plasmatique. Une étude visant à évaluer la capacité des trousses commerciales à détecter les mutants de l'AgHBs a été réalisée. La capacité à détecter les mutants était variable selon les trousses. La majorité des trousses détectaient les protéines recombinantes issues des souches sauvages. Les trousses utilisant un anticorps monoclonal pour la phase de capture avaient une capacité inférieure à 80% pour la détection des mutants. La surveillance des marqueurs du VHB et du VHC chez les donneurs de sang s'est poursuivie en étroite partenariat avec l'InVS.

Le laboratoire associé du virus de l'hépatite delta a poursuivi les études en cours, en particulier l'évaluation des performances de trousses pour la quantification de l'ARN du VHD. Deux des 3 trousses évaluées étaient incapable de quantifier avec exactitude les souches de génotypes africains, qui représentent plus de 60% des souches circulant en France. Le laboratoire associé a également participé au développement d'un étalon international OMS pour le virus delta. La surveillance des marqueurs du VHD s'est poursuivie en France et à l'étranger via la mise en place de nombreuses collaborations internationales, notamment avec l'Afrique du Nord.

CNR COORDONNATEUR

LABORATOIRE DE VIROLOGIE ET INSERM U955

HOPITAL HENRI MONDOR

CRETEIL

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

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

MOYENS HUMAINS AFFECTES AU CNR

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

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

- . 1 externe en Médecine
- . 2 Secrétaires Médicales

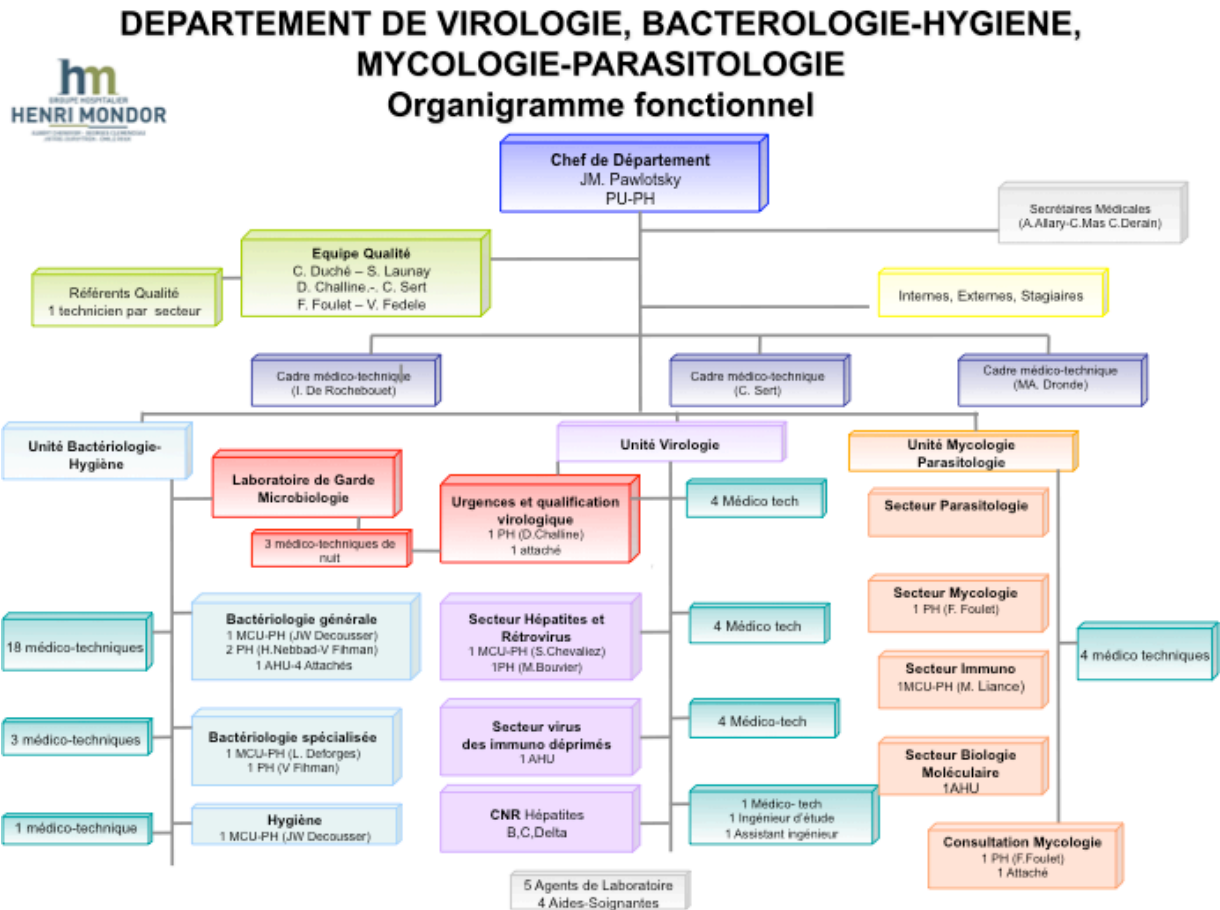


Figure 2 : Organigramme du Département de Virologie, Bactériologie-Hygiène et Mycologie-Parasitologie de l'hôpital Henri Mondor.

Le personnel suivant sera affecté au fonctionnement du CNR coordonnateur :

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

LOCAUX ET EQUIPEMENTS

Le laboratoire hospitalo-universitaire de Virologie occupe 430 m² de laboratoire, 105 m² de bureau, 175 m² de surface d'accueil, laverie et réserves, bibliothèque (certains locaux sont communs avec le laboratoire de Bactériologie-Hygiène et la plate-forme de séquençage de nouvelle génération); 30 m² sont réservés à la garde de nuit. Le laboratoire fonctionne 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Une réorganisation physique du laboratoire est prévue dans le cadre du schéma directeur des laboratoires du Pôle de Biologie, dont la date dépendra des financements accordés. Elle vise en particulier à créer, à côté de la plate-forme automatisée de sérologies déjà fonctionnelle, une plate-forme intégrée de biologie moléculaire en maladies infectieuses qui permettra de rationaliser et d'automatiser au maximum les activités actuellement réalisées au sein du laboratoire. Les activités du CNR bénéficieront grandement de cette restructuration. Par ailleurs, une nouvelle plateforme de séquençage de nouvelle génération à haut débit (*next-generation sequencing*, NGS) est en cours d'installation. Cette plateforme est localisée dans des locaux dédiés, en cours de rénovation, contigus au Département de Virologie, Bactériologie-Hygiène, Mycologie-Parasitologie, sous la responsabilité du Pôle de Biologie (Chef de Pôle : Professeur Jean-Michel PAWLLOTSKY) et de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB). Elle comprend de très nombreux appareils détaillés ci-après.

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 XL (DIASORIN),
- . 1 VITROS 3600 (Ortho),
- . 1 ARCHITECT (Abbott),

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

- . 1 extracteur automatique d'acides nucléiques COBAS AmpliPrep (Roche)

- . 1 extracteurs automatiques d'acides nucléiques *m2000_{SP}* (Abbott),
- . 2 extracteur QIASymphony SP/AS (Qiagen),
- . 1 pipeteur-distributeur Cobas p630 (Roche),
- . 1 automate pour "ADN branchés" Siemens 340 (Siemens),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS Taqman 96 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS Taqman 48 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel *m2000_{RT}* (Abbott),
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel StepOnePlus (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel LighCycler 1.0 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel ABI7300 (Applied Biosystems),
- . 1 Rotor-Gene Q (Qiagen)
- . 1 thermocycleur à gradient MASTERCYCLE (Eppendorf),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 9700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2400 (Applied Biosystems),
- . 2 thermocycleurs ABI GENEAMP 9600 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur UNO II (Biometra).
- . 1 PANTHER System pour la préparation, amplification et détection des génomes du VIH et du VHC dans la cadre de la qualification des dons d'organes de tissus et de cellules (Gen-Probe)

- 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),
- . 3 séquenceurs automatiques capillaires ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems), disponibles sur la plate-forme du Centre de Recherche.

- Matériel destiné à la constitution et la conservation des thèques

- . Hottes à flux laminaires,
- . Congélateurs -80°C,
- . Chambres froides et congélateurs -20°C,

. Cuves d'azote liquide.

- Equipements prévus pour la plateforme de NGS

- . 1 GS Junior (Roche – 454 Sequencing)
- . 1 GS FLX + (Roche – 454 Sequencing)
- . 1 MiSeq Personal Sequencer (Illumina)
- . 1 HiSeq 2500 (Illumina)
- . Autres matériels à venir (automates de préparation de librairie, *Access Array™* System)

THEMATIQUES DE RECHERCHE

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

1. **Expertise technologique** : Développement, standardisation et évaluation de la performance intrinsèque et des indications des tests et des nouvelles technologies virologiques à visée diagnostique et de suivi thérapeutique des hépatites virales chroniques.

2. **Epidémiologie moléculaire** : Epidémiologie moléculaire et surveillance des virus des hépatites B et C dans le cadre du CNR des Hépatites Virales B, C et delta,

3. **Recherche clinique et translationnelle** : Etude de la variabilité génétique naturelle et associée à la chimiothérapie antivirale des virus des hépatites B et C, avec un intérêt tout particulier pour les mécanismes sous-tendant l'efficacité et l'échec thérapeutique et le rôle de la résistance antivirale dans l'échec thérapeutique.

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

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

Les activités de diagnostic et de suivi thérapeutique des malades atteints d'hépatites virales sont fondées sur l'utilisation de techniques virologiques comprenant des techniques immuno-enzymatiques de type ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) automatisées et des techniques de biologie moléculaire fondées sur l'amplification génique par PCR, aujourd'hui principalement la PCR en temps réel, l'amplification du signal par les ADN branchés, l'hybridation inverse ou l'analyse de la séquence des génomes viraux par séquençage direct, clonage-séquençage ou pyroséquençage à haut débit (ultra-deep pyrosequencing, UDPS).

L'expertise du laboratoire en matière de diagnostic virologique des hépatites virales est reconnue internationalement, comme en témoignent les nombreux articles originaux et de revue publiés sur le sujet depuis de nombreuses années. Plusieurs évaluations de tests virologiques à visée diagnostique pour le VHC et le VHB, en partenariat avec les industriels qui les développent, ont été conduites. Ces évaluations ont concerné les techniques de biologie moléculaire adaptées à la détection et/ou la quantification de l'ARN du VHC et de l'ADN du VHB par PCR en temps réel, ainsi que des techniques de typage des génomes viraux par hybridation inverse ou séquençage visant à identifier le génotype et le sous-type viral ou des mutations de résistance après analyse des séquences nucléotidiques (méthodes de séquençage direct, clonage-séquençage, pyroséquençage à haut débit). Ces travaux ont donné lieu à des publications acceptées ou en préparation. Les réalisations dans ce domaine sont détaillées dans le bilan des activités du CNR sur la période 2012-2013.

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

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

cas groupés ou dans un contexte épidémique. Les études réalisées dans le cadre des activités du CNR sont présentées ci-dessous dans le bilan d'activité.

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

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

De nombreux travaux d'investigation ont été réalisés dans cette thématique. Le laboratoire étudie ainsi les mécanismes moléculaires de l'action antivirale de la ribavirine dans le traitement des hépatites chroniques C. La ribavirine est un élément essentiel du traitement de l'hépatite chronique C. En effet, elle augmente très significativement les taux de guérison de l'infection chronique par le VHC lorsqu'elle est administrée en combinaison à des antiviraux directs (antiprotéases, antipolymérase) en présence ou non d'interféron (IFN) pégylé (Hézode *et al.*, 2009 ; Kwo *et al.*, 2010 ; Kowdley *et al.*, 2012 ; Osinusi *et al.*, 2012 ; Soriano *et al.*, 2012). Le principal mode d'action de la ribavirine serait de prévenir les rechutes (Bronowicki *et al.*, 2006).

Les mécanismes d'action moléculaire de la ribavirine restent cependant inconnus. Plusieurs hypothèses ont été formulées [inhibition directe l'ARN polymérase ARN-dépendante (NS5B), inhibition de l'enzyme inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), effet mutagène, propriétés immunomodulatrices, modulation de l'expression des gènes induits par l'IFN (ISG) et des voies inhibitrices de l'IFN], le plus souvent sur la base de résultats générés *in vitro* (Lau *et al.*, 2002). Le rôle prépondérant d'aucun de ces mécanismes n'a cependant été confirmé au cours du traitement des hépatites chroniques C.

Le but de ce travail était de comprendre le mécanisme moléculaire d'action de la ribavirine dans l'infection virale C *in vitro* à l'aide de différents modèles cellulaires : lignées humaines d'hépatomes, et cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ces

dernières sont des cellules clés de la réponse immune car elles sécrètent de grandes quantités d'IFN de type I.

L'analyse de l'expression génique dans des cellules hépatocytaires immortalisées (Huh7) non infectés et traités par la ribavirine a montré une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'interféron. Il s'agit des gènes codant le TLR7 (*Toll-like Receptors*), l'IRF7 (*Interferon Regulatory Factor*) et l'IRF9. Différentes concentrations de ribavirine (0, 1, 10, 100 et 1000 µg/mL) et différents temps (0, 30 min, 2 h, 8 h, 24 h et 48 h) ont été testés. L'effet observé était dose-dépendant. L'effet maximum était observé 24 heures post-traitement. Des effets additifs, voire synergiques ont été obtenus par traitement des cellules Huh7 par la ribavirine (100 et 1000 µg/mL) en association à l'interféron alpha à la dose de 100 UI/mL. L'effet observé était d'autant plus important que la concentration en ribavirine augmentait d'un facteur 10.

La ribavirine avait une action antivirale anti-VHC. En effet, la ribavirine diminuait de façon dose-dépendante le niveau de réplication du RSG, mesurée par RT-qPCR dans des cellules exprimant de façon stable le réplicon subgénomique, Con-1, par rapport à des cellules non traitées.

Afin d'élucider comment la ribavirine était capable d'affecter la transcription de certaines gènes dans un contexte d'infection, nous avons évalué l'effet de la ribavirine sur le promoteur du gène codant l'IRF7. Pour cela, les cellules Huh7.5 exprimant le RSG Con-1 et un ou deux éléments de réponse à l'IFN (IRF-E plus ou moins ISRE) à partir de différents plasmides d'expression ont été traitées avec différentes doses de ribavirine, seule ou en combinaison à l'IFN. La ribavirine activait de façon dose-dépendante le promoteur du gène codant l'IRF7 via l'élément IRF-E. Contrairement à l'IFN, la ribavirine n'avait pas d'effet sur l'élément ISRE. De plus, des cellules Huh7 exprimant stablement le RSG Con-1 ont été transduites à l'aide de particules lentivirales exprimant un shIRF7 et ont été traitées par des doses croissantes de ribavirine (0, 10, 100 et 100 µg/mL). À 48 heures post-traitement, la ribavirine était capable d'inhiber la réplication du RSG.

Bien que l'IRF7 puisse jouer un rôle majeur à travers l'amplification de la voie de signalisation de l'IFN, la production d'IFN est initiée par la reconnaissance d'un TLR. La ribavirine a un effet sur l'expression du gène codant le TLR7. En utilisant des cellules HEK (*Human Embryonic Kidney cells*) exprimant le TLR7 et un gène rapporteur inducible (SEAP codant la phosphatase alcaline), la ribavirine activait sélectivement le TLR7 et ce, de façon dose-dépendante. De plus, le traitement des cellules par

l'imiquimod ou la loxoribine (agonistes puissants du TLR7) en présence de ribavirine augmentait significativement l'activité du TLR7. La stimulation du TLR7 par la ribavirine induisait la sécrétion de cytokines telles que l'IFN de type I dans des cellules humaines d'hépatomes.

Au total, la ribavirine semble agir comme un agoniste sélectif du TLR7, induisant l'augmentation de la production d'IFN de type I à travers l'activation de l'IRF7, un facteur clé du fait de son action antivirale et de son rôle dans l'amplification de la voie de signalisation de l'IFN.

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

AUTRES ACTIVITES DE RECHERCHE DU LABORATOIRE

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

cyclophiline, utilisés en combinaison à l'interféron alpha et à la ribavirine, ou en combinaisons orales sans interféron.

L'équipe de recherche "Physiopathologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques", INSERM U955, poursuit également une recherche fondamentale dans deux domaines principaux. Le premier est le développement de nouvelles approches thérapeutiques et l'étude des mécanismes moléculaires de la résistance aux antiviraux développés contre le VHC. De nouveaux inhibiteurs du VHC ont été découverts au laboratoire, en collaboration avec des équipes de chimistes, et sont actuellement en phase de caractérisation pré-clinique, en particulier une toute nouvelle famille d'inhibiteurs des cyclophilines non dérivés de la cyclosporine A, des membres de la famille des auresones, et des Flavonoïdes (ces deux derniers groupes de molécules agissant comme des inhibiteurs non nucléosidiques de l'ARN polymérase virale). Les mécanismes moléculaires de la résistance sont étudiés dans différents systèmes expérimentaux enzymatiques acellulaires, ou dans des systèmes cellulaires de réplication et d'infection par le VHC, grâce à des approches combinant mutagenèse dirigée et utilisation de cassettes comprenant les séquences virales des individus infectés et éventuellement traités.

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

CAPACITES TECHNIQUES ACTUELLES DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE DU CNR

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

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

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

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

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

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

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

. Techniques de biologie moléculaire pour la détection des mutations de résistance du VHB associées à la chimiothérapie antivirale, fondées sur le séquençage direct du domaine transcriptase inverse de l'ADN polymérase ; l'hybridation inverse (Ino-LiPA HBV DR v3) ; la caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB par des

techniques de clonage-séquençage ; et les techniques de détection des mutations de résistance et de caractérisation de leurs dynamiques par pyroséquençage à haut débit suivi de l'analyse des données par notre package de logiciels "maison" PyroPack® (UDPS).

.Techniques de biologie moléculaire pour la détection des mutations de résistance du VHC aux inhibiteurs directs, fondées sur le séquençage direct des protéines NS3 (protéase), NS5B (polymérase) et NS5A ; la caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB par clonage-séquençage ; et les techniques de détection des mutations de résistance par pyroséquençage à haut débit suivi de l'analyse des données par notre package de logiciels "maison" PyroPack® (UDPS).

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

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

TECHNIQUES IMPLEMENTEES AU COURS DE L'ANNEE 2012

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

BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES DE L'ANNEE 2012-2013

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

Les activités de diagnostic et de suivi thérapeutique des malades atteints d'hépatites virales sont fondées sur l'utilisation de techniques virologiques comprenant des techniques immuno-enzymatiques de type ELISA automatisées et des techniques de biologie moléculaire fondées sur l'amplification génique par PCR (*Polymerase Chain Reaction*), aujourd'hui principalement la PCR en temps réel, l'hybridation inverse ou l'analyse de la séquence des génomes viraux.

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

Etude des performances de la plate-forme Cobas AmpliPrep-Cobas Taqman 96 de seconde génération (CAP/CTM HCV v2.0) pour la détection et la quantification de l'ARN du VHC de génotype 4. Les performances intrinsèques de la nouvelle plate-forme de PCR en temps réel Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan 96 (CAP/CTM HCV v2.0, Roche Molecular Systems) ont été évaluées pour la quantification de l'ARN du VHC à partir d'un grand nombre d'échantillons provenant de patients infectés par un VHC de génotype 4, provenant du Service d'Hépatogastroentérologie de l'hôpital Henri Mondor et du Laboratoire Cerba. Le groupe A comprenait 122 patients infectés par un VHC de génotype 4 et le groupe B comprenait 4 patients infectés par un VHC de génotype 4 dont l'ARN était indétectable à l'aide la trousse CAP/CTM de première génération. L'ARN de chaque échantillon a été quantifié en parallèle à l'aide de

3 techniques : bDNA HCV 3.0 (ADN branchés), CAP/CTM HCV et CAP/CTM HCV v2.0. Dans 76,2% des échantillons, la quantité d'ARN du VHC mesurée avec la trousse CAP/CTM était légèrement plus faible que celle mesurée à l'aide du bDNA HCV 3.0, et ce quel que soit le sous-type du génotype 4. En revanche, la corrélation entre les valeurs mesurées à l'aide de la nouvelle trousse CAP/CTM HCV v2.0 et du bDNA était excellente (Figure 3). La nouvelle trousse était capable de quantifier avec exactitude l'ARN du VHC portant des substitutions nucléotidiques en positions 165 et 145.

Au total, la trousse CAP/CTM HCV v2.0, au contraire de la première génération de ce test, quantifie avec exactitude l'ARN du VHC de génotype 4 et ce, indépendamment du sous-type. Elle peut donc être utilisée dans les essais thérapeutiques et en pratique clinique pour quantifier l'ARN viral chez les malades infectés par ce génotype (Chevaliez et al., J Clin Microbiol. 2013 Apr;51(4):1078-82).

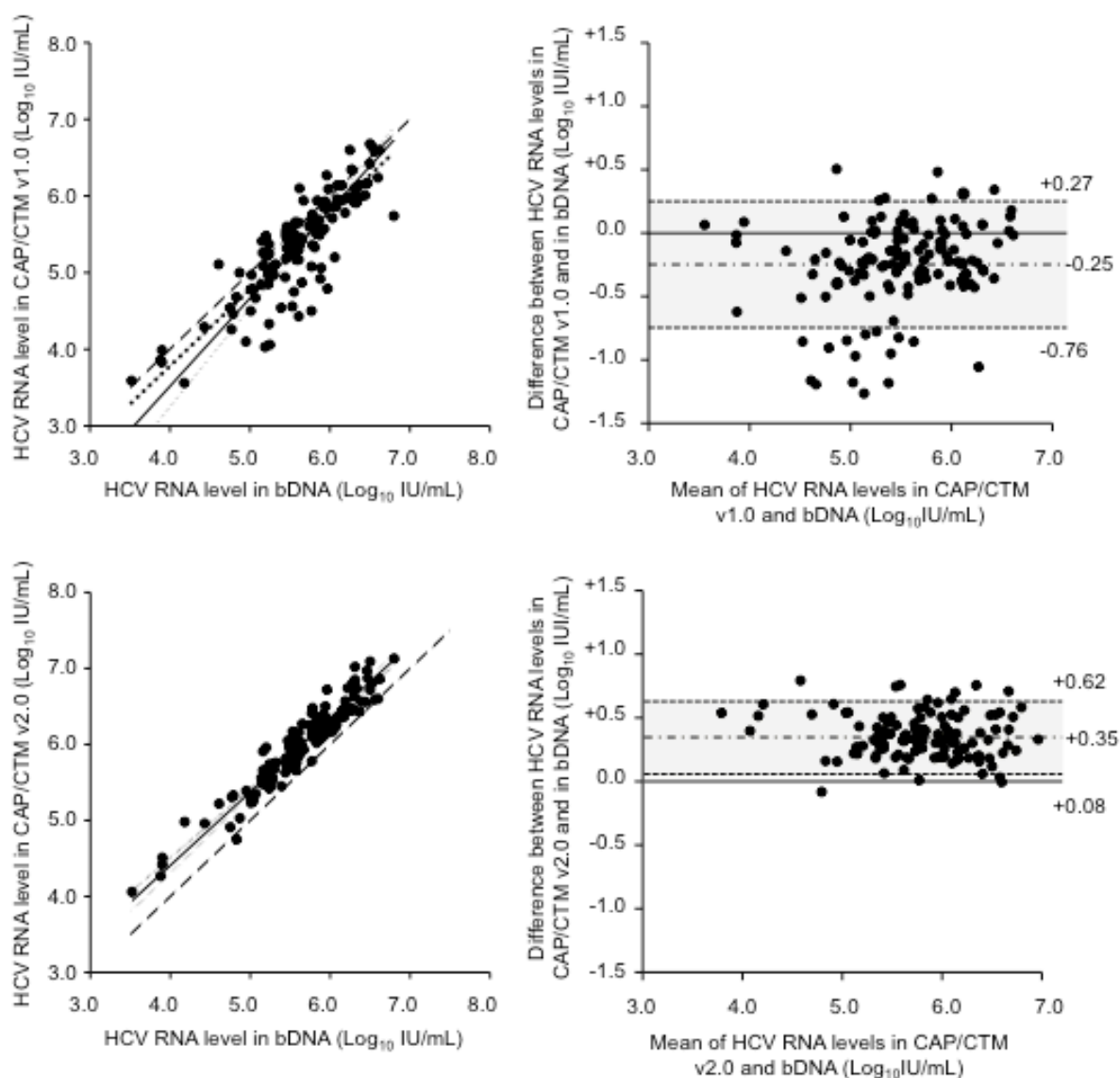


Figure 3 : Corrélation de Deming et analyse Bland-Altman de l'ARN du VHC mesuré par bDNA, CAP/CTM HCV et CAP/CTM v2.0 dans les 122 échantillons du groupe A.

Tableau 1 : ARN du VHC des échantillons du groupe B mesuré à l'aide des trousses CAP/CTM HCV, CAP/CTM HCV v2.0, m2000 et bDNA.

Genotype 4 subtype	CAP/CTM v1.0	CAP/CTM v2.0	Abbott RealTime™ HCV	bDNA
4h	<1.08	5.8	5.4	5.0
4l	<1.08	6.3	6.0	5.7
4h	<1.08	6.7	6.5	6.2
4k	<1.08	5.4	5.7	5.8

Performances du nouveau test rapide (TROD) DRW HBsAg v2.0 pour la détection de l'antigène de surface (AgHBs) du VHB dans différentes populations.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire associé de l'INTS. L'objectif était d'évaluer les caractéristiques intrinsèques et la performance clinique du nouveau TROD DRW-HBsAg v2.0 (Diagnostics for the Real World™, Ltd, UK) dans des populations variées incluant des porteurs chroniques de l'AgHBs, des sujets présentant une hépatite aiguë sévère d'étiologie inconnue et des femmes enceintes dont le statut vis-à-vis du VHB n'était pas connu au moment de l'accouchement. La limite de détection clinique du test était de $0,30 \pm 0,07$ UI/mL à $0,97 \pm 0,26$ UI/mL, selon le génotype du VHB (Tableau 2). Sa spécificité était de 98,8% (IC95% : 96,9%-99,5%) chez les individus séronégatifs pour l'AgHBs, 98,7% (IC95% : 96,9%-99,4%) chez les individus AgHBs-négatif ayant une hépatite sévère d'étiologie inconnue, 97,8% (IC95% : 96,6%-98,7%) chez les femmes enceintes séronégatives pour l'AgHBs au moment de l'accouchement. La sensibilité clinique de ce test était respectivement de 100,0%, 96,3% et 95,2% chez les individus AgHBs-positif de chacun des 3 groupes. La présence de substitutions amino acidiques dans la région hydrophile majeure (MHR) n'avait pas d'influence sur la détection de l'AgHBs par le test DRW HBsAg v2.0 (Tableau 3).

Au total, ce nouveau test rapide est simple et suffisamment sensible pour être utilisé dans des populations à faible et fort risque d'infection par le VHB (Chevaliez et al., manuscrit soumis à J Clin Microbiol.)

Tableau 2 : Sensibilité clinique du test rapide DRW HBsAg v2.0 selon le génotype du VHB.

HBV genotype	N	Mean±SD lowest HBsAg level detected (IU/mL)
Genotype A	5	0.38±0.12
Genotype B	4	0.52±0.17
Genotype C	4	0.30 ±0.07
Genotype D	4	0.40±0.10
Genotype E	4	0.97±0.26
Genotype F	2	0.42±0.17

Tableau 3 : Titres de l'AgHBs (Architect) chez les 20 donneurs de sang porteurs d'un virus mutant au niveau de la région MHR.

Blood donors	Genotype	HBsAg titer (Log ₁₀ IU/mL)	Amino acid substitutions in the MHR
1	E	4.10	D144E
2	D	2.50	T131I
3	D	0.65	T131N, M133I, T134H
4	C	3.90	I126N
5	D	2.85	T118V, A128V, Q129L, S171F, W172*stop
6	A	3.90	M133T
7	D	0.70	Q101R, M103I, T118K, S143L, F158L, W172L
8	D	3.70	Y134N
9	B	3.30	P120S, F134I
10	B	2.90	T126A
11	A	3.40	Q129H, D144A
12	D	2.35	T118A
13	B	4.35	G129H
14	D	1.80	G130R
15	D	2.40	G130R
16	E	4.00	G145R
17	E	2.85	S143L
18	B	-0.9	M133T, T116N
19	E	3.30	G145A
20	A	>5.4	T116N

Performances du test rapide TOYO HCV pour la détection des anticorps anti-VHC à partir d'échantillons sériques fraîchement collectés. La recherche d'anticorps anti-VHC a été réalisée à partir de 150 échantillons sériques fraîchement collectés (i.e., non congelés, conservés à 2-8°C pendant 7 jours au maximum) à l'aide du test rapide TOYO anti-HCV : 100 séronégatifs et 50 séropositifs pour le VHC [statut sérologique déterminé à l'aide d'une méthode ELISA de 3^{ème} génération (Vitros Eci™, Ortho-Clinical Diagnostics)]. La spécificité était de 100% (IC95 : 96,3%-100,0%). La sensibilité clinique était également de 100% (IC95% : 92,9%-100,0%). Au total, cette étude, basée sur un petit nombre d'échantillons, montrait que le test rapide TOYO anti-HCV était simple à réaliser, rapide (≥15 minutes), spécifique et sensible lorsqu'il était utilisé sur une matrice biologique de type sérum fraîchement collecté.

Etude VHC TROD évaluant les TROD pour l'infection virale C à partir de matrices biologiques originales telles que le liquide cravculaire et le sang total capillaire.

L'étude, qui a débuté en septembre 2012, a pour objectif principal d'étudier les performances (sensibilité et spécificité) des TROD pour la détection des anticorps anti-VHC dans le liquide cravculaire et le sang total capillaire prélevé au bout du doigt après auto-piqûre, comparativement aux résultats sérologiques sur sérum déterminés à l'aide d'une méthode immuno-enzymatique (test de 3^{ème} génération). Les objectifs secondaires de cette étude sont d'évaluer la quantité d'IgG totales et la présence d'anticorps anti-VHC dans le liquide cravculaire, respectivement à l'aide d'une méthode d'agglutination et d'une approche immuno-enzymatique manuelle.

Au total 600 individus, dont 400 uniquement infectés par le VHC (infection par le VIH, VHB et VHD sont des critères d'exclusion), répliquant ou non le virus et 200 sujets séronégatifs seront inclus. Il s'agit d'une étude bicentrique impliquant les services d'Hépatogastroentérologie du CHU Henri Mondor (Christophe Hézode) et du Centre Intercommunal de Créteil (Isabelle Rosa). Trois tests rapides sont évalués ; il s'agit des tests rapides OraQuick HCV Rapid Antibody Test® (OraSure Technologies, Inc – distributeur : Meridian Biosciences), TOYO Diagnostics (TÜRKLAB TIBBI MALZEMELER SAN. TIC. A.S., Turquie – distributeur Servibio) et le test Labmen HCV (TÜRKLAB TIBBI MALZEMELER SAN. TIC. A.S., Turquie – distributeur Nephrotek).

A ce jour, 421 patients ont été inclus dans les 2 centres, avec la répartition suivante : 338 au CHU Henri Mondor et 83 patients au CHIC. Deux cent soixante-cinq patients avaient un facteur de risque connu et étaient séropositifs pour le VHC, et la grande majorité d'entre eux (228/265 soit 86,0%) répliquaient le VHC (ARN du VHC moyen±DS : 5,65±1,05 Log₁₀ UI/mL). Cent cinquante-six patients n'avaient pas de facteur de risque et étaient séronégatifs pour le VHC. Quatre TRODs ont été réalisés: 1 test à partir du liquide cravculaire (OraQuick HCV Rapid Antibody Test®) et 3 tests à partir de sang total capillaire prélevé au bout du doigt (OraQuick HCV Rapid Antibody Test® et TOYO Diagnostics) ou veineux prélevé au pli du coude à partir d'un tube (test Labmen HCV). Le taux de réussite était très satisfaisant puisque seulement 9 tests n'ont pas pu être réalisés à partir du sang total capillaire en raison d'une quantité insuffisante de sang et d'un refus du patient de pratiquer une nouvelle autopiûre. Le test Labmen a

été pratiqué chez 146 sujets seulement. Une analyse intermédiaire des résultats a été présentée au cours de la Journée Nationale Hépatites le 30 mai 2013.

Contrôle de qualité national du géotypage de la résistance aux inhibiteurs de la protéine NS3 du VHC. Dans le cadre de l'AC33, présidée par le Pr. JM PAWLOTSKY, un contrôle de qualité national du géotypage de la résistance aux inhibiteurs de la protéase du VHC a été élaboré par le laboratoire de Microbiologie de Brest (Dr S. Vallet) en collaboration avec le CNR. L'objectif était d'évaluer la performance de la détection des substitutions amino acidiques impliquées dans la diminution de sensibilité aux antiprotéases ayant une AMM dans le traitement de l'hépatite chronique C (telaprevir et boceprevir) par les techniques de séquençage direct. Un panel de 12 échantillons codés (dont un témoin négatif et 11 échantillons positifs) a été testé dans 23 laboratoires français. Les résultats montraient un taux d'erreur de seulement 0,7%. L'exactitude de la détermination du profil géotypique était de 75% à 100% selon le laboratoire. Les résultats incorrects étaient essentiellement liés à la méthode utilisée. Cette étude soulignait l'importance des contrôles de qualité dans l'évaluation des capacités des laboratoires à rendre des résultats conformes (Vallet et al., J Clin Microbiol. 2013 May;51(5):1428-33).

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

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

Résolution de génotypes du VHC “indéterminés” avec le test Line Probe assay de deuxième génération (LiPA HCV 2.0). Une étude rétrospective a été réalisée à partir d'échantillons sanguins en provenance du laboratoire d'analyses médicales Cerba (Docteur Jean-Dominique POVEDA). Au total, 53 échantillons (ARN du VHC : $5,40 \pm 0,9 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$) pour lesquels les résultats de génotypage par hybridation inverse de seconde génération étaient ininterprétables ont été analysés. Ces échantillons provenaient essentiellement de patients originaires d'Afrique subsaharienne et d'Afrique du Nord. La détermination du génotype et du sous-type a été réalisée par séquençage direct d'une partie de la séquence nucléotidique des gènes codant les protéines NS5B et core-E1 (positions respectives 8325 à 8610 et 873 à 1265 par rapport à la souche prototype H77 de génotype 1a), suivi d'une analyse phylogénique en comparaison à des souches de référence des différents génotypes (1 à 7) et sous-types. Le type et le sous-type ont pu être déterminés chez 51 des 53 patients (96,2%). Deux échantillons n'ont pas été amplifiés au niveau des 2 régions et un échantillon n'a pas été amplifié au niveau de la région core-E1, et ce malgré des valeurs d'ARN du VHC détectables [respectivement 4,1, 3,2 et 4,7 $\text{Log}_{10} \text{ UI/mL}$ avec la méthode des ADN branchés (Versant HCV 3.0, Siemens)]. Sept patients (13,7%) étaient infectés par un génotype 1 dont un par un sous-type 1a, 2 par un sous-type 1b, un par un sous-type 1d, un par un sous-type 1g et un patient par un sous-type indéterminé. Chez le patient infecté par un VHC de génotype 1 non sous-typable, l'analyse phylogénique de 28 clones de la région core-E1 a montré un génotype différent de celui identifié à partir de l'analyse phylogénique de 23 clones de la région NS5B (4b versus 1a), avec des valeurs de ré-échantillonnage élevées (respectivement 79% et 100%). Ce résultat suggérait fortement qu'un évènement de recombinaison entre les génotypes 1a et 4b avait eu lieu. La détermination complète de la séquence nucléotidique sera réalisée pour identifier le point de recombinaison. Vingt-quatre patients (47,1%) étaient infectés par un VHC de génotype 2, 2l dans 10 cas, 2i dans 9 cas, 2a dans 1 cas, et 2c dans 1 cas. Le sous-type du génotype 2 était indéterminé dans 3 cas. Quatre patients (7,8%) étaient infectés par un génotype 3, dont 3 par un sous-type 3h et un par un sous-type 3a. Dix patients (19,6%) étaient infectés par un génotype 4, sous-type 4r dans 4 cas et 4m dans 2 cas, les 4 patients restants étant infectés respectivement par un sous-type 4f, 4g, 4l et 4o. Trois patients (5,9%) étaient infectés par un génotype 5, dont 2 patients par un sous-type non-5a, seul sous-type disponible dans les banques de séquence de référence. Ce

résultat suggère l'existence d'un nouveau sous-type de génotype 5. Les trois patients restants (5,9%) étaient infectés par un génotype 6, dont 2 par un sous-type 6e et un par un sous-type 6q.

Enquête COQUELICOT. L'enquête COQUELICOT est une enquête de séroprévalence du VIH et des hépatites virales B et C et de séro-incidence du VIH et du VHC chez des usagers de drogues ayant sniffé ou s'étant injecté au moins une fois au cours de leur existence. Les résultats de cette enquête permettront d'ajuster les actions de prévention et de disposer d'indicateurs pour évaluer leur impact. Au total, 1568 sujets ont accepté de participer à l'étude dans 5 villes (Lille, Strasbourg, Paris, Bordeaux, Marseille). Parmi les sujets ayant accepté de participer à l'étude, 886 étaient séronégatifs pour le VHC, dont 30 étaient séropositifs pour le VIH.

Mille quatre cent soixante-neuf buvards ont été reçus au mois de décembre 2011 par le CNR VIH (Pr Francis BARIN, Tours). Seuls 1320 buvards disposaient de spots utilisables ; 474 d'entre eux étaient positifs pour le VHC. A partir de ces buvards, nous avons recherché l'ARN du VHC à l'aide d'une technique de PCR en temps réel standardisée (CAP/CTM96, Roche) et déterminé le génotype du VHC par analyse phylogénique d'une portion du gène codant la protéine NS5B (méthode de référence) lorsque les buvards étaient positifs en ARN avec une valeur >500 UI/mL (i.e., $>2,7$ Log_{10} UI/mL). La détection-quantification de l'ARN du VHC a été réalisée sur 469 buvards, soit un taux de réussite voisin de 98,9%. Parmi ces 469 buvards, 227 (48,4%) contenaient de l'ARN viral, quantifiable dans la très grande majorité des cas (moyenne de charge virale $2,63 \pm 0,70$ Log_{10} UI/mL) ; seuls 3 buvards avaient un ARN détectable mais non quantifiable ($<1,20$ Log_{10} UI/mL). La détermination du génotype viral a été possible chez 191 patients (84,1%), avec la distribution suivante : 118 patients infectés par un génotype 1, dont 100 par un génotype 1a et 18 par un génotype 1b, 2 patients infectés par un génotype 2, 40 par un génotype 3, dont 38 par un génotype 3a et 2 par un génotype 3k, et 31 par un génotype 4, dont 13 par un génotype 4a, 17 par un génotype 4d et un par un génotype 4e.

Prévalence de la résistance primaire du VHB aux analogues nucléos(t)idiques de patients naïfs de traitement nouvellement pris en charge au sein des Pôles de Référence et Réseaux Hépatites au cours de la période 2008-

2012. Parmi les 2845 patients (59% d'hommes, d'âge moyen 36,0 ans, dont 19% nés dans un pays de faible endémicité et 81% dans un pays de forte ou moyenne endémicité), 624 individus ont été inclus dans le volet virologique de l'étude. La grande majorité d'entre eux (88,2%) étaient infectés par un virus mutant de la région pré-C/C (AgHBe-négatif). A la prise en charge, les médianes du titre de l'AgHBs et de la charge virale (ADN du VHB) étaient respectivement de 3,15 Log₁₀ UI/mL et 3,60 Log₁₀ UI/mL. Environ, 64% des patients avaient un ADN du VHB inférieur à 2000 UI/mL. Les génotypes D (32,7%), E (27,4%) et A (25,5%) étaient les plus fréquents. La prévalence de la résistance primaire a été évaluée chez 429 patients pour lesquels l'ADN du VHB était supérieur à 2 Log₁₀ IU/mL à l'aide d'une méthode de séquençage à haut débit ultrasensible (UDPS), qui permet la détection des variants viraux minoritaires (seuil de détection d'environ 1%).

Les résultats sont d'ores et déjà disponibles pour 111 patients. Plus de 900 000 séquences ont été analysées. Au total, 56% des patients étaient infectés par des variants minoritaires résistants aux analogues nucléos(t)idiques, généralement présents en faible quantité (0,25-10,0%). La distribution des substitutions amino acidiques pré-existantes capables de conférer la résistance aux analogues nucléos(t)idiques était la suivante : rtR202G (10,0%), rtM204I/V (9,1%), rtT184s/A/I/L (8,1%), rtV173L (6,7%), rtA181V/T (5,6%), rtN236T (3,2%), rtL180M (2,0%), rtM250V (1,6%) and rtL80I/V (0,3%). Environ la moitié des patients abritaient des variants résistants à la première génération d'analogues, tandis qu'une faible proportion abritait des variants résistants à l'entecavir.

INVESTIGATION DES CAS ISOLÉS ET GROUPES DE TRANSMISSION

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

Transmission du VHC au cours d'un examen endoscopique réalisé au centre hospitalier de Saint-Denis. L'étude génétique et phylogénique menée au niveau de 3 régions du génome viral (portion du gène NS5B, gène codant la glycoprotéine

d'enveloppe E1 et région HVR1 localisée au sein du gène codant la glycoprotéine d'enveloppe E2) chez le patient source et le cas index a montré que les souches virales étaient phylogéniquement proches, avec des valeurs de re-échantillonnage respectives de 61% et 72% pour les régions E1 et HVR1 (Figure 4). Les analyses génétiques et phylogéniques des souches de VHC issues de ces deux patients ont permis d'estimer que l'infection par la même souche de VHC était possible, mais ne pouvait être affirmée à 100% au vu des résultats de l'analyse et du matériel fourni.

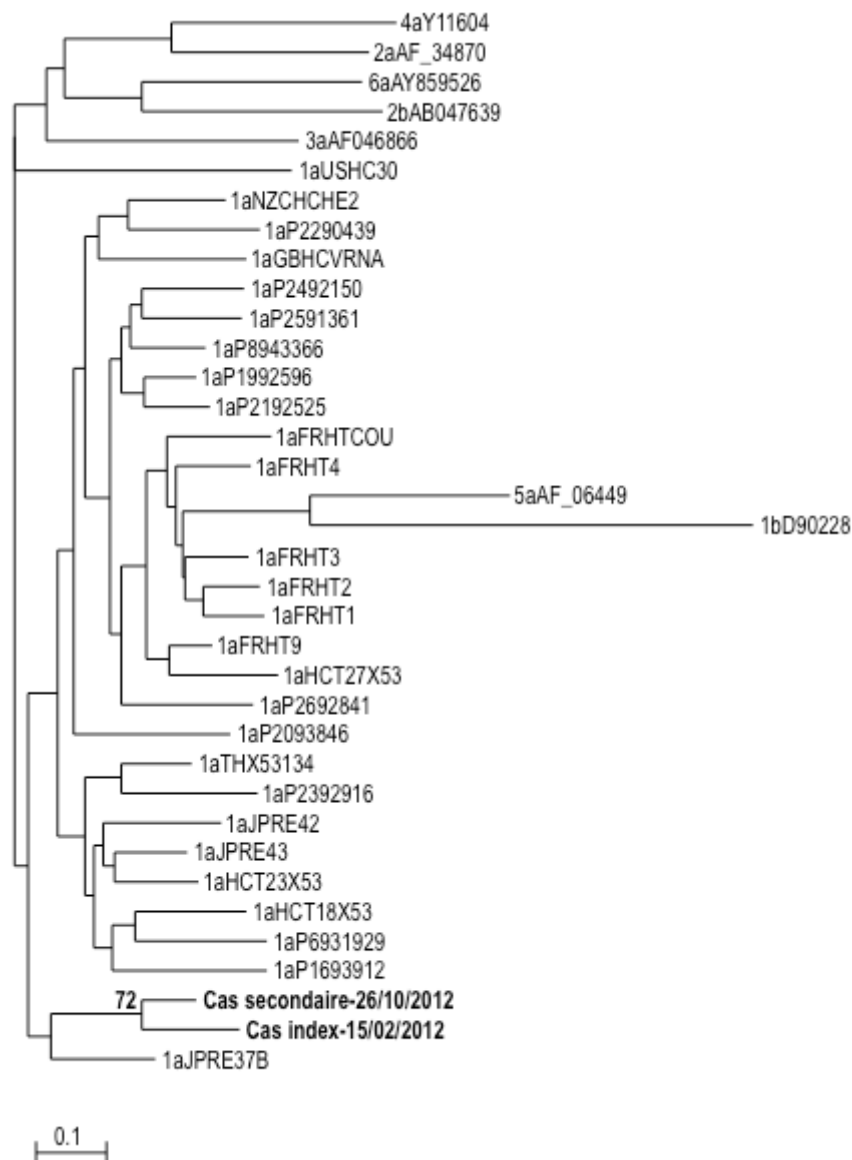


Figure 4 : Phylogénie de la région HVR1 du VHC (81 nucléotides). Analyse réalisée par DNADIST (Phylip 3.65), Kimura 2-parameter, Ts/Tv 2.0. Les chiffres indiqués au niveau des nœuds correspondent aux pourcentages de 1000 re-échantillonnages.

SURVEILLANCE ET CARACTERISATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIVIRAUX

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

Recherche de mutations de résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques. Au cours de l'année 2012, plusieurs recherches de mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques utilisés dans le traitement de l'hépatite chronique B ont été réalisées par le CNR dans le cadre d'un échec thérapeutique secondaire (20 demandes au total).

Recherche de mutations de résistance du VHC aux antiprotéases. Au cours de l'année 2012, plusieurs recherches de mutations de résistance aux antiprotéases (boceprevir et telaprevir) utilisés dans le traitement de l'hépatite chronique C ont été réalisées par le CNR (3 demandes au total).

Développement et utilisation des techniques de pyroséquençage à haut débit pour la surveillance et la caractérisation de la résistance du VHC aux antiviraux spécifiques. De nouvelles approches fondées sur le pyroséquençage à haut débit (UDPS) sont récemment venues compléter l'arsenal des méthodes d'étude génotypique de la résistance aux antiviraux (classiquement séquençage direct, hybridation inverse, clonage-séquençage). Ces techniques ont la particularité de générer un nombre très élevé de séquences au cours de la réaction (plusieurs milliers, voire dizaines de milliers par échantillon analysé). Elles possèdent donc une sensibilité importante pour la détection de variants minoritaires au sein de populations virales

complexes. Ces méthodes posent cependant des problèmes spécifiques, en particulier les problèmes de filtrage qualitatif des séquences générées et l'abondance des informations qui doivent être traitées et pour lesquelles aucun logiciel d'analyse adapté à la virologie n'existe. Nous avons donc développé une série de logiciels originaux (et protégés), comprenant de nombreux filtres de qualité, pour l'analyse des données virologiques générées par les techniques de pyroséquençage : PyroClass[®] permet la classification automatique des séquences générées ; PyroMute[®] permet l'analyse des mutations ; PyroDyn[®] permet la mise en évidence des croissances ou décroissances exponentielles de populations virales ; PyroLink[®] permet d'établir les liaisons entre mutations situées sur les mêmes brins viraux. Les études ci-dessous montrent les possibilités offertes par ces technologies dans la surveillance et la caractérisation de la résistance aux antiviraux dirigés contre le VHC et le VHB.

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

L'étude de la dynamique des variants viraux résistants au telaprevir au moment de la ré-ascension de la charge virale a été caractérisée par UDPS. Elle était complexe et caractérisée : 1) par un enrichissement progressif en populations virales résistantes au telaprevir qui portaient de nombreuses substitutions amino acidiques comprenant à la fois des mutations de résistance à des positions connues (36, 54, 155) et des mutations à d'autres positions probablement impliquées dans le fitness du virus résistant ; 2) par une décroissance progressive et très lente des populations résistantes au traitement débutant immédiatement après l'arrêt du telaprevir et leur remplacement par des populations sensibles (Chevaliez et al., manuscrit en préparation).

Les techniques de séquençage ultra-sensible par UDPS ont également été utilisées afin de caractériser les dynamiques des populations virales du VHB au cours du traitement par adefovir en monothérapie chez des sujets ayant développé une résistance à cette molécule au cours du traitement. Plus de 480 000 séquences (111 Mb), soit 4010 ± 843 séquences par échantillons d'une longueur moyenne de 382 ± 31 nucléotides, ont été générées à partir de 119 échantillons sériés (15 à 24 échantillons par patient) 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. Les substitutions amino acidiques capables de conférer la résistance aux analogues nucléos(t)idiques étaient présentes chez la majorité des patients sous la forme de population minoritaires (Tableau 4). La dynamique des variants résistants à l'adefovir était complexe et différait selon les patients, du fait de différences de fitness des variants résistants. L'analyse par UDPS montrait des vagues successives de variants résistants qui portaient de nombreuses mutations comprenant à la fois des mutations de résistance à des positions connues et des mutations à des positions non encore décrites dans la littérature. Les variants résistants à l'adefovir étaient partiellement inhibés par le lamivudine (Rodriguez et al., Hepatology 2013, sous presse).

Tableau 4 : Fréquence des substitutions amino aciques susceptibles de conférer la résistance aux analogues nucléos(t)idiques avant la mise en route du traitement par adefovir chez des sujets jamais exposés aux analogues nucléos(t)idiques.

	ADN du VHB (Log ₁₀ UI/mL)	V173L	L180M	A181V/T	T184 S/A/I/L	R202G	M204V/I	N236T
Pt-1	6,6	<	<	0,47%	<	<	0,31%	0,25%
Pt-2	7,8	<	<	0,18%	<	<	<	<
Pt-3	6,8	<	<	0,22%	<	<	0,32%	<
Pt-4	5,5	<	<	<	0,17%	<	<	<
Pt-5	7,6	<	<	0,33%	<	<	<	-
Pt-6 ¹	6,2	<	<	<	<	<	<	-
Pt-7	6,1	<	<	0,33%	<	<	<	-
Cutoff*		0,05%	0,03%	0,08%	0,15%	0,18%	0,21%	0,22%

¹ : Faible nombre de séquences obtenu pouvant avoir un impact sur la sensibilité de détection des variants

*Limite de détection

Résistance primaire à l'ADV

Résistance primaire à l'LAM, au FTC, à la LdT, à l'ETV

Mutations secondaires compensatoires

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

- 1- De constituer un groupe de réflexion et d'action pluri-disciplinaire sur la problématique de la résistance du VHB et du VHC aux antiviraux.
- 2- De coordonner l'action des services cliniques (en collaboration avec la Fédération 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 réunions de l'AC33 ont permis de mettre en chantier un certain nombre de projets. Un groupe de Virologie Médicale de l'AC33 a été créé, qui regroupe l'ensemble des centres de virologie hospitalo-universitaires et hospitaliers impliqués dans la surveillance de la résistance des virus d'hépatites aux antiviraux. Ce groupe a permis la mise en réseau des différents laboratoires en charge de la surveillance et de la prise en charge de la résistance sur le territoire national et leur connexion avec les plates-formes génétiques, biochimiques et cellulaires d'étude de la résistance.

Les travaux de l'AC33 ont permis la mise en place d'un programme de recherche en virologie et pharmacologie associé à la cohorte CUPIC, qui accompagnait l'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) du telaprevir et du boceprevir chez les sujets cirrhotiques, infectés par un VHC de génotype 1, préalablement traités et non répondeurs à ce premier traitement. Ces travaux s'appuient également sur la constitution, sous la responsabilité de l'ANRS, de la grande cohorte nationale HEPATHER avec l'ensemble des acteurs cliniciens du champ de recherche. Cette cohorte, associée à un CRB où seront stockés les prélèvements réalisés de façon prospective,

permettra la réalisation de nombreuses études de recherche translationnelle consacrées au développement thérapeutique et à la résistance. L'AC33 constitue ainsi une force de propositions pour la réalisation d'études cliniques à forte valeur ajoutée en recherche translationnelle, qui pourront être financées et pilotées par l'ANRS.

La cohorte nationale a déjà débutée depuis quelques mois et permettra à l'AC33 de mettre en place un observatoire national de la résistance des virus des hépatites B et C aux antiviraux, en collaboration avec l'InVS.

PUBLICATIONS (2012-2013)

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

2012

1. Bourlière M, Ouzan D, Rosenheim M, Doffoël M, Marcellin P, Pawlotsky JM, Salomon L, Fagnani F, Rouanet S, Pinta A, Vray M. Pegylated interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in a real-life setting : the Hepatys French cohort (2003-2007). *Antivir Ther* 2012; 17: 101-110.
2. Pawlotsky JM. The invaders and the barrier. *J Hepatol* 2012; 56: 11-13.
3. Sarrazin C, Hézode C, Zeuzem S, Pawlotsky JM. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2012; 56 (Suppl. 1): S88-S100.
4. Bezemer G, van Gool AR, Verheij-Hart E, Hansen BE, Lurie Y, Esteban JI, Lagging M, Negro F, Zeuzem S, Ferrari C, Pawlotsky JM, Neumann AU, Schalm SW, de Knegt RJ. Long-term effects of treatment and response in patients with chronic hepatitis C on quality of life. *BMC Gastroenterol* 2012 ; 12 :11.
5. Pawlotsky JM. New antiviral agents for hepatitis C. *F1000* 2012; 4: 5.
6. Jacobson IM, Pawlotsky JM, Afdhal NH, Dusheiko GM, Forns X, Jensen DJ, Poordad F, Schulz J. A practical guide for the use of boceprevir and telaprevir for the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 2012; 19 (suppl. 2): 1-26.
7. Pawlotsky JM, Najera I, Jacobson I. Resistance to mericitabine (RG7128), a nucleoside analogue inhibitor of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Therap* 2012 ; 17:411-23.
8. Lok AS, Pawlotsky JM. Viral hepatitis at a crossroad. *Gastroenterology* 2012;142:1261-3.
9. Pawlotsky JM. Is hepatitis virus resistance to antiviral drugs a threat? *Gastroenterology* 2012; 142: 1369-72.
10. Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky JM. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology* 2012; 142: 1303-13.
11. Pawlotsky JM. Drug resistance: prevalence and clinical implications during the treatment of chronic hepatitis C infection. *Clin Liv Dis* 2012; 1: 58-61.
12. Chouteau P, Defer N, Florimond A, Higgs M, Gaudin A, Merour E, Dhumeaux D, Lerat H, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus (HCV) protein expression enhances hepatic fibrosis in HCV transgenic mice exposed to a fibrogenic agent. *J Hepatol* 2012; 57: 499-507.
13. Pawlotsky JM. Resistance to direct-acting antivirals. *Curr Hepatitis Rep* 2012; 11: 188-194.

14. Wedemeyer H, Jensen DM, Godofsky E, Mani N, Pawlotsky JM, Miller V. Recommendations for hepatitis C virus clinical trial viral response nomenclature and definitions for investigational HCV agents. Hepatology. 2012; 56: 2398-403.
15. Polyak SJ, Oberlies NH, Pécheur EI, Dahari H, Ferenci P, Pawlotsky JM. Silymarin for HCV infection. Antivir Ther 2013; 18: 141-7.
16. Pawlotsky JM. The science of direct-acting antiviral and host-targeted agent therapy. Antivir Ther 2012; 17: 1109-17.
17. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virology of hepatitis C virus infection. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2012; 26: 381-9.

2013

18. Pascarella S, Clément S, Dill T, Conzelmann S, Lagging M, Missale G, Neumann AU, Pawlotsky JM, Zeuzem S, Rubbia-Brandt L, Bochud PY, Negro F. Intrahepatic mRNA levels of SOCS1 and SOCS3 are associated with cirrhosis but do not predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. Liver Int 2013; 33 : 94-103.
19. Söderholm J, Waldenström J, Pilli M, Bochud PY, Negro F, Askarieh G, Pawlotsky JM, Zeuzem S, Ferrari C, Neumann A, Haagmans BL, Missale G, Hellstrand K, Lagging M. Soluble CD26 impacts treatment outcome and associates with the functionality of HCV-specific T-cells in chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. PloS One ; 8 : e56991.
20. Pawlotsky JM. Treatment of hepatitis C : how will we use viral kinetics, response-guided therapy ? Curr Gastroenterol Rep 2013 . 15 : 309.
21. Polyak SJ, Ferenci P, Pawlotsky JM. Hepatoprotective and antiviral functions of silymarin components in hepatitis C virus infection. Hepatology 2013; 57 : 1262-1271.
22. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Rodriguez C, Soulier A, Poveda JD, Pawlotsky JM. The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, version 2.0 real-time PCR assay accurately quantifies hepatitis C virus genotype 4 RNA. J Clin Microbiol 2013 ; 51 : 1078-1082.
23. Pawlotsky JM. Treatment of chronic hepatitis C : current and future. Curr Top Microbiol Immunol 2013 ; 369: 321-42.
24. Chevaliez S. New markers for diagnosis and management of chronic hepatitis C virus infection. Ann Gastroenterol 2013, 26 : 98-99.
25. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Rodriguez C, Soulier A, Poveda JD, Pawlotsky JM. The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, version 2.0 real-time PCR assay accurately quantifies hepatitis C virus genotype 4 RNA. J Clin Microbiol 2013 ; 51 : 1078-1082.
26. Pawlotsky JM. Treatment of chronic hepatitis C : current and future. Curr Top Microbiol Immunol 2013 ; 369: 321-42.
27. Polyak SJ, Oberlies NH, Pécheur EI, Ferenci P, Pawlotsky JM. Silymarin for hepatitis C virus infection. Antivir Ther 2013 ; 18 : 141-147.
28. Fusco DN, Brisac C, John SP, Huang YW, Chin CR, Xie T, Zhao H, Zhang L, Chevaliez S, Wambua D, Lin W, Peng L, Chung RT, Brass AL. A genetic screen identifies interferon alpha effector genes required for the suppression of hepatitis C virus replication. Gastroenterology 2013 ; in press.
29. Chevaliez S. Is HBsAg quantification ready for prime time? Clin Res Hepatol Gastroenterol 2013, in press.
30. Haudecoeur R, Peuchmaur M, Ahmed-Belkacem A, Pawlotsky JM, Boumendjel A. Structure-activity relationships in the development of allosteric hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibitors: 10 years of research. Med Res Rev 2013; in press.
31. Higgs MR, Lerat H, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus-induced activation of beta-catenin promotes c-myc expression and a cascade of pro-carcinogenetic events. Oncogene 2013; in press
32. Chevaliez S, Hézode C, Bahrami S, Grare M, Pawlotsky JM. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: finite treatment duration unlikely. J Hepatol 2013; in press.

33. Sulkowski MS, Bourlière M, Bronowicki JP, Asselah T, Pawlotsky JM, Shafran S, Pol S, Mauss S, Larrey D. Faldaprevir combined with peginterferon alfa-2a and ribavirin in chronic HCV genotype 1 patients with prior nonresponse: SILEN-C2 trial. *Hepatology* 2013; in press.
34. Vallet S, Larrat S, Laperche S, Le Guillou-Guillemette H, Legrand-Abrevanel F, Bouchardeau F, Pivert A, Henquell C, Mirand A, André-Garnier E, Giordanengo V, Lagathu G, Thibault V, Scholtes C, Schvoerer E, Gaudy-Graffin C, Maylin S, Trimoulet P, Brochot E, Hantz S, Gozlan J, Roque-Afonso AM, Soussan P, Plantier JC, Charpentier C, Chevaliez S, Colson P, Mackiewicz V, Aguilera L, Rosec S, Gouriou S, Magnat N, Lunel-Fabiani F, Izopet J, Morand P, Payan C, Pawlotsky JM. Multicenter quality control of hepatitis C virus protease inhibitor resistance genotyping. *J Clin Microbiol* 2013 ; in press.
35. Maqbool MA, Higgs M, Carmouse S, Pawlotsky JM, Lerat H. Regulation of hepatitis C virus replication by nuclear translocation of nonstructural 5A protein and transcriptional activation of host genes. *J Virol* 2013 ; in press.
36. Rodriguez C, Chevaliez S, Bensadoun P, Pawlotsky JM. Characterization of the dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir by ultra-deep pyrosequencing. *Hepatology* 2013 ; in press.
37. Pawlotsky JM. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2013 ; in press.
38. Hézode C, Fontaine H, Dorival C, Larrey D, Zoulim F, Canva V, de Lédighen V, Poynard T, Samuel D, Bourlière M, Zarski JP, Raabe JJ, Alric L, Marcellin P, Riachi G, Bernard PH, Loustaud-Ratti V, Métivier S, Tran A, Serfaty L, Abergel A, Causse X, Di Martino V, Guyader D, Lucidarme D, Grando-Lemaire V, Hillon P, Féray C, Dao T, Cacoub P, Rosa I, Attali P, Petrov-Sanchez V, Barthe Y, Pawlotsky JM, Pol S, Carrat F, Bronowicki JP. Safety and efficacy of telaprevir or boceprevir in combination with peginterferon alfa/ribavirin in treatment-experienced patients with HCV-related cirrhosis in the real-life setting. Interim analysis of a multicenter cohort study in the context of the French Early Access Programme (ANRS CO20-CUPIC). *J Hepatol* 2013 ; in press.

ARTICLES SOUMIS POUR PUBLICATION

- Lawitz EJ, Janczewska E, Bassan I, Di Bisceglie A, Hassanien T, Rodriguez-Torres M, Godofsky EW, Tatum H, Foster GR, Jacobson IM, Pawlotsky JM, Hebner C, Arterburn S, Knox S, Subramanian GM, McHutchison JG, DeMicco M. The polymerase inhibitor tegobuvir (GS-9190) with peginterferon and ribavirin in patients with genotype 1 hepatitis C.
- Rodriguez C, Soulié C, Marcelin AG, Calvez V, Descamps D, Charpentier C, Flandre P, Bellecave P, Harrigan R, Pawlotsky JM, Masquelier B, ANRS AC11 Study Group. HIV-1 coreceptor usage prediction by ultra-deep pyrosequencing increases the proportion of patients treated with success by CCR5 inhibitors.
- Laird ME, Mohsen A, Duffy D, Saleh R, Le Foulher L, Casrouge A, E-Daly M, Rafik M, Abdel-Hamid M, Soulier A, Pawlotsky JM, Mohamed MK, Bonnard P, Mallet V, Pol S, Albert ML, Fontanet A. Apolipoprotein H expression is strongly associated with IL28B genotype and predicts viral clearance in both acute and chronic hepatitis C virus infection.
- Hayer J, Rodriguez C, Germanidis G, Deléage G, Zoulim F, Pawlotsky JM, Combet C. Ultra-deep pyrosequencing and molecular modeling identify key structural features of hepatitis B virus RNase H, a putative target for antiviral intervention
- Florimond A, Chouteau P, Le Seyec J, Mérour E, Ahnou N, Lotersztajn S, Pawlotsky JM. Human hepatic stellate cells are refractory to hepatitis C virus entry and replication.
- Chevaliez S, Challine D, Naija H, Luu T, Laperche S, Allain JP, Lee HH, Pawlotsky JM. Performance of a new rapid test for the detection of hepatitis B surface antigen in various patient populations.
- Schmidt WN, Nelson DR, Pawlotsky JM, Sherman KE, Thomas DL, Chung RT. Direct-acting antiviral agents and the path to interferon independence.

CHAPITRES DE LIVRES

2012

1. Pawlotsky JM. Measuring HCV RNA and assessing virologic response. In: Chronic hepatitis C virus: advances in treatment, promise for the future. Springer, New York, 2011: 149-157.
2. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis viruses. In : European Manuel of Clinical Microbiology (EMCM), 1st édition.
3. Corneille J, Challine D, Chevaliez S. Diagnostic des infections à *Herpesviridae* : méthodes, indications, interprétation et limites. In. Infections en hématologie. Cordonnier C, Herbrecht R, eds. John Libbey Eurotext Hématologie collection FMC, Paris, France, 2012.

2013

4. Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky JM. Application of molecular biology to the diagnosis of viral hepatitis. In : Viral Hepatitis, 4th Edition. Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ, eds. Wiley-Blackwell, Oxford (UK), 2013: in press.

CONFERENCES SUR INVITATION

Jean-Michel PAWLITSKY

2012

1. "Management of chronic hepatitis C in 2012". Viral Hepatitis Symposium, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne (Switzerland), 12 janvier 2012.
2. "Viral Hepatitis Interactive Session". 22nd Challenge in Virology, Saanen (Switzerland), 12-15 janvier 2012.
3. "Hepatitis C in the Vaccine Research Institute". Vaccine Research Institute (VRI) Kick-off Meeting, Créteil (France), 17 janvier 2012.
4. "Management of chronic hepatitis C". 2nd Gastro-Intestinal and Liver International Scientific Meeting, Yangon (Myanmar), 28-29 janvier 2012.
5. "Meet-the-expert luncheon". 2nd Gastro-Intestinal and Liver International Scientific Meeting, Yangon (Myanmar), 28-29 janvier 2012.
6. "Update on hepatitis C diagnostics and therapies". Biocartis Internal Meeting, Mechelen (Belgium), 13 février 2012.
7. "Protease inhibitor use in practice". MSD Educational Workshop, Toronto (Canada), 21 février 2012.
8. "Protease inhibitor use in practice". MSD Educational Workshop, Montréal (Canada), 21 février 2012.
9. "Direct acting antivirals for HCV and resistance". Canadian Symposium on Hepatitis C Virus, Montréal (Canada), 23 février 2012.
10. "Translational HCV research". National Canadian Research Training Program-HepCPAC Meeting, Montréal (Canada), 24 février 2012.
11. "Issues and challenges in implémentation of new HCV practice guidelines". Session on "Canadian Association for the Study of the Liver (CASL) Practice Guidelines : Viral Hepatitis", Canadian Digestive Disease Week/CASL Winter Meeting, Montréal (Canada), 24-27 février 2012.

12. "Hepatitis C treatment success and failure". University of Michigan Grand Rounds, Department of Digestive Diseases, University of Michigan, Ann Arbor (USA), 27 février 2012.
13. "Known mechanisms for viral clearance and achieving SVR : can we optimize our targets for greater clinical success ?" American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Single Topic Conference "HCV direct antiviral agents : concepts, development and optimal use", Atlanta (USA), 16-17 mars 2012.
14. "Mechanisms of HCV DAA résistance : a primer" American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Single Topic Conference "HCV direct antiviral agents : concepts, development and optimal use", Atlanta (USA), 16-17 mars 2012.
15. "Les nouveaux traitements de l'hépatite C". 14èmes Journées Francophones de Virologie, Paris, 29-30 mars 2012.
16. "Les inhibiteurs de protéase du VHC". Réunion plénière de l'Académie Nationale de Pharmacie, Paris, 4 avril 2012.
17. "Will HCV drug resistance be an issue ?". Joint EASL-Virgil Workshop, The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
18. "Will HCV drug resistance be an issue ?". Joint EASL-Virgil Workshop, The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
19. "The future of change : all-oral therapy". Boehringer-Ingelheim Satellite Symposium. The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
20. "Profiling the ideal agent for simplifying HCV management". Novartis Satellite Symposium, The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
21. "VHC: eradication ?". Séminaire Annuel de l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS), Institut Pasteur, Paris, 3 mai 2012.
22. "Viral Hepatitis Summary". General Session 4, The International Liver Congress, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 18-22 avril 2012.
23. "Treatment of chronic hepatitis C". Symposium "Pegasys, 10 years: a bridge to the future", Lisbon (Portugal), 5 mai 2012.
24. "New HCV therapies". Andres T. Blei Memorial Lecture, Northwestern University Medical Grand Rounds, Chicago (USA), 8 mai 2012.
25. "EASL Viral Hepatitis Summary". Hepatology Liver, Vienna (Austria), 11-12 mai 2012.
26. "New anti-HCV drugs". International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases (ISHEID) 2012, Marseille (France), 23-25 mai 2012.
27. "New anti-HCV drugs". International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases (ISHEID) 2012, Marseille (France), 23-25 mai 2012.
28. "New needs in viral hepatitis diagnostics". 8th International Workshop on HIV and Hepatitis Coinfection, Madrid (Spain), 30 mai-1^{er} juin 2012.
29. "HCV replication cycle". 11th International Symposium on Viral Hepatitis, Sitges (Spain), 1-2 juin 2012.
30. "HCV drug development : what is next ?". 2012 British Digestive Disorders Federation Meeting, Liverpool (Royaume Uni), 17-20 juin 2012.
31. "State-of-the-Art Lecture : Direct-acting antivirals for hepatitis C infection". 2012 British Digestive Disorders Federation Meeting, Liverpool (Royaume Uni), 17-20 juin 2012.
32. "Update on virological monitoring of HBV and HCV infection". 14th international Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Shanghai (China), 22-25 juin 2012.
33. "Dynamics of HBV and HCV resistance revisited by next-generation sequencing". 14th international Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Shanghai (China), 22-25 juin 2012.
34. "New targets and treatment strategies for hepatitis C". Institut Pasteur de Corée, Seoul (Korea), 26 juin 2012.

35. "Recent advances and future perspectives in the treatment of patients with HCV". Congrès "Black holes in chronic hepatitis", Rome (Italy), 9 juillet 2012.
36. "State-of-the-Art lecture: Update on hepatitis C virus". 15th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV) and Joint Meeting with the European Society for Veterinary Virology (ESVV), Madrid (Spain), 4-7 septembre 2012.
37. "Current treatment of hepatitis C". Swedish Hepatitis Meeting, Håckeberga (Sweden), 5-6 septembre 2012.
38. "Future treatment of hepatitis C". Swedish Hepatitis Meeting, Håckeberga (Sweden), 5-6 septembre 2012.
39. "Resistance : what you need to know and why". The Viral Hepatitis Congress 2012, Francfort (Germany), 7-9 septembre 2012.
40. "HCV resistance and treatment failure". EASL-AASLD Special Conference on Therapy of Hepatitis C : Clinical Application and Drug Development, Prague (Czech Republic), 14-16 septembre 2012.
41. "Current standard-of-care for HCV and a 5-year perspective". Meeting "Building consensus on the way forward to increase access to HCV treatment in low- and middle-income countries" organized by Médecins Sans Frontières (MSF), Paris (France), 25 septembre 2012.
42. "Virological monitoring". Preceptorship/Center of Excellence on Hepatitis C, Créteil (France), 10 octobre 2012.
43. "HCV therapy : the future". Preceptorship/Center of Excellence on Hepatitis C, Créteil (France), 10 octobre 2012.
44. "The science of HCV new drug development", University of Vienna Medical School, Vienna (Austria), 17 octobre 2012.
45. "Optimizing outcomes with protease inhibitors: adverse events management and prevention of resistance". 2nd World Congress on Controversies in the Management of Viral Hepatitis (C-HEP), Berlin (Germany), 18-20 octobre 2012.
46. "Resistance to HCV protease inhibitors : game over ?". 2nd World Congress on Controversies in the Management of Viral Hepatitis (C-HEP), Berlin (Germany), 18-20 octobre 2012.
47. "Interferon-free regimens : the way forward ?". 20th United European Gastroenterology Week (UEGW), Amsterdam (The Netherlands), 20-24 octobre 2012.
48. "Looking at the future : 2015 onwards". Meeting "Changing the Game : Best Practice in HCV care", Palermo (Italy), 26-27 octobre 2012.
49. "Hepatitis delta virus viral replication and genomic testing". 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, Massachusetts (USA), 9-13 novembre 2012.
50. "HCV treatment: the present and the future". 32nd Panhellenic Conference in gastroenterology, Athens (Greece), 30 novembre-2 décembre 2012.
51. "HCV treatment in naïve patients". 2nd Global Meeting on HCV Therapy Advances, Rome (Italy), 14-15 décembre 2012.

Stéphane CHEVALIEZ

2012

1. "Virological monitoring of hepatitis C therapy". 10th European Meeting on HIV&Hepatitis Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance, Barcelona, 28-30 March 2012.
2. "Intérêts de la détermination de l'*IL28B* dans la prise en charge des patients atteints d'hépatite C", Les évènements de l'année 2012 en microbiologie clinique, Paris, 27 janvier 2012.
3. "Mécanismes de non-réponse au traitement antiviral dans l'hépatite C".Conférence dans le service d'Hépatologie et de Gastroentérologie de l'hôpital Jean Verdier, Bondy, 4 avril 2012.

4. "Hepatitis C : virological Tools for monitoring new antiviral treatment". Siemens Academy Scientific Day, Bruxelles, Belgium, May 24th 2012.
5. "Hépatite B : du diagnostic au traitement". Journée Thématique Hépatites Chroniques (Siemens), Paris 30 avril 2012.
6. Utilisation des greffons dérogatoires en transplantation hépatique : intérêts et limites ; Aspects virologiques". Service d'Hépatologie et de Gastroentérologie de l'hôpital Henri Mondor, Créteil, 6 juin 2012.
7. "*IL28B* genotype : useful or not useful ?". DAAs for the treatment of chronic hepatitis C : translating efficacy into effectiveness, Milan, Italy, 2-3 July 2012.
8. "HCV RNA assays". EASL/AASLD Special Conference: Therapy of hepatitis C : Clinical Application and Drug Development. Prague, Czek Republic, 14-16 September 2012.
9. Tests rapides hépatites virales". Journée AC-11/AC-12/AC-33 de l'ANRS, Amphithéâtre Adicare, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, 26-27 novembre 2012.

2013

10. "How important is the selection of the RNA assay in the treatment of hepatitis C?", 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam, The Netherlands, 24-28 April 2013.

PROGRAMME D'ACTIVITE 2013-2014

Les priorités de la prochaine année seront :

1. La poursuite de l'étude TROD VHC et la mise en place à partir de la même population d'individus d'une étude DBS VHC.
2. La finalisation de la surveillance des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B avec, en particulier, les résultats finaux concernant la prévalence de la résistance primaire aux analogues nucléos(t)idiques évaluée par séquençage à haut-débit ultra-sensible.
3. La réalisation d'études de performance analytique et clinique de nouvelles techniques de biologie moléculaire destinées à la détection-quantification de l'ARN du VHC et de l'ADN du VHB, en particulier l'évaluation des nouvelles trouses développées par Siemens (kPCR HCV et HBV) et Hologic Gen-Probe.
4. La poursuite de la mise en place de la plateforme de séquençage de nouvelle génération (NGS) et l'application de ces méthodes à l'ensemble des études du CNR.
5. L'ouverture du site web du CNR, d'ores et déjà bien avancé.

LABORATOIRE ASSOCIE

HEPATITES B, C et delta en TRANSFUSION SANGUINE

INSTITUT NATIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINE

PARIS



Rapport d'activité 2012

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

SOMMAIRE

1/ INTRODUCTION	2
1-1 MISSIONS ET OBJECTIFS.....	2
1-2 EQUIPE : PERSONNELS DEVOLUS AUX ACTIVITES DU CNR.....	3
1-3 LABORATOIRE.....	3
1-4 DEMARCHE QUALITE.....	4
2/ ACTIVITES D'EXPERTISE :	4
2-1 CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....	4
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2012.....	5
2-2-1 <i>Expertise dans le domaine de la sécurité transfusionnelle.....</i>	<i>5</i>
2-2-2 <i>Expertise dans le domaine des outils de diagnostic.....</i>	<i>5</i>
2-2-3 <i>Les contrôles de qualités.....</i>	<i>8</i>
2-2-4 <i>Les enquêtes de transmission.....</i>	<i>9</i>
3/ ACTIVITES DE SURVEILLANCE DES DONNEURS DE SANG :.....	10
3.1 METHODE	11
3.2 RESULTATS	13
3.2.1 <i>Le VHB.....</i>	<i>13</i>
3.2.2 <i>Le VHC.....</i>	<i>32</i>
3.2.3 <i>Bilan du DGV et risque résiduel.....</i>	<i>42</i>
4/ACTIVITES DE RECHERCHE 2012	46
5/ ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL :	47
6/ LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS RELATIVES AUX ACTIVITES DU CNR 2012.....	48
7/ PROGRAMME D'ACTIVITE 2013-2014.....	50

1/ Introduction

1-1 Missions et Objectifs

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

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

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

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

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

1-2 Equipe : personnels dévolus aux activités du CNR

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

- 8 techniciens de laboratoires,
- 3 ingénieurs
- 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 ingénieur,
- 0,1 secrétariat,
- 0,3 responsable.

1-3 Laboratoire

Trois secteurs d'activités peuvent être individualisés :

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

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

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

1-4 Démarche qualité

Les activités du laboratoire d'expertise en virologie ont reçu l'accréditation du COFRAC selon la norme ISO-CEI 17025 sous le numéro 1-1950 au 1^{er} janvier 2008. L'accréditation a été confortée lors des audits de suivi. Le laboratoire répond actuellement aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 : 2007, et est accrédité sous le numéro 8-1950 rév 4 à compter du 15 février 2013.

A ce titre, le laboratoire participe à des contrôles externes de qualité périodiques pour les marqueurs sérologiques, de quantification de la charge virale et de caractérisation moléculaire utilisés dans le cadre des activités du CNR (CTCB, Toulouse, QCMD, UK).

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, géotype) sont disponibles pour des études.

- un panel de 17 échantillons de protéines HBs recombinantes calibrées à environ 50 ng/ml produites *in vitro* en cellules HuH7. Ce panel est composé de 9 échantillons de génotypes A à F et 8 échantillons porteurs d'une ou plusieurs mutations situées sur la boucle antigénique de l'Ag HBs et connues pour être à l'origine de faux négatifs lors du dépistage de ce marqueur.

Pour le VHC :

Nous disposons de divers panels d'échantillons plasmatiques

Ceux-ci comprennent principalement :

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

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

2.2 Activités d'expertise de l'année 2012

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

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

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

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

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

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

1) Tests d'orientation diagnostique VHC

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

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

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

Les résultats ont mis en exergue certains points :

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

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

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

Dans le cadre, d'une évaluation de l'impact diagnostique et sécuritaire des mutants de l'enveloppe du VHB, susceptibles d'induire des modifications conformationnelles de l'enveloppe virale pouvant conduire à des résultats de dépistage faussement négatifs, nous avons mené une étude comparative de 13 trousse commerciales de détection de l'Ag HBs 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 positifs (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.

La sensibilité clinique observée vis-à-vis des mutants des panels 1, 2 et 3 était différente selon les tests ; de 97,9% à 62,9%. 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.

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'Ag HBs.

Servant-Delmas A, Mercier-Darty M, Ly TD, Wind F, Alloui C, Sureau C, Laperche S.
Variable capacity of 13 Hepatitis B virus surface antigen assays for the detection of HBsAg mutants in blood samples. J Clin Virol 2012 53(4) : 338-345.

3) Participation à la caractérisation d'un standard international pour les marqueurs HBe du VHB

Le Paul-Erlich Institut a organisé une étude collaborative afin de calibrer les premiers standards internationaux des marqueurs AgHBe et anti-HBe. Le laboratoire a testé 7 échantillons pour chaque marqueur à l'aide des trousseaux ETI EBK PLUS et ETI AB-EBK-PLUS (DiaSorin). La synthèse des différents laboratoires participants devrait être disponible au cours de l'année 2013.

2-2-3 Les contrôles de qualités

1) En France

Une autorisation d'utilisation temporaire (ATU) délivrée par l'AFSSAPS en janvier 2011 pour une trithérapie combinant Interferon pégylé, ribavirine et une antiprotéase chez certaines catégories de patients présentant une hépatite chronique C de génotype 1 (1a ou 1b) nous a conduit à préparer un panel d'échantillons visant à évaluer les laboratoires souhaitant réaliser le suivi de leurs patients dans le cadre de cette ATU. En effet, des échecs aux antiprotéases ayant été observés, il était essentiel de pouvoir évaluer ces échecs, soit en cours de traitement soit après traitement et de mesurer l'apparition des mutations de résistance.

Dans ce contexte et dans le cadre des travaux du groupe AC33 de l'ANRS, en collaboration avec les laboratoires de virologie du CHU de Brest (S. Vallet) et du CHU de Grenoble (S. Larrat) nous avons constitué un panel de 12 échantillons comprenant 2 souches sauvages de génotype 1, 9 transcrits provenant de souches mutées dans la NS3 ou d'échantillons natifs comprenant des mutations de résistance et 1 échantillon VHC négatif. Ce panel a été distribué codé à 23 laboratoires qui l'ont analysé avec le protocole mis en place localement.

Une identification des mutations a été obtenue dans 75% à 100% des cas en fonction des laboratoires et des méthodes utilisées. L'analyse des résultats a identifié deux points d'amélioration : le choix des amorces et la vigilance sur les possibles contaminations inter-échantillons.

Vallet S, Larrat S, Laperche S et al Multicenter quality control of hepatitis C virus protease inhibitor resistance genotyping Journal of Clin Microbiol 2013 accepted

2) En Afrique

La sécurité transfusionnelle dans les pays émergents reste un problème préoccupant principalement lié aux ressources limitées et aux tests utilisés. Dans l'objectif d'évaluer les performances des réactifs utilisés dans la routine du dépistage des marqueurs viraux chez les donneurs de sang de certains pays d'Afrique, nous avons distribué à 60 laboratoires de 17 pays d'Afrique francophone un panel de 25 échantillons comprenant 8 négatifs, 5 Ag HBs 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. Les résultats confirment ce que nous avons mis en évidence lors de l'opération pilote à savoir une sensibilité moindre des tests rapides par rapport aux tests ELISA nous conduisant à recommander l'utilisation de ces derniers pour assurer la sécurité transfusionnelle.

L'extension de cette étude à d'autres pays de l'Afrique anglophone dans le cadre d'une collaboration avec le Blood Systems Research Institute, San Francisco a été entreprise en 2012. Les résultats sont en cours d'exploitation

Laperche. S on behalf of the Francophone African Group for Research in Blood Transfusion. Multinational assessment of blood-borne virus testing and transfusion safety on the African continent. Transfusion; 2013 sous presse

2-2-4 Les enquêtes de transmission

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

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

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

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

Deux enquêtes de transmission transfusionnelles, menées respectivement en 2007 et 2008, ont fait l'objet d'une publication en 2013.

Enquête n°1 :

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

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

Enquête n°2 :

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

A. Servant-Delmas, C. Chuteau, C. Lefort, Y. Piquet, S. Chevalyere, V. Betbeze, M. Delhoume, S. Hantz, S. Alain, S. Laperche. Two cases of transfusion-transmitted Hepatitis B virus infection in a low endemic country before implementation of HBV NAT. Transfusion, 2013 53(2): 291-296

3/ Activités de surveillance des donneurs de sang :

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

Parallèlement à cette veille épidémiologique descriptive, est menée une surveillance virologique plus spécifique. Elle a pour objectif de mieux caractériser le profil biologique des donneurs confirmés positifs pour les virus VHB et VHC et d'assurer une veille de la diversité virale des souches circulant dans la population des donneurs de sang. Cette surveillance est réalisée en prospectif depuis 2000 à partir d'un échantillon de chaque don confirmé positif. L'acheminement d'un échantillonnage de tout don trouvé positif pour un des marqueurs de l'infection par les virus VHB ou VHC depuis l'EFS vers notre laboratoire, est régi par l'arrêté du 6 février 2009 précisant les conditions de transmission de poches et d'échantillons de plasma issus de donneurs de sang prélevés par l'Etablissement français du sang au laboratoire de virologie transfusionnelle de l'Institut national de transfusion sanguine associé des centres nationaux de référence des virus des hépatites B, C et delta et du VIH, paru au journal officiel le 19 février 2009.

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

3.1 Méthode

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

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

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

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.

La surveillance virologique du VHB comprend :

- 1) La détermination du **titre de l'Ag HBs** par comparaison à une gamme de référence à l'aide d'un réactif commercial ou par électroimmunodiffusion
- 2) La recherche de la **virémie** (débutée en 1998) par une méthode d'amplification par PCR d'un fragment de génome de la capsid virale (nucléotides 1955-2401), mise au point au laboratoire et dont la sensibilité analytique sur un échantillon de référence internationale (WHO) avait été estimée entre 85 et 172 UI/ml (500 et 1000 copies/ml). A partir de 2005, 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 30 UI/ml (175 copies /ml ; référence internationale WHO). La détermination de la charge virale est réalisée depuis 2005 avec le réactif Cobas Taq Man, RocheDiagnostics (Limite de Quantification : 6 UI/ml).
- 3) La détermination du **profil sérologique HBe** par les techniques ETI EBK PLUS et ETI AB-EBK-PLUS (DiaSorin)

4) La quantification des **anticorps anti-HBs** par une technique commerciale (Murex anti HBs, DiaSorin puis Monolisa anti-HBs PLUS, Biorad à partir de 2011)

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

6) L'analyse moléculaire par **phylogénie** des souches virales est venue compléter le sérotypage pour les souches particulières dès 2002. Elle concerne toutes les souches disponibles en quantité suffisante et dont la virémie est détectable sur tous les dons Ag HBs et/ou ADN 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 (Servant-Delmas A et al. Transfusion, 2010). En 2012, le laboratoire a développé une PCR spécifique d'une région chevauchante codant la polymérase du virus (cible des molécules antivirales) et la boucle antigénique de l'Ag HBs. Cet outil va permettre de génotyper les souches VHB et d'étudier la présence de mutations de résistance au traitement et celles décrites comme affectant l'antigénicité de l'Ag HBs chez les donneurs de sang.

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

La surveillance virologique du VHC comprend :

1) La recherche de l'**ARN plasmatique** pratiquée sur les dons anti-VHC positifs collectés entre le 1^{er} janvier 2000 et le 30 juin 2001, veille de la mise en place systématique du DGV du VHC. Cette recherche a été réalisée sur tous les dons anti-VHC confirmés positifs reçus au laboratoire et prélevés sur cette période de 18 mois, par le réactif AMPLICOR VHC 2.0 (Roche), dont le seuil de sensibilité annoncé était de 50 UI/ml. La quantification de la charge virale est réalisée sur chaque don collecté à partir de 2007 par RT PCR (*Cobas TaqMan, Roche Limite de Quantification : 25 UI/ml*)

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

3) La détermination du **sérotype** réalisée sur chaque échantillon nonvirémique par détermination de la spécificité des anticorps anti-NS4 grâce à la trousse Murex HCV serotyping (Murex). La production du test ayant été définitivement suspendue par l'industriel, un test a été développé au laboratoire de manière à pouvoir continuer de disposer d'un typage des sujets non virémiques permettant d'assurer le maintien de la surveillance de cette population.

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 2011. L'année 2012 n'a pas été prise en compte car l'ensemble des données n'était pas disponible au moment de la rédaction de ce rapport.

Seuls les éléments les plus significatifs sont présentés.

3.2.1 Le VHB

Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHB

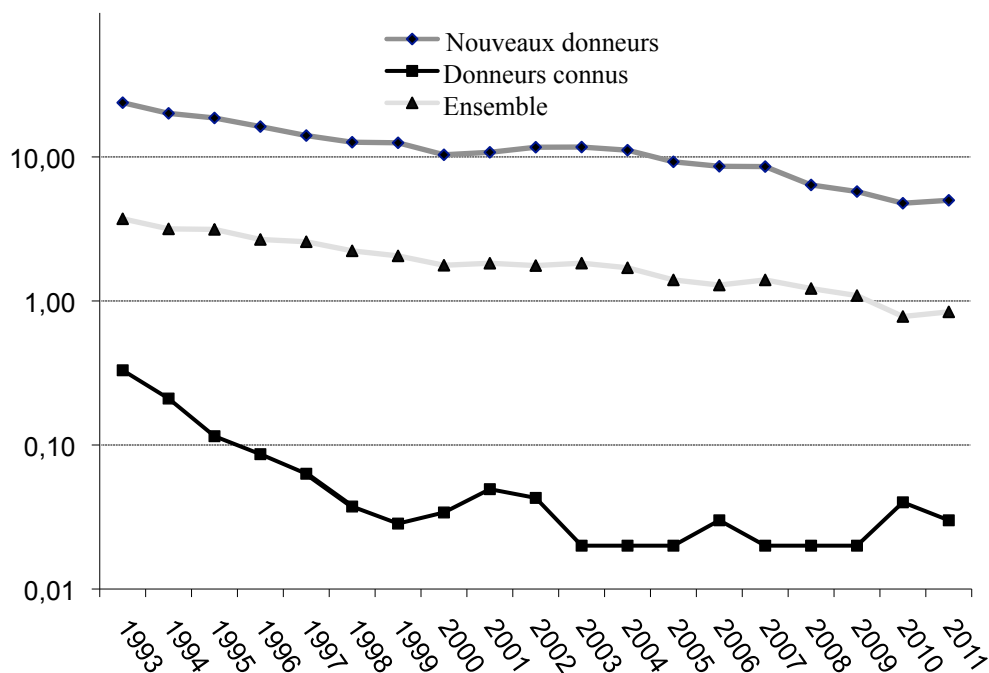
Le tableau 1 et la figure 1 donnent la comparaison et l'évolution des taux de positivité des dons VHB positifs observés entre 1993 et 2011 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

Tableau 1 : Taux des dons VHB positifs observés dans les dons de sang de 1993 à 2011.

Année	Nouveaux donneurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux p. 10000 dons
1993	1168	23.8	96	0.33	1264	3.72
1994	935	20.1	56	0.21	991	3.17
1995	885	18.6	28	0.12	913	3.14
1996	717	16.2	20	0.09	737	2.67
1997	682	14.1	14	0.06	696	2.58
1998	569	12.6	8	0.04	577	2.23
1999	511	12.5	6	0.03	517	2.06
2000	431	10.3	7	0.03	438	1.77
2001	434	10.8	10	0.05	444	1.83
2002	424	11.7	9	0.04	433	1.76
2003	447	11.7	4	0.02	451	1,83
2004	420	11.1	4	0.02	424	1,70
2005	346	9.25	5	0.02	351	1.40
2006	327	8.61	6	0.03	333	1.29
2007	376	8.57	5	0.02	381	1.40
2008	339	6.39	5	0.02	344	1.22
2009	322	5.75	5	0.02	327	1.09
2010	224 (6)*	4.77	10 (1)*	0.04	234	0.78
2011	257 (7)*	5.00	7 (3)*	0.03	264	0.84

()* nombre de dons Ag HBs négatifs/DGV positifs

Figure 1: Evolution des taux (pour 10.000 dons) de dons de sang VHB positifs de 1993 à 2011 (échelle logarithmique).



Une baisse régulière des taux est observée chez les nouveaux donneurs. La diminution plus importante observée jusqu'en 1998 peut être attribuée à une pratique de plus en plus fréquente de la vaccination. Cette baisse a été suivie d'un plateau jusqu'en 2004, lui-même suivi d'une nouvelle inflexion de la prévalence particulièrement marquée depuis 2007.

Le taux d'incidence a régulièrement diminué jusqu'en 1999 puis a subi des variations qui ne sont toutefois pas significatives compte tenu des faibles effectifs concernés.

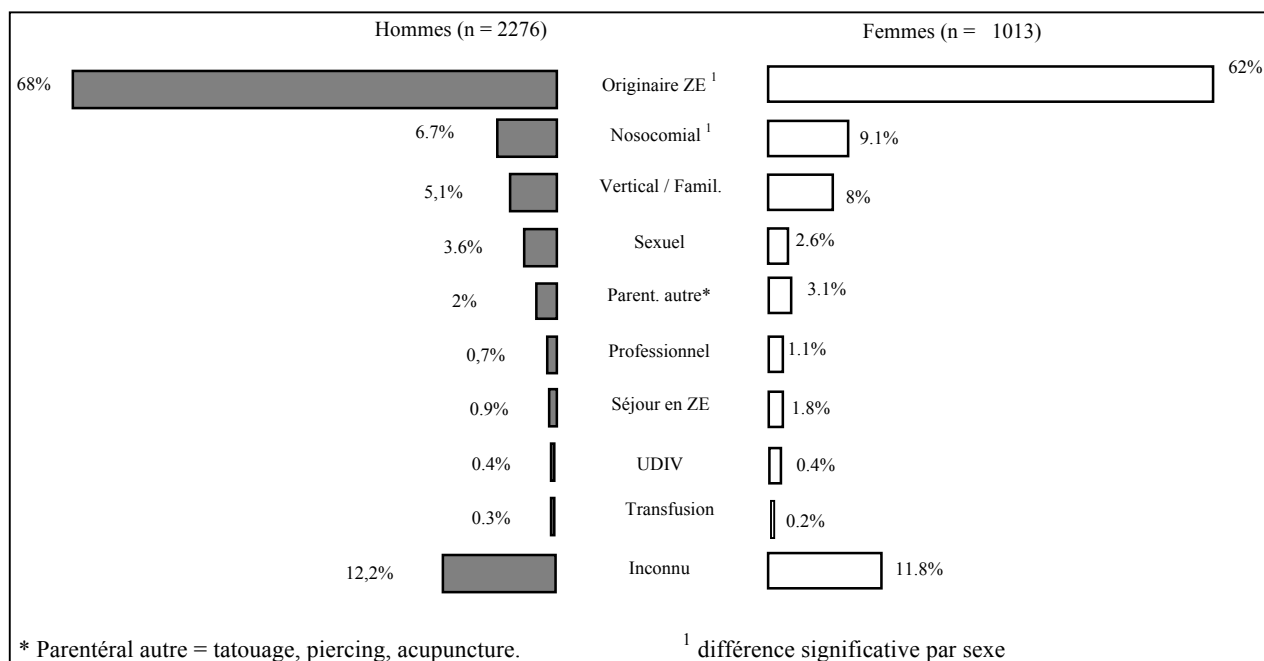
Les départements d'Outre-Mer ont une prévalence environ 10 fois supérieure à celle observée dans les autres départements.

Comme le montre la figure 2, qui fait état des facteurs de risque (hiérarchisés en fonction de leur probabilité de survenue) recherchés chez 3289 (67.2%) des 4892 nouveaux donneurs positifs pour l'Ag HBs, prélevés en France métropolitaine entre 1998 et 2011, et qui ont pu être interrogés, le facteur de risque principal est l'origine géographique, suivi du risque nosocomial.

En revanche, chez les donneurs connus de la période 1998-2011 (nombre total : 91) pour lesquels un facteur de risque a pu être identifié (50 sur les 72 interrogés), le risque sexuel se retrouve au premier plan (19.4%).

Il convient de souligner, que chez 12.1% des nouveaux donneurs et dans 30.6% des cas chez les donneurs connus, interrogés sur leur facteur de risque, celui-ci n'a pas été identifié.

Figure 2 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHB positifs en France métropolitaine entre 1998 et 2011 (n= 3289).



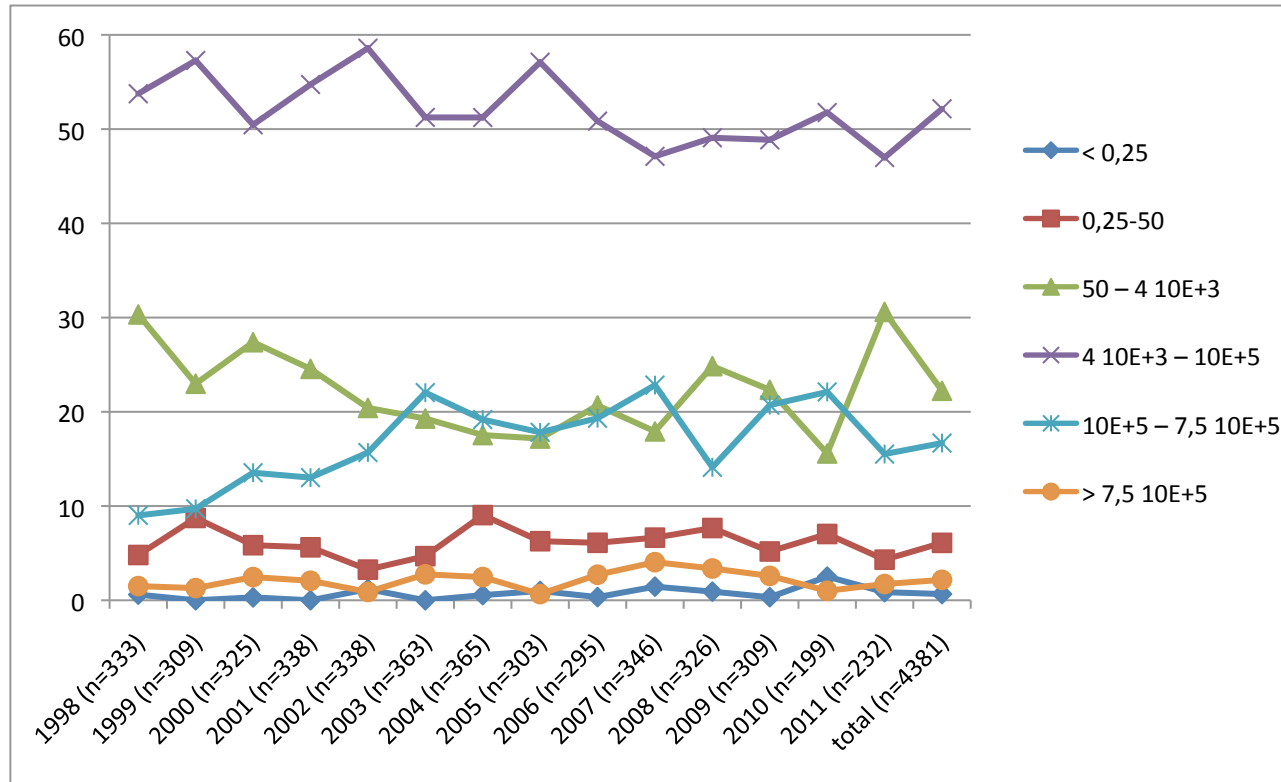
UDIV : utilisateur de drogue par voie intraveineuse

Surveillance virologique de l'infection par le VHB

La figure 3 fait état de l'évolution des **titres de l'Ag HBs** dans les dons positifs pour ce marqueur entre 1998 et 2011.

Ces résultats montrent que plus de 99% des dons analysés avaient un taux d'Ag HBs supérieur à 0.25 ng/ml, taux environ 20 fois supérieur aux capacités de détection des tests de dépistage de l'Ag HBs utilisés à ce jour. Les taux observés sont stables dans le temps. La corrélation entre concentration de l'Ag HBs et la charge virale en fonction des génotypes est en cours.

Figure 3 : Evolution des titres de l'Ag HBs (ng/ml) chez les donneurs de sang entre 1998 et 2011.



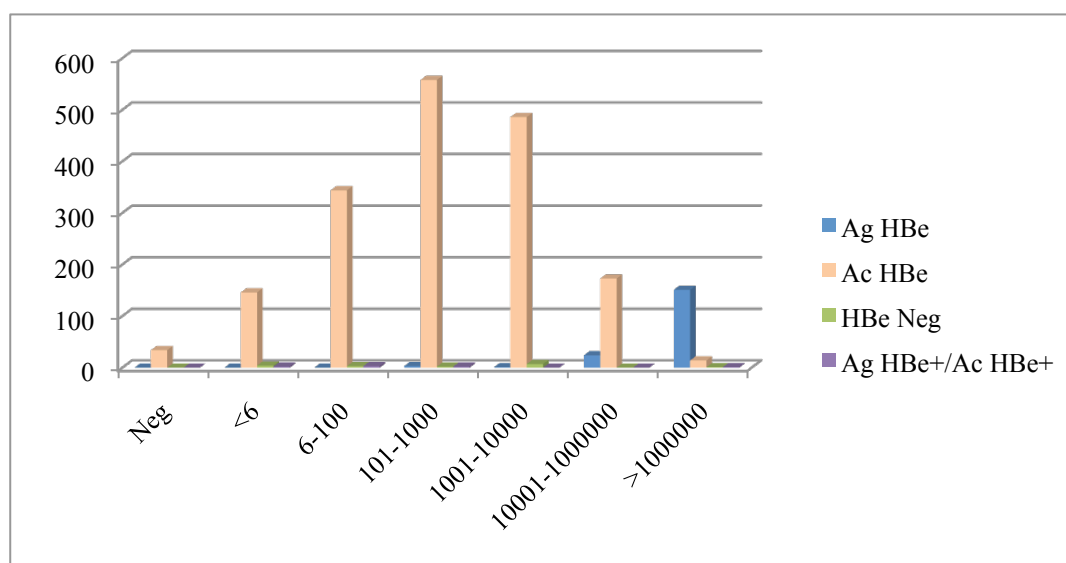
La répartition des **marqueurs HBe** sur les 4388 dons pour lesquels l'information est disponible : soit 79.8% des 5499 dons collectés dans la période 1998-2011 est fourni dans le tableau 2.

Tableau 2 : Répartition des marqueurs HBe chez les donneurs VHB positifs entre 1998 et 2011

	AcHBe pos / AgHBe neg		AgHBe pos / AcHBe neg		AgHBe pos / AcHBe pos		HBe neg		Total testé N
	N	%	N	%	N	%	N	%	
1998	291	86.9	39	11.6	2	0.6	3	0.9	335
1999	260	85.5	40	13.2	0	0.0	4	1.3	304
2000	269	85.7	40	12.7	1	0.3	4	1.3	314
2001	286	86.7	36	10.9	2	0.6	6	1.8	330
2002	302	89.6	34	10.1	0	0.0	1	0.3	337
2003	325	89.0	37	10.1	1	0.3	2	0.5	365
2004	321	87.9	39	10.7	1	0.3	4	1.1	365
2005	278	91.1	24	7.9	1	0.3	2	0.7	305
2006	266	89.6	29	9.8	0	0.0	2	0.7	297
2007	298	85.6	45	12.9	1	0.3	4	1.1	348
2008	291	89,0	30	9,2	1	0,3	5	1,5	327
2009	282	91.3	25	8.1	0	0	2	0.6	309
2010	181	87.4	19	9.2	0	0	7	3.4	207
2011	226	92.2	13	5.3	0	0	6	2.5	245
Total	3876	88.3	450	10.3	10	0.2	52	1.2	4388

Il apparaît que 88.3% (3876/4388) des dons Ag HBs positifs sont **Ac HBe** positifs, cette proportion étant stable dans le temps. Par ailleurs, comme le montre la figure 4, les dons Ag HBe positifs présentent des charges virales plus élevées.

Figure 4: Relation entre la charge virale (UI/ml) et le statut HBe sur 1959 dons VHB positifs collectés entre 2005 et 2011 (179 AgHBe pos, 1755 Ac HBe pos, 17 HBe neg, 8 Ag et AcHBe positifs).



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

Le tableau 3 en fournit les résultats et montre une faible fréquence (2.6% au total) des anti-HBs chez les donneurs AgHBs positifs sans liaison évidente avec l'existence de mutations du gène S. La moyenne du taux d'anti-HBs est de 47 mUI/ml avec une médiane de 26 mUI/ml. Par ailleurs, 7 (0.7%) dons présentaient des Ac anti-HBs sans Ag associé dont le détail n'est pas montré ici.

La fréquence des mutants de l'AgHBs est significativement plus élevée ($p = 0.0005$) pour les dons Ag/Ac HBs positifs (18.5% ; 5/27) que les dons Ac anti-HBs négatifs (4.4% ; 78/1759). Ces cinq souches sont porteuses de 2 mutations pour 2 souches et d'au moins 3 mutations pour 3 souches. La notion de vaccination n'est pas renseignée à l'exception d'un donneur pour lequel l'absence de vaccination a été exclue.

Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée concernant l'origine géographique des donneurs, le facteur de risque ou la charge virale VHB. En revanche, les donneurs Ag/Ac HBs positifs sont plus âgés (60% ont plus de 40 ans) que les donneurs Ac négatifs (67.5% ont moins de 40 ans ; $p = 0.003$). De plus, on note un sexe ratio plus élevé dans le groupe des Ac anti-HBs négatifs (2.3) que dans le groupe positif pour les deux marqueurs (1.08 ; $p=0.047$). Enfin, le titre en AgHBs est plus faible pour les dons Ag/Ac positifs que les dons Ac négatifs ; 63% des dons Ag/Ac+ présentent un titre inférieur à 4000 ng/ml alors que ceci concerne seulement 29.3% des dons anti-HBs négatifs ($p=0.0002$).

Toutefois, ces résultats seront à consolider au cours des années à venir.

Tableau 3 : Fréquence des anti-HBs chez les donneurs AgHBs positifs de 2008 à 2011 en fonction du génotype

Ac HBs	2008	2009	2010	2011	Total
N testés	313	301	204	238	1056
N Ac HBs Pos	8 (2.6%)	5 (1.7%)	7(3.4%)	7 (2.9%)	27 (2.6%)
Taux (mUI/mL)	10 - 145	12 - 46	10 - >100	12 - 25	10 - >100
Ac HBe	7	5	6	6	24
gt A	1 dble pop	2	1	1	5
gt B	0	0	1	2	3
gt C	1	0	1	0	2
gt D	3	1	3	3	10
gt E	1	1	0	1	3
gt F	1	0	0	0	1
ND	1	1	1	0	3
Mutations HBs	1	1	2	1	5

Sur les 4941 donneurs trouvés Ag HBs positifs entre 1999 et 2011, 4034 (81.6 %) ont bénéficié d'un **sous-typage de l'Ag HBs** et 85.7 % d'entre eux (n = 3456) ont pu être entièrement typés. Les 14.3 % n'ayant pas pu être entièrement sous typés correspondaient dans la majorité des cas à des échantillons présentant des titres d'Ag HBs inférieurs au seuil de détection de la technique de sérotypage.

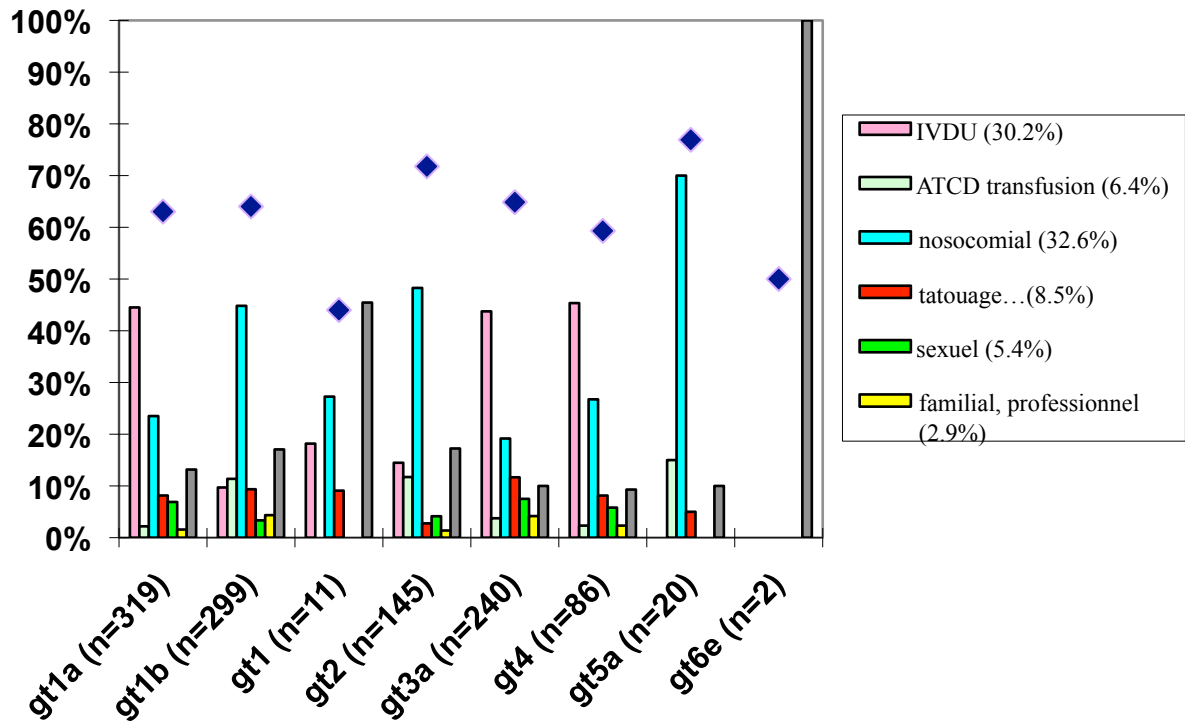
Le tableau 4 et la figure 5 montrent l'évolution de la répartition des différents sous-types de l'Ag HBs de 1999 à 2011.

Sur l'ensemble de la période 1999-2011, le sous-type *ayw2* (correspondant au génotype D, fortement prévalent dans le bassin-méditerranéen) était le plus fréquent (33.9 %), suivi du sous-type *adw2* (génotype A ou B, majoritaire en Europe occidentale) (25.5 %). 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 10.9%, 15,6 % et 7,4%. Toutefois, on note jusqu'en 2005 (figure 5) une diminution significative ($p=0.004$) des souches *adw2* et *ayw3* ($p=0.001$) et une augmentation des *ayw4* ($p<10^{-4}$), en probable liaison avec une augmentation des donneurs originaires d'Afrique. Depuis 2005 une relative stabilisation des proportions est observée avec toutefois des fluctuations avec notamment une baisse des *ayw2* au profit des *ayw4* et en 2011 des *ayw1* qui méritent d'être confirmées dans les années à venir.

Tableau 4 : Répartition des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2011 (incluant les Antilles depuis 2006 et La Réunion depuis 2008)

Sous- types	1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
ayw1	16	6.3	34	12.9	29	10.5	27	8.9	31	10.0	27	8.6	34	12.9	23	9.3	34	11.6	30	10.9	31	11.3	22	12.4	38	18.5	376	10.9
ayw2	84	33.1	97	36.7	91	32.9	102	33.7	106	34.3	109	34.9	87	33	84	34.0	109	37.1	88	32.0	101	36.9	54	30.3	59	28.8	1171	33.9
ayw3	30	11.8	15	5.7	23	8.3	12	4.0	24	7.8	22	7.1	10	3.8	10	4.0	14	4.8	20	7.3	12	4.4	7	3.9	8	3.9	207	6.0
ayw4	16	6.3	28	10.6	23	8.3	60	19.8	46	14.9	48	15.4	55	20.8	47	19.0	51	17.3	44	16.0	43	15.7	36	20.2	44	21.5	541	15.6
adr	27	10.6	17	6.4	26	9.4	22	7.3	27	8.7	22	7.1	15	5.7	21	8.5	19	6.5	17	6.2	20	7.3	15	8.4	8	3.9	256	7.4
adw2	79	31.1	71	26.9	80	28.9	77	25.4	74	23.9	83	26.6	63	23.8	60	24.3	66	22.4	73	26.5	65	23.7	43	24.2	46	22.4	880	25.5
adw4	2	0.8	2	0.8	5	1.8	3	1.0	1	0.3	1	0.3	0	0	2	0.8	1	0.3	3	1.1	2	0.7	1	0.6	2	1.0	25	0.7
	254	100.0	264	100.0	277	100.0	303	100.0	309	100.0	312	100.0	264	100.0	247	100	294	100	275	100	274	100	178	100	205	100	3456	100.0
N analysés	300		314		327		334		362		365		306		303		348		329		310		207		229		4034	
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 (16.4%)		36 (11.6%)		29 (14%)		24 (10.5%)		578 (14.3%)	

Figure 5 : Evolution de la part relative (en %) des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2011 (incluant les Antilles depuis 2006 et La Réunion depuis 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 (52.0%), le sous-type ayw2 avec le bassin Méditerranéen (49.1%), les sous-types ayw3 et adw2 avec l'Europe (66.9% et 61.7%, respectivement), le sous-type ayw4 avec l'Afrique sub-saharienne (78.4%) et le sous-type adr avec l'Asie (61.1%).

Tableau 5 : Proportion (%) des différentes origines géographiques des donneurs VHB positifs en fonction du sous-type 1999-2011

Origine géographique	ayw1		ayw2		ayw3		ayw4		adr		adw2		adw4		Total sous typés	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Europe ¹	52	15.2	353	35.5	115	66.9	85	17.0	61	27.0	481	61.7	13	59.1	1160	38.2
Bassin Méditerranéen	15	4.4	488	49.1	21	12.2	7	1.4	0	0	55	7.1	0	0	586	19.3
Afrique Sub Saharienne	178	52.0	76	7.6	11	6.4	393	78.4	2	0.9	70	9.0	0	0	730	24.0
Asie	74	21.6	13	1.3	3	1.7	1	0.2	138	61.1	58	7.4	0	0	287	9.5
Autre	23	6.7	64	6.4	22	12.8	15	3.0	25	11.1	116	14.9	9	40.9	274	9.0
Sous total	342	100.0	994	100.0	172	100.0	501	100.0	226	100.0	780	100.0	22	100.0	3037	100.0
Ethnie inconnue	34 (9.0 %)		177 (15.1 %)		35 (16.9%)		40 (7.4 %)		30 (11.7 %)		100 (11.4 %)		3 (12.0 %)		419 (12.1%)	
Total	376 (10.9%)		1171(33.9 %)		207 (6.0%)		541 (15.7 %)		256 (7.4%)		880 (25.5%)		25 (0.7%)		3456 (100%)	

¹ Bassin Méditerranéen exclu

L'analyse moléculaire a été réalisée sur 2035 dons Ag HBs positifs et/ou ADN positifs collectés entre 2005 et 2011. Parmi ces 2035 dons, 242 (11.9%) 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 6. Comme présenté dans la figure 7, la proportion des génotypes est stable entre 2005 et 2009. En 2010 et 2011, on note une inflexion du génotype D au profit des génotypes A et E. Cette tendance (non statistiquement significative) devra être confirmée dans les années à venir.

On note une prévalence globale plus élevée de génotype D (42.1%), suivie des génotypes A (27.7%) et E (17.2%) puis des génotypes B (6.3%), C (6.1%) et F (0.7%).

Cette répartition est en accord avec l'origine géographique des donneurs (A : Europe, B : Asie, C : Asie, D : bassin méditerranéen et Europe, E : Afrique). Le sexe ratio n'est pas différent en fonction des génotypes. En revanche, parmi les hommes, l'âge moyen est plus élevé chez les sujets infectés par le génotype D (35.4 ans) et les plus jeunes ont été observés dans le génotype E (27.1 ans, $p < 10^{-4}$). Les femmes infectées par le génotype A sont plus âgées que celles infectées par le génotype E (35.7 contre 23.8 ans, respectivement, $p < 10^{-4}$).

Figure 6: Répartition des génotypes du VHB chez 1793 donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2011.

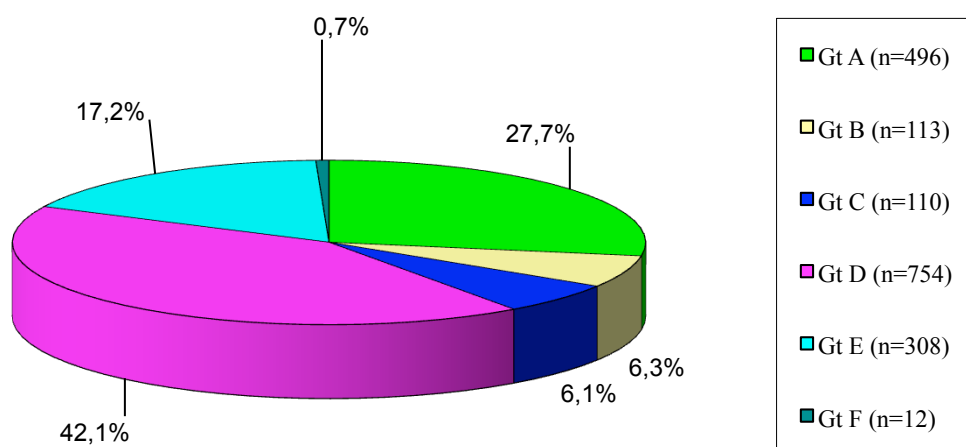
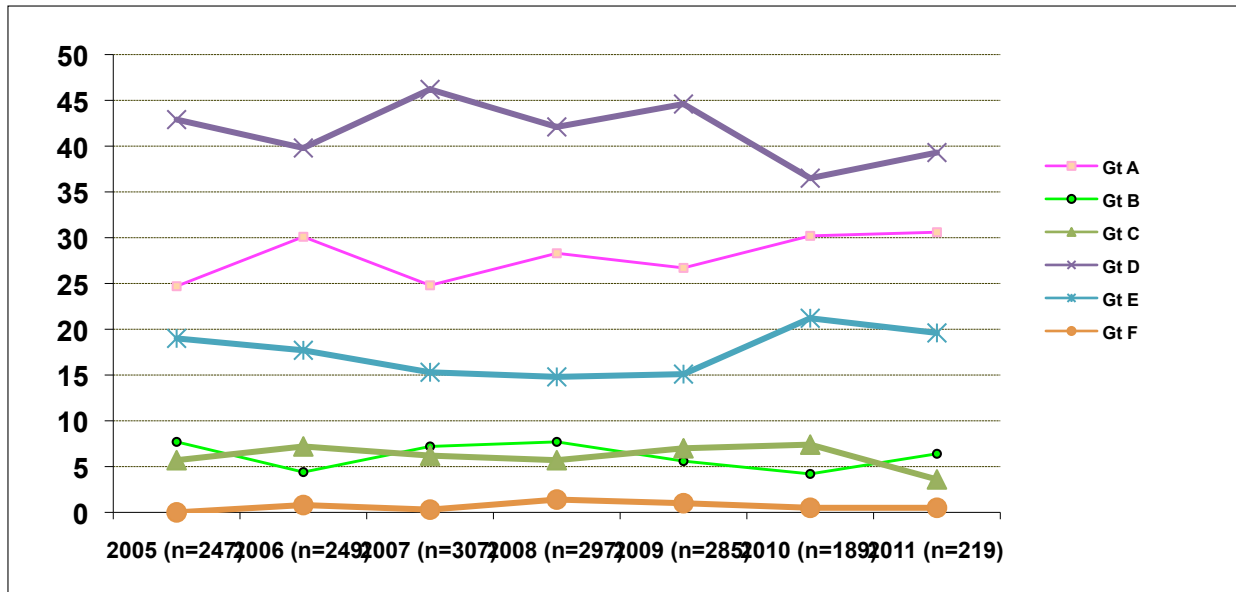


Figure 7: Evolution des proportions (%) des différents génotypes du VHB chez les donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2011.



La répartition des génotypes observée dans notre population est sensiblement différente de celles décrites dans divers travaux réalisés en France puisque, même si les génotypes A et D restent les plus prévalents, leurs proportions respectives varient de 24% à 51% pour le génotype A (27.7% dans notre population) et de 18% à 42.1% (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 VHB positifs ayant fait un don aux Antilles entre 2005 et 2011 et ceux ayant donné en Métropole entre 2005 et 2011 et à la Réunion entre 2008 et 2011. Soixante-deux (42.2%) des 147 dons prélevés aux Antilles dans la période d'étude ont été analysés. Bien que les effectifs soient trop faibles pour en tirer un enseignement, l'on note des différences significatives : le génotype A étant majoritaire aux Antilles avec 74.2% des souches dont, par ailleurs, 56.5% (n= 26) sont A1, décrites comme étant originaires d'Afrique et 8.7% (n=4) sont A2, d'origine européenne.

Tableau 6: Comparaison de la répartition des génotypes du VHB entre les souches provenant des donneurs de sang prélevés aux Antilles (2005-2011) et sur le reste du territoire (Métropole 2005-2011 et Ile de la Réunion 2008-2011)

génotype	Antilles N	%	Métropole + Réunion N	%	p
A dont	46	74.2 %	450	26 %	<10 ⁻⁴
A1	26 (56.5%)*		54 (12%)**		
A2	4 (8.7%)		123 (27.3%)		
A autres	16 (34.8%)		273 (60.7%)		
B	1	1.6%	112	6.5%	na
C	0	0%	110	6.4 %	na
D	12	19.3%	742	42.8%	NS
E	3	4.9%	305	17.6%	na
F	0	0%	12	0.7%	na
TOTAL	62		1731		

* dont 20/20 testés (100%) sont adw2

** dont 44/54 (81.5%) sont adw2

na : non applicable, NS : non significatif

La corrélation entre sérotype et génotype figure dans le tableau 7. Sur les 2045 échantillons étudiés (3 non testés ni en génotypage ni en sérotypage), 1738 (84.5%) ont été étudiés pour le sérotype et 1793 (87.7%) par génotypage. Parmi ces 2045 échantillons, 1572 (76.9%) ont été caractérisés par les 2 méthodes (encadré dans le tableau 7), 86 (4.2%) n'ont pu être caractérisés par aucune des méthodes, 221 (10.8%) uniquement par séquençage et 166 (8.1%) uniquement par sérotypage.

Parmi les 1572 échantillons caractérisés par les 2 méthodes, 26 (1.6%) étaient discordants selon la classification admise liées à des mutations modifiant le sérotype.

Tableau 7 : Répartition des génotypes du VHB et relation avec le sérotype chez 1793 donneurs de sang entre 2005 et 2011

Sous- types	ayw1	ayw2	ayw3	ayw4	adw2	adw4	adr	Total ss typés	Non typables	Non testés	TOTAL	
Génotypes												
A	132 (69.1%)	<u>2 (0.4 %)</u>			329 (89.9 %)			463	22 ¹	11	496	27.7%
B	55 (28.8%)				36 (9.8 %)			91	20	2	113	6.3%
C		<u>1 (0.2%)</u>					102 (100%)	103	5	2	110	6.1%
D	<u>4 (2.1%)</u>	531 (97.8%)	69 (98.6%)	<u>8 (2.8 %)</u>				612	125	17	754	42.0%
E		<u>9 (1.6 %)</u>	<u>1 (1.4%)</u>	282 (97.2%)	<u>1 (0.3%)</u>			293	8	7	308	17.2%
F						10 (100%)		10	2	0	12	0.7%
Total génotypés	191	543	70	290	366	10	102	1572	182	39	1793	100%
Non génotypables	21	39	10	29	47	1	12	159	62	21	242	
Non testés	0	0	1	1	4	0	1	7	3	3	13	
TOTAL	212	582	81	320	417	11	115	1738	247	63	2048	

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

¹ incluant 2 ADN positifs/Ag HBs négatifs

Par ailleurs, des mutations du gène S codant l'enveloppe virale décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination, ou aux immunoglobulines et hors polymorphisme naturel ont été retrouvées pour 84 échantillons (4.7%) (tableau 8). Soixante-six souches présentaient une mutation unique dans la région analysée, et 18 des mutations multiples (2 : n=11, 3 : n=3 ; >3 n=4). La mutation majoritairement identifiée (21.4%) portait sur le résidu 133 (18 cas dont 6 en association avec au moins une autre mutation), puis sur les résidus 130 (14 cas), 134 et 129 (9 cas pour chacun). Le génotype B présente la plus forte proportion de souches mutées (11.5%) alors que le génotype C semble être plus conservé (2,7%).

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

Tableau 8: Inventaire des mutations du gène S du VHB retrouvées par analyse moléculaire de 1793 donneurs de sang virémiques entre 2005 et 2011

Génotype	A	B	C	D	E	F	TOTAL
Mutations							
T116N	1						1
P120S				2	1		3
P120T	1	1		1	1		4
I/T126A		3					3
I/T126N			2	1			3
Q129H		2		2	1		5
G130R		1		3			4
G130N	3				1		4
T131I		1		3			4
M133I				4			4
M133T	4			1	1		6
M133L		1			1		2
F134L	1						1
Y134N				3			3
T/S143M	2			2			4
S143L				2	1		3
D144E		1		1	1		3
G145R	1				2		3
G145A					2		2
T116N-D144G				1			1
P120S-F134I		1					1
Q129H-D144A	1						1
Q129R-G130N	2						2
G130N-M133I				1			1
G130R-S132Y				1			1
G130R-Y134N				1			1
M133T-T116N		1					1
M133T-F134L	1		1				2
T131N-M133I-Y134H				1			1
T116N-S117K-T125M	1						1
Q129L-G130R-M133T				1			1
Multiples mutations > 3	1			3			4
codon stop w172				1			1
insertion 116T	2	1					3
Total	21	13	3	35	12	0	84
% /génotype	25.0%	15.5%	3.6%	41.6%	14.3%		
	4.2%	11.5%	2.7%	4.6%	3.9%	0%	4.7%

La figure 8 et le tableau 9 font état de la relation entre charge virale et génotype sur 1928 souches. Ces résultats montrent que les charges virales plus élevées sont observées pour les génotypes B et C avec une différence statistiquement significative ($p < 10^{-3}$).

Figure 8 : Proportions (%) des charges virales (log UI/ml) en fonction du génotype du VHB chez 1928 donneurs de sang en 2005 et 2011. (ND : génotype non déterminé)

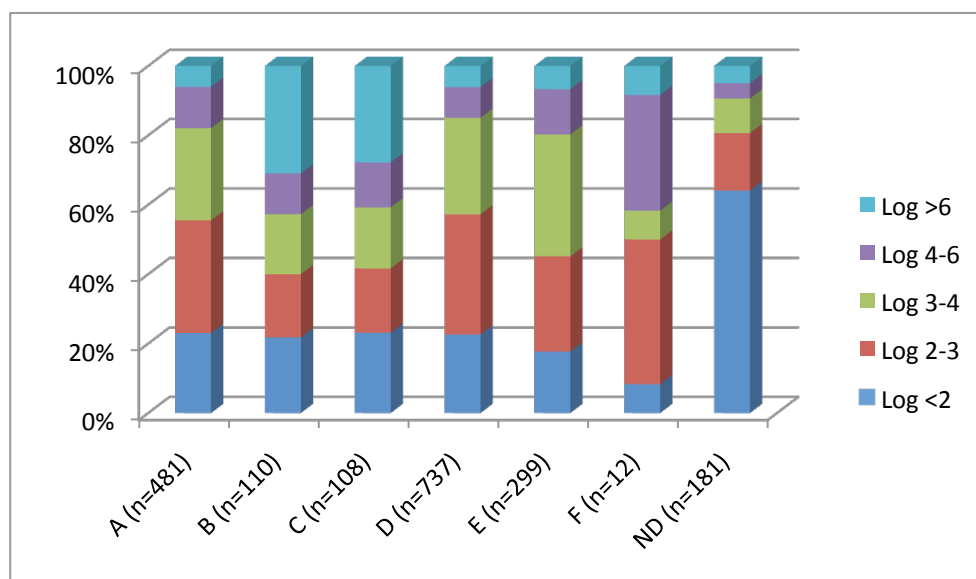


Tableau 9: Pourcentage de donneurs de sang dans les différentes tranches de charges virales en fonction des génotypes 2005-2011

CV log UI/ml	Gen A (n=481)	Gen B (n=110)	Gen C (n=108)	Gen D (n=737)	Gen E (n=299)	Gen F (n=12)	ND (n=181)	Total (N=1928)
<2	23.1	21.8	23.1	22.7	17.8	8.3	64.1	25.8
2-3	32.4	18.2	18.5	34.6	27.4	41.7	16.6	29.4
3-4	26.6	17.3	17.6	27.8	35.1	8.3	9.9	25.7
4-6	11.9	11.8	13.0	8.8	13.0	33.4	4.4	10.4
>6 *	6.0	30.9	27.8	6.1	6.7	8.3	5.0	8.7
moy	3.03	4.33*	4.15*	3	3.29	3.76	1.9	3.09
Ecart Type	1.61	2.6	2.48	1.58	1.57	1.79	1.69	1.81

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

Le statut vis à vis **des anticorps anti-Delta** des donneurs Ag HBs positifs est consigné dans le tableau 10.

Parmi les donneurs Ag HBs positifs, 1.98% présentent une co-infection par le virus Delta entre 1997 et 2011. Après une période de stabilité autour de 1.1% pendant 10 ans, la prévalence a augmenté à partir de 2006 pour atteindre 6.5% en 2010. On note un retour à 1.28% en 2011. En ne prenant en compte que les positifs francs, le taux de prévalence des anticorps Delta s'élève à 1.31%.

En collaboration avec le laboratoire associé au CNR pour l'étude du virus Delta, nous menons une étude visant à établir les fréquences des sujets virémiques pour le virus Delta parmi les donneurs présentant des anticorps. La quantification de la virémie, réalisée sur 61 échantillons a identifié 14 souches (22.9%) avec une charge virale détectable (10^2 - 10^8 copies/ml). Douze souches étaient de génotype 1, une de génotype 7 (le dernier étant en cours d'investigation). Trois souches VHD-1 étaient isolées chez des donneurs européens, 2 VHD-1 chez des donneurs originaires du Bassin Méditerranéen et les 7 autres chez des donneurs originaires d'Afrique Sub-Saharienne. La charge virale VHB des 14 donneurs ARN-VHD positifs était plus basse (médiane à 14 UI/ml) que celle des dons ARN-VHD négatifs (médiane à 874 UI/ml). Aucune différence dans la répartition des génotypes du VHB n'était observée entre les donneurs mono et co-infectés.

La surveillance prospective des donneurs VHB positifs a permis d'identifier une augmentation de la prévalence en lien possible avec l'origine géographique des donneurs. Le faible taux de donneurs ARN Delta positifs (22.9%) comparé à celui observé dans le cadre d'un recrutement hospitalier peut en partie s'expliquer par le portage asymptomatique du virus chez les donneurs. Toutefois, les faibles effectifs nécessitent une poursuite de la surveillance.

Tableau 10: Prévalence des anticorps anti-Delta chez les donneurs de sang VHB positifs de 1997 à 2011

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
n testés	253	325	278	303	325	330	360	360	297	283	331	314	299	200	234	4492
Positifs faibles	0	0	0	0	0	0	1	2	1	8	1	2	5	8	2	30
Positifs francs	3	3	4	1	4	4	4	2	3	4	8	10	3	5	1	59
%	1.18	0.92	1.44	0.33	1.23	1.21	1.39	1.11	1.35	4.24	2.72	3.82	2.67	6.5	1.28	1.98
PCR Pos/nb testés parmi les pos faibles	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2	0/0	0/6	0/1	0/0	0/2	0/6	0/1	0/18
Génotype																
PCR Pos/nb testés parmi les pos francs	2/2	0/0	0/0	0/0	0/3	1/3	1/3	1/2	2/2	1/4	3/7	1/9	1/3	0/4	1/1	14/43
Génotype	2xGt1					Gt7	Gt1	Gt1	2xGt1	Gt1	3xGt1	Gt1	Gt1			En cours

3.2.2 Le VHC

Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHC

Le tableau 11 et la figure 9 donnent la comparaison des taux de positivité pour le VHC observés entre 1993 et 2011 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

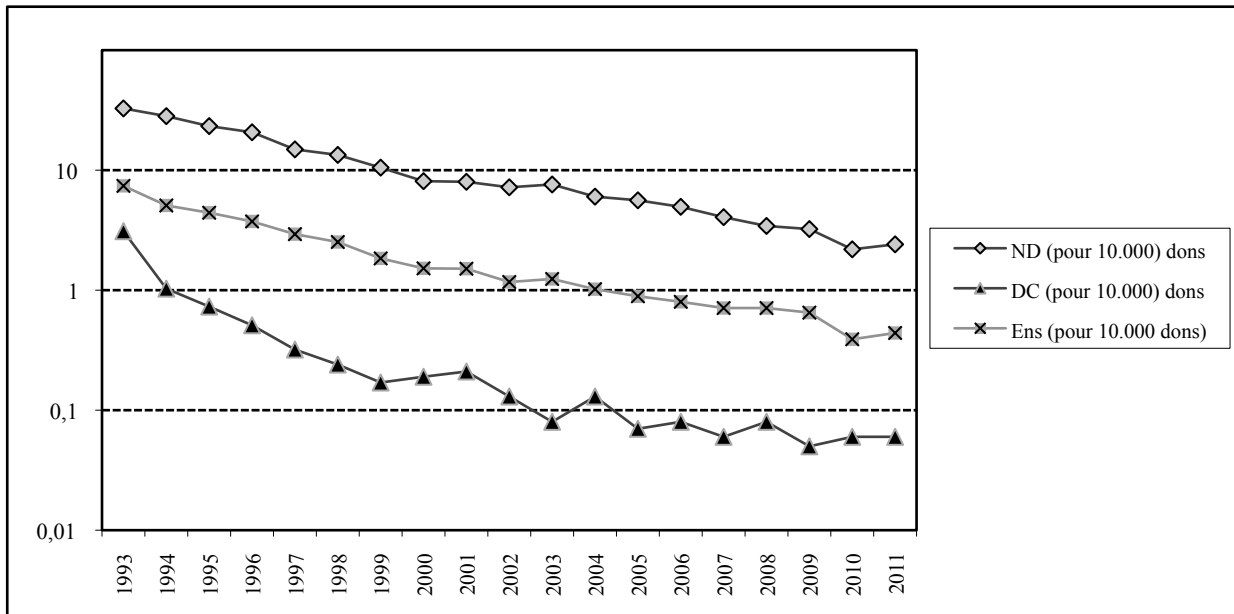
Tableau 11 : Taux des dons de sang VHC positifs de 1993 à 2011.

Année	Nouveaux donneurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons
1993	1605	32.7	902	3.1	2507	7.4
1994	1281	28.2	266	1.03	1547	5.08
1995	1106	23.3	178	0.73	1284	4.42
1996	914	20.7	118	0.51	1032	3.74
1997	720	14.9	71	0.32	791	2.93
1998	601	13.4	51	0.24	652	2.52
1999	428	10.5	36	0.17	464	1.84
2000	337	8.1	39	0.19	376	1.52
2001	322	8.0	43 ⁽²⁾	0.21	365	1.51
2002	262	7.2	27 ⁽²⁾	0.13	289	1.17
2003	290 ⁽¹⁾	7.60	16	0.08	306	1.24
2004	227	6.02	28 ⁽²⁾	0.13	255	1.02
2005	210	5.61	14 ⁽²⁾	0.07	224	0.89
2006	188 ⁽²⁾	4.95	17	0.08	205	0.80
2007	178 ⁽²⁾	4.06	14 ⁽¹⁾	0.06	192	0.71
2008	182	3.43	19 ⁽¹⁾	0.08	201	0.71
2009	181	3.23	13	0.05	194	0.65
2010	103	2.19	15 ⁽²⁾	0.06	118	0.39
2011	124	2.41	16	0.06	140	0.44

⁽¹⁾ dont 2 Ac nég DGV pos

⁽²⁾ dont 1 Ac nég DGV pos

Figure 9: Evolution des taux (pour 10.000 dons) de dons de sang VHC positifs de 1993 à 2011. (ND : nouveaux donneurs, DC : donneurs connus, ens : ensemble) (échelle logarithmique)

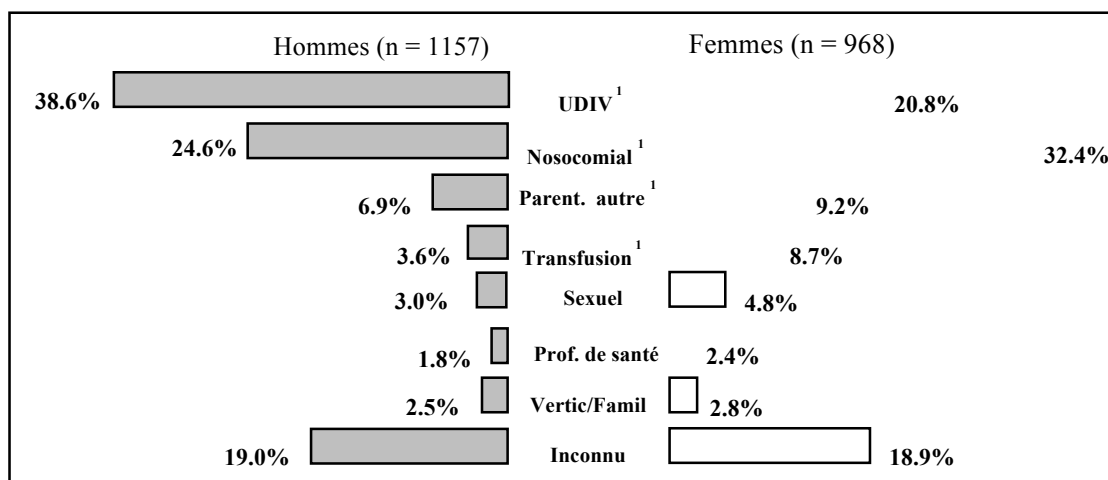


Une baisse régulière des taux est observée liée, d'une part à une sélection progressive de la population des donneurs connus, et d'autre part à une meilleure maîtrise des facteurs de risque qui a permis d'éliminer des candidats au don potentiellement à risque lors de l'entretien précédent le don. Une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

Les facteurs de risque renseignés pour 58.5% (2125) des 3633 nouveaux donneurs VHC positifs entre 1998 et 2011 (figure 10), montrent que près de 19% n'ont aucun facteur de risque identifié, et que la toxicomanie (38.6% chez les hommes et 20.8 % chez les femmes) et les expositions nosocomiales (24.6% chez les hommes et 32.4% chez les femmes) restent au premier plan des modes de contaminations potentiels retrouvés chez ces sujets.

Chez les 237 donneurs connus (113 hommes et 124 femmes) ayant présenté une séroconversion documentée et interrogés sur leur facteur de risque (soit 68.3% des 347 de cette catégorie entre 1998 et 2011), la toxicomanie par voie IV représente le facteur de risque le plus fréquemment identifié chez les hommes (33.6%) alors que pour les femmes il s'agit d'un risque nosocomial (25%) suivi d'un partenaire connu pour être VHC positif (22.6%). La part des donneurs connus sans facteur de risque identifié s'élève à 20.7% (résultats non montrés).

Figure 10 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHC+ interrogés sur FdR 1998-2011 (n = 2125).



¹Différence significative par sexe

Surveillance virologique de l'infection par le VHC

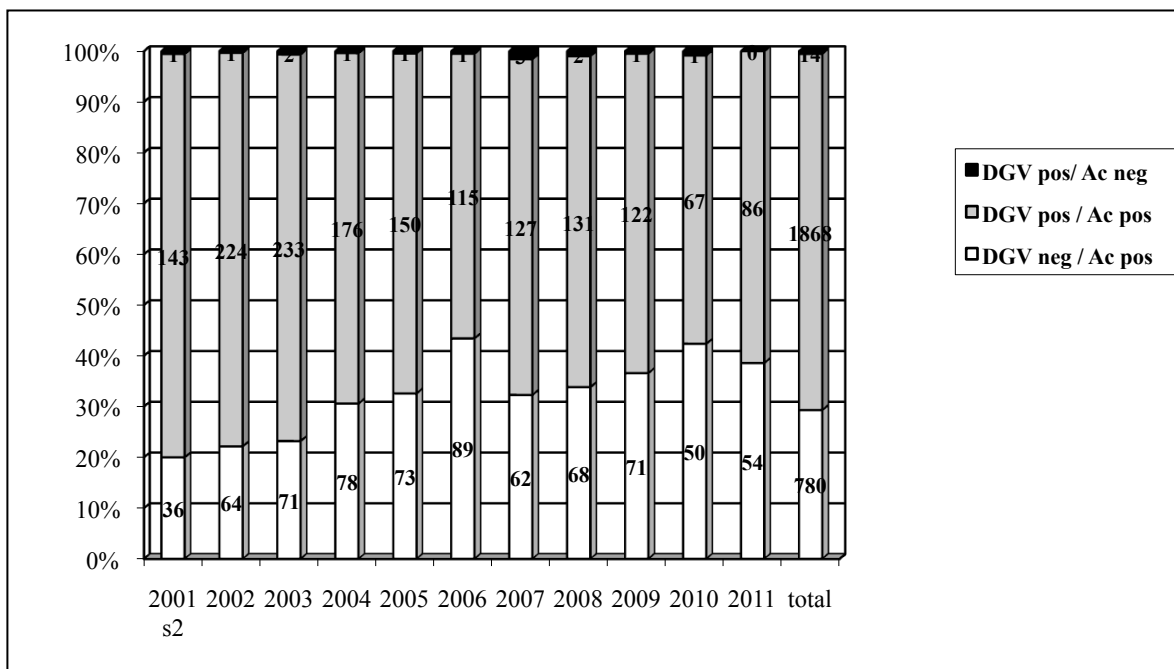
Sur la période 2000-2011, le laboratoire a reçu 2285 échantillons de donneurs VHC positifs, ce qui représente 79.8% des 2865 donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 12 ans.

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 12, la proportion de dons VHC positifs virémiques est en moyenne de 70.7 % avec toutefois une tendance à la baisse de cette catégorie (figure 11) particulièrement marquée en 2006 et 2010. Aucune différence dans les caractéristiques démographiques et épidémiologiques entre le groupe des donneurs virémiques et celui des non virémiques n'a pu être mise en évidence pour expliquer ce phénomène.

Tableau 12 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2000 et 2011 en fonction de la virémie.

	2000		2001 (S1)		2001 (S2)		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ac +/ARN+	205	81.0	89	84.8	143	79.4	224	77.5	233	76.1	176	69.0	150	67.0	115	56.1	127	66.1	131	65.2	122	62.9	67	56.8	86	61.4	1868	70.2
Ac +/ARN -	48	19.0	16	15.2	36	20.0	64	22.1	71	23.2	78	30.6	73	32.6	89	43.4	62	32.3	68	33.8	71	36.6	50	42.4	54	38.6	780	29.3
Ac -/ARN +	0	0.0	0	0.0	1	0.6	1	0.3	2	0.7	1	0.4	1	0.4	1	0.5	3	1.6	2	1.0	1	0.5	1	0.8	0	0.0	14	0.5
TOTAL	253		105		180		289		306		255		224		205		192		201		194		118		140		2662	

Figure 11 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2001 (semestre 2 : début du DGV) et 2011 en fonction de la virémie (n=2304).



La figure 12 fournit la répartition des charges virales déterminées sur 514 donneurs prélevés entre 2007 et 2011. Cinq donneurs avaient des CV inférieures au seuil de quantification de la trousse (< 25 UI/ml), néanmoins dépistées par le DGV pratiqué en pool : 1 donneur était en phase de préséroconversion (Ac VHC négatifs), les 4 autres étaient porteurs chroniques (Ac VHC positifs) dont 3 avec une CV faible et 1 porteur d'un génotype 4f, sous-quantifié par le Cobas Taq Man (140 UI/ml avec la technique d'Abbott). Dans le tableau 13 figure la répartition des CV en fonction des génotypes ainsi que les CV moyennes. Il existe une différence significative entre celles-ci ($p < 10^{-4}$) avec 2 groupes : 1) les CVs les plus élevées concernent les génotypes 1 (1a et 1b) et 2 (absence de différences entre les CVs moy entre ces génotypes) 2) les CVs les moins élevées observées pour les génotypes 3 et 4 (aucune différences entre ces 2 génotypes).

Figure 12: Répartition des charges virales (en log d'UI/ml) du VHC chez 514 donneurs de sang virémiques prélevés entre 2007 et 2011.

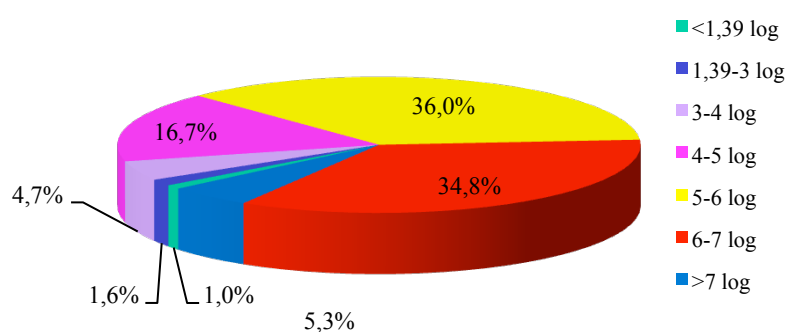


Tableau 13: Répartition des charges virales VHC en fonction des génotypes (2007-2011)

CV log UI/ml	Gen1a (n=158)	Gen1b (n=137)	Gen2 (n=58)	Gen3 (n=108)	Gen4 (n=38)	Gen5 (n=6)	NG (n=5)	TOTAL (N=510)
<1.39	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.6%	0.0%	80.0%	1.0%
1.39-3	0.6%	1.5%	1.7%	1.9%	0.0%	16.7%	20.0%	1.6%
3-4	1.3%	2.9%	6.9%	8.3%	13.2%	0.0%	0.0%	4.7%
4-5	13.9%	13.9%	10.3%	25.9%	26.3%	0.0%	0.0%	16.7%
5-6	37.3%	35.8%	25.9%	41.7%	36.8%	33.3%	0.0%	36.0%
6-7	38.6%	41.6%	44.8%	20.4%	21.1%	50.0%	0.0%	34.8%
>7	8.2%	4.4%	10.3%	1.9%	0.0%	0.0%	0.0%	5.3%
Moy	5.86	5.81	5.83	5.24	5.16	5.54	5.59	5.62
Ecart Type	0.84	0.88	1.14	0.97	1.17	1.50	2.49	1.06

NG : non génotypables

Sont exclus de ce tableau :

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

- 2 échantillons de 2011 de génotypes 1L (CV : 4.69 log UI/ml) et 6 (CV : 6.24 log UI/ml) respectivement

Sur les 1882 donneurs trouvés ARN VHC positifs entre 2000 et 2011, 92.6 % (n = 1743) ont bénéficié d'une détermination du génotype. La figure 13 montre la répartition des génotypes sur l'ensemble de la période, et la figure 14 l'évolution des génotypes dans le temps.

Variabilité du VHC

Sur la période 2000-2011, le génotype le plus fréquent est le génotype 1 (57.3 %), suivi par le génotype 3 (21.2 %), le génotype 2 (11.6 %) et le génotype 4 (8.3 %). Cette répartition est relativement stable au cours des 5 premières années d'étude (pas de différence significative). Toutefois, en 2006 une augmentation des génotypes 4, avec une baisse des génotypes 1 ont été observées, tendances non confirmées en 2007-2009. Le génotype 1 semble amorcer une remontée en 2009 alors que l'inverse se produit pour le génotype 4.

Figure 13 : Répartition des génotypes du VHC chez 1743 donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2011.

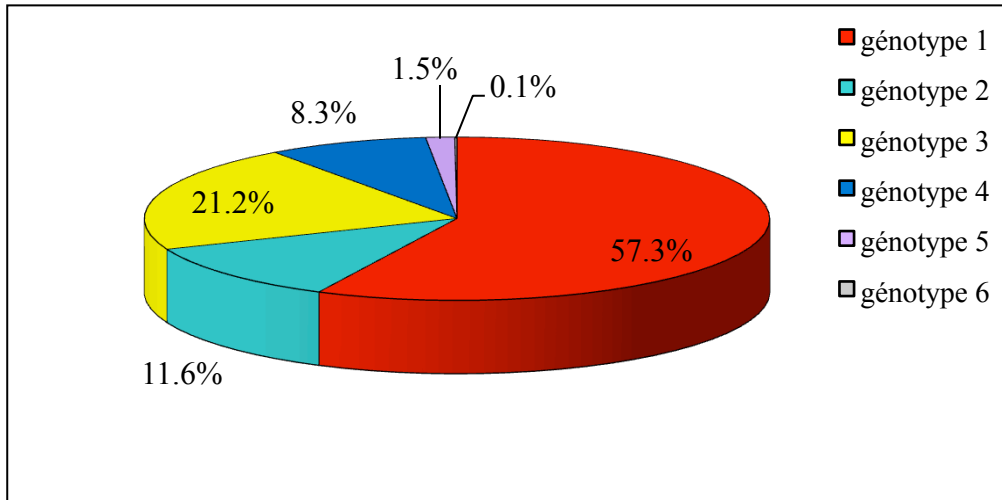
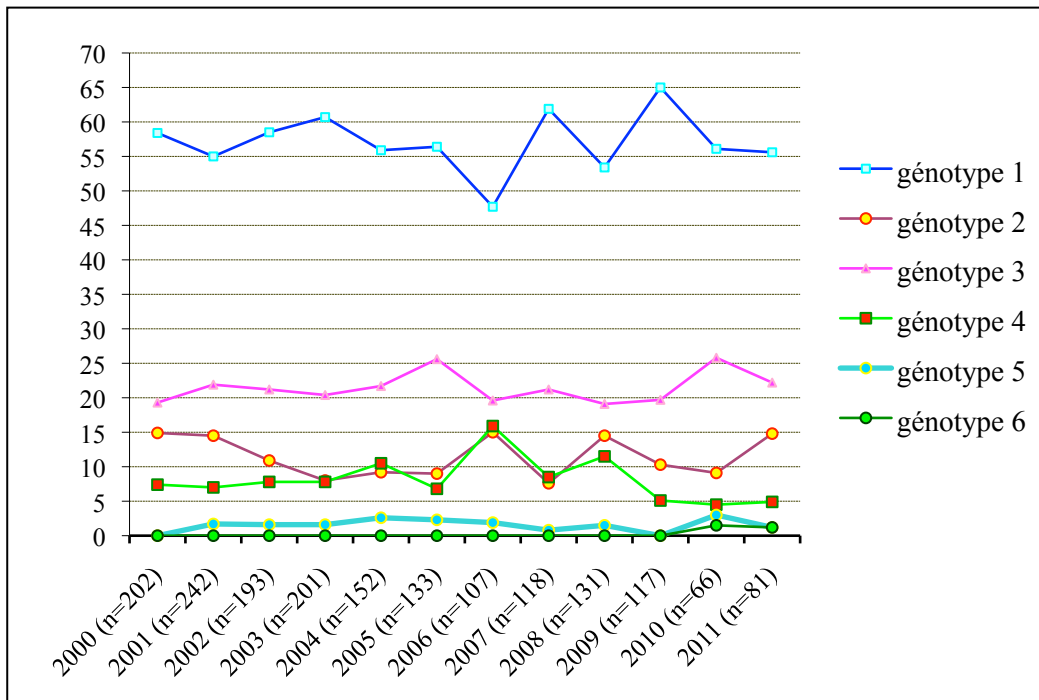


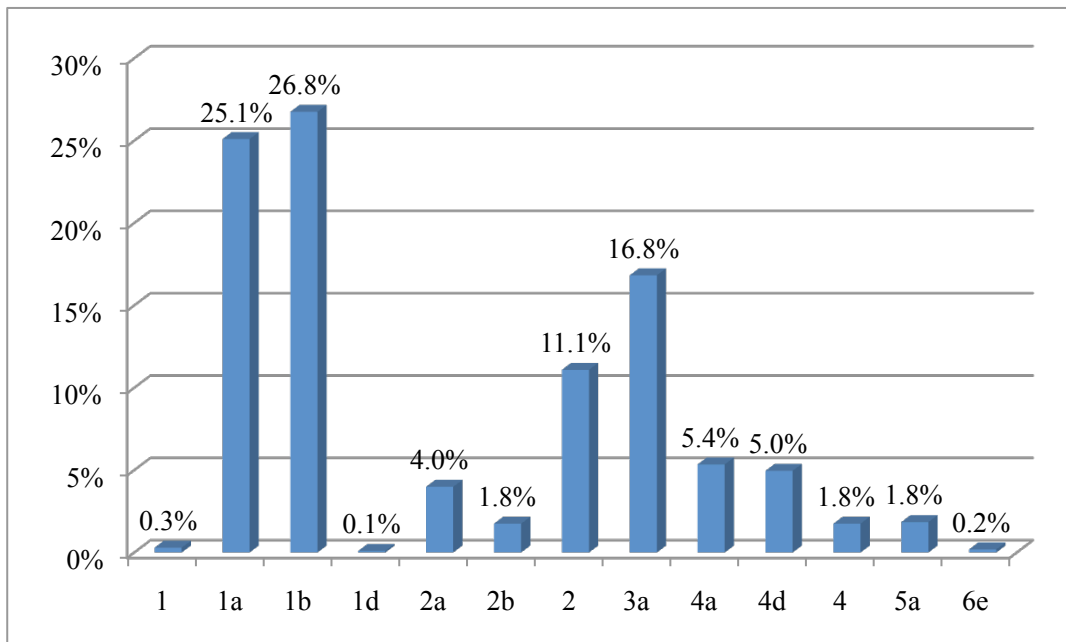
Figure 14: Evolution des proportions relatives (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2011.



L'analyse moléculaire par séquençage de 1028 souches (537 génotypes 1, 173 génotypes 2, 173 génotypes 3, 124 génotypes 4, 19 génotypes 5, 2 génotype 6) collectées durant cette même période rend compte d'une grande variabilité des sous-types, comme le montre la figure 15.

Parmi les 537 donneurs infectés par le génotype 1, 51.2% sont de sous-type 1b et 48% de sous-type 1a. L'analyse des 173 souches de génotype 2 montre une très grande variabilité de ce génotype avec toutefois une majorité des souches appartenant au sous-type 2a avec 23.7%. 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 44.4% et 41.1% des souches de ce génotype.

Figure 15 : Répartition des génotypes et des sous-types du VHC sur 1028 souches étudiées par séquençage moléculaire.

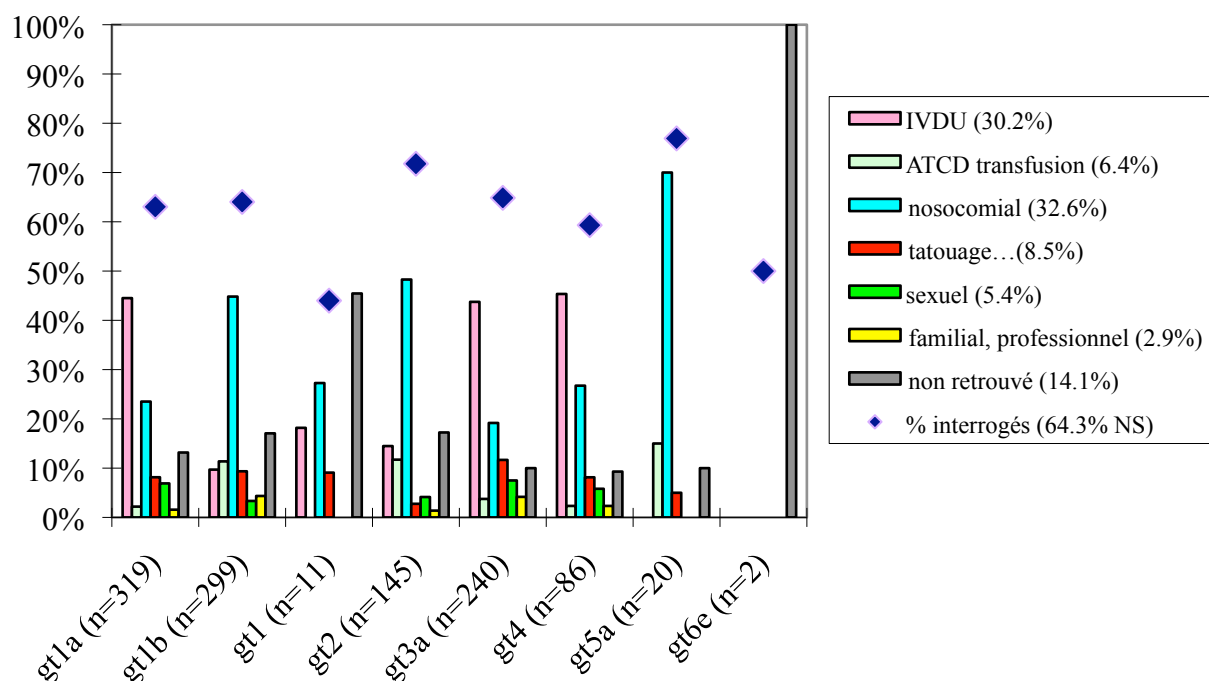


Les facteurs de risque ont été hiérarchisés en fonction de la probabilité d'occurrence la plus élevée. Cette hiérarchisation, adoptée au sein du comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang » chez les sujets présentant plus d'un facteur de risque, est par ordre de fréquence décroissante : 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, 3a ou 4, une proportion plus élevée (44.5 %, 43.8% et 45.4% respectivement) ont été contaminés par toxicomanie intraveineuse comparativement aux autres génotypes. Chez les donneurs avec un génotype 1b ou 2, une proportion plus

élevée (44.8 % et 48.3 % respectivement) ont été contaminés par voie nosocomiale, comparativement aux autres génotypes (figure 16).

Figure 16 : Répartition des facteurs de risque du VHC (hiérarchisés) chez les donneurs de sang en fonction du génotype sur la période 2000-2011.



Sérotypage VHC

Parmi les 243 donneurs non virémiques que comptaient les années 2008 à 2011 (68, 71, 50 et 54 respectivement), 151 (61.9%) ont été analysés pour la détermination du sérotype VHC. Les 92 échantillons restants n'ont pas été étudié, soit parce qu'ils n'avaient pas été reçus (1/3), soit parce qu'ils ne présentaient pas d'anti-NS4, anticorps sur lesquels est basé le sérotypage (2/3). Sur ces 151 échantillons, 88 (58.3%) ont été sérotypés avec succès. La répartition des sérotypes et sa comparaison avec la répartition des génotypes sur la même période sont fournies dans le tableau 14.

Tableau 14: Comparaison des proportions de sérotypes VHC et des génotypes VHC sur la période 2008-2011

Type	Sérotipe (n=88)		Génotype (n=395)		P
	N	%	N	%	
1	62	70.5	228	57.7	0.027
2	4	4.6	49	12.4	0.033
3	17	19.3	83	21	NS
4	3	3.4	28	7.1	NS
5	0	0	5	1.3	na
6	0	0	2	0.5	na
1+4	1	1.1	0	0	na
3+4	1	1.1	0	0	na

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

Seuls 68 de ces 88 donneurs ont été interrogés sur leur facteur de risque : aucun facteur de risque n'a été retrouvé pour 16 (25.5%) d'entre eux. Des 52 autres : 19 avaient des antécédents de toxicomanie IV, 2 avaient été transfusés, 19 déclaraient une contamination nosocomiale possible, 3 parentérales, 6 avaient possiblement été exposés sexuellement et 3 présentaient un autre mode de contamination possible (vertical, familial, professionnel...).

3.2.3 Bilan du DGV et risque résiduel

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

Depuis la mise en place du **DGV du VHC** le 1^{er} juillet 2001 et jusqu'au 31 décembre 2011 28.4 millions de dons ont bénéficié de cette mesure. Au terme de cette période, 14 dons provenant de donneurs sans anticorps spécifiques ont été identifiés (voir les caractéristiques dans le tableau 15); parmi ceux-ci 1 avait un taux élevé de transaminases et 1 présentait des anti-HBc. Ces 2 dons auraient été écartés : le bilan net du DGV se porte donc à 12 dons pour les 11 premières années de pratique du DGV, soit 0.42 par million de dons. Aucun cas n'a été observé depuis 2010.

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

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

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

La figure 17 montre le gain apporté par le DGV (exprimé par million de dons) dans différents pays l'ayant introduit). Il existe très clairement de grandes disparités entre les pays, ne serait-ce qu'en Europe, liées à de multiples facteurs tels que le nombre de dons testés (précisés pour chacun des pays en abscisse), la méthode utilisée (dépistage en pool ou en unitaire) mais avant tout l'épidémiologie locale. La France se situe dans le pays où le gain est un des plus faibles.

Figure 17: Gain du DGV (nombre de dons ARN VHC positifs et anti-VIH négatifs exprimés par millions de dons) dans différents pays (d'après la littérature et l'enquête européenne pour l'ISBT, Roth et al. 2012).

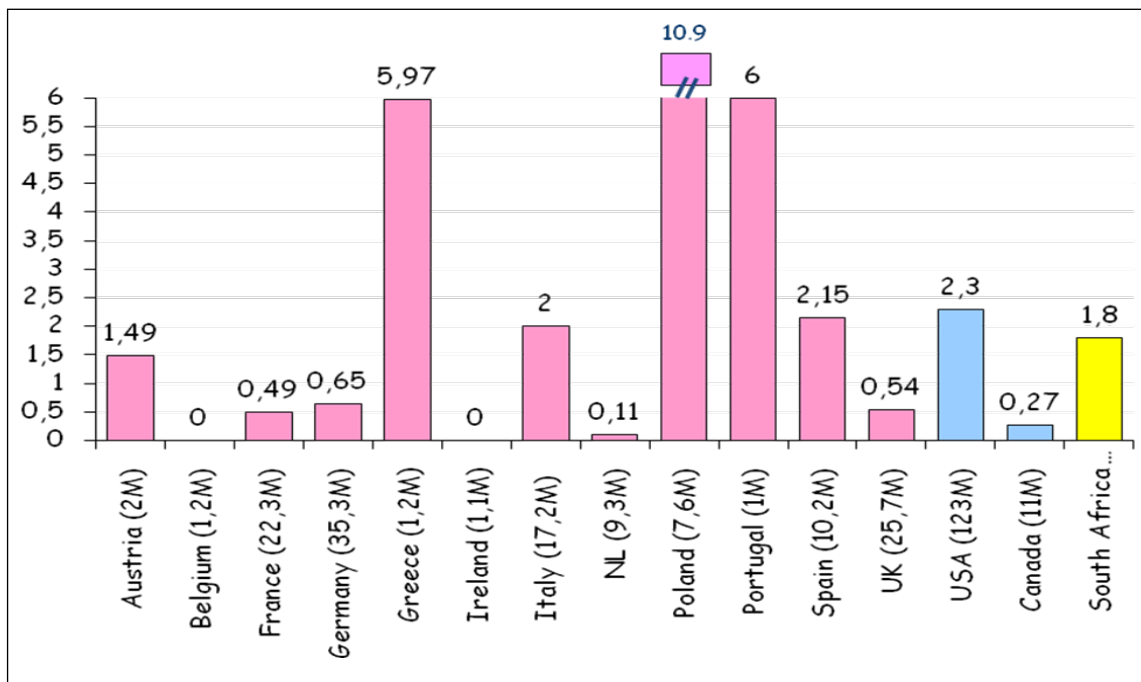


Tableau 15: Caractéristiques des donneurs dépistés ARN positifs anticorps négatifs entre le 1^{er} juillet 2001 et le 31 décembre 2011

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

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

Na : non applicable

Le DGV VHB est pratiqué en unitaire dans les DOM depuis janvier 2005 et au CTSA depuis 2006 et a été étendu à la métropole en 2010 avec une introduction progressive entre mai et octobre. Sur les 4.9 millions de dons en ayant bénéficié jusqu'au 31 décembre 2011, 19 dons ont été retrouvés Ag HBs négatif et DGV positif. Quatorze avaient des anti-HBc et correspondaient probablement à une infection dite « occulte » et 5 étaient en fenêtre sérologique comme en a attesté le suivi sérologique. Le bilan net est donc de 1.02 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 16).

Tableau 16 : Bilan du DGV VHB de 2005 au 31 décembre 2011

	DOM (2005-2011)	CTSA (2006-2011)	FM (2010 partiel-2011)	Total
Dons testés	266 393	128 820	4 505 098 ¹	4 900 311 ¹
DGV pos AgHBs pos	190	51	310	551 (91.8%)
DGV pos AgHBs neg	4	0	15	19 ² (3.2%)
DGV neg AgHBs pos	12	0	18	30 (5%)
Total HBV Pos	206	51	343	600

¹ estimation

² Dont 14 OBI (anti-HBc pos) 5 FS (anti-HBc neg)

Le risque résiduel sur la période 2009-2011 est de 1/14 000 000 dons (IC 5% : 0 - 1/1 700 000) pour le VHC et 1/1 900 000 dons (IC 95% : 0 - 1/ 750 000) pour le VHB.

4/Activités de recherche 2012

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

L'article est soumis pour publication.

Infection multigénotypique du VHB

Nous avons montré l'existence d'infections mixtes par plusieurs géotypes du VHB chez un même sujet. La fréquence de ce phénomène dans la population des donneurs de sang a été estimée avec la trousse INNO-LiPA à 10,5% (Mercier M et al. J Clin Microbiol. 2011; 49:1154-1156). Néanmoins, dans cette première étude, l'analyse épidémiologique n'a pas permis d'identifier des facteurs de risque spécifiques chez les sujets infectés par plusieurs géotypes, étant donné les faibles effectifs étudiés. 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.

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

Enseignement universitaire

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

Enseignement médical non universitaire

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

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

- Rétro-information à InVS

Comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang InVS

6/ Liste des publications et communications relatives aux activités du CNR 2012

Publications

Pillonel J, Legrand D, Sommen C, Laperche S. Surveillance épidémiologique des donneurs de sang et risque résiduel de transmission du VIH, de l'HTLV, du VHC et du VHB par transfusion en France entre 2008 et 2010. *BEH*. 2012 ; 39-40 : 438-442

Laperche S, Servant-Delmas A, Gallian P, Pillonel J. La surveillance de la diversité des virus VIH, VHB et VHC chez les donneurs de sang français entre 2000 et 2010. 2012. *BEH*, 39-40 : 447-452

Allain JP, Candotti D; ISBT HBV Safety Collaborative Group. Hepatitis B virus in transfusion medicine: still a problem? *Biologicals*. 2012;40:180-6.

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

Servant-Delmas A, Mercier-Darty M, Ly TD, Wind F, Alloui C, Sureau C, Laperche S. Variable capacity of 13 Hepatitis B virus surface antigen assays for the detection of HBsAg mutants in blood samples. *J Clin Virol* 2012; 53 (4) : 338-345.

Servant-Delmas A, Chuteau C, Lefort C, Piquet Y, Chevaleyre S, Betbeze V, Delhoume M, Hantz S, S. Alain S, Laperche S. Two cases of transfusion-transmitted Hepatitis B virus infection in a low endemic country before implementation of HBV NAT, *Transfusion* 2013; 53 : 291-296

Vallet S, Larrat S, Laperche S, Le Guillou-Guillemette H, Legrand-Abravanel F, Bouchardeau F, Pivert A, Henquell C, Mirand A, André-Garnier E, Giordanengo V, Lagathu G, Thibault V, Scholtes C, Schvoerer E, Gaudy-Graffin C, Maylin S, Trimoulet P, Brochot E, Hantz S, Gozlan J, Roque-Afonso AM, Soussan P, Plantier JC, Charpentier C, Chevaliez S, Colson P, Mackiewicz V, Aguilera L, Rosec S, Gouriou S, Magnat N, Lunel-Fabiani F, Izopet J, Morand P, Payan C, Pawlotsky JM. Multicenter quality control of hepatitis C virus protease inhibitor resistance genotyping. *J Clin Microbiol*. 2013 sous presse

Laperche S, Francophone African Group for Research in Blood Transfusion. Multinational assessment of blood-borne virus testing and transfusion safety on the African continent. *Transfusion*. 2013 sous presse

Communications orales.

Bloch E, Shah A, Khaidarova Z, Laperche S, Lefrere JJ , van Hasselt J, Zacharias P, Murphy EL for the Anglophone Africa Transfusion Research Group A proficiency testing study of laboratories conducting transfusion screening for HIV, HCV and HBV in twelve African countries

African Society of blood transfusion Meeting, Mauritius, 11-12 Juin 2012

Laperche S

La sécurisation infectieuse de la transfusion Africaine
Congrès de la SFH, Paris, 21-23 mars 2012

Pillonel J, Legrand D, Laperche S,

Epidémiologie des donneurs de sang infectés par le VHB et le VHC et risque résiduel de transmission de ces infections par transfusion en France
71 èmes journées de l'AFEF, Montpellier, 3-6 octobre 2012

Communications affichées

Laperche S, on behalf of the Francophone African Group for Research in Blood Transfusion
Reinforcement of the transfusion safety for blood-borne viruses on African continent through a multinational study
32nd International Congress of the International Society of Blood Transfusion, Cancun, Mexique– 8-12 Juillet 2012

Chevaliez S, Challine D, Naija H, Luu T, Laperche S, Allain JP, Pawlotsky JM
Performance of a new rapid test for the detection of hepatitis B surface antigen in various patient populations
American Association for the Study of Liver Diseases Liver Meeting, Boston, USA, 9-13 Novembre 2012

7/ Programme d'activité 2013-2014

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

- La surveillance des dons ADN VHB positifs et Ag HBs négatifs faisant suite à la mise en place du dépistage génomique viral systématisé depuis 2010, permettra d'établir avec plus de précision d'une part la part du bénéfice de la mesure revenant aux infections aiguës (anti-HBc négatifs) et d'autre part la fréquence des infections B occultes (anti-HBc positives) dans la population des donneurs de sang. L'analyse moléculaire des infections aiguës mises en évidence dans ce contexte, permettra d'identifier les caractéristiques virologiques propres à ces infections et de les comparer aux infections chroniques qu'elles soient « classiques » ou « occultes ».

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

- L'étude de la diversité génétique du VHB chez les donneurs de sang sera étendue à la région polymérase du génome viral à partir de l'année 2012 de collectes de dons. Ainsi, en plus du génotype viral et des mutations décrites comme affectant l'antigénicité de l'AgHBs, la présence de mutations de résistance aux traitements anti-viraux sera caractérisée dans cette population asymptomatique et naïve de tout traitement.

- Un nouvel outil moléculaire spécifique de la région NS3 du VHC est en cours de mise en place afin de disposer d'une technique capable d'amplifier les 6 génotypes viraux en une seule réaction (Besse B et al. J Virol Methods, 2012). La mise en évidence des souches VHC porteuses de mutations de résistance aux anti-protéases, fera l'objet d'un nouvel axe de surveillance dans cette population dès 2013.

- Par ailleurs, d'un point de vue strictement épidémiologique, les facteurs de risques manquant pour certains donneurs de sang leur seront attribués par imputation multiple sur la base des caractéristiques démographiques et biologiques des donneurs pour lesquels un facteur de risque a été identifié. Cette approche sera réalisée en collaboration avec l'InVS.

2) Le virus Delta

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

3) Quantification Ag HBs

La quantification de l'Ag HBs est aujourd'hui un marqueur important dans la prise en charge thérapeutique des patients chroniquement infectés par le VHB et divers dispositifs sont désormais disponibles. Dans le cadre d'une collaboration impliquant 4 laboratoires de virologie (Biomnis, Ivry (Thoai Duong Ly), INTS, Paris (Syria Laperche, Annabelle Servant-Delmas), CH Paul Brousse, Villejuif (Anne-Marie Roque), CH Pitié-Salpêtrière, Paris (Vincent Thibault) nous étudierons comparativement la sensibilité analytique et clinique,

notamment dans leur capacité à détecter de manière équivalente la diversité virale, des réactifs de quantification de l'AgHBs disponibles sur le marché européen en 2013.

4) Evaluation du QX100 Droplet Digital PCR System (Biorad)

Le système QX100 Droplet Digital PCR system (ddPCR) est une technologie d'amplification de troisième génération permettant une quantification absolue de molécules d'ADN cibles contenues dans l'échantillon. Le mélange réactionnel est immobilisé en gouttelettes calibrées dans lesquelles la réaction d'amplification a lieu, la détection se faisant en point final grâce à la présence d'une sonde couplée à une chimie de type TaqMan.

Cette technologie sera mise à profit pour étudier deux séries d'échantillons : ceux collectés chez les donneurs ayant des profils d'hépatites B occultes pour lesquels la virémie VHB est particulièrement faible, et les donneurs dont la charge virale est en dessous de la limite de quantification de la trousse Cobas Taq Man (Roche Diagnostics) mais qui ont pu être génotypés à l'aide des outils moléculaires développés au laboratoire dont la sensibilité analytique est estimée entre 30 et 60 UI/ml ; ces échantillons représentent environ 50% des dons avec une charge virale < 6 UI/ml. Cette approche nous permettra notamment d'évaluer la véracité des résultats obtenus par la technique de quantification de l'ADN-VHB utilisée au laboratoire.

5) Infections à VHB à génotypes multiples

L'exploration des infections mixtes chez les donneurs de sang virémiques pour le VHB afin de préciser leur fréquence, leurs caractéristiques épidémiologiques et de mieux comprendre leurs modes d'acquisition se poursuivra sur un plus grand nombre de dons de sang AgHBs positifs dont les facteurs d'exposition des donneurs seront renseignés. Le recours à une technologie de séquençage à haut débit permettant l'identification de variants minoritaires à hauteur de 1% semble l'outil de choix.

Par ailleurs, la méthode développée pourra être transposée à l'étude d'autres virus tels le virus de l'hépatite C ou le virus de l'immunodéficience humaine chez les donneurs de sang.

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.

6) Incidence de l'infection par le VHC

Deux méthodes permettent aujourd'hui d'évaluer l'incidence de cette infection dans la population des donneurs de sang :

- 1- soit à partir des séroconversions observées sur des périodes consécutives de 3 ans
- 2- soit à partir des cas exclusivement virémiques

Le taux d'incidence ainsi calculé est très faible.

A l'instar du VIH, nous souhaiterions en collaboration avec le CHU de Tours, utiliser une nouvelle approche basée sur un test d'avidité (Gaudy-Graffin C, et al. *J Clin Microbiol.* **2010**;48:3281-

3287) permettant d'identifier les infections de moins et de plus de 6 mois. La limite de cette méthode tient à son absence de fiabilité chez les sujets non-virémiques. Aussi, une modélisation basée sur l'estimation du pourcentage de sujets infectés depuis moins de 6 mois et non virémiques réalisée à partir de données de la littérature, pourra permettre d'ajuster le taux obtenu en prenant en compte ce groupe de sujets qui représente environ 40% des donneurs de sang VHC positifs. Nous mettrons à profit notre collection en testant avec cette méthode les donneurs depuis 2000. De ce fait cette étude nous permettra de mieux apprécier l'évolution du taux d'incidence dans le temps, chose qu'il était difficile d'appréhender jusqu'alors en raison du faible nombre de donneurs entrant dans les 2 catégories ci-dessus citées. De plus, même si la population des donneurs de sang n'est pas superposable à la population générale, parce qu'elle présente l'avantage d'être relativement homogène et suivie exhaustivement dans le temps, les données qui seront issues de son étude fourniront de précieuses informations sur l'infection à VHC en France.

Fait à Paris, le 2 mai 2013

Syria LAPERCHE
Annabelle SERVANT-DELMAS

Coût consommables de laboratoire (compte 60)

<u>Réactifs VHB :</u>			
<i>Sérologie</i>	Nb tests	Prix	Total
AgHBs ETI MAK 4 Diasorin	100	0,74	74,00 €
Titration de l'AgHBs (EID maison)	290	0,20	58,00 €
AgHBe ETI EBK plus Diasorin	40	3,58	143,20 €
AcHBe ETI AB EBK plus Diasorin	200	3,58	716,00 €
Ac Delta ETI AB Delta K Diasorin	270	2,69	726,30 €
Monolisa Anti HBs plus BIO RAD	260	1,99	517,40 €
Sérotypage HBs HBS Ag Elitech	230	1,10	253,00 €
<i>Biologie moléculaire</i>			
Charge virale Cobas Taq Man Roche HBV IVD	320	45,37	14 518,40 €
High pure IVD	320	8,30	2 656,00 €
Génotypage	300	22,00	6 600,00 €
<u>Réactifs VHC :</u>			
Génotypage (Siemens)			
Versant HCV amplification 2.0	110	23,50	2 585,00 €
Versant HCV génotypage 2.0	110	73,78	8 115,80 €
Charge virale Cobas Taq Man Roche HCV IVD	180	93,04	16 747,20 €
High pure IVD	180	8,30	1 494,00 €
Génotypage	30	22,00	660,00 €
Sérotypage (Murex HCV serotyping, Abbott)	60	31,75	1 905,00 €
<u>Consommables : autres</u>			20 723,00 €
Total			78 492,30 €

LABORATOIRE ASSOCIE

HEPATITE DELTA

HOPITAL AVICENNE

BOBIGNY

Rapport d'activité du laboratoire associé au Centre National de Référence
des hépatites B, C et Delta pour l'infection par le virus de l'hépatite Delta (HDV)
Unité de Virologie du Service de bactériologie, virologie, hygiène
(Hôpital AVICENNE)
Année 2012

Rédigé par Emmanuel Gordien

1/ Introduction :

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

*Au sein du CNR des hépatites B, C et Delta, le laboratoire associé de l'Hôpital Avicenne – UFR SMBH, Université Paris 13 (Bobigny) a pour mission **d'étudier la problématique de l'infection par le virus de l'hépatite Delta (HDV)**. Il a pour objectifs :*

- ***d'évaluer et de développer les tests diagnostiques** nécessaires au dépistage sérologique et à la détection et quantification de l'ARN viral la prise en charge des patients infectés par ce virus et ce dans différents tissus biologiques (sang, foie, sperme, ...).*
 - ***D'organiser un contrôle national de qualité du diagnostic de l'infection HDV en sérologie et en biologie moléculaire (tous les 2 ans)***
 - ***D'assurer le typage prospectif (effectif depuis 2001) de toutes les nouvelles souches** qui circulent en France*
 - *D'assurer la gestion et la valorisation scientifique de la souchothèque CNR (collection exhaustive de plasmas ou sérums ; ARN et ADN complémentaire) de toutes ces souches.*
 - *Du fait de l'expertise technique et scientifique acquise, jouer un rôle actif de référent au niveau international dans le diagnostic (en sérologie et en biologie moléculaire), le suivi et la prise en charge de l'infection Delta.*
- **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 2012, l'activité diagnostique HDV a été marquée par :
 - (i) *Une légère augmentation (5%) du nombre de demandes de dépistage sérologique (recherches d'Anticorps (Ac) Totaux) et des Ac Delta IgM). Cependant, avec 1989 demandes de quantification de la charge virale HDV plasmatique, nous enregistrons une augmentation de plus de 10% par rapport à l'année 2011.*
 - (ii) *225 nouvelles souches virales HDV 18% de plus que l'an dernier (dont le chiffre était déjà supérieur aux 5 années précédentes) ont été caractérisées. L'origine géographique des 225 patients nouvellement dépistés en France (voir figure 1) se répartit comme suit : Afrique (53,3%), Europe de l'Est (15,6%), Asie (13%) et Europe de l'Ouest (9,8%). Cette année, la tendance d'une augmentation des souches « asiatiques » observée l'an dernier*

se confirme. Nous avons aussi constaté une légère augmentation de souches HDV chez des patients d'Europe de l'Ouest. Celle-ci est probablement en rapport avec la réception au laboratoire de référence d'échantillons de nouveaux centres (Bordeaux, Limoges et Toulouse) et de laboratoires privés (Biomnis) qui jusque-là faisaient leurs propres tests.

(iii) A propos des génotypes des souches isolées, les résultats sont les suivants : les génotypes strictement « africains » : HDV-5 (n=24), -6 (n=4), -7 (n=5) et -8 (n=3) représentent 16% des souches circulant en France et si on y rajoute les HDV-1Afr (n=113), ce taux passe à 66,4% (Figure 2). Cette donnée est importante eu égard aux performances médiocres des tests de quantification de la charge virale obtenues lors des contrôles de qualité que nous avons réalisés.

(iv) La comparaison des performances de 3 kits commerciaux de quantification de l'ARN Delta a été réalisée durant l'année 2012. La donnée majeure est l'incapacité pour 2 de ces 3 tests proposés, de quantifier de façon fiable les souches de génotypes africains (y compris les génotypes 1 Africains), soit donc plus de 60% des souches circulant en France. En effet, celles-ci sont largement sous-estimées voire non détectées pour de nombreux échantillons. Une publication de cette étude a été produite dans la revue *Clinical gastroenterology and Hepatology* Volume 11, Issue 6, Pages 734-740, June 2013.

(v) Le deuxième contrôle national de qualité (CNQ) en sérologie et en biologie moléculaire a été organisé en fin mars 2012 avec le concours financier de l'ANRS. Fait nouveau, plusieurs laboratoires étrangers (Angleterre, Allemagne, Etats-Unis, Suisse) ont participé à ce CNQ-2. L'analyse et les conclusions de ce 2^{ème} CNQ ont été tirées au cours du 1^{er} semestre 2012 et ont été présentées à différents congrès internationaux. Brièvement, de nombreuses « techniques maison existent », utilisant diverses technologies. A l'instar des kits commerciaux existants, la plupart d'entre elles sous-estiment ou ne détectent pas les souches africaines qui dans les grandes métropoles européennes, compte tenu des migrations de populations peuvent infecter 40% des patients. Une publication est en préparation.

(vi) Le LA-CNR a participé à l'évaluation d'un étalon HDV international OMS. Il s'agira d'une étape décisive dans l'harmonisation des techniques de quantification qui devront alors être évaluées pour tous les génotypes. Les résultats de cette évaluation seront disponibles courant 2013. D'ores et déjà, le LA-CNR partie intégrante d'un réseau international (Hepatitis Delta International Network, HDIN) a proposé son expertise dans la standardisation des techniques existantes. Ainsi, le premier contrôle international de qualité des différentes techniques de quantification de la charge virale delta que nous avons organisé (avril 2013) en constituera une étape décisive. Le soutien financier de l'ANRS a aussi été obtenu pour ce projet.

(vii) Le LA-CNR a réalisé la recherche du virus Delta dans les différentes fractions du liquide séminal d'un patient ayant une virémie Delta de 6,7 log copies/ml. Brièvement, nous n'avons détecté l'ARN HDV ni dans le liquide séminal (LS) ni dans la fraction finale du prélèvement spermatique. Cette absence de détection de l'ARN Delta (seuil de détection 2 log copies/ml) ne semble pas liée à un inhibiteur de la PCR. Ces résultats gagneraient à être confirmés sur un 2^{ème} prélèvement du patient. De plus la recherche de l'ARN HDV devra être réalisée dans tous les compartiments du sperme, y compris dans les spermatozoïdes. Enfin un projet de collaboration multicentrique sur plusieurs patients avec étude de la répllication des virus HBV et HDV pourrait être conduit suite à cette première expérience. (Voir rapport en annexe).

(viii) Enfin, le LA-CNR a développé plusieurs collaborations internationales effectives en

vue de caractériser la diversité génétique du HDV et de son virus auxiliaire HBV à travers le monde, Centre Afrique, Martinique, Mauritanie, Tunisie, notamment. La mise en évidence du nouveau sous-génotype HBV/D8 hautement prévalent au Niger (Abdou M. et al., J. Gen. Virol., 2010) a été aussi retrouvée en Mauritanie. Plus de 27 souches HBV/D8 mauritaniennes sont en cours de caractérisation complète. Cette nouvelle souche HBV est capable de s'associer à des souches HDV de génotypes -1 et -5. De même un nouveau sous génotype A putatif mauritanien est en cours de caractérisation complète. Plusieurs travaux et publications sont en cours.

(ix) Une étude du diagnostic de l'HDV en sérologie et en biologie moléculaire sur papier buvard a été réalisée. Ces travaux ont été présentés en congrès national et international. (Voir résumé en annexe). Une étude dans la « vraie vie » est en cours d'organisation en collaboration avec un laboratoire privé de Mauritanie. Le diagnostic de l'infection HDV sera réalisé en parallèle sur des échantillons sanguins et sur des gouttes de sang séché sur papier buvard à la fois en sérologie et en biologie moléculaire.

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

o Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

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

Frédéric Le Gal, Ingénieur, adjoint, AP-HP, 10%, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris ;

Ségoène Brichler, AHU, 10% ; APHP et Université Paris 13 ;

Wael Mansour, doctorant, CNR 80% ;

Fernando Neri Pinto : Technicien 50%

o Organigramme :

Emmanuel Gordien : Responsable 10%

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

Ségoène Brichler : Assistante spécialiste : 10%

Wael Mansour, doctorant : 50%

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

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

Les efforts pour la mise au point d'un contrôle interne dans notre technique de quantification sont sur le point d'aboutir.

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

Aussi afin d'avancer dans cette voie, après l'extraction automatisée des acides nucléiques sur l'automate M2000sp de la société Abbott, nous sommes en passe d'adapter notre

étape de RT-PCR sur l'automate M2000RT (Abbott). Ainsi les différentes étapes de la technique pourront être plus facilement standardisées à l'instar des normes des tests commerciaux.

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

o surface, plans

Le laboratoire associé au CNR ne possède pas à proprement parler de surfaces dévolues spécifiquement à l'activité CNR. Il est localisé dans le bâtiment Lavoisier au 2^{ème} étage au sein du service de Bactériologie, Virologie, Hygiène de l'Hôpital Avicenne. Les surfaces de l'ensemble du laboratoire de Virologie sont de 100 m² répartis à raison de 60 m² à l'étage et de 40 m² au 3^{ème} étage dans le laboratoire commun de Biologie Moléculaire de l'hôpital.

Depuis l'épidémie de grippe de 2009, un laboratoire L2 avait été construit au sein du laboratoire de virologie. Le projet de la construction d'un laboratoire de type L3 vient d'être validé au sein de l'APHP, et devrait être opérationnel au début du 2^{ème} trimestre 2014. Ceci entraînera une relocalisation à l'étage supérieur du Bâtiment et à cette occasion, une mise aux normes des laboratoires du LA-CNR dans la perspective de l'accréditation (N ISO 15 189).

o principaux équipements

- PSM, Etuves à CO₂, chaîne du froid : chambre froide à +4°C, congélateurs, -20°C, -40°C, -70°C
- Laveur ELISA, - Automate de sérologies virales nouvellement acquis en 2010 : Etimax (Diasorin) et Architect (Abbott)
- Extracteurs automatiques Abbott et Roche
- Thermocycleurs PCR sprint et ABI 9700, ABI 7000 et ABI 7500 fast (PCR temps réel)
- Séquenceur ABI3100 (4 capillaires)
- Séquenceur ABI 3500 (8 capillaires en cours d'acquisition)
- Lecteur de micro-array MWG.
- Laboratoire L2
- La mise en commun des équipements de biologie moléculaire de l'ensemble des services de biologie du pôle de biologie Avicenne – Jean Verdier, avec comme objectif la réalisation effective de la plate forme de biologie moléculaire du pôle.

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**

o Techniques disponibles

Techniques Sérologiques :

D'un point de vue général, le laboratoire possède les techniques sérologiques de

dépistage et de suivi des infections liées aux virus HBV, HIV, HCV, HAV, CMV, EBV, Parvovirus B19, Dengue et HTLV.

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

Techniques de Biologie Moléculaire :

La technique de **RT-PCR quantitative** plasmatique pour le virus HDV mise en place au laboratoire en 2004, est utilisée en routine depuis 2005 (Le Gal F. et al Journal of Clinical Microbiology 2005). Devant le manque récurrent de tests équivalents disponibles chez les industriels pour les laboratoires de diagnostic, nous avons vu au cours de l'année 2012 une augmentation des demandes d'examen (+10% par rapport à 2011) confirmant son intérêt majeur pour le suivi de l'infection par HDV. Il convient de noter que tous les génotypes sont également quantifiables par cette technique, à l'exception du génotype 3 « Sud Américain » pour lequel une paire d'amorces spécifiques a été définie.

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

Une étape cruciale est en passe d'être franchie pour cette technique : la mise au point d'un contrôle interne, par l'utilisation de l'ARN du bactériophage MS2. La mise au point d'une RT-PCR multiplex sera l'étape ultime (fin 2013).

La **détection qualitative de l'ARN HDV** est effectuée si le résultat de PCR quantitative est négatif pour les échantillons de patients ayant eu au préalable une détection d'ARN delta positive, ou pour confirmer la réplication virale d'un échantillon retrouvé « positif non quantifiable » par notre technique quantitative. Cette technique est une RT-PCR qui consiste à amplifier une région du génome viral (appelée R0) recouvrant la fin du gène codant la grande protéine jusqu'à la séquence du ribozyme antigénomique (Radjef et al., 2004). Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B180 (n°4118).

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

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

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

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

- En 2012, la mise en place d'un **témoin interne** de quantification permettant de valider chaque phase technique de la quantification de la charge virale HDV par la technique de RT-PCR en temps réel est encore en cours de développement et d'optimisation. Plusieurs essais non concluants ont été réalisés (2011) à l'aide de produits commerciaux disponibles ARN Simplexa® de la société Eurobio, notamment à la phase d'extraction automatisée, nécessitant des volumes trop importants de réactifs. Un nouveau candidat est actuellement à l'étude, il s'agit d'un bactériophage MS2, en collaboration avec l'équipe suisse du Dr Roland Sahli. Une validation définitive est prévue courant 2^{ème} semestre 2013.

- De plus la réalisation de la **RT-PCR « en un seul tube »** est aussi en cours. L'objectif est la simplification des différentes étapes intermédiaires en vue d'une automatisation plus poussée de la technique. Elle impose cependant le choix de nouvelles amorces consensus dans une région différente du génome du fait du problème critique de la dénaturation de l'ARN Delta, mais devant permettre de détecter l'ensemble des génotypes Delta. Des essais de RT-PCR en seul tube sont en cours et les premiers résultats seront disponibles courant 2013.

- Le diagnostic de l'infection HDV en sérologie (Ac anti HDV totaux) et en biologie moléculaire (RT-PCR qualitative et quantitative) à partir de gouttes de sang et ou plasma séchées sur papier buvard a été validé expérimentalement au sein du LA-CNR (voir résumé soumis à congrès ci-dessous). Un projet vient d'être initié dans la « vraie vie » en partenariat avec un laboratoire de Mauritanie (Nouakchott) pays de forte endémie pour l'HDV (20 à 40% des patients HBV positifs). Les échantillons de 100 patients HBV positifs sont analysés de façon prospective à la fois sur sang total, sur plasma et sur des spots de sang total et plasma séchés sur papier buvard. Les examens seront les suivants : Ac anti HDV totaux ; RT-PCR qualitative et quantitative HDV et génotypes HDV et HBV. Les résultats seront disponibles courant 2^{ème} semestre 2013.

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

- Enfin des pourparlers sont en cours avec une firme privée (Fast Track Diagnostic) pour le développement d'un kit commercial de quantification de la charge virale Delta marqué CE. Deux pistes sont en cours : l'amélioration de leur « kit candidat », pour la capacité de quantification de tous les génotypes existant ; et l'avancée sur l'automatisation de notre propre technique. Une extension de la licence de notre brevet est à l'étude avec les autorités compétentes de l'AP-HP. Un contrat de licence ou de recherche et développement sont à l'étude. Un « confidentiality agreement » est en cours de signature avec la société FTD.

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

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

Schématiquement, 3 approches sont complémentaires :

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

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

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

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

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

Pour les marqueurs sérologiques, nous conservons les échantillons reçus positifs et négatifs à -40°C pendant un an puis à -20°C le plus longtemps possible (>5 ans). Pour les marqueurs moléculaires, nous conservons les échantillons positifs et négatifs à -70°C. Enfin, une 'souchothèque' CNR-Delta est conservée -70°C pour toute nouvelle souche caractérisée génétiquement. A ce jour une collection de plus de 1500 souches a été constituée.

o Description technique ('Souchothèque' CNR-Delta)

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

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

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

o Conditions de mise à disposition de ces collections

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

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

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 trousse sont maintenant disponibles (société Ingen), et ont été évaluées au sein du laboratoire (voir infra).

- Techniques moléculaires
 - ARN delta ou ARN HDV recherche qualitative (technique RT-PCR interne au CNR)
 - ARN delta ou ARN HDV recherche quantitatif (technique RT-PCR sondes TaqMan® interne au CNR).
 - Génotypage des souches HDV par séquençage (technique interne au LA CNR)
- **Un algorithme simplifié d'utilisation de ces différentes techniques est proposé en première intention :**

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

- Recherche d'anticorps totaux anti-delta systématique chez tout patient porteur chronique de l'antigène HBs
- En cas de positivité des anticorps totaux, recherche des anticorps IgM et de l'ARN viral. Cet examen peut être facultatif en dehors d'activités de recherche clinique

Diagnostic d'une infection avec réplication virale :

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

Identification et génotypage

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

Suivi thérapeutique chez un patient traité

- RT-PCR quantitative

Depuis 2004, nous avons donc décidé au laboratoire associé au CNR B, C et Delta d'utiliser de façon exceptionnelle la détection de l'antigène delta dans l'approche du diagnostic de l'infection par ce virus. A notre sens, ce test n'a pas de pertinence dans l'approche diagnostique compte tenu du caractère fugace de ce marqueur et de la sensibilité beaucoup plus grande des techniques moléculaires et de leur inscription à la nomenclature.

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

2.2 Activités d'expertise de l'année N

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

niveau de caractérisation réalisé (typage phénotypique, génotypique ...)

La recherche d'anticorps totaux anti-HDV (1065 examens en 2012):

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

Plus simplement, la détection des anticorps totaux anti-HDV doit être faite de principe chez tous les patients porteurs de l'antigène HBs car :

- (i) l'HDV est responsable d'une maladie hépatique beaucoup plus grave ;*
- (ii) entraîne en général une inhibition de la répllication de l'HBV (Williams V et al. 2010) ;*
- (iii) et il importe d'évaluer la prévalence réelle de l'infection en France.*

La détection des immunoglobulines de la classe M (IgM anti-HDV) (103 examens en 2012)

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

La détection de l'ARN viral (1989 examens en 2012)

Nous avons appliqué la détection quantitative de l'ARN HDV à 1989 échantillons pour l'année 2012 (+10%). Cet aspect s'inscrit dans le suivi nécessaire de la mise sous traitement immuno-modulateur (interféron alpha) ou antiviral parfois associé. Ainsi, la disponibilité de la technique ouvre des perspectives de projets multicentriques en fonction des thérapeutiques proposées.

Tableau 1. : Volume d'examens réalisés

Analyses		TOTAL 2011	%	TOTAL 2012	%
Sérologies	IgG / Totaux	1014	30,57%	1065	31,00%
	IgM	99	2,98%	103	3,00%
	DEIA	43	1,30%	11	0,32%
Biologie Moléculaire	Génotypes	185	5,58%	225	6,55%
	Charges virales	1854	55,89%	1989	57,90%
	PCR qualitative Delta	122	3,68%	42	1,22%
TOTAL (n)		3317	100%	3435	100,00%

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

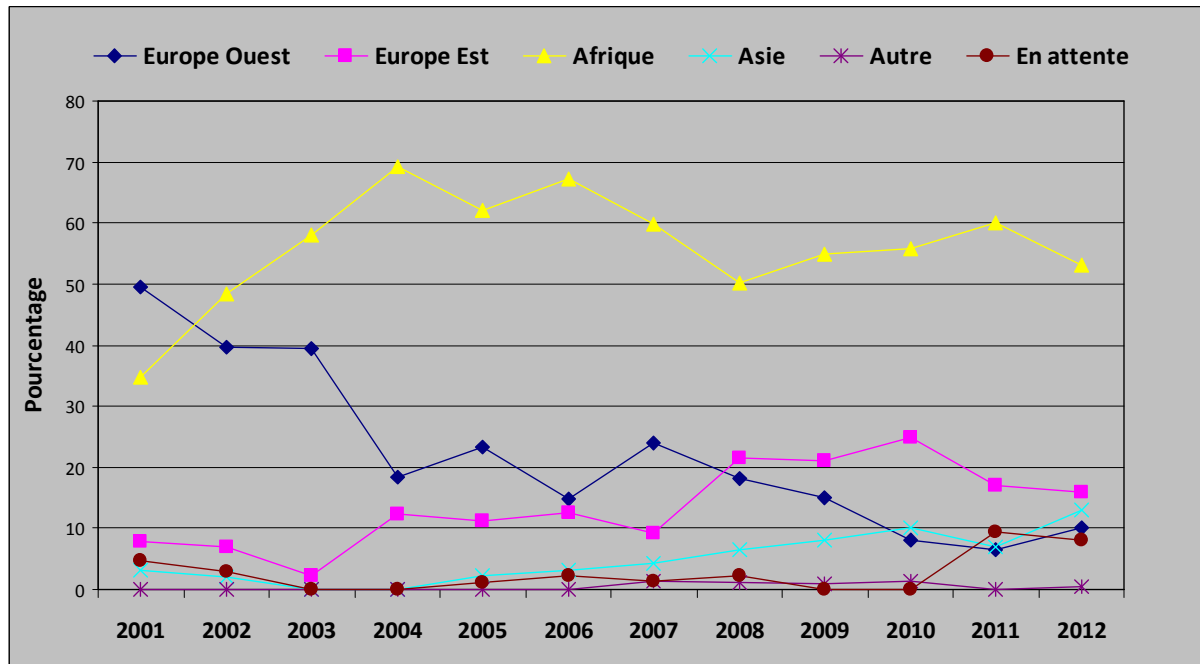
L'étude de la réplication virale des virus HBV, HCV et HDV nécessite une structure possédant un niveau de confinement de type L3. La construction d'un laboratoire de sécurité L3 au sein du laboratoire de bactériologie virologie hygiène dès le début du dernier semestre 2012, et opérationnel a priori courant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

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

*Nos analyses indiquent qu'en 2012, plus de 50% des isolats ont été caractérisés chez **des patients originaires de l'Afrique de l'Ouest et du Centre.***

Ainsi, durant cette année encore, sur les 225 échantillons répliquant l'HDV et recueillis chez des nouveaux patients infectés par l'HDV, une forte majorité provenait de patients étrangers issus de pays d'endémie (Afrique sub-saharienne et Europe de l'Est). Depuis maintenant 3 années, la proportion de patients originaires d'Europe de l'Est s'est stabilisée autour de 20%. (Figure 1 et tableau 2).

Figure 1: Origine géographique des patients infectés par l'HDV : évolution depuis 2001



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

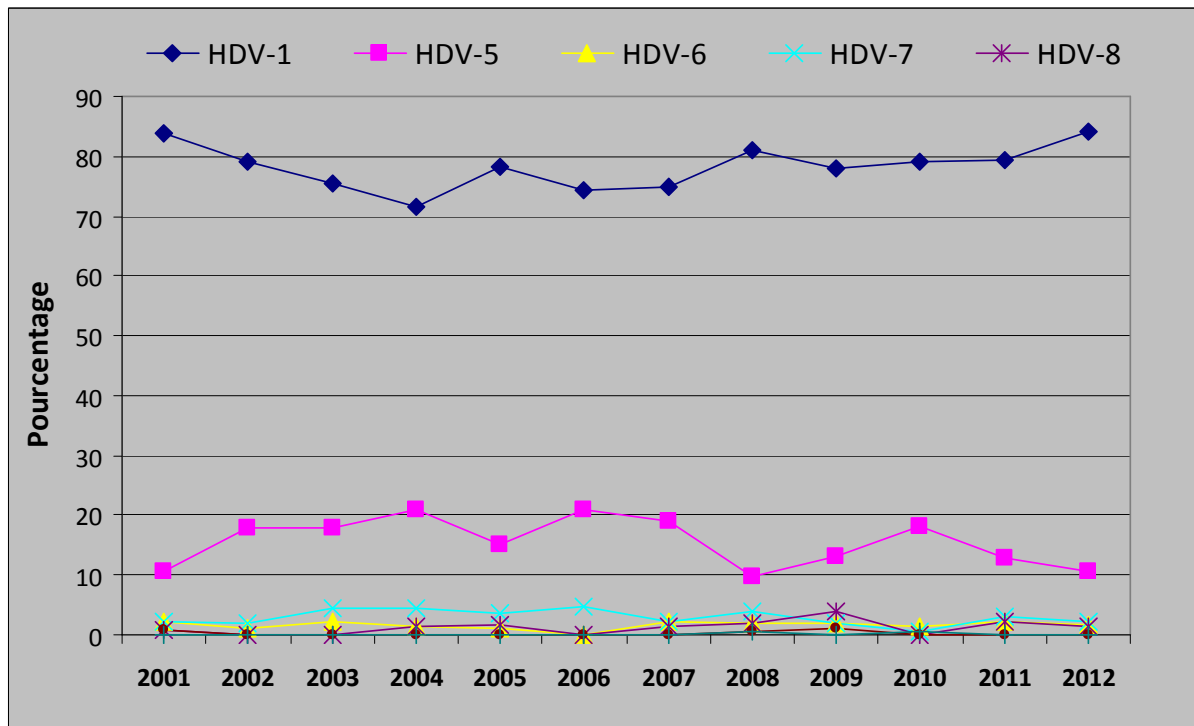
En ce qui concerne les **génotypes HDV** caractérisés au sein du CNR Delta, des isolats affiliés à 2 génotypes ont été principalement mis en évidence en France (Figure 2): Génotype 1 (HDV-1) ubiquitaire : n = 189 et L'HDV-5, africain : n = 24. Cependant nous avons pu isoler des souches de HDV-6 (n=4), HDV-7 (n=5) et de HDV-8 (n=3).

Si l'HDV-1 représente toujours la majorité des infections présentes en France, les génotypes africains HDV-5, -6, et -7 (en particulier le génotype 5) représentent plus de 15 % des souches caractérisées au laboratoire (Figure 2). Ces souches n'ont, à notre connaissance, pas encore été décrites dans d'autres pays européens. Cependant, grâce à l'amélioration des outils diagnostiques développés dans notre laboratoire, il est probable que ceux-ci puissent être mis en évidence.

Tableau 2 : Origine des patients dépistés en France en 2012

Europe Ouest = 22	<i>Espagne = 1</i>
<i>France = 19</i>	<i>Portugal = 1</i>
<i>Suisse = 1</i>	
Europe Est = 35	<i>Roumanie = 17</i>
<i>Bulgarie = 5</i>	<i>Russie = 3</i>
<i>Moldavie = 4</i>	<i>Autre = 6</i>
Afrique = 120	<i>Mali = 9</i>
<i>Burkina Fasso = 2</i>	<i>Mauritanie = 20</i>
<i>Algérie = 1</i>	<i>Niger = 1</i>
<i>Cameroun = 40</i>	<i>République de Centrafrique = 9</i>
<i>Congo Brazzaville = 1</i>	<i>République Démocratique du Congo = 1</i>
<i>Cote d'Ivoire = 9</i>	<i>Sénégal = 4</i>
<i>Egypte = 3</i>	<i>Sierra Leone = 1</i>
<i>Gabon = 3</i>	<i>Tchad = 7</i>
<i>Guinée = 5</i>	<i>Tunisie = 2</i>
	<i>Autre = 2</i>
Asie = 22	<i>Géorgie = 2</i>
<i>Arménie = 3</i>	<i>Mongolie = 8</i>
<i>Chine = 7</i>	<i>Autre = 2</i>
Moyen-Orient = 7	<i>Koweït = 1</i>
	<i>Turquie = 6</i>
Autre = 1	<i>Guadeloupe = 1</i>
Inconnu = 13	
En attente = 5	

Figure 2 : Evolution des génotypes HDV caractérisés au CNR Delta entre 2001 et 2012 (%)



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

Le nombre de résultats positifs ou douteux en anticorps anti-delta totaux représente a diminué en 2012, du fait de la conformité des échantillons. En effet, certaines trousses (Diasorin) présentent des accroches non spécifiques lorsque qu'elles sont réalisées sur plasma. .

Nous avons pu noter une stabilisation haute des demandes de charges virales HDV (+10%). Ces évolutions sont le reflet d'une augmentation de la prise en compte de l'infection HDV et de l'intérêt médical porté au test de quantification de la charge virale plasmatique HDV pour le suivi des patients. De plus, la mise en place de l'algorithme décisionnel concernant les marqueurs HDV dans la routine depuis 2004, nous a permis de mieux cibler l'infection HDV au sein du centre de référence. Il convient aussi de que suite au contrôle national de qualité réalisé, plusieurs laboratoires publics et privés ou dont les résultats étaient discordants avec ceux du LA-CNR, nous confient désormais leurs échantillons. Ainsi nous avons reçu des échantillons venant directement de l'étranger via certains de ces laboratoires (Cameroun, Côte d'Ivoire, Mauritanie, Sénégal, Tchad, Tunisie, Roumanie).

A noter que courant 2012, les Laboratoires CERBA ont acheté la licence d'utilisation du Brevet déposé par le CNR en 2001 et réalisent désormais la technique LA-CNR de quantification de la charge virale pour leurs patients. Une collaboration scientifique étroite a été mise en place avec eux pour la fourniture de tous les échantillons nouvellement positifs retrouvés, à la fois pour les patients vivant en France mais aussi sur leur cohorte de patients de l'étranger.

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 CERBA

Les Laboratoires BIOMNIS

Le laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Tunis

Certains autres laboratoires privés à l'étranger (le laboratoire Biomed24 en Mauritanie)

Certains Médecins spécialistes français et étrangers (Lyon, Suisse, Mauritanie ; Angleterre)

○ Répartition par type d'activités :

Schématiquement 2 types d'envoi :

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

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

○ Répartition géographique :

Bonne représentation en France-Nord

Sites un peu moins nombreux en France-Sud. Cependant depuis le dernier trimestre 2012, Bordeaux, Limoges et Toulouse, de même que le laboratoire Biomnis basé en Région Parisienne et à Lyon, nous envoient leurs prélèvements.

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

Des pays Africains via les laboratoires Biomnis, CERBA et le laboratoire Biomed 24 de Mauritanie

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

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

- Pour le reste du pays, la couverture est bonne. En 2012, 28 laboratoires publics et privés dont 12 en biologie moléculaire ont participé au 2^{ème} contrôle de qualité HDV réalisé par le LA-CNR. A noter comme indiqué plus haut, la participation supplémentaire de 4 laboratoires étrangers (Grèce, États Unis, Royaume Uni, Suisse). (Voir Compte rendu ci-dessous)

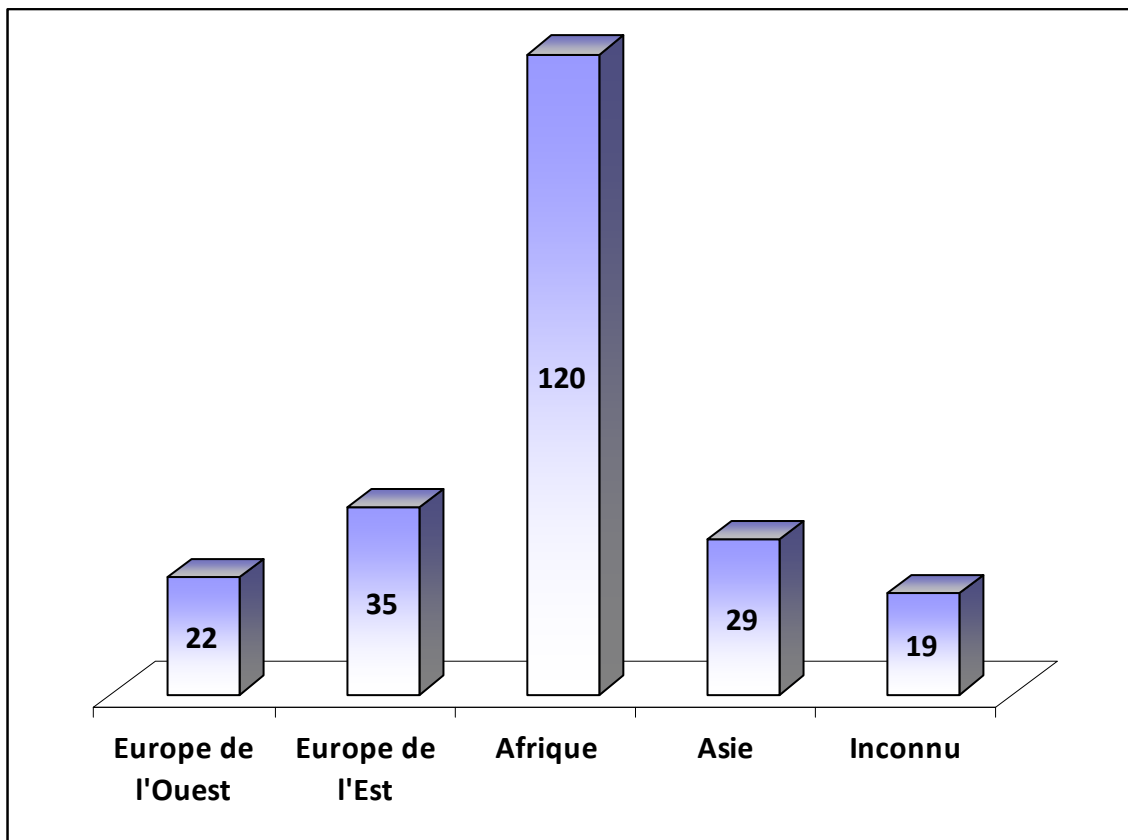
- B/ Définition de l'échantillon de souches isolées

Sur l'ensemble des 1989 échantillons quantifiés en 2012 pour l'ARN de l'HDV, 225 cas positifs correspondaient à des souches nouvellement caractérisées. Il convient aussi de noter qu'en plus de ceux-ci, 54 souches provenaient directement de patients infectés dans leur pays d'origine : Cameroun : 23 ; Mauritanie : 14, Tchad : 5, Roumanie : 4, Cote d'Ivoire : 3, Sénégal 2 et 1 souche de Tunisie, d'Egypte et de Suisse, et ce via des laboratoires privés (CERBA, Biomnis et Biomed24 de Mauritanie).

- **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 (64,2%). L'âge médian est de 44 ans pour les hommes versus 43 ans pour les femmes. L'origine géographique des patients infectés indique l'importance des isolats d'origine africaine sub-saharienne

Figure 3 : Origine des nouveaux patients infectés par HDV et caractérisés en France au sein du CNR Delta en 2012 (n = 225)



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

- *Rapports annuels depuis 2003 et mise en place du programme triennal lors de l'appel d'offres 2006-2009.*
- *Transmission en 2010 des rapports techniques et analytiques du premier contrôle national de qualité réalisé.*
- *Transmission en 2012 des rapports techniques et analytiques du deuxième contrôle national de qualité réalisé.*
- **E/ Décrire les collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines suivants : santé animale, alimentaire, environnement**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- *Le laboratoire est inclus dans des réseaux locaux (CISIH93, Groupe GERCOVIH, Réseau hépatite C Nord –Francilien) et Nationaux (HCV ANRS AC11, HIV-HBV ANRS AC11, AC33).*
- *Il entretient également des liens privilégiés pour l'étude de l'infection HDV avec le CNR National B, C et Delta et l'autre laboratoire associé du CNR dirigé par Syria Laperche. De même, des collaborations sont maintenues avec le Laboratoire de virologie moléculaire, INTS dirigé par Camille Sureau.*
- *Au niveau international, le laboratoire est en contact avec plusieurs équipes travaillant sur le HDV :*
 - *Dr Benetti – CIBIC - Argentine / Dr Dazhuang Shang (Institute of Liver Studies King's College Hospital Denmark Hill London SE5 9RSUK). Ces équipes nous ont interpellés en tant que référent international sur la variabilité HDV pour leur fournir soit des échantillons positifs de différents génotypes, soit des plasmides de quantification en vue de la mise en place du test de PCR en temps réel.*
 - *Le professeur Prof. Dr. Michael Roggendorf de l'Institut universitaire de Virologie de Duisburg –en Allemagne : pour la fourniture de séquences Delta de génotypes différents pour l'étude d'épitopes delta pouvant être incriminés dans l'échappement du virus au système immunitaire ;*
 - *Le Pr Heiner Wedemeyer du département de gastroentérologie, hépatologie et endocrinologie de Hanovre en Allemagne pour la comparaison des techniques de quantification de la charge virale Delta : mise en place en 2010 d'un contrôle de qualité interne dans la quantification de la charge virale ARN de l'HDV.*
 - *Le Dr Sahli Roland, de l'institut de microbiologie, Lausanne Suisse, pour l'amélioration des techniques de quantification de la charge virale Delta et l'évaluation de contrôles internes.*
 - *Dr Garson (Londres)*
 - *Dr Gish (USA)*
 - *Pr Triki de l'institut Pasteur de Tunisie.*
 - *Le Dr Michael Chudy (Allemagne) pour l'évaluation d'un standard HDV OMS.*
 - *Le Dr Bill Carman, de la société Fast Track Diagnostics, pour la mise au point d'un kit de quantification HDV consensus, marqué CE*

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- **A/ les objectifs de l'enquête :**

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

- **B/ les partenaires :**
- **C/ état d'avancement :**
- **D/ principaux résultats le cas échéant ou renvoi à une publication :**
 - Caractérisation de l'épidémiologie moléculaire B et delta en Turquie (article soumis): le but du travail était de caractériser les souches d'HBV et d'HDV circulant en Turquie en particulier à l'Est du pays où près de 56% de la population AgHBs positive est infectée par l'HDV. Les principaux résultats confirment en Turquie l'association « méditerranéenne » : HBV/D et HDV-1. Il est intéressant de constater que cette association est également présente en Mongolie, traduisant peut-être une épidémiologie virale superposée aux migrations de populations.
 - Suivi des charges virales plasmatiques HDV sur une cohorte en Grèce (Manesis et al Inter. Med. Press 2007)
 - En 2007, nous avons finalisé cette étude internationale avec la Grèce. Elle avait pour but de quantifier l'ARN de l'HDV chez des patients traités par interféron pégylé et Lamivudine avec le Dr Manesis. Ces mesures venaient compléter différentes mesures biologiques et concluaient à l'intérêt de la quantification combinée de l'AgHBs et de l'ARN HDV dans le suivi des patients infectés de façon chronique par HBV et HDV.
 - Epidémiologie Moléculaire de l'Hépatite B-Delta en Afrique (travaux en cours) Plusieurs coopérations ont été initiées en 2007 dans le but de caractériser les couples HBV-HDV circulant dans les pays concernés :
 - 1- La République Centre Africaine (Dr Narcisse Komas).
 - 2- 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.
 - 3- L'Algérie (Dr S. Gourari). Etude réalisée sur plus de 150 échantillons. Une publication est en préparation.
 - 4- Le Cameroun (Dr R. N Jouom, Institut Pasteur de Yaoundé) 200 échantillons
 - Epidémiologie Moléculaire de l'Hépatite B-Delta en Mauritanie : Trois publications ont été réalisées (Mansour et al., J Med Virol. 2012 Aug;84(8):1186-98 ; Mansour et al., J Clin Virol. 2012 Sep;55(1):12-6, et Lunel Fabiani et al., (sous presse).
 - Epidémiologie Moléculaire de l'Hépatite B-Delta en Martinique : une publication révisée a été resoumise (Gélu- Siméon M et al ;).
 - Comparaison des kits commerciaux de quantification de l'hépatite Delta : Brichler S et al., Clin Gastroenterol Hepatol. 2013 Jun;11(6):734-40
 - Expérience du contrôle national de qualité pour le diagnostic de l'HDV en sérologie et en biologie moléculaire. Ces travaux doivent être présentés à un congrès international courant 2013 et une publication est en préparation.
 - Caractérisation de l'épidémiologie moléculaire B et delta en Syrie (Travaux en cours) : En lien avec un doctorant Syrien (Mr W. Mansour) réalisant ces travaux aux CHU d'Avicenne (Dr. E. Gordien) et d'Angers (Pr. F Lunel-Fabiani) environ 200 échantillons provenant de patients AgHBs positif ont été collectés sur tout le territoire syrien. Ces échantillons sont en cours de rapatriement pour réaliser les différentes analyses moléculaires et sérologiques sur les virus HBV et HDV.

- **E/ la contribution du CNR**

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

Ainsi le LA-CNR a été invité en Tunisie par l'Institut Pasteur de Tunis pour l'organisation d'un symposium sur l'hépatite B et Delta en Tunisie. Le LA-CNR a accueilli une étudiante tunisienne dans le cadre de sa thèse d'université.

4. Alerte :

- **A/ décrire la procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal :**

- *La procédure d'alerte serait mise en place dans le cadre de cas groupés d'hépatites aiguës ou fulminantes survenant soit dans un contexte de facteur de risque identifié, principalement par voie parentérale chez l'adulte, soit chez des patients porteurs chroniques de l'Antigène HBs.*
- *D'autre part, l'évaluation des kits commerciaux existants ou en développement permettra ainsi que des « techniques maison » pour déterminer leur capacité à détecter ou quantifier les différentes souches circulant en France (voir circulation des souches en France dans la figure 2). Ainsi, suite au 2^{ème} contrôle de qualité réalisé, plusieurs laboratoires (publics et privés) ont décidé de confier leurs analyses au LA-CNR, qui les réalise désormais.*

- **B/ descriptif des phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année :**

Il n'y a pas eu de phénomène nécessitant un signalement d'infections HDV dans le cadre d'une procédure d'alerte.

- **C/ analyse des tendances et du fonctionnement du système :**

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

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

- **A/ Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires :**

- Cours magistraux, à la faculté de médecine de Paris 13 ; de Paris 7 et à la faculté de médecine Antilles Guyane ;

- *Staffs, conférences sur invitation, et dans les services cliniques de l'APHP et dans les sessions scientifiques organisées par des laboratoires pharmaceutiques ;*
 - *Cours dans le cadre de la formation continue, Bioforma et laboratoires privés (Biomnis Vitry et Lyon) ;*
 - *Cours à l'Institut Pasteur de Paris (Virologie systématique) ;*
 - *Stagiaire en provenance d'Algérie (Dr. S. Gourari) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Algérie.*
 - *Stagiaire en provenance du CHU Angers (M. W. Mansour) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Mauritanie.*
 - *Stagiaire en provenance du Burundi : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant au Burundi (G. Ciza);*
 - *Stagiaire en provenance de Centrafrique : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Centrafrique. Projet financé par l'ANRS (G. Laghoe)*
 - *Stagiaire en provenance du Cameroun : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant au Cameroun (Dr R. Njouom)*
 - *Thèse de doctorat d'université (M. F. Le Gal 2007) : Diversité génétique de l'HDV en Europe et en Afrique. Caractérisation et implication en virologie médicale.*
 - *Thèse de doctorat d'université (Mlle V. Williams 2008) : Inhibition de la répllication du HBV auxiliaire ; Approche des mécanismes moléculaires spécifiques de la pathogenèse hépatique.*
 - *Thèse de doctorat d'université (Mme M. Issoufou 2010) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant au Niger.*
 - *Mémoire de M2 (Mlle Erin Khan, 2010) : Implication de la NADPH Oxydase 4 dans l'Induction du Stress Oxydant par le Virus de l'Hépatite Delta ;*
 - *Thèse de doctorat d'université (Mlle S. Brichler, 2011) : Pathogenèse spécifique du virus de l'hépatite Delta.*
 - *Thèse de doctorat d'université (M. Wael Mansour) : Prévalence et diversité génétique des souches HBV et HDV circulant au Niger et en Mauritanie.*
 - *Accueil d'un stagiaire Technicien : mise au point d'un contrôle interne pour la technique de quantification de la charge virale Delta (Melle Afifaa Butt)*
 - *Accueil de stagiaire de Tunisie pour l'étude la prévalence et diversité génétique des souches HBV et HDV circulant en Tunisie.*
 - *Symposium HBV et HDV en Tunisie (mai 2012)*
- **B/ Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)**
- *Les différents mémoires de M2 ou de thèses de sciences produits au sein du CNR-Delta, servent de support scientifique et technique en interne au laboratoire dans la mise en place des études et protocoles techniques.*
 - *Toujours en interne au laboratoire, le Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA) sert à la bonne réalisation des techniques de routine destinées au diagnostic et de suivi de l'infection par HDV.*
 - *Enfin des réunions mensuelles orientées CNR Delta sont réalisées afin de diffuser et de rendre compte de l'avancement des divers travaux, à la fois au sein même du laboratoire de Virologie d'Avicenne mais également plus largement au sein de notre l'hôpital.*

- **C/ Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :**
 - o Rétro-information aux partenaires
 - o Diffusion aux professionnels : conférences, Site web
Compte-rendu annuel, publications scientifiques et didactiques
- **D/ Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...) :**
- **Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...) :**
ANAES pour la mise en place de la nomenclature pour les examens moléculaires de l'HDV

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

Pour le LA CNR des hépatites B, C et delta pour l'infection delta, les travaux de recherche ont été effectués principalement en lien avec l'unité INSERM U845 de Necker (Paris). En 2013 notre groupe va intégrer l'unité U955, équipe 18, dirigée par Jean Michel Pawlotsky (Créteil).

Pour chacun de ces travaux, décrire :

- **les objectifs,**
- **les partenariats et l'apport du CNR**
- **l'état d'avancement et le cas échéant les principaux résultats.**

1- Rôle des protéines delta dans la cancérogenèse : Déterminer les interactions cellulaires et les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse liée à l'infection par l'HDV ; Interactions de la grande protéine delta et de voies de signalisation cellulaires (INSERM U845 et Hôpital Avicenne, LA-CNR des hépatites B, C et delta). La grande protéine Delta, ou p27 joue un rôle majeur à la fois dans les mécanismes d'inhibition de la réplication du virus HBV auxiliaire, fréquemment retrouvée, et aussi dans la pathogenèse spécifique propre de l'HDV, notamment par la genèse d'un stress oxydant dans la cellule avec pour conséquence l'activation des facteurs de transcription STAT-3 et NF-kB. L'implication du gène de la NADPH oxydase-4 (Nox-4) a été montrée dans la genèse de ce stress oxydant. Ces travaux sont les résultats obtenus au laboratoire dans le cadre de la thèse d'université de Mlles Williams (J. Gen. Virol, 2010) et Brichtler (J Viral Hepatitis 2012).

STAT-3 et NF-kB sont retrouvés dans les promoteurs de nombreux gènes, dont le gène de la cycline D1 et le gène anti apoptotique BclXL. Des résultats préliminaires dans notre modèle in vitro nous ont montré que p27 activait les promoteurs de ces deux gènes. Ces travaux seront poursuivis afin d'établir le rôle de cette protéine de l'HDV dans la prolifération cellulaire et dans le blocage de l'apoptose, à l'origine de son action carcinogène.

- 2- *L'étude de la co-spéciation des souches B et Delta a été étudiée dans un modèle cellulaire de transfection en utilisant des plasmides codant les protéines s-AgHBS et L-HDAg de génotypes différents, permettant la formation de pseudo particules virales. Les résultats préliminaires obtenus au laboratoire dans le cadre de la thèse d'université de Mme ABDOU, ont montré une plus grande efficacité de l'association ente le génotype HBV/D avec le génotype HDV-1. En Afrique, le génotype HBV/E est majoritaire et pas moins de 5 génotypes Delta (1, 5, 6, 7 et 8) circulent. LA question posée : HBV/E enveloppe t'il avec la même efficacité les 5 génotypes Delta ? Et quelles sont les conséquences sur la pathogenèse des différents génotypes viraux ? Ces travaux bénéficieront de la disponibilité du laboratoire L3 à venir.*
- 3- *Etude de la variabilité génétique des souches HDV et HBV en Afrique (Algérie, Burundi, Cameroun, Centre Afrique, Mauritanie, Niger et tout récemment la Tunisie) en lien avec des équipes médicales et de recherche sur place. La caractérisation de sous génotypes putatifs A HBV/Am (m pour Mauritanie) de même que des souches HBV/D8 est d'ores et déjà en cours. L'étude de la variabilité génétique B et Delta en Tunisie sera initiée en lien avec l'équipe du Pr TRIKI de l'Institut Pasteur de Tunis. Les transferts de technologie sont réalisés avec ces différentes équipes (sérologie ; PCR qualitative, génotypage)*
- 4- *L'étude de la variabilité génétique de l'HDV sera abordé sous l'angle de la variabilité du site d'Editing de l'ARN Delta, phénomène essentiel à la fabrication de la grande protéine Delta, responsable de l'export de la nucléoprotéine Delta et de la liaison à la problème d'enveloppe du virus HBV auxiliaire et donc de la morphogenèse et de la propagation du virus. La conformation de cette région est différente selon les génotype 1 et 3 notamment (Casey J et al 2011). Qu'en est-il pour les autres génotypes ? Une approche sera le séquençage à haut débit de cette région d'editing pour l'ensemble des génotypes, à partir de la collection du LA-CNR.*

7- Liste des publications et communications

Publications nationales

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

Publications internationales

Brichler S., Lagathu G., Abdou Chekaraou M., Le Gal F., Edouard A., Dény P., Césaire R., Gordien E. African, Amerindian, European and Indian Hepatitis B Virus Strains Circulate in the Caribbean Island of Martinique. J Gen Virol, 2013, soumis en révision

Brichler S., Le Gal F., Butt A., Chevret S., Gordien E. 2013. Dramatic Underestimation of Hepatitis Delta Virus RNA Quantification by Commercial Real-Time RT-PCR Assays. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jan 31

Brichler S., Setshedi M., Renou C. 2013. Resolution of chronic hepatitis delta infection after five years of peginterferon-adeфовir: lessons from a case report. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013 Feb 20

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

W. Mansour, CT. Hamed, MA. Bollahi, S. Brichler, F. Le Gal, A. Ducancelle, B. Lo, E. Gordien 4, M. Rosenheim, and F. Lunel
J. Clin. Virol, 2012

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

Wael Mansour, F- Zahra Fall Malick, Ahmad Sidiya, Elkhalil Ishagh, Mariama Abdou Chekaraou, Pascal Veillon, Alexandra Ducancelle, Ségolène Brichler Frédéric Le Gal , Baidy Lo, Emmanuel Gordien and Françoise Lunel-Fabiani
J. Med Virol, 2012

Isoprenylated Large Hepatitis Delta Antigen activates STAT-3 and NF- κ B via Oxidative Stress
Virginie Williams, Ségolène Brichler, Erin Khan, Mounia Chami, Paul Dény, Dina Kremsdorf 2 and Emmanuel Gordien (*J Viral Hepatitis* 2012)

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

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

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

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

Abdou Chekaraou M, Brichler S, Mansour W, Le Gal F, Garba A, Dény P, Gordien E.
J Gen Virol. 2010 Jun;91(Pt 6):1609-20. Epub 2010 Feb 10. PubMed

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

Hepatitis Delta Virus Proteins p24 and p27 Suppress Hepatitis B Virus (HBV) Replication by Trans Repression of HBV Enhancers and by Activation of the β IFN Inducible MxA Gene (*J Gen Virol*. 2009 Nov;90(Pt 11):2759-67)

Virginie Williams, Ségolène Brichler, Nadja Radjef, Pierre Lebon, Anne Goffard, Didier Hober, Remi Fagard, Dina Kremsdorf, Paul Dény, and Emmanuel Gordien

Drugan C., Brichler S., Muntean M., Olteanu I., Carstina D., Drugan T., Gordien E., Dény P. 2008. Genotype of Hepatitis B Virus in Romanian Patients. *Applied Medical Informatics* 22(1-2):55-61

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

Dény P.

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

Communications nationales

Brichler S. Hépatite Delta : Quels tests en pratique ? 17ème journée annuelle du GemHep (Groupe français d'Etudes Moléculaires des Hépatites), Paris, 11 décembre 2012

Brichler S., Le Gal F., Butt A., Chevret S., Roulot D., Gordien E. Sous-quantification majeure de la charge virale VHD par 3 trousse commerciales utilisant le principe de PCR en temps réel. 71èmes journées scientifiques de l'Association Française d'étude du foie (AFEF), Montpellier, France, 3-6 octobre 2012

Communications internationales

Samba D., Abdou-Chekaraou M., Gina L., Brichler S., Sholtes C., Martel N., Ouavene J.O., Kay A., Hantz O., Lesbordes J.L., Trepo C., Gordien E., Zoulim F., Kommas N.P., Dény P. 2012. ANRS 12202 : Hepatitis B and Delta Hepatitis in Central African Republic (CAR): Virological reassessment of a fulminant hepatitis outbreak occurring in the mid eighties. *J Hepatol*;56: S173-4

Brichler S., Le Gal F., Butt A., Chevret S., Gordien E. Underestimation of Hepatitis delta virus RNA quantification by 3 commercial real-time RT-PCR assays. International Meeting : The Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Oxford, United Kingdom, 22-25 septembre 2012

Mansour W., Hamed C.T., Le Gal F., Alloui C., Brichler S., Lunel-Fabiani F., Gordien E. Use of

dried serum spots for serological and molecular detection of Hepatitis delta virus. International Meeting : The Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Oxford, United Kingdom, 22-25 septembre 2012

Brichler S., Le Gal F., Mansour W., Chevret S., Gordien E., Roulot D. L'infection par le virus de l'hépatite Delta en France : données épidémiologiques et virologiques sur plus de 1100 malades. 71èmes journées scientifiques de l'Association Française d'étude du foie (AFEF), Montpellier, France 3-6 octobre 2012

Brichler S., Le Gal F., Mansour W., Chevret S., Roulot D., Gordien E. 2012. Epidemiological and virological features of Hepatitis delta virus infection in a French cohort of 1122 patients. *Hepatology*;56:S39A

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

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

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

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

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

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

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

Mom V (1), Bloquel B (1), Falah N (2), Cortay J-C (2), Yu D (1), Sureau C (3), Hantz O (1), Kay A (1), Gordien E (4,5), Le Gal F(4), Lina B (2), Zoulim F (1,6), Deny P (1,4)

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

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

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

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

Results of a french national quality control for hepatitis delta virus RNA quantification

F. Le Gal, S. Brichler, M. Abdou Chekaraou, P. Deny and E. Gordien

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

High Prevalence of Hepatitis Delta Virus in Adults and Pregnant Women in Mauritania

Wael Mansour (1), Zahra Fall Malick (2), Ahmed Sidiya (3), Ishak Elkhalil (4), Mariama Abdou Chekaraou(5), Baïdy Lô (2), Alexandra Ducancelle(1), Emmanuel Gordien(5), Françoise Lunel-Fabiani(1)

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

Evaluation d'une technique d'extraction et d'amplification de l'ARN viral Delta à partir des taches de sang et de sérums séchés sur papiers buvards

W. Mansour and C.T. Hamed, E. Ahmed-Tijani, S. Amadou-Mody, F. Le Gal, E. Gordien, A. Ducancelle, M.A. Bollahi, F. Lunel-Fabiani.

Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse ; 3 & 4 Décembre 2009 ; Paris

Evolution of epidemiology and viral diversity in hepatitis delta virus infected patients in France from 2001 to 2009

Frédéric Le Gal, Mariama Abdou-Chekaraou, Sécolène Brichler, Nora Belguerma, Paul Dény, Emmanuel Gordien.

Communication affichée au congrès international de biologie moléculaire de l'HBV San Diego, septembre 2009

The Isoprenylated Large Hepatitis Delta Antigen activates STAT-3 and NF κ B via Endoplasmic Reticulum Stress and Production of Reactive Oxygen Species

Williams V., Brichler S., I. Dusanter, I. Komla-Soukha, C. Sureau, Fagard R., Dény P. and E. Gordien

Communication orale 42th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona, Spain, April 11-15, 2007

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

Williams Virginie, Brichler Sécolène, Komla Soukha Isabelle, Sureau Camille, Kremsdorf Dina, Dény Paul and Gordien Emmanuel

Communication orale au congrès international de biologie moléculaire de l'HBV Rome, septembre 2007

Conférences sur invitations

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

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

E. Gordien

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

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

E. Gordien

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

8- Programme d'activité N+1 et N+2

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

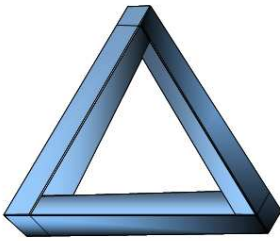
Notre activité à venir s'articule d'ores et déjà autour des 5 axes décrits ci-dessous afin de permettre la mise à disposition d'outils de diagnostic et de pronostic de l'infection HDV pour une prise en charge optimale des patients infectés

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

Emmanuel GORDIEN

31 mai 2012

ANNEXE 1



Unité de Virologie Avicenne Virus de l'Hépatite Delta

Laboratoire associé au
CNR des Hépatites B, C et Delta

Bobigny, le 20 février 2013

LABORATOIRE DE
BACTERIOLOGIE

VIROLOGIE – HYGIENE

125 RUE DE STALINGRAD 93009 BOBIGNY CEDEX
BATIMENT LAVOISIER - PORTE 17, 2EME ETAGE

RESPONSABLE :

EMMANUEL GORDIEN (MD,
PHD)

emmanuel.gordien@avc.aphp.fr

☎ : 01 48 95 58 12

RESPONSABLE ADJOINT :

FREDERIC LE GAL (PhD)

frederic.legal@avc.aphp.fr

☎ : 01 48 95 56 11

SÉGOLÈNE BRICHLER (PHARMD, PHD)

segolene.brichler@avc.aphp.fr

☎ : 01 48 95 75 96

WAEI MANSOUR (MD, PHD)

wael.mansour@avc.aphp.fr

☎ : 01 48 95 56 11

FERNANDO NERI PINTO (TECHNICIEN)

fernando.neri-pinto@avc.aphp.fr

☎ : 01 48 95 56 11

SECRETARIAT :

KHALISSA BOUARGUE

bacterio.viro@avc.aphp.fr

☎ : 01 48 95 56 11

Recherche de l'ARN viral dans le sperme d'un patient infecté par le virus de l'hépatite Delta (12/02/2013)

RAPPORT

Nous avons reçu le 14 Novembre 2012, le liquide séminal (LS) et la fraction finale pour le patient « M. F. » infecté par le virus de l'hépatite Delta avec une charge virale plasmatique de l'ordre de 6.7 log copies/ml et de génotype HDV-1. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée à ce jour sur la présence de l'ARN HDV dans le liquide séminal.

L'AgHBs a été quantifié dans le sérum (8962 IU/mL), dans le LS (0.07 IU/mL- dilution au 1/5^{ème}) et dans la fraction finale (0.01 IU/mL – dilution 1/25^{ème}) par l'automate Architect (Abbott). (Seuil de positivité est de 0.05 IU/mL).

Les anticorps anti-HDV totaux étaient positifs dans le sérum et dans le liquide séminal du patient (dilué au 1/5^{ème}). Les IgM n'étaient détectés que dans le sérum.

Nous avons réalisé la première expérience avec le protocole du laboratoire de virologie du CHU de Toulouse utilisé pour la détection de l'HIV dans le sperme.

Le liquide séminal de M. F a été dilué au 1/5^{ème} (200 µl de liquide séminal +850µl de plasma HDV négatif) et la fraction finale a été diluée au 1/25^{ème} avec du PBS (Phosphate Buffered Saline). L'extraction des ARN a été réalisée sur l'extracteur M2000sp d'Abbott.

.../...

La recherche d'ARN HDV par PCR en temps réel (Le Gal *et al.*, 2005) ou par PCR qualitative HDV-R0, plus sensible (Ivaniushina *et al.* 2001), s'est révélée négative dans le LS et dans la fraction finale.

Une deuxième expérience avec une extraction de 300µl de LS non dilué avec l'extracteur Maxwell a été réalisée. La recherche d'ARN Delta s'est aussi révélée négative.

Afin d'éliminer l'existence d'inhibiteurs de PCR dans le LS, nous avons réalisé plusieurs dilutions du LS provenant de personnes saines (non infectées par l'HDV) avec un plasma HDV positif (charge virale HDV = 6 log copies/ml). Des dilutions au 1/2, 1/10, 1/20, 1/200, 1/500, 1/1000 ont été effectuées. Les valeurs de charges virales attendues ont été obtenues pour chacune des dilutions.

Nous avons testé l'échantillon de LS de M. F. à des dilutions au 1/10 et 1/20, l'ARN Delta était indétectable par PCR quantitative ou qualitative, de même que dans la fraction finale diluée au 1/25^{ème}.

En conclusion, nous n'avons détecté l'ARN HDV ni dans le LS ni dans la fraction finale du prélèvement spermatique de M. F. ayant pourtant une virémie Delta de 6,7 log copies/ml. De plus cette absence de détection de l'ARN Delta (seuil de détection 2 log copies/ml) ne semble pas liée à un inhibiteur de la PCR.

Cette étude est la première réalisée dans ce domaine et pour un seul patient chez un patient infecté par une souche de génotype 1. Ces résultats sont donc à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons. Cependant, en l'attente de ces résultats sur une plus grande cohorte, il convient tout de même de considérer le sperme de tout patient atteint d'une hépatite Delta chronique comme un liquide biologique à risque de contamination virale pour l'HBV et aussi potentiellement pour l'HDV.

Perspectives :

Ce travail gagnerait à être effectué sur un 2^{ème} prélèvement du patient pour confirmer les résultats. De plus la recherche de l'ARN HDV devrait être réalisée dans tous les compartiments du sperme, y compris les spermatozoïdes.

Enfin un projet de collaboration multicentrique sur plusieurs patients avec étude de la répllication des virus HBV et HDV pourrait être conduit suite à cette première expérience.

Wael Mansour, Fernando Neri Pinto, Frédéric Le Gal, Ségolène Brichler, Emmanuel Gordien

ANNEXE 2 :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Compte Rendu du contrôle de qualité HDV 2012

Dans le cadre de son activité de laboratoire associé au centre national de référence des hépatites virales B, C et Delta (LA_CNR_BCD), l'unité de virologie du service de bactériologie, virologie – hygiène du groupe hospitalier Avicenne – Jean Verdier – René Muret Bigottini a mis en place au cours de l'année 2012 le deuxième « **contrôle national de qualité en sérologie et biologie moléculaire du diagnostic du virus de l'hépatite delta** ». A cette évaluation nationale, se sont adjoints 4 laboratoires internationaux spécialisés dans le diagnostic moléculaire de l'infection par le virus de l'Hépatite Delta (cf ci-dessous).

Ce contrôle de qualité a consisté :

- d'une part à l'**analyse sérologique** de 4 échantillons différents pour les Anticorps totaux anti-HDV (Ac_HDV) et les Anticorps IgM anti-HDV (IgM_HDV)
- d'autre part à la **détection quantitative de l'ARN-HDV plasmatique** de 12 échantillons de charge virale et génotype viral divers.

Les centres participants :

Vingt-huit (28) centres ont participé à ce 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 Pitié Salpêtrière - Service de Virologie (**Paris**) #*
- Hôpital Saint Antoine – Service de Virologie (**Paris**) #

- Institut Nationale de Transfusion Sanguine (**Paris**) #
- Hôpital Charles Nicolle - Service de Virologie (**Rouen**) #
- Hôpital Purpan - Service de Virologie (**Toulouse**) #*
- Faculté de Médecine de **Tours** #
- Hôpital de la Timone – Laboratoire de virologie (**Marseille**) #
- CHU Nantes – Laboratoire de Virologie (**Nantes**) #
- CHU Montpellier – Laboratoire de Virologie (**Montpellier**) #*
- CHU Pontchaillou – Laboratoire de Virologie (**Rennes**) #
- CHU Strasbourg – Laboratoire de Virologie (**Strasbourg**) #
- CHU Saint Etienne – Laboratoire de Virologie (**St Etienne**) #
- CHU Poitiers – Laboratoire de Virologie (**Poitiers**) #
- CHUV Lausanne (**Suisse**)*
- Clinical Microbiology-Virology UCLH NHS Foundation of London (**United Kingdom**) #*
- Laboratory Branch Division of Viral Hepatitis NCHHSTP Centers for Disease - Atlanta (**USA**)*
- Dpt of Hygiene and Epidemiology Athens University Medical School – Athens (**Grèce**)*

Parmi ceux-ci, **22** ont réalisé les tests sérologiques (#), dont **10** pour les seuls Ac_HDV totaux, et **11** ont réalisé les tests de biologie moléculaire quantitatifs (*).

Ces analyses ont été réalisées selon les techniques utilisées habituellement en routine au sein des différents centres.

Les résultats du LA CNR BCD :

Au sein du LA_CNR_BCD, chacun des échantillons envoyés composant ce contrôle de qualité avait été testé à 3 reprises afin d’obtenir une valeur cible précise et répétable. Les valeurs ainsi obtenues, avec la description des échantillons sont présentées ci-dessous :

Sérologie :

- Echantillon n°1 : **S3583 IgTotaux POS (index 0.008) IgM Douteux (index 1.10)**
- Echantillon n°2 : **S3850 IgTotaux POS (index 0.007) IgM POS (index 8.53)**

- Echantillon n°3 : S4203 IgTotaux POS (index 0.010) IgM POS faible (index 1.90)
- Echantillon n°4 : S2012 IgTotaux NEG (index 1.93) IgM NEG (index 0.14)
-

Biologie Moléculaire :

- Echantillon n°1 : BM0236 CV- HDV = 2 630 000 copies/ml (génotype HDV-7)
- Echantillon n°2 : BM0347 CV-HDV = 2 165 000 copies/ml (génotype HDV-5)
- Echantillon n°3 : BM1334 CV-HDV = 60 500 copies/ml (génotype HDV-5)
- Echantillon n°4 : BM1336 CV-HDV = 3 130 000 copies/ml (génotype HDV-1Afr)
- Echantillon n°5 : BM1340 CV-HDV = 1 240 000 copies/ml (génotype HDV-8)
- Echantillon n°6 : BM1476 CV-HDV = 120 000 copies/ml (génotype HDV-1Afr)
- Echantillon n°7 : BM1490 CV-HDV = 33 150 000 copies/ml (génotype HDV-1Afr)
- Echantillon n°8 : BM1797 CV-HDV = 16 000 copies/ml (génotype HDV-1Eur)
- Echantillon n°9 : BM1903 CV-HDV = 35 650 000 copies/ml (génotype HDV-1Eur)
- Echantillon n°10 : BM2011 CV-HDV = négative (Témoin négatif- Ag HBs Négatif)
- Echantillon n°11 : BM2124 CV-HDV = 455 000 copies/ml (génotype HDV-1Eur)
- Echantillon n°12 : BM2270 CV-HDV = 235 000 copies/ml (génotype HDV-6)

ECHANTILLONS (Log(Copies/ml))		VALEUR 1	VALEUR 2	VALEUR 3	MOYENNE	STDEVA
1	BM0236	6,49	6,36	6,40	6,42	0,07
2	BM0347	6,38	6,30	6,33	6,33	0,04
3	BM1334	4,90	4,76	4,65	4,77	0,13
4	BM1336	6,62	6,45	6,38	6,48	0,12
5	BM1340	6,22	6,12	5,88	6,07	0,17
6	BM1476	5,09	5,13	4,98	5,06	0,08
7	BM1490	7,59	7,51	7,45	7,52	0,07
8	BM1797	4,24	4,32	3,99	4,18	0,17
9	BM1903	7,61	7,56	7,48	7,55	0,07
10	BM2011	0	0	0	0	0
11	BM2124	5,80	5,58	5,55	5,64	0,14
12	BM2270	5,46	5,27	5,36	5,36	0,09

Tableau récapitulatif des 3 valeurs obtenues par le LA_CNR_BCD pour chacun des échantillons du panel de Biologie Moléculaire avec la valeur moyenne et la déviation standard.

Les résultats des centres :

L'interprétation des résultats rendus pour le panel sérologique a été réalisée comme suit :

- Interprétation biologique du résultat :

A : réponse attendue

B : réponse acceptable

C : réponse incorrecte

- Calcul du z-score au sein du groupe de pairs

A : z-score < 2

B : z-score entre 2 et 3

C : z-score > 3

Les résultats globaux :

Sérologie :

Tests utilisés :

Sérologie Anticorps totaux ou IgG :

22 participants

17 Diasorin

2 Diapro

2 Aldatis

1 inconnu

Sérologie Anticorps IgM :

13 participants

12 Diasorin

1 inconnu

Echantillon S3583

- Ig totales POSITIVES

22 réponses POS (100%)

Diasorin : ratio moyen = 0.012 ; écart-type = 0.020

Diapro : ratio moyen = 0.028 ; écart-type = 0.037 (n=2)

Aldatis : ratio moyen = 13.281 ; écart-type = 0.451 (n=2)

- IgM DOUTEUSES

2 participants ont rendu DOUTEUX, 3 ont rendu POS, 8 ont rendu NEG

Diasorin : ratio moyen = 0.919 ; écart-type = 0.38

Echantillon S3850

- Ig totales POSITIVES

22 réponses POS (100%)

Diasorin : ratio moyen = 0.012 ; écart-type = 0.018

Diapro : ratio moyen = 0.073 ; écart-type = 0.004 (n=2)

Aldatis : ratio moyen = 15.825 ; écart-type = 0.317 (n=2)

- IgM POSITIVES

13 réponses POS (100%)

Diasorin : ratio moyen = 6.513 ; écart-type = 1.665

Echantillon S4203

- Ig totales POSITIVES

22 réponses POS (100%)

Diasorin : ratio moyen = 0.014 ; écart-type = 0.02

Diapro : ratio moyen = 0.054 ; écart-type = 0.006 (n=2)

Aldatis : ratio moyen = 7.268 ; écart-type = 6.743 (n=2)

- IgM POSITIVES FAIBLES

7 participants ont rendu POS, 1 a rendu DOUTEUX, 5 ont rendu NEG

Diasorin : ratio moyen = 1.337 ; écart-type = 0.651

Echantillon S2012

- Ig totales NEGATIVES

22 réponses NEG (100%)

Diasorin : ratio moyen = 1.976 ; écart-type = 0.219

Diapro : ratio moyen = 4.672 ; écart-type = 0.322 (n=2)

Aldatis : ratio moyen = nd ; écart-type = nd (1 seule valeur exploitable)

- IgM NEGATIVES

12 réponses NEG, 1 réponse NON FAIT (acceptable car Ac totaux neg)

Diasorin : ratio moyen = 0.117 ; écart-type = 0.048

Biologie Moléculaire :

Onze (11) centres ont réalisé les analyses de biologie moléculaire.

Les 11 centres ont réalisé une **détection quantitative** de l'ARN HDV soit en utilisant la technique du LA_CNR_BCD (n=2), soit une technique « maison » propre à leur laboratoire (n=8), soit la technique commerciale LightMix de la société Roche Diagnostic (n=1).

Les résultats anonymisés et présentés ci-dessous sont exprimé en Log copies d'ARN-HDV par ml de plasma. En orange les résultats sous-estimés de plus de 1 log et en rouge sont présentés les résultats présentant un défaut majeur de quantification de l'ARN HDV.

Échantillons	Génotype HDV	LA-CNR	LAB1	LAB2	LAB3	LAB4	LAB5	LAB6	LAB7	LAB8	LAB9	LAB10	LAB11
BM0236	HDV-7	6,4	5,6	6	<2,3	5,97	6,13	<2,8	3,28	5,5	4,4	2,7	<1,6
BM0347	HDV-5	6,3	5,4	6,14	4,15	6,45	7,05	4,05	4,3	6,4	5,4	4,7	5,77
BM1334	HDV-5	4,8	4,2	4,1	<2,3	4,3	4,79	<2,8	<2,3	4	<2,3	2,6	3,7
BM1336	HDV-1Af	6,5	6,4	5,65	4,5	6,59	6,52	<2,8	<2,3	6,8	<2,3	6,5	<1,6
BM1340	HDV-8	6,1	5,6	5,96	<2,3	6,41	6,52	<2,8	4,15	6,2	5,4	3	4,92
BM1476	HDV-1Af	5,1	5,9	4,1	<2,3	4,1	6,12	3,14	<2,3	4,45	4,9	2,7	4,37
BM1490	HDV-1Af	7,5	8,1	6,58	2,4	8,4	9,01	4,18	4,98	7	7,6	2,6	7,15
BM1797	HDV-1Eu	4,2	3,95	3,21	2,6	3,87	4,39	<2,8	<2,3	4,2	<2,3	3,5	2,69
BM1903	HDV-1Eu	7,5	8	7,11	4,04	7,48	8,66	5,5	6,2	7,3	5,2	7,2	6,76
BM2011	Contrôle	<3,0	<2,7	<3,0	2,7	<3,0	<3,0	<2,8	<2,3	<2,3	<2,3	2,7	<1,6
BM2124	HDV-1Eu	5,6	6,1	4,81	<2,3	6,11	6,42	3,48	3,9	5,7	5,9	4,98	4,71
BM2270	HDV-6	5,4	6,3	4,5	<2,3	6,2	6,23	<2,8	4,9	5,4	5,3	2,54	4,88
Techniques utilisées		LA-CNR	Maison	LA-CNR	Maison	Maison	Maison	Kit commercial	Maison	LA-CNR	Maison	Maison	Maison

Conclusion :

Pour le diagnostic sérologique de l'infection par le virus de l'hépatite delta, les techniques Diasorin ont été les plus couramment utilisées. Ce contrôle de qualité a montré de très bons résultats, cohérents sur l'ensemble des centres effectuant le test de dépistage des Anticorps totaux (100% de réponses correctes). Pour les centres ayant effectué la recherche des Anticorps de type IgM, les réponses incorrectes se sont centrées uniquement sur le seul échantillon S4203 (« Positif faible ») pour lequel 5 centres sur 13 (38%) ont rendu un résultat négatif.

Pour le diagnostic en biologie moléculaire, pour lequel les centres ont majoritairement utilisé une technique « maison » propre à leur laboratoire, il est tout d'abord important de noter que 2 centres ont retrouvé une charge virale positive sur le témoin négatif (Ag HBs-). Ce contrôle de qualité « Biologie Moléculaire » a également mis en évidence pour la moitié des centres un défaut important de quantification ($> 2\log$) voire de non détection des souches de génotype non HDV-1 (souches originaires d'Afrique HDV-5, -6, -7 et -8), l'ensemble des souches des génotypes HDV-5 à HDV-8 représentant plus de 20% des souches caractérisées et circulant en France Métropolitaine.

Une harmonisation des techniques de quantification de la charge virale HDV permettant une quantification correcte des souches de tous les génotypes (HDV-1 à HDV-8) utilisées dans le cadre du suivi des patients doit absolument être mise en œuvre.

S. Brichler (PharmD, PhD)

F. Le Gal (Ingénieur, Ph.D)

E. Gordien (M.D, Ph.D)