

Rapport annuel d'activité

2017

**Centre national de référence
des Hépatites B, C et delta**

Année d'exercice

2016

Résumé analytique

Le Centre National de Référence (CNR) des Hépatites Virales B, C et delta est localisé au sein du laboratoire de Virologie de l'Hôpital Henri Mondor de Créteil. Sa direction est assurée par le Professeur Jean-Michel Pawlotsky, avec le concours du Professeur Stéphane Chevaliez. Le CNR comprend également 2 laboratoires associés, le laboratoire du Département d'étude des Agents Transmissibles par le Sang de l'Institut National de la Transfusion Sanguine, dirigé par le Dr Syria Laperche, pour la population spécifique des donneurs de sang, et le laboratoire de Virologie des hôpitaux universitaires Paris-Seine-Saint-Denis, localisé à l'hôpital Avicenne, dirigé par le Dr Emmanuel Gordien, pour les aspects concernant le virus de l'hépatite delta (VHD).

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 année de fonctionnement a été une année de collaboration accrue entre les partenaires du CNR et de mise en place de nouvelles études et de nouvelles techniques. Elle a vu en particulier : la mise en place d'études évaluant les méthodes alternatives au prélèvement veineux pour le dépistage, le diagnostic et le monitoring des infections par le VHC ou le VHB (y compris chez les patients coinfectés par le VIH) ; le démarrage du volet biologique BaroTest de la huitième vague des Baromètres Santé et la poursuite de l'enquête PREVAGAY 2015. 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 tests rapides pour la détection d'anticorps anti-HBs).

Les activités d'expertise et de surveillance du laboratoire associé aux hépatites virales en transfusion sanguine se sont poursuivies, en particulier l'évaluation des trousse de quantification de l'AgHBs afin d'évaluer leur sensibilité à quantifier les mutants de l'AgHBs, ainsi que l'évaluation du séquenceur haut débit de 3^{ème} génération MinION. La surveillance des donneurs de sang n'a pas fait apparaître de différences notables avec les années précédentes.

Le laboratoire associé du virus de l'hépatite delta a considérablement consolidé sa mission d'expertise tant au niveau national qu'international pour ce qui est de la variabilité génétique du virus et du diagnostic en biologie moléculaire, à la fois le génotypage des souches et la quantification de l'ARN plasmatique. Trois contrôles de qualité nationaux pour le diagnostic sérologique et moléculaire du VHD ont été réalisés avec une participation de la plupart des laboratoires de la France hexagonale. Par ailleurs, le premier contrôle international de qualité pour la quantification de l'ARN du VHD a été complété et mené à son terme avec la participation de nombreux centres internationaux de tous les continents exceptés l'Amérique du Sud, 28 laboratoires au total. La diffusion de l'expertise à travers la mise en place de techniques de quantification de l'ARN delta plasmatique a été poursuivie. Une trousse de quantification de l'ARN du VHD a été ainsi développée. Une deuxième trousse est en cours de développement avec pour objectif une mise à disposition pour les pays à faibles ressources. Enfin, l'analyse rétrospective des dossiers cliniques des patients infectés par le VHD suivis en France (projet Deltavir) a permis de montrer la gravité de la maladie delta avec un nombre de cas de cirrhose, de décompensation hépatique, de survenue de carcinome hépatocellulaire multiplié par respectivement 1,5, 2 et 3,5 à la fin du suivi et un risque de survenue à 10 ans de ces complications de 57,3%, 31% et 15%.

Rapport annuel d'activité

2017

**Centre national de référence
des Hépatites B, C et delta**

Année d'exercice

2016

**CNR coordonnateur
Laboratoire de Virologie
Hôpital Henri Mondor**

4. Missions et organisation du CNR

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 Professeur Stéphane Chevaliez, Directeur Adjoint.

Le CNR coordonnateur est le laboratoire de virologie du Département de Virologie, Bactériologie-Hygiène, Mycologie-Parasitologie, Unité Transversale du Traitement des Infections des hôpitaux universitaires Henri Mondor (Chef de Département : Pr Jean-Michel Pawlotsky), adossé à l'équipe de recherche "Physiopathologie et Thérapeutiques des Hépatites Virales Chroniques et des Cancers Liés" de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (INSERM U955), localisés à l'hôpital Henri Mondor de Créteil. Les 2 laboratoires associés sont le Département d'étude des Agents Transmissibles par le Sang de l'Institut National de la Transfusion Sanguine localisé à Paris 15 et le laboratoire de Virologie des hôpitaux universitaires Paris-Seine-Saint-Denis, localisé à l'hôpital d'Avicenne à Bobigny.

Le CNR, lieu d'activités médicales et scientifiques, est ouvert sur l'extérieur par le biais de multiples connexions, relations et collaborations. Ceci est en particulier le cas avec les acteurs institutionnels : Santé publique France [regroupement de l'Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé (Inpes), l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et l'Établissement de Préparation et de Réponse aux Urgences Sanitaires (Eprus) depuis le 1^{er} mai 2016], la Direction Générale de la Santé (DGS), l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM), l'Établissement Français du Sang (EFS), le Centre de Transfusion des Armées (CTSA), l'Agence de la Biomédecine (ABM), l'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS), ainsi que l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) au niveau Européen. La coopération se poursuit également avec l'ensemble des partenaires publics et privés impliqués dans la surveillance ou associés à des événements épidémiologiques dans le cadre des activités du CNR (hôpitaux, cliniques, laboratoires d'analyses de biologie médicales, laboratoires de recherche, ...).

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, avec une étroite collaboration

entre les trois laboratoires constituants. Les missions confiées au CNR sont les suivantes et sont détaillées dans l'**Annexe 1** :

- ❖ Expertise microbiologique
- ❖ Contribution à la surveillance épidémiologique
- ❖ Contribution à l'alerte
- ❖ Recherche

4. Activités d'expertise

2.1. Evolution des techniques au cours de l'année 2016

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, aujourd'hui principalement la PCR (*polymerase chain reaction*) en temps réel, la TMA (*transcription mediated-amplification*) en temps réel, l'hybridation inverse ou l'analyse de la séquence des génomes viraux par séquençage direct, clonage-séquençage ou séquençage nouvelle génération (NGS).

Techniques développées ou en développement

Le développement de méthodes diagnostiques alternatives au prélèvement sanguin pour le dépistage et le diagnostic des hépatites virales est en plein essor. C'est le cas des tests immunologiques sur bandelettes permettant la mise en évidence d'antigènes ou d'anticorps (TRODs ou tests rapides d'orientation diagnostique) ou des tests non immunologiques permettant la détection ou la quantification des acides nucléiques. Ces techniques utilisent des matrices biologiques non conventionnelles, telles que le liquide cravulaire ou le sang total capillaire, et permettent une biologie délocalisée auprès du patient ou "point of care testing" (POCT). Ces méthodes peuvent en effet être utilisées dans les cabinets médicaux, les services d'urgences, les unités de soins intensifs, les CeGIDD (Centres Gratuits d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des Infections Sexuellement

Transmissibles), les structures de prévention ou les structures associatives, voire au domicile du patient (autotest). Le papier filtre ou buvard (DBS, *dried blood spot*) permet de recueillir le sang capillaire ou veineux et de le conserver sous forme desséchée. De nombreuses analyses peuvent être envisagées à partir de ce support (moléculaires, sérologiques et pharmacologiques). Les techniques de biologie moléculaire pour la détection voire la quantification des génomes viraux (ARN du VHC ou ADN du VHB) et pour la détection des profils de résistance aux antiviraux directs à partir de sang total déposé sur buvard ont été développées au cours de l'année 2016. D'autre part, en collaboration avec le Dr Christophe Rodriguez, les tests de génotypage et de détermination des profils de résistance du VHC aux antiviraux à action directe fondés sur le séquençage haut débit ont été évaluées dans le cadre du CNR. Nous avons également développé des techniques de biologie moléculaire permettant la détermination des profils de résistance des patients en échec de traitement par AAD dans le cadre de la mise en place de l'Observatoire National de la résistance du VHC aux antiviraux directs adossé à la cohorte nationale HEPATHER (ANRS CO22).

Travaux d'évaluation des techniques (réactifs et trousses)

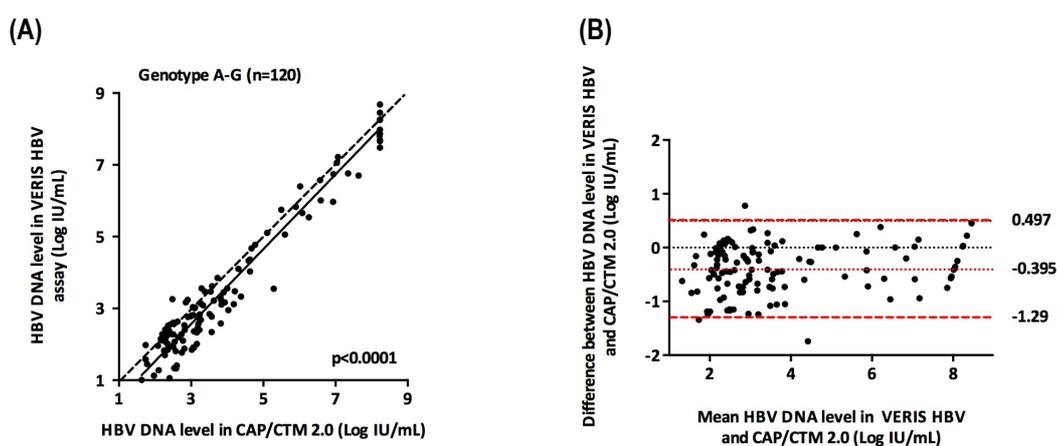
Les trousses évaluées au cours de l'année 2016 sont mentionnées dans le **Tableau 1**. Il s'agit essentiellement de techniques de biologie moléculaire pour la détection et la quantification de l'ARN du VHC et de l'ADN du VHB par PCR ou TMA en temps réel et de méthodes sérologiques pour la détection de l'AgHBs ou des anticorps anti-VHC à partir de liquide cravculaire ou de sang total capillaire ou veineux, et ce par l'intermédiaire de tests rapides (TROD).

Tableau 1 : Trousses évaluées au cours de l'année 2016

Trousse	Application	Fabricant
Abbott RealTime HCV Cobas Taqman HCV v2.0 Architect HCV Ag OraQuick HCV test First Response HCV Card	Détection-quantification de l'ARN du VHC à partir de sang total déposé sur DBS	Abbott Roche Abbott OraSure
Assure HCV MultiSure HCV	Détection des anticorps anti-VHC à l'aide de TROD	Premier Med Corp MP Diagnostics

OraQuick HCV test		OraSure
Toyo HCV		Türklab
Labmen HCV		
VERIS HBV	Détection-quantification de l'ADN du VHB	Beckman
Aptima HCV Quant Dx	Détection-quantification de l'ARN du VHC	Hologic
Aptima HBV Quant	Détection-quantification de l'ADN du VHB	Hologic

Evaluation des performances de la plate-forme DxN VERIS pour la détection et la quantification de l'ADN du VHB. Les performances intrinsèques de la plate-forme de PCR en temps réel DxN VERIS (Beckman) ont été évaluées pour la quantification de l'ADN du VHB dans un contexte clinique. La spécificité évaluée à partir de 201 échantillons plasmatiques séronégatifs pour le VHB (absence d'AgHBs et d'anticorps anti-HBc) était de 99,5%. La limite de détection estimée à 7,5 UI/mL était en accord avec celle mentionnée par le fabricant. L'ADN de 120 plasmas de patients infectés par les principaux génotypes du VHB (A-G) a été quantifié en parallèle par le test VERIS HBV et le test Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan (CAP/CTM) HBV v2.0. Une excellente relation linéaire de la quantification de l'ADN du VHB était observée (**Figure 1A**). Les valeurs de charge virale obtenues avec le test VERIS HBV étaient modérément plus faibles par rapport aux valeurs obtenues avec le test CAP/CTM HBV 2.0 (moyenne de la différence VERIS HBV moins CAP/CTM HBV 2.0 : $-0,395 \pm 0,455$ Log IU/mL, **Figure 1B**), et ce quels que soient le génotype et la valeur de la charge virale (Fourati et al., article accepté dans J Clin Virol).



Figures 1 : Corrélation des valeurs d'ADN du VHB mesurées par la plate-forme de PCR en temps réel DxN VERIS (Beckman) avec les valeurs mesurées sur les mêmes échantillons avec la plate-forme CAP/CTM (Roche) (A). Représentation de Bland-Altman (B). La zone limitée par des pointillés rouges correspond à la moyenne $\pm 1,96$ DS.

Evaluation des performances de la plate-forme Panther pour la détection et la quantification de l'ARN du VHC. Les performances intrinsèques de la plate-forme de TMA en temps réel Panther (Hologic) ont été évaluées pour la quantification de l'ARN du VHC dans un contexte clinique. La spécificité de la trousse Aptima HCV Quant Dx était de 98,6%. La limite de détection estimée à 2,3 UI/mL était en accord avec celle fournie par le fabricant. En ce qui concerne la répétabilité et la reproductibilité, les coefficients de variation étaient compris respectivement entre 0,09% et 5,61% et 1,05% et 3,65%. La quantification de l'ARN du VHC à partir de 162 échantillons collectés chez des patients infectés par différents génotypes du VHC montrait une excellente relation linéaire, et ce quelle que soit le comparateur utilisé [COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HCV v2.0 (Roche) et Abbott RealTime HCV (Abbott)]. Dans tous les cas, les dynamiques virales des patients sous traitement étaient strictement parallèles, et ce indépendamment du traitement antiviral et du génotype viral (**Figure 2**). La nouvelle trousse, Aptima HCV Quant Dx, était sensible, spécifique, reproductible et quantifiait avec exactitude l'ARN du VHC de patients infectés par différents génotypes du VHC, incluant les patients sous traitement antiviral. Cette trousse peut être utilisée en toute confiance pour détecter et quantifier l'ARN du VHC dans les essais cliniques et en pratique clinique (Chevaliez et al., J Clin Virol 2017; 91: 5-11).

Contrôle de qualité de la détection des substitutions amino acidiques conférant une diminution de sensibilité du VHC aux antiviraux directs (DAA). Dans le cadre de l'observatoire National de la résistance du VHC aux DAA, un contrôle de qualité, à destination des 5 laboratoires participant à l'Observatoire, a été réalisé. Le panel comportait 14 échantillons cliniques (1 échantillon avec un ARN du VHC <12 UI/mL, 2 échantillons sans mutations de résistance détectable, 11 échantillons avec 1, 2 ou 3 mutations, dont 1 échantillon en double) des différents génotypes du VHC (1-4) collectés chez des patients en échec de traitement. Le niveau moyen de charge virale des échantillons était de $5,7 \pm 0,3$ Log UI/mL (intervalle : 5,1-6,1). La distribution des génotypes était : G1 (n=5), G2 (n=2), G3 (n=3) et G4 (n=3). Les régions NS3, NS5A et NS5B ont été systématiquement séquencées (méthode Sanger) à partir de protocoles standardisés avec une limite de détection d'environ 15-20%. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 2**. Un des 5 laboratoires n'a pas détecté la mutation L159F de la région NS5B du CQ2, de même pour l'une des mutations de la région

NS3 (Y56H) du CQ4. Des défauts d'amplification ont été observés dans un nombre substantiel de cas : 1 laboratoire n'a pas pu amplifier la région NS3 du CQ4, de même pour la région NS5A du CQ5 et CQ6, la région NS3 du CQ7 et CQ8, les régions NS3 et NS5A du CQ9, la région NS5A des CQ11 et CQ12. Des mutations supplémentaires ont été trouvées pour certains échantillons du panel ; c'est le cas pour l'échantillon CQ5 où 3 laboratoires sur 5 ont identifié des mutations supplémentaires (positions 168 et 170) par rapport à la position 122 de la région NS3, de même pour l'échantillon CQ10 où la majorité des laboratoires ont identifié des mutations supplémentaires dans l'une ou l'autre des régions analysées (V36M dans la région NS3 pour 3 laboratoires, Q30E/K dans la région NS5A pour 4 laboratoires). Seul 1 laboratoire sur 5 a trouvé le profil de résistance correct pour l'échantillon CQ6. En effet, seul ce dernier a réussi à identifier la mutation S556G de la région NS5B, mutation conférant une diminution de sensibilité au dasabuvir. Trois laboratoires avaient une séquence trop courte pour pouvoir lire l'électrophorégramme à cette position, tandis que 2 laboratoires ne l'ont pas identifiée malgré une longueur de séquence suffisante.

Au total, cette étude a mis en évidence la nécessité d'optimiser les techniques car des régions, en particulier NS3 et NS5A, n'ont pas pu être amplifiées dans un nombre substantiel de cas.

Tableau 2 : Profils de résistance des patients en échec de traitement.

N° CQ	Génotype	Profils de résistance			Pourcentages de résultats corrects (n/N)
		NS3	NS5A	NS5B	
CQ1	3	WT	A30S, Y93H	WT	100% (5/5)
CQ2	3	WT	A30K	L159F	80% (4/5)
CQ3	2	Y56H	WT	WT	100% (5/5)
CQ4	2	Y56H, R122N, D168V	WT	WT	60% (3/5)
CQ5	1b	S122N	L31V, Y93H	WT	80% (4/5)
CQ6	1b	S122N	P58S, Y93H	S556G	20% (1/5)
CQ7	4	WT	L28V	S282T	80% (4/5)
CQ8	4	WT	L28V	S282T	80% (4/5)
CQ9	4	D168E	L28M	WT	80% (4/5)
CQ10	1a	Q80K	L31M, H58P	WT	100% (5/5)
CQ11	1a	R155K	K24Q, M28T, Q30K	WT	80% (4/5)
CQ12	1b	WT	WT	WT	80% (4/5)
CQ13	-		ARN du VHC <12 UI/mL		100% (5/5)
CQ14	3a	WT	WT	WT	100% (5/5)

WT (*wild type*) : sauvage

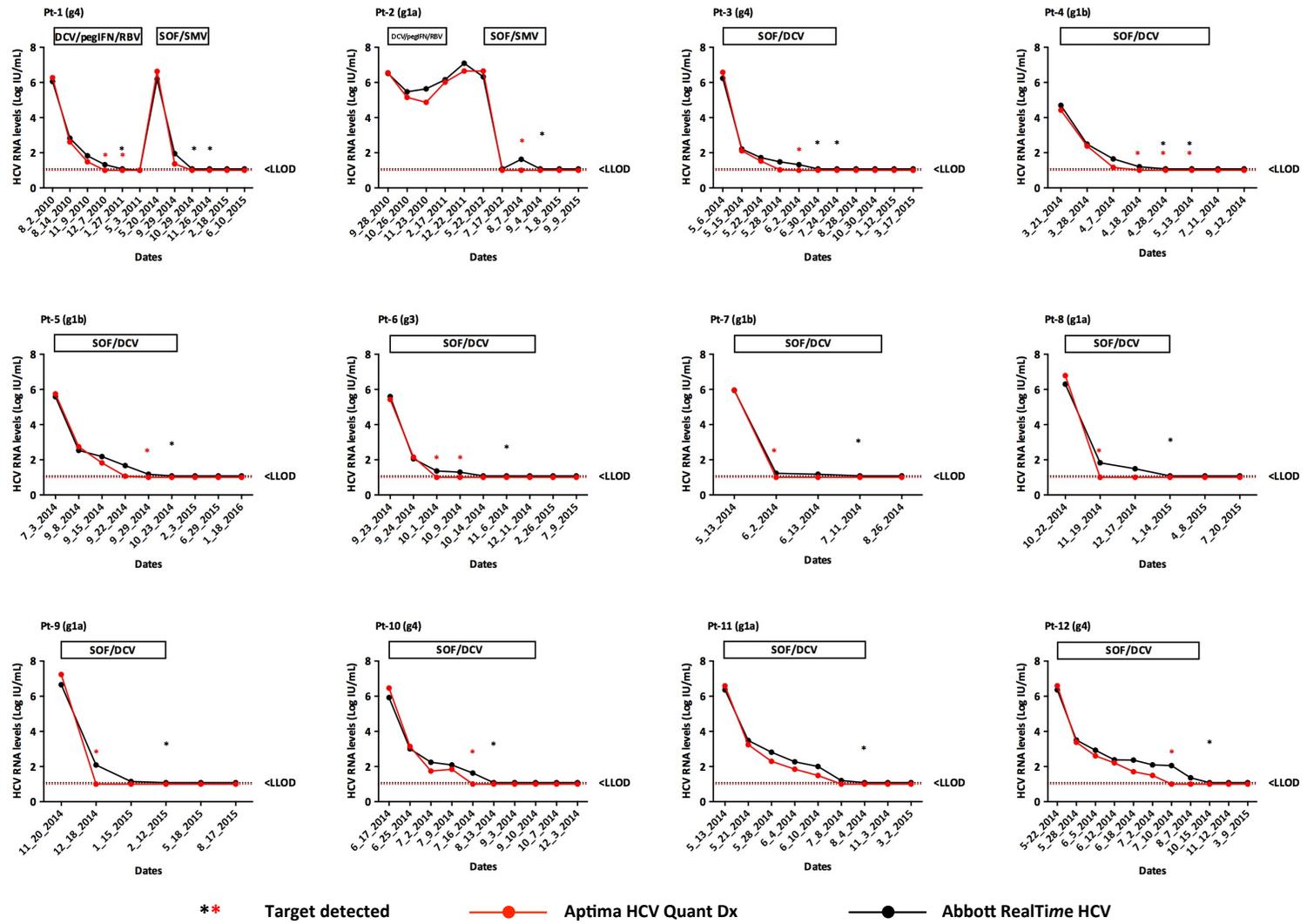


Figure 2 : Dynamiques virales des 12 patients sous traitement antiviral. Les génotypes et les traitements antiviraux sont indiqués.

Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Des techniques de biologie moléculaire permettant la détermination du génotype de résistance du VHC aux antiviraux directs des régions ciblées par les antiviraux (NS3, NS5A et NS5B) ont été transférées à cinq laboratoires au cours de l'exercice 2016.

2.1. Activité d'expertise de l'année 2016

Nombre de souches ou prélèvements réceptionnés

Au total, le nombre de prélèvements envoyés au CNR a été de 258. Ces prélèvements provenaient exclusivement de laboratoires hospitaliers français.

Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux antiviraux

Au cours de l'année 2016, 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 (43 demandes au total).

Au cours de l'année 2016, plusieurs recherches de mutations de résistance aux antiviraux directs (antiprotéases, anti-NS5A et anti-polymérase) utilisés dans le traitement de l'hépatite chronique C ont été réalisées par le CNR (179 demandes au total). Les trois régions (NS3, NS5A et NS5B) étaient systématiquement séquencées.

3. Activités de surveillance

Le **Tableau 3** liste l'ensemble des études ou enquêtes ayant contribué à la surveillance épidémiologique auquel le CNR coordonnateur a participé au cours de l'année 2016.

Tableau 3 : Liste des études ou enquêtes réalisées au cours de l'année 2016

Etude ou enquête	Objectif principal
Prevagay 2015	Séroprévalence du VIH et des hépatites B et C auprès des HSH fréquentant les lieux de convivialité
BaroTest	Enquête nationale de dépistage des hépatites B et C et du VIH par auto-prélèvement à domicile
Afrobaromètre Santé	Prévalence des hépatites B et C et du VIH auprès des populations africaine et caribéenne d'Ile-de-France
Résistance VHB	Prévalence de la résistance primaire aux analogues nucléos(t)idiques
Résistance VHC	Incidence de la résistance du VHC aux antiviraux directs dans le cadre de la cohorte HEPATHER CO22

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

Estimation de la séroprévalence de l'hépatite B et C au sein de l'enquête PREVAGAY

2015. L'étude Prevagay était une enquête transversale anonyme réalisée chez les homosexuels masculins fréquentant les établissements de convivialité gays avec 2 volets (volet biologique et comportemental). Soixante établissements (lieux avec sexe et sans sexe) au total ont participé à l'enquête à Paris et dans 4 grandes villes métropolitaines (Montpellier, Lyon, Nice et Lille). L'enquête s'est déroulée de septembre à décembre 2015. Parmi les 5 324 HSH abordés, 2 658 (50% d'acceptation) ont participé à l'étude avec la répartition suivante : 328 HSH à Nice, 267 à Montpellier, 485 à Lyon, 486 à Lille et 1092 à Paris. L'âge médian des participants était de 41 ans, et étaient majoritairement (83%) nés en France. La prévalence globale du VIH était de 14,3% avec la répartition suivante : 7,6% à Lille, 11,4% à Lyon, 16,9% à Montpellier, 17,1% à Nice et 16,0% à Paris (données pondérées selon la méthode généralisée des poids de sondage selon le poids de la structure, le poids individuel et le nombre de fréquentation des établissements). Parmi les séropositifs pour le VIH, 92% connaissaient leur statut sérologique. La grande majorité (93%) des patients séropositifs bénéficiaient d'un traitement antirétroviral et la moitié avait une infection VIH contrôlée (CV indétectable sans antécédent d'IST au cours des 12 derniers mois). Au total, 2 661 DBS étaient disponibles pour le dépistage des hépatites B et C. Les données présentées ci-après sont des données préliminaires car non pondérées. Avec un seuil d'interprétation de 0,7, la détection des anticorps anti-VHC était positive chez 37 HSH, soit une séroprévalence globale de 1,4% (1,2% à Lille, 0,6% à Lyon, 1,5% à Montpellier, 4,3% à Nice et 0,9% à Paris). Parmi les HSH séropositifs pour le VHC, 25 (67,6%) avaient un ARN détectable. La

détermination du génotype VHC a été réalisée parmi les DBS ayant un ARN positif, seuls 14 ont pu être amplifiés au niveau de la région NS5B. L'analyse phylogénique montrait la distribution suivante : 5 HSH étaient infectés par un génotype 1a, 1 par un génotype 3a et 8 par un génotype 4d. Avec un seuil d'interprétation de 13,6, la détection de l'AgHBs était positive chez 18 HSH (confirmée chez uniquement 16/18 à l'aide de la trousse VIDAS HBsAg de chez Biomérieux), soit une séroprévalence l'AgHBs de de 0,7% (0,4% à Lille, 1,0% à Lyon, 1,5% à Montpellier, 0,3% à Nice et 0,55% à Paris).

Estimation de la prévalence de l'hépatite B et de l'hépatite C à travers le volet biologique BaroTest de la huitième vague des Baromètres Santé. Les Baromètres Santé, mis en place en 1992, sont des enquêtes aléatoires réalisées par téléphone sur les comportements et perceptions de santé. La dernière s'est déroulée de janvier à juillet 2016 auprès de plus de 20 000 personnes résidant en France métropolitaine. Les personnes sélectionnées étaient invitées à répondre à un questionnaire d'une durée de 35 minutes environ où les thèmes abordés étaient la prévention des maladies infectieuses (hygiène, gestes, barrières, vaccination), les maladies à transmission vectorielle, les comportements sexuels et préventifs, les pratiques contraceptives, le dépistage des hépatites B et C et de l'infection à VIH. Un dépistage de l'hépatite B, C et du VIH à partir d'un auto-prélèvement sanguin où le sang capillaire était déposé sur buvard a été proposé à 17 781 individus. Parmi ces derniers, 13 226 personnes ont accepté de participer au volet biologique BaroTest, et un total de 7096 buvards a été reçu au CNR. Le taux global de participation à BaroTest était de 40%. La détection des anticorps anti-VHC (\pm ARN VHC) et de l'AgHBs ont été réalisées sur 6 962 buvards. Avec un seuil d'interprétation de 0,14 (Soulie et al., J Infect Dis 2016), la détection des anticorps anti-VHC est positive chez 536 individus (7,7%), l'ARN chez uniquement 11, ce qui suggérait un nombre important de résultats faussement positifs. En effet, la majorité des buvards (518/520) avec un ratio $<0,60$ étaient négatifs quant à la détection de l'ARN viral. Parmi les 20 buvards avec un ratio $\geq 0,60$, 9 (45%) avaient un ARN détectable tandis que 11 avaient un ARN indétectable. La détection de l'AgHBs était positive chez 18 individus, soit une séroprévalence de l'AgHBs de 0,26%.

Estimation de la prévalence de l'hépatite B et C au sein de l'enquête Afrobaromètre

Santé. L'enquête Afrobaromètre était une enquête transversale anonyme réalisée chez les populations africaines et caribéennes d'Ile-de-France fréquentant les lieux communautaires (discothèques, salons de coiffure, salle des fêtes, lieux de culte et lieux de passage type gares et marchés). Cette enquête s'est déroulée du 3 mai au 6 juillet 2016 auprès de 1 285 personnes (taux d'acceptation de 31%). Les participants étaient majoritairement des hommes (62%), d'âge moyen 35,4 ans. Soixante et onze interventions ont été réalisées dont 10 en discothèque, 23 dans des salons de coiffure, 9 en salle des fêtes, 2 dans des lieux de culte et 27 dans des lieux de passage (gares et rues). Un total de 1 328 échantillons (spots de sang total déposé sur DBS) a été reçu au CNR. Les analyses virologiques ont consisté en la détection des anticorps anti-VHC et de l'AgHBs à l'aide de méthodes ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) automatisées. Avec un seuil d'interprétation de 0,14 (Soulier et al., J Infect Dis 2016), la détection des anticorps anti-VHC était positive chez 886 individus (66,7%), incluant 349 DBS avec un ratio compris entre 0,14 et 0,19, 502 DBS avec un ratio compris entre 0,20 et 0,59 et 35 DBS avec un ratio $\geq 0,60$. Ces résultats suggèrent un nombre important de résultats faussement positifs, une réévaluation du seuil d'interprétation sera donc nécessaire. En ce qui concerne la détection de l'AgHBs, 68 individus étaient AgHBs-positif, soit une séroprévalence de l'AgHBs de 5,1%.

3.2. Surveillance de la résistance aux antiviraux

Prévalence de la résistance primaire aux analogues nucléos(t)idiques. La prévalence de la résistance primaire a été évaluée chez 232 patients naïfs de traitement nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B à travers les Pôles de Référence et Réseaux Hépatites pour lesquels l'ADN du VHB était supérieur à 2,5 Log IU/mL à l'aide d'une méthode de séquençage à haut débit ultra-sensible (UDPS). Cette technique permet la détection des variants viraux minoritaires (seuil de détection d'environ 1%) qui portent substitutions amino acidiques conférant de la résistance aux analogues nucléos(t)idiques (RAS pour *resistance associated substitutions*). Les caractéristiques des patients sont présentées dans le **Tableau 4**. Plus de 1 500 000 séquences ont été analysées, soit 6251 ± 379 séquences en moyenne par échantillon. L'analyse par UDPS révélait que la variabilité de la transcriptase inverse était essentiellement localisée en dehors des domaines A, B, C, D et E du domaine de transcriptase

inverse de l'ADN polymérase (**Figure 3**). On notait la présence de 3 régions hautement variables et ce quel que soit le génotype viral ; il s'agissait des régions 121-153, 211-224 et 256-273. La variabilité de l'AgHBs était essentiellement localisée au dehors du "déterminant a" (épitope majeur de neutralisation B-dépendant) de la région MHR (*major hydrophilic region*). Parmi les 232 patients naïfs de tout traitement, 174 (75%) n'avaient pas de substitutions amino acidiques détectables (limite de détection 1%), tandis que 58 patients (25%) avaient des substitutions capables de conférer de la résistance aux analogues nucléos(t)idiques, et ce en proportion variable (1 à 100%). Toutes les positions décrites dans la littérature comme conférant de la résistance (positions 163, 169, 173, 180, 181, 184, 186, 202, 204, 236 and 250) à l'exception de la position 80 étaient concernées. L'analyse statistique montrait qu'aucun paramètre démographique, virologique ou histologique à l'exception du titre en AgHBs et du niveau de charge virale (ADN du VHB) étaient associés à la présence d'une ou plusieurs substitutions amino acidiques. En effet, le titre en AgHBs était significativement plus élevé chez les patients ayant au moins 1 substitution par rapport aux patients sans mutation détectable ($3,7 \pm 0,7$ Log UI/mL versus $3,5 \pm 0,7$ Log UI/mL ; $p=0,047$). Parallèlement, le niveau de charge virale était plus élevé chez les patients ayant au moins 2 mutations versus ceux n'ayant pas ou ayant une seule substitution ($5,4 \pm 1,8$ Log UI/mL versus $4,0 \pm 1,7$ Log UI/mL ; $p<0,001$). Le pays de naissance (Europe, Afrique du Nord et Asie ; $p<0,001$) et le génotype viral (génotypes A, B et C ; $p=0,017$) étaient significativement associés à la présence de la substitution rtI163V, alors que la coinfection par le VHD était associée à la présence de la mutation en position 181 (33% versus 5%, $p=0,044$). Parmi les patients éligibles à un traitement antiviral et ayant des RASs avant le début du traitement, 22 patients étaient éligibles à un traitement antiviral. Les schémas thérapeutiques étaient : interféron pégylé (n=3), entecavir (n=6), tenofovir (n=12, dont une combinaison avec l'emtricitabine) et lamivudine (n=1). Une réponse virologique définie par un ADN VHB indétectable 48 semaines après le début du traitement était obtenue chez la majorité des patients, tandis que 3 patients étaient perdus de vue. La présence de RASs n'avait donc pas d'impact sur la réponse au traitement.

Au total, cette étude montrait que 25% des patients avaient des mutations de résistance détectable à l'aide d'une méthode de séquençage ultra-sensible alors même qu'ils n'avaient jamais été exposés aux antiviraux. Chez les patients traités, les mutations n'avaient pas d'impact sur la réponse au traitement. Ces résultats renforcent le fait que seuls les analogues

nucléos(t)idiques avec une forte barrière à la résistance (entecavir, tenofovir) doivent être utilisés en pratique clinique, comme le recommandent les sociétés savantes internationales (Chevaliez et al., article soumis).

Tableau 4 : Caractéristiques des patients inclus

	N=232
Âge médian (année, intervalle)	40 (29-51)
Sexe masculin, n (%)	142 (61,2)
Pays de naissance, n (%)	
France	75 (33,2)
Europe	25 (11,1)
Afrique du Nord	20 (8,8)
Moyen-Orient	16 (7,1)
Asie	29 (12,8)
Afrique Sub-saharienne	61 (27,0)
Coinfection VHD, n (%)	6 (2,6)
ALAT median (U/L, intervalle)	36 (5-556)
ALAT ≥LSN, n (%)	86 (37,1)
Stade de fibrose, n (%)	18 (10,0)
F0-F1	113 (64,9)
F2	33 (19,0)
F3	10 (5,7)
F4	18 (10,3)
AgHBe-négatif, n (%)	202 (87,1)
ADN du VHB (Log UI/mL), moy±DS	4,10±1,65
Génotype VHB, n (%)	
Génotype A	84 (36,2)
Génotype B	12 (5,2)
Génotype C	18 (7,8)
Génotype D	78 (33,6)
Génotype E	39 (16,8)
Génotype G	1 (0,4)

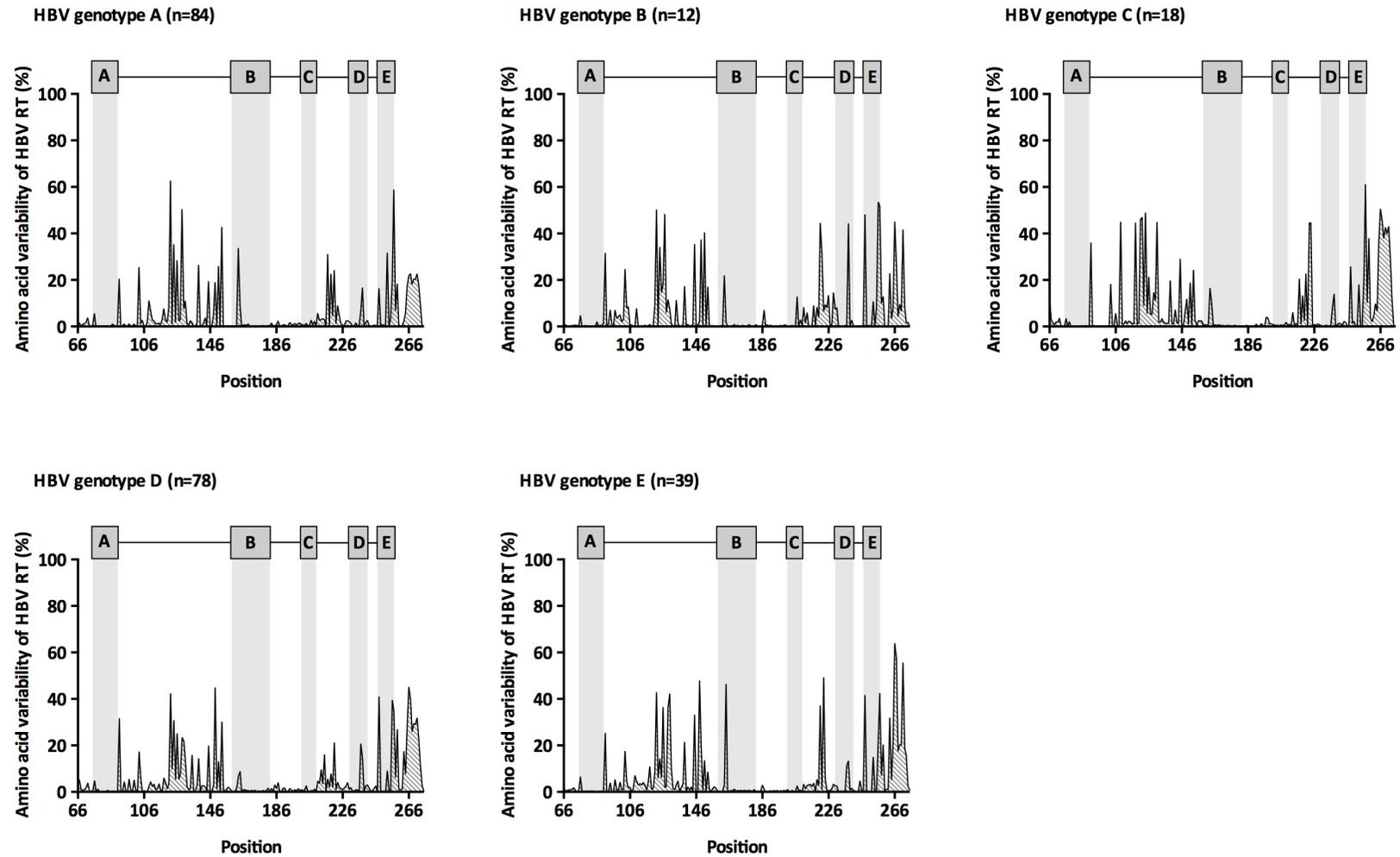


Figure 3 : Variabilité nucléotidique du domaine de transcriptase inverse (RT) de l'ADN polymérase du VHB (position : 66 à 275) pour les 232 patients naïfs de traitement infectés par un génotype A (n=84), B (n=12), C (n=18), D (n=78) et E (n=39).

3.3. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Observatoire National de la résistance du VHC aux antiviraux directs (ANRS CO22 HEPATHER). De nombreuses options thérapeutiques sont désormais disponibles pour le traitement des patients atteints d'hépatite chronique C. La France a bénéficié en 2014-2015 d'un accès compassionnel au sofosbuvir, simeprevir et au daclatasvir dans le cadre de l'ATU de cohorte. Désormais de nombreuses molécules (sofosbuvir, simeprevir, daclatasvir, ledipasvir-sofosbuvir, paritaprevir/ritonavir et ombitasvir avec ou sans dasabuvir, grazoprevir-elbasvir, sofosbuvir-velpatasvir) ont l'AMM. L'efficacité de ces antiviraux directs est élevée, avec des taux de guérison, caractérisés par un ARN viral indétectable 12 semaines après l'arrêt du traitement, supérieurs à 90%. La majorité des échecs de traitement sont des rechutes, définies par un ARN viral à nouveau positif après l'arrêt du traitement chez des patients l'ayant négativé sous traitement. Ces rechutes surviennent majoritairement dans les premières semaines suivant l'arrêt du traitement. L'analyse des populations virales des patients en échec de traitement à l'aide de méthodes de séquençage direct ("population sequencing") ou de méthodes plus sensibles de séquençage de nouvelle génération (UDPS) a montré que la majorité des patients abritait des virus résistants portant des mutations de résistance (RASs) à un ou plusieurs des antiviraux directs administrés. Le rôle de la résistance dans la non-réponse au traitement est probablement important, mais reste à évaluer. Les objectifs principaux de cet observatoire étaient de mesurer l'incidence de la résistance du VHC aux antiviraux directs, de caractériser les profils de résistance des patients en échec de traitement inclus dans HEPATHER et d'évaluer l'impact des RAS sur la réponse au retraitement. A ce jour, près de 6 000 patients ont initié un traitement incluant au moins un DAA depuis au moins 12 semaines. La majorité d'entre eux a guéri (taux de SVR4 de 93,8%). Néanmoins, 347 patients étaient en échec de traitement, soit une incidence de la résistance de 6,2%. A ce jour, les profils de résistance et l'impact des RASs sur la réponse au retraitement est disponible pour les 169 premiers patients. Ce sont majoritairement des hommes, âgés de 61 ans en moyenne, avec une maladie sévère du foie (72% avec une cirrhose compensée dans 87%) et infectés majoritairement par un génotype 1 (47%) et 3 (25%) (**Tableau 5**). Les profils génotypiques de résistance avant le retraitement étaient disponibles pour 150 patients. Comme le montre la **Figure 4**, 62% des patients abritaient des virus résistants au moment du retraitement portant une ou plusieurs RASs. La

plupart des patients avait des RASs au niveau de la région NS5A (31,3%), soient seules ou en association avec des RAS s de la région NS3 et/ou NS5B.

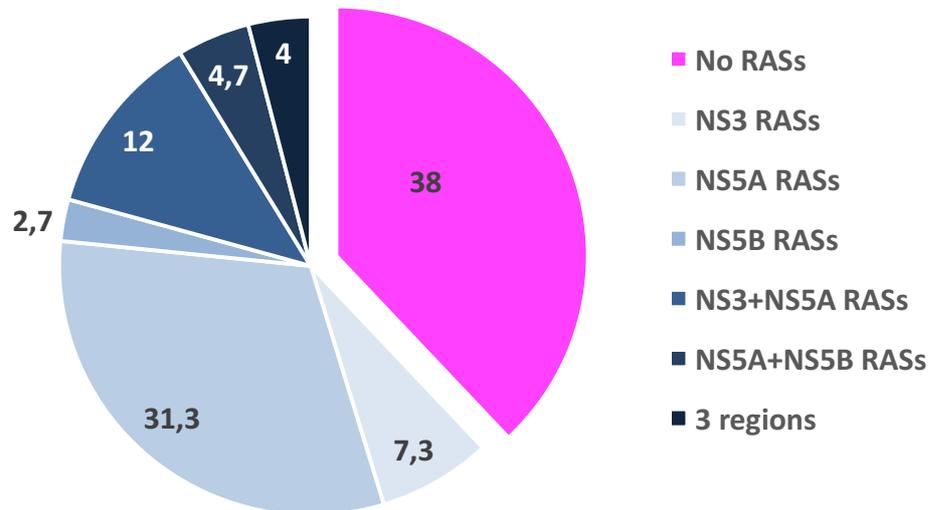


Figure 4 : Profils de résistance pour tous les génotypes (1, 2, 3, 4 et 6 ; n=150).

Au total 116 patients étaient éligibles pour un retraitement incluant 57 patients de génotype 1, 11 patients de génotype 2, 26 patients de génotype 3 et 21 patients de génotype 4. Les régimes thérapeutiques de retraitement suivaient les recommandations internationales de l'EASL (*European Association for the Study of the Liver*) et de de l'AASLD-IDSa (*American Association for the Study of Liver Diseases - Infectious Diseases Society of America*), à savoir switcher vers une classe d'antiviraux différente si possible sans résistance croisée, ajouter de la ribavirine et/ou allonger la durée de traitement. Une majorité de patients de génotype 1 (75%) avaient des RASs au moment du retraitement. Les patients de génotype 1a avec RASs répondaient moins bien au retraitement que les patients sans mutation de résistance (respectivement, taux de RSV12 de 85% versus 100%). Les RASs n'avaient aucun impact sur les patients de génotype 1b. Seulement 24% des patients de génotype 2 avaient des RASs au moment du retraitement. Ceci était à mettre en relation avec le fait que la majorité de ces patients étaient en échec de sofosbuvir et ribavirine. Aucune mutation capable de conférer une diminution de sensibilité au sofosbuvir (positions 282, 159 et 321) n'a été mise en évidence. Les RASs n'avaient aucune influence sur la

réponse au retraitement (taux de SVR12 comparable). Environ la moitié des patients de génotype 3 avaient des RASs au moment du retraitement. Comme précédemment pour le génotype 2, aucun impact des RASs sur la réponse au retraitement n'était observé. Plus de deux-tiers (70%) des patients de génotype 4 avaient des RASs au moment du retraitement. Les RASs n'avaient pas d'impact sur la réponse au retraitement avec des taux de RSV12 comparables.

Tableau 5 : Caractéristiques des patients inclus dans l'Observatoire National de la résistance aux DAA

	N=169
Âge moyen±DS (année)	61±9
Sexe masculin, n (%)	118 (70)
Fibrose sévère, n (%)	147 (91)
Cirrhose, n (%)	116 (72)
Score de Child-Pugh, n (%)	
A	73 (87)
B	8 (9)
C	3 (4)
Episode de décompensation hépatique, n	13
Génotype VHC, n (%)	
Génotype 1	80 (47)
Génotype 2	16 (9)
Génotype 3	43 (25)
Génotype 4	29 (17)
Génotype 6	1 (0,6)

Lorsque les options thérapeutiques de retraitement suivent les recommandations de l'EASL et de l'AASLD-IDSA, les RASs n'avaient pas d'impact sur la réponse au retraitement exceptés chez les patients de génotype 1a cirrhotiques (Chevaliez et al., EASL 2017).

4. Alerte

Investigation des cas isolés et groupes de transmission

L'investigation de 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. La transmission des résultats à SPF se fait via l'adresse suivante : noa-signallement@invs.sante.fr.

Transmission du VHC en hémodialyse. 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) chez le patient source et le cas index suspecté a montré que les séquences nucléotidiques présentaient des pourcentages d'homologie variables en fonction de la région considérée (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Pourcentage d'homologie nucléotidique entre le cas index suspecté (Pt-1) et le patient source (Pt-2)

Patient	% d'homologie nucléotidiques	
	E1 (551 nt)	HVR1 (81 nt)
Pt-1 (cas index suspecté)	100%	100%
Pt-2	90,4%	74,1%

En effet, les séquences de la région E1 avaient un fort pourcentage d'homologie (90,4%). Si l'on considère les séquences de la région HVR1, l'homologie nucléotidique était relativement peu importante entre les patients Pt-1 et Pt-2 (74,1%). L'étude de la région E1, fondée sur l'alignement des séquences obtenues avec 110 séquences nucléotidiques de génotype 1b, disponibles dans les banques, montrait que les souches isolées des patients 1 et 2 étaient phylogéniquement distantes (valeur de ré-échantillonnage : 31% et 26%), et plus proches de séquences prototypes incluses dans l'analyse. Lorsque l'on étudiait la région HVR1 par comparaison avec 38 séquences nucléotidiques de génotype 1b disponibles dans les banques, les souches des 2 patients (Pt-1 et Pt-2) étaient à nouveau distantes l'une de

l'autre avec une valeur de ré-échantillonnage faible au niveau du nœud (43% et 47%) (**Figure 5**).

Au total, les analyses génétiques et phylogéniques des régions NS5B, E1 et HVR1 permettaient d'estimer avec une forte probabilité que les 2 patients avaient été infectés par des souches de VHC différentes.

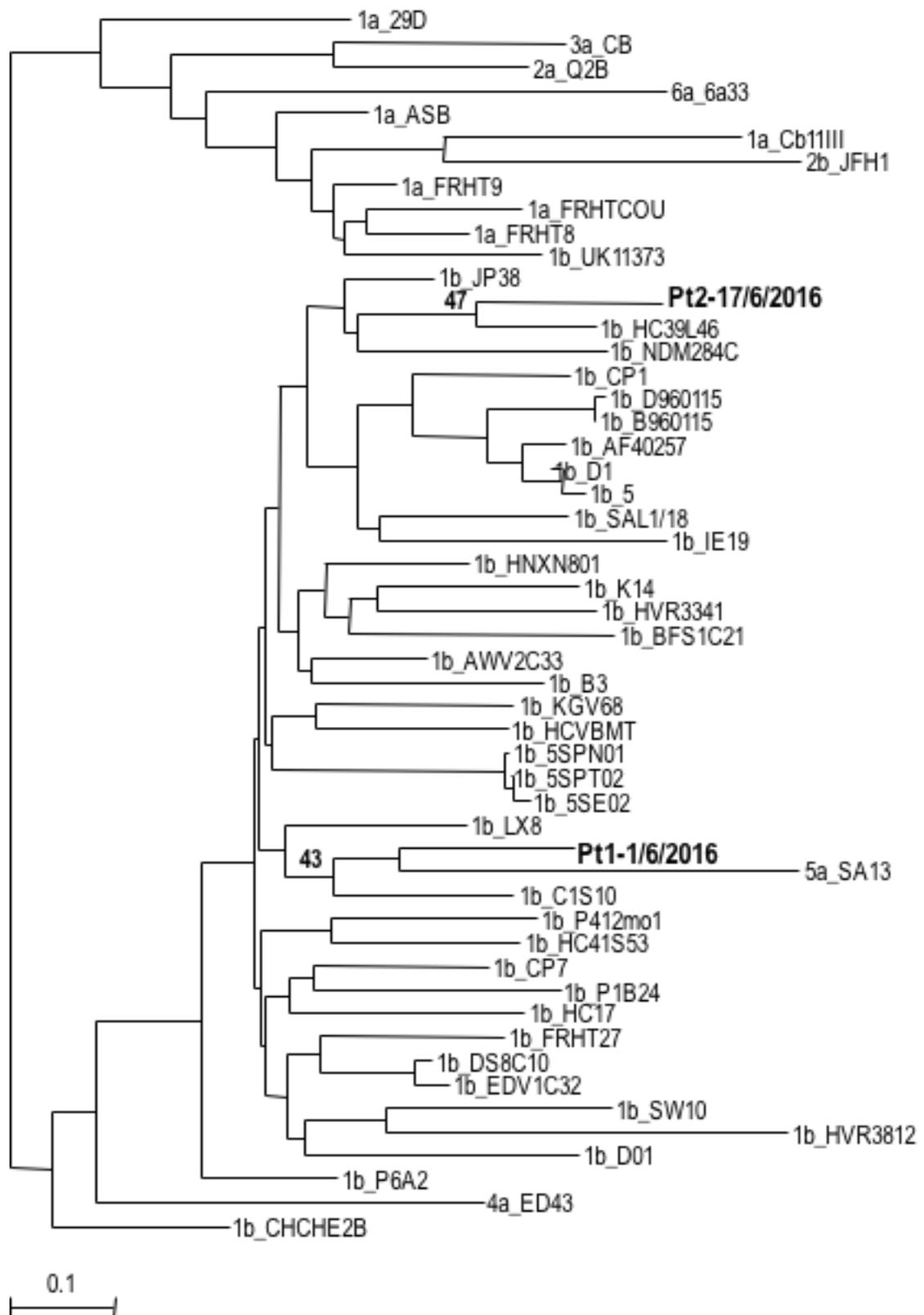


Figure 5 : Phylogénie de la région HVR1 du VHC (81 nucléotides). Analyse réalisée par DNADIST (Phylip 3.65), Kimura 2-parameter, Ts/Tv 2.0. Les chiffres indiqués au niveau des nœuds correspondent aux pourcentages de 1 000 re-échantillonnage.

Transmission intrafamiliale du VHC. 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) chez un couple a montré que les séquences nucléotidiques présentaient des pourcentages d'homologie nucléotidique de respectivement 99,8% et 97,5% pour les régions E1 et HVR1.

L'étude de la région E1, fondée sur l'alignement des séquences obtenues avec 24 séquences nucléotidiques de génotype 4, disponibles dans les banques, montrait que les souches isolées des 2 patients étaient phylogéniquement très proches, et plus proches l'une de l'autre que de chacune des autres séquences prototypes incluses dans l'analyse (valeur de ré-échantillonnage : 100%). Lorsque l'on étudiait la région HVR1 par comparaison avec 76 séquences nucléotidiques de génotype 4 disponibles dans les banques, les souches des 2 patients formaient à nouveau un groupe monophylétique avec des valeurs de ré-échantillonnage élevées au niveau du nœud (99%).

Au total, les analyses génétiques et phylogéniques des régions NS5B, E1 et HVR1 étaient concordantes et permettaient d'estimer avec une forte probabilité que les 2 patients étaient infectés par la même souche de VHC.

5. Activité d'information, de formation et de conseil

Enseignements

Enseignement à l'Institut de Formation de Technicien de Laboratoire Médical (IFTLM)

- . Cours magistraux sur les hépatites A, B, C, D, E et entérovirus (3,5 heures)
- . Cas cliniques (1,5 heures)

Enseignement à l'Institut de formation en Soins Infirmiers (IFSI) de l'hôpital Henri Mondor et de l'hôpital Emile Roux (15 heures)

- . Cours magistraux sur les microorganismes, contaminations et infections et les virus et infections dans le cadre de l'UE 2.10.S1 : (Infectiologie et Hygiène)
- . Cours magistraux sur les hépatites A, E, B, D et C et diagnostic des infections virales dans le cadre de l'UE 2.5.S3 : (Processus Inflammatoires et Infectieux)

Enseignement dans le cadre de la passerelle PACES-L3 : “Le monde des virus” (2 heures), Université Paris-Est-Créteil (UPEC).

Enseignement aux étudiants de DFGSM3 de la faculté de Médecine de Créteil (UPEC) (12 heures)

- . Cours magistraux de virologie systématique
- . Enseignements dirigés
- . Travaux pratiques

Enseignement aux étudiants de DCEM4 de la faculté de Médecine de Créteil (UPEC) (1 heure)

- . Cours magistral de virologie clinique

Enseignement dans le cadre du Master M1 Biologie-Santé dans le cadre de l’UE Interactions des agents microbiens : “Diversité virale”, Faculté de Médecine de Créteil (2 heures), UPEC.

Enseignement dans le cadre du Master M1 Biologie-Santé dans le cadre du parcours Microbiologie-Infectiologie : “Aspects moléculaires de l’infection VHC” (1,5 heures), Faculté de Médecine Paris Descartes, Universités Paris 5-Paris 7.

Enseignement dans le cadre du Master M2 de la Faculté de Pharmacie, Mention Ecologie microbienne, Pathogénie des microorganismes et Anti-infectieux : “Antiviraux directs et VHC” (3 heures), Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud.

Enseignement dans le cadre du Master M2 Sciences, technologie, santé, mention infectiologie : microbiologie, virologie, immunologie, spécialité virologie moléculaire et médicale : “Virus de l’hépatite C : virologie moléculaire, physiopathologie et diagnostic” (3 heures), Université Denis Diderot.

Enseignement dans le cadre du Diplôme Universitaire Hépatites Virales, Cytokines et Antiviraux : “Virus de l’hépatite C : virus et marqueurs (1 heure) ; Hépatite C : stratégie diagnostique et suivi virologique (0,5 heure) ; Résistance du VHC aux antiviraux directs” (1 heure), Université Paris 6.

Enseignement dans le cadre du Diplôme Universitaire Maladies Infectieuses et Foie : “Virologie du virus de l’hépatite C” (2 heures).

Enseignement dans le cadre du Diplôme d’Etudes Spécialisées (DES) de biologie médicale : “cas cliniques sur les virus d’hépatites” (4 heures), Universités Paris 5-Paris Sud.

Enseignement théorique (principes des techniques de virologie) et pratique (formation à l'utilisation des nouvelles techniques) aux techniciens du secteur de virologie.

Enseignement de la virologie aux internes et aux externes du Département de Virologie, Bactériologie - Hygiène, Mycologie – Parasitologie et Unité Transversale du Traitement des Infections.

Accueil de stagiaire

Aurélien Gibaud (France)

Activités d’expertise auprès des organismes de tutelles

Stéphane Chevaliez a les fonctions suivantes :

. Au niveau du groupe hospitalier Henri Mondor

Membre du Comité de Sécurité Transfusionnelle et d’Hémovigilance

Membre du Comité des anti-infectieux

. Au niveau de l’ANRS

Membre de l’action coordonnée N°5-24 (AC5-AC24) en charge des protocoles thérapeutiques pour les patients coinfectés par le VIH et les hépatites virales

Membre de l’AC33 “Hépatites : virologie, résistance, innovations biotechnologiques” et du groupe de virologie médicale de l’AC33

Membre du conseil scientifique de l'essai thérapeutique SOFTRIH
Membre du Conseil Scientifique Sectoriel N°7 (CSS7) sur Recherches Clinique et épidémiologique dans les hépatites virales

. Au niveau de la DGS

Membre du groupe de travail sur les TROD
Membre du Comité de suivi et de prospective du plan national de lutte contre les hépatites B et C
Membre du groupe d'expert pour l'actualisation du rapport relatif à la prise en charge des personnes infectées par le virus de l'hépatite B ou C

. Au niveau de Santé publique France

Membre du Conseil Scientifique du programme de surveillance des hépatites B et C
Membre du Conseil Scientifique de l'étude PREVAGAY 2015

. Au niveau de l'ARS Ile-de-France

Membre du groupe de travail sur le parcours de soins du patient infecté par le VHC

Jean-Michel Pawlotsky a les fonctions suivantes :

. Au niveau de l'ANRS

Président de l'AC33 "Hépatites : virologie, résistance, innovations biotechnologiques"
Président du Conseil Scientifique Sectoriel N°4 (CSS4) sur Recherches fondamentale dans les hépatites virales

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

3.1. Activité 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 des performances intrinsèques, 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 à large spectre et aux mécanismes des lésions hépatiques associées ou non à l'infection par le VHC, à l'aide de modèles murins et transgéniques et de modèles cellulaires.

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 ou TMA en temps réel, l'hybridation inverse ou l'analyse de la séquence des génomes viraux par séquençage direct, clonage-séquençage ou séquençage à haut débit. L'expertise du laboratoire coordonnateur en matière de diagnostic virologique des hépatites virales est reconnue nationalement et internationalement, comme en témoignent les nombreux articles originaux et de revue publiés sur le sujet depuis de très 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 ou TMA 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, séquençage à haut débit). Ces travaux ont donné lieu à de nombreuses publications. Les réalisations dans ce domaine sont détaillées dans le bilan des activités du CNR sur la période 2012-2016.

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 séquençage 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 ont été présentées dans le bilan d'activité.

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. L'effet des antiviraux à action directe ciblant l'une des 3 régions du génome viral du VHC (NS3, NS5A ou NS5B) 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. L'équipe développe des techniques de séquençage direct ("population sequencing") et à haut débit (NGS) 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 comme 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. Elle combine un certain nombre de modèles enzymatiques acellulaires et de modèles cellulaires de réplication et d'infection permettant la caractérisation de la résistance conférée par les substitutions amino acidiques observées chez les malades, ainsi que l'étude du fitness des variants résistants. En ce qui concerne l'étude phénotypique de la résistance du VHC aux antiviraux directs, des modèles de réplicons subgénomiques pour la plupart des génotypes du VHC ont été développés. Le système réplicon est fondé sur une construction chimérique bicistronique organisée de la manière suivante : un domaine comprenant l'extrémité 5' non codante du VHC, incluant l'IRES, le gène de résistance à la néomycine et un gène rapporteur luciférase et un deuxième domaine comprenant l'IRES du virus EMCV (*encephalomyocarditis virus*) qui dirige la traduction des protéines non structurales du VHC ; la construction se termine avec l'extrémité 3' non codante du génome viral. Les réplicons sous-génomiques sont dépourvus des séquences codant les protéines structurales, p7 et NS2 qui ne sont pas nécessaires à leur réplication. Des substitutions amino acidiques candidates sont introduites par mutagenèse dirigée sur un (ou plusieurs) plasmide(s) et l'analyse phénotypique est réalisée sur des réplicons transitoires (réplicon de sous-type 1b et 2a) ou des réplicons « stabilisés » (réplicons de génotype 3, 4 ou 5) dans des lignées d'hépatomes humains Huh-7.5. Après

mutagénèse dirigée et linéarisation du (ou des) plasmide(s), celui-ci (ceux-ci) est (sont) transcrit(s) *in vitro* via une ARN polymérase T7. L'ARN du réplicon sous-génomique ainsi généré est transfecté dans des lignées d'hépatomes humains Huh-7.5. Après stabilisation (pour les génotypes 3, 4 ou 5), les tests phénotypiques sont effectués en présence de concentrations croissantes des antiviraux étudiés. L'inhibition de la réplication virale est évaluée par la mesure de l'activité luciférase en présence de différents antiviraux. Le niveau de résistance des différents mutants est mesuré par l'étude de la concentration efficace 50 (CE50) et la concentration efficace 90 (CE90), qui correspondent aux concentrations de l'antiviral permettant d'inhiber la réplication virale respectivement de 50% et de 90%. En ce qui concerne l'étude phénotypique de la résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques, le CNR a développé son propre système *in vitro* de réplication du VHB. Le système cellulaire est dérivé des cellules Huh7 et permet la caractérisation de la résistance conférée par les substitutions amino acidiques *in vivo* chez les patients en échec, ainsi que l'étude de la capacité répliquative des variants résistants. Le modèle infectieux est fondé sur la transfection dans des cellules Huh7 d'un plasmide codant le génome du VHB (pCH-9/3091, 3182 pb) de génotype D sous contrôle d'un promoteur CMV (Nassal et al., 1992).

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 des 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 de 2^{nde} génération utilisés en combinaison.

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

antivirales vis-à-vis d'autres familles virales responsables d'infections pour lesquelles il n'existe pas de chimiothérapie antivirale ou de vaccin.

Le deuxième thème de recherche majeur concerne l'étude des mécanismes des lésions hépatiques associées ou non 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 CHC. L'hépatocarcinogenèse viro-induite, les mécanismes de la croissance tumorale et le rôle du micro-environnement hépatique, ainsi que le développement d'approches préventives du CHC chez les malades cirrhotiques, constituent un axe majeur du laboratoire pour les prochaines années.

3.2. Publications et communications

Publications internationales

1. **Soulier A, Poiteau L, Rosa I, Hézode C, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, Chevaliez S.** Dried blood spots: a tool to ensure broad access to hepatitis C screening, diagnosis and treatment monitoring. *J Infect Dis* 2016; 213: 1087-1095.
2. Seignères B, Descamps F, Croise R, Barlet V, **Bouvier-Alias M, Chevaliez S, Pawlotsky JM**, Abdelhady W, Rafik M, Avellon AM, Echevarria JM, Hausmann M, Dugua JM. Multicenter clinical evaluation of the new 3rd generation assay for detection of antibodies against hepatitis C virus on the VIDAS[®] system. *J Clin Virol* 2016; 78:20-26.
3. Meguellati A, Ahmed-Belkacem A, Nurisso A, Yi W, Brillet R, Berqouch N, Chavoutier L, Fortuné A, **Pawlotsky JM**, Boumendjel A, Peuchmaur M. New pseudodimeric auroles as palm pocket inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Eur J Med Chem* 2016; 115: 217-229.
4. Vermehren J, Maasoumy B, Maan R, Cloherty G, Berkowski C, Feld JJ, Cornberg M, **Pawlotsky JM**, Zeuzem S, Manns MP, Sarrazin C, Wedemeyer H. Applicability of hepatitis C virus RNA viral load thresholds for 8-week treatments among patients with chronic HCV genotype 1 infection. *Clin Infect Dis* 2016; 62: 1228-1234.

5. Ferraris P, Chandra PK, Panigrahi R, Aboulnasr F, Chava S, Kurt R, **Pawlotsky JM**, Wilkens L, Osterlund P, Hartmann R, Balart LA, Wu T, Dash S. Cellular mechanism for impaired hepatitis C virus clearance by interferon associated with IFN lambda-3 gene polymorphisms relates to intra-hepatic interferon lambda expression. Am J Pathol 2016; 186: 938-951.
6. **Poiteau L, Soulier A**, Rosa I, Roudot-Thoraval F, Hézode C, **Pawlotsky JM, Chevaliez S**. Performance of rapid diagnostic tests for the detection of antibodies to hepatitis C virus in whole blood collected on dried blood spots. J Viral Hepat 2016; 23: 399-401.
7. **Chevaliez S, Poiteau L**, Rosa I, **Soulier A**, Roudot-Thoraval F, Laperche S, Hézode C, **Pawlotsky JM**. Prospective assessment of rapid diagnostic tests for the detection of antibodies to hepatitis C virus, a tool for improving access to care. Clin Microbiol Infect 2016; 22: 459; e1-6.
8. Hézode C, **Chevaliez S**, Scoazec G, **Soulier A**, Varaut A, **Bouvier-Alias M**, Ruiz I, Roudot-Thoraval F, Mallat A, Féray C, **Pawlotsky JM**. Retreatment with sofosbuvir and simeprevir of patients with hepatitis C virus genotype 1 or 4 who previously failed a daclatasvir-containing regimen. Hepatology 2016; 63: 1809-1816.
9. **Pawlotsky JM**. Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens. Gastroenterology 2016; 151: 70-86.
10. Maasoumy B, Vermehren J, Welker MW, Bremer B, Perner D, Höner zu Siederdisen C, Deterding K, Lehmann P, Cloherty G, Reinhardt B, **Pawlotsky JM**, Manns MP, Zeuzem S, Cornberg M, Wedemeyer H, Sarrazin C. Clinical value of on-treatment HCV-RNA levels during different approved sofosbuvir-based antiviral regimens. J Hepatol 2016; 65: 473-482.
11. Denaës T, Lodder J, Chobert MN, **Pawlotsky JM**, Lotersztajn S, Teixeira-Clerc F. The cannabinoid receptor 2 protects against alcoholic liver disease via an autophagy-dependent macrophagic pathway. Sci Rep 2016; 6: 28806.
12. **Pawlotsky JM**. Hepatitis C drugs: is next generation the last generation? Gastroenterology 2016; 151: 587-590.
13. **Fourati S, Pawlotsky JM**. Recent advances in understanding and diagnosing hepatitis B virus infection. F1000Res 2016; 5: 2243.
14. Ahmed-Belkacem A, Colliandre L, Ahnou N, Nevers Q, Gelin M, Bessin Y, Brillet R, Douguet D, Bourguet W, **Pawlotsky JM***, Guichou JF* (*equal participation).

- Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities. Nat Commun 2016; 7: 12777.
15. **Pawlotsky JM**. The end of the hepatitis C burden: really? Hepatology 2016; 64: 1404-1407.
 16. Lahaye X, Satoh T, Gentili M, Cerboni S, Conrad C, Ahmed-Belkacem A, Rodriguez EC, Guichou JF, Bosquet N, Piel M, Le Grand R, King M, **Pawlotsky JM**, Manel N. Nuclear envelope protein SUN2 mediates cyclophilin A activities on HIV infection. Cell Rep 2016; 15: 879-892.
 17. Cloherty G, **Chevaliez S**, Sarrazin C, Herman C, Holzmayer V, Dawson G, Maasoumy B, Vermehren J, Wedemeyer H, Feld, JJ, **Pawlotsky JM**. Hepatitis C RNA assay differences in results. Potential implications for shortened therapy and determination of sustained virologic response. Sci Rep 2016; 6: 35410.
 18. **The ANRS collaborative study group on hepatocellular carcinoma (ANRS CO22 HEPATHER, CO12 CIRVIR and CO23 CUIPILT cohorts)**. Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2016; 65: 734-740.
 19. Calderaro J, Rousseau B, Amaddeo G, Mercey M, Charpy C, Costentin C, Luciani A, Laurent A, Azoulay D, Lafdil F, **Pawlotsky JM**. Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: relationship with clinical and pathological features. Hepatology 2016; 64: 2038-204.
 20. Riou J, Aït Ahmed M, Blake A, Vozlinsky S, Brichler S, Eholié S, Boëlle PY, Fontanet A; HCV epidemiology in Africa group. Hepatitis C virus seroprevalence in adults in Africa: a systematic review and meta-analysis. **J Viral Hepat** 2016; 23(4): 244-55.
 21. Ducancelle A, Pivert A, Bertrais S, Boursier J, Balan V, Veillon P, le Guillou-Guillemette H, Thilbault V, Castelain S, Roquebert B, Coste-Burel M, Mackiewicz V, Schvoerer E, Larrat S, Maylin S, Alain S, Loustaud-Ratti V, Gordien E, Gozlan J, Brodard V, **Chevaliez S**, Calès P, Lunel-Fabiani F. Different precore/core mutations of hepatitis B interact with, limit or favor liver fibrosis severity. J Gastroenterol Hepatol 2016; in press.
 22. Bottero J, Brouard C, Roudot-Thoraval F, Deuffic-Burban S, Hofliger P, Abergel A, Volant J, Dhumeaux D, Yazdanpanah Y; **Viral Hepatitis Testing Experts group**. 2014 French guidelines for hepatitis B and C screening: a combined targeted and mass

testing strategy of chronic viruses namely HBV, HCV and HIV. Liver Int 2016; 36(10): 1442-9.

23. Brisac C, Salloum S, Yang V, Schaefer EA, Holmes JA, **Chevaliez S**, Hong J, Carlton-Smith C, Alatrakchi N, Kruger A, Lin W, Chung RT. IQGAP2 is a novel interferon-alpha antiviral effector gene acting nonconventionally through the NF- κ B pathway. J Hepatol 2016; 65(5): 972-979.
24. Léon L, Kasereka S, Barin F, Larsen C, Weill-Barillet L, Pascal X, **Chevaliez S**, Pillonel J, Jauffret-Roustide M, Le Strat Y. Age- and time-dependent prevalence and incidence of hepatitis C virus infection among drug users in France, 2004-2011: model-based estimation from two national cross-sectional serosurveys. Epidemiol Infect 2016; 145(5): 895-907.

Communications nationales

1. **Fourati S**, Challine D, Poveda JD, Laperche S, Bouvier-Alias M, **Soulier A**, **Poiteau L**, **Pawlotsky JM**, **Chevaliez S**. Le système VERIS quantifie avec exactitude les différents génotypes du virus de l'hépatite B. 18^{èmes} Journées Francophones de Virologie, Paris, 24-25 mars 2016 (abstract : Virologie 2016 ; 20 (2) : O14).
2. **Chevaliez S**, Rodriguez C, **Poiteau L**, **Soulier A**, **Donati F**, Darty M, Chevallier P, Leroy V, Brodard V, Brouard C, Larsen C, Semaille C, Roudot-Thoraval F, **Pawlotsky JM**. Résistance primaire du VHB dans une large cohorte de patients naïfs de traitement. 6^{es} Journées d'étude du pôle Santé & Société. Ecole nationale Vétérinaire d'Alfort, Maison-Alfort, 30-31 mars 2016.
3. **Chevaliez S**, Dubernet F, Dauvillier C, Hézode C, **Pawlotsky JM**. "Le nouveau test de TMA en temps réel, Aptima HCV Quant Dx, quantifie avec exactitude les différents génotypes du virus de l'hépatite C". 21^{ème} journée annuelle du Groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP), Paris, 8 décembre 2016.
4. **Fourati S**, Challine D, Poveda JD, **Laperche S**, **Bouvier-Alias M**, **Soulier A**, **Poiteau L**, **Pawlotsky JM**, **Chevaliez S**. Le système VERIS HBV quantifie avec exactitude les différents génotypes du virus de l'hépatite B. 6^{es} Journées d'étude du pôle Santé & Société. Ecole nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, 30-31 mars 2016.
5. **Fourati S**, Roudot-Thoraval F, **Chevaliez S**, Scoazec Borghi G, **Soulier A**, Varaut A, Francois M, **Poiteau L**, Mallat A, **Pawlotsky JM**, Hézode C. Les patients infectés par un

VHC de genotype 1 ou 4 avec une cirrhose compensée sans mutation de résistance NS5A peuvent être traités par sofosbuvir plus un anti-NS5A pendant 12 semaines sans ribavirine. 79^{èmes} Journées de l'Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF), Bordeaux, 28 septembre au 1 octobre 2016 (CA-18).

6. **Chevaliez S**, Dubernet F, Dauvillier C, Hézode C, **Pawlotsky JM**. Le nouveau test de TMA en temps réel, Aptima HCV Quant Dx, quantifie avec exactitude les différents génotypes du virus de l'hépatite C. 36^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, 12-13 décembre 2.

Communications internationales

1. **Fourati S**, Hézode C, **Soulier A**, **Poiteau L**, Lavert M, Rodriguez C, **Chevaliez S**, **Pawlotsky JM**. HCV Resistance to Daclatasvir/Sofosbuvir Across Different Genotypes in the Real Life. 23th conference on Retrovirus and Opportunistic Infections (CROI), Boston, February 22-25, 2016.
2. Gautier A, Rahib D, Brouard C, Saboni L, Blineau V, El Malti F, Divid C, **Chevaliez S**, Barin F, Larsen C, Lot F, Lydié N. Proposition d'un volet biologique à l'issue d'une enquête téléphonique : retour d'expérience du BaroTest. 9^{ème} Colloque Francophone sur les Sondages, 11-14 Octobre 2016, Québec, Canada.
3. Duchesne L, Njouom R, Lissock FL, Tamko-Mella GF, Soulier A, **Chevaliez S**, Lacombe K, Rouveau N, **Poiteau L**, Rallier S. HCV Ag Core's Screening Performance in Mono-Infected, HIV- and HBV-Coinfected Patients. 23th conference on Retrovirus and Opportunistic Infections (CROI), Boston, February 22-25, 2016.
4. Duchesne L, Njouom R, Lissock F, Tamko-Mella GF, Rallier S, **Poiteau L**, **Soulier A**, **Chevaliez S**, Vernet G, Rouveau N, Girard PM, Lacombe K. Performances de l'antigène core du VHC comme marqueur diagnostique de l'hépatite C chez des patients camerounais mono-infectés et co-infectés VIH-VHC ou VHB-VHC. 8^{ème} Conférence Internationale Francophones VIH/hepatites AFRAVIH 2016, 20-23 avril 2016, Bruxelles, Belgique.
5. Chas J, Lebrette MG, Adda A, Guessant S, Amiel C, **Chevaliez S**, Peytavin G, Pailoux G. Efficience d'une prise en charge intégrée des nouveaux traitements du VHC. 8^{ème}

Conférence Internationale Francophones VIH/hepatites AFRAVIH 2016, 20-23 avril 2016, Bruxelles, Belgique.

6. **Fourati S**, Roudot-Thoraval F, **Chevaliez S**, Scoazec Borghi G, **Soulier A**, Varaut A, Francois M, **Poiteau L**, Mallat A, **Pawlotsky JM**, Hézode C. Patients with HCV GT 1/4 infection and compensated cirrhosis, without baseline NS5A RASs, can be treated with SOF plus an NS5A inhibitor for 12 weeks without ribavirin. New perspectives in hepatitis C virus infection – The roadmap for cure, Special Conference EASL/AASLD, 23-24 September 2016, Paris, France.
7. Saboni L, Rahib D, Brouard C, Gautier A, **Chevaliez S**, Barin F, Larsen C, Lot F, Lydie N. BaroTest : étude de faisabilité et d'acceptabilité d'une nouvelle offre de dépistage des hépatites B et C et du VIH. Colloque International sur la Recherche Interventionnelle, 17-18 novembre 2016, La Grande Crypte, Paris.

Conférences nationales sur invitation

Stéphane Chevaliez

1. "Evaluation des performances de la trousse Aptima HCV Quant Dx versus Roche et Abbott". Rencontres virologiques HOLOGIC, Paris, 2 février 2016.
2. "Evaluation des performances de la trousse Aptima HBV Quant Dx versus Roche et Abbott". Rencontres virologiques HOLOGIC, Paris, 2 février 2016.
3. "Actualités virologiques et résistance : Horizon 2016". Actualités et Conséquences Pratiques dans le VIH (ACP), 13^{ème} édition, Paris, 15 mars 2016.
4. "Quid des résistances virologiques chez le patient hépatite C ?". Rencontres en Hépatologie de l'Est Parisien : Le patient Hépatite C en 2016, Abbvie, Créteil, 12 mai 2016.
5. "Résistance aux nouvelles molécules anti-VHC". Service d'Infectiologie de l'hôpital Hôtel Dieu, Paris, 19 septembre 2016.
6. "Atelier échecs, résistance et retraitement". Innov' Action 2^{ème} édition, Agissons ensemble contre l'hépatite C (Abbvie), Nice, 9-10 décembre 2016.

Jean-Michel Pawlotsky

1. "Nouveaux traitements anti-VHC". 13^{ème} Journée du Groupe Transplantation et Infection (GTI), Paris, 20 mai 2016.

Conférences internationales sur invitation

Stéphane Chevaliez

- 1.1 “Virological tools for the diagnosis and management of HBV and HCV infection”.
Hepatology International Preceptorship Abbvie, Creteil, June 7-8, 2016.

Jean-Michel Pawlotsky

1. “Evolving recommendations: defining best practices”. International Hepatitis C Exchange Symposium, Paris (France), 10 janvier 2016.
2. “HCV resistance and DAA treatment failures”. Annual Meeting of the Scientific Council of the HEPNILE Egyptian Cohort, Paris, 29 janvier 2016.
3. “The cure for HCV genotype 3 : the hope comes true”. BMS Symposium, Annual Meeting of the Asociacion Espanola para el Estudio del Hgado (AEEH), Madrid (Spain), 17-19 février 2016.
4. “Interferon-free treatment failures and HCV resistance”. The International Liver Congress 2015, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona (Spain), 13-17 avril 2016.
5. “Grand Rounds : Hepatitis C”. The International Liver Congress 2015, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona (Spain), 13-17 avril 2016.
6. “HCV emerging data and trending topics”. The International Liver Congress 2015, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona (Spain), 13-17 avril 2016.
7. “EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C Workshop”. The International Liver Congress 2015, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona (Spain), 13-17 avril 2016.
8. “My life as an Associate Editor and other considerations”. Journal of Hepatology Editors’ Meeting. The International Liver Congress 2015, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona (Spain), 13-17 avril 2016.

9. "HCV update, resistance, and other challenges". Positive Care Clinic, Lakeridge Health, Whitby, Ontario (Canada), 9 mai 2016.
10. "HCV update, resistance, and other challenges". London, Ontario (Canada), 9 mai 2016.
11. "Changing paradigms of hepatitis C treatment". Toronto General Hospital, Toronto, Ontario (Canada), 10 mai 2016.
12. "HCV treatment success, failure, and future". Toronto Hepatology Dinner Workshop, Toronto, Ontario (Canada), 10 mai 2016.
13. "HCV update, resistance, and other challenges". CHU Laval, Québec, Québec (Canada), 11 mai 2016.
14. "HCV treatment success, failure, and future". Québec Hepatology Dinner Workshop, Québec, Québec (Canada), 11 mai 2016.
15. "Changing paradigms of hepatitis C treatment". McGill University Hospital, Montréal, Québec (Canada), 12 mai 2016.
16. "HCV treatment success, failure, and future". Montréal Hepatology Dinner Workshop, Montréal, Québec (Canada), 12 mai 2016.
17. "Clinical cases with the residents". Hôpitaux Universitaires Saint-Luc, Montréal, Québec (Canada), 13 mai 2016.
18. "Changing paradigms of hepatitis C treatment". Hôpitaux Universitaires Saint-Luc, Montréal, Québec (Canada), 13 mai 2016.
19. "New treatment strategies in hepatitis C". Webcast for the Urugayen National Hepatology Meeting, Montevideo (Uruguay), 2 juin 2016.
20. "HCV resistance and DAA treatment failures". Webcast for HepatoAIDS, Sao Paulo (Brésil), 2-4 juin 2016.
21. "HCV resistance and DAA treatment failures". Abbvie Hepatology Academy Preceptorship, Créteil (France), 7-8 juin 2016.
22. "HBV treatment landscape and viral suppression". Abbvie Hepatology Academy Preceptorship, Créteil (France), 7-8 juin 2016.
23. "Future interferon-free treatments". Abbvie Hepatology Academy Preceptorship, Créteil (France), 7-8 juin 2016.
24. "Hepatitis C treatment success and failure". Irish Society of Gastroenterology 2016 Annual Summer Meeting, Galway (Ireland), 9-10 juin 2016.

25. "Birth cohort screening for HCV in Europe". Cost-Effectiveness in Liver Disorders (CELD) Conference 2016, Budapest (Hungary), 23-24 juin 2016.
26. "From clinical trials to patients realities". HCV Symposium, Singapore (Singapore), 7 septembre 2016.
27. "HCV Grand Rounds". Changi General Hospital, Singapore (Singapore), 8 septembre 2016.
28. "Understanding HCV resistance and implications on DAA therapy", HCV Symposium, Hong Kong (China), 8 septembre 2016.
29. "DAA resistance: basic science of baseline and treatment-emergent RASs". Abbvie Symposium on HCV Resistance, Taipei (Taiwan), 10 septembre 2016.
30. "Basic science of HCV DAA resistance". Abbvie Symposium on HCV Resistance, Taipei (Taiwan), 10 septembre 2016.
31. "Overcoming the impact of NS5A RASs on SVR rates". Abbvie Symposium on HCV Resistance, Taipei (Taiwan), 10 septembre 2016.
32. "Presentation of the EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016". EASL/AASLD Special Conference "New perspectives in hepatitis c virus infection: the roadmap for cure". Paris (France), 22-24 septembre 2016.
33. "Next-generation diagnostic tools: ready-to-use ?" EASL/AASLD Special Conference "New perspectives in hepatitis c virus infection: the roadmap for cure". Paris (France), 22-24 septembre 2016.
34. "Breaking down barriers to HCV elimination". EASL/AASLD Special Conference "New perspectives in hepatitis c virus infection: the roadmap for cure". Paris (France), 22-24 septembre 2016.

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Sans objet

8. Programme d'activité 2017-2018

Les priorités des prochaines années comprendront le développement et l'évaluation de techniques sérologiques et moléculaires utilisées pour le diagnostic et le suivi thérapeutique des infections par le VHB, le VHC et le VHD. L'accent sera mis tout particulièrement sur le développement et l'évaluation d'alternatives au prélèvement sanguin pour le dépistage des hépatites virales, outil important des futures études épidémiologiques et de la surveillance des hépatites virales. Le laboratoire coordonnateur poursuivra son rôle d'animation et sa participation aux contrôles de qualité organisés sous l'égide de l'AC33 à l'ANRS en partenariat avec les laboratoires associés. Un accent particulier sera mis sur le transfert de techniques de biologie moléculaire, en particulier les techniques de détermination des profils de résistance développées dans le cadre de l'Observatoire National de la Résistance. Les principaux travaux d'ores et déjà prévus sont décrits ci-dessous :

5. La poursuite et le développement des alternatives au prélèvement veineux pour le diagnostic et le suivi des infections par les virus d'hépatites B et C (TROD pour la détection de l'antigène de capsid du VHC, de l'antigène HBe du VHB, des anticorps anti-HBs du VHB, DBS pour la détermination des profils de résistance du VHC aux antiviraux directs)
5. L'évaluation des performances des trousse de séquençage haut débit pour la détermination du génotypage de résistance du VHC aux antiviraux directs
5. La participation aux enquêtes épidémiologiques de Santé publique France
5. La mise en place de contrôle de qualité pour la détection des génotypes de résistance du VHC aux antiviraux directs
5. La poursuite de développement d'un site web du CNR

Rapport annuel d'activité

2017

**Centre national de référence
des Hépatites B, C et delta**

**CNR associé en Transfusion
Sanguine
Laboratoire de Virologie
INTS**

**Année d'exercice
2016**

1. Missions et Organisation du CNR

Voir annexe 1

2. Activités d'expertise

1.1 Activités d'expertise de l'année 2016

Expertise dans le domaine de la sécurité transfusionnelle

Enquêtes de transmission. L'infection B occulte présente un risque résiduel de transmission par transfusion persistant malgré l'efficacité du dépistage des marqueurs directs d'infection AgHBs et ADN viral. L'analyse des génomes viraux obtenus à partir de 7 donneurs de sang slovènes dans cette situation clinique a mis en évidence un lien génétique entre les souches de VHB infectant les paires donneurs-receveurs. Par ailleurs, une dose infectieuse inférieure à 600 UI par produit transfusé a pu être établie. Le dépistage des anticorps anti-HBc reste donc un levier sécuritaire. Toutefois, dans les régions fortement endémiques où ce dépistage pourrait compromettre l'approvisionnement en produits sanguins, la nécessité d'accroître la sensibilité des tests de dépistage du génome viral semble nécessaire pour améliorer la sécurité transfusionnelle vis-à-vis du VHB

Contrôles de qualité. Lancement d'un contrôle de qualité de la sérologie virale à partir de la constitution d'un panel de 25 échantillons distribué dans 100 centres de transfusions de 8 pays Africains (Cameroun, Ghana, Kenya, Malawi, Mozambique, Nigeria, Rwanda, Tanzanie,) en collaboration avec le CDC Atlanta, le Blood Systems Research Institute et l'université de San Francisco.

Expertise dans le domaine des outils de diagnostic

Quantification de l'AgHBs. Etude multicentrique impliquant 4 laboratoires de virologie (DATS/INTS, Biomnis, Ivry CH Paul Brousse, Villejuif CH Pitié-Salpêtrière, Paris)

visant à comparer la sensibilité de 3 troussees disponibles sur le marché. Malgré quelques divergences sans conséquences cliniques notables, une bonne corrélation entre les troussees a été notée. Toutefois, les échantillons de génotype C étaient diversement quantifiés selon la trousse. L'impact des substitutions du déterminant « a » sur la quantification AgHBs était particulièrement marqué pour une des troussees dont la majorité portait la substitution G145R (*Thibaut et al. J Clin Virol 2017*)

Intégration dans le « MinION Access Programme » d'Oxford Nanopore (UK) pour évaluation du séquenceur MinION (technologie de séquençage de troisième génération).

Le MinION utilise un séquençage basé sur le passage des molécules d'ADN au travers de nanopores soumis à un courant ionique engendrant un signal électrique caractéristique de chaque base. Comparée aux méthodes de génération antérieure, cette technique offre l'avantage de séquencer de très longues molécules d'ADN et rend de ce fait accessible l'obtention d'un génome viral complet en une séquence unique. Les résultats obtenus pour le séquençage du VHB (en collaboration avec la CIBU de l'Institut Pasteur) confirment que cette technologie génère de longues séquences qui couvrent la totalité du génome soit 3200 pb. En revanche, un taux d'erreurs global (substitutions, insertions, délétions) très élevé (15%) et une faible profondeur de séquençage (ie. nombre de séquences uniques générées) rendent l'analyse des polymorphismes génétiques malaisée.

3. Activités de surveillance des donneurs de sang

La surveillance des donneurs de sang positifs pour les marqueurs des virus des hépatites B et C s'inscrit dans un étroit partenariat avec Santé Publique France (SPF), l'Établissement Français du Sang (EFS) et le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA). Cette surveillance a pour objectif de mieux caractériser le profil biologique des donneurs confirmés positifs pour ces virus et d'assurer une veille de la diversité virale des souches circulant dans la population des donneurs de sang. Par ailleurs, elle est mise en regard des données épidémiologiques qui sont rassemblées à l'INTS et analysées en partenariat avec SPF.

La surveillance virologique est réalisée en prospectif depuis 2000 à partir d'un échantillon de chaque don confirmé positif. Les DOM, exclus 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.

L'acheminement d'un échantillonnage de tout don trouvé positif pour un des marqueurs des infections par les virus des hépatites, depuis l'EFS vers notre laboratoire, est régi par l'arrêté du 6 février 2009.

2.1 Méthode

Le **recueil des données épidémiologiques** est basé sur des questionnaires trimestriels élaborés conjointement avec SPF et réactualisé au besoin 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 professionnels de la collecte et les responsables des plateaux de qualification virologique des dons de l'EFS et du CTSA et concernent les dons homologues. Les données démographiques et épidémiologiques sont saisies et analysées par le laboratoire/CNR et sont mises en regard des données virologiques.

Les données qui sont présentées concernent les résultats obtenus depuis le début de la mise en place de la surveillance virologique exhaustive jusqu'à la fin de l'année 2015. L'année 2016 n'a pas été prise en compte notamment pour la surveillance virologique car l'ensemble des données n'était pas disponible au moment de la rédaction de ce rapport. Par

ailleurs, limiter la présentation de l'activité sur les cinq dernières années nous est apparu trop restrictif car nous aurait privés de la possibilité d'évaluer avec précision les tendances évolutives.

3.2. Résultats

Seuls les éléments les plus significatifs sont présentés.

3.2.1 Le VHB

Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHB

Tableau 1 : Taux des dons VHB positifs observés dans les dons de sang de 1993 à 2015.

Année	Nouveaux donateurs		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
2012	272 (10)*	5.56	8 (5)*	0.03	280	0.92
2013	220 (4)*	4.89	3	0.01	223	0.81
2014	255 (7)*	5.67	1 (1)*	0.00	256	0.91
2015	217 (9)*	5.32	8 (5)*	0.03	225	0.76

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

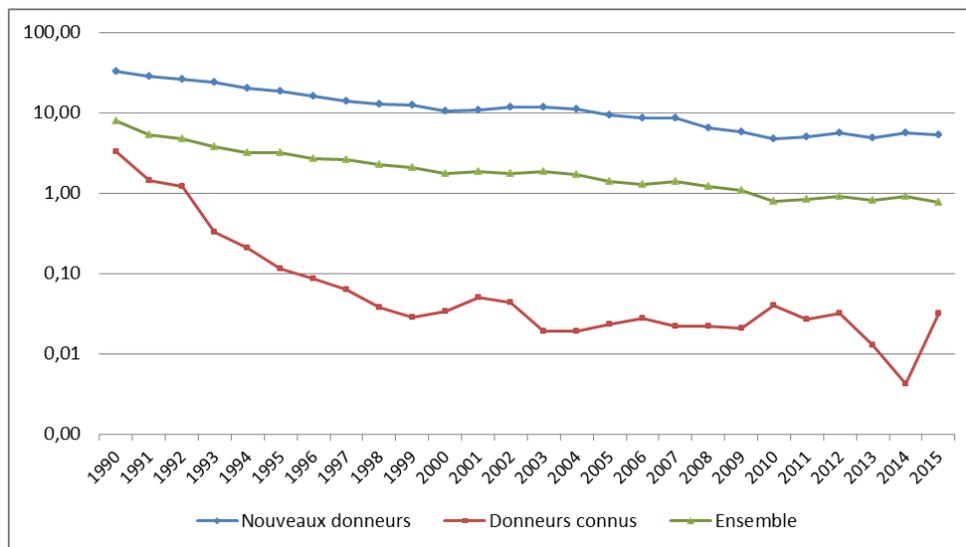


Figure 1 : Evolution du taux des dons VHB positifs en fonction du statut des donneurs.

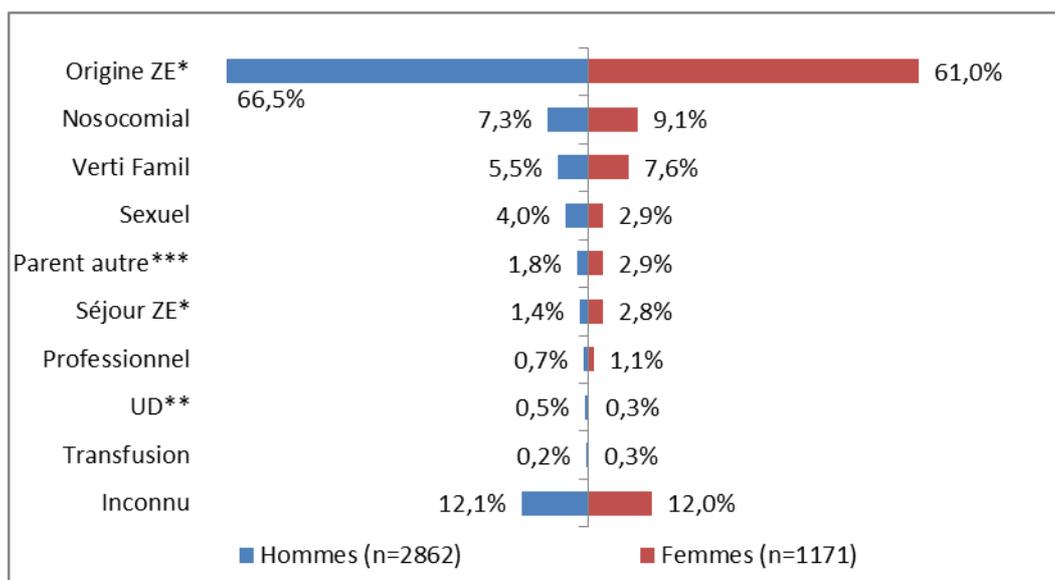


Figure 2 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHB positifs en France métropolitaine en fonction du sexe entre 1998 et 2015 (n = 4033).

La répartition des **marqueurs HBe** sur les 5262 dons pour lesquels l'information est disponible, soit 80.9% des 6502 dons VHB positifs dans la période 1998-2015, fait apparaître que 88,7% (4668/5262) des dons VHB positifs sont **anticorps anti-HBe** positifs AgHBe négatifs, cette proportion étant stable dans le temps.

La recherche des **anticorps anti-HBs** (**Tableau 2**) 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. 3,2% chez les donneurs AgHBs positifs ont des anti-HBs sans liaison évidente avec l'existence de mutations du gène S (en comparaison avec les souches retrouvées chez les donneurs de sang). La moyenne du taux d'anti-HBs était de 53 mUI/mL avec une médiane de 18 mUI/mL. Par ailleurs, 20 (1,0%) dons présentaient des anticorps anti-HBs sans antigène associé. Aucune différence significative n'était observée concernant l'origine géographique des donneurs, le facteur de risque ou le sexe ratio. En revanche, les donneurs Ag/Ac HBs positifs sont plus âgés (42.6% ont plus de 40 ans) que les donneurs anticorps négatifs (65,5% ont moins de 40 ans ; $p = 0,19$). De plus, on note une charge virale plus élevée dans le groupe des anticorps anti-HBs négatifs avec 39,2% des dons avec une charge virale supérieure à 1000 UI/mL ; alors que cela représente seulement 29,5% des dons Ag/AcHBs+ ($p=0,12$). Enfin, le titre en AgHBs est plus faible pour les dons Ag/Ac positifs que les dons anticorps négatifs ; 54,1% des dons Ag/Ac+ présentent un titre inférieur à 4000 ng/mL alors que ceci concerne seulement 32,6% des dons anti-HBs négatifs ($p=0,0004$).

Tableau 2 : Fréquence des anti-HBs chez les donneurs AgHBs positifs de 2008 à 2015 en fonction du génotype.

Anti-HBs	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
N testés	313	301	204	238	252	196	228	188	1921
N Ag/Ac HBs Pos	8 (2.6%)	5 (1.7%)	7 (3.4%)	7 (2.9%)	14 (5.6%)	4 (2%)	10 (4.4%)	6 (3,2%)	61 (3.2%)
Taux (mUI/mL)	10-145	17-46	10- >100	17 - 25	12-1490	11-15	11-79	11-19	10 - 1490
Ac HBe	7	5	6	6	12	4	10	5	55
gt A	1	2	1	1	3	0	2	0	10
gt B	0	0	1	2	0	0	2	2	6
gt C	1	0	1	0	1	0	0	0	3
gt D	3	1	3	3	6	2	2	4	24
gt E	1	1	0	1	2	1	2	0	8
gt F	1	0	0	0	1	0	0	0	2
ND	1	1	1	0	1	1	3	0	8
Mutations HBs	1	1	2	1	0	0	1	1	7

Sur les 5 867 donneurs trouvés AgHBs positif entre 1999 et 2015, le laboratoire a reçu 4 895 prélèvements dont 4 180 (85,4 %) ont pu bénéficier d'un **sous-typage de l'AgHBs** (test immuno-enzymatique mis au point au laboratoire basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux de spécificité restreinte (Laperche S et al. J Viral Hepatitis, 2001). Les 14,6 % n'ayant pas pu être sous-typés correspondaient dans la majorité des cas à des échantillons présentant des titres d'AgHBs inférieurs au seuil de détection de la technique de sérotypage (AgHBs >100 ng/mL) (**Figure 3**).

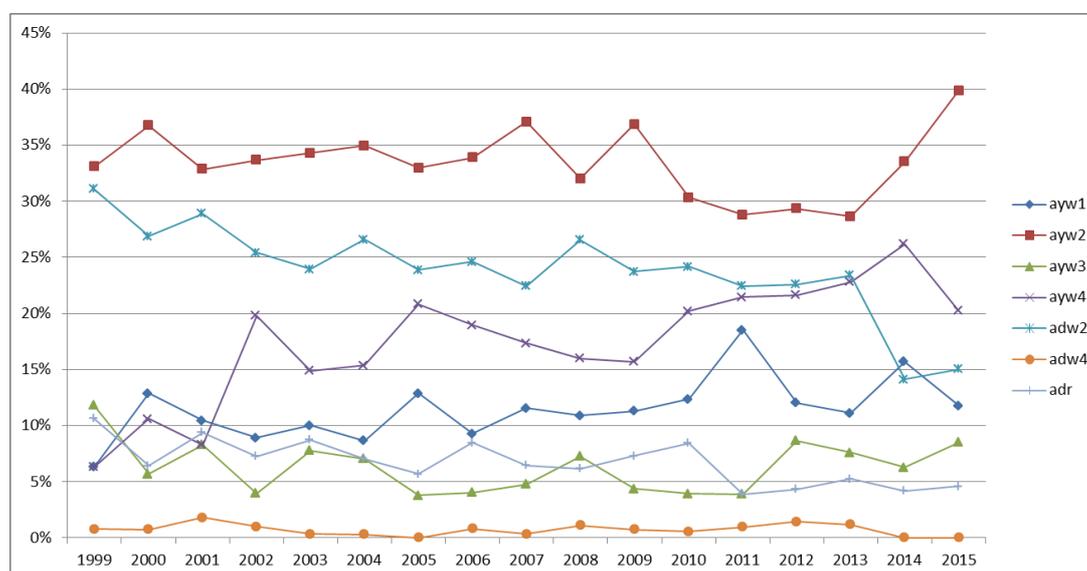


Figure 3 : Evolution de la part relative (en %) des sous-types de l'AgHBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2015 (incluant les Antilles depuis 2006 et La Réunion depuis 2008).

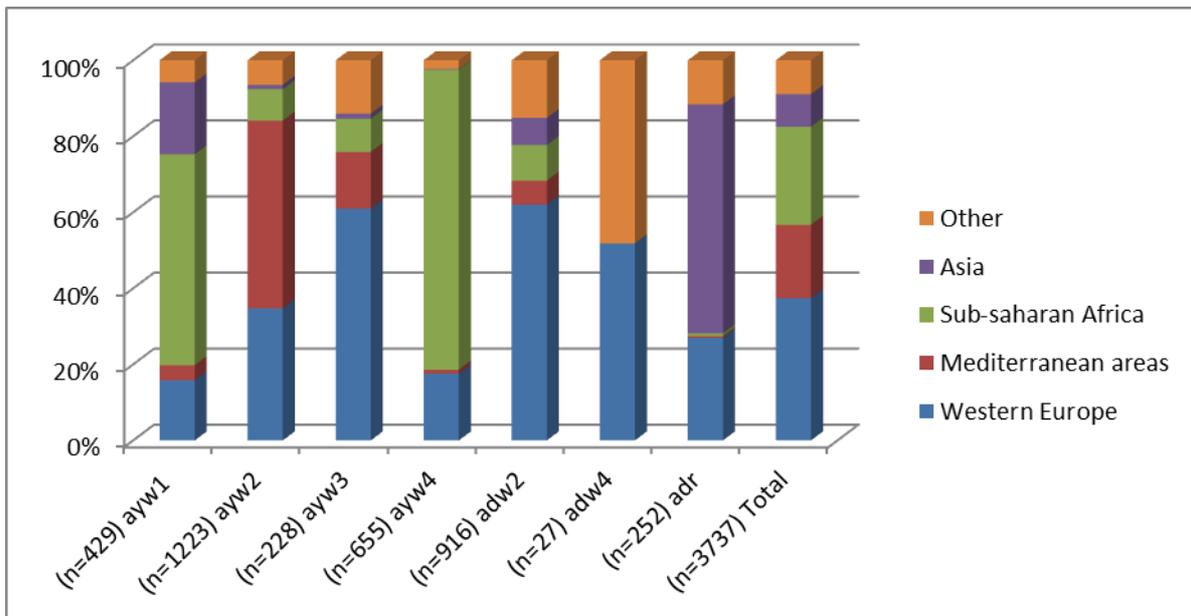


Figure 4 : Proportion (%) des différentes origines géographiques des 3 737 donneurs VHB positifs en fonction du sous-type pour la période 1999-2015.

L'analyse moléculaire 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 282 à 688 nt sur la séquence de référence NC_003977) 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'AgHBs (région amplifiée : nucléotides 271 à 1140 nt sur la séquence de référence NC_003977). Cet outil permet 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'AgHBs chez les donneurs de sang.

Sur 2 939 dons AgHBs positifs et/ou ADN positifs collectés entre 2005 et 2015, 2 878 (97,9%) ont pu être testés en biologie moléculaire. Parmi ces 2 878 dons, 261 (9,5%) n'étaient pas génotypables. La proportion des génotypes est stable entre 2005 et 2013. A partir de 2014, on note une augmentation significative du génotype D au profit des génotypes A et E. (**Figure 5**). On observe une prévalence globale plus élevée de génotype D (42,6%), suivie des génotypes A (27,2%) et E (18,2%) puis des génotypes B (5,7%), C (5,5%) et F (0,7%). Cette répartition est en accord avec l'origine géographique des donneurs (A : Europe et Afrique, B et C : Asie, D : bassin méditerranéen et Europe, E : Afrique). D'autre

part, le sexe ratio (moyenne sexe ratio 2,48) est significativement en faveur des hommes pour l'ensemble des génotypes (génotype A à E $p < 10^{-4}$, génotype F $p = 0,04$). Il n'est pas différent en fonction des génotypes à l'exception d'une proportion plus importante d'homme pour le génotype D que le génotype C avec un sexe ratio respectivement 2,90 et 1,69 ($p = 0,003$). Parmi les hommes, l'âge moyen est plus élevé chez les sujets infectés par le génotype D (36,3 ans) et les plus jeunes ont été observés dans le génotype E (27,7 ans, $p < 10^{-4}$). Les femmes infectées par le génotype A sont plus âgées que celles infectées par le génotype E (35,6 contre 24,9 ans, respectivement, $p < 10^{-4}$).

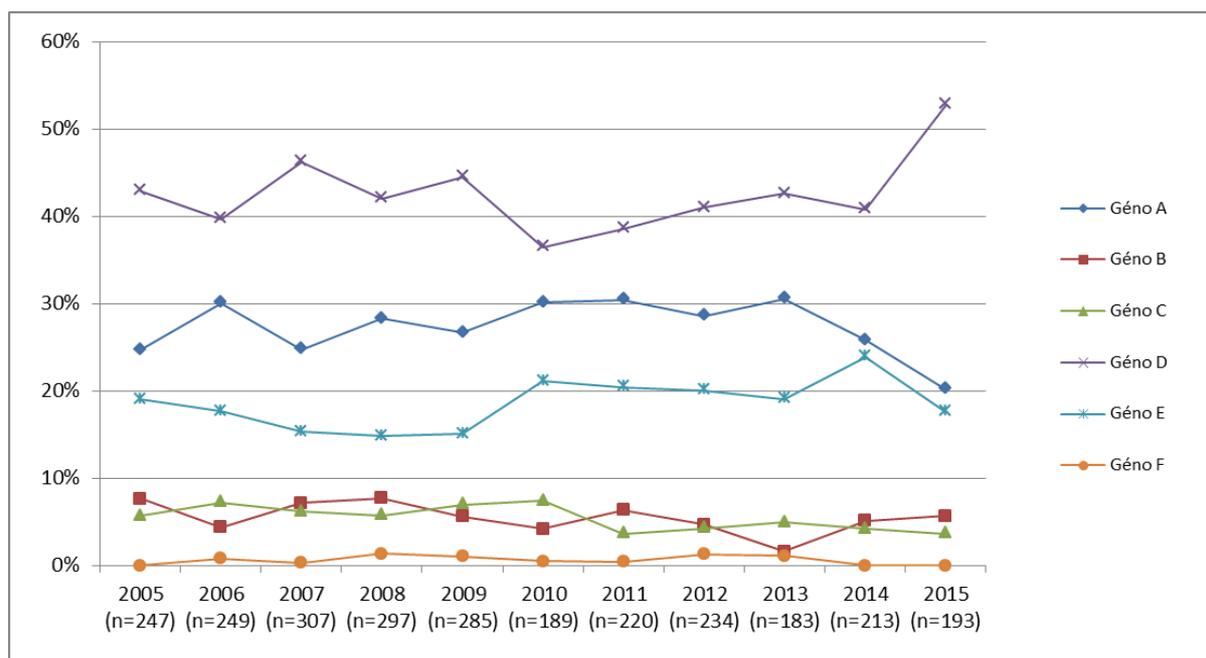


Figure 5 : Evolution des proportions (%) des différents génotypes du VHB chez les donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2015.

Tableau 3 : Comparaison de la répartition des génotypes du VHB entre les souches provenant des donneurs de sang prélevés aux Antilles (2005-2015) et sur le reste du territoire (Métropole 2005-2015 et Ile de la Réunion 2008-2015)

Génotypes	Antilles			Métropole+ Réunion		TOUS		p
	N	%		N	%		%	
A	67	78,8		646	25,5	713	27,2	<10 ⁻⁴
A1*	39	58,2	**	101	15,6			
A2	7	10,4		184	28,5			
A autre	21	31,3		361	55,9			
B	1	1,2		148	5,8	149	5,69	NA
C	0	0,0		145	5,7	145	5,54	NA
D	14	16,5		1102	43,5	1116	42,6	0,028
E	3	3,5		474	18,7	477	18,2	NA
F	0	0,0		17	0,7	17	0,65	NA
Total	85			2532		2617		

* dont 32/34 testés (94%) sont adw2

** dont 68/100 (68%) sont adw2

NA : non applicable

La corrélation entre sérotype et génotype est détaillée dans le **Tableau 4**. Sur les 2 939 échantillons étudiés (6 non testés ni en génotypage ni en sérotypage), 2 461 (83,7%) ont été sérotypés et 2 617 (89,0%) génotypés. Parmi ces 2 933 échantillons, 2 268 (77,3%) ont été caractérisés par les 2 méthodes (encadré dans le tableau 6), 123 (4,2%) n'ont pu être caractérisés par aucune des méthodes, 349 (11,9%) uniquement par séquençage et 193 (6,6%) uniquement par sérotypage. Parmi les 2 268 échantillons caractérisés par les 2 méthodes, 35 (1,5%) étaient discordants en lien avec la présence de mutations sur l'AgHBs pour 26 souches.

Tableau 4 : Répartition des génotypes du VHB et relation avec le sérotype chez donneurs de sang entre 2005 et 2015.

Génotypes	Sous-types										Total ss typés	non typables	Non testés	TOTAL			
	ayw1	ayw2	ayw3	ayw4	adw2	adw4	adr										
A	200	71,7%	<u>2</u>	<u>0,3%</u>	0	0	449	90,0%	0	0	651	42	20	713	27,24%		
B	68	24,4%	0	0	0	0	49	9,8%	0	0	117	28	4	149	5,69%		
C	0		<u>1</u>	<u>0,1%</u>	0	0	0		0	132	98,5%	133	6	6	145	5,54%	
D	<u>11</u>	<u>3,9%</u>	760	98,3%	121	99,2%	<u>7</u>	<u>1,6%</u>	0	0	<u>2</u>	<u>1,5%</u>	901	175	40	1116	42,64%
E	0		<u>10</u>	<u>1,3%</u>	<u>1</u>	<u>0,8%</u>	439	98,4%	<u>1</u>	<u>0,2%</u>	0	451	12	14	477	18,23%	
F	0		0		0		0		15	100%	0	15	2	0	17	0,65%	
Total Génotypés	279		773		122		446		499		15	134	2268	265	84	2617	
Non génotypables	22		38		12		34		48		1	11	166	66	29	261	
Non testés	3		6		3		5		7		0	3	27	28	6	61	
TOTAL	304		817		137		485		554		16	148	2461	359	119	2939	

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

Des **mutations du gène S** codant l'AgHBs décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination, ou aux immunoglobulines et hors polymorphisme naturel ont été retrouvées pour 163 échantillons (6.2%) (**Tableau 5**) :

- 130 souches avaient une mutation unique dans la région analysée,
- 33 avaient des mutations multiples (2 : n=21, 3 : n=5 ; >3 n=7).

La mutation majoritairement identifiée (22,7%) portait sur le résidu 133 (37 cas dont 13 en association avec au moins une autre mutation), puis sur les résidus 134 (24 cas), 130 et 129 (21 et 17 respectivement). Le génotype B présente la plus forte proportion de souches mutées (13,4%).

L'étude de la diversité génétique du VHB chez les donneurs de sang a été 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 antiviraux est maintenant caractérisée dans cette population asymptomatique et naïve de tout traitement. Sur un total de 823 souches génotypées, 24 (2,9%) présentaient une mutation de résistance ; les deux mutations les plus représentées portaient sur la mutation rtI233V associée à une résistance à l'adefovir (5 cas de mutations unique et 1 cas de mutations multiples) et la mutation rtA194TS associée à une résistance au tenofovir. Les autres mutations sont détaillées dans le **Tableau 6**.

Tableau 5 : Inventaire des mutations de l'AgHBs du VHB retrouvées par analyse moléculaire de 2617 dons de sang virémiques entre 2005 et 2015

Génotypes Mutations	A	B	C	D	E	F	TOTAL
T116N	3				1		4
T118R				1			1
P120S				3	1		4
P120T	3	2		1	3		9
T123N				2			2
C124R			1				1
T126A		5					5
I/T126N			2	1			3
Q129H		2		3	1		6
Q129R				1			1
G130R		1		4			5
G130N	6				1		7
T131I		1		4			5
T131S	1						1
M133I	1			5			6
M133T	9	1		2	2		14
M133L		2		1	1		4
F134L	4		1		2		7
Y134N				6			6
C137Y			1				1
C138Y			1				1
T/S143M	3	1		2			6
S143L				9	1		10
D144E		1		2	3		6
G145R	1				2		3
G145A	1		1		3		5
T116N Q129H	1						1
T116N M133T		1					1
T116N D144G				1			1
T118R Q129P				1			1
P120S F134I		1					1
T126A Q129R				1			1
Q129H D144A	1						1
Q129R G130N	2						2
Q129R G145A					1		1
G130N M133I				1			1
G130R S132Y				1			1
G130N Y134N				1			1
G130R Y134N				1			1
M133I F134L		1					1
M133L F134L	1						1
M133T F134L	2		1				3
M133I D144E	1						1
Multiples mutations >=3	3			9			12
codon stop w163	1						1
codon stop w172				1	1		2
insertion 114TT	1						1
insertion 116T	2	1					3
Total	47	20	8	65	23	0	163
	28,8%	12,3%	4,9%	39,9%	14,1%		
Total génotypés	713	149	145	1116	477	17	2617
	6,6%	13,4%	5,5%	5,8%	4,8%	0,0%	6,2%

Tableau 6 : Inventaire des mutations de la polymérase virale sur le domaine reverse transcriptase (RT) du VHB associées à une résistance au traitement antiviral, retrouvées par analyse moléculaire des 823 dons de sang virémiques pour les années de collectes 2012

Génotypes		A	B	C	D	E	F	TOTAL
Mutations "RT"	Impact drogue							
L80V	LAM, TEL				2			2
I169L	ENT				1	1		2
I169T	ENT				1			1
A194T	TEN	1			3			4
A194S	TEN				1			1
A181S	ADE, LAM, TEL	1			1			2
A181T	LAM, TEL					1		1
T184S	ENT	1						1
V173L	LAM				1			1
V173M	LAM				1			1
I233V	ADE	1			4			5
L80V, V173L	LAM, TEL				1			1
L80V, I233V	ADE, LAM, TEL				1			1
V173, L180M, M204V	ENT, LAM, TEL	1						1
Total avec mutations		5	0	0	17	2	0	24
		20,8%	0,0%	0,0%	70,8%	8,3%		
Total génotypés		217	36	35	363	167	5	823
		2,3%	0,0%	0,0%	4,7%	1,2%	0,0%	2,9%

ADE : adefovir, ENT : entecavir, LAM : lamivudine, TEL : telbivudine, TEN : tenofovir

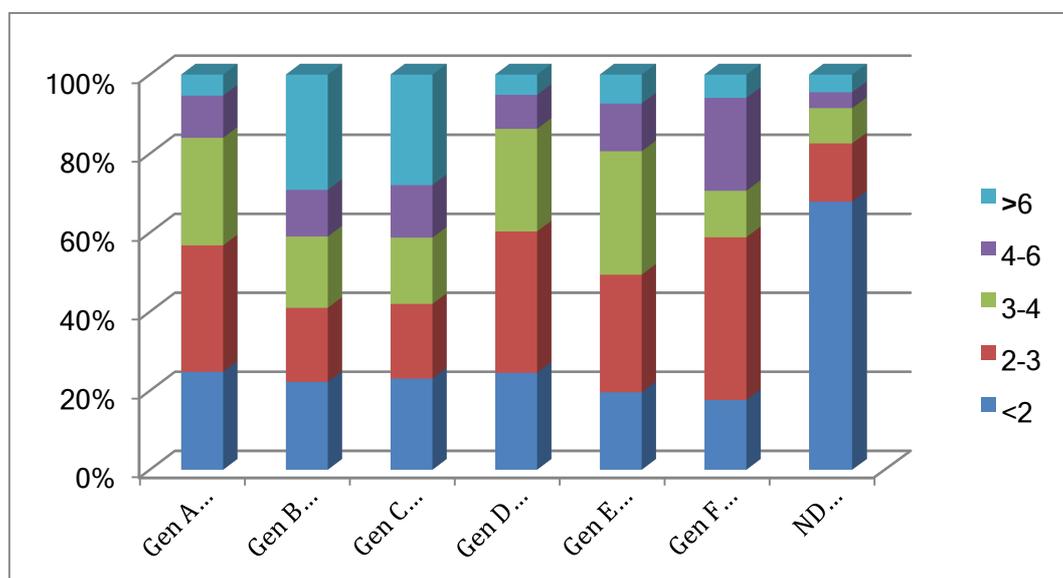


Figure 6 : Proportion (%) des charges virales (Log UI/mL, Cobas TaqMan Roche, Limite de quantification 6 UI/mL) en fonction du génotype du VHB chez 2 779 donneurs de sang en 2005 et 2015 (ND : génotype non déterminé).

La **Figure 6** fait état de la relation entre charge virale et génotype sur 2 779 souches. Ces résultats montrent que les charges virales plus élevées sont observées pour les génotypes B et C ($p < 10^{-4}$).

Co-infection VHB/Delta

2,08% des donneurs AgHBs positifs présentent une coinfection par le virus Delta entre 1997 et 2015. (**Tableau 7**) Après une période de stabilité autour de 1,1% pendant 10 ans, la prévalence varie depuis 2006 avec des valeurs majoritairement comprises entre 2,5 et 4,0% avec des prévalences extrêmes, haute en 2010 à 6,5% et basses en 2011 et 2015 autour de 1,2%. En ne prenant en compte que les positifs francs, le taux de prévalence moyen des anticorps delta s'élève à 1,40%.

En collaboration avec le 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 75 échantillons a identifié 20 souches (26,6%) avec une charge virale détectable (10^2 - 10^9 copies/mL). Dix-huit souches étaient de génotype 1, une de génotype 7 et une de génotype 8. Cinq souches VHD-1 étaient isolées chez des donneurs européens, 2 VHD-1 chez des donneurs originaires du Bassin Méditerranéen et les 9 autres chez des donneurs originaires d'Afrique Sub-Saharienne et 1 originaire des DOM. La charge virale VHB des 20 donneurs ARN-VHD positifs était plus basse (médiane à 34 UI/mL) que celle des dons ARN-VHD négatifs (médiane à 1257 UI/mL). 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 (26,7%) 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 7 : Prévalence des anticorps anti-Delta chez les donneurs de sang VHB positifs de 1997 à 2015.

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
n testés	253	325	278	303	325	330	360	360	297	283	331	314	299	200	234	250	194	225	185	5346
Positifs faibles	0	0	0	0	0	0	1	3	1	8	1	2	5	8	2	2	2	1	0	36
Positifs francs	3	3	4	1	4	4	4	2	3	4	8	10	3	5	1	4	5	5	2	75
%	1,2%	0,9%	1,4%	0,3%	1,2%	1,2%	1,4%	1,4%	1,3%	4,2%	2,7%	3,8%	2,7%	6,5%	1,3%	2,4%	3,6%	2,7%	1,1%	2,1%
PCR Pos/nb testés parmi les pos faibles	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/3	0/0	0/6	0/1	0/0	0/2	0/6	0/1	0/0	0/1	0/0	0/0	0/20
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	2/4	2/5	2/2	0/1	20/55
Génotype	2xGt 1					Gt7	Gt1	Gt1	2x Gt1	Gt1	3x Gt1	Gt1	Gt1		Gt8	2x Gt1	2x Gt1	2x Gt1		

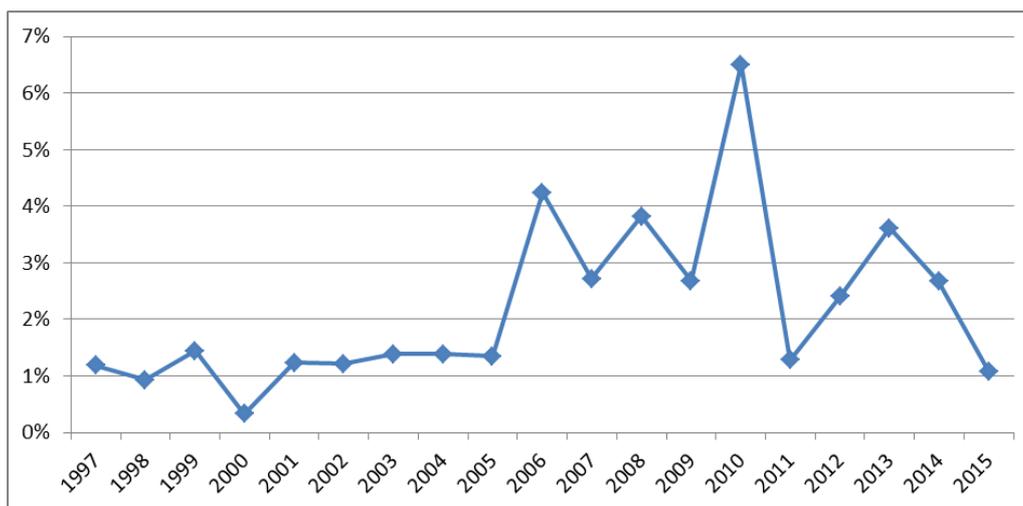


Figure 7 : Evolution de la séroprévalence du virus Delta chez les donneurs de sang de 1997 à 2015.

Dépistage du génome viral VHB

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 (**Tableau 8**). Sur 16,5 millions de dons testés, 60 dons ont été retrouvés AgHBs négatif et DGV positif :

- 43 avaient des anti-HBc et correspondaient probablement à une infection dite « occulte » (OBI) et
- 17 étaient en infection aiguë. A noter que 8 sur 13 qui ont pu être testés avaient des anti-HBs témoignant d'une vaccination précédente.

Le bilan net du DGV (DGV+, autres marqueurs négatifs) est donc de 1,03 par million de dons testés.

Tableau 8 : Bilan du Dépistage du génome viral VHB de 2005 au 31 décembre 2015 (16,5 millions de dons testés).

	DOM (2005-2015)	CTSA (2006-2015)	FM (2010 partiel-2015)	Total
Dons testés	457235	199895	15813036	16470166
DGV pos AgHBs pos	233	71	1134	1438 (90.8%)
DGV pos AgHBs neg	4	1	55	60 ¹ (3.8%)
DGV neg AgHBs pos	17	0	69	86 (5.4%)
Total VHB Pos	254	72	1258	1584

¹ Dont 43 OBI (anti-HBc pos) et 17 Infection aiguë (anti-HBc neg)

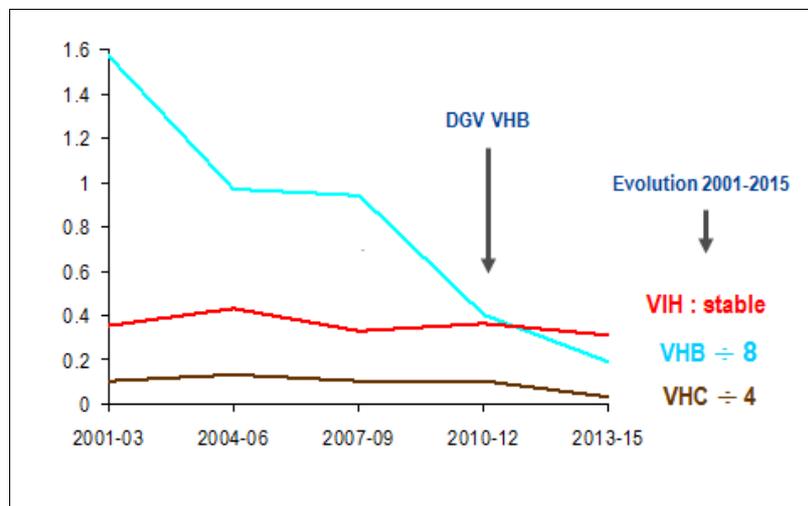


Figure 8 : Evolution du risque résiduel transfusionnel de 2001 à 2015.

Le bénéfice observé de la recherche de l'ADN du VHB sur les dons de la période 2013-2015 est plus important que le gain estimé : 0,59 vs 0,14 (IC 95% : 0,01 – 0,80) pour un million.

Synthèse

La surveillance de l'infection par le VHB chez les donneurs de sang montrait :

- 1- Une diminution constante des taux de dons AgHBs et/ou ADN positifs chez les nouveaux donneurs. Lors de la dernière année surveillée (2015) la prévalence était à 6,7/10 000 dons, soit 12 fois inférieure à la dernière prévalence estimée en population générale en 2004. Cette différence est en grande partie expliquée par la sélection des candidats au don et dans une moindre mesure par la couverture vaccinale.
- 2- Une incidence faible évaluée 0,31 p.100000 personnes/année soit environ 5 fois inférieure aux données estimées en population générale (2013).
- 3- Le facteur de risque principal est l'origine géographique et les sujets positifs sont plus volontiers des hommes (sexe ratio 3,0 en 2015), jeunes (moyenne âge 36,5 ans).
- 4- La répartition des génotypes est en faveur du génotype D (42,6%), suivi des génotypes A (27,2%) et E (18,2%).
- 5- 6,2% des donneurs AgHBs positifs ont au moins une mutation dans le gène S pouvant affecter le diagnostic, l'échappement vaccinal, ou aux immunoglobulines (hors polymorphisme naturel).
- 6- 2,9% ont une mutation de résistance aux mutations.
- 7- 2,1% présentent des anticorps anti-delta et 26,6% d'entre eux sont ARN-delta positifs.
- 8- La mise en place du dépistage du génome viral a permis d'écartier 17 dons sur 16,5 millions de dons testés. Parmi eux ~50% avaient des anticorps anti-HBs à taux faibles (entre 13 et 414 UI/mL) pouvant laisser penser à un certain pouvoir immunoprotecteur qui n'aurait pas conduit à la contamination du receveur. Par ailleurs cette dernière observation montre que la vaccination ne protège pas systématiquement de l'infection.
- 9- Le risque résiduel d'être en présence d'un donneur infecté par le VHB et non dépisté comme tel est de 1/5,3 millions de dons, soit 1 tous les 2 ans.

3.2.2 Le VHC

Tableau 9 : Taux des dons de sang VHC positifs de 1993 à 2015.

Année	Nouveaux donateurs		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
2012	129	2.64	11	0.04	140	0.46
2013	109	2.42	8	0.03	117	0.42
2014	120	2.67	7	0.03	127	0.45
2015	101 ⁽²⁾	2.48	9	0.04	110	0.37

⁽¹⁾ dont 2 Ac nég DGV pos ⁽²⁾ dont 1 Ac nég DGV pos

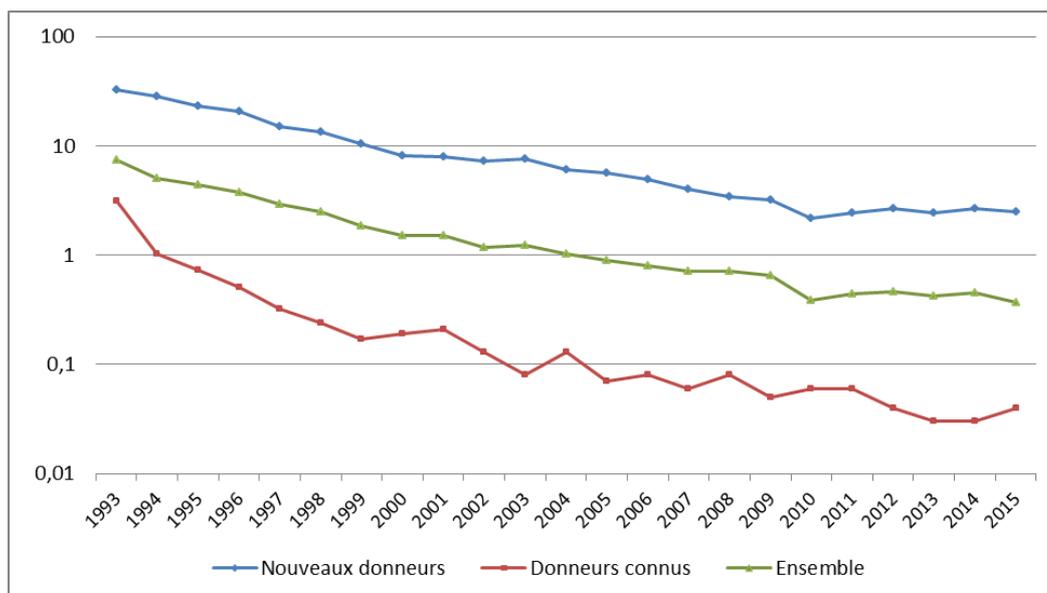
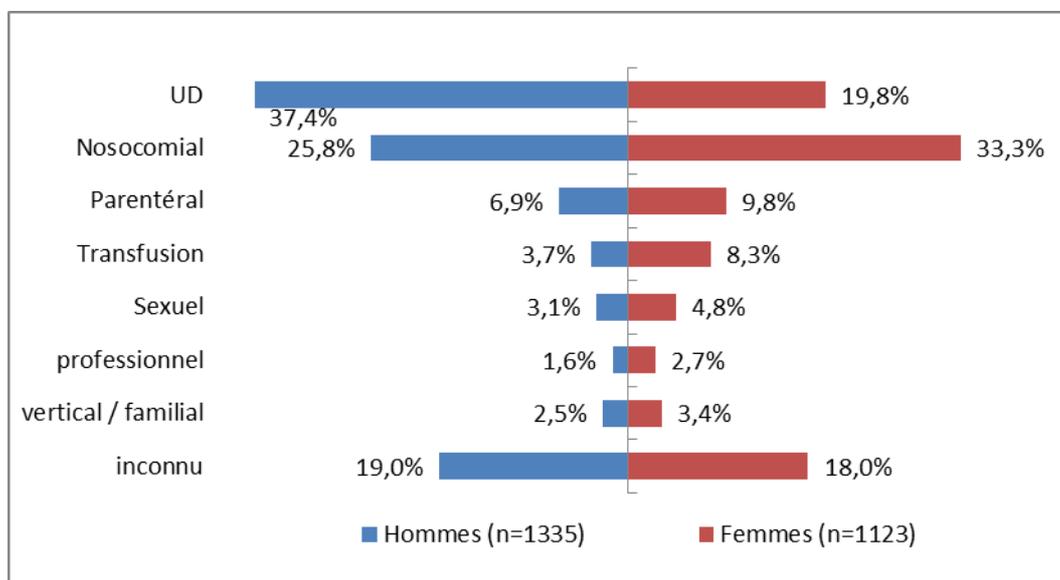


Figure 9 : Evolution du taux des dons VHC positifs en fonction du statut des donneurs.

Une baisse régulière des taux est observée liée à l'amélioration continue de la sélection des donneurs due notamment à une meilleure maîtrise des facteurs de risque et aux campagnes de dépistage réalisé en population générale. Par ailleurs le taux d'incidence diminue en lien avec une diminution du nombre de nouveaux cas en population générale.



Différence significative par sexe (UD, nosocomial, parentéral, transfusion,sexuel) ; UD : Usage de drogue

Figure 10 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHC+ interrogés sur FdR 1998-2015 (60% des 4092 nouveaux donneurs de la période).

Chez les 263 donneurs connus (123 hommes et 140 femmes) ayant présenté une

séroconversion documentée et interrogés sur leur facteur de risque (soit 69,0% des 381 de cette catégorie entre 1998 et 2015), la toxicomanie par voie intraveineuse représente le facteur de risque le plus fréquemment déclaré chez les hommes (33,3%) alors que pour les femmes il s'agit du risque nosocomial (26,4%) suivi du risque sexuel (22,1%). La part des donneurs connus sans facteur de risque identifié s'élève à 21,3%.

Sur la période 2000-2015, le laboratoire a reçu 2 751 échantillons de donneurs VHC positifs, ce qui représente 81,9% des 3359 donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 16 ans.

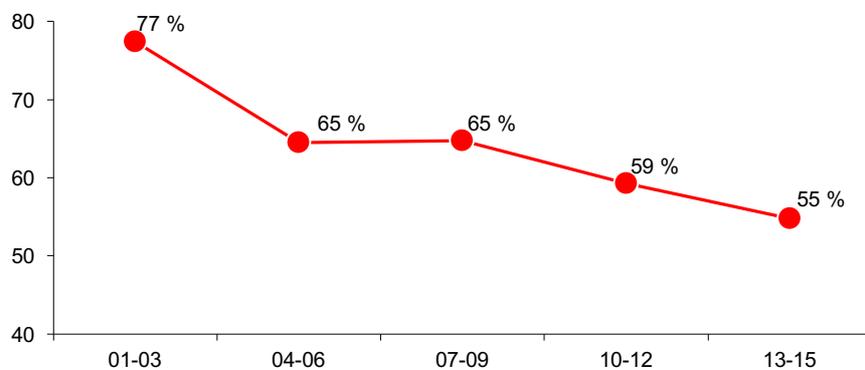
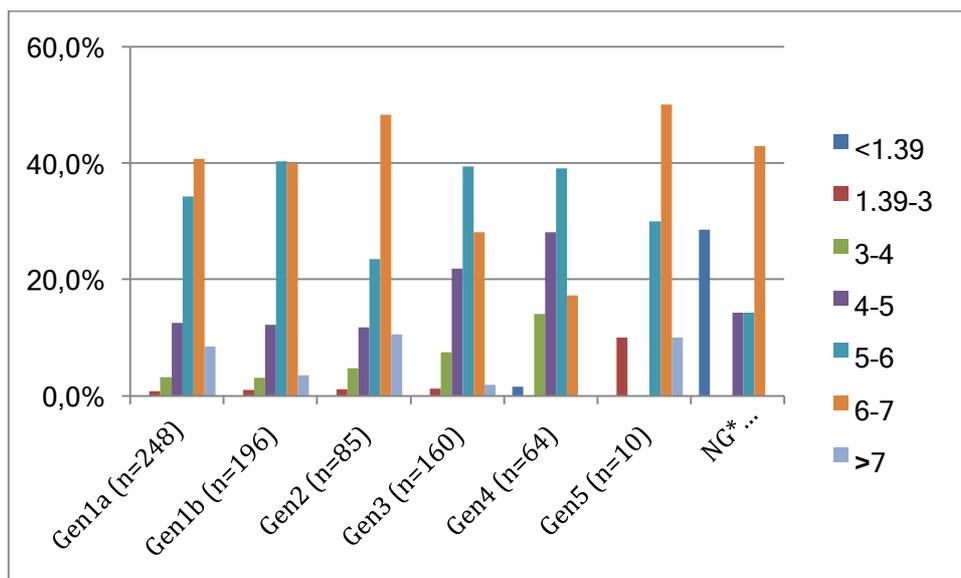


Figure 11 : Evolution de la proportion de donneurs virémiques parmi les donneurs anti-VHC positifs entre 2001 (semestre 2 : début du DGV) et 2015.

Pour les charges virales déterminées sur 783 donneurs prélevés entre 2007 et 2015, 6 donneurs avaient des CV inférieures au seuil de quantification de la trousse (< 25 UI/mL), 2/5 ont été dépistées par le DGV pratiqué en pool, et 1 non dépisté en DGV unitaire. 1 donneur était en phase de pré-séroconversion (anticorps VHC négatifs), les 5 autres étaient porteurs chroniques (anticorps VHC positifs) dont 4 avec une CV faible et 1 porteur d'un génotype 4f, sous-quantifié par le Cobas TaqMan (140 UI/mL avec la technique d'Abbott). La répartition des CV en fonction des génotypes est similaire quelle que soit le génotype (**Figure 12**). Sur 770 échantillons la moyenne des charges virales est de 6,36 log UI/mL s'étalant de <1,38 log UI/mL à 7,54 log UI/mL.



*NG : non génotypables

Figure 12 : Répartition des charges virales (exprimées en Log UI/mL d'ARN-VHC) en fonction des génotypes (2007-2015) (n=770).

Sont exclus les échantillons suivants :

Année	CV Log UI/mL	Conclu Geno
2009	6,90	1d
2010	5,68	6e
2011	4,69	1l
2011	6,24	6e
2012	6,03	1g
2012	2,24	1
2012	5,70	6
2012	6,19	6
2015	6,34	1
2015	7,01	6

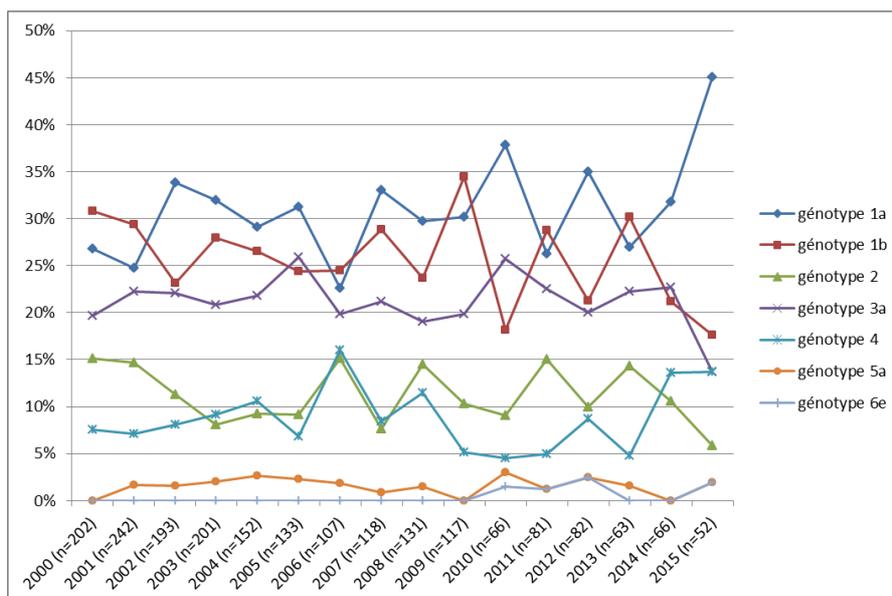


Figure 13 : Evolution des proportions relatives (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2015 (n=1 978 soit 91,6% des 2 160 ARN positifs).

La détermination du génotype réalisée sur chaque échantillon virémique par hybridation inverse (VERSANT HCV GENOTYPING ASSAY LiPA 2.0, Siemens) et par séquençage d'un fragment d'environ 340 paires de bases de la région NS5B du virus pour certains échantillons.

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 drogues, 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 (respectivement, 41,3%, 44,4% et 39,8%) ont été contaminés par toxicomanie comparativement aux autres génotypes. Chez les donneurs avec un génotype 1b ou 2, une proportion plus élevée (respectivement, 45,4 % et 45,5 %) ont été contaminés par voie nosocomiale, comparativement aux autres génotypes (**Figure 14**).

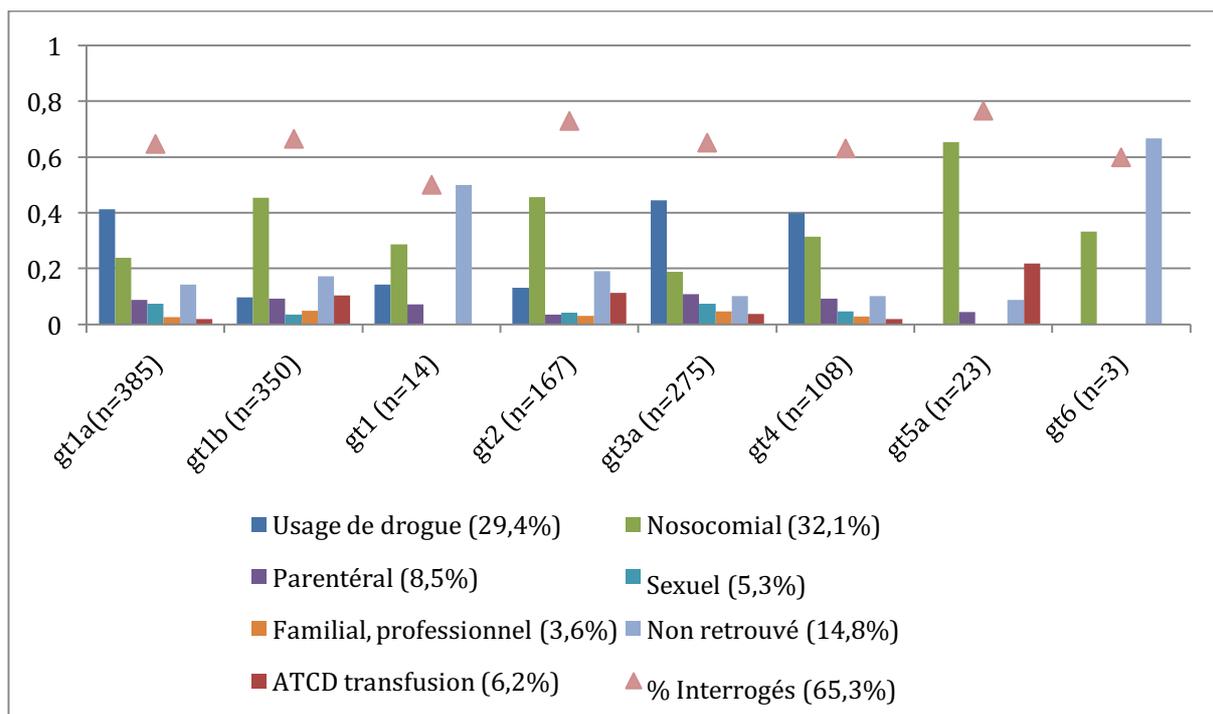


Figure 14 : Répartition des facteurs de risque du VHC (hiérarchisés) chez les donneurs de sang en fonction du génotype sur la période 2000-2015.

Bilan du DGV et risque résiduel

Le dépistage génomique viral est pratiqué à ce jour à l'aide d'un test triplex (VIH, VHC, VHB) avec la même technologie (Ultrio Procleix, Novartis Chiron) (**Tableau 11**).

15 dons provenant de donneurs sans anticorps spécifiques ont été identifiés (voir les caractéristiques dans le tableau ci-dessous); parmi ceux-ci 2 dons auraient été écartés car ayant un autre marqueur (taux élevé de transaminases et 1 anti-HBc). Le bilan net du DGV se porte donc à 13 dons pour les 15 premières années de pratique du DGV, soit 0,325 par million de dons. Aucun cas n'a été observé entre 2011 et 2014. Huit étaient des hommes (moyenne d'âge 40 ans) et 7 des femmes (moyennes d'âge 40,3 ans). Le bénéfice observé de la recherche de l'ARN du VHC sur les dons de la période 2013-2015 est sensiblement plus faible que le gain estimé : 0,12 vs 0,17 (IC 95% : 0,02 – 0,85) pour un million.

Tableau 11 : Caractéristiques des donneurs dépistés ARN-VHC positifs anticorps négatifs entre le 1er juillet 2001 et le 31 décembre 2015 (40 millions de dons testés).

Cas	Année	Statut	Génotype	CV log UI/mL	Monolisa HCV Ag/Ab Pos si >1	Sexe /Age	ND /DC	Délai entre le don négatif et le don positif	Facteur de Risque	Remarques
1	2001	FS	1a	7,67	0,93	M/62	DC	141	endoscopie	
2	2002	FS	3a	5,08	0,10	M/35	DC	1515	?	ALT +
3	2003	?	NT		NT	M/22	ND	NA	?	
4	2003	IS	4a	5,70	2,58	M/47	ND	NA	?	
5	2004	FS	1b	7,26	0,50	F/58	DC	91	AES	
6	2005	FS	1a	3,36	0,20	M/20	DC	366	Partenaire VHC+	
7	2006	?	NT		NT	F/40	ND	NA	?	Anti-HBc +
8	2007	FS	1a	5,08	0,44	F/39	ND	NA	Partenaire VHC+ Professionnel	
9	2007	FS	1a	<1,40	0.26	F/46	DC	112	Partenaire VHC+ CV : 4.3 log UI/ml (M1)	
10	2007	?	1a	7,52	2,4	M/47	DC	120	Non investigué	
11	2008	?	1a	7,28	1,77	M/64	DC	77	Nosocomial/sexuel ?	
12	2008	FS	1a	3,91	0,5	F/37	DC	217	partenaire VHC et toxicomane	
13	2009	FS	3a	4,30	0.41	M/23	DC	1003	?	
14	2010	?	1a	7,26	1.4	F/43	DC	145	Partenaire VHC	
15	2015	FS	3a	5,46	0.2	F/19	ND		Partenaire VHC	

CV : Charge Virale, FS : fenêtre sérologique, IS : immunosilencieux, ? : inconnu ND : nouveau donneur, DC : donneur connu, NT : Non testé, NA : non applicable

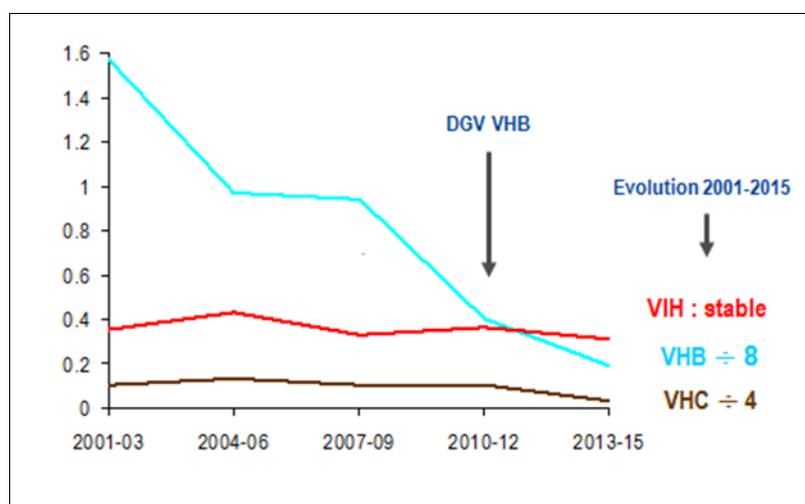


Figure 16 : Evolution du risque résiduel transfusionnel de 2001 à 2015.

Synthèse

La surveillance de l'infection par le VHC chez les donneurs de sang montre :

- 1- On note une diminution constante du taux de dons anticorps anti-VHC et/ou ARN positifs chez les donneurs de sang. Lors de la dernière année surveillée (2015) la prévalence chez les nouveaux donneurs était de 3,1/10 000 dons soit 25 fois inférieure à la prévalence estimée en population générale en 2011. Cette différence est en grande partie expliquée par la sélection des candidats au don et les campagnes de dépistage en population générale
- 2- Une incidence faible évaluée à 0,11 p.100000.
- 3 -Le facteur de risque principal est la toxicomanie par voie injectable chez les hommes et l'exposition nosocomiale chez la femme ; le sexe ratio est de 1 et la moyenne d'âge de 46,3 ans.
- 4- La proportion de donneurs ARN+ diminue avec le temps (80,0% en 2001, 49,1% en 2015) en accord avec l'incidence en diminution.
- 5- La répartition des génotypes établie sur près de 2 000 souches reçues est stable durant la période de suivi (2000-2015) et est en accord avec celle de la population française : gt 1 (58,1% avec 51,8% 1a), gt 3 (21,3%), gt 2 (11,6%), gt 4 (8,6%), gt 5 (1,5%) gt 6 (0,3%).
- 6- La toxicomanie IV est liée aux gt 1a, 3a et 4, l'exposition nosocomiale au gt 1b et 2.
- 8- La mise en place du dépistage du génome viral a permis d'écarter 13 dons sur près de 40 millions de dons testés. Le facteur de risque retrouvé dans 50% des cas investigués montre un risque sexuel (6/12) ; 8/13 sont des gt1a.
- 9- Le risque résiduel d'être en présence d'un donneur infecté par le VHC et non dépisté comme tel est de 1/32 millions de dons, soit 1 tous les 11 ans.

4. Activités de recherche 2016

Evaluation de la fréquence des mutations de résistance aux anti-protéases chez les donneurs de sang. A partir de l'analyse de la région NS3 du VHC, mis en place en 2013 (Besse B et al. J Virol Methods, 2012), la mise en évidence des souches VHC porteuses de mutations de résistance aux antiprotéases, a fait l'objet d'un nouvel axe de surveillance. 83 dons VHC positifs étaient inclus dans l'étude avec une virémie médiane de 106 UI/mL. Parmi

les 70 échantillons géotypés avec la PCR pangénotypique, 36 étaient de gt 1 (52%), 8 de gt2 (11%), 16 de gt 3 (23%), 7 de gt4 (10%), 1 de gt 5 (1%) et 2 de gt6 (3%) avec une concordance de 100% avec la technique de géotypage précédemment utilisée. Parmi les 36 souches de gt1, 4 (11%) présentaient une mutation de résistance aux antiprotéases. Concernant les 34 géotypes non-1, l'analyse est reportée dès lors que nous disposerons de données de la littérature permettant conclure aux phénotypes de résistance des souches non-1.

Impact de la diversité virale sur la détermination de la charge virale VHB. La surveillance moléculaire des souches VHB isolées chez les donneurs de sang dans la période 2005-2013 montre que 8.4% avaient une charge virale inférieure au seuil de quantification mais que 54% des souches concernées étaient géotypables en utilisant une méthode de sensibilité moindre (30 UI/ml). Le géotype A semblait particulièrement concerné par ce phénomène. L'étude des séquences de la région Précore/Core (cible d'amplification de la trousse de quantification utilisée en routine) montre un polymorphisme génétique particulier pour toutes les souches de géotype A qui présentent un défaut de quantification. Ces résultats encore préliminaires seront confortés avec l'inclusion d'autres échantillons.

Etude moléculaire des souches du virus de l'hépatite B (VHB) infectant des donneurs de sang AgHBs positif/ADN VHB négatif lors du dépistage. L'existence de donneurs de sang positifs pour l'AgHBs et négatifs pour l'ADN lors du dépistage (environ 5 % des donneurs VHB positifs en France métropolitaine) mérite que l'innocuité du sang de ces sujets soit étudiée avant d'entreprendre des mesures de suppression qui pourraient menacer la sécurité transfusionnelle. Pour cela, la caractérisation moléculaire et fonctionnelle de souches du virus de l'hépatite B infectant des sujets non traités présentant un haut niveau d'AgHBs sans virémie détectable ou inférieure au seuil de quantification des tests actuels les plus sensibles a été entreprise. Les données préliminaires obtenues à l'aide d'échantillons issus d'une large collaboration internationale, en particulier avec la Chine, ont permis d'identifier des mutations génomiques pouvant affecter négativement la production de particules virales sans altérer celle de l'AgHBs. En parallèle, une étude préliminaire a été menée sur la faisabilité de différentes approches moléculaires pour le développement d'un système répliatif du VHB *in vitro*.

Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de l'hépatite B occulte chez les donneurs de sang. La caractérisation de mutations du génome viral associées à l'infection occulte a confirmé l'existence d'un nouvel élément génétique de contrôle de l'expression du gène S apparemment impliqué dans la régulation du transport nucléo-cytoplasmique de l'ARNm pre-S2/S viral. Dans le cadre d'une collaboration avec le Centre de Transfusion de Dalian (Chine), l'étude de la prévalence de l'infection B occulte et de la diversité génétique des souches virales associées a montré une prévalence de 1:2000 dons et a mis en évidence une sous-population (12.5%) de profils sérologiques inhabituels sans anti-HBc persistant dans le temps. Aucune mutation particulière dans le gène de la protéine virale Core ou dans les éléments contrôlant son expression n'a été identifiée, suggérant une infection à bas niveau en présence d'une immunité partielle (anti-HBs +) et/ou une anomalie de la réponse immunitaire de l'hôte. Ces études ont bénéficié d'un financement de la société Grifols.

Etude fonctionnelle et structurale des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B. Les étapes de morphogénèse et d'entrée virales pour les virus des hépatites B et D font l'objet d'études détaillées se basant sur l'analyse fonctionnelle des processus d'assemblage et d'entrée d'isolats particuliers des VHB et VHD. Au cours de l'année 2016, une collaboration avec un groupe japonais a permis d'identifier de nouvelles molécules à potentiel antiviral : i) des analogues de la cyclosporine - capables de bloquer l'infection par le VHB sans inhiber l'activité de transport des acides biliaires par le transporteur NTCP et ii) des molécules de type pranthocyanidine qui bloquent, à la surface du virus, le site d'attachement au récepteur cellulaire. Une collaboration avec un groupe américain a aussi permis de démontrer que le transporteur d'acides biliaires NTCP, récepteur cellulaire pour le VHB, assure également une fonction stimulatrice de la production de particules virales. Enfin, une autre collaboration avec l'unité INSERM U1110 (Strasbourg) a montré que le transporteur NTCP/récepteur VHB jouait un rôle bénéfique sur la réplication du virus de l'hépatite C (VHC), en modulant la réponse immune innée des hépatocytes.

Diversité génétique du VHC chez les donneurs de sang en Afrique sub-saharienne. Les résultats du dépistage anti-VHC dans 8 pays d'Afrique sub-saharienne (Burundi,

Cameroun, République Démocratique du Congo, Madagascar, Mali, Mauritanie et Niger) montraient une séroprévalence de 2,9% sur un échantillonnage de plus de 15.000 plasmas de donneurs de sang. Parmi les plasmas re-testés dans le DATS avec un test VHC Ag/Ac combiné, seuls 16% des plasmas ont résulté anti-VHC positifs suggérant un défaut de spécificité du dépistage initial pouvant impacter significativement l'approvisionnement en sang. L'ARN VHC a été détecté dans 57% de ces plasmas séropositifs.

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

Enseignement universitaire

- Diplôme Universitaire de Transfusion Sanguine, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
- Diplôme Universitaire de Transfusion Sanguine, Université Paris Est Créteil, Paris 12
- Capacité en Transfusion Sanguine, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
- DESC d'Hémobiologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
- Diplôme Universitaire de Médecine Transfusionnelle, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
- Master 2, Virologie, module virologie moléculaire et médicale, Paris 7

Enseignement non universitaire

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

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

- Rétro-information à SPF
- Publications scientifiques

Comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang SPF »

Accueil de stagiaires

- Accueil d'étudiants en master 2 de l'université St Quentin en Yvelines-Versailles (Paris 11)

- Accueil de stagiaires chinois dans le cadre d'échanges technologiques et d'études collaboratives.

Conseil aux professionnels de santé

- HAS

2010-2011 Expert auprès de la HAS pour établir les recommandations sur les stratégies de dépistage de l'infection par les virus VHB et VHC.

- AFSSAPS-ANSM

Depuis 2001 Expert dans le cadre du contrôle de qualité national pour les marqueurs viraux.

2009-2012 Membre de la commission nationale des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*

2010-2012 Membre suppléant de la commission nationale d'hémovigilance

Depuis 2015 Membre-expert groupe de sécurité virale, ANSM

- G-Med

Depuis 2000 Expert pour les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*

6. Liste des publications et communications relatives aux activités du CNR 2016

Publications nationales

1. **Laperche S**, Lefrère JJ, Morel P, Pouchol E, Pozzetto B. Blood transfusion: control of infectious risks. *Presse Med* 2015; 44: 189-99.
2. Garraud O, Heshmati F, Pozzetto B, Lefrere F, Girot R, Saillol A, **Laperche S**. Plasma therapy against infectious pathogens, as of yesterday, today and tomorrow. *Transfus Clin Biol* 2016; 23: 39-44.

Publications internationales

1. Pivert A, Servant-Delmas A, Lunel-Fabiani F, Le Guillou-Guillemette H, **Laperche S**, Ducancelle A. Correlation between the promoter basal core and precore mutations and HBsAg quantification in French blood donors infected with hepatitis B virus. *J Med Virol* 2015; 87: 529-35.
2. El Ekiaby M, Moftah F, Goubran H, van Drimmelen H, **Laperche S**, Kleinman S, Busch M, Lelie N. Viremia levels in hepatitis C infection among Egyptian blood donors and implications for transmission risk with different screening scenarios. *Transfusion* 2015; 55: 1186-94.
3. **Laperche S**, Nübling M, Stramer SL, Brojer E, Grabarczyk P, Yoshizawa H, Kalibatas V, El Elkyabi M, Moftah F, Girault A, van Drimmelen H, Busch MP, Lelie N. Sensitivity of hepatitis C virus core antigen and antibody combination assays in a global panel of window period samples. *Transfusion* 2015; 55: 2489-98.
4. Servant-Delmas A, Ly TD, Hamon C, Houdah AK, **Laperche S**, Comparative performance of three rapid HBsAg assays for detection of HBs diagnostic escape mutants in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 3954-5.
5. Garraud O, Cognasse F, Tissot JD, Chavarin P, **Laperche S**, Morel P, Lefrère JJ, Pozzetto B, Lozano M, Blumberg N, Osselaer JC Improving platelet transfusion safety: biomedical and technical considerations. *Blood Transfus* 2016; 14: 109-22.
6. Prugger C, **Laperche S**, Murphy EL, Bloch EM, Kaidarova Z, Tafflet M, Lefrère JJ, Jouven X Screening for transfusion transmissible infections using rapid diagnostic tests in Africa: a potential hazard to could adversely affect blood safety? *Vox Sang* 2016; 110: 196-8.
7. Chevaliez S, Poiteau L, Rosa I, Soulier A, Roudot-Thoraval F, **Laperche S**, Hézode C, Pawlotsky JM. Prospective assessment of rapid diagnostic tests for the detection of antibodies to hepatitis C virus, a tool for improving access to care. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22(5): 459. e1-6.
8. Candotti D, Diarra B, Bisseye C, Tao I, Quang KP, Sanou M, **Laperche S**, Sanogo R, Allain JP, Simpore J. Molecular characterization of hepatitis B virus in blood donors from Burkina Faso: prevalence of quasi-subgenotype A3, genotype E and mixed infections. *J Med Virol* 2016; 88(12): 2145-2156.

Communications orales congrès nationaux

1. Candotti D, Enjalbert F, Li T, Yeun MF, **Laperche S**, Allain JP. Altération d'un mécanisme post transcriptionnel de régulation de l'expression de l'AgHbs dans l'infection à hépatite B occulte. 15 ème Réunion du réseau national hépatites ANRS, Paris 29-30 janvier 2015.
2. Candotti D, Leclerc C, Servant-Delmas A, Boizeau L, **Laperche S**. Caractérisation moléculaire des souches du virus de l'hépatite B (VHB) infectant les donneurs de sang à haut niveau d'AgHBs sans virémie détectable : implications pour la sécurité transfusionnelle. XXVII ème Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Montpellier 15-17 septembre 2015.
3. Sauvage V, Vandenbogaert M, Boizeau L, Candotti D Servant-Delmas A, Caro V, **Laperche S**. Evaluation de la technologie Nanopore MinION pour le séquençage du virus de l'Hépatite B. 16ème Réunion du réseau national hépatites ANRS, Paris 3-4 février 2016.

Communications orales congrès internationaux

1. Candotti D, Leclerc. C, Servant-Delmas. A, Boizeau L, **Laperche S**. Molecular and functional characterization of hepatitis B virus strains infecting blood donors with high HBsAg and undetectable HBV DNA levels: implications for blood safety and screening policy. 25th Regional Congress of ISBT London, UK 27 th June- 1st July 2015.
2. Deng X, Candotti D, Wang D, Wang X, Chen H, **Laperche S**, Liang X. Concomitant presence of HBV DNA and anti-HBs as only markers of HBV infection in donors with occult hepatitis B in Dalian, China. 34th International Congress of the ISBT Dubai, United Arab Emirates, September 3 - 8, 2016.

Conférences sur Invitation

1. **Laperche S**. HEV et sécurité transfusionnelle. Journée plénière AC11/12/33 ANRS, 21 janvier 2015.
2. **Laperche S**. Hépatites virales et risqué transfusionnel. Colloque de la Société de pathologie exotique « vers un contrôle mondiale des hépatites virales », Institut Pasteur, Paris, 19 Mai 2015.
3. **Laperche S**. Quelle stratégie pour assurer une meilleure sécurité transfusionnelle ?. Congrès de la Société Africaine d'Hématologie Dakar, Sénégal, 12-14 Novembre 2015.

4. **Laperche S.** Gestion d'une émergence virale infectieuse dans son impact transfusionnel potentiel. Journée de Médecine Transfusionnelle, Société française d'hémoaphérèse, Paris, 27 novembre 2015.
5. **Laperche S,** Leconte des Floris MF, Pillonel J, Hauser L, Lefort C, Py JY, Hervé I, Djoudi R. For the French haemovigilance network-EFS Lookback studies to assess viral risks the French experience 2000-2012. 17th international haemovigilance seminar, Paris, 9-11 march 2016.
6. **Laperche S.** Critères de choix des outils du dépistage viral en qualification biologique des dons. 1^{er} Congrès de la Société Marocaine de Transfusion Sanguine, Casablanca, 28-30 avril 2016.
7. **Laperche S.** Emergence virale et risque transfusionnel. Colloque des Virologues, Gilead, Paris, 1er juillet 2016.

7. Programme d'activité 2017-2018

Le programme d'activités pour les années futures a fait l'objet d'une présentation détaillée lors du précédent appel d'offre pour le renouvellement des CNR (mandature 2017-2021). En effet, un nouveau CNR a été créé, il s'agit du **Centre National de Référence Risques infectieux Transfusionnels**. Il est formé du laboratoire du Département d'étude des Agents Transmissibles par le Sang de l'Institut National de la Transfusion Sanguine, dirigé par le Dr Syria Laperche.

Rapport annuel d'activité

2017

**Centre national de référence
des Hépatites B, C et delta**

**CNR associé delta
Laboratoire de Virologie
Hôpital Avicenne**

Année d'exercice

2016

1 Missions et organisation du CNR

La description détaillée est présentée en annexe.

2 Activités d'expertise

Le CNR associé hépatite Delta possède une expertise dans les domaines d'investigation virologique, de quantification de la charge virale dans des échantillons cliniques et de typage moléculaire. Participe au développement, à l'évaluation et à la standardisation des méthodes diagnostiques de l'infection Delta Contribue à la surveillance des virus circulant en France, en particulier la détection de nouveaux virus variants émergeant pouvant poser un problème pour le diagnostic ou le traitement.

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année N

Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Nous avons dès lors organisé une surveillance sanitaire nationale et internationale des techniques « maisons » et kits commerciaux proposés, à la fois par l'étude des performances de ces kits et surtout par l'organisation de contrôles de qualité nationaux et internationaux.

De plus, nous avons participé avec l'organisation mondiale de la santé (OMS) au développement d'un standard VHD international.

Forts de cet étalon international, nous avons organisé le premier contrôle international de qualité des techniques de quantification de la charge virale ARN. Celui-ci a impliqué 28 laboratoires de toutes les régions du monde exceptée l'Amérique du Sud. Un rapport a été envoyé à chaque laboratoire participant.

La conclusion de toutes ces études est que la plupart des tests commerciaux ou des techniques « maison » sous-estimaient largement ou étaient incapables de quantifier la charge virale ARN Delta sur de nombreux échantillons cliniques. Ces échecs étaient en rapport principalement en rapport avec cette diversité génétique, notamment sur des

souches « Africaines ». Plusieurs communications orales et affichées à congrès nationaux et internationaux et plusieurs publications ont été réalisées sur cette question précise (Brihler S. et al., 2013, 2014 ; Le Gal et al., Hepatology 2016).

Evolution des techniques

Le CNR Associé Delta a participé avec des firmes privées françaises au développement de kit commerciaux consensus. Une étude des performances d'un kit français, vient d'être présentée à deux congrès internationaux et publiée dans une revue internationale (Le Gal et al., EASL Barcelone Avril 2016 ; AFRAVIH, Belgique Avril 2016 et Le Gal et al., 2017). Celui-ci, dont le marquage CE est imminent, est actuellement utilisé en routine par le laboratoire.

De même, un kit prototype sur plate-forme ouverte à visée des laboratoires des Pays à ressources limitées est en développement avec une start-up française. Ses performances viennent d'être présentées à un congrès (ISHEID Mai 2016). Un projet ANRS d'implantation de ce test dans 2 Pays d'Afrique (Cameroun et République Centrafricaine) vient d'être accepté pour financement à l'appel d'offres ANRS de septembre 2016.

Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Nous avons aidé à la mise en place dans plusieurs laboratoires du kit français évalué et développé par la société Eurobio.

3 Présenter les activités d'expertise de l'année N et commenter les évolutions quantitatives et qualitatives observées

L'activité diagnostique du CNR delta a vu une légère diminution, en rapport avec la réalisation par un plus grand nombre de centres, des techniques validées par le CNR Delta notamment lors des contrôles de qualité annuels réalisés. Une diminution de 17%, 17% et 19,2% a été observée pour les anticorps totaux, pour les IgM et pour les charges virales ARN respectivement, avec un total de 2 419 examens réalisés.

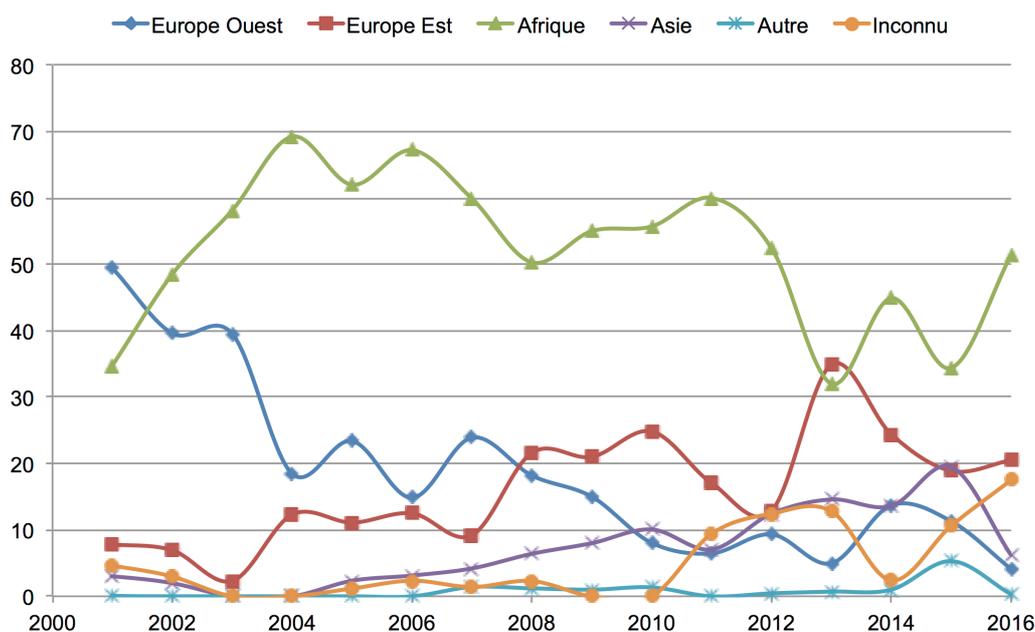
Durant l'année 2016, le 4^{ème} contrôle de qualité national en sérologie et en biologie moléculaire a été initié. L'analyse des résultats et l'envoi aux différents centres sera réalisé courant 2017.

3 Activités de surveillance

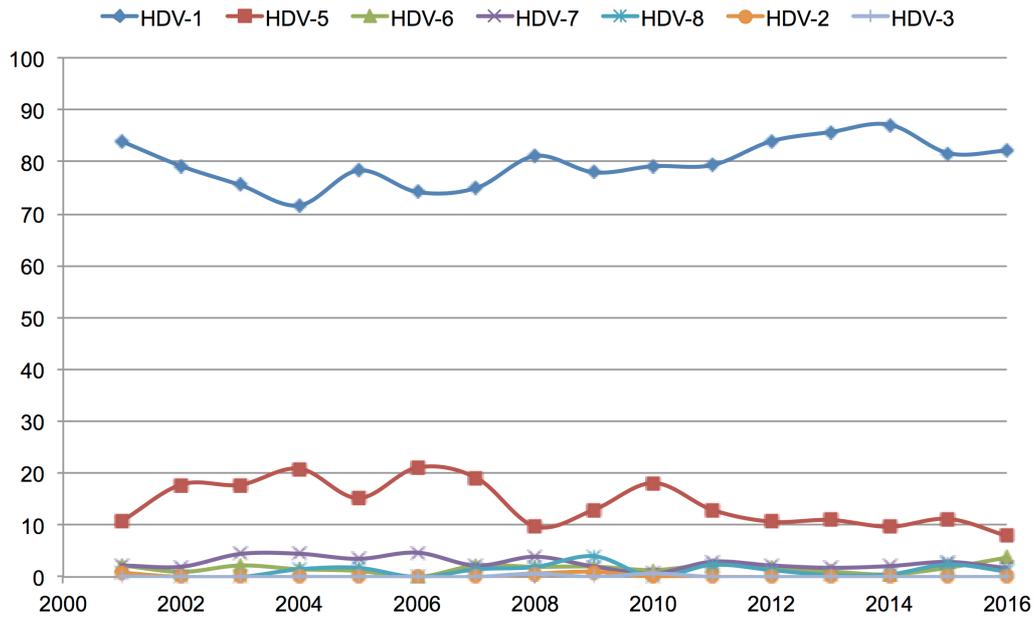
3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

- Typage prospectif des nouvelles souches delta circulant en France.

En 2016, 292 nouvelles souches ont été identifiées et génotypées. Les génotypes se répartissaient comme suit : 195 HDV-1 auparavant les génotypes 152 HDV-1Africain, 87 HDV-1 européen ou Asiatiques, 23 HDV-5, 11 HDV-6, 5 HDV-7 et 3 HDV-8. Dix souches sont en cours de caractérisation (voir figures et tableaux ci-dessous).



Origine géographique des patients HDV positifs en France (en %)



Proportion (%) des différents génotypes HDV caractérisés en France

HDV génotypes	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
HDV-1	110	80	34	48	134	95	102	125	78	118	135	189	241	170	138	240	1379
HDV-5	14	18	8	14	26	27	26	15	13	27	22	24	31	19	19	23	251
HDV-6	3	1	1	1	2	0	3	3	2	2	4	4	3	1	3	11	26
HDV-7	3	2	2	3	6	6	3	6	2	1	5	5	5	4	5	5	46
HDV-8	1	0	0	1	3	0	2	3	4	0	4	3	1	1	4	3	21
HDV-2	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
HDV-3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
Total	131	101	45	67	171	128	136	154	100	149	170	225	281	195	169	282	1727

Tableaux des nouvelles souches Delta caractérisées en France depuis 2001

PAYS	n	N	%
EUROPE DE L'OUEST			
France	12		
Sous total		12	5,00%
EUROPE DE L'EST			
Bulgarie	2		
Moldavie	3		
Ukraine	1		
Roumanie	47		
Georgie	4		
Hongrie	1		
Lithuanie	1		
Turquie	1		
Sous total		60	25,00%
ASIE			
Chine	2		
Mongolie	15		
Pakistan	1		
Sous total		18	7,50%
MOYEN ORIENT			
Oman	1		
Sous total		1	0,42%
AFRIQUE			
Bénin	1		
Burkina Faso	1		
Cameroun	71		
Centrafrique	7		
Congo	2		
Côte d'Ivoire	11		
Ethiopie	12		
Gabon	3		
Guinée	2		
Guinée Equatoriale	1		
Mali	3		
Mauritanie	10		
Niger	1		
République démocratique du Congo	1		
Sénégal	3		
Sierra Leone	2		
Tchad	9		
Togo	3		
Tunisie	5		
Sous total		148	61,67%
OCÉAN INDIEN			
Mayotte	1		
Sous total		1	0,42%
TOTAL		240	100,00%

Origine géographique des patients HDV positifs nouvellement dépistés en France

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

Sans objet

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

- Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France (échanges de données, périodicité, analyse commune)

Toutes les souches HDV positives sont collectées, caractérisées et conservées au sein de la collection CNR-D (voir ci-dessus). Cependant l'augmentation observée de la prévalence de l'infection Delta chez les patients nés en France n'a pas été confirmée en 2015 et 2016

- 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 CNR-D participe depuis 4 ans au réseau international Delta (Hepatitis Delta international network, HDIN). Il anime un groupe de travail international sur la quantification de l'ARN du viral Delta.

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Les enquêtes ou études ponctuelles sont celles des contrôles nationaux et internationaux de qualité qui ont été initiés et qui seront perpétués. Chaque année le CNR-D fournira à tous les laboratoires français un contrôle de qualité externe pour le diagnostic en sérologie et en biologie moléculaire. Le 4^{ème} contrôle national de qualité a été initié et les résultats seront rendus premier trimestre 2017.

Des dispositions similaires seront discutées avec nos contacts internationaux au sein du groupe de travail.

4 Alerte

A ce jour pas d'alerte notifiée. La surveillance de toutes les nouvelles souches circulantes, l'évaluation systématique de tous les kits commerciaux, la publication et la diffusion des informations obtenues, sont des éléments majeurs de surveillance.

6.2 Activités d'information, de formation et de conseil

Le CNR-D est sollicité régulièrement au niveau national et international pour son expertise et pour la conduite de programme d'études et de recherche.

Au sein du laboratoire, une formation théorique de base et pratique est dispensée aux techniciens. Celle-ci fait partie de leur formation dans le cadre de leur habilitation à réaliser la technique CNR-D.

De même tous les internes du service reçoivent cette formation, sur le plan scientifique mais aussi technique pour leur permettre de réaliser la validation biologique des examens.

Plusieurs services en Province sollicitent le CNR-D pour l'organisation de staffs dans leurs hôpitaux. De même les biologistes du CNR-D sont régulièrement directement par téléphone ou par courriel pour l'aide au diagnostic.

Des stagiaires Français (techniciens ou scientifiques en cours de cursus de formation) ou étudiants en thèse d'exercice ou thèse d'université ou en Post Doctorat, sont régulièrement accueillis au sein du laboratoires.

Au niveau international, le CNR-D a une tradition d'accueil de médecins, chercheurs ou étudiants étrangers. Des étudiants tunisiens, centrafricains, ont été accueillis en 2014. De plus le CNR-D a été invité et a participé dans différents Pays, Algérie, Bénin a des formations post universitaires (2014 et 2016).

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

6.1 Décrire les activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.

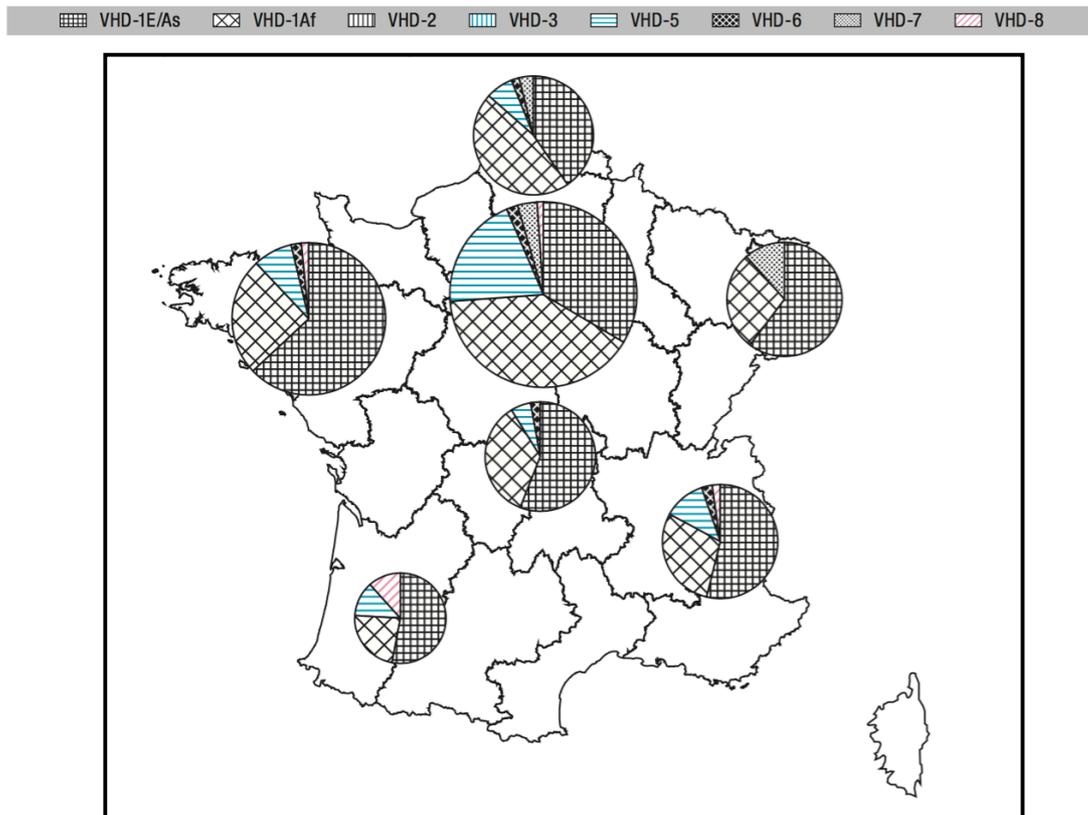
Le CNR associé hépatite Delta possède une expertise dans les domaines d'investigation virologique, de typage moléculaire. Nous participons à la standardisation des méthodes diagnostiques, et contribuons à la surveillance des virus circulant en France, en particulier la détection de nouveaux virus variants émergeant pouvant poser un problème pour le diagnostic ou le traitement.

Mon équipe s'intéresse particulièrement à la diversité des virus delta circulants, et à l'impact de cette diversité sur l'infection virale et la pathogenèse : (i) étude des caractéristiques épidémiologiques des patients infectés par le VHD, les maladies cliniques associées, les modes de transmission, les traitements, la prévention ; (ii) la compréhension des mécanismes moléculaires soutenant la réplication du VHD et (iii) la physiopathologie de l'infection virale : Editing, perturbation de l'homéostasie cellulaire, pathogenèse spécifique liée au VHD. Ainsi, ces deux structures cadrent idéalement à la fois sur le plan de la complémentarité et de la cohérence scientifique et organisationnelle avec ma thématique générale de recherche : « Variabilité génétique et pathogenèse spécifique du virus de l'hépatite Delta. Interactions avec le virus de l'hépatite B auxiliaire ».

L'un des apports majeurs des travaux de recherche de notre laboratoire est la proposition d'une nouvelle classification du genre Deltavirus. En effet, quatre nouveaux génotypes VHD ont été caractérisés au laboratoire et nous ont permis de proposer une classification en huit groupes génétiques distincts issus d'un ancêtre commun ou clade ou génotype (Radjef N., et al., 2014 et Le Gal F. et al., 2016). Ces travaux ont permis le dépôt d'un brevet international au nom de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, « Molécules d'acides nucléiques d'HDV, leurs fragments et leurs applications » (PCT/FR02/03239) en septembre 2001.

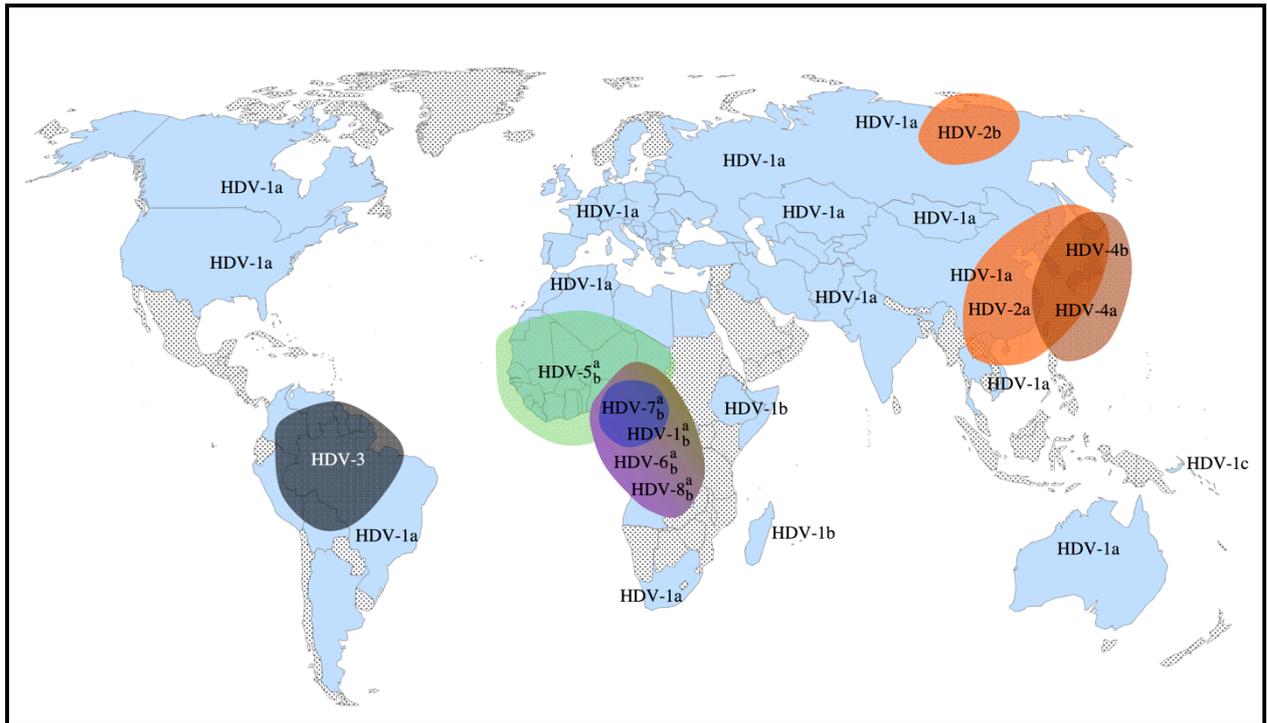
Aujourd'hui, grâce au typage prospectif en France de toute nouvelle souche VHD qui réplique, dans le cadre de sa mission de veille sanitaire, et grâce à de nombreuses études

réalisées dans diverses régions du monde (Algérie, Centrafrique, Mauritanie, Niger, Roumanie, Tunisie, Turquie), le CNR Associé a caractérisé plus de plus de 2500 séquences VHD. Nous avons ainsi récemment, mis en évidence un nouveau degré de variabilité du virus au sein de la plupart des différents génotypes : les sous-génotypes. Une étude exhaustive portant sur la diversité génétique du VHD à l'échelle mondiale, réalisée grâce à nos 2152 souches, vient d'être soumise à publication (Août 2016).



Répartition des génotypes et sous génotypes en France (Gordien E. : BEH 19-20, 2 juin 2015

p 349)



Répartition mondiale des génotypes et sous génotypes VHD

(Le Gal F., et collaborateurs : article en révision pour la revue Hepatology 2017)

L'une des questions concrètes directes posée en pratique clinique par cette grande variabilité virale, est celle des outils diagnostiques de mesure de la charge virale ARN pour le suivi des patients infectés. En 2005, prenant en compte cette variabilité génétique du virus, notre laboratoire a développé la première méthode consensus de quantification de la charge virale ARN par RT-PCR en temps réel. Cette technique « maison » a fait l'objet d'un dépôt de brevet d'invention (« Quantification de la charge virale VHD par PCR en temps réel » (PCT/FR02/03239 en septembre 2005). Nous avons dès lors organisé une surveillance sanitaire nationale et internationale des techniques « maisons » et kits commerciaux proposés, à la fois par l'étude des performances de ces kits et surtout par l'organisation de contrôles de qualité nationaux et internationaux.

De plus, nous avons participé avec l'organisation mondiale de la santé (OMS) au développement d'un standard VHD international. Forts de cet étalon international, j'ai organisé le premier contrôle international de qualité des techniques de quantification de la

charge virale ARN. Celui-ci a impliqué 28 laboratoires de toutes les régions du monde exceptée l'Amérique du Sud. Un rapport a été envoyé à chaque laboratoire participant.

La conclusion de toutes ces études est que la plupart des tests commerciaux ou des techniques « maison » sous-estimaient largement ou étaient incapables de quantifier la charge virale ARN Delta sur de nombreux échantillons cliniques. Ces échecs étaient en rapport principalement en rapport avec cette diversité génétique, notamment sur des souches « Africaines ». Plusieurs communications orales et affichées à congrès nationaux et internationaux et plusieurs publications ont été réalisées sur cette question précise (Brichler S. et al., 2013, 2014). L'article décrivant les résultats du contrôle international de qualité que nous avons soumis vient d'être accepté par la revue américaine *Hepatology* (Le Gal et al., 2016 June 2016).

Aussi, prenant en compte l'ensemble des résultats et analyses de ces différentes études, le CNR Associé Delta a participé avec des firmes privées françaises au développement de kit commerciaux consensus. Une étude des performances d'un kit français, vient d'être présentée à deux congrès internationaux (Le Gal et al., EASL Barcelone Avril 2016 ; AFRAVIH, Belgique Avril 2016 et manuscrit en préparation). Celui-ci est actuellement en cours d'évaluation par le CNR Associé Delta dans la « vraie-vie ».

De même, un kit prototype sur plate-forme ouverte à visée des laboratoires des Pays à ressources limitées est en développement avec une start-up française. Ses performances viennent d'être présentées à un congrès (ISHEID Mai 2016). Un projet ANRS d'implantation de ce test dans 4 Pays d'Afrique va être resoumis à l'appel d'offres ANRS de septembre 2016.

Par ailleurs, la biothèque CNR associé Delta, est forte de plus de 2600 échantillons cliniques, complètement caractérisés sur le plan des données démographiques des patients (origine géographique, genre, âge et parfois le mode de contamination) et sur les génotypes des souches et les charges virales delta mesurées chez les patients. Cependant aucune donnée clinique de traitement ou de suivi longitudinal n'y est enregistrée. Nous avons décidé de valoriser cette base de données par le recueil et une analyse rétrospectifs des dossiers cliniques des patients infectés par le VHD suivis en France. L'objectif principal est l'analyse de l'épidémiologie, de l'histoire naturelle, de l'évolution de la maladie, et la détermination des facteurs prédictifs de réponse au traitement. Les objectifs

secondaires sont les corrélations virologiques VHB/VHD, et les corrélations clinico-virologiques. Nous avons développé le projet Deltavir, en collaboration avec l'unité d'hépatologie du CHU Avicenne (Pr. Dominique Roulot), le département de Santé Publique du CHU Henri Mondor (Pr. Françoise Roudot Thoraval). Ce projet dans lequel 1112 patients ont été inclus, à partir de 35 centres français, a été financé par l'ANRS au titre de l'année 2013. Les données ont pu être collectées pour 1057 patients dont 998 (94,4%) étaient en vie contre 59 (5,6%) décédés. Cette étude a confirmé la gravité de la maladie Delta avec dans notre cohorte, un nombre de cas de cirrhose, de décompensation hépatique, de survenue de carcinome hépatocellulaire multiplié par 1,5, 2 et 3,5 à la fin du suivi et un risque de survenue à 10 ans de ces complications de 57,3%, 31% et 15% respectivement.

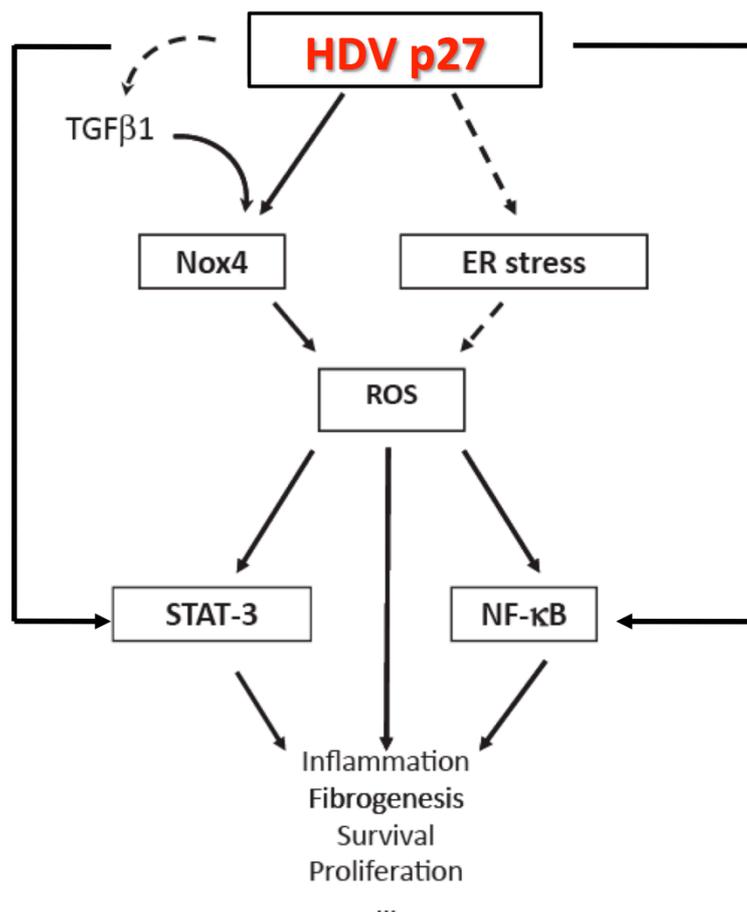
A côté de ces questions cliniques essentielles pour la prise en charge optimale des patients, des questions plus fondamentales peuvent être posées, quant à l'avantage sélectif d'une telle variabilité génétique pour le virus. Et notamment, la question de l'enveloppement par le virus auxiliaire, le VHB. Du fait l'inhibition de la réplication du VHB par le VHD, dont nous avons décrit précédemment les mécanismes incriminés (Williams et al., 2009), nous avons mis au point une méthode de PCR nichée permettant l'amplification des souches VHB chez plus de 40% des patients, présentant y compris des charges virales VHB indétectables. Ainsi grâce à cette technologie, nous disposons actuellement de près de 500 couples de séquences VHB et VHD, obtenus à partir de la cohorte du CNR Associé Delta. Nous avons ainsi pu aborder sous un angle descriptif, la question de la co-spéciation des souches B et Delta selon les géotypes. Ainsi, si des associations sont plus fréquentes entre souches géotypes B et Delta provenant d'une même région géographique, des associations non attendues sont aussi observées entre souches asiatiques et africaines par exemple et même avec des souches VHB 'recombinantes'. Ces résultats viennent d'être présentés en communication affichée à deux congrès internationaux (Gerber A. et al., 2016 EASL Barcelone Avril 2016 ; AFRAVIH, Belgique Avril 2016). Ce fait rend compte probablement des migrations de populations avec leurs souches virales, mais posent aussi la question de l'efficacité de l'enveloppement en fonction de cette variabilité, et donc des déterminants moléculaires de l'enveloppement B/Delta.

Un autre axe tout aussi intéressant en rapport avec la variabilité génétique du virus, que nous sommes en train d'explorer, est celui du mécanisme d'editing de l'ARN VHD.

L'editing est cette modification post-transcriptionnelle de l'ARN antigénomique VHD, un intermédiaire de réplication, médiée par une enzyme humaine, l'adénosine désaminase associée au ARN double brin de type 1 ou ADAR-1. Cette enzyme reconnaît une conformation second-tertiaire particulière de l'ARN antigénomique appelé site ou région d'editing en une position très précise correspondant au codon stop UAG en position 1012 de la phase ouverte de lecture codant la petite protéine Delta (p24). La désamination de ce codon stop UAG va donner un codon tryptophane UGG, et donc un allongement de la phase de lecture qui va permettre la synthèse de la p27, isoforme longue de la protéine Delta. Une étude américaine (Casey J et al. 2012) a montré que la conformation de cette région d'editing serait différente dans sa conformation, entre les génotypes 1 et 3. La conséquence en serait une capacité de fixation différente de l'enzyme ADAR-1 sur son substrat et donc une capacité d'editing, donc de synthèse de la grande protéine delta, différente selon le génotype. Cela se traduit-il par une plus ou grand grande virulence de la souche virale ?

Nous avons engagé l'étude de cette question tout récemment sous un autre angle utilisant les techniques de séquençage à haut débit. L'idée mise en œuvre, a été de quantifier dans les échantillons cliniques les séquences éditées (avec le codon UGG) versus les séquences non éditées (UAG) grâce à l'automate MiSeq® Illumina disponible au laboratoire. L'échantillonnage d'étude est composé : de clones purs « édités » et « non édités » déjà établis au laboratoire ; d'une sélection d'échantillons de tous les génotypes ; d'échantillons cliniques de patients sans et avec traitement interféron de la biothèque du CNR associé Delta. La phase préliminaire est en cours, en collaboration avec le CNR principal B, C et delta, avec la conception d'un logiciel d'analyses des séquences à partir de ceux déjà réalisés en interne et brevetés notamment le logiciel Pyrotrop (appartenant avec les logiciels PyroClass, PyroMute et Pyrodyn au 'package' ProPack) utilisé pour le virus de l'immunodéficience humaine (Rodriguez C. et al., 2015). Une technicienne du laboratoire a mené à bien ce travail dans le cadre d'un Master 2 de bio-informatique. Cet outil que nous sommes en train d'évaluer, permettra de quantifier par NGS les taux d'ARN éditées versus non éditées et donc les capacités d'editing selon le génotype des souches infectantes. Nous pourrions ainsi explorer l'évolution des ARN éditées au cours de l'histoire naturelle de la maladie ou au cours de traitement. Il pourrait aussi fournir un nouvel outil pronostic de l'évolution de la maladie.

Par ailleurs, toujours dans le domaine de la recherche fondamentale, plusieurs résultats préliminaires concernant la pathogenèse spécifiquement liée au VHD, réalisés essentiellement au sein de l'unité INSERM U845, sont d'ores et déjà acquis. Ils ont été l'objet des thématiques des travaux des étudiants que j'ai encadrés en M1, M2, et en doctorat d'université. Nous avons en effet montré dans des modèles in vitro essentiellement, que la grande protéine du VHD, la p27 était capable : (i) d'activer le facteur de transcription STAT-3 (signal transducer and activator of transcription -3), protéine activée de façon constitutive dans de très nombreux cancers (prostate, sein, mélanome, ...); (ii) le facteur NFκB, (iii) d'activer la voie du stress oxydant. Sur ce dernier point, nous avons montré la voie de la NADPH oxydase (Nox-4) était impliquée dans la production des radicaux oxygénés par la p27 (Williams et al., 2012). Toutefois, et vraisemblablement en rapport avec notre modèle, nous n'avons pu mettre en évidence de façon claire un stress du réticulum endoplasmique.



Actions de la grande protéine Delta (p27) (Williams V. et coll., J Viral Hepatitis 2012)

Par ailleurs des données non publiées ont été observées : p27 est capable, dans notre modèle in vitro, (i) d'activer le cycle cellulaire, via la cycline D1 ; (ii) d'inhiber l'apoptose, à la fois par la séquestration de la protéine pro-apoptotique Bax, et par une activation de la transcription et de la traduction du gène anti-apoptotique Bcl-xL.

Ces résultats préliminaires gagneront à être revalidées sur un modèle plus relevant à définir ou à concevoir, prenant en compte notamment les modèles d'infection de lignées hépatocytaires grâce à la découverte du récepteur hépatocytaire des virus B et Delta, le NTCP. Ces études devraient nous permettre d'avancer dans la compréhension d'un modèle de carcinogenèse VHB / VHD impliquant notamment une synergie des protéines HBx du VHB et p27 du VHD dans les effets observés.

6.2 Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR en 2016

Publications internationales :

1. Le Gal F, Brichler S, Sahli R, Chevret S, Gordien E. First international external quality assessment for hepatitis Delta virus RNA quantification in Plasma. *Hepatology* 2016;64(5) : 1483-94

Communications internationales :

1. A New Generic Real-Time PCR Kit For Hepatitis Delta RNA Viral Load Quantification. Joany Castéra-Guy, Pierre-Alain Rubbo, Edouard Tuillon, Frédéric Le Gal, Emmanuel Gordien. International Symposium Hiv & Emerging Infectious Diseases, 25-27 Mai 2016 France.

2. Co-Spéciation Des Virus VHB/VHD : Etude Sur 826 Patients Infectés. A. Gerber, S. Dziri, S. Brichler, F. Le Gal, E. Gordien. 8e Conférence Internationale Francophone VIH/Hépatites - AFRAVIH 2016. Bruxelles

3. Evaluation d'une nouvelle trousse de quantification de la charge virale VHD par RT-PCR en temps réel. Frédéric Le Gal, Fabrice Mirco, Fernando Neri Pinto, Elhame Anouhal, Ségolène

Brichler, Emmanuel Gordien. 8e Conférence Internationale Francophone VIH/Hépatites - AFRAVIH 2016. Bruxelles

4. Co-speciation of HBV and HDV genotypes: study of plasma samples of 826 infected patients. A. Gerber, S. Dziri, S. Brichler, F. Le Gal, E. Gordien. Po179 EASL, Barcelona, 11 - 17 April 2016: Journal of Hepatology 04/2016; 64: S385

5. Evaluation of a new commercial assay using a one-step real time RT-PCR technology for HDV RNA viral load quantification F. Le Gal, M. Fabrice, F. Neri Pinto, E. Anouhal, S. Brichler, E. Gordien. Po118, EASL Barcelona, 11 - 17 April 2016: Journal of Hepatology 04/2016; 64: S360

6. Epidemiological, Clinical And Virological Features Of Hepatitis Delta Virus Infection In France. S. Brichler, F. Roudot-Thoraval, D. Samuel, P. Marcellin, O. Chazouilleres, T. Poynard, V. Thibault, F. Zoulim, P. André, N. Ganne, H. Fontaine, Z. Benabdesselam, R. Layese, E. Gordien, D. Roulot. P0579, EASL Barcelona, 11 - 17 April 2016: Journal of Hepatology 04/2015; 62:S532-S533. Doi:10.1016/S0168-8278(15)30785-6

7. Predictive factors of cirrhosis, hepatic decompensation and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis delta. D. Roulot, S. Brichler, R. Layese, D. Samuel, P. Marcellin, O. Chazouilleres, T. Poynard, F. Zoulim, N. Ganne, H. Fontaine, Z. Ben Abdesselam, E. Gordien, F. Roudot-Thoraval. P0600, EASL Barcelona, 11 - 17 April 2016: Journal of Hepatology 04/2015; 62: S541-S542. Doi:10.1016/S0168-8278(15)30806-0

▪ **Conférences sur invitation :**

« L'hépatite virale Delta, est-elle un problème de santé publique en Afrique ? »

Faculté de médecine de Cotonou – Bénin, Février 2016

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Sans objet. En effet, 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.

8 Programme d'activité pour 2017-2018

Au cours de l'année 2017-2018, l'activité d'expertise microbiologique, de conseils, et de surveillance épidémiologique, du CNR associé Delta se développera et s'intensifiera dans tous les domaines d'excellence listés ci-dessus et d'ores et déjà engagés, à la fois au niveau national et international. Ces activités seront réalisées en synergie entre le CNR principal, par le développement de projets communs transversaux, par la mise en commun des expertises, des compétences et logistiques respectives.

Typage prospectif des souches VHD répliquant en France et dans diverses populations (collaboration avec différentes équipes de Pays en développement : Bénin, Cameroun, Centrafrique, Guyane, Kenya, Madagascar, République du Congo, ...). Le typage prospectif des souches VHD infectant tout nouveau patient sera systématiquement réalisé. Et ce que ce soit sur des souches de patients résidant en France ou non. En effet, les laboratoires privés nous adressent tous les mois une aliquote de sérum/plasma des patients ayant une charge virale positive dans le cadre de notre activité de référence (158 cette année 2016), venant de 22 Pays différents, en plus des 134 échantillons de patients résidant en France). Ainsi au cours des 5 prochaines années, en moyenne 200 à 300 géotypes par an (soit 1000 à 1500) seront réalisés. De plus plusieurs collaborations sont en cours (Éthiopie, Madagascar, République du Congo) et à venir (Bénin, Cameroun, Centrafrique, Guyane, Kenya), une fois les financements trouvés. La variabilité génétique des souches VHD sera aussi étudiée en temps réel.

Taxinomie du VHD (collaborations ICTV). La conséquence directe de notre expertise dans le domaine de la variabilité génétique du VHD, avec notamment la proposition de définition de 'sous-géotypes' au sein des différents géotypes, a été la sollicitation par des experts du comité international de la taxinomie des virus (ICTV). Les travaux achevés cette année et la

publication soumise, serviront de base aux discussions à venir suite à notre première réunion de travail à Berlin en Janvier 2015. L'objectif est la proposition à la communauté scientifique internationale d'une taxinomie du genre Deltavirus, en huit génotypes et en sous génotypes au sein des différents génotypes. Le corollaire sera la nécessaire collaboration avec des équipes d'Amérique du Sud et d'Asie du Sud-Est respectivement, pour la fourniture d'échantillons de génotypes VHD-3 d'une part et VHD-2 et -4 d'autres part, région où circulent les souches de ces génotypes. Les contacts et échanges de plasmides (Drs Mei Chao et Yeh de l'université de Chang Gung à Taiwan) et de fichiers séquences (Pr. Wu du laboratoire des maladies digestives de l'université de Hong Kong, Chine) de génotype 4 ont d'ores et déjà eu lieu. De même des pourparlers sont en cours e Dr Alan Kay, ancien chercheur à INSERM Lyon avec qui a développé des collaborations sur le VHD-3 avec le Dr Parana membre d'une équipe brésilienne de l'université fédérale de Bahia.

Techniques de quantification : optimisation et implantation en France et dans diverses régions du monde. La validation récente d'un kit de quantification de la société Eurobio en cours de marquage CE constitue une avancée majeure dans ce domaine, à l'ère de l'avènement de nouvelles thérapeutiques anti-VHD. Ce kit est utilisé en routine par le CNR associé Delta. Plusieurs axes d'amélioration sont envisagés pour la généralisation et la simplification de son utilisation. Après l'étape d'automatisation de l'extraction des ARN, nous envisageons l'automatisation de l'étape de RT-PCR afin de réduire encore les risques d'erreurs ainsi que le temps technicien. Cette validation se fera par l'étude en parallèle avec notre technique « consensus maison » développée en 2005 (Le Gal et al., JCM 2005). L'étape ultérieure sera l'accréditation selon la norme ISO 15189 au sein du laboratoire. De même l'adaptation de la technique sur d'autres automates que ceux proposés par le fabricant, sera évaluée. Une collaboration sera établie avec le service recherche et développement de la firme pour l'optimisation de l'outil, en termes d'automatisation sur la base des expériences réalisées. Une optimisation aussi est envisageable en termes de sensibilité. En effet la question du choix des fluorochromes (FAM et HEX) pourrait être revue dans le but de diminuer le bruit de fond obtenu avec des échantillons VHD négatif, pouvant potentiellement masquer un échantillon VHD faiblement positif vrai. D'autre part, les collaborations établies avec les autres firmes privées, Omunis et Lipsdiag seront poursuivies. En particulier, le projet de recherche ANRS de validation et d'implantation du kit ouvert de la

société Omunis, Puma HDV kit dans des Pays en développement, a été soumis à nouveau cette année et accepté pour financement. Le projet, limité cette fois-ci à deux pays, le Cameroun et la République de Centrafrique ayant expérience, moyens et savoir-faire, permettra en même temps d'avoir des données de séroprévalence de l'infection Delta dans des cohortes VHB existantes. D'autre part, il s'agit de Pays de forte prévalence VHB et VHD *a priori*, et surtout, tous les génotypes VHD sont retrouvés au Cameroun notamment. L'un des objectifs secondaires de l'étude est de déterminer le génotype des souches infectant les patients. Ainsi nous pourrions disposer et caractériser sur le plan moléculaire des souches africaines circulant en Afrique et étayer notre hypothèse d'une apparition du VHD au Cameroun.

Organisation d'un contrôle national de qualité annuel du diagnostic de l'infection VHD en sérologie et biologie moléculaire. L'institution d'un contrôle annuel de qualité à partir d'échantillons cliniques d'intérêt sélectionnés de la souchothèque du CNR Associé, nous paraît indispensable. Il permettra d'évaluer en France les capacités diagnostiques des laboratoires publics et privés de France (Métropole et des DROM) concernant le VHD. De plus il constituera l'indispensable contrôle externe pour les laboratoires (qui nous en ont fait la demande) dans leur processus d'accréditation.

HDV et NGS (travaux communs avec le CNR coordonnateur). La disponibilité à la fois des automates et de l'expertise technique et scientifique et au sein du CNR B, C et Delta (CNR principal et associé) de nouvelles générations de séquençage (NGS) permettent d'ouvrir un champ d'investigation « HDV et NGS ». La récente mise au point d'un logiciel de quantification des formes éditées et non éditées de l'ARN Delta au cours d'un travail conjoint au sein du CNR, devra aller à son terme puis être testé en clinique. En effet, il s'agira de savoir si la proportion d'ARN non édité (permettant la synthèse de la petite protéine) versus ARN édité (permettant la synthèse de la grande protéine) varie au cours de l'histoire naturelle de la maladie avec ou sans traitement et aurait une quelconque valeur prédictive dans l'évolution de la maladie. Des travaux préalables au sein de notre équipe, avaient montré une interférence de la grande protéine delta avec les voies de signalisation cellulaire via STAT-3 et NF- κ B, et avec le stress oxydant via la NADPH oxydase. Par ailleurs, un champ de réflexion NGS et VHD sera ouvert notamment pour l'analyse moléculaire des souches des

patients répondeurs/rechuteurs à l'arrêt du traitement interféron, ou avec les nouvelles thérapies anti VHD, de même que dans l'apport éventuel du NGS dans la caractérisation moléculaire plus poussée des génotypes et sous génotypes.

Horloge moléculaire du VHD (travaux communs avec le CNR coordonnateur). L'origine du virus de l'hépatite Delta est encore à ce jour une énigme. Aucun équivalent animal n'a été décrit à ce jour. Ses caractéristiques répliquatives le rapprochent des virus des plantes. Des hypothèses d'une origine humaine ont aussi été avancées (Pelchat and Taylor, 2014). Des études sur la prévalence de l'infection VHB et VHD menées aux Antilles françaises, territoires de fortes migrations africaines du fait de la traite négrière française de 17^{ème} au 19^{ème} siècles ont retrouvé une prévalence de 2 à 3% dans les années 1990 (Fest et al. 1993) et aujourd'hui, 0,9%, du fait des campagnes de vaccination anti-VHB. Cependant aucune infection par le virus Delta n'a été retrouvée. Cependant, en Amérique du Sud, notamment en Amazonie, des épidémies d'infections delta fulminantes sévères ont été décrites, et le génotype VHD-3, présentant jusqu'à 40% de divergence génétique avec les autres virus Delta a été incriminé. Tout récemment au Nord-Est du Brésil (Santos et al. 2016), pays de traite négrière du 15^{ème} au 19^{ème} siècles, des souches de génotype VHD-8 « africain », chez des patients autochtones ont été décrites, confirmant l'étude plus ancienne de Barros et al. 2011. De même en 2015 un VHD-1 avait été rapporté. Aussi la faible prévalence du delta aux Antilles, est-elle le reflet d'une émergence récente du VHD ? La disponibilité de 169 souches complètes caractérisées au CNR associé, avec les caractéristiques précises des patients, nous permettra très rapidement, avec le concours du CNR principal d'étudier l'horloge moléculaire du virus et d'apporter des éléments au débat sur l'origine du virus.

Co-spéciation VHB – VHD (collaborations avec Camille Sureau à l'INTS). Ainsi à ce jour, 10 génotypes VHB et 8 génotypes VHD ont été décrits, avec l'individualisation de sous génotypes au sein de ces génotypes B et Delta caractérisés par une origine géographique précise. Mais du fait des fortes migrations de populations différentes souches VHB et VHD se sont dispersées dans de nombreux Pays. Nous disposons actuellement de près de 500 couples de séquences VHB et VHD, obtenus à partir de la cohorte du CNR Associé Delta qui nous ont permis de décrire la co-spéciation des souches B et Delta selon les génotypes (Gerber A. et al., 2016 EASL Barcelone Avril 2016 ; AFRAVIH, Belgique Avril 2016). Une

publication est en préparation sur ce point. L'efficacité de la morphogénèse des virions Delta est-elle similaire selon la variabilité génotypique B/Delta ? Ceci nous amène à explorer les déterminants moléculaires de l'enveloppement B/Delta. De façon très intéressante, ces séquences VHB et VHD correspondant à la région d'enveloppement de la ribonucléoprotéine Delta par les protéines d'enveloppe du VHB, sont disponibles pour près de 500 couples B/Delta. Ainsi nos efforts actuels tendent vers la détermination des mécanismes moléculaires et conformationnels de ces régions impliquées dans la morphogénèse des virions delta. Des collaborations nationales sont d'ores et déjà établies et nous ont permis d'élaborer un axe de recherche fondamentale dans ce domaine pour notre équipe. Des discussions et collaborations initiales sont en cours avec le Dr Camille Sureau de l'INTS pour la mise au point d'un modèle in vitro en culture cellulaire, prenant avantage de son expertise des modèles d'infection en lignées hépatocytaires exprimant le récepteur NTCP (transporteurs des taurocholates) du VHB et du VHD. Des expériences de mutagenèse dirigée permettront de définir les motifs indispensables dans la morphogénèse des virions B et Delta.

Protocoles de traitement anti-VHD (actions concertées ANRS). De nouvelles thérapies anti-VHD sont en cours d'essais cliniques de phase 2 : le Myrcludex B, inhibiteur d'entrée du VHB et du VHD et le Lonafarnib®, inhibiteur de prénylation et donc de la morphogénèse des virions Delta ainsi que les polymères d'acides nucléiques développés par la société canadienne Replicor. Un projet ANRS est en cours d'élaboration avec le Pr. Roulot, hépatologue référent du CNR associé Delta, *a priori* avec ces deux protocoles randomisés. Le CNR Delta sera le laboratoire référent pour la quantification de la charge virale Delta selon un calendrier défini, permettant des études annexes d'étude de la cinétique de décroissance de la charge virale sous traitement (voir ci-dessous). Des études secondaires de comparaison de l'efficacité et de la sensibilité de kits commerciaux dans ce contexte seront étudiées, et ce en fonction aussi de la variabilité génétique des souches infectante. Le génotypage systématique des souches sera réalisé. Forts de l'expérience de l'étude Deltavir, de nombreux marqueurs pourront aussi être étudiés, tels l'AgHBs quantitatif, ainsi que les marqueurs non-invasifs de fibrose hépatique (voir ci-dessous). De même le nouveau logiciel de quantification des formes éditées et non-éditées de l'ARN Delta, développé en partenariat avec le CNR principal, pourra être étudié en pratique clinique prospective. Enfin

l'analyse moléculaire des souches lors des rechutes ou échec de traitement devra être envisagé.

Modélisation de la cinétique de la charge virale Delta au cours des traitements de l'infection (collaboration avec Jérémie Guedj et le CNR coordonnateur). Une seule étude à notre connaissance a été conduite sur la modélisation de la cinétique de la charge virale sous traitement (Guedj J et al. 2014). Celle-ci sera donc un des enjeux secondaires important de l'étude ARNS décrite ci-dessus. Le partenariat scientifique avec Jérémie Guedj dans la définition du 'design' de l'étude est acquis et sera facilité par son appartenance comme nous-mêmes à l'équipe INSERM U955 dirigée par le Pr Pawlotsky.

Tests non invasifs de fibrose et VHD. De même, la validation des tests non invasifs de fibrose hépatique dans la maladie VHD seront aussi un autre objectif de cette étude clinique. Des contacts ont été établis avec le Pr. Poynard Thierry et le Dr Munteanu Moana (Halfon P et al. 2002 ; Poynard T et al., 2014 ; Munteanu M et al. 2016) pour le 'design' de l'étude. Le Fibrotest, l'Actitest, mais aussi d'autres marqueurs (Lutterkort GL et al. 2016) seront utilisés pour lors évaluation au cours de la maladie sous traitement efficace et lors des rechutes éventuelles. Ainsi grâce sa cohorte unique au monde, à son expertise reconnue au niveau national et international, au suivi prospectif des souches virales circulant en France et dans de nombreuses régions du monde, le CNR associé Delta se situe à l'interface de l'épidémiologie clinique et moléculaire, de la recherche clinique, appliquée et fondamentale et donc un atout de santé publique majeur. L'une des finalités immédiates de ces études sera la possibilité de contribuer à l'édiction de recommandations nationales et internationales inexistantes à ce jour, pour la prise en charge clinique, biologique, histologique et thérapeutique des patients infectés par le virus de l'hépatite Delta.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR coordonnateur et des laboratoires associés

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 Professeur Stéphane CHEVALIEZ, Directeur Adjoint.

Le CNR coordonnateur est le Laboratoire de Virologie du Département de Virologie, Bactériologie-Hygiène, Mycologie-Parasitologie, Unité Transversale du Traitement des Infections du Groupe Hospitalier Henri Mondor (Chef de Département : Professeur Jean-Michel Pawlotsky), adossé à l'équipe de recherche "Physiopathologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques et des Cancers Liés" 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 2 laboratoires associés seront le Département d'étude des Agents Transmissibles par le Sang de l'Institut National de la Transfusion Sanguine localisé à Paris 15 (Responsable : Dr Syria Laperche) et le laboratoire de Virologie des hôpitaux universitaires Paris-Seine-Saint-Denis, localisé à l'hôpital d'Avicenne à Bobigny (Responsable : Dr Emmanuel Gordien).

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, est sur l'extérieur par le biais de multiples connexions, relations et collaborations. Ceci est en particulier le cas avec les acteurs institutionnels : Santé Publique France [regroupement de l'Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé (Inpes), l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et l'Établissement de Préparation et de Réponse aux Urgences Sanitaires (Eprus) depuis le 1^{er}

mai 2016], la Direction Générale de la Santé (DGS), l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM), l'Établissement Français du Sang (EFS), le Centre de Transfusion des Armées (CTSA), l'Agence de la Biomédecine (ABM), l'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS), ainsi que l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) au niveau Européen. La coopération se fait également avec l'ensemble des partenaires publics et privés impliqués dans la surveillance ou associés à des évènements épidémiologiques dans le cadre des activités du CNR (hôpitaux, cliniques, laboratoires d'analyses de biologie médicales, laboratoires de recherche, ...).

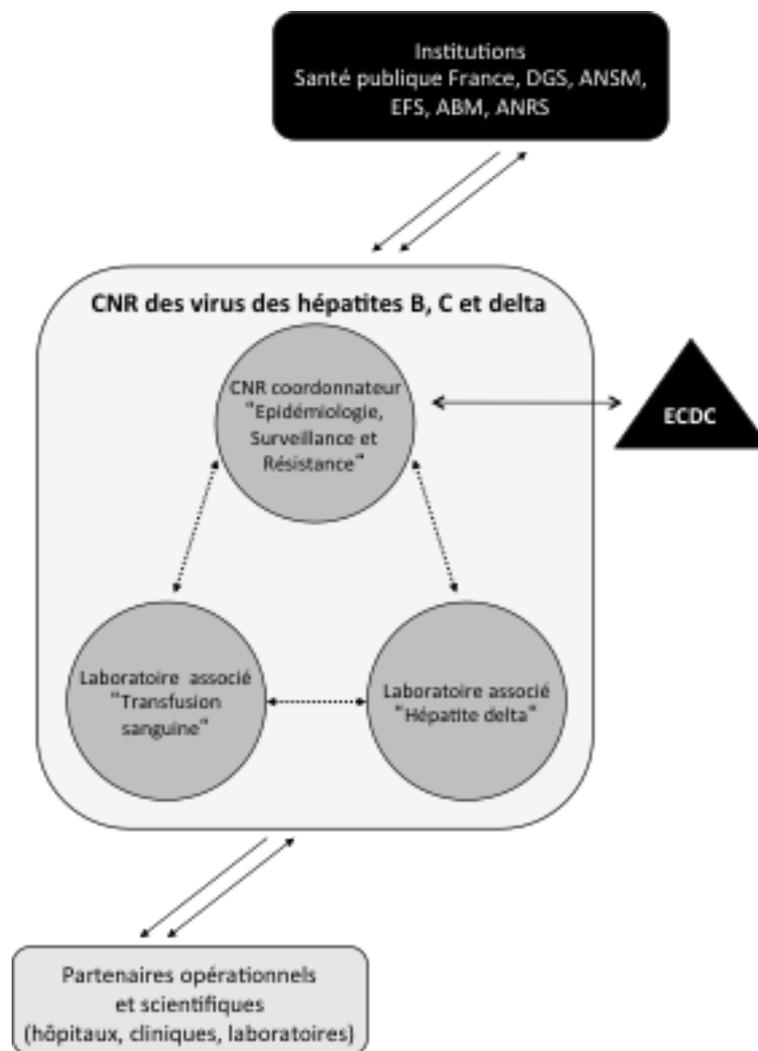


Figure 1 : Structure du CNR des virus des hépatites B, C et delta.

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, le développement, l'évaluation et la contribution au contrôle de méthodes de dépistage et de diagnostic, de typage et de détermination des virémies, de nombreuses études ont été réalisées dans le cadre de l'étroite collaboration entre les 3 laboratoires, qui sera poursuivie et amplifiée, et bénéficiera de l'expertise de participants extérieurs au CNR ; on pourra citer l'Observatoire National de la résistance du VHC aux antiviraux directs adossé à la cohorte nationale HEPATHER (ANRS CO22), le Groupe de Virologie Médicale de l'Action Coordonnée 33 (AC33) de l'ANRS, en particulier pour la conception et la mise à disposition de contrôles de qualité nationaux concernant la détection-quantification de l'ARN du VHD et la détermination des profils de résistance du VHC aux antiviraux directs.

Le développement et la validation de tests de dépistage (TROD) sur des matrices non conventionnelles (sang total capillaire, salive) ou de supports spécifiques permettant le recueil de sang total capillaire (papier filtre, micro-prélèvement) utilisés comme alternative au prélèvement veineux sont en plein essor dans le champ des hépatites virales. Ils ont un intérêt particulier vis-à-vis de populations marginalisées sans accès aux structures de soins classiques, et un rôle majeur dans les pays à ressources limitées afin de tester les infections transmissibles par les produits sanguins.

Une des missions importantes du CNR concerne le typage moléculaire des souches d'hépatites B, C et delta à l'aide d'analyses phylogéniques. Le développement de la biologie moléculaire au cours de la dernière décennie, avec en particulier le développement des méthodes de séquençage à haut-débit de nouvelle génération (une plate-forme regroupant les dernières technologies et des approches originales de bio-

analyse est implantée au cœur des locaux de l'hôpital Henri Mondor ; Les 2 laboratoires associée disposant également de séquenceurs haut débit), permet d'investiguer des situations complexes d'intérêt médical et scientifique. Ces nouvelles technologies sont mises à profit dans les études de cas isolés, cas groupés, épidémies, auxquelles les CNR sont régulièrement confrontés.

La détection et l'investigation virologique de "nouveaux agents viraux" potentiellement impliqués dans la survenue d'hépatites chez l'homme reste d'actualité, même si cette éventualité ne s'est pas présentée jusqu'à présent.

L'étude de la résistance des virus d'hépatites aux antiviraux directs se fera en étroite collaboration avec l'ANRS à travers l'Observatoire National de la résistance du VHC aux antiviraux directs adossé à la cohorte nationale HEPATHER (ANRS CO22), ainsi que du groupe de virologie médicale de l'Action Coordonnée 33 (AC33), tous deux coordonnés par les Prs Jean-Michel Pawlotsky et Stéphane Chevaliez.

L'expertise microbiologique en sécurité transfusionnelle et des dons d'organes, qui recouvre notamment l'évaluation des réactifs de dépistage et de confirmation, est assurée conjointement par le laboratoire du Département d'étude des Agents Transmissibles par le Sang de l'INTS pour la sécurité transfusionnelle et par le laboratoire coordonnateur pour celle des dons d'organes, de tissus et de cellules. Ce dernier abrite en effet le laboratoire Central de Qualification Virologique des Organes, Tissus et Cellules de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) (Responsable : Dr Dominique Challine), qui couvre un large territoire allant de l'Île-de-France à la région Centre-Val de Loire et la Normandie ainsi que les Antilles françaises.

L'évaluation du risque de transmission après accident d'exposition au sang dans le cadre d'un milieu de soins ou autre est assurée par l'une des composantes du CNR des virus des hépatites B, C et delta, dans le cadre des activités diagnostiques.

Contribution à la surveillance épidémiologique

La surveillance des types viraux en France et la détection des virus mutants émergents susceptibles de poser des difficultés diagnostiques, de prise en charge thérapeutique ou d'échappement à la vaccination (pour le VHB) sont assurées conjointement par les 3 laboratoires dans leurs domaines de compétences respectives.

La surveillance de la résistance aux antiviraux pour l'hépatite C et pour l'hépatite B, déjà évoquée précédemment, implique le CNR coordonnateur ainsi qu'un réseau de cinq laboratoires dispersés sur le territoire national pour ce qui est de la résistance du VHC aux antiviraux directs dans le cadre de l'Observatoire National, en lien avec l'ANRS.

La participation aux études épidémiologiques coordonnées par l'agence nationale de santé publique est assurée par l'un ou l'autre des laboratoires en fonction de leurs domaines de compétences. Le laboratoire coordonnateur a participé à de nombreuses études épidémiologiques (PREVAGAY, BAROTEST, AFROBAROMETRE, etc) qui ont été détaillées précédemment. Ces dernières ont permis de mieux renseigner la prévalence et l'incidence des hépatites B et C dans certaines populations (population générale, HSH, populations africaines et caribéennes d'Île-de-France).

Les collaborations avec l'EFS et l'ANSM pour la surveillance des infections par le VHB et le VHC dans la population des donneurs de sang, en particulier l'analyse de la diversité des souches circulant en lien avec la surveillance de la diversité des souches virales au niveau national, sont assurées par le laboratoire du Département d'Étude des Agents Transmissibles par le Sang de l'INTS. Ce laboratoire a également la capacité de détecter et d'identifier de nouveaux virus pouvant être responsables d'hépatites transmissibles par le sang.

L'investigation de cas groupés d'infection par le VHB et le VHC par la comparaison d'isolats et l'étude des modalités de transmission résiduelle sont assurées par le laboratoire coordonnateur du Département de Virologie, Bactériologie-Hygiène, Mycologie-Parasitologie, Unité Transversale du Traitement des Infections des hôpitaux universitaires Henri Mondor et le laboratoire du Département d'Étude des Agents Transmissibles par le Sang de l'INTS. Ces analyses sont réalisées à l'aide de techniques développées et validées dans les 2 laboratoires à partir de souches de références communes aux 2 laboratoires.

La surveillance au niveau européen, en particulier, celle de la résistance aux antiviraux, est sous la responsabilité de l'ECDC. Il n'existe pas à ce jour de programme de surveillance actif et financé. Néanmoins le CNR est à la disposition de l'ECDC pour tout étude ou programme susceptibles de se développer dans ce domaine.

Contribution à l'alerte

Les trois laboratoires qui constituent le CNR des virus des hépatites B, C et delta contribuent et contribueront à l'alerte en signalant à l'agence nationale de santé publique tout évènement sanitaire inhabituel (suspicion de cas groupés, émergence d'une souche particulière, forme cliniques inhabituelles, ...).

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 et des Cancers Liés" (INSERM U955) dirigée par le Pr Jean-Michel PAWLITSKY à l'hôpital Henri Mondor de Créteil.

1.2 Moyens humains

Le personnel suivant est affecté au fonctionnement du CNR coordonnateur :

	Qualification	ETP	Organisme payeur
Dominique CHALLINE	PH	0,25	AP-HP
Jean-Michel PAWLITSKY	PU-PH	0,25	UPEC/AP-HP
Stéphane CHEVALIEZ	PU-PH	0,60	UPEC/AP-HP
Magali BOUVIER-ALIAS	PH	0,25	APHP
Slim FOURATI	AHU	0,25	UPEC/AP-HP
Christophe RODRIGUEZ	MCU-PH	0,25	UPEC/AP-HP
Alexandre SOULIER	IE	1,0	AP-HP
Flora DONATI	IE	1,0	Dotation CNR
Nazim AHNOU	IE	1,0	Dotation CNR
Lila POITEAU	TS	1,0	AP-HP
Frédéric CLERC	CMT	0,10	AP-HP
Laurence LEDIT	Secrétaire	0,10	AP-HP
12 techniciens			APHP

Jean-Michel PAWLITSKY, PU-PH
 Chef de Pôle, Chef de département

Claude-James SOUSSY PU-PH, vacations Accréditation; 3 secrétaires; 4 agents; 7 internes, 3 externes

VIROLOGIE & CNR	BACTERIOLOGIE - HYGIENE	MYCOLOGIE - PARASITOLOGIE	UNITE TRANSVERSALE DE TRAITEMENT DES INFECTIONS
Stéphane CHEVALIEZ, MCU-PH	Jean-Winoc DECOUSSER, MCU-PH	Françoise BOTTEREL, PU-PH	Raphaël LEPEULE, PH
Christophe RODRIGUEZ, MCU-PH Dominique CHALLINE, PH Magali BOUVIER-ALIAS, PH Slim FOURATI, AHU Alfred KOBAL, PA	Lionel DEFORGES, MCU-PH Vincent FIHMAN, PH Houria NEBBAD, PH Marine DESROCHES, AHU Fazia OULD-HOCINE, PAC Lamia LIMAM, PA Sophie BLEUVEN, PA Ahmed OUSSER, PA	Françoise FOULET, PH Nawel AIT AMAR, AUA Jean Benjamin MURAT, PA Karima CHEIKH, PA Christine BONNAL, PA Jean-Marc COSTA, PA	Olivia SENARD, Ass Spe
Frédéric CLERC, CMT 12,4 techniciens APHP 2 IE APHP 2 AI CNR 3 TEBANRS	Isabelle DE ROCHEBOUET, CMT 20 techniciens APHP 3 techniciens bio-hygiénistes	4 techniciens APHP 1 agent APHP	

Figure 2 : Organigramme du Département de Virologie, Bactériologie - Hygiène, Mycologie - Parasitologie, Unité Transversale de Traitement des Infections du GH Henri Mondor.

Le personnel suivant est affecté au fonctionnement des laboratoires associés :

Laboratoire de Virologie de l'INTS (Responsable : Dr S. LAPERCHE)

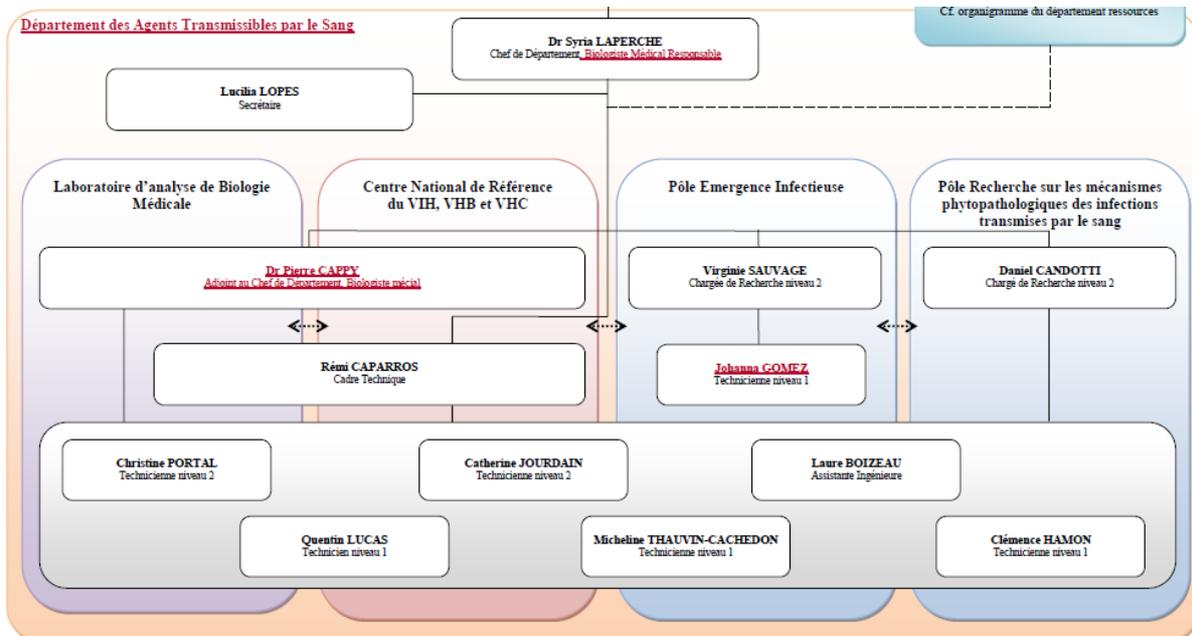


Figure 3 : Organigramme du laboratoire de virologie transfusionnelle

Laboratoire de Virologie d'Avicenne (Responsable : Dr E GORDIEN)

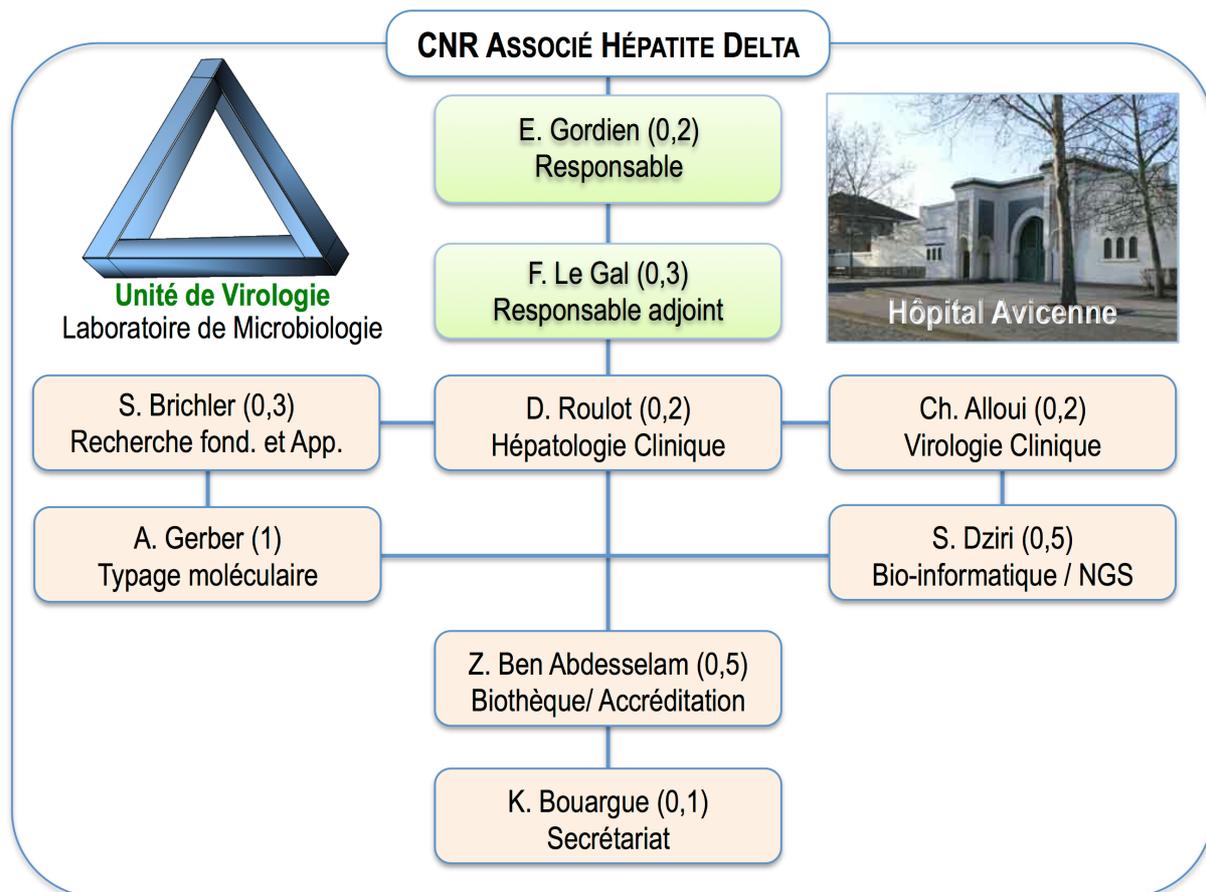


Figure 4 : Organigramme du laboratoire de virologie d'Avicenne

1.3 Locaux et équipements

CNR coordonnateur

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 (**Figure 5**). Le laboratoire fonctionne 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Une réorganisation physique du laboratoire est en cours dans le cadre du schéma directeur des laboratoires du Pôle de Biologie. 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 fonctionnelle depuis quelques mois. Cette plateforme est

localisée dans des locaux dédiés, contigus au Département de Virologie, Bactériologie-Hygiène, Mycologie-Parasitologie, Unité Transversale du Traitement des Infections, sous la responsabilité du Pôle de Biologie (Chef de Pôle : Pr Jean-Michel Pawlotsky) et de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB).



Figure 5 : Plan du département de Virologie, Bactériologie-Hygiène, Mycologie-Parasitologie, Unité Transversale du Traitement des Infections avec les locaux dédiés au laboratoire de Virologie représenté en jaune, la plate-forme de NGS en rouge et les surfaces communes en vert.

Laboratoire de Virologie de l'INTS (Responsable : Dr S LAPERCHE)

Les locaux abritant le plateau technique de Virologie sont composés d'une surface de 314 m² incluant les laboratoires, les zones de stockage ambiant et froid pour le courant et les bureaux.

Les zones de stockage froid (-20, -80C°) abritant les collections sont centralisées au sous-sol du bâtiment et surveillées 24 h sur 24 par une centrale de température avec intervention du personnel d'astreinte sur alarme.



Figure 6 : Plan du laboratoire de Virologie de l'INTS.

Laboratoire de Virologie d'Avicenne (Responsable : Dr E GORDIEN)

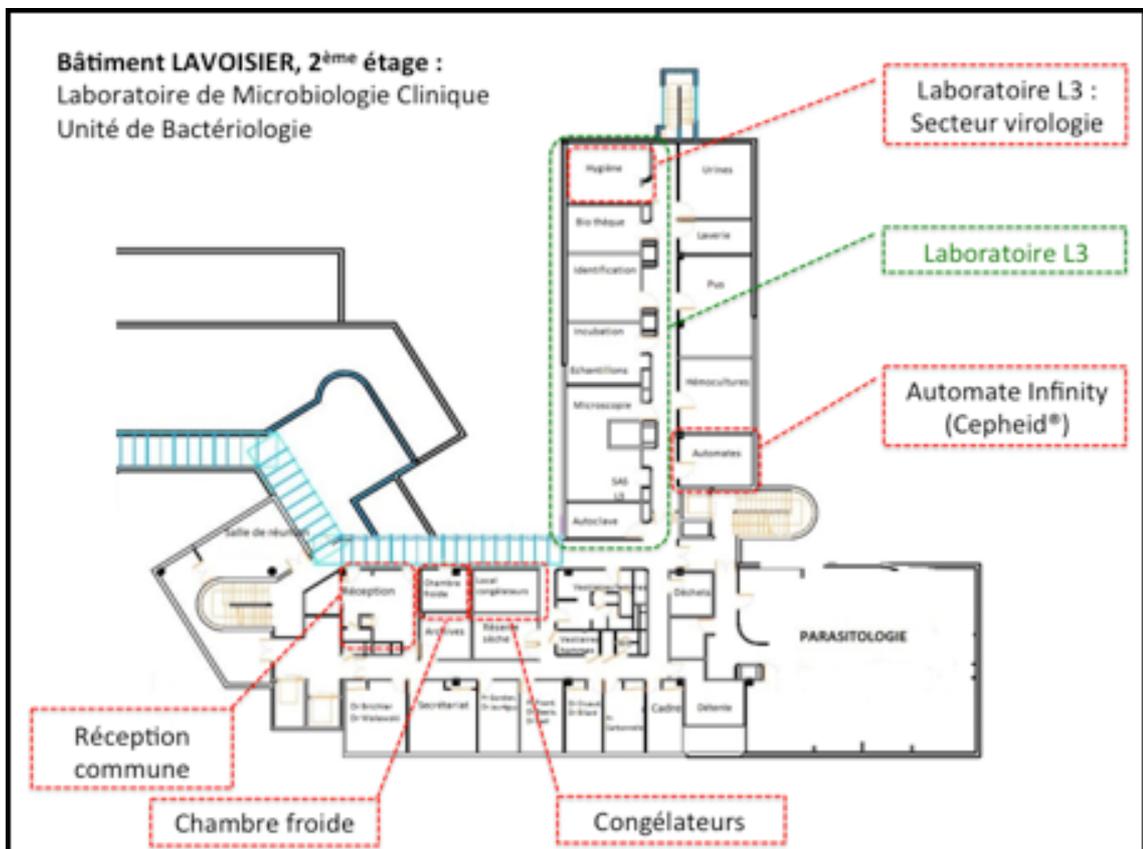
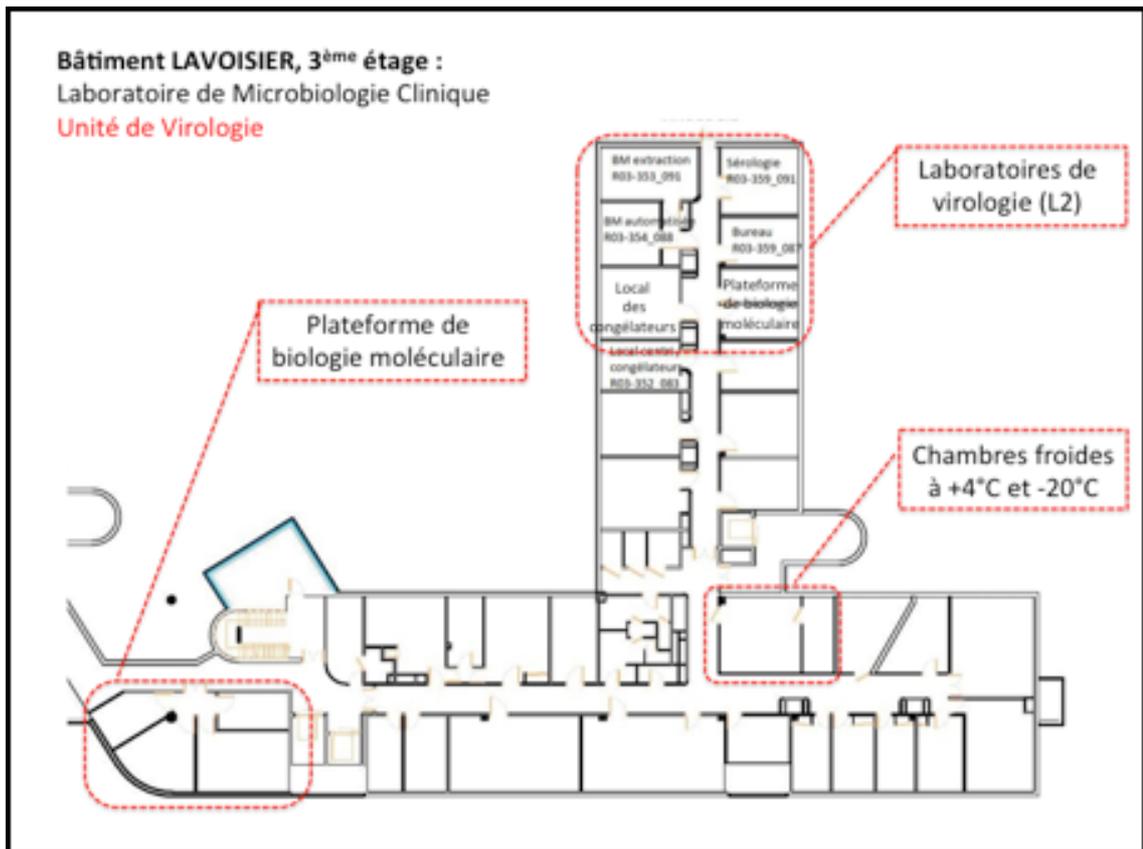


Figure 7 : Plan du laboratoire de virologie d'Avicenne

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

Principaux équipements

Les équipements à la disposition du laboratoire coordonnateur sont les suivants :

- Automates de sérologies virales

- . 3 VIDAS (BioMérieux),
- . 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/thermocycleur PCR "en temps réel" DxN VERIS (Beckman)
- . 1 extracteur automatique d'acides nucléiques COBAS AmpliPrep (Roche)
- . 1 extracteur automatique d'acides nucléiques *m2000_{SP}* (Abbott),
- . 3 extracteurs QIASymphony SP/AS (Qiagen),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS Taqman 96 (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 ABI7300 (Applied Biosystems),
- . 2 Rotor-Gene Q (Qiagen)
- . 1 thermocycleur à gradient (Life Technologies),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 9700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2700 (Applied Biosystems),
- . 2 thermocycleurs ABI GENEAMP 9600 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur UNO II (Biometra)

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

- . 1 automate d'analyse des hybridations inverses AUTOBLOT 3000 (Siemens),
- . 1 Auto-LiPA 48 (Innogenetics)
- . 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 pour la plateforme de NGS

- . 1 GS Junior (Roche – 454 Sequencing)
- . 1 GS FLX + (Roche – 454 Sequencing)
- . 1 MiSeq DX (Illumina)
- . 2 NextSeq 500 (Illumina)
- . 1 Ion Proton™ (Life Technologies)
- . 1 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)
- . 3 thermocyclers Veriti (Applied Biosystems)
- . 1 CASY TT (Roche Diagnostics)
- . 1 TissueLysser (Qiagen)
- . Hotte chimique

En ce qui concerne les laboratoires associés :

Les principaux équipements à la disposition du CNR delta sont les suivants :

- . PSM2, Etuves à CO₂,
- . Chaîne du froid : Réfrigérateurs ; chambres froides à +4°C et à -20° ; congélateurs à -20°C, -40°C, -70°C
- . Laveurs ELISA,
- . Automates ELISA de sérologies virales acquis en 2010 : Etimax (Diasorin) ; Architect (Abbott) ; Evolis (Biorad) et Liaison® Diasorin (en cours d'acquisition)
- . Extracteurs automatiques d'acides nucléiques : Maxwell®, Abbott et Roche
- . Thermocycleurs PCR sprint et ABI 9700, ABI 7000, ABI 7500 fast, CFX96 Biorad (PCR temps réel)
- . Séquenceur ABI3100 (4 capillaires)
- . Séquenceur ABI 3500 (8 capillaires en cours d'acquisition)
- . Lecteur de micro-array MWG
- . Laboratoire L3

- . Automate de pyroséquençage (Pyromark Qiagen)
- . Séquenceur NGS MiSeq Illumina
- . Equipements communs de la plate-forme de biologie moléculaire du Pôle Biologie – Produits de Santé Avicenne – Jean Verdier.

1.4 Démarches qualité mise en œuvre au sein du CNR

Un effort important a été et sera consacré à l'accréditation du laboratoire coordonnateur et des laboratoires associés.

Le processus est d'ores-et-déjà engagé dans ce sens pour le laboratoire coordonnateur avec les visites du COFRAC en février 2014 et mai 2015 pour l'accréditation des paramètres suivants : anticorps anti-VIH/Ag, anticorps anti-HTLV, anticorps anti-VHC, antigène HBs, anticorps anti-HBs, anticorps anti-HBc totaux et IgM, anticorps anti-VHA totaux et IgM, anticorps anti-CMV IgG et IgM, anticorps anti-EBV anti-VCA IgG, anti-EBV anti-EBNA, ARN du VHC, ADN du CMV, de l'EBV et du virus BK.

La prochaine visite du COFRAC planifiée au cours de l'année 2018 verra l'accréditation des paramètres virologiques en rapport avec les activités du CNR : ADN du VHB, l'antigène HBs quantitatif.

En ce qui concerne le laboratoire de l'INTS, Les activités ont reçu l'accréditation du COFRAC selon la norme ISO-CEI 17025 sous le numéro 1-1950 au 1er janvier 2008. L'accréditation a été confortée lors des audits de suivi. Le laboratoire répond à ce jour aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 : 2012, et est accrédité sous le numéro 8-1950 rév 4.

Le laboratoire participe à plusieurs programmes d'évaluation externe de la qualité. Ces programmes permettent des comparaisons inter-laboratoire.

- 1- Contrôle national de la qualité (ANSM)
- 2- Contrôle inter-laboratoire national (CTCB) : 3 fois/an
- 3- Contrôle inter-laboratoire international (QCMD) : 2 fois /an

Le laboratoire réalise ses activités de CNR sur des échantillons sous forme anonyme, ceux-ci parvenant avec un numéro de don.

Depuis 2011, le Pôle de Biologie des hôpitaux universitaires de Paris-Seine-Saint-Denis (HUPSSD) auquel nous appartenons et qui est multi sites (hôpitaux Avicenne, Jean-Verdier et René-Muret-Bigottini) est engagé dans une démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189. Cette démarche a permis d'accroître les relations avec les autres laboratoires du groupe hospitalier HUPSSD, en particulier avec le service de Microbiologie de l'hôpital Jean Verdier, dirigé par le Pr. E. Carbonnelle, qui est aussi chef de service du laboratoire de bactériologie virologie, hygiène d'Avicenne. Le caractère multi-site de notre Groupe, nous a montré des difficultés particulières mais aussi des pistes pour le regroupement indispensable des activités. Elle permet aussi d'emblée, la mise en place d'une politique commune d'assurance-qualité du laboratoire de microbiologie clinique Avicenne/Jean Verdier. L'organisation mise en place est la suivante :

- Un comité de pilotage (COFIL) qualité au sein du pôle avec le chef de pôle, le référent assurance qualité (RAQ) et les responsables qualité (médicaux et non médicaux) des différentes unités fonctionnelles
- La référente assurance qualité (RAQ), Mme E. Bottius a été embauchée en 2015 et pilote l'action sur tout le Pôle.
- Le praticien à temps partiel de virologie, Y. Baazia, qui a obtenu son diplôme de qualité, est dévolu à l'organisation et au suivi de cette tâche pour l'unité de virologie.
- Le Dr Ch. Alloui, est le référent médical informatique
- Des techniciens ont été nommés sur des tâches très précises comme référents ; (i) un référent qualité, (ii) métrologie, (iii) risques chimiques et (iv) informatique (voir organigramme du laboratoire de microbiologie clinique Avicenne).
- De même, chaque technicien est référent d'un automate et d'une technique donnée
- Le logiciel Kalilab de gestion de qualité (société Netica) a été déployé sur tout pôle. Une formation théorique et pratique a été et est dispensée à tous les utilisateurs, personnel médical et non médical.

En termes de méthode, nous avons commencé au sein de l'unité de virologie (2014) par une réorganisation de notre système de gestion documentaire. Nous avons débuté la rédaction de nos dossiers de validation de méthodes (binôme biologiste/technicien) tout d'abord pour les sérologies sur automate Architect, que nous avons décidé d'accréditer en premier. Fin août 2015 la première visite du COFRAC (comité français d'accréditation) a lieu avec plusieurs écarts non-critiques et des recommandations fortes. De nombreux efforts

sont consentis et déjà tous les écarts listés après la visite des accréditeurs du COFRAC, ont été levés. Une nouvelle visite COFRAC a eu lieu fin août 2016, pour laquelle un audit « blanc » a été réalisé en interne. De nombreux points ont été soulevés par cet audit, ainsi que des mesures correctrices. L'étape à venir est celle de l'accréditation des techniques de charge virale par biologie moléculaire automatisée sur automate Roche Cobas TaqMan, avec une visite COFRAC prévue fin d'année 2016. A noter que, concernant la charge virale delta, nous avons instauré en routine un kit commercial (société Eurobio) qui a été validé en amont par le CNR associé Delta. Le dossier de validation de méthodes est d'ores et déjà prêt. L'automatisation de l'étape d'extraction est la toute prochaine étape (dernier trimestre 2016) qui nous permettra de proposer d'accréditer cette technique. Le CNR-D bénéficiera donc de cette politique de qualité et d'accréditation en cours au sein du pôle, à la fois pour les dossiers de validation des méthodes utilisées, mais aussi pour la métrologie. L'objectif prioritaire sera aussi la gestion et la déclaration de notre souchothèque qui constitue une collection unique au monde. Une déclaration initiale a été faite à la CNIL dans le cadre de l'étude Deltavir, portant sur cette souchothèque. Il conviendra de la mettre complètement aux normes de la législation des collections biologiques. Aussi se fait jour la nécessité d'un personnel dédié affecté à cette activité spécifique « accréditation CNR -D».

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

CNR coordonnateur.

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 et de l'antigène de capsid du VHC, la détection de l'antigène HBe, des anticorps anti-HBc totaux et IgM, des anticorps anti-HBs et des anticorps anti-HBe, de l'antigène lié à la capsid du VHB (HBV core-related antigen), des anticorps anti-VHC totaux et des anticorps anti-HD IgG.

. Techniques de biologie moléculaire pour la détection et la quantification de l'ADN du VHB, des ARN du VHB et de l'ARN du VHC par PCR classique 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 NGS (standardisé ou technique maison).

. 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 développés au sein du laboratoire 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 pour la grande majorité des génotypes ; la caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces des régions virales ciblées par les antiviraux du VHC 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 PyroPack[®].

. 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, de la détermination du génotype, ainsi que la détection des mutations de résistance du VHC à partir de sang total recueilli sur buvard (DBS).

. Tests phénotypiques en culture cellulaire pour l'étude de l'impact des substitutions amino acidiques associées à la résistance du VHC aux antiviraux à action directe ; modèle infectieux du VHB en culture cellulaire pour étude de l'impact des substitutions amino acidiques associées à la résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques.

CNR en transfusion sanguine.

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

. L'immunologie (méthodes immuno-enzymatiques) : automates dédiés, incubateurs, laveurs de microplaques, spectrophotomètres,

. L'analyse moléculaire : plateau d'analyse moléculaire des acides nucléiques comprenant des thermocycleurs, une plateforme de séquençage haut débit (Life Technologies), des automates de PCR en temps réel (Light Cycler, Cobas TaqMan, Roche) et logiciels de bioinformatique

CNR delta.

Les capacités techniques du laboratoire associé pour le virus de l'hépatite delta :

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. Les principaux résultats viennent d'être publiés (Brichler et al., J. Clin. Microbiol., 2014).

Techniques de Biologie Moléculaire

La technique de RT-PCR quantitative plasmatique de quantification de l'ARN VHD, mise en place au laboratoire en 2004, est utilisée en routine depuis 2005 (Le Gal F. et al Journal of Clinical Microbiology 2005). Tous les génotypes sont également quantifiables par cette technique, à l'exception du génotype 3 « Sud-Américain » en général sous quantifié, et pour lequel une paire d'amorces spécifiques a été définie. Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B220 (n°4119).

Après l'extraction automatisée sur l'automate Abbott M2000sp, une étape cruciale a été franchie pour cette technique : la mise au point d'un contrôle interne, par l'utilisation de l'ARN du bactériophage MS2. L'automatisation plus avant de la technique par l'utilisation de l'automate M2000rt d'Abbott, impliquant la mise au point de la RT-PCR en une seule étape, multiplex, avec contrôle interne avait été un temps envisagé pour l'amélioration de cette technique « historique » de référence. Cependant les travaux réalisés parallèlement, en collaboration avec des firmes privées françaises ont donné récemment des résultats extrêmement encourageants. Ainsi deux kits de RT-PCR multiplex en une seule étape, utilisant la technologie TaqMan en temps réel, semblent présenter des gages de qualité. L'un, de la Société Eurobio, d'ores et déjà commercialisé et en attente de marquage CE, est aujourd'hui utilisé en routine par le CNR-D, après une phase de deux mois d'utilisation en parallèle avec le test de référence « maison » du CNR-D. L'autre, un kit prototype de la société Omunis, pensé d'emblée pour des plateformes ouvertes à visée des Pays en voie de développement, a montré des résultats équivalents à ceux du CNR-D dans une première étude sur un faible échantillonnage, sauf pour certains génotypes particuliers, et est en cours d'évaluation dans la « vraie-vie ».

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

grande protéine jusqu'à la séquence du ribozyme antigénomique (Radjef et al., 2004). Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B180 (n°4118). Cette technique est pan génotypique.

La caractérisation du génotype des souches HDV est effectuée sur toute nouvelle souche positive, par l'amplification de cette même région R0 du génome viral, suivie du séquençage et de l'analyse phylogénétique (par Distance et Neighbor-Joining) (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.

La séquence complète du génome est obtenue par séquençage de plusieurs régions chevauchantes (appelées R1, R2 et R3, avec des variantes selon certaines souches) et reconstitution de la séquence complète (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-D, mais n'intervient pas encore dans le schéma de diagnostic clinique du patient. Le CNR-D dispose d'une base de données exhaustive de plus de 2600 séquences 'R0' HDV, de tous les génotypes (1 à 8) excepté le génotype 3, dont 116 séquences complètes.

2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Pour le VHB : AgHBs, anti-HBs et ADN du VHB

Pour le VHC : Anti-VHC et ARN du VHC

Pour le VHD : anticorps anti-delta totaux, anticorps anti-delta IgM, antigène delta, ARN du VHD

2.3 Collection de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

Description : nombre de souches, caractérisation

Toute nouvelle souche est conservée en sérothèque dans les différents laboratoires du CNR. Les échantillons sont caractérisés (génotypage, charge virale, etc...) systématiquement selon les méthodes de référence disponibles. Un volume minimum de 500 microlitres minimum est conservé dans des cryotubes à pas de vis externe.

CNR coordonnateur

Une sérothèque spécifique consacrée aux donneurs d'organes, tissus et cellules contenant aujourd'hui plus de 45 000 échantillons dont environ 10 000 provenant de donneurs d'organes. Il s'agit d'une collection unique d'échantillons qui continuera à s'enrichir au sein du CNR à raison d'environ 3000 nouveaux échantillons par an. Cette sérothèque bien caractérisée, associée à la banque de données en cours de constitution, permettra la réalisation d'études sur la performance des marqueurs sérologiques pour la détection des marqueurs réglementaires, ainsi que sur l'intérêt d'implémenter des marqueurs sérologiques d'autres infections virales et sur la performance intrinsèque des tests correspondants.

CNR en transfusion sanguine.

Des Collections sont constituées depuis 2005 pour le VHB et 2008 pour le VHC comportant plusieurs centaines d'échantillons plasmatiques, régulièrement alimentées par des échantillons informatifs (suivis de séroconversions, phases précoces de l'infection, différents génotypes, porteurs chroniques, centralisés dans notre unité sous des volumes pouvant aller jusqu'à 250 mL correspondant à des poches de plasma de donneurs de sang infectés par les virus des hépatites B et C.

Parmi ces collections, sont disponibles à ce jour sous des volumes de plusieurs dizaines de millilitres intégrables dans des panels pérennes :

. **1764 échantillons plasmatiques ADN-VHB positifs** de charges virales variables et dont les génotypes se répartissent ainsi :

A1	A2	A3	A4	A autres	Total A	B2	B3	B4	B autres	Total B	Total C
131	206	40	20	100	497	23	6	51	18	98	97

D1	D2	D3	D4	D7	D8	D autres	Total D	Total E	F1	F2	F?	Total F
223	80	109	32	129	20	144	737	322	2	2	9	13

. **538 échantillons plasmatiques ARN-VHC positifs** de charges virales variables et dont les génotypes se répartissent ainsi :

1a	1b	1 ?	Total	2a	2b	2c	2i	2j	2k	2l	2 ?	Total

			1									2
166	134	3	303	9	4	20	8	2	6	3	13	65

								4			Total
3a	4a	4d	4f	4k	4p	4r	4t	?	Total 4	Total 5	6
117	21	14	2	1	1	1	1	3	44	6	3

Un panel SFTS VHC comprenant 40 échantillons plasmatiques de 0.5 ml et représentant diverses situations clinico-biologiques est mis à disposition des industriels.

Les collections et panels sont conservés en enceintes à -20°C ou -80°C dont la température est surveillée en continue selon les procédures obéissant à la norme.

CNR delta

Toute nouvelle souche ARN HDV positif est conservée au CNR-D. Ces échantillons sont génotypés systématiquement selon la méthode décrite ci-dessus. Un volume minimum de 500 microlitres minimum est conservé dans des tubes « Nunc ».

Conditions de stockage

Les sérums sont conservés à -40°C pendant 1 an puis à -20°C le plus longtemps possible (> 5 ans), les plus anciens étant malheureusement éliminés du fait des conditions limitées de stockage (congélateurs + surfaces). Cependant, après extraction d'acides nucléiques, amplification, quantification et génotypage, les échantillons caractérisés (sérum et/ou plasmas ; ARN, et cDNA) sont conservés à -80°C . Les ressources biologiques font l'objet d'une gestion informatisée par un logiciel dédié.