



INSTITUT  
DE VEILLE SANITAIRE

Surveiller, alerter, prévenir

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

---

## **RAPPORT D'ACTIVITE 2006-2007**

Avril 2007

# I

## **STRUCTURE ET MISSIONS DU CNR**

## 1/ Rappel des missions du CNR

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

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

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

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

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

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

## **2/ Description de la structure du CNR**

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

- CNR des hépatites virales B, C et delta : localisée dans le service de Bactériologie-Virologie-Hygiène et de l'équipe de recherche sur les hépatites virales (INSERM U841) de l'hôpital Henri Mondor, Créteil (Responsable : Pr. Jean-Michel PAWLOTSKY),
- Laboratoire associé CNR des hépatites virales B, C et delta en transfusion sanguine : localisé à l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS), Paris (Responsable ; Dr. Syria LAPERCHE),
- Laboratoire associé responsable de la recherche et du développement : localisée au sein de l'unité mixte de recherche Institut Pasteur-INSERM à l'hôpital Paul Brousse, Villejuif (Responsable : Dr. Valérie THIERS),
- Laboratoire associé pour les hépatites delta : localisé à l'hôpital Avicenne, Bobigny (Responsable : Pr. Paul DENY).

Le CNR est dirigé par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY et son Directeur Adjoint est le Docteur Valérie THIERS. Le Conseil de Direction est constitué des Directeurs des 4 laboratoires. Le Conseil de Direction aura pour mission d'assurer la coordination des activités du CNR entre les différents laboratoires associés, d'assurer une animation scientifique (cellule d'animation scientifique confiée à la responsabilité du Docteur Stéphane CHEVALIEZ, Hôpital Henri Mondor, Créteil) et de prendre toute décision concernant l'organisation ou le fonctionnement du CNR, en relation avec l'Institut National de Veille Sanitaire (InVs). Les collaborations scientifiques et techniques entre les différents laboratoires associés existent, comme en témoignent d'ores et déjà les publications communes à certains d'entre eux. Leur continuité est assurée par la cellule d'animation, qui se charge périodiquement de

réunir les différents membres des laboratoires qui constituent le CNR des Hépatites B, C et delta.

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

- Les acteurs institutionnels : Institut National de Veille Sanitaire (InVS), Direction Générale de la Santé (DGS), Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), Etablissement Français du Sang (EFS), Agence de la Biomédecine (EFG), Institut Pasteur (IP), Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS).
- Les réseaux de surveillance et de recherche Européens : réseau ViRgil de surveillance de la résistance du VHB et du VHC aux antiviraux, réseau BOTIA de surveillance de la transmission des virus par la transfusion sanguine et la greffe.
- L'ensemble des partenaires institutionnels et privés impliqués dans la surveillance ou associés à des événements épidémiologiques liés à l'activité du CNR des hépatites B, C et delta comme les hôpitaux, les cliniques, les laboratoires d'analyses médicales, les laboratoires de recherche, la Fédération Nationale des Pôles de Référence et Réseaux Hépatites (FNPRRH).

### **3/ Bilan global de la première année de fonctionnement**

La première année de fonctionnement du CNR dans sa forme nouvelle a été une année de mise en place et de transition, compliquée par l'arrivée tardive des financements qui a retardé le recrutement des personnels dédiés (recrutement de l'Ingénieur d'Etudes CNR en juin 2006 à l'hôpital Henri Mondor). Cette année a permis au CNR localisé à l'hôpital Henri Mondor de mettre en place de nouvelles techniques qui sont apparues comme essentielles au développement des activités du CNR, ainsi que les procédures permettant l'application de l'ensemble des techniques disponibles dans ce laboratoire aux activités très particulières de ce CNR. Cette mise en place a été facilitée par l'infrastructure, très automatisée, du

laboratoire de virologie de l'hôpital Henri Mondor et par la liaison avec l'équipe de recherche INSERM au sein de laquelle sont concentrées les compétences en matière d'analyses informatiques des séquences virales.

Cette année a vu la poursuite des activités du laboratoire associé consacré aux hépatites virales en transfusion sanguine, tandis que le laboratoire associé consacré à la recherche et au développement, auparavant en charge de la majorité des activités du CNR, a poursuivi et complété les études en cours. Aucune relation avec le laboratoire associé consacré au virus de l'hépatite delta n'est à signaler. Son responsable en titre a quitté la Direction de son service hospitalier au cours de l'année et son rapport n'a pas été transmis au Directeur du CNR.

La suite de ce rapport présente les rapports spécifiques à chacune des autres composantes du CNR.

**II**

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

**Laboratoire de Virologie et INSERM U841  
Hôpital Henri Mondor, Université Paris 12  
Créteil**

## **I- STRUCTURE DU CNR**

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

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

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

### **A. Personnels dévolus**

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

- Personnel médical :

- . 1 Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 1 Praticien Hospitalier,
- . 1 Assistant Hospitalier Universitaire,
- . 1 Praticien Attaché,
- . 0,3 vacataire,
- . 2 Moniteurs d'Etudes Biologiques.

- Personnel non médical :

- . 1 ingénieur CNR,
- . 1 Cadre Médico-Technique,
- . 12,4 ETP techniciens AP-HP,
- . 1 secrétaire.

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

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

Les personnels suivants sont affectés au fonctionnement du CNR :

- . 0,15 Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 0,10 Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 0,20 Praticien Hospitalier,
- . 0,20 Praticien Attaché,
- . 0,30 Assistant Hospitalier Universitaire,
- . 1,00 Ingénieur d'Etudes,
- . 0,30 Moniteur d'Etudes Biologiques,
- . 1,80 technicien (temps technicien augmenté l'année prochaine),
- . 0,15 infirmière.

## **B. Démarche qualité du CNR**

Le laboratoire de virologie de l'hôpital Henri Mondor a mis en place le GBEA et l'hôpital a été accrédité. L'ensemble des procédures utilisées pour les activités du CNR des hépatites B, C et delta a fait l'objet d'une rédaction de type GBEA. Par ailleurs, la partie du laboratoire responsable de la qualification virale des dons d'organes, de tissus et de cellules est en cours de certification.

### C. Locaux et équipements

Le laboratoire hospitalo-universitaire de virologie occupe 250 m<sup>2</sup> de laboratoire, 105 m<sup>2</sup> de bureau, 175 m<sup>2</sup> de surface d'accueil, laverie et réserves, bibliothèque (certains locaux sont communs avec le secteur de Bactériologie-Hygiène) ; 30 m<sup>2</sup> sont réservés à la garde de nuit. Le laboratoire fonctionne 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Les équipements à la disposition du CNR des Hépatites B, C et delta sont les suivants :

#### - Automates de sérologies virales

- . 3 VIDAS (BioMérieux),
- . 1 ACCESS Base (Beckman),
- . 1 ACCESS II (Beckman),
- . 1 LIAISON (DIASORIN),
- . 1 VITROS Eci (Ortho),
- . 1 ARCHITECT (Abbott),
- . 1 automate intégré pour microplaques BEP 2000 (Dade-Behring).

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

- . 1 extracteur automatique d'acides nucléiques COBAS AMPLIPREP (Roche)
- . 1 extracteur automatique d'acides nucléiques *m2000<sub>SP</sub>* (Abbott),
- . 1 automate pour "ADN branchés" Siemens 340 (Siemens),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS TAQMAN 96 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS TAQMAN 48 (Roche),

- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel *m2000<sub>RT</sub>* (Abbott),
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel LIGHTCYCLER 1.0 (Roche),
- . 1 automate pour PCR compétitive COBAS AMPLICOR (Roche),
- . 1 thermocycleur à gradient MASTERCYCLE (Eppendorf),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 9700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2400 (Applied Biosystems),
- . 2 thermocycleurs ABI GENEAMP 9600 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur UNO II (Biometra).

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

- . 1 automate d'analyse des hybridations inverses AUTOLIPA (Siemens),
- . 2 séquenceurs automatiques LONGREAD TOWER (Siemens),
- . 1 séquenceur automatique capillaire ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), disponible sur la plate-forme de l'IFR.

- 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.

## II- RESUME DES ACTIVITES DE L'ANNEE

### A. Capacités techniques du CNR

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

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

#### - Liste des techniques disponibles au laboratoire au 1<sup>er</sup> janvier 2006

. Sérologies virales automatisées pour la détection de l'antigène HBs, de l'antigène HBe, des anticorps anti-HBc totaux et IgM, des anticorps anti-HBs et des anticorps anti-HBe, des anticorps anti-VHC, de l'antigène HD, et des anticorps anti-HD IgG et IgM,

. Techniques de détection et de quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC par PCR classique, techniques des ADN branchés et PCR en temps réel automatisée et artisanale,

. Détermination du génotype du VHC par séquençage direct des régions NS5B et core/E1 et par technique d'hybridation inverse de seconde génération, qui inclut des sondes dirigées contre la région 5' non codante et la capsid (InnoLipa v2.0),

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

- . Identification des VHB mutants de la région PréC-C par séquençage direct ou par technique d'hybridation inverse (Inno-LiPA HBV precore),
- . Etude de la séquence des régions hypervariables du VHC destinée aux études de transmission virale,
- . Détection des mutations de résistance du VHB associées à la chimiothérapie antivirale par séquençage direct du domaine transcriptase inverse de l'ADN polymérase, hybridation inverse (Ino-LiPA HBV DR) ou caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB,
- . Analyse de la séquence du gène codant l'AgHBs, en particulier la région MHR contenant les déterminants majeurs de la réponse humorale, appliquée aux études de transmission du VHB et à la recherche de mutants non détectés par les tests sérologiques (hépatites B occultes).

#### **- Techniques implantées au cours de l'année 2006**

- . Implantation d'une seconde méthode de référence pour la détermination du type et du sous-type du VHC par séquençage direct de la région core/E1.

#### **- Techniques en développement**

- . Méthode de détection des infections par plusieurs génotypes du VHB par RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*),
- . Mise en place d'une technique de PCR en temps réel permettant la détection très précoce des mutants d'échappement à la chimiothérapie antivirale,
- . Développement d'une base de données des mutations de résistance du VHB aux antiviraux

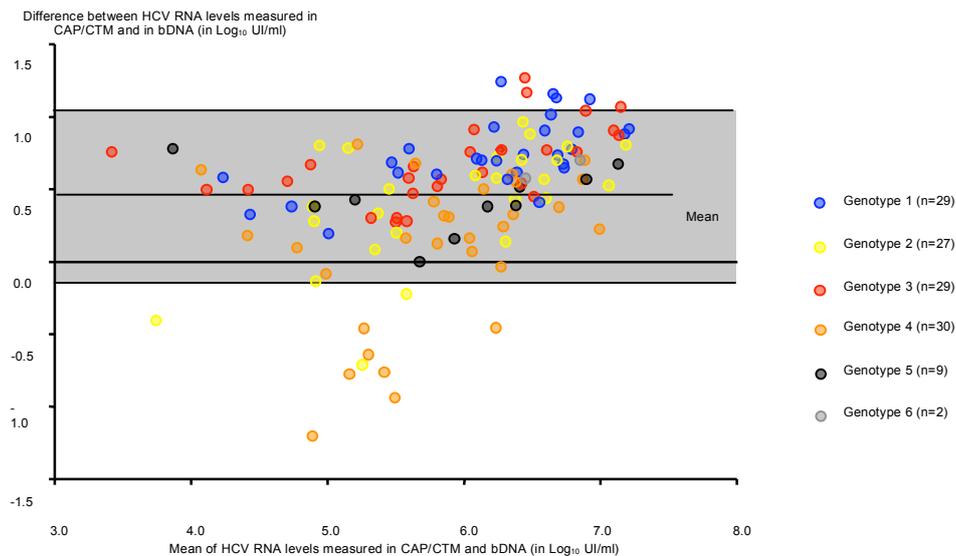
### **B. Activités de développement, de standardisation et d'évaluation des techniques diagnostiques et de typage**

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

l'amplification du signal par les ADN branchés, l'hybridation inverse ou l'analyse de la séquence des génomes viraux.

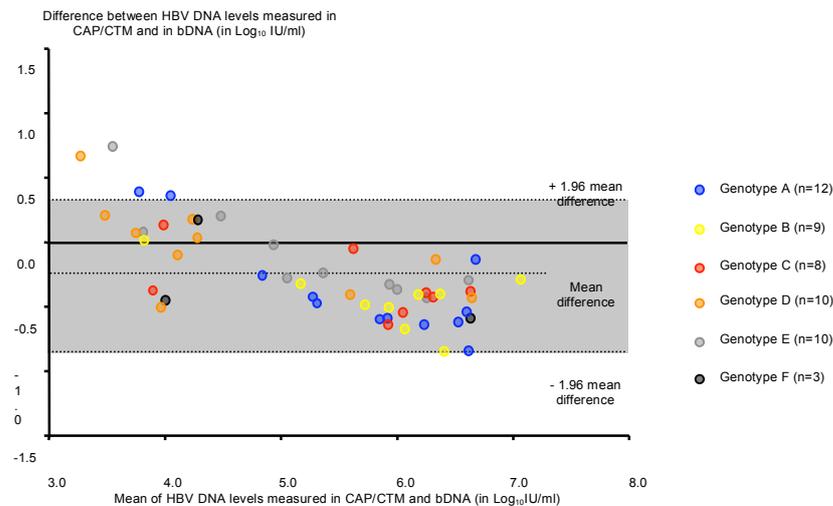
Plusieurs évaluations de tests virologiques à visée diagnostique pour le VHC et le VHB ont été réalisées en partenariat avec les industriels qui les développent. Ces évaluations ont concerné les techniques de biologie moléculaire adaptées à la détection et/ou la quantification de l'ARN du VHC et de l'ADN du VHB par PCR en temps réel, ainsi que des techniques de typage des génomes viraux par hybridation inverse ou séquençage visant à identifier le génotype et le sous-type viral ou des mutations de résistance après analyse des séquences nucléotidiques. Ces travaux ont donné lieu à des publications acceptées, soumises ou en préparation.

Les performances intrinsèques de la plate-forme de PCR en temps réel Cobas Ampliprep-Cobas TaqMan 48 (CAP/CTM, Roche Molecular Systems) ont été évaluées de façon extensive pour la quantification de l'ARN du VHC dans un contexte de pratique clinique. Nous avons montré que la plateforme CAP/CTM, la plus utilisée des techniques de PCR en temps réel pour la quantification de l'ARN du VHC dans le monde, surestimait systématiquement la charge virale du VHC dans les sérums des patients d'un facteur de l'ordre de 0,5 à 0,7 log unités internationales par millilitre (UI/ml). Cependant, cette surestimation disparaissait lorsque les sérums étaient dilués, suggérant une interaction biochimique avec un composant naturel du sang humain à l'origine de la surquantification. Nous avons par ailleurs observé que, dans ce contexte d'hyperquantification globale, respectivement 15% et 30% des échantillons de VHC de génotypes 2 et 4 étaient sous-quantifiés, et démontré que la sous-quantification était le fait d'un mésappariement des amorces et/ou de la sonde utilisées avec la séquence cible au cours de la réaction d'amplification. Cette étude, importante pour la pratique clinique quotidienne, a fait l'objet d'une publication (Chevaliez et al., *Hepatology* 2007 : sous presse).



**Figure 1 :** Diagramme Bland-Altman représentant la quantification de l'ARN du VHC dans 126 échantillons cliniques par les deux méthodes CAP/CTM et bDNA. La différence de quantification d'ARN du VHC est présentée en fonction de la moyenne des deux valeurs. Les différents génotypes du VHC sont représentés par différentes couleurs. La zone grise correspond à la moyenne des différences  $\pm 1,96$ .

La plateforme de PCR en temps réel CAP/CTM a été également évaluée pour la quantification de l'ADN du VHB. Les résultats ont montré des performances intrinsèques satisfaisantes en termes de spécificité (100%, intervalle de confiance à 95% : 98.1%-100%), de reproductibilité et de répétabilité. La quantification de l'ADN du VHB était linéaire sur l'ensemble de l'intervalle de quantification (1,7 Log<sub>10</sub> UI/ml à 8 Log<sub>10</sub> UI/ml) et ce, indépendamment du génotype. Néanmoins, une sous-quantification modérée de l'ADN du VHB a été observée pour des valeurs d'ADN du VHB supérieures à 4,5 log UI/ml, sans impact majeur sur la prise en charge clinique (Chevaliez et al., article en préparation).



**Figure 2 :** Diagramme Bland-Altman représentant la quantification de l'ADN du VHB dans 52 échantillons cliniques par les deux méthodes CAP/CTM et bDNA. La différence de quantification d'ADN du VHB est présentée en fonction de la moyenne des deux valeurs. Les différents génotypes du VHB sont représentés par différentes couleurs. La zone grise correspond à la moyenne des différences  $\pm 1,96$ .

La détermination du génotype du virus de l'hépatite C est indispensable à la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'hépatite chronique C. La détermination du génotype du VHC par hybridation inverse à l'aide de sondes oligonucléotidiques dirigées contre la région 5' non-codante du génome viral est la méthode la plus couramment utilisée dans les laboratoires de virologie. Une étude visant à étudier l'effet de l'addition de sondes oligonucléotidiques de la région codant la capsid virale aux sondes de la région 5' non-codante sur l'exactitude de la détermination du sous-type des souches de VHC de génotype 1 a été réalisée. Cette étude, qui portait sur plus de 500 malades et comparait la méthode de référence (séquençage de la région NS5B du génome viral), une méthode d'analyse de séquence de la région 5' non codante et le test Inno-Lipa de deuxième génération qui inclut des sondes de la région 5' non codante et de la capsid, a montré que le séquençage de la région 5' non codante était à l'origine d'un sous-typage erroné des souches de génotype 1 dans 15% des cas environ. L'addition de sondes oligonucléotidiques de la capsid améliorerait considérablement la détermination du

sous-type des souches de VHC de génotype 1 par rapport aux tests de génotypage fondés sur la seule analyse de la région 5'NC, et permettait une bonne discrimination des souches de génotypes 1 et 6. Environ 4% des échantillons cliniques restaient cependant incorrectement sous-typés par cette méthode, essentiellement chez des patients infectés par un VHC de génotype 1, de sous-type non-1a, non 1b (Chevaliez et al., article en préparation).

En ce qui concerne la standardisation des techniques virologiques, le CNR des Hépatites B, C et delta a participé à une étude européenne coordonnée par le NIBSC (National Institute of Biological Standards and Controls) qui concernait la mesure de la charge virale de l'ARN du VHC. La quantification de l'ARN du VHC a été effectuée sur 16 échantillons par deux techniques, la technique des ADN branchés (bDNA, Versant HCV RNA 3.0, Siemens) et par PCR en temps réel par la plate-forme *m2000<sub>SP</sub>/m2000<sub>RT</sub>* (Abbott). Les résultats de cette étude internationale sont en cours d'analyse au NIBSC et devraient permettre le développement de nouveaux standards secondaires pour la calibration des tests de quantification de l'ARN du VHC.

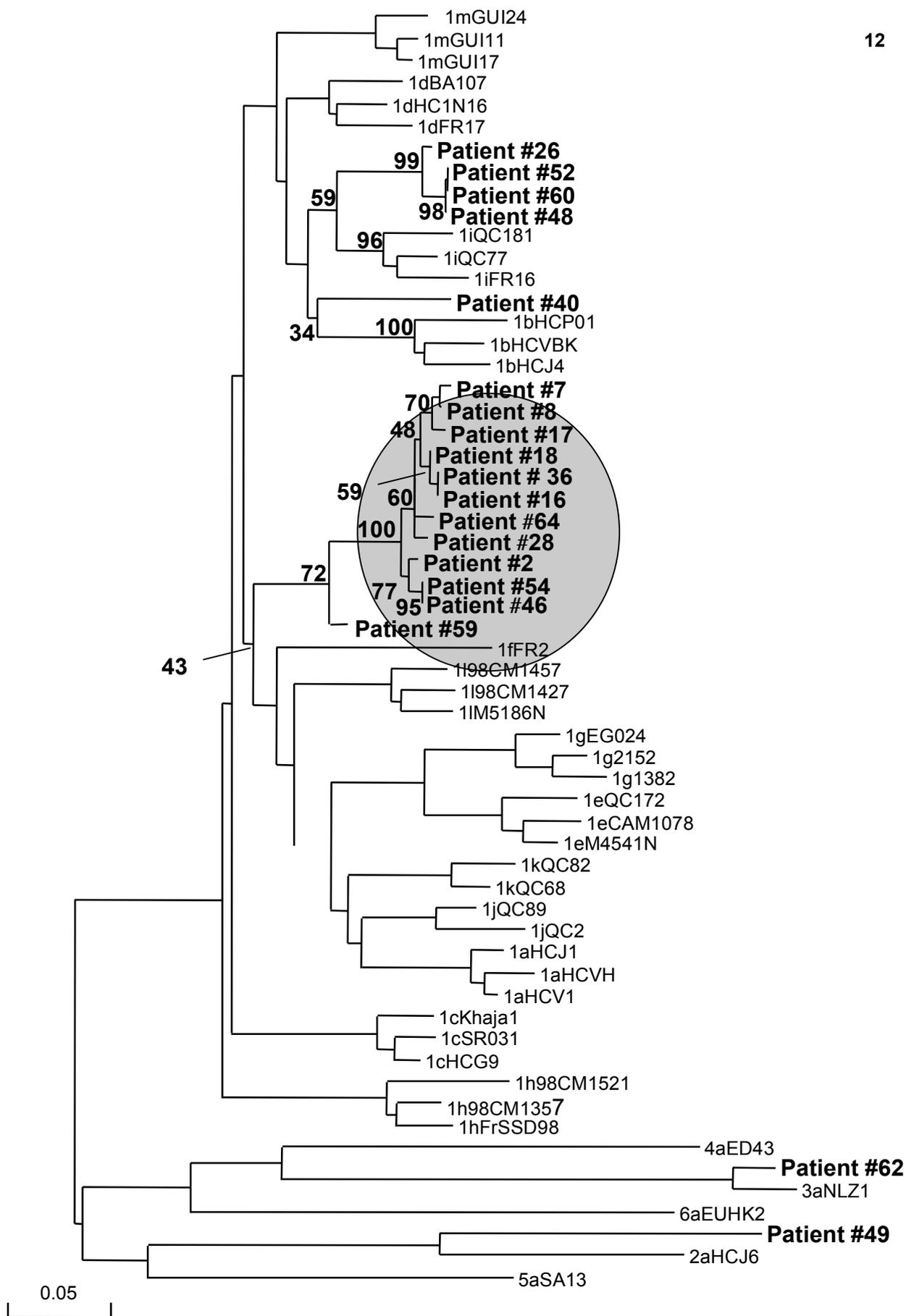
Des tests sérologiques et moléculaires standardisés ont par ailleurs été évalués sur le parc d'automates du laboratoire :

- . Nouveaux tests de détection de l'antigène HBs, détectant (ou censés détecter) les mutants de la région S (Abbott, DiaSorin),
- . Nouveaux tests de détection des anticorps anti-HBc totaux et IgM et anti-HBs (Abbott),
- . Tests combinés antigène de capsid du VHC-anticorps anti-VHC (BioRad),
- . Techniques d'hybridation inverse pour l'identification du génotype du VHB, des mutants de la région préC et de la région promotrice du core du VHB, et des mutants résistants à la lamivudine et à l'adéfovir (Innogenetics),
- . Techniques de détermination du génotype du VHC par séquençage direct de la région NS5B du génome viral (Bayer).

### **C. Caractérisation virologique des échantillons et typage moléculaire pour la surveillance de l'épidémiologie des types viraux et de l'émergence des mutants**

Le laboratoire hospitalier de virologie, en collaboration avec l'équipe de recherche INSERM, a développé tous les outils de typage moléculaire et d'analyse des génomes du VHB et du VHC (PCR, clonage, séquençage, analyses génétiques et phylogéniques) nécessaires à la réalisation d'études en épidémiologie moléculaire des hépatites virales, en particulier en contexte épidémique. Le CNR des hépatites B, C et delta met à la disposition des cliniciens et des laboratoires qui en font la demande l'ensemble de ces outils.

Dans ce cadre, une étude prospective récente réalisée dans une unité d'hémodialyse au Bénin chez 63 patients hémodialysés a permis l'identification d'un nouveau sous-type de VHC de génotype 1. Les études génétiques et phylogéniques ont permis de montrer que 17 patients sur 64 avaient été infectés par une souche de VHC de génotype 1, un patient par une souche de génotype 2 et un patient par une souche de génotype 3 (Figure 3). Parmi les 17 patients infectés par un VHC de génotype 1, 4 (23,5%) étaient infectés par un sous-type 1i, un (5,9%) par un sous-type 1b et 12 (70,6%) n'étaient pas sous-typables. Les séquences nucléotidiques des 12 souches non-typables ont été analysées à l'aide de différentes méthodes de phylogénie moléculaire (parcimonie et maximum de vraisemblance) afin d'étudier leur parenté de ces souches. Ces souches étaient phylogéniquement très proches et formaient un groupe monophylétique avec de fortes valeurs de ré-échantillonnages. De plus, ces souches se distinguaient génétiquement et phylogéniquement des autres sous-types (1a à 1l) de génotype 1 par 16 à 26% de leur séquence nucléotidique au niveau de la région NS5B et 24 à 33% dans la région core/E1. Ce nouveau sous-type de VHC de génotype 1 est provisoirement dénommé 1m et plusieurs souches sont en cours de séquençage complet. Cette étude a permis d'observer la naissance, au sein d'une unité d'hémodialyse d'un pays en voie de développement, d'une épidémie nosocomiale liée à un nouveau sous-type de VHC, inconnu jusqu'à présent.

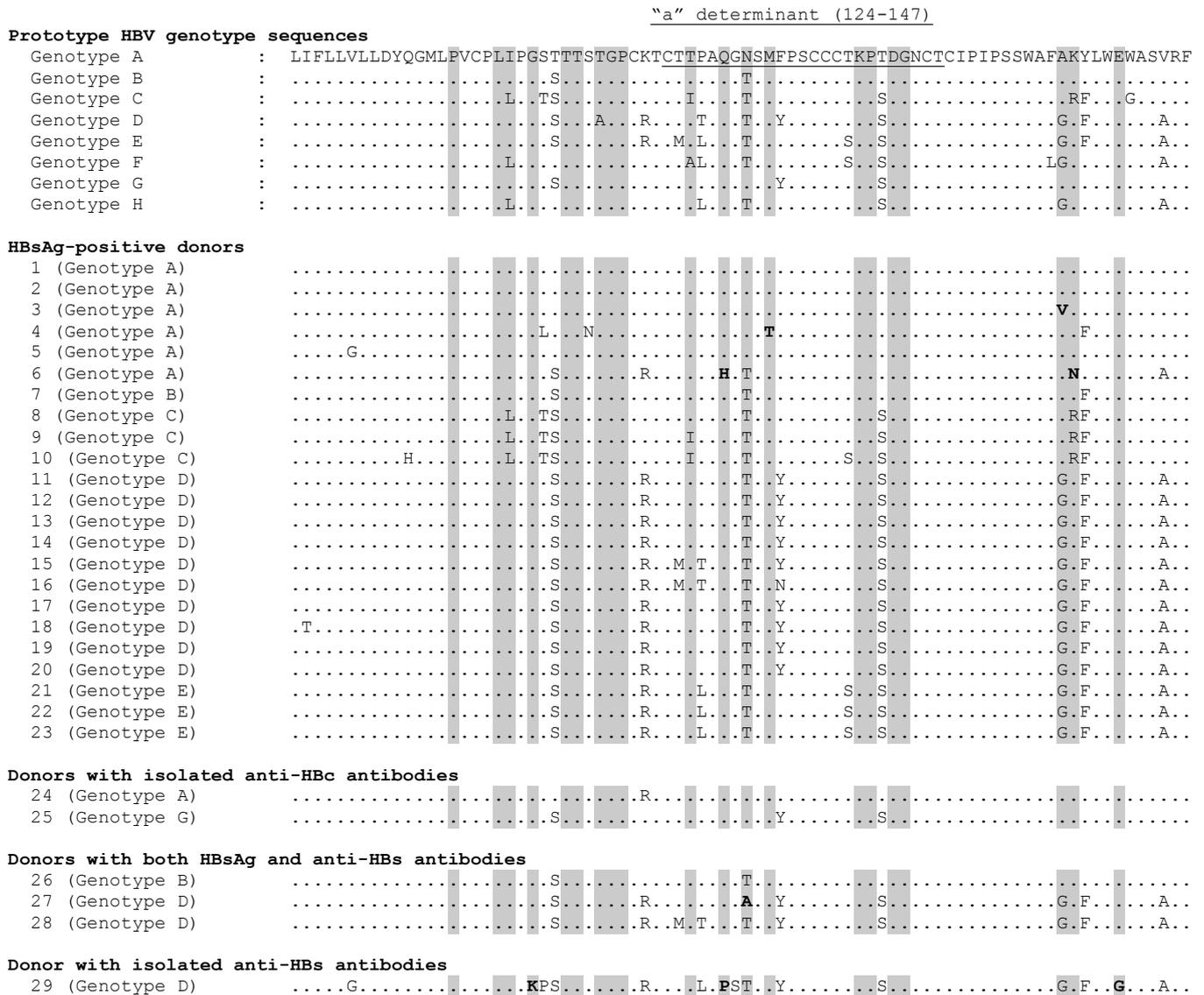


**Figure 3 :** Détermination du génotype du VHC par analyse phylogénique d'une portion de la région NS5B. Les chiffres en gras correspondent aux valeurs de ré-échantillonnages après 10 000 répliquates.

D'autre part, le CNR des hépatites B, C et delta a mené une étude visant à déterminer la valeur diagnostique et pronostique des paramètres virologiques du VHB, incluant la charge virale, le génotype et la présence de mutations des régions « precore » et « promoteur du core » du gène preC-C du virus, chez 579 patients grecs ayant une hépatite chronique B à antigène HBe négatif et infectés par un virus de génotype D. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le Docteur Georgios Germanidis, du Papageorgiou General Hospital de Thessalonique, en Grèce. Les résultats ont montré que le niveau de la réplication virale était corrélé au type de mutations de la région promotrice du core et au degré d'inflammation hépatique. La présence d'IgM anti-HBc était corrélée au type de mutations de la région promotrice du core, ainsi qu'à la sévérité de l'atteinte hépatique (activité inflammatoire, fibrose et cirrhose). Nos résultats suggèrent que les patients ayant une hépatite chronique B à antigène HBe négatif infectés par un VHB de génotype D ayant des valeurs de transaminases normales de façon répétée et un ADN du VHB inférieur à  $10^4$  UI/ml peuvent être considérés comme des porteurs inactifs du VHB. Les autres malades sont des candidats potentiels à un traitement antiviral.

Nous avons étudié la prévalence des marqueurs du VHB chez 11 155 donneurs d'organes, de tissus ou de cellules testés au laboratoire entre 2000 et 2005 et l'ADN viral a été recherché chez tous ceux qui présentaient un ou plusieurs marqueurs du VHB, ainsi que chez plus de 1600 donneurs de tissus séronégatifs pour le VHB ou ayant un profil vaccinal caractérisé par la seule présence des anticorps anti-HBs. Un certain nombre de ces donneurs présentaient un ADN du VHB détectable en l'absence d'antigène HBs. Leur charge virale était modérée et plus faible que chez les patients atteints d'hépatite chronique B. L'analyse de la totalité de la séquence de la région preS1-preS2-S, codant les protéines de surface du VHB et incluant le déterminant « a », épitope majeur de la réponse humorale anti-VHB, a montré la présence de mutations ponctuelles dans chacune des trois régions séquencées (Figure 4). Les mutations de l'antigène HBs et les délétions des régions preS n'étaient le plus souvent pas responsables de l'absence de détection de l'AgHBs, qui semblait en relation avec un manque de sensibilité des tests pour des titres faibles d'antigène HBs circulant. Des substitutions amino-acidiques non

décrites à ce jour pourraient expliquer l'absence de détection de l'antigène HBs dans les cas restants. Ces résultats montrent l'intérêt d'améliorer la sensibilité analytique de la détection de l'antigène HBs et la capacité à identifier les mutants de l'antigène de surface pour améliorer la sécurité virale des greffes d'organes, de tissus et de cellules.



**Figure 4 :** Alignement des séquences amino-acidiques de la région hydrophile majeure (MHR) allant des positions 99-160 de l'antigène de surface HBs. Les quatre groupes de donneurs ayant de l'ADN du VHB détectable sont représentés et comparés à une séquence de référence de chaque génotype du VHB.

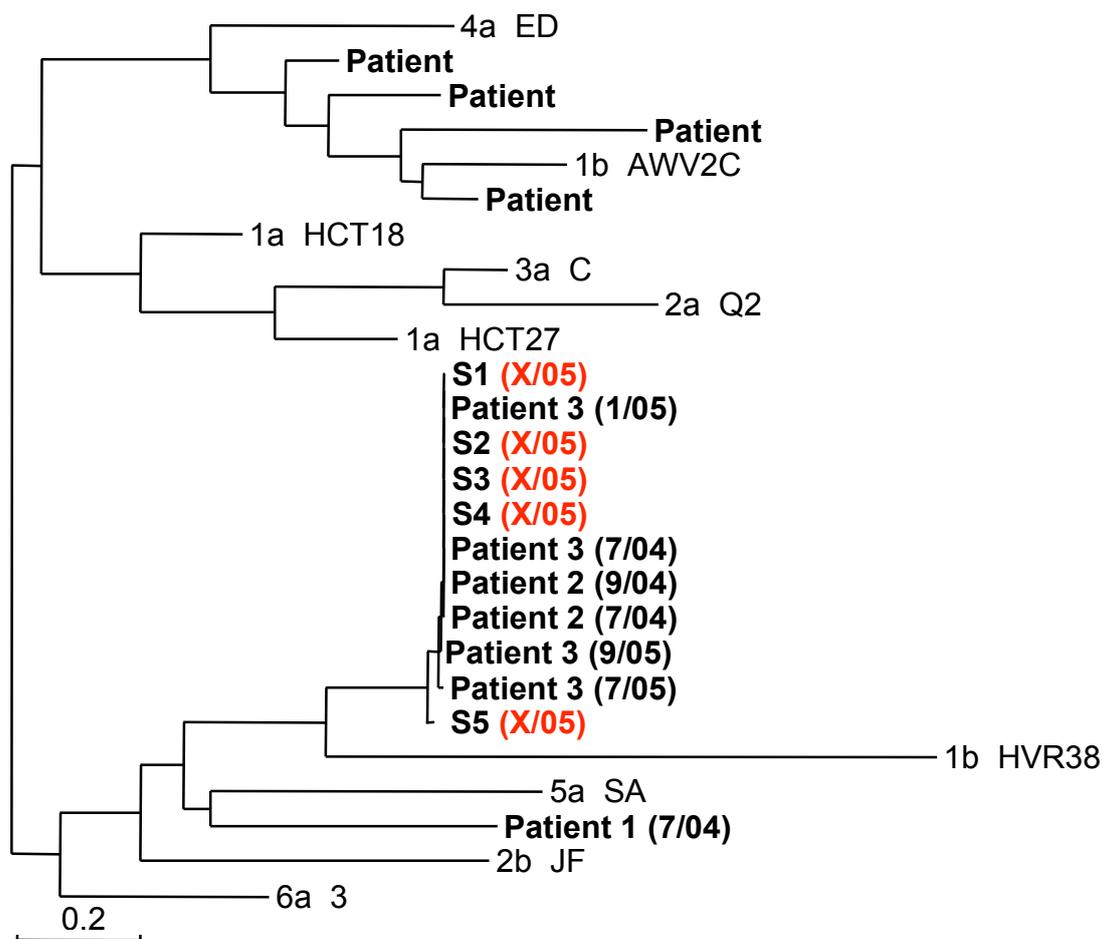
Enfin, en réponse à des demandes spécifiques de cliniciens, le CNR des hépatites B, C et delta a étudié la transmission du VHB chez des nouveaux-nés et ce malgré la mise en place de mesures prophylactiques (sérovaccination et administration d'immunoglobulines HBIG à la naissance). Les cas étudiés, au nombre de 2, n'ont pas permis de mettre en évidence de mutants de l'antigène HBs au niveau du déterminant « a », principal épitope B-dépendant.

#### **D. Investigation des cas isolés et groupés de transmission**

L'investigation des cas groupés de transmission du VHB et du VHC ou des cas isolés de transmission nosocomiale de ces virus a bénéficié de l'expérience du laboratoire, qui abrite le Centre de Prise en Charge des Hépatites Virales à Transmission Nosocomiale de l'AP-HP.

Dans ce cadre plusieurs études ont été réalisées. Une première étude a concerné deux cas de transmissions nosocomiales d'infection par le VHC dans l'unité de néphrodialyse de l'hôpital Henri Mondor, identifiées à la suite de la réalisation de sérologies systématiques après la séance de dialyse. Deux patients suivis en hémodialyse dans notre institution ont été infectés par le VHC entre janvier et juin 2005. Une étude virologique et épidémiologique a été conduite afin de déterminer si les patients avaient été contaminés au cours de séances d'hémodialyse et quels rôles respectifs jouaient la contamination de l'environnement et le non-respect des précautions standard de soins. Cinquante-deux patients suivis en hémodialyse dans le centre ont été testés pour la présence d'anticorps anti-VHC et de l'ARN du VHC. De nombreux prélèvements de l'environnement ont été réalisés à différentes dates sur différentes surfaces inertes ou supports. Pour tous les échantillons contenant une quantité détectable d'ARN viral, les séquences nucléotidiques ont été déterminées dans deux régions du génome viral (HVR1 et NS5B) et comparées par analyse phylogénique. L'un des deux patients ayant eu une séroconversion VHC avait été infecté par le virus d'un autre patient atteint d'une hépatite chronique C et suivi dans l'unité d'hémodialyse. Le deuxième patient

semblait s'être infecté en dehors de l'unité d'hémodialyse. Parmi les 740 échantillons prélevés sur supports ou surfaces inertes, 82 (11%) contenaient des traces d'hémoglobine, dont 6 (8%) contenaient de l'ARN viral du VHC. Les études génétiques et phylogéniques menées sur les souches de VHC isolées sur les supports et les surfaces inertes ont montré que toutes étaient très proches de la souche de VHC responsable de la transmission nosocomiale dans l'unité (Figure 5). L'adhésion aux précautions standard de soins était de 37,8% seulement et l'hygiène des mains était respectée dans environ 50% des cas. En conclusion de cette étude, les surfaces inertes contaminées par du sang peuvent constituer un réservoir pour le VHC, pouvant être à l'origine de transmissions nosocomiales du virus. Les personnels soignants peuvent être le vecteur de la transmission du virus présents sur les surfaces. Les précautions d'hygiène et le port des gants doivent être rigoureusement appliqués, car ils permettent d'éviter la transmission du VHC en unité d'hémodialyse, ce d'autant que le virus est présent dans l'environnement.



**Figure 5.** Arbre phylogénique réalisé dans la région HVR1 montrant la proximité des souches infectant le patient 3 (source), le patient 2 (infecté) et les surfaces inertes (S1 à S5).

Une étude similaire a été réalisée chez 64 patients suivis dans une unité de dialyse de l'hôpital Hubert Kutuku Maga de Cotonou au Bénin. Parmi les 64 patients étudiés, 19 (29,7%) avaient de l'ARN du VHC détectable dans leur sérum. Des souches de VHC de génotype 1 ont été isolées en majorité dans cette étude (63% des cas). L'étude phylogénique de la région HVR1 a montré que les 4 souches de sous-type 1i et les 12 souches de génotype 1m (voir ci-dessus) avaient très probablement été transmises de patient à patient au sein de l'unité d'hémodialyse (Figure 3).

À la demande du CHU de Lille, nous avons étudié une suspicion de transmission au sein d'une unité d'hémodialyse entre deux patients dialysés chroniques dont l'un avait une sérologie positive vis-à-vis du VHC depuis 2001 et l'autre une séropositivité vis-à-vis du VHC révélée en 2006. Les études génétiques et phylogéniques de trois régions du génome viral (NS5B, HVR1 et E1) suggéraient très fortement que les deux malades étaient infectés par la même souche de VHC de génotype 1a, donc qu'un des malades était la source de la contamination de l'autre, ou que tous les deux avaient été infectés par un autre malade (hypothèse improbable étant donné que le premier patient avait une séropositivité vis-à-vis du VHC connue depuis 2001). Le caractère nosocomial de la contamination au sein de l'unité d'hémodialyse pouvait donc être suspecté.

Nous avons été saisis pour une expertise auprès du Tribunal de Grande Instance de Pontoise pour une suspicion de transmission du VHC entre deux prévenus. Nous avons réalisé une analyse phylogénique des populations virales présentes chez ces deux personnes dans deux régions du génome viral, NS5B et HVR1. Le génotype viral retrouvé chez ces deux personnes était identique (génotype 1a) et l'analyse de la région HVR1 montrait que les souches, bien que présentant de légères différences sans doute liées à l'évolution génétique naturelle, étaient très proches l'une de l'autre et différentes des séquences de référence utilisées. En conclusion, les analyses suggéraient fortement que l'un des deux sujets avait contaminé l'autre, mais aucune conclusion sur le mode de transmission et la date ne pouvait être tirée.

Nous avons enfin réalisé une étude de transmission dans le cadre d'une suspicion de contamination professionnelle par le VHC. Le séquençage d'une portion du gène NS5B a été réalisé à partir des prélèvements des deux patients, suivi d'une analyse phylogénique permettant d'identifier le génotype de la souche infectante, qui était de génotype 1a. Les études phylogéniques de la région HVR1, localisée au sein du gène codant la glycoprotéine d'enveloppe E2, et de l'intégralité de la région codant la glycoprotéine E1 (557 nucléotides), régions permettant d'étudier plus précisément la parenté entre les souches virales de VHC, ont été réalisées. Les séquences présentaient un fort pourcentage d'homologie nucléotidique (respectivement 81% et 95% pour les régions HVR1 et E1). L'étude de la région codant la glycoprotéine d'enveloppe E1, fondée sur l'alignement des séquences obtenues avec 52 séquences nucléotidiques disponibles dans les banques, montrait que les souches étaient phylogéniquement très proches, et plus proches l'une de l'autre que d'aucune séquence prototypes incluse dans l'analyse. En conclusion, les analyses génétiques et phylogéniques des souches de VHC de ces deux patientes suggéraient très fortement que l'une avait été infectée par le virus de l'autre. Il était cependant impossible de conclure quant au mode de transmission et à sa date. Le caractère professionnel de la contamination ne pouvait être exclu.

### **E. Surveillance et caractérisation de la résistance aux antiviraux**

L'échec thérapeutique et la résistance du VHB et du VHC aux molécules antivirales constituent une des principales thématiques du laboratoire et de l'équipe INSERM qui lui est associée, à la fois dans ses aspects cliniques et plus fondamentaux (étude des mécanismes moléculaires de l'efficacité et de l'échec des anti-viraux). Un certain nombre de travaux d'investigation ont été réalisés dans la suite des activités antérieures à l'implantation du CNR. Cette première année a cependant été principalement consacrée à la mise en place des outils qui devraient permettre la mise en place d'une réelle plate-forme de surveillance de la résistance des virus d'hépatites en France, dont on peut espérer qu'elle sera opérationnelle au cours de l'année 2008, selon le degré d'investissement des partenaires (FNPRRH et ANRS).

Plusieurs travaux d'investigation ont été réalisés dans cette thématique. Le premier portait sur le mécanisme moléculaire de l'action antivirale de la ribavirine dans le traitement des hépatites chroniques C. De nombreux mécanismes, hypothétiques, peuvent expliquer l'effet antiviral de la ribavirine dans le traitement de l'hépatite chronique C. L'hypothèse la plus en vogue est un effet mutagène de la ribavirine engendrant une « catastrophe d'erreurs », c'est-à-dire générant une quasi-espèce virale non viable. L'analyse génétique de plusieurs centaines de séquences de clones isolés à différents temps avant, pendant et après le traitement chez des malades recevant soit de la ribavirine seule, soit une combinaison d'interféron alpha et de ribavirine, n'a pas montré d'effet mutagène de la ribavirine, même lorsque la réplication virale était profondément inhibée par l'action antivirale de l'interféron alpha. Ces résultats remettent en cause l'hypothèse d'une action mutagène de la ribavirine induisant une catastrophe d'erreurs au cours de la réplication du VHC (Chevaliez et al., J Virol 2007).

Une étude des mutations de résistance sélectionnées au cours du traitement combiné de l'hépatite chronique B par la lamivudine et l'adefovir est en cours qui a permis d'identifier 3 cas sur une cinquantaine de malades traités. Un de ces malades présentait une mutation A181V qui confère une résistance croisée aux deux molécules. Les deux autres malades présentaient uniquement des mutations de résistance à la lamivudine et étaient sans doute des répondeurs suboptimaux à l'adefovir. Dans une dernière étude, toute récente, nous avons étudié 6 malades ayant une hépatite chronique C et ayant rechuté sous traitement de 12 semaines par l'association interféron alpha pégylé-ribavirine-telaprevir (inhibiteur spécifique de la protéase du VHC en développement de phase II) ou après son arrêt. Cette étude nous a permis d'identifier de nouvelles mutations associées à la résistance, inconnues jusqu'alors, qui sont actuellement testées dans nos modèles *in vitro*.

Au cours de l'année 2006, 12 recherches de mutations de résistance à différentes molécules antivirales utilisées dans le traitement des hépatites B ont été demandées dans le cadre du diagnostic étiologique de l'échec thérapeutique secondaire. Les échantillons proviennent essentiellement d'hôpitaux de l'AP-HP

(Saint Antoine, Bicêtre, Henri Mondor, Pitié-Salpêtrière) et de l'hôpital Intercommunal de Créteil.

Nous souhaitons développer au sein du CNR un observatoire national de la résistance des virus d'hépatites B et C aux traitements antiviraux disponibles et en développement. Ce projet s'intégrera dans celui de la création d'une cohorte nationale de malades porteurs d'hépatites chroniques B ou C en échec thérapeutique, souhaitée par le Professeur Jean-François DELFRAISSY, Directeur de l'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS), qui sera co-coordonnée par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY et dont les aspects virologiques seront confiés au CNR. Cette cohorte, montée en collaboration avec la FNPRRH, inclura de façon prospective tous les malades infectés par le VHB recevant un traitement par interféron alpha ou par inhibiteurs spécifiques du VHB en état d'échec thérapeutique, ce dernier étant le plus souvent associé à une résistance antivirale dans le cas des inhibiteurs. Elle inclura également l'ensemble des malades traités au cours des années futures par la combinaison d'interféron alpha et de ribavirine, mais aussi par toutes les nouvelles classes thérapeutiques en développement, dont on sait d'ores et déjà qu'elle généreront des fréquences élevées de résistances antivirales. La création de cette cohorte et le travail d'analyses virologiques réalisé par le CNR permettra une surveillance précise de l'épidémiologie et une caractérisation moléculaire de la résistance des virus d'hépatites aux antiviraux et le suivi de son évolutivité. La cohorte et les multiples théques qui lui seront associées représenteront également une source importante d'études scientifiques sur la résistance, du type de celles décrites dans le projet scientifique. Les discussions sont en cours pour monter ce projet.

### **III- CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPPENS**

Les activités du CNR en matière de surveillance sur le plan national sont connectées avec le réseau d'excellence européen ViRgil (Combating Viral Resistance to Treatments), financé dans le cadre du 6<sup>ème</sup> PCRD de la Commission

Européenne, premier réseau européen de surveillance de l'émergence des résistances aux anti-viraux des virus d'hépatites. Ce réseau associe près de 70 centres cliniques, laboratoires de recherche et PME européennes autour de la surveillance et de l'investigation de la résistance virale ([www.virgil-net.org](http://www.virgil-net.org)). Le fonctionnement du réseau européen ViRgil n'a pas été optimal au cours des trois premières années de son fonctionnement, en particulier du fait de sa taille, trop importante, de son manque de focalisation, et de la lourdeur administrative liée au fonctionnement des réseaux d'excellence européens. Un reformatage du réseau est prévu dans le courant de l'année 2008 qui devrait permettre d'amplifier les collaborations. Au cours de l'année 2008, celles-ci se sont bornées au séquençage de souches de VHB résistants à l'adefovir provenant de plusieurs centres européens inclus dans une étude multicentrique.

#### IV- LISTE DES PUBLICATIONS

##### 2006

1. Pallier C, Castéra L, Soulier A, Hézode C, Nordmann P, Dhumeaux D, **Pawlotsky JM**. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine. *J Virol* 2006; 80: 643-653.
2. **Pawlotsky JM**. Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl.1): S10-S13.
3. McHutchison JG, Bartenschlager R, Patel K, **Pawlotsky JM**. The face of future hepatitis C antiviral drug development: recent biological and virologic advances and their translation to drug development and clinical practice (review article). *J Hepatol* 2006; 44: 411-421.
4. **Pawlotsky JM**. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology* 2006; 43 (Suppl. 1): S207-S220.
5. **Laperche S**, Saune K, Dény P, Duverlie G, Alain S, Chaix ML, Gaudy C, Lunel F, **Pawlotsky JM**, Payan C, Pozzetto C, Tamalet C, Thibault V, Vallet S, Bouchardeau F, Izopet J, Lefrère JJ. A unique NS5B hepatitis C virus (HCV) gene sequence consensus database is essential for the standardization of genotype determination in multicenter epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 614-616.
6. **Chevaliez S**, **Pawlotsky JM**. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci* 2006; 3: 35-40.
7. **Pawlotsky JM**. EASL: a growing association in the global world. *J Hepatol* 2006; 44: 623.

8. **Pawlotsky JM**. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 299: 261-284.
9. **Pawlotsky JM**, Gish RG. Future therapies of hepatitis C. *Antiviral Ther* 2006; 11: 397-408.
10. **Pawlotsky JM**. Science, medicine and... the markets. *J Hepatol* 2006; 45: 341-342.
11. **Pawlotsky JM**. EASL recognition awards. *J Hepatol* 2006; 45: 463.
12. Morice Y, Cantaloube JF, Beaucourt S, Barbotte L, De Gendt S, Lopes Goncales F, Butterworth E, Cooksley G, Gish RG, Beaugrand M, Fay F, Fay O, Gonzalez JE, Bringel Martins RM, Dhumeaux D, Vanderborght B, Stuyver L, Sablon E, de Lamballerie X, **Pawlotsky JM**. Molecular epidemiology of hepatitis C virus subtype 3a in injecting drug users. *J Med Virol* 2006; 78: 1296-1303.
13. Romero AI, Lagging M, Westin J, Dhillon AP, Dustin LB, **Pawlotsky JM**, Neumann AU, Ferrari C, Missale G, Haagmans BL, Schalm SW, Zeuzem S, Negro F, Verheij-Hart E, Hellstrand K. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN- alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006; 194: 895-903.
14. **Chevaliez S, Pawlotsky JM**. Clinical virology of hepatitis C virus. *Future Virology* 2006; 1: 649-657.
15. **Challine D, Roudot-Thoraval F, Sabatier P, Dubernet F, Larderie P, Rigot P, Pawlotsky JM**. Serological viral testing of cadaveric cornea donors. *Transplantation* 2006; 82: 788-793.
16. **Laperche S**, Thibault V, Bouchardeau F, Alain S, Castelain S, Gassin M, Gueudin M, Halfon P, Larrat S, Lunel F, Martinot-Peignoux M, Mercier B, **Pawlotsky JM**, Pozzetto B, Roque-Afonso AM, **Roudot-Thoraval F**, Saune K, Lefrère JJ. Expertise of laboratories in viral load quantification, genotyping and precore mutant determination for hepatitis B virus in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3600-3607.
17. Bronowicki JP, Ouzan D, Asselah T, Desmorat H, Zarski JP, Foucher J, Bourlière M, Renou C, Tran A, Melin P, Hézode C, Chevalier M, **Bouvier-Alias M, Chevaliez S**, Montestruc F, Lonjon-Domanec I, **Pawlotsky JM**. Effect of ribavirin in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006; 131: 1040-1048.
18. Kuiken C, Combet C, Bukh J, Shin-I T, Deléage G, Mizokami M, Richardson R, Sablon E, Yusim K, **Pawlotsky JM**, Simmonds P. A comprehensive system for consistent numbering of HCV sequences, proteins and epitopes. *Hepatology* 2006; 44: 1355-1361.
19. Lagging M, Romero AI, Westin J, Norkrans G, Dhillon AP, **Pawlotsky JM**, Zeuzem S, von Wagner M, Negro F, Schalm SW, Haagmans BL, Ferrari C, Missale G, Neumann AU, Verheij-Hart E, Hellstrand K. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006; 44: 1617-1625.
20. Perrin L, **Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M**, Sarrazin C, Zeuzem S, Colucci G. Multicenter performance evaluation of a new Taqman PCR assay for monitoring HIV RNA load. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4371-4375.

## 2007

1. Lukasiewicz E, Hellstrand K, Westin J, Ferrari C, Neumann AU, **Pawlotsky JM**, Schalm SW, Zeuzem S, Veldt BJ, Hansen BE, Verhey-Hart E, Lagging M. Predicting treatment outcome following 24 weeks peginterferon a2a/ribavirin therapy in patients infected with HCV genotype 1: utility of HCV RNA at day 0, day 22, day 29 and week 6. *Hepatology* 2007; 45: 258-259.
2. Combet C, Garnier N, Charavay C, Grando D, Crisan D, Lopez J, Dehne-Garcia A, Geourjon C, Bettler E, Hulo C, Le Mercier P, Bartenschlager R, Diepolder H, Moradpour D, **Pawlotsky JM**, Rice C, Trépo C, Penin F, Deleage G. euHCVdb: the European hepatitis C virus database. *Nucl Acids Res* 2007; 35: D363-D366.
3. **Brillet R**, Penin F, Hézode C, Chouteau P, Dhumeaux D, **Pawlotsky JM**. The nonstructural 5A (NS5A) protein of hepatitis C virus genotype 1b does not contain an "interferon sensitivity determining region". *J Infect Dis* 2006; 195: 432-441.
4. Westin J, Lagging M, Dhillon AP, Norkrans G, Romero A, **Pawlotsky JM**, Zeuzem S, Schalm SW, Verheij-Hart E, Negro F, Missale G, Neumann AU, Hellstrand K. Impact of steatosis on viral kinetics and treatment outcome during antiviral treatment of chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007; 14: 29-35.
5. **Bouchardeau F**, Cantaloube JF, **Chevaliez S**, Portal C, Razer A, Lefrère JJ, **Pawlotsky JM**, De Micco P, Laperche S. Improvement of hepatitis C virus (HCV) genotype determination with the new version of the Inno-LiPA HCV assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1140-1145.
6. Hézode C, **Chevaliez S**, **Bouvier-Alias M**, **Roudot-Thoraval F**, Brillet R, Zafrani ES, Dhumeaux D, **Pawlotsky JM**. Efficacy and safety of adefovir dipivoxil 20 mg daily in HBeAg-positive patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus and a suboptimal virological response to adefovir dipivoxil 10 mg daily. *J Hepatol* 2007; 46: 791-796.
7. Westin J, Hellstrand K, Alsio A, Ydreborg M, Ferrari C, Neumann AU, **Pawlotsky JM**, Schalm SW, Zeuzem S, Verhey-Hart E, Lagging M. Impact of disease severity on outcome of antiviral therapy in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 45: 1333-1334.
8. **Pawlotsky JM**. Treatment of hepatitis C: don't put all your eggs in one basket !. *Gastroenterology* 2007; 132: 1611-1615.
9. **Pawlotsky JM**, **Chevaliez S**, McHutchison JG. The hepatitis C virus as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007; 132: 1979-1998.
10. **Chevaliez S**, **Bouvier-Alias M**, **Brillet R**, **Pawlotsky JM**. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. *Hepatology* 2007; in press.
11. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, **Pawlotsky JM**, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C. Antiviral resistant hepatitis B virus: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007; in press.
12. **Chevaliez S**, **Pawlotsky JM**. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007; in press.

13. **Chevaliez S, Brillet R, Hézode C, Pawlotsky JM.** Analysis of ribavirin's mutagenic properties in human hepatitis C virus infection. J Virol 2007; in press.

## ARTICLES A CARACTERE DIDACTIQUE

### I- REVUES NON FRANCOPHONES

#### 2006

1. **Pawlotsky JM.** Definitions of HBV treatment failure and resistance. In: Clinical strategies for preventing and managing resistance to anti-HBV agents. Clinical Care Options Hepatitis, ed. Clinical Care Options LLC, 2006: 25-33.
2. **Pawlotsky JM, Chevaliez S.** Virological tools in hepatitis B virus infection. European Gastroenterology Review 2006; 2: 39-44..

#### 2007

1. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** Diagnostic tools in hepatitis B. Hot Topics in Viral Hepatitis 2007; 4: 7-14.

### II- REVUES FRANCOPHONES

#### 2006

1. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** Diagnostic et suivi du traitement des hépatites B et C: apport de la PCR en temps réel. Réseaux Hépatites 2006; 40: 16-19.
2. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** Virus de l'hépatite B: quels outils virologiques pour le clinicien ? La lettre de l'hépatogastroentérologue 2006; 9: 184-187

## CHAPITRES DE LIVRES

### I- LIVRES INTERNATIONAUX

#### 2006

1. **Pawlotsky JM.** Hepatitis C virus population dynamics during infection. In : Quasispecies : concepts and implications for virology. Domingo E, ed. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (Germany), 2006 : 261-284.
2. **Pawlotsky JM.** Current and future status of drug therapy in hepatitis C virus infection. In: Trends and research in viral hepatitis. Raghunath D, Nayak R, eds. Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd, New Delhi (India), 2006: 283-304.
3. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** Hepatitis C virus genome and lifecycle. In: Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology. Tan SL, ed. Horizon Scientific Press, Norwich (UK), 2006 : 5-47.
4. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** Diagnosis and monitoring of hepatitis C virus. In: Viral hepatitis. Buti M, Esteban R, eds. Schering-Plough Grup3, Barcelona (Espagne), 2006: 168-179.

### 2007

1. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** How to use virological tools for the optimal management of chronic hepatitis C ? In: Management of patients with viral hepatitis. Marcellin P, ed. APHC, Paris (France), 2007: 25-36.

## CONFERENCES SUR INVITATIONS

### I- INTERNATIONALES

#### 2006

1. **Pawlotsky JM.** "Mechanisms of HCV infection", European Association for the Study of the Liver (EASL) Monothematic Conference "Liver Transplantation for Viral Hepatitis", Paris (France), 12-14 janvier 2006.
2. **Pawlotsky JM.** "Monitoring HBV infection", Gilead HBV Seminar, Rome (Italie) 3-4 février 2006.
3. **Pawlotsky JM.** "The future of HCV therapy", National Hepatitis Day, Stockholm (Suède), 6-7 février 2006.
4. **Pawlotsky JM.** "Tests for HBV". NIDDK/NIH-AASLD Meeting on "Management of chronic hepatitis B : 2006", Bethesda (USA), 6-8 avril 2006.
5. **Pawlotsky JM.** "Chronic hepatitis therapy", 4<sup>th</sup> Arab Symposium for Antimicrobial Agents & 16<sup>th</sup> Tunisian National Congress of Infectiology, Tunis (Tunisie), 17-20 avril 2006.
6. **Pawlotsky JM.** "Hepatitis B: what we are up against", Hepatitis B Stakeholder Forum, Parlement Européen, Bruxelles (Belgique), 25 avril 2006.
7. **Pawlotsky JM.** "Definition and diagnosis of HCV resistance", ViRgil-EASL Joint Meeting, 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Vienne (Autriche), 26-30 avril 2006.

8. **Pawlotsky JM.** "Overview of new directions in HCV therapy", Congrès "Bridging the Sciences. HIV, HBV, HCV and emerging viruses", Paris (France), 31 mai-2 juin 2006.
9. **Pawlotsky JM.** "Current state-of-the art on hepatitis C research", 2<sup>nd</sup> International Conference "Moving forward with hepatitis C", Dublin (Irlande), 21-23 juin 2006.
10. **Pawlotsky JM.** "HCV kinetics, the target for HCV therapies", 12<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Paris (France), 1-5 juillet 2006.
11. **Pawlotsky JM.** "New treatments for HBV", 12<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Paris (France), 1-5 juillet 2006
12. **Pawlotsky JM.** "Coinfections and viral interference", ANRS-ISVHLD Coinfection Day, 12<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Paris (France), 1-5 juillet 2006.
13. **Pawlotsky JM.** "HBV screening in liver donors", Symposium "Occult hepatitis B: diagnosis and pathogenesis", 12<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Paris (France), 1-5 juillet 2006.
14. **Pawlotsky JM.** "Diagnosis and monitoring of HCV", 8<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis, Barcelone (Espagne), 7-8 septembre 2006.
15. **Pawlotsky JM.** "Telaprevir-VX 950: preclinical data", Investigators Meeting of the PROVE2 Trial, Francfort (Allemagne), 11-12 septembre 2006.
16. **Pawlotsky JM.** "Applications of genetic and phylogenetic analyses to a human viral infection: the example of hepatitis C", 12th International Workshop on Virus Evolution and Molecular Epidemiology, Athènes (Grèce), 11-16 septembre 2006.
17. **Pawlotsky JM.** "New therapies for HCV", 16th Romanian Congress of Hepatology, Bucarest (Roumanie), 22-23 septembre 2006.
18. **Pawlotsky JM.** "The future in the treatment of hepatitis C", 13th Falk Liver Week, Freiburg (Allemagne), 6-11 octobre 2006.
19. **Pawlotsky JM.** "New targets and the drug pipeline in hepatitis C", European Association for the Study of the Liver (EASL) Post-Graduate Course, United European Gastroenterology Week, 21-25 octobre 2006.
20. **Pawlotsky JM.** "Management of resistance : implications for treatment choice", Symposium "Focus on the Virus: A New Paradigm for the Management and Treatment of HBV", 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston (USA), 27-31 octobre 2006.
21. **Pawlotsky JM.** "Viral Resistance: Translating Science into Clinical Application", Symposium "Revolutionizing the Way We Treat HCV: STAT-C", 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston (USA), 27-31 octobre 2006.
22. **Pawlotsky JM.** "HBV Resistance: concepts, prevention, management", Grand Rounds at Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston (USA), 1er novembre 2006.
23. **Pawlotsky JM.** "HBV Resistance: concepts, prevention, management", New England Medical Center, Boston (USA), 2 novembre 2006.

24. **Pawlotsky JM.** "HBV Resistance: concepts, prevention, management", University of Massachusetts Medical Center (UMass), Worcester (USA), 3 novembre 2006.
25. **Pawlotsky JM.** "Evolving knowledge in HCV and new molecular targets", Astra/Zeneca Advisory Meeting on Hepatitis C Therapy, Toronto (Canada), 8-9 novembre 2006.
26. **Pawlotsky JM.** "Monitoring the HBV patient: when can we stop ?": 2<sup>nd</sup> European Viral Hepatitis Educational Initiative (EVHEI) Workshop, Francfort (Allemagne), 23-24 novembre 2006.
27. **Pawlotsky JM.** "Why is sensitivity to interferon alpha dependent on HCV genotype ?", Symposium on Viral Hepatitis, Taormina (Italie), 26-28 novembre 2006.
28. **Pawlotsky JM.** "Available and evolving approaches to HCV treatment", Monothematic Conference "Hepatic fibrosis" of the Indian Association for the Study of the Liver (INASL), Calcutta (Inde), 8-10 décembre 2006.

### 2007

1. **Pawlotsky JM.** "How to use virological tools for the optimal management of chronic hepatitis C", 2<sup>nd</sup> Paris Hepatitis Conference, Paris (France), 22-23 janvier 2007.
2. **Pawlotsky JM.** "HCV kinetics on ribavirin therapy", American Association for the Study of the Liver (AASLD) Single Topic Conference "Mechanisms of action of interferon and ribavirin in hepatitis C", Chicago (USA), 1-3 mars 2007.
3. **Chevaliez S.** "Intérêt clinique de la détermination du génotype du virus de l'hépatite C dans la prise en charge thérapeutique". Workshop Innogenetics, Vienne, 19 mars 2007
4. **Pawlotsky JM.** "Donor occult HBV in liver transplantation", 3<sup>rd</sup> European Liver and Intestinal Transplantation Association (ELITA)-European Liver Transplant Registry (ELTR) Winter Meeting, Obergugl (Autriche), 24-26 mars 2007.
5. **Pawlotsky JM.** "Virological basis of future treatment strategies for hepatitis C", 10<sup>th</sup> Interdisciplinary Winter Meeting, Obergugl (Autriche), 27-28 mars 2007.
6. **Pawlotsky JM.** "Management of resistance in the HBV patients", 10<sup>th</sup> Greek National Hepatology Congress, Athènes (Grèce), 26-29 avril 2007.
7. **Pawlotsky JM.** "How to monitor for response and resistance", Hepatitis B Clinical Symposium, Digestive Disease Week, Washington (USA), 19-24 mai 2007.
8. **Pawlotsky JM.** "Hepatitis C virus therapy", State-of-the-Art Lecture, Digestive Disease Week, Washington (USA), 19-24 mai 2007.
9. **Pawlotsky JM.** "Management of resistance in the HBV patients", 6<sup>th</sup> Turkish National Hepatology Congress, Istanbul (Turquie), 8-10 juin 2007.

## II- NATIONALES

1. **Pawlotsky JM.** "Nouvelles approches thérapeutiques des hépatites virales B et C", Journée du Foie organisée par le service d'Hépatologie-Gastroentérologie du CHU de Montpellier, Montpellier, 20 janvier 2006.
2. **Chevaliez S.** "Actualités sur la grippe aviaire". 2<sup>ème</sup> Journée d'Actualités en Prévention de l'Infection, Hôpital Henri Mondor, Créteil, 23 mars 2006
3. **Pawlotsky JM.** "Nouvelles molécules dans le traitement de l'hépatite chronique C", Ateliers "Non répondeurs", Journée Roche Hépatologie, Paris, 12-13 mai 2006.
4. **Pawlotsky JM.** "Nouveaux traitements de l'hépatite C: des concepts au réel", 23<sup>ème</sup> Journée Jean-Claude Dreyfus "Le foie et ses maladies", Faculté de Médecine Cochin, Paris, 15 septembre 2006.
5. **Pawlotsky JM.** "VHC: diversité et réponse au traitement", Réunion Plénière de l'Action Coordonnée 11 (AC11) de l'ANRS, Paris, 19 septembre 2006.
6. **Pawlotsky JM.** "Les hépatites virales", Colloque Microbiologie du Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur (PRES) UniverSud Paris, Villejuif, 23 septembre 2006.
7. **Pawlotsky JM.** "Diagnostic et surveillance de l'hépatite C", Séminaire de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département de la Formation Continue des Médecins "Le point sur les hepatitis B et C", Paris, 4 octobre 2006.
8. **Pawlotsky JM.** "Résistance du VHC: nouveaux concepts ?", Journées PROSPECTH, Laboratoires Schering-Plough, Nice, 13-14 octobre 2006.
9. **Pawlotsky JM.** "Hépatite C: virologie et cinétique virale", Journée Régionale de Pathologie Infectieuse, Lille, 17 octobre 2007.
10. **Pawlotsky JM.** "Histoire naturelle, clinique et virologie des hépatites à HCV", Séminaire de formation à la santé INSERM, Paris, 24 octobre 2006.
11. **Pawlotsky JM.** "Résistance à l'Entecavir", Symposium de lancement de Baraclude (entecavir), Cannes, 1<sup>er</sup> décembre 2006.
12. **Chevaliez S.** "Résistance à l'Entecavir", Symposium de lancement de Baraclude (entecavir), Cannes, 1<sup>er</sup> décembre 2006

## 2007

1. **Pawlotsky JM.** "Nouveaux traitements de l'hépatite C", Journée d'Hépatologie de l'hôpital Beaujon, Paris, 13 janvier 2007.

## V- PROGRAMME D'ACTIVITES 2008-2009

Les priorités des prochaines années seront :

1- La réalisation d'études nationales, en collaboration avec la FNPRRH, permettant de surveiller l'évolution de la distribution en France des génotypes du VHC et du VHB, qui peut avoir d'importantes conséquences en thérapeutique.

2- La surveillance de la transmission des virus d'hépatites en transplantation d'organes, de tissus et de cellules.

3- La réalisation d'études des performances analytiques et cliniques de nouvelles techniques de biologie moléculaire destinées à la quantification de la charge virale du VHB et du VHC et à la mise en évidence de mutations (en collaboration avec les équipes de R&D de plusieurs firmes industrielles avec lesquelles nous sommes en contact).

4- La mise en place de l'observatoire national des malades non répondeurs aux traitements du VHB et du VHC qui permettra la structuration de la surveillance de la résistance aux antiviraux à l'échelon national.

5- L'évaluation des performances d'un test salivaire pour la détection des anticorps anti-VHC totaux dans la salive.

**III**

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

**Institut National de la Transfusion Sanguine  
Paris**

## **1/ Introduction :**

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

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

- 1 aide laboratoire,
- 3 techniciens de laboratoires,
- 3 biotechnologistes,
- 2 biotechnologistes approfondis,
- 2 ingénieurs de recherche,
- 1 secrétaire,
- 1 médecin biologiste responsable du laboratoire.

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

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

L'INTS est un groupement d'intérêt public en partie financé par la CNAM.

Les activités du laboratoire sont en cours d'accréditation selon la norme 17025 (dossier déposé au COFRAC en février 2007)

Les locaux abritant le plateau technique de Virologie ont bénéficié d'une rénovation récente (2000) ayant impliqué une restructuration totale des laboratoires. Ces travaux ont été dictés par les exigences de mise en conformité pour un fonctionnement compatible avec des activités de référence. La surface des locaux comprenant les laboratoires, les zones de stockage ambiant et froid et les bureaux est de 314 m<sup>2</sup>.

Trois secteurs d'activités peuvent être individualisés :

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

- 2) un secteur dédié à la constitution des sérothèques et panels (hottes à flux laminaires, congélateurs..)
- 3) un secteur occupé par les activités de virologie fondamentale avec notamment trois pièces dédiées à la culture virale sous un confinement de type P2.

## **2/ Activités d'expertise :**

### **2-1 Capacités techniques du CNR**

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

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

Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles :

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

Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

Pour le VHB :

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

Pour le VHC :

Nous disposons de divers panels d'échantillons plasmatiques

Ceux-ci comprennent principalement :

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

Stockage en enceintes à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2-2 Activités d'expertise de l'année 2006**

### **Expertise dans le domaine de la sécurité transfusionnelle**

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

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

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

En 2006, deux dossiers ont été expertisés (2 réactifs de mesure de l'ARN du VHC) et deux expertises techniques réalisées (un réactif de dépistage des anti-VHC et un réactif de détermination du génotype VHC).

Les outils du dépistage constituent une des bases fondamentales sur lesquelles repose la sécurité des produits sanguins. La veille scientifique et la validation des méthodes utilisées permettent d'éviter les dérives qui pourraient compromettre la

qualité du dépistage et, de ce fait, la sécurité transfusionnelle. De la même façon, l'évaluation et la validation des outils nouvellement développés s'inscrivent dans l'amélioration de la stratégie sécuritaire. Par ailleurs, la veille technique sur les outils biologiques de caractérisation virale sur lesquels est basée l'épidémiologie des donneurs de sang est nécessaire pour harmoniser et valider les pratiques.

Dans ce cadre, nous avons étudié les performances d'un réactif nouvellement développé pour le génotypage du VHC (Versant™ HCV Genotype assay 2.0). Celui-ci correspond à la deuxième version d'un réactif existant basé sur la détermination du génotype des souches VHC à partir de sondes oligonucléotidiques complémentaires de fragments situés dans la région 5'NC du virus et spécifiques de génotypes, auxquelles, pour la deuxième version, ont été ajoutées des sondes spécifiques de la région core du virus, destinées à mieux différencier les sous-types des génotypes 1 et 6. Les résultats obtenus de l'étude de 135 échantillons issus de nos collections, et caractérisés par analyse phylogénique des souches, ont permis d'identifier de meilleures performances de la version 2 du test puisque 64,7% des résultats étaient concordants avec le séquençage avec la version 2 contre 37,5% avec la version précédente, et ce principalement à la faveur d'une meilleure caractérisation des sous types du génotype 1 essentiellement grâce à l'ajout des sondes core (96,8% de résultats justes avec la version 2 contre 45,2% avec la version 1) (Bouchardeau et al. J Clin Microbiol. 2007;45:1140).

### **Les contrôles de qualités**

Dans le cadre de l'étude du VHB, nous avons coordonné une étude multicentrique nationale (Laperche S, J Clin Microbiol. 2006;44:3600), incluant quatorze laboratoires spécialisés appelés à collaborer à des protocoles multicentriques. L'objectif de cette étude était d'évaluer ces laboratoires sous trois volets :

- (i) la détermination de la charge virale de l'ADN du VHB, notamment pour évaluer les techniques de PCR en temps réel, qui constituent de nouveaux outils proposés en ce domaine,
- (ii) la détermination du génotype,
- (iii) l'identification de la présence de mutants pré core/core.

Les résultats ont montré que, parallèlement aux techniques « classiques » que ce soit de PCR ou d'amplification du signal, largement répandues, émergeaient des techniques nouvelles de PCR en temps réel, présentant des avantages à la fois organisationnels (grâce notamment à leur automation) et de performance (avec des seuils de sensibilité analytique plus bas et une plage de quantification plus large). Ces techniques, actuellement dédiées au diagnostic biologique, sont en développement pour la qualification des dons, car leurs propriétés en font des outils adaptés aux exigences du dépistage transfusionnel. Par ailleurs, l'exactitude dans la détermination du génotype variait de 33 % à 100 % en fonction des laboratoires. Enfin, la fiabilité dans l'identification d'un mutant pré-core variait de 25 % à 100 % selon les laboratoires.

Pour le VHC, divers panels d'échantillons ont été préparés dans le cadre de contrôles de qualité organisés par l'Agence nationale de recherche sur le SIDA et les Hépatites virales (ANRS). Nous avons coordonné deux études complémentaires, dont la seconde s'est déroulée en 2006 (Laperche S et al. J Clin.Microbiol 2006;44:614) visant à valider l'expertise des laboratoires appelés à collaborer à des protocoles multicentriques sous l'égide de l'ANRS, pour la détermination des génotypes du VHC). Les résultats de la première étude ont conduit à proposer d'utiliser les techniques de génotypage basées sur la région 5'NC du génome viral dans les travaux pour lesquels l'identification du sous-type revêt un intérêt moindre (applications essentiellement cliniques et thérapeutiques), et les techniques de séquençage dans la région NS5b pour les études épidémiologiques. La seconde étude a conduit à proposer une uniformisation des banques des séquences utilisées dans le cadre de travaux communs. Cette précaution revêt une importance capitale lorsqu'il s'agit d'établir des liens épidémiologiques entre les souches et les facteurs de risque susceptibles d'être rencontrés chez les donneurs de sang.

### **3/ Activités de surveillance des donneurs de sang:**

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

Parallèlement à cette veille épidémiologique descriptive, est menée une surveillance virologique plus spécifique. Elle a pour objectif de mieux caractériser le profil biologique des donneurs confirmés positifs pour les virus VHB et VHC et d'assurer une veille de la diversité virale des souches circulant dans la population des donneurs de sang. Cette surveillance est réalisée en prospectif depuis 2000 à partir d'un échantillon de chaque don confirmé positif. Les Antilles exclues de ce recueil jusqu'en 2005 en raison de difficultés organisationnelles occasionnées par le transport des échantillons, ont été intégrées à cette surveillance en 2006. Toutefois la mise en place récente de cette mesure ne permet pas encore d'apporter des renseignements significatifs spécifiques à ces départements.

#### **1) Méthode**

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

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

(i) le taux d'incidence ( $T_i$ ) des séroconversions pour chaque virus étudié, dans la population des donneurs ayant donné au moins deux fois durant la période de l'étude (qui est de 3 années consécutives) et,

(ii) les estimations des durées respectives des fenêtres silencieuses publiées dans la littérature: 22 jours (6-38) pour les anticorps anti-VIH (3) et 11 jours avec le DGV-VIH-1 en pool (10), 51 jours (36-72) pour les anticorps anti-HTLV (8), 56 jours (25-109) pour l'Ag HBs (5, 9), 66 jours (38-94) pour les anticorps anti-VHC (1, 4, 11) et 10 jours avec le DGV-VHC (10).

Pour le VHB, le calcul est assujéti à un ajustement de manière à prendre en compte le caractère transitoire de l'Ag HBs sur lequel est fondée l'estimation du risque résiduel. Toutefois, deux éléments font penser que le risque résiduel lié au VHB est de cette manière incorrectement évalué :

(i) La durée de la fenêtre silencieuse utilisée pour l'estimation du RR du VHB, qui a été établie avec des tests de détection de l'Ag HBs dont le seuil de détection était supérieur aux réactifs utilisés actuellement (0,3 – 0,4 ng/ml contre moins de 0,1 ng/ml avec les réactifs actuels) (2, 7),

(ii) Les variations observées dans le calcul du risque résiduel alors que le nombre de cas incidents Ag HBs est stable, voire à la baisse.

Aussi, dans le contexte d'une réflexion sur l'intérêt de la mise en place du dépistage génomique viral (DGV) pour le VHB, il convenait d'évaluer au mieux ce risque. Nous nous sommes donc proposés de revoir son estimation de la façon suivante :

(i) Réajuster la durée de la fenêtre sérologique de l'Ag HBs pour l'établir avec les tests de dépistage les plus sensibles (ceux utilisés aujourd'hui en France) en tenant compte des données les plus récentes de la littérature.. Nous avons adopté une durée de fenêtre sérologique de 45 jours sur la base d'un consensus international d'experts.

(ii) Supprimer l'utilisation du facteur de correction pour le calcul du RR VHB en évaluant le taux d'incidence de l'Ag HBs et de l'anti-HBc.

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

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

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

où RR2 = FS anti-HBc x Ti anti-HBc en référence à l'antigénémie HBs fugace ou indétectable (25% des cas).

**La surveillance virologique du VHB** comprend :

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

2) La recherche de la **virémie** (débutée en 1998) par une méthode d'amplification par PCR d'un fragment de génome de la capsid virale (nucléotides 1955-2401), mise au point au laboratoire et dont la sensibilité analytique sur un échantillon de référence international (WHO) avait été estimée entre 500 et 1000 copies/ml. A partir de 2004, cette méthode a été remplacée par une PCR amplifiant une partie du gène S correspondant à la boucle antigénique de l'Ag HBs (nucléotides 256-723) et dont la

sensibilité analytique a été évaluée à 500 copies /ml (référence internationale WHO) . La détermination de la charge virale est réalisée depuis 2005 avec le réactif Cobas Taq Man, Roche (seuil à 6UI/ml).

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

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

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

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

**La surveillance virologique du VHC** comprend :

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

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

## **2) Résultats**

Les données qui sont présentées concernent les résultats obtenus depuis le début de la mise en place de la surveillance virologique jusqu'à la fin de l'année 2005. L'année 2006 n'a pas pu être prise en compte pour tous les paramètres recueillis, car l'ensemble des données n'était pas disponible au moment de la rédaction de ce rapport.

### **2.1 Le VHB**

#### **Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHB**

Le tableau ci-dessous donne la comparaison des taux de positivité pour l'Ag HBs observés entre 1993 et 2006 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

**Tableau 1 : Comparaison des taux de l'Ag HBs observés dans les dons de sang de 1993 à 2006**

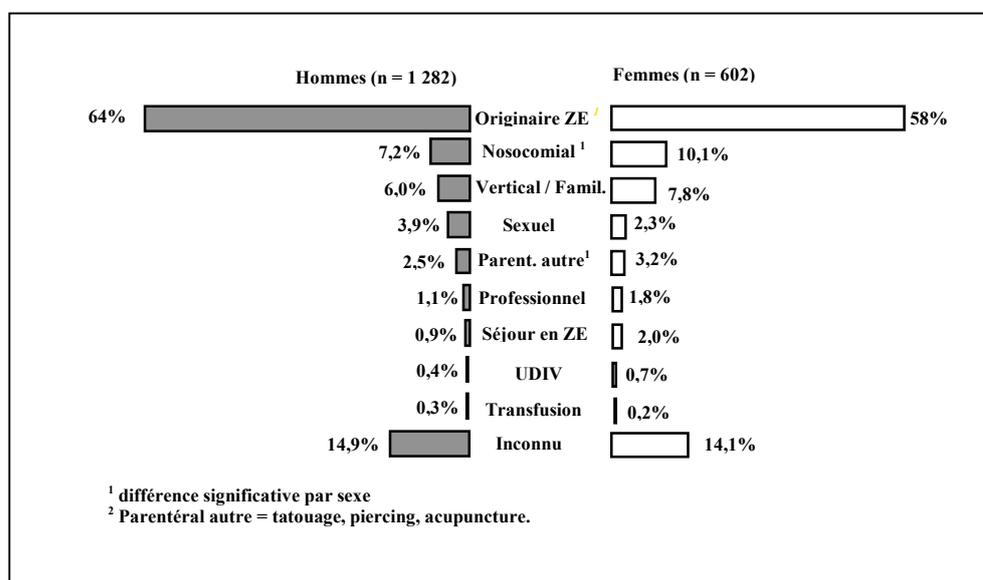
Année	Nouveaux donneurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux p. 10000 dons
1993	1168	23,8	96	0,33	1264	3,72
1994	935	20,1	56	0,21	991	3,17
1995	885	18,6	28	0,12	913	3,14
1996	717	16,2	20	0,09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

Une baisse régulière des taux est observée aussi bien chez les nouveaux donneurs que chez les donneurs connus. La diminution plus importante observée jusqu'en 1998 peut être attribuée à une pratique de plus en plus fréquente de la vaccination. Depuis 1998, le taux d'incidence chez les donneurs connus semble s'être stabilisé. Les départements d'Outre-Mer ont une prévalence environ 10 fois supérieure à celle observée dans les autres départements.

Comme le montre la figure 1, qui fait état des facteurs de risque (hiérarchisés en fonction de leur probabilité de survenue) retrouvés chez 1884 (60%) des 3146 nouveaux donneurs positifs pour l'Ag HBs, prélevés en France métropolitaine entre 1998 et 2005, et qui ont pu être interrogés, le facteur de risque principal est l'origine géographique, suivi du risque nosocomial.

En revanche, chez les donneurs connus pour la période 1998-2005, le risque sexuel se retrouve au premier plan. Il convient de souligner, que chez 14,6% des nouveaux donneurs et dans 33% des cas chez les donneurs connus, le facteur de risque n'a pas été identifié.

**Figure 1 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs Ag HBs positifs en France métropolitaine entre 1998 et 2005 (n=1884)**



### Surveillance virologique de l'infection par le VHB

Le tableau suivant fait état de l'évolution des **titres de l'Ag HBs** dans les dons positifs pour ce marqueur entre 1996 et 2005 :

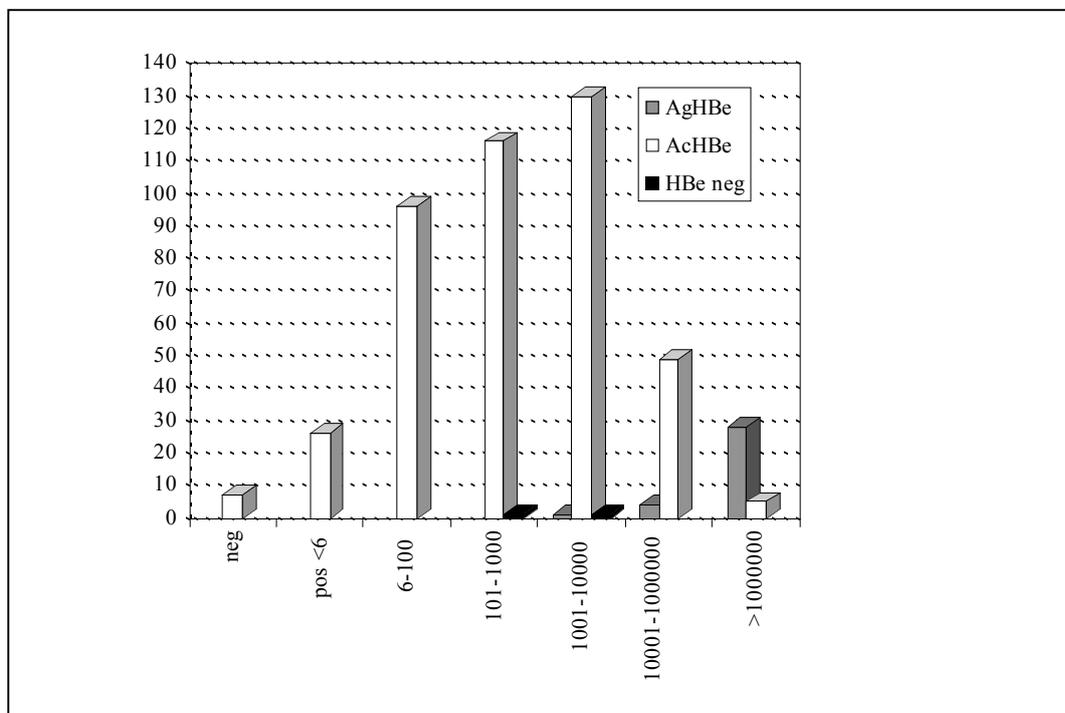
**Tableau 2 : Evolution des titres de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1998 et 2004**

Ag HBs (ng/ml)	1996-1997		1998		1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
< 0,25	3	0,6	2	0,6	0	0,0	1	0,3	0	0,0	4	1,2	0	0	2	0,5	3	1	15	0,4
0,25-50	21	41,4	16	4,8	27	8,7	19	5,9	19	5,6	11	3,3	17	5,0	33	9,0	19	6,3	182	5,7
50 - 3 990	100	20,8	101	30,3	71	23,0	89	27,5	83	24,6	69	20,4	70	20,7	64	17,6	52	17,2	699	22,8
4 10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	270	56,3	179	53,8	177	57,3	164	50,6	185	54,7	198	58,6	186	55,0	187	51,2	173	57,1	1720	54,2
1,5 10 <sup>5</sup> - 7,5 10 <sup>5</sup>	76	15,8	30	9,0	30	9,7	44	13,6	44	13,0	53	15,7	80	23,7	70	19,2	54	17,8	480	14,9
> 7,5 10 <sup>5</sup>	10	2,1	5	1,5	4	1,3	8	2,5	7	2,1	3	0,9	10	3,0	9	2,5	2	0,7	58	2,0
Total	480	100	333	100	309	100	325	100	338	100	338	100	363	100	365	100	303	100	3154	100
Nb de testés / Total dons Ag HBs+	33%		58%		60%		74%		76%		77%		79%		86%		86,3%		50,7%	

Ces résultats montrent que plus de 99% des dons analysés avaient un taux d'Ag HBs supérieur à 0,25 ng/ml, taux environ 20 fois supérieur aux capacités de détection des tests de dépistage de l'Ag HBs utilisés à ce jour.

Il apparaît que 88,1% (2778/3154) des dons Ag HBs positifs sont **Ac HBe** positifs. Par l'utilisation d'une technique de PCR dont le seuil de détection correspondait à 500 copies/ml (dons étudiés jusqu'en 2004), 66% des dons Ac HBe positifs présentaient une virémie. Le changement de technique en 2005 basée sur une méthode de PCR en temps réel de sensibilité supérieure (seuil à 6UI/ml correspondant à environ 35 copies/ml), a permis de mettre en évidence le fait que la très large majorité des dons Ag HBs positifs étaient virémiques (100% des dons Ag HBe positifs et 98,3% des dons Ac HBe positifs) comme le montre la figure 2. Par ailleurs, les dons Ag HBe positifs présentent des charges virales plus élevées. Ces observations sont concordantes avec une étude que nous avons menée récemment sur un réactif destiné au dépistage de l'ADN du VHB dans le cadre de la qualification des dons (Bouchardeau F, et al. *Transfusion*. 2006 ;46:2047-2052) et qui montrait, qu'à l'instar des échantillons prélevés dans la phase précoce et Ag HBs négatifs, le DGV-VHB pratiqué en unitaire était plus performant dans la détection de l'ADN du VHB chez les porteurs chroniques de l'Ag HBs (sensibilité de 98%) que le DGV pratiqué en pool (sensibilité de 84%). D'où la nécessité absolue de bénéficier de tests moléculaires très sensibles dans le cadre d'une stratégie envisageant l'abandon du dépistage de l'Ag HBs à leur profit, et ce de manière encore plus marquée dans les pays où le dépistage des anti-HBc n'est pas pratiqué.

**Figure 2 : Relation entre la charge virale et le statut HBe sur 441 dons Ag HBs positifs collectés en 2005 et 2006 (33 AgHBe pos, 406 Ac HBe pos, 2 HBe neg)**



Sur les 3635 donneurs trouvés Ag HBs positifs entre 1998 et 2005, 2514 (69,2%) ont bénéficié d'un **sous-typage de l'Ag HBs** et 86,5% d'entre eux (n = 2176) ont pu être entièrement typés.

Le tableau 3 et la figure 3 montrent l'évolution de la répartition des différents sous-types de l'Ag HBs de 1998 à 2005.

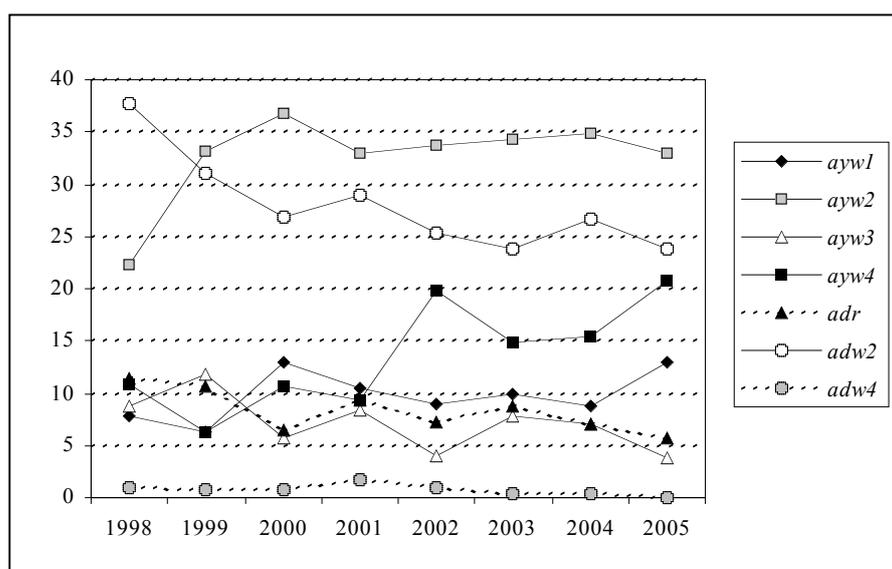
Sur l'ensemble de la période 1998-2005, le sous-type *ayw2* (correspondant au génotype D, fortement prévalent dans le bassin-méditerranéen) était le plus fréquent (33,1%), suivi du sous-type *adw2* (génotype A ou B, majoritaire en Europe occidentale) (27,6 %). Les sous-types *ayw1* (génotype A (Afrique) ou B (Asie)), *ayw4* (génotype E originaire d'Afrique sub-saharienne) et *adr* (génotype C, asiatique) étaient en proportions équivalentes, autour de 10 %, avec cependant une augmentation significative du sous-type *ayw4* à partir de 2002.

L'analyse de tendance a montré une diminution du sous-type *adw2* entre 1998 et 2002 ( $p=0,006$ ) passant de 37,8 % en 1998 à 25,4 % en 2002 et une augmentation du sous-type *ayw2* entre 1998 et 2000 ( $p < 10^{-4}$ ). Les pourcentages pour ces deux sous-types se sont stabilisés les années suivantes.

**Tableau 3 : Répartition des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1998 et 2005 en France métropolitaine**

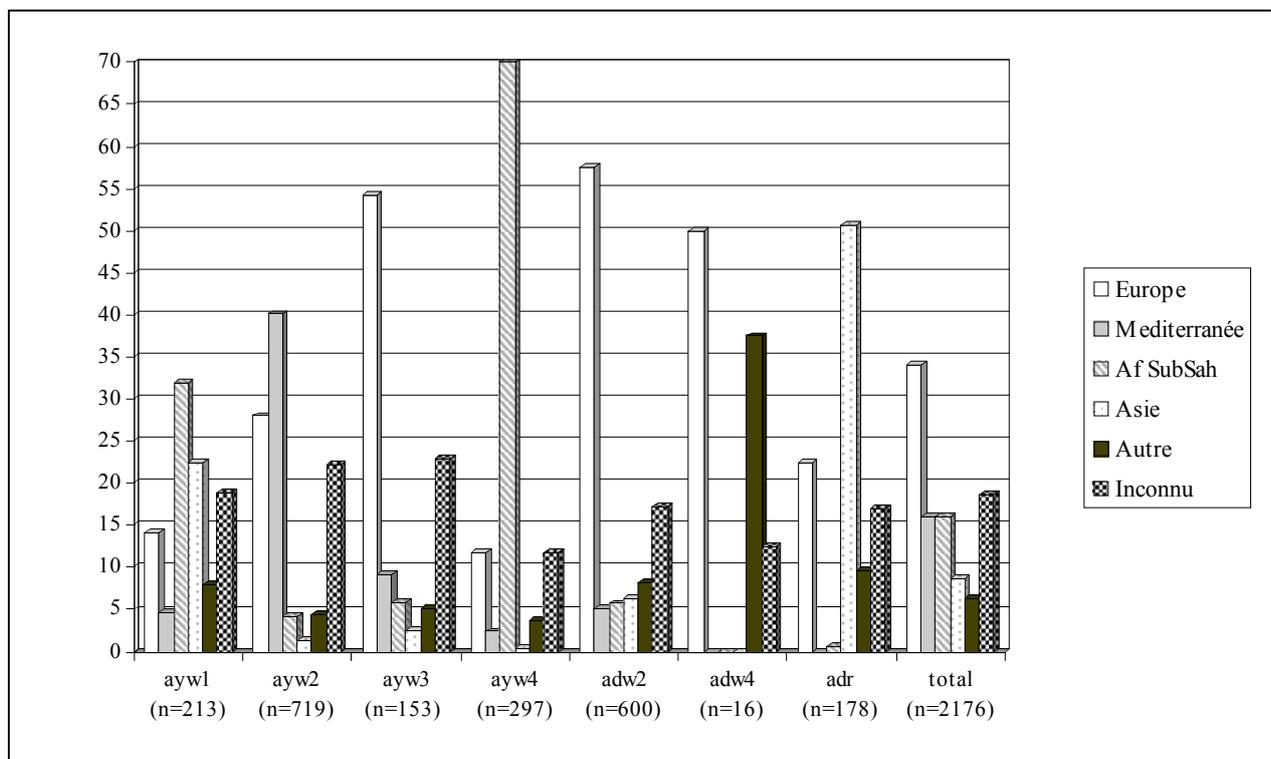
Sous- types	1998		1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>ayw1</i>	15	7,8	16	6,3	34	12,9	29	10,5	27	8,9	31	10,0	27	8,6	34	12,9	213	9,3
<i>ayw2</i>	43	22,3	84	33,1	97	36,7	91	32,9	102	33,7	106	34,3	109	34,9	87	33	719	33,1
<i>ayw3</i>	17	8,8	30	11,8	15	5,7	23	8,3	12	4,0	24	7,8	22	7,1	10	3,8	153	7,4
<i>ayw4</i>	21	10,9	16	6,3	28	10,6	23	8,3	60	19,8	46	14,9	48	15,4	55	20,8	297	12,7
<i>adr</i>	22	11,4	27	10,6	17	6,4	26	9,4	22	7,3	27	8,7	22	7,1	15	5,7	178	8,5
<i>adw2</i>	73	37,8	79	31,1	71	26,9	80	28,9	77	25,4	74	23,9	83	26,6	63	23,8	600	28,1
<i>adw4</i>	2	1,0	2	0,8	2	0,8	5	1,8	3	1,0	1	0,3	1	0,3	0	0	16	0,9
	<b>193</b>	<b>100,0</b>	<b>254</b>	<b>100,0</b>	<b>264</b>	<b>100,0</b>	<b>277</b>	<b>100,0</b>	<b>303</b>	<b>100,0</b>	<b>309</b>	<b>100,0</b>	<b>312</b>	<b>100,0</b>	<b>264</b>	<b>100,0</b>	<b>2176</b>	<b>100</b>
N analysés	207		300		314		327		334		362		365		305		2514	
N non typables	14 (6,8%)		46 (15,3%)		50 (16,5%)		50 (15,3%)		31 (9,3%)		53 (14,6%)		53 (14,5%)		41 (13,4%)		338 (13,4%)	

**Figure 3 : Evolution de la part relative (en %) des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1998 et 2005 en France métropolitaine.**



La figure 4 montre la répartition des origines géographiques des donneurs Ag HBs positifs en fonction du sous-type et confirme la relation entre le sous-type ayw1 et l'Afrique Sub-Saharienne (31,9%), le sous-type ayw2 avec le bassin Méditerranéen (40,1%), les sous-types ayw3 et adw2 avec l'Europe (54,2% et 57,5%, respectivement), le sous-type ayw4 avec l'Afrique sub-saharienne (70%) et du sous-type adr avec l'Asie (50,6%).

**Figure 4 : Proportion (%) des différentes origines géographiques des donneurs Ag HBs positifs en fonction du sous-types**



**L'analyse moléculaire** a pu être réalisée sur 398 échantillons : 246 des 313 dons Ag HBs positifs de l'année 2005, et 152 des dons de 2006 (résultats préliminaires pour l'année 2006) (voir tableau 4). La répartition des souches est donnée dans le tableau 4 ainsi que leur correspondance avec les sous-types. On note une prévalence plus élevée de génotype D (40,7%), suivie des génotypes A (25,1%) et E (20,9%) puis des génotypes B (7,2%) et C (5,9%). Pour 8 (2,2%) souches des 362 ayant pu être à la fois génotypées et sérotypées la correspondance entre les 2

déterminations est atypique. Notons que 48 souches (10%) des souches n'ont pas pu être classées par le génotypage, en raison principalement de chromatogrammes de séquençage ne permettant pas de conclure de façon formelle sur la séquence obtenue (doubles populations par exemple), en revanche, un sérotype a pu être donné pour ces échantillons montrant ici la complémentarité des deux méthodes notamment pour les charges virales faibles qui ne peuvent très souvent bénéficier d'une analyse de séquence. Toutefois, ces 2 méthodes ne sont pas en mesure d'identifier les infections multiples puisque seule la souche majoritairement présente sera mise en évidence.

**Tableau 4 : Répartition des génotypes du VHB chez les donneurs de sang en 2005 et 2006 (résultats partiels) en France métropolitaine et relation avec le sous-type**

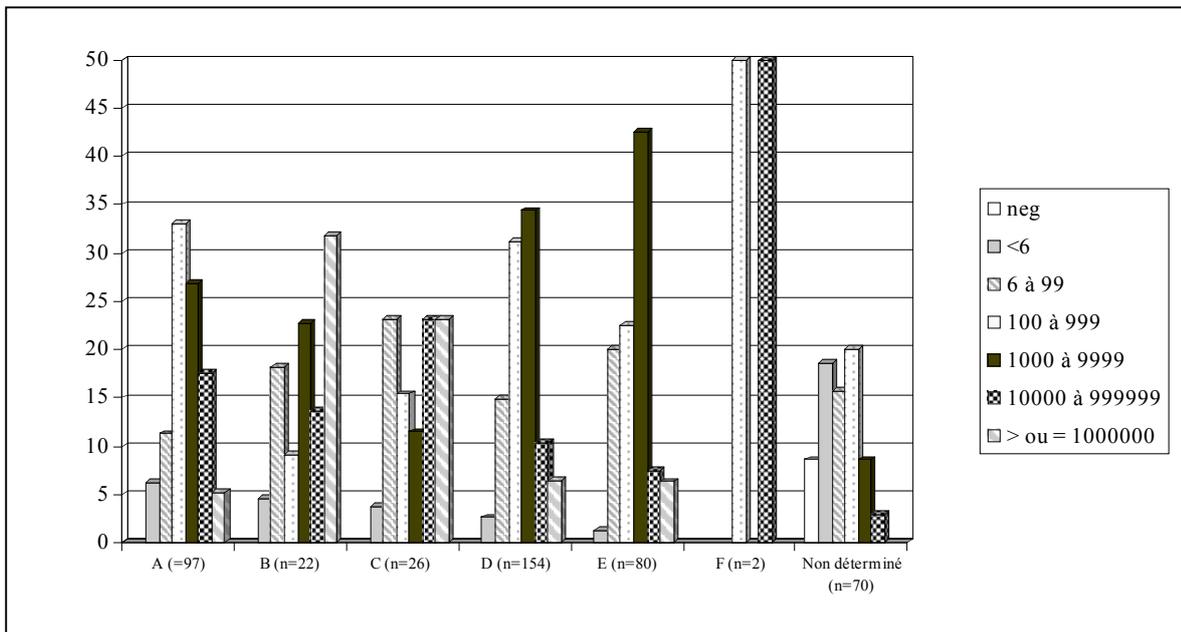
Génotypes	Sérotypes									Total	% sur 398 génotypés	
	<i>ay</i>	<i>ayw1</i>	<i>ayw2</i>	<i>ayw3</i>	<i>ayw4</i>	<i>adr</i>	<i>adw2</i>	<i>adw4</i>	Non typable			Non testé
A		18	1				74		5	2	100	(25,1%)
B	1	13					7		3		24	(6,0%)
C						24			2	1	27	(6,8%)
D	10		117	12	2				19	2	162	(40,7%)
E	1		5		74		1		1	1	83	(20,9%)
F								2			2	(0,5%)
Non génotypables	1	10	9	2	12	5	14		15	7	75	
Total	13	41	132	14	88	29	96	2	45	13	473	

Par ailleurs, des mutations de l'enveloppe virale décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination ou aux immunoglobulines étaient retrouvées pour 15 échantillons (3.7%). Toutefois il convient de noter que les variants retrouvés dans cette population ont été détectés par les trousseuses utilisées dans le dépistage de l'Ag HBs sur les dons de sang. Par contre, il n'est pas exclu que leur détection soit altérée avec d'autres trousseuses ; cette possibilité est actuellement à l'étude.

La figure 5 fait état de la relation entre charge virale et génotype sur 381 souches. Cette représentation montre que les charges virales se situent majoritairement entre 100 et 10<sup>4</sup> UI/ml pour les génotypes les plus fréquemment rencontrés, A, D et E (59.8%, 65.6% et 65% respectivement), avec toutefois une tendance à des charges

virales plus élevées chez les donneurs contaminés par le génotype E (plus volontiers  $>10^4$ UI/ml). En revanche, pour les génotypes B et C, les charges virales ont tendance à être plus élevées. Il convient toutefois de ne pas produire de conclusions hâtives dans la mesure où les effectives pour ces deux génotypes sont faibles.

**Figure 5 : Proportions (%) des charges virales en fonction du génotype du VHB chez les donneurs de sang en 2005 et 2006 (résultats partiels) en France métropolitaine**



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

**Tableau 5 : Prévalence des anticorps anti-Delta chez les donneurs de sang Ag HBs positifs**

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	Total
n testés	246	326	282	305	318	336	359	350	294	2816
<b>Positifs</b>	3	3	4	1	4	4	4	4	3	30
%	1,22	0,92	1,42	0,33	1,26	1,19	1,11	1,14	1,04	1,06

Parmi les donneurs Ag HBs positifs 1,06 % présentent une co-infection par le virus Delta. Cette observation semble en-dessous des taux de prévalences avancés pour la France (entre 10 et 20%).

## 2.2 Le VHC

### Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHC

Le tableau 6 donne la comparaison des taux de positivité pour le VHC observés entre 1993 et 2006 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

**Tableau 6 : Comparaison des taux VHC observés dans les dons de sang de 1993 à 2006**

Année	Nouveaux donneurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons
1993	1605	32,7	902	3,1	2507	7,4
1994	1281	28,2	266	1,03	1547	5,08
1995	1106	23,3	178	0,73	1284	4,42
1996	914	20,7	118	0,51	1032	3,74
1997	720	14,9	71	0,32	791	2,93
1998	601	13,4	51	0,24	652	2,52
1999	428	10,5	36	0,17	464	1,84
2000	337	8,1	39	0,19	376	1,52
2001	322	8,0	43 <sup>(2)</sup>	0,21	365	1,51
2002	262	7,2	27 <sup>(2)</sup>	0,13	289	1,17
2003	290 <sup>(1)</sup>	7,60	16	0,08	306	1,24
2004	225	5,97	28 <sup>(2)</sup>	0,13	253	1,01
2005	210	5,61	14 <sup>(2)</sup>	0,07	224	0,89
2006	188 <sup>(1)</sup>	4,95	17	0,08	205	0,80

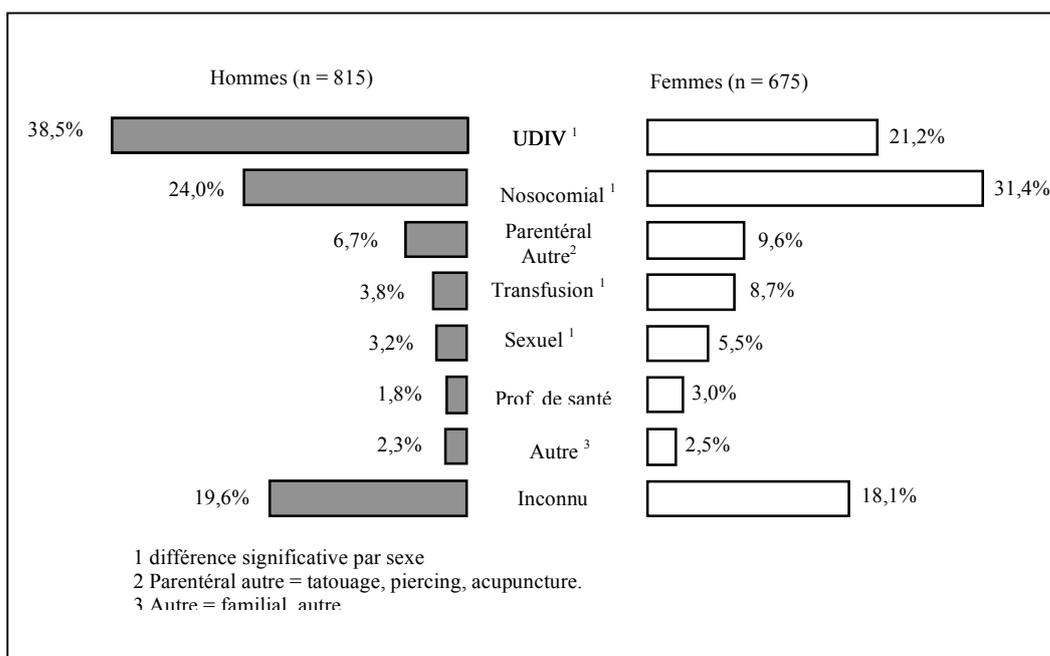
<sup>(1)</sup> dont 2 Ac nég DGV pos

<sup>(2)</sup> dont 1 Ac nég DGV pos

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

Les facteurs de risque renseignés pour 56% (1490) des 2675 nouveaux donneurs VHC positifs entre 1998 et 2005 (figure 6) , montrent que près de 20% n'ont aucun facteur de risque identifié, et que la toxicomanie (30,7%) et les expositions nosocomiales (27,3%) restent au premier plan des modes de contaminations potentiels retrouvés chez ces sujets. Par contre (résultats non montrés), chez les 158 donneurs connus ayant présenté une séroconversion documentée et interrogés sur leur facteur de risque (soit 72% des 219 de cette catégorie entre 1994 et 2005), l'exposition nosocomiale est le facteur de risque identifié le plus fréquemment (18% des donneurs interrogés) puis la toxicomanie par voie IV (16%). La part des donneurs connus sans facteur de risque identifié s'élève à 30%.

**Figure 6 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHC+ interrogés sur FdR 1998-2005 (n = 1 490)**



### Surveillance virologique de l'infection par le VHC

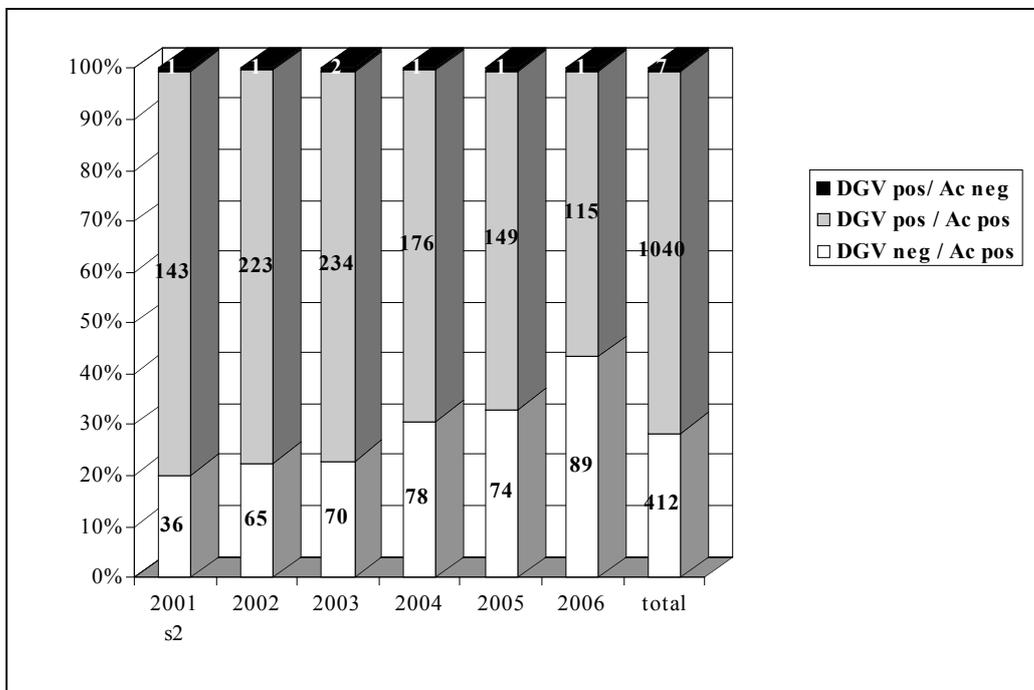
Sur la période 2000-2005, le laboratoire a reçu 1356 échantillons de donneurs VHC positifs, ce qui représente 75% des 1813 donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 6 ans.

Les résultats concernant la recherche de l'ARN du VHC fournis pour l'année 2000 et le 1<sup>er</sup> trimestre 2001 sont issus des analyses pratiquées dans notre laboratoire, sur 64 % (358/561) des donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 18 mois et ceux fournis à partir du second semestre 2001 sont ceux du DGV et sont donc exhaustifs. Comme le montre le tableau 7, la proportion de dons VHC positifs virémiques est en moyenne de 71.8 % avec toutefois une tendance à la baisse (figure 7) de cette catégorie.

**Tableau 7 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2000 et 2005 en fonction des résultats de la virémie .**

	2000		2001 (1 <sup>er</sup> semestre)		2001 (2 <sup>nd</sup> semestre)		2002		2003		2004		2005		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ac	205	81	89	85	143	79,4	223	77,2	234	76,5	176	69,0	149	66,5	1219	75,6
+ /ARN+																
Ac+ /ARN -	48	19	16	15	36	20,0	65	22,5	70	22,9	78	30,6	74	33	387	24
Ac - /ARN +	0		0		1	0,6	1	0,3	2	0,6	1	0,4	11	0,5	6	0,4
<b>TOTAL</b>	<b>253</b>		<b>105</b>		<b>180</b>		<b>289</b>		<b>306</b>		<b>255</b>		<b>224</b>		<b>1612</b>	

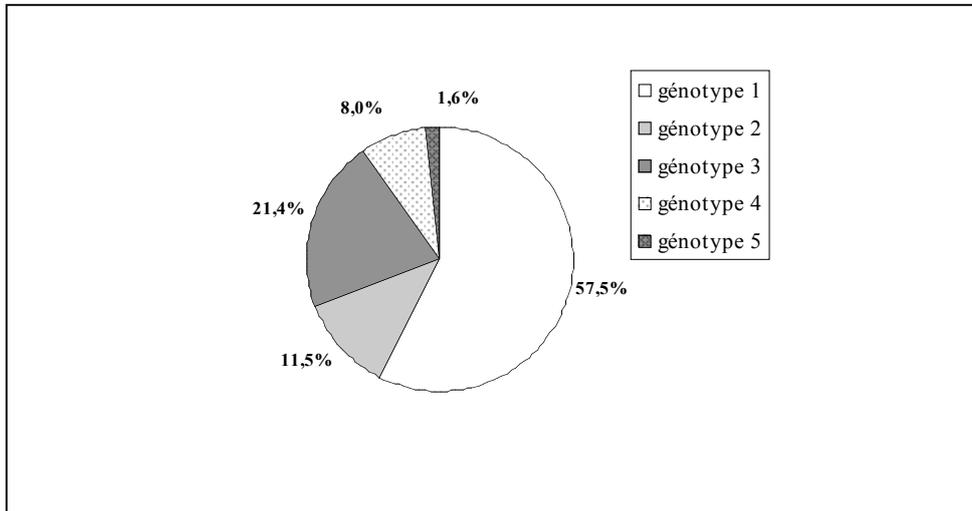
**Figure 7 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2001 (semestre 2) et 2006 en fonction des résultats de la virémie .**



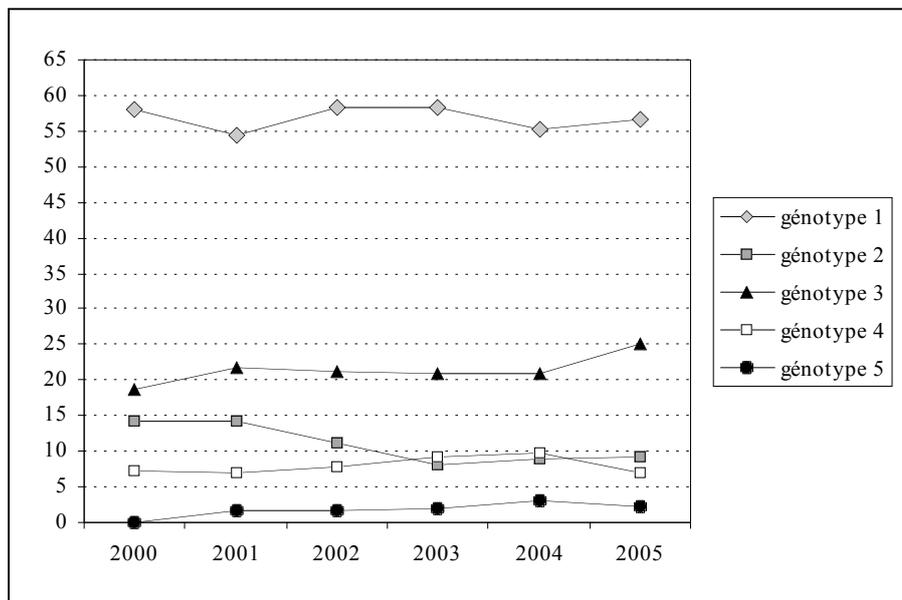
Sur les 1 813 donneurs trouvés VHC positifs entre 2000 et 2005, 61,4 % (n = 1 114) ont bénéficié d'une **détermination du génotype**. La figure 8 montre la répartition des génotypes sur l'ensemble de la période, et la figure 9 l'évolution des génotypes dans le temps.

Sur la période 2000-2005, le génotype le plus fréquent a été le génotype 1 (57,5 %), suivi par le génotype 3 (21,4 %), le génotype 2 (11,5 %) et le génotype 4 (8,0 %). Cette répartition est relativement stable au cours des 6 années d'étude (pas de différence significative). Toutefois, une tendance à l'augmentation des génotypes 4 jusqu'en 2005 (non confirmée en 2006), avec une baisse des génotypes 2 a été observée.

**Figure 8 : Répartition des génotypes du VHC chez 1114 donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2005.**



**Figure 9 : Evolution de la répartition (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2004.**



**L'analyse moléculaire** de 654 souches (390 génotypes 1, 88 génotypes 2, 105 génotypes 3, 60 génotypes 4, 11 génotypes 5) collectées durant cette même période rend compte d'une grande variabilité des sous-types, comme le montre le tableau 8.

Parmi les 390 donneurs infectés par le génotype 1, 54,3% sont de sous-type 1b et 45,4% de sous-type 1a. L'analyse des 88 souches de génotype 2 montre un très grande variabilité de ce génotype avec toutefois plus d'un quart des souches appartenant au sous type 2a. Les génotypes 3 et 5 sont très homogènes : 100% des souches sont de sous type 3a et 5a respectivement. Enfin, le génotype 4 est aussi très variable en dehors du sous type 4a, qui représente 41,7% des souches de ce génotype.

**Tableau 8 : Répartition des génotypes et des sous-types du VHC sur 654 souches étudiées par analyse moléculaire.**

	1 *	1a	1b	2 *	2a	2b	2c	2i	2k	2l	3a	4 *	4a	4d	4f	4h	5a
n	1	177	212	13	25	11	14	13	8	4	105	6	25	25	2	2	11
% du sous type dans le génotype	0,3	45,4	54,3	14,8	28,4	12,5	15,9	14,8	9,1	4,5	100	10	41,7	41,7	3,3	3,3	100

\* sous type non déterminé

La relation entre les génotypes et les facteurs de risque retrouvés chez les donneurs VHC positifs entre 2000 et 2005 est exposée dans le tableau 9. Les facteurs de risque ont été hiérarchisés en fonction de la probabilité d'occurrence la plus élevée. Cette hiérarchisation, adoptée au sein du comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang » chez les sujets présentant plus d'un facteur de risque, est par ordre de fréquence décroissante : usage de drogue par voie intraveineuse, antécédents de transfusion avant 1991, exposition nosocomiale, expositions parentérales autres (tatouage, piercing, acupuncture), sexuel, autre (familial, professionnel).

Cette analyse montre que génotypes et facteurs de risque sont significativement liés ( $p < 10^{-4}$ ). Chez les donneurs ayant un génotype 1a ou 3a, une proportion plus

élevée (48 % et 45,5 % respectivement) ont été contaminés par toxicomanie intraveineuse comparativement aux autres génotypes. Chez les donneurs avec un génotype 1b ou 2, une proportion plus élevée (46,6 % et 46,2 % respectivement) ont été contaminés par voie nosocomiale, comparativement aux autres génotypes.

**Tableau 9: Répartition des facteurs de risque du VHC (hiérarchisés) chez les donneurs de sang en fonction du génotype sur la période 2000-2005.**

	1a		1b		1		2		3a		4		5		total	
Nbre de donneurs VHC génotypés	304		310		27		128		238		89		18		1114	
Donneurs non revus en consultation	108	35,5%	124	40,0%	12	44,4%	35	27,3%	95	39,9%	44	49,4%	9	50%	427	38,3%
Donneurs interrogés sur le facteur de risque	196	64,5%	186	60,0%	15	55,6%	93	72,7%	143	60,1%	45	50,6%	9	50%	687	61,7%
<b>Facteur de risque</b>																
UDIV	94	<b>48,0%</b>	21	11,3%	3	20,0%	15	16,1%	65	<b>45,5%</b>	19	42,2%	0	0	217	<b>31,6%</b>
Antécédents de transfusion	4	2,0%	18	9,7%	1	6,7%	14	15,1%	6	4,2%	1	2,2%	2	22,8%	46	6,7%
Nosocomial	49	25,0%	83	<b>44,6%</b>	3	20,0%	43	<b>46,2%</b>	26	18,2%	13	28,95%	7	77,8%	224	32,6%
Expositions parentérales autres *	15	7,7%	23	12,4%	1	6,7%	4	4,3%	16	11,2%	7	15,6%	0	0	66	9,6%
Sexuel	14	7,1%	7	3,8%	1	6,7%	5	5,4%	15	10,5%	2	4,4%	0	0	44	6,4%
Autre (familial, professionnel,...)	2	1,0%	5	2,7%	0	0	1	0,1%	6	4,2%	1	2,2%	0	0	14	2%
Risque non retrouvé	18	9,2%	29	15,6%	6	40,0%	12	12,9%	9	6,3%	2	4,4%	0	0	76	11,1%
<b>Total</b>	196	100%	186	100%	15	100%	93	100%	143	100%	45	100%	9	100%	687	100%

\* tatouage, piercing, acupunture..

### 2.3 Bilan du DGV et risque résiduel

Depuis la mise en place du DGV du VHC le 1<sup>er</sup> juillet 2001, environ 14 millions de dons ont bénéficié de cette mesure. A la fin 2006, 6 dons provenant de donneurs sans anticorps spécifiques ont été identifiés ; parmi ceux-ci 1 avait un taux élevé de transaminases et donc aurait été écarté : le bilan net du DGV se porte donc à 5 dons pour les 5,5 premières années de pratique du DGV.

Le DGV VHB est pratiqué en unitaire dans les DOM depuis janvier 2005 : sur les 55758 dons en ayant bénéficié jusqu'au 30 juin 2006, aucun n'a été retrouvé Ag HBs négatif et DGV positif.

Le risque résiduel sur la période 2004-2006 est de 1 pour 8.5 millions de dons pour le VHC et 1 pour 1 million de dons pour le VHB.

La méthode révisée pour le VHB fournit une estimation similaire pour cette période, contrairement aux périodes précédentes (voir tableau 10). Cette méthode semble plus robuste que la méthode classique et montre une relative stabilité du risque VHB.

**Tableau 10 : Comparaison des résultats obtenus pour chaque période en fonction de la méthode d'estimation du risque résiduel du VHB employée.**

	2000-2002	2001-2003	2002-2004	2003-2005
Cas incidents Ag HBs	13	8	2	5
Cas incidents Ac HBc				
certains	10	12	13	10
certains + inclassables	16	15	20	20
RR « traditionnel »	1/400 000	1/640 000	1/2 400 000	1/ 1 400 000
RR avec FS de 45 jours	1/490 000	1/800 000	1/3 000 000	1/ 1 700 000
RR révisé				
Hypothèse favorable	1/900 000	1/920 00	1/1 100 000	1/1 700 000
Hypothèse défavorable	1/680 000	1/780 000	1/750 000	1/ 1 200 000

#### **4/ Activités d'information, de formation et de conseil :**

##### **Enseignement universitaire**

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

##### **Enseignement médical non universitaire**

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

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

- Rétro-information à InVS

##### **Comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang InVS**

## **5/ Liste des publications et communications**

### **Publications**

**Laperche S** , Saune K, Dény P, Duverlie G, Alain S, Chaix ML, Gaudy C, Lunel F, **Pawlotsky JM**, Payan C, Pozzetto B, Tamalet C, Thibault V, Vallet S, Bouchardeau F, Izopet J, Lefrère J. A unique NS5b Hepatitis C Virus (VHC) gene sequence consensus database is essential for the standardization of genotype determination in multicentre epidemiological studies. *J Clin.Microbiol* 2006; 44 : 614-616.

Cantaloube JF, **Laperche S**, Gallian P, **Bouchardeau F**, de Lamballerie X, de Micco P : Analysis of the 5' non-coding region versus the NS5b region in genotyping Hepatitis C Virus isolates from blood donors in France. *J Clin Microbiol.* 2006 ;44 :2051-2056.

Ly TD, **Servant-Delmas A**, Bagot S, Gonzalo S, Férey MP, Ebel A, Dussaix E, **Laperche S**, Roque-Afonso AM. Sensitivity of Four new Commercial Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Assays to detect HBsAg Mutant Forms. *J Clin Microbiol.* 2006 ;44:2321-2326.

**Laperche S**, Thibault V, **Bouchardeau F**, Alain S, Castelain S, Gassin M, Gueudin M, Halfon P, Larrat S, Lunel F, Martinot-Peignoux M, Mercier B, **Pawlotsky JM**, Pozzetto B, Roque-Afonso AM, Roudot-Thoraval F, Sauné K, Lefrère JJ. Expertise of laboratories in viral load quantification, genotyping and precore mutant determination of Hepatitis B virus (VHB) in a multicentre study; *J Clin Microbiol.* 2006 :44:3600-3607.

**Bouchardeau F**, **Girault A** , **Razer A**, **Servant-Delmas A**, **Mercier M**, **Laperche S**. Sensitivity of Hepatitis B Virus-DNA Transcription Mediated Amplification (TMA) Testing in Hepatitis B Surface Antigen positive blood donations. *Transfusion.* 2006 ;46:2047-2052.

Delarocque-Astagneau E, Pillonel J, de Valk H, Perra A, **Laperche S**, Desenclos JC. Modes of hepatitis C virus transmission: methodological approaches *Rev Epidemiol Sante Publique.* 2006;54: S5-S14

Pillonel J, **Laperche S**. Surveillance épidémiologique des donneurs de sang homologues et risque résiduel en France entre 2003 et 2005. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* 2006 51-52 :411-414.

**Bouchardeau F**, Cantaloube JF, **Chevaliez S**, Portal C, **Razer A**, Lefrère JJ, **Pawlotsky JM**, De Micco P, **Laperche S**. Improvement of HCV genotype determination with the new version of Inno-LiPa HCV assay. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1140-1145.

### **Communications orales.**

*8 èmes Journées Francophones de Virologie, Paris, 20-21 Avril 2006*

Charges sériques significatives d'ADN du virus de l'hépatite B parmi les sujets ayant un profil sérologique « anticorps anti-HBc isolés »

Masuel J, Launay O, **Servant A**, Basse-Guerineau AL, Méritet JF, **Laperche S**, Sogni P, Rosenberg AR.

### **Communications affichées**

*12 th International Symposium of Hepatitis Viral Liver Diseases Paris, France, 1-4 Juillet 2006*

**Modes of transmission of the hepatitis C virus in France between 1995 and 2001: an incident case-control study**

**Delarocque-Astagneau E, Perra A, Pillonel J, de Valk H., Laperche S, Desenclos JC.**

**Prevalence of Hepatitis B virus genotypes and surface antigen variants in French blood donors.**

**Servant A, Girault A, Mercier M, Jourdain C, Bouchardeau F, Laperche S.**

Evolution of hepatitis B virus diversity in French blood donors through a seven-year survey

**Laperche S, Girault A, Pillonel J, LeMarrec N, Mercier M, Bouchardeau F, Servant A**

**Sensitivity of Hepatitis B surface antigen (HBsAg) assays to detect HBsAg mutant forms.**

Laperche S, Ly T, Servant-Delmas A, **Bagot S, Gonzalo S, Férey M, Ebel A, Dussaix E, Roque-Afonso A.**

*XXIX th Congress of International Society of Blood Transfusion, Cap Town, South Africa 2-7 Septembre 2006*

Servant A, Bouchardeau F, Girault A, Mercier M, **Wind F, Elghouzzi MH**, Laperche S.

**Hepatitis B virus genotypes and surface antigen variants in French blood donors.**

### **Séminaires et conférences sur invitation**

*2 èmes Journées Maghrébines de Transfusion Sanguine, Casablanca, 3 et 4 avril 2006*

Sécurité transfusionnelle virale et dépistage biologique

**Laperche S.**

**6- Programme d'activité 2007**

1) La surveillance virologique va être poursuivie avec une extension aux donneurs prélevés dans les DOM de manière à élargir l'observatoire.

2) La recherche de l'ARN du virus et la répartition des génotypes Delta constituera un travail mené dans le cadre du CNR avec le laboratoire associé pour l'étude du Delta.

3) Pour évaluer la capacité des trousse de détection de l'Ag HBs à reconnaître les particules virales des différents génotypes du VHB, ainsi que des mutants de l'enveloppe virale, nous allons poursuivre la constitution d'un panel comprenant à ce jour 17 échantillons de protéines HBs recombinantes (9 échantillons de génotypes A à F et 8 échantillons porteurs d'une ou plusieurs mutations situées dans la boucle antigénique et connues pour être à l'origine de faux négatifs lors du dépistage de l'Ag HBs). Les séquences HBs sont clonées dans un vecteur d'expression eucaryote et exprimées in vitro après transfection de cellules hépatiques Huh7. Les protéines sécrétées en quantité suffisante dans le surnageant de culture sont retenues pour la constitution du panel, qui a été calibré grâce à la présence de l'étiquette HA placée en C terminale des protéines recombinantes. Les premiers résultats montrent un défaut de reconnaissance du mutant G145R par une des trousse étudiées. L'étude doit être étendue à d'autres trousse commerciales, et le panel complété par d'autres protéines d'intérêt. Cette approche constitue une appréciation prospective des limites potentielles des tests actuellement utilisés en transfusion pour le dépistage de l'Ag HBs et pourrait contribuer à guider un élargissement du spectre de sensibilité de ces tests.

4) Pour environ 6% des échantillons VHB positifs qui ont été phylogénétiquement analysés, le séquençage direct est apparu difficilement interprétable suggérant l'existence d'infections mixtes. Nous avons en projet d'étudier le phénomène d'infections VHB mixtes dans la population des donneurs de sang et en menant une étude rétrospective visant à identifier les infections mixtes suspectées lors du séquençage direct des échantillons de l'année 2005 complétée d'une étude prospective réalisée chez des donneurs de sang prélevés en 2006. Le support technique de cette étude sera le clonage systématique des souches suspectes. Dans le cadre des collaborations entre unités du CNR, l'étude d'une population de patients consultant en service spécialisé pourra compléter celle-ci de manière à identifier des spécificités propres à chacun des deux groupes de sujets testés.

5) Les hépatites B occultes sont définies par la présence d'ADN du VHB dans le sang ou le foie en l'absence d'AgHB. Les 2 phénomènes susceptibles d'être à l'origine de ces particularités biologiques sont (i) l'existence d'une répllication à bas bruit, (ii) l'existence de mutations dans l'épitope immunodominant (AA100-160) de l'enveloppe virale générant un résultat faussement positif lors de la recherche du l'Ag HBs avec certains réactifs.

La prévalence de ces infections B occultes est variable et dépend du taux de prévalence de l'infection VHB dans la population étudiée et d'autre part de la sensibilité de la technique de biologie moléculaire utilisée pour détecter l'ADN viral.

Dans la population des donneurs de sang le taux de positivité de l'ADN parmi les dons anti-HBc positifs, Ag HBs négatifs varie en fonction des études entre 0 et 15%. Par ailleurs, des études effectuées chez les donneurs d'organes et de tissus en France montrent des prévalences allant de 0 à 4.8% (donneurs de cornées) dans la populations des sujets porteurs d'anti-HBc et d'anti-HBs et de 0 à 9.5% (donneurs de cornées) pour les sujets avec un anti-HBc « isolé ».

En France, aucune étude n'est à ce jour disponible dans la population des donneurs de sang. Or, à l'heure où la mise en place du dépistage génomique du VHB est très largement évoquée, la redéfinition de la place de chacun des marqueurs faisant partie du panel des tests de dépistage obligatoires paraît légitime. Nous allons

évaluer de manière prospective la prévalence des hépatites B occultes dans la population de donneur de sang en Ile de France.

6) Parmi les virus majeurs, le VHB est celui pour lequel le risque transfusionnel reste le plus élevé. Ce constat a conduit à introduire le dépistage de son ADN sur les dons de sang dans certains pays de moyenne et de forte endémie. Toutefois, l'existence d'un vaccin spécifique dont le rôle dans le contrôle de l'infection est prouvé, permettrait d'envisager la sécurité transfusionnelle vis-à-vis du VHB sous un autre angle. La couverture vaccinale chez les donneurs de sang français n'est pas connue. Elevée, elle réduirait le risque résiduel lié au virus et permettrait d'argumenter le bien-fondé de la mise en place du DGV VHB à la lumière d'une donnée nouvelle et rarement étudiée. Nous souhaitons donc, estimer la couverture vaccinale contre le VHB chez les donneurs de sang sur la base d'une étude réalisée sur un échantillon de 5000 donneurs qui serait le plus représentatif de l'ensemble des donneurs de sang par la mise en œuvre d'un dépistage des anti-HBs, dépistage aujourd'hui non obligatoire.

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

Fait à Paris le 9 mai 2007

Syria LAPERCHE

\*\*\*\*\*

## **IV**

# **LABORATOIRE ASSOCIE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT**

**Hôpital Paul Brousse  
Villejuif**

# Contribution à la surveillance épidémiologique

## Résumé

### 1.1 Surveillance de l'évolution des isolats VHC en France

Sur le plan national, en étroite collaboration avec l'Institut de Veille Sanitaire, une enquête de veille épidémiologique menée sur des assurés sociaux (âgée de 18 à 80 ans) de 2003 à 2004 a montré que la prévalence observée du VHC était stable (0.9%) par comparaison aux chiffres de 1994. Nous avons montré qu'environ **60%** des assurés sociaux dépistés anti-VHC positifs ont une multiplication virale active, qui est supérieure à  **$>10^5$  UI/ml** pour plus de **86%** de ces sujets. L'analyse de la diversité des souches VHC montre que le génotype 1 reste le plus fréquent observé (54 %). Les génotypes génotypes 2 (17,5%) et 4 (16,6%) se situent en seconde position par ordre de fréquence. Une situation opposée est observée chez les donneurs de sang où le génotype 3a (20%) représente le second par ordre de fréquence et les génotypes 2 et 4 seulement 10%. L'analyse phylogénétique, réalisée sur la région NS5b, indique la circulation d'une grande diversité d'isolats du VHC en France (1d, 1<sup>e</sup>, 1h, 1l, 1i, 2j, 2k, 2l, 4f, 4k).

Comme le démontre cette enquête nous assistons en France à diffusion de génotypes plus hétérogènes. C'est pourquoi, nous avons poursuivi la mise en place de collaborations nationales et internationales afin de faire remonter sur le CNR des souches virales plus atypiques. Grâce à une d'une collaboration avec l'université du Caire dans le cadre d'un projet soutenu par l'ANRS (coordinateur A. Fontanet) nous avons réalisé une étude visant à étudier les facteurs résiduels de transmission du VHC dans une population rurale en Egypte. Les données moléculaires obtenues (1) indiquent la grande hétérogénéité du type 4 avec la mise en évidence d'un nouveau sous type nommé **4u** en cours de caractérisation. (2) indiquent par la combinaison de l'analyse phylogénétique et du test de Mantel que la maison ( $p < 0.0001$ ), les relations mère-enfants ( $p=0.002$ ) et les relations de fratrie ( $p=0.005$ ) étaient associées à la transmission intrafamiliale du VHC dans cette zone hyperendémique. Par ailleurs, une analyse des données épidémiologiques a été réalisée sur la totalité de la cohorte (4000 sujets) en collaboration avec l'unité de Laurent Abel (Inserm

U555). Cette analyse a confirmé nos résultats moléculaire en identifiant une forte corrélation entre la présence d'une infection VHC et les liens de parenté du 1 degré (mère/enfant, enfant/enfant) qui peut être expliquée par une combinaison particulière de modes de transmission dans la famille et une prédisposition génétique des sujets à l'infection.

## 1.2 Diversité des souches VHB et surveillance de l'émergence de mutants

L'enquête de prévalence nationale et régionale menée par l'INVS de 2003 à 2004 a aussi recherché des marqueurs sériques de l'infection par le virus de l'hépatites B (VHB) dans cet échantillon national d'assurés sociaux. Le niveau de prévalence observé pour le VHB, supérieur à ce qui était proposé jusqu'à maintenant, était compatible avec un nombre de porteurs de ce virus dans notre pays de l'ordre de 300 000 chez les personnes âgées de 20 à 80 ans. Nous avons montré que 92% (99/107) des assurés sociaux dépistés AgHBs positifs étaient porteurs d'une multiplication virale active (ADN+), et parmi ceux-ci **93%** (92/99) avaient une charge virale basse, **inférieure à  $10^4$  UI/ml**. La diversité des souches de VHB dans cet échantillon est cours d'analyse. Nous participons aussi au projet de surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France, qui vient de recevoir le soutien de l'ANRS (porteur de projet V. Thibault ; membres du projet D. Antona, E. Delarocque, S. Laperche, V. Thiers). L'objectif de ce projet, qui vient de débuter en février, est de recueillir des données moléculaires sur les souches de VHB responsables d'hépatites B aiguës en France.

Ces dernières années, avec l'avènement des techniques moléculaires, de nombreux mutants naturels du VHB ont été décrits, parmi lesquels figurent des mutants du gène de l'enveloppe, de la capsid virale, et du gène X. Les données récentes suggèrent que ces mutants possèdent une répartition mondiale et que leur incidence est en augmentation en France. Nous, nous proposons d'estimer la fréquence des mutants du gène de la capsid virale (mutants PréC) dans la population des assurés sociaux et dans le groupe des hépatites aiguës B. Une technique d'amplification en temps réel est en cours de développement de basée sur une « PCR allèle spécifique ».

## I Infrastructure utilisée

### Localisation et Historique

Le laboratoire associé au Centre national de Référence sur les Hépatites Virales B, C et Delta est dirigé par Valérie Thiers. Il est hébergé dans les locaux de l'unité INSERM U 785 dirigée par le Pr. Didier Samuel - *Pathogenèse et traitement des hépatites fulminantes et du cancer du foie* -, localisée sur le campus du CHU Paul Brousse. Son interaction étroite avec les chercheurs de l'unité Inserm U785 et les cliniciens du centre hépato Biliaire, centre spécialisé dans le traitement des maladies du foie, le situe dans un contexte scientifique de haut niveau.

Le laboratoire associé et l'unité 785 sont situés au 2<sup>ème</sup> étage (aile Sud) du Centre Hépato Biliaire (CHB).

### Infrastructure

Le Laboratoire Associé est constitué de 3 modules (double module de bureau et module de laboratoire-post PCR). Il possède en propre tout l'équipement nécessaire à la réalisation de sa mission (machines PCR, congélateurs -20 C°, -80°, centrifugeuses, postes informatique, serveur de sauvegarde, petit matériel de laboratoire). Pour la réalisation de travaux plus spécialisés, il a libre accès à l'équipement lourd de l'unité Inserm U 785 (250 m<sup>2</sup>). En particulier, la spécificité des techniques utilisées conduit à utiliser des locaux spécialisés appartenant à l'unité 785. Ces locaux particuliers ou « modules PCR » répondent aux critères stricts d'un »L2«, (35m<sup>2</sup> situés au 1<sup>ème</sup> sous-sol du CHB pièce d'extraction, pièce de MIX), et permettent d'assurer en toute sécurité la manipulation de sérums et de tissus infectieux. Les modules PCR sont sous sa responsabilité.

### Personnel

L'institut Pasteur affecte pour la gestion du laboratoire associé un ingénieur de recherche pour 50% de son temps de travail ainsi qu'un technicien supérieur (100% de son temps de travail).

Le Laboratoire associé a réalisé ses activités de recherche grâce à du personnel temporaire, un technicien supérieur (CDD Inserm), un étudiant en thèse de science (Dr R. Sobesky) recrutés sous le couvert de l'unité U785.

## **II Activité d'Expertise**

### **2.1 - Capacités techniques du CNR**

#### **2.11 Techniques disponibles**

Le laboratoire associé possède une expertise reconnue dans le domaine du typage et de l'épidémiologie moléculaire des virus des hépatites B et C. Cette expertise fait principalement appel à des techniques de biologie moléculaire (PCR incluant la capacité d'amplifier de longs fragments, sélection d'amorces, clonage moléculaire, séquençage) et d'analyse bioinformatique des séquences, incluant l'interrogation des banques de données, leur caractérisation physico-chimique ou leur analyse phylogénétique.

Le laboratoire associé réalise une caractérisation moléculaire d'isolats par l'intermédiaire de techniques de référence. Cette identification, non basée sur l'utilisation de kit commerciaux, se fonde sur une analyse phylogénétique des séquences virales obtenues en suivant la méthodologie établie par la commission d'expert responsables du classement des isolats VHC. Nous étudions deux sous régions distinctes du génome viral validées comme représentative du génotype viral. Pour chacune des régions, la séquence nucléotidique consensus est déduite par alignement des séquences sens et anti-sens de chaque isolat par utilisation du programme CLUSTALW version 1.8 (Thomson JD et al., 1994). L'analyse phylogénétique des séquences ainsi obtenues est réalisée par comparaison à des souches de référence extraites des banques de données. Le modèle mathématique utilisé pour l'analyse phylogénétique est basé une analyse de matrices de distance (DNADIST, Kimura 2 parameters). Un arbre phylogénétique est ensuite modélisé par utilisation de l'algorithme du « Neighbor-Joining ». La fiabilité de la structure des branches est mesurée par réalisation d'une analyse de « Bootstrap » (n=1000). L'ensemble des programmes utilisés pour cette analyse sont inclus dans le logiciel MEGA (Kumar S, et al., 2004).

## 2.12 Techniques en Développement

### 2.121 Détection des mutants du PreCore du VHB par PCR en temps réel

La séroconversion anti-HBe est le résultat de la clairance immune du VHB. Cette immunité anti-HBe devrait empêcher les réactivations. Cependant la disponibilité de PCR HBV avec un seuil de sensibilité très inférieur à celui des techniques habituelles d'hybridation (bDNA, hybrid-capture), a fait apparaître des profils qui associent une positivité pour les anti-HBe à une faible positivité en ADN Viral, avec ou sans élévation des transaminases. Ces profils posent le problème du classement de ces patients, qui auparavant, auraient été rangés dans les « asymptomatiques non virémiques ». Deux mécanismes moléculaires, génotypes dépendant, sont responsables de l'inactivation fonctionnelle du PréCore (PréC). Soit il y a création d'un codon stop par mutation ponctuelle à la position 1896, ce qui abroge la production d'AgHBe et s'observe pour les génotypes B à E. Soit il y a double mutation ponctuelle dans le promoteur PréC en position 1762/64 qui réduit la synthèse de l'AgHBe et s'observe pour tous les génotypes (A à E). Ces mutants sont les plus fréquemment rencontrés en pratique clinique (70% des hépatites chroniques B en France). La mise en évidence des mutants Pré-C permettra d'orienter le choix thérapeutique en discriminant, parmi les porteurs chroniques AgHBe(-)/Ac anti-HBe(+) ceux qui ont gardés une multiplication virale active.

#### Etat d'avancement du travail

Les essais d'identification de la mutation ponctuelle 1896, basés sur l'utilisation de sondes de détection spécifiques du virus sauvage et mutant (technologie du FRET), s'étant révélés peu concluants nous nous sommes réorientés vers une amplification sélective en temps réel ou « PCR allèle spécifique ». Ce système est basé sur l'utilisation d'amorces spécifiques d'une espèce grâce au positionnement stratégique de la mutation sur l'amorce. La souche minoritaire portant la mutation recherchée, est ainsi amplifiée de façon sélective. Afin d'identifier les séquences conservées du VHB nous avons réalisé une séquence consensus à partir d'un alignement de séquences de tous les génotypes (A n=16, B n=9, C n=8, D n=9, E n=8). L'analyse de la séquence consensus par le logiciel *Tetra-primer ARMS-PCR* a permis de sélectionner deux couples d'amorces de Tm 63°C. Chaque espèce génère un produit d'amplification de taille différente: sauvage 140pb et muté 100pb.

Nous disposons de deux plasmides contenant 1.3 x génome du VHB (région de redondance se situe sur la zone PréC) possédant ou non la mutation en position 1896. Nous avons parallèlement effectué le clonage d'un génome complet du VHB porteur de la mutation 1896A. Ces différents plasmides seront utilisés pour mettre en place la PCR. Une amplification « PCR duplex », permettant la détection des deux espèces mutée et sauvage sera évaluée dans un second temps.

### **Calendrier**

1. Test des amorces par des expériences de reconstruction sur plasmides.
2. Évaluation de la spécificité, sensibilité et reproductibilité de cette PCR sur des mélanges de plasmides sauvage mutés.
3. Evaluation d'échantillons VHB de génotypes variés sélectionnés pour les caractéristiques ADN(+)/ AgHBe(-).
4. Comparaison aux techniques de référence séquençage direct de la région préC et technique LiPADRV2.

### **2.122 Détection des infections à VHB occultes**

L'objectif est de mettre en place une PCR VHB très sensible afin de pour voir détecter les infections HBV « occultes ». Ces infections cryptiques sont définies par la détection chez des sujets AgHBs négatifs d'ADN du VHB par PCR. La présence d'ADN du virus de l'hépatite B avec ou sans anticorps spécifique en dehors de la période « fenêtre » définit l'infection VHB occulte. Cette situation a été décrite dans les hépatocarcinomes, chez les porteurs chroniques ayant un anti-HBc isolé, associée à une infection par le virus de l'hépatite C et chez des sujets sans aucun marqueur sérologique d'une infection par VHB. La fréquence du diagnostic dépend de la sensibilité relative des tests de détection de l'antigène de surface, de l'ADN viral et de la prévalence de l'infection dans la population. Dans tous les cas, la charge virale est basse, inférieure à  $10^4$ , souvent à 100 UI/ml.

Nous allons au départ utiliser une PCR de type emboîté (nested). Deux couples universels d'amorces ont été ciblés à partir de la séquence VHB consensus décrite précédemment, afin d'amplifier un segment de l'ordre de 350pb. Le fragment amplifié final contient les mutations d'intérêt, ou bien correspond à une zone informative pour le typage viral. Nous avons sélectionné des amorces pour amplifier un fragment de la région PréC et de la région du gène S.

### **Test des amorces du gène S**

Les premiers essais ont été réalisés sur des sérums ayant une charge virale élevée  $> 10^5$  UI/ml. Un produit d'amplification visible en gel d'agarose a été obtenu, indiquant que ces amorces étaient fonctionnelles. Par contre, des résultats plus aléatoires ont été obtenus pour des échantillons ayant un titre viral  $< 10^5$  UI/ml avec une méthode d'amplification classique. Afin d'augmenter la sensibilité de la technique nous avons modifié un certain nombre de paramètres : quantité de serum analysé ; utilisation d'un mélange de polymérase à haut rendement haute fidélité ; développé un protocole de PCR optimisé pour amplifier de l'ADN faiblement représenté. Avec ce protocole, nous obtenons une nette amélioration de la sensibilité. Des résultats positifs ont été obtenus pour une quinzaine de patients avec des charges virales comprises entre  $10^5$  et  $\geq 10^2$  UI/ml.

### **Test des amorces du gène PréC**

Le même type d'approche a été utilisé pour cette région, mais la sensibilité obtenue est moindre. Nous obtenons des résultats positifs pour des valeurs d'ADN du VHB de l'ordre de  $10^3$  UI/ml. Le manque d'efficacité de la PCR sur la région PréC est probablement lié à la structure nucléotidique particulière de cette séquence ou d'importantes structures secondaires de type tige-boucle ont été identifiées. L'optimisation du protocole de PCR de cette région par utilisation d'adjuvants du type DMSO, glycérol sur cette matrice riche en GC est en cours.

### **2.13 Collections de souches**

De par, sa localisation au sein du centre Hépatobiliaire, notre laboratoire a accès à une collection d'échantillons (foie, sérum, lymphocytes) constituée d'une cohorte de sujets suivis pour une infection par le VHB ou VHC. Ces échantillons bien caractérisés, sur le plan clinique et biologique, sont stockés dans de bonnes conditions ( $-80^\circ\text{C}$  ou  $-30^\circ\text{C}$ ). Ces collections seront utilisées pour la mise en place de l'évaluation de nouvelles techniques de typage moléculaire.

### **2.2 Activité d'expertise de l'année 2006**

L'épidémiologie des génotypes du VHC en France est en continuelle évolution et il est important d'effectuer une caractérisation de souches plus atypiques pour la France et pour lesquelles on dispose de peu d'information de séquence. Pour remplir cette mission il est nécessaire d'avoir accès à des souches virales provenant

d'origines géographiques diverses. Par son appartenance à l'institut Pasteur notre laboratoire bénéficie de relations privilégiées avec des laboratoires étrangers et nous nous sommes employés à mettre en place des collaborations internationales afin de disposer de souches virales originaires de régions du monde où circulent des variants particuliers du VHC.

### **2.21 Modélisation d'amorces pour l'amplifier des VHC de type 4 et 6**

Dans le cadre d'un projet transversal de recherche de trois ans (2004-2007 coordination P. Mavromara - IP Hellénique) développé au sein de l'institut Pasteur Paris, des membres du réseau des instituts Pasteur (Paris, Grèce, Roumanie, Saint-Petersbourg, Cambodge, Vietnam) ont été associés (§ 3.2.2). Au cours de cette dernière année nous avons apporté principalement un soutien bioinformatique. Nous avons dessiné des amorces pour permettre l'amplification de régions complètes d'isolats de type 4 et 6. À partir d'alignements de séquences complètes de type 6 (n=5) issues du sud-est Asiatique (Thaïlande, Vietnam, Hong Kong, Macau), des amorces spécifiques du type 6 pour la région NS4B ont été dessinées pour ces régions. Des produits amplifiés de plusieurs isolats ont été obtenus, séquencés et une analyse phylogénétique a été réalisée (*fig. 4*). Pour le type 4, la situation est plus complexe, car il n'y avait qu'une seule séquence complète de type 4a (ED-43) disponible dans les banques de données. Trois jeux d'amorces ont été modélisés sans succès et le dernier jeu a permis l'amplification de deux isolats de type 4f qui ont été séquencés (*fig. 4*). Basé sur les données de séquences générées à partir de nos amorces les régions Capside et NS4b d'isolats de type 6a, 6e et 4f ont été clonées à l'IP-Hellénique. Des peptides de fusion ont été générés à partir des protéines Capside et NS4B et un test ELISA est en cours de développement. Les premiers résultats montrent que la région NS4B représente un antigène prometteur pour le développement de tests sérologiques.

Pour effectuer la caractérisation d'un nouveau sous-type du type 4 (4u), nous avons également généré des amorces permettant l'amplification de la région virale codant pour les protéines d'enveloppe E1 et E2 (*cf. § 2.23*). À partir de données bibliographiques et d'alignements de séquences, nous avons sélectionné deux couples d'amorces localisés de part et d'autre de la région d'intérêt (Capside+823, Capside+850 et P7-2625, E2-2580). Ces amorces ont été testées et sont fonctionnelles.

## **2.22 Participation à la constitution d'un Panel**

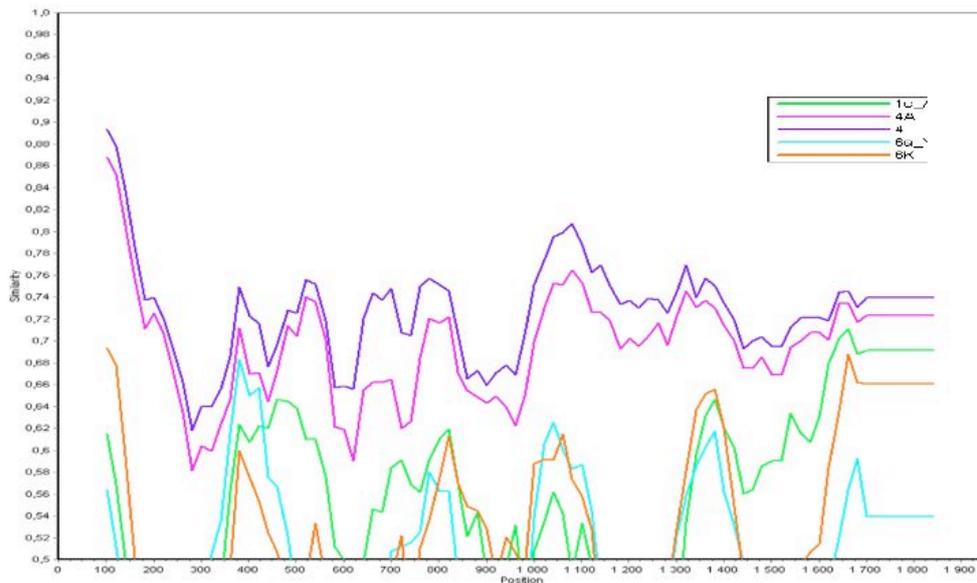
Dans le cadre du réseau des Instituts Pasteur (§ 3.2.2) nous avons participé à la caractérisation moléculaire (RT-PCT, analyse de séquence) d'isolats VHC rentrant dans la constitution d'un panel. Les échantillons ont été collectés chez les partenaires du réseau (Roumanie, Grèce, Cambodge, Vietnam, Cameroun). Ce panel constitué de géotypes (1a, 1b, 2, 3, 4 et 5/6) a été utilisé pour tester l'impact de la diversité virale sur les tests sérologiques commerciaux, puis pour évaluer l'efficacité et la spécificité des antigènes de capsid et NS4B du VHC synthétisé au cours de ce projet (voir § ci-dessus).

## **2.23 Identification d'un nouveau sous-type du type 4 : nommé 4u**

Dans le cadre d'une étude des hépatites virales au Caire, soutenu par l'ANRS et coordonné par A. Fontanet (IP-Paris), nous avons effectué une caractérisation moléculaire de 149 isolats collectés dans un village de 20 000 habitants, situé dans le delta du Nil au nord-est du Caire (cf. RA 2005). Pour résumer les données déjà obtenues, nous avons montré que la majorité des isolats Egyptiens (98%) étaient de type 4 (n=149) et 129 appartenaient à des sous-types connus (4a n=124, 4o n=3, 4m n=2). Cependant, dans cette cohorte un groupe de 20 échantillons n'appartenait à aucun sous-type identifié. L'analyse des distances génétiques pour les régions de référence NS5b et E1 montrait que ces isolats constituaient un nouveau sous type du type 4. Une requête de classification a été déposée auprès du comité de classement des isolats du VHC, représenté par les bureaux des banques de données disponibles pour le VHC, Européenne (<http://euhcvdb.ibcp.fr>), américaine (<http://hcv.lanl.gov>) et japonaise (<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>). Nos données de séquences, associées à l'identification d'isolats infectant un groupe de 20 sujets ont conduit au classement provisoire de ces isolats comme un nouveau sous type du VHC-4 et la lettre « u » leur a été attribuée.

L'absence de données de séquences concernant les isolats de type 4 dans les banques de données nous a conduit à caractériser la région codant pour les protéines d'enveloppe E1E2 pour deux de ces isolats. Ces protéines représentent des cibles potentielles pour la réalisation d'un vaccin. Nous avons mis en place un protocole de RT-PCR optimisé pour les longs fragments et un fragment PCR de 1800pb a été purifié puis cloné. Trois clones indépendants ont été séquencés pour chaque isolat et comparés à des séquences de référence extraites des bases de

données VHC citées ci-dessus. La comparaison des séquences E1 E2 à des séquences de VHC a été réalisée par l'intermédiaire du logiciel Simplot.2.5. Comme illustré sur la figure ci-dessous l'analyse des distances sur une grande région virale (1800pb) a confirmé que ces isolats constituaient bien un nouveau sous type « u » à l'intérieur des types 4. Ces isolats sont proches des isolats de type 4a. Par ailleurs aucun site de recombinaison inter-génotypique n'a été identifié dans la portion analysée. Ce résultat est en accord avec les données précédemment obtenues par l'analyse phylogénétique de régions partielles du VHC situées dans les extrémités en 5' (E1) et 3' (NS5B) du génome.



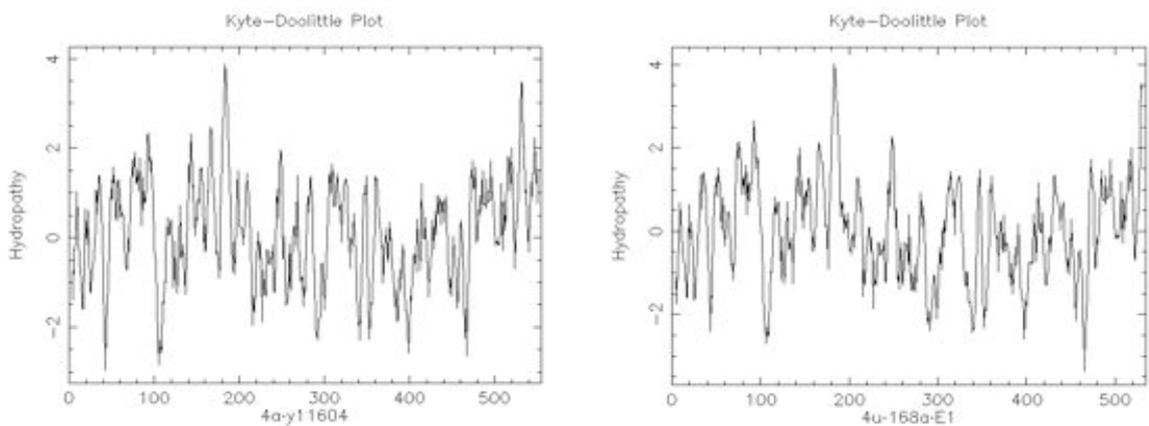
Analyse comparative de la région E1E2 des isolats égyptiens 4u avec d'autres isolats de type 1 (1c vert), 4 (4a rose, 4 non-classés mauve) et 6 (6a bleu, 6k orange).

Après traduction en acides aminés de ces séquences nous avons étudié certains paramètres physico-chimiques de ces protéines, comme les sites de N-glycosylation et le profil d'hydropathie. L'analyse comparative des protéines E1E2 de génotype 4a (n=9), avec le nouveau sous-type 4u par l'intermédiaire du logiciel GlycoSite, a montré plusieurs différences :

- le nombre (4u=11 à 12 vs 4a=13 à 15)
- la position des sites de N-glycosylation (glissement d'un acide aminé après la position 93 pour les 4u au niveau de E2). La modification des

sites de glycosylation peut avoir une incidence importante sur la structure spatiale, la stabilité, le transport et donc sur l'activité biologique de cette protéine. Au niveau des protéines d'enveloppe ces modifications pourraient se traduire par une modification ou une perte d'épitope et conduire par exemple à une diminution de l'immunogénicité ou à un échappement immunitaire.

La comparaison des profils d'hydropathie des protéines E1E2 pour les génotypes 4u et 4a (n=9) montre une bonne superposition des graphes comme l'illustre la figure ci dessous. Ce résultat a été confirmé par l'intermédiaire du logiciel Tmap qui a identifié 4 séquences transmembranaires similaires pour les deux sous-types 4u et 4a.



Graphiques illustrant les profils d'hydropathie des protéines E1E2 pour les génotypes 4a et 4u par utilisation de l'algorithme de Kyte-Doolittle. Les régions possédant une valeur supérieure à zéro sont constituées d'acides aminés de type hydrophobe.

### III Activités de surveillance

#### 3.1 Enquêtes ponctuelles concourant à la surveillance

##### 3.11 Surveillance des infections chroniques B et C au niveau National

Une enquête de prévalence nationale et régionale des marqueurs sériques des infections dues aux virus des hépatites B (VHB) et C (VHC) réalisée de 2003 à 2004 sous l'égide de la DGS et de l'INVS à partir d'un échantillon national d'assurés

sociaux (âgée de 18 à 80 ans) du régime général de l'assurance maladie, a montré que (Meffre et al, 2005)

1. Pour la séropositivité anti-VHC le niveau de prévalence observé (0.9%) est du même ordre que celui observé en 1994.
2. Pour l'infection chronique par le VHB un niveau de prévalence de l'AgHBs de 0,68% a été observé, supérieur à ce qui était proposé jusqu'à maintenant. Cette prévalence est compatible avec un nombre de porteurs de ce virus dans notre pays de l'ordre de 300 000 chez les personnes âgées de 20 à 80 ans

### 3.111 Epidémiologie Moléculaire du VHC dans la population générale

#### Détermination de la charge virale

Nous avons réalisé la recherche de l'ARN du VHC par PCR-qualitative maison chez les 233 assurés sociaux dépistés comme séropositifs pour les anti-VHC. Nous avons montré que 139/233 étaient positifs pour l'ARN du VHC dans le sérum. L'estimation quantitative de la charge virale a été réalisée sur les 139 sujets ARN VHC(+) et sur 31 sujets ARN VHC(-) par utilisation d'un test commercial (Abbott RealTime HCV). L'ensemble des 31 échantillons ARN(-) par la technique maison ont été confirmés négatifs par le test commercial. Les charges virales obtenues pour les échantillons détectés ARN(+) sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Charge virale * (UI/ml)	>10 <sup>7</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>5</sup>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>3</sup>	>10 <sup>2</sup>
anti-VHC(+)	4	<b>73</b>	<b>43</b>	15	3	1
ARN(+) (%)	(2,9)	(52,5)	(30,9)	(10,8)	(2,2)	(0,7)

\*Charge virale exprimée en Unite internationales/millilitre ; Test de 500µl seuil de sensibilité < 25UI/ml

Les résultats obtenus montrent qu'environ **60%** des assurés sociaux dépistés anti-VHC positifs ont une multiplication virale active (ARN VHC(+)), qui est supérieure à **>10<sup>5</sup> UI/ml** pour plus de **86%** de ces sujets.

### Détermination des génotypes

L'analyse de la diversité des souches, a été effectuée sur 126 échantillons par séquençage direct de la région NS5b. Nous avons observé que le génotype 1 (1b n=39, 1a n=23) reste le plus fréquent observé (54 %), suivi des génotypes 2 (17,5%), 4 (16,6%), et de façon plus minoritaire les 3a (9,5%) et 5a (2,4%). La comparaison de ces données, obtenues dans une population d'assurés sociaux, à la répartition des génotypes chez les donneurs de sang observée en 2003 montre que le type 1 reste majoritaire, mais indique une répartition différentes des groupes plus minoritaires (tableau ci-dessous ; \* n=197 données de l'INTS - rapport CNR Hépatite 2005).

Génotypes du VHC	1	2	3	4	5
Donneurs de sang* (%)	58,4	8,1	<b>20,8</b>	9,1	2
Assurés Sociaux (%)	54	<b>17,5</b>	9,5	<b>16,6</b>	2,4

La prévalence du génotype 4, encore rare en France il y a une dizaine d'années, est actuellement la même que celle du génotype 2 dans la population des assurés sociaux. Ces deux génotypes se situent en seconde position par ordre de fréquence. Dans les deux groupes, les génotypes 5 et 6 sont très rares. L'analyse phylogénétique réalisée sur la région NS5b indique la circulation d'une grande diversité de sous type du VHC en France pour les types 1, 2 et 4 (*figures 1, 2, 3*). Initialement ces sous-types ont été décrits chez des sujets originaires d'Afrique Centrale et d'Égypte.

### Conclusions

L'étude moléculaire a volontairement été **réalisée en aveugle**, et pour le moment un commentaire général des données peut être réalisé. La mesure de la charge virale montre pour **la moitié** de l'échantillon national d'assurés sociaux une charge virale définie comme « **haute** » (>600 000 UI/ml) lors de la prise en charge thérapeutique. Ces sujets sont donc potentiellement contaminant pour leur

entourage. L'analyse de la diversité des souches circulant dans cette population, considérée comme représentative de la population générale, montre que la prévalence du génotype 4, encore rare en France il y a une dizaine d'années, est actuellement la même que celle du génotype 2 dans la population des assurés sociaux. Ces deux génotypes se situent en seconde position par ordre de fréquence. Une situation opposée est observée dans la population des donneurs de sang où le génotype 3a représente 20% des cas, et les génotypes 2 et 4 environ 10%. Ces données sont en accord avec les études récentes réalisées en France qui indiquaient une modification de la prévalence des génotypes du VHC chez les sujets porteurs chroniques. Ces études montraient que les génotypes 4a, 4d et 2a, identifiés chez des sujets d'origine française étaient plus généralement associés à des individus jeunes, contaminés par toxicomanie intraveineuse. Les autres isolats beaucoup plus hétérogènes 1 (d, e, h, i), 4 (c, k, f, q) et 2 (c, i, j, k, l,) étaient associés à l'origine non-européenne des sujets. (Morrice et al., 2001 ; Tamalet et al. 2003 ; Nicot et al., 2005 ; Thomas F et al, 2007).

Le décodage de l'enquête permettra (1) de connaître la proportion de sujets connaissant leur statut sérologique et parmi ceux ci, ceux pris en charge (2) de déterminer s'il est nécessaire de déclencher à une nouvelle campagne d'incitation au dépistage (3) d'étudier l'association génotypes / origine géographique afin d'évaluer la diffusion de nouveaux génotypes en France.

### **3.112 Epidémiologie du VHB**

#### **Détermination de la charge virale**

Nous avons réalisé la recherche quantitative l'ADN du VHB par utilisation de la technique commerciale COBAS TaqMan HBV (ROCHE) chez 107 sujets dépistés comme porteurs de l'AgHBs. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous. Nous avons montré que 8 des 107 des assurés sociaux porteurs de l'antigène HBs n'avaient pas d'ADN du VHB détectable dans le sérum (<24UI/ml). Les résultats des charges virales obtenues sur les 99 sujets ADN VHB positif sont présentés dans le tableau ci-dessous.

ADN HBV	POS									NE G
	Charge virale **	>10 8	>10 7	>10 6	>10 5	>10 4	>10 3	>10 2	>24	
AgHB s + (%)	3 2,8	1 0,9	2 1,9	1 0,9	7 6,5	24 22,4	26 24,3	12 11, 2	23 21, 5	8 7,5

ND\* : « not detected » pas d'amplification HBV ; \*\* test 500µl de sérum ;  $<10^2$  UI/ml  
ADN HBV positif mais zone de quantification non linéaire.

Nous avons montré que 92% (99/107) des assurés sociaux dépistés AgHBs positifs étaient porteurs d'une multiplication virale active (ADN+), et parmi ceux-ci **93%** (92/99) avaient une charge virale basse, **inférieure à  $10^4$  UI/ml**.

### Détermination des génotypes

Nous avons débuté une analyse des génotypes du VHB pour les sujets ADN VHB positif. Pour l'instant, 6 patients ayant une charge virale supérieure à  $10^6$  UI/ml ont été génotypés (A n=3 ; B n=1 ; C n=1 ; D n=1). La faiblesse de la charge virale chez les sujets étudiés rend délicate l'approche de typage par séquençage direct des produits d'amplification. Nous avons maintenant développé une technique PCR adaptée à ces faibles charges virales (cf. § 2.122) nous permettant d'obtenir un produit PCR séquençable pour des charges virales de l'ordre  $10^2$  UI/ml.

### Conclusions

L'analyse de la charge virale à partir d'un échantillon national d'assurés sociaux dépistés positif pour l'antigène HBs montre que plus de **90%** sont porteurs d'une multiplication virale active. La principale caractéristique de cet échantillon représentatif de la population générale est la **faiblesse** de la charge virale observée (93%  $<10^4$  UI/ml).

Une charge virale basse chez ces sujets AgHBs positif peut être expliquée par deux hypothèses:

1. une infection chronique par virus B « sauvage » : au fil du temps, la multiplication virale a diminué, l'ADN du VHB est intégré dans le génome cellulaire et en l'absence de séquelles hépatiques il s'agit d'un porteur sain.
2. une infection chronique par Virus B avec mutation(s). Les plus fréquentes dans l'histoire naturelle siègent dans la région préC (1762/1764, 1896) et réduisent le niveau de répllication du VHB.

### **Perspectives**

Les données récentes suggèrent que l'incidence de ces mutants préC est en augmentation en France. Ces mutants sont retrouvés chez des patients plus âgés, à prédominance masculine, et sont caractérisés par une charge virale inférieure à  $10^5$  copies/ml (Zarski et al. J hepatol 2006). Nous allons donc estimer dans cette population d'assurés sociaux la fréquence des variants du préC. La présence des mutants du préC sera confrontée chez ces mêmes sujets au génotype du VHB observé et à l'origine géographique des sujets.

### **3.12 Projet de Surveillance des hépatites aiguës B**

Le projet d'une surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France mené e collaboration avec l'institut de veille sanitaire a obtenu un soutien financier de l'ANRS (porteur de projet V. Thibault ; membres du projet D. Antona, E. Delarocque, S. Laperche, V. Thiers ).

L'objectif de ce projet est de recueillir des données moléculaires sur les souches de VHB responsables d'hépatites B aiguës en France. En particulier, d'accumuler des informations sur les génotypes circulant en France, la fréquence des variants du déterminant « a » de l'AgHBs, la fréquence des mutants « pré-C ». Les informations obtenues seront ainsi les premières à concerner la population générale pour ce type de maladie.

Ce projet, après avoir obtenu l'accord de la CNIL, est maintenant en phase opérationnelle depuis le mois de Février. Les documents d'information concernant cet observatoire moléculaire du VHB ont été mis en ligne sur le site de l'INVS et le recueil des prélèvements va s'effectuer sur une année.

### **3.13 Etude de la transmission intrafamiliale du VHC en Egypte.**

L'étude récente d'une cohorte égyptienne, endémique pour le VHC, a montré que les causes iatrogènes n'expliquaient que la moitié des infections actuelles des adultes, et ne rendaient pas compte des infections observées chez les sujets de moins de 20 ans (Arafa N et al., 2005). Ces observations suggèrent l'intervention d'autres modes de transmission du VHC en zone hyper endémique, notamment dans le cadre familial.

#### **3.131 Résultats**

Nous avons étudié la transmission intrafamiliale du VHC, sur cette cohorte de 4000 individus. Toutes les familles pour lesquelles au moins deux sujets ARN positifs étaient identifiés ont été enrôlées dans l'étude. Nos résultats obtenus, par le biais d'une analyse phylogénétique de 133 sujets, montraient un regroupement des souches virales suivant les maisonnées et les familles, sans que le rôle de l'un ou de l'autre puisse être discerné. Pour aller plus loin dans l'analyse nous avons utilisé le test de Mantel, qui permet de déterminer s'il existe une corrélation entre deux matrices, par exemple celle des distances génétique et celle des matrices phénotypiques (même maison, relation époux, père - enfant, mère-enfant, fratrie, différence d'âge faible, même sexe). Nous avons montré en analyse multivariée que la maison ( $p < 0.0001$ ), les relations mère / enfant ( $p = 0.002$ ) et les relations de fratrie ( $p = 0.005$ ) étaient les seules significatives (cf. RA 2005).

Parallèlement, en collaboration avec l'unité de Laurent Abel (Inserm U555), une analyse des données épidémiologiques a été effectuée sur cette même cohorte. Cette analyse a pris en compte tous les sujets de plus de 3 ans soit 3994 individus (âgés de 4 ans à 88 ans). Un arbre généalogique (jusqu'au troisième niveau de parenté) a été modélisé pour chaque famille (475 familles incluant 2 à 48 membres) et les facteurs de risques d'infection VHC ont été recueillis. La séroprévalence dans cette population était de 12,3% sans différence en fonction du sexe et augmentait avec l'âge. L'association entre la présence d'une infection VHC et les liens de parentés entre individus a été étudiée tout en intégrant dans l'analyse les autres les facteurs de risques. L'analyse des données a mis en évidence une forte corrélation entre la présence d'une infection VHC et les liens de parenté du 1 degré (mère/enfant, enfant/enfant). Ce lien est d'autant plus fort que les que les enfants

sont jeunes et de même âge. Cependant, par typage moléculaire, nous avons montré que les souches virales sont différentes dans la majorité des paires enfant - enfant chroniquement infectées. De plus, les analyses ont montré que cette corrélation était indépendante de l'âge et de la différence d'âge entre les enfants. Ce résultat suggère l'implication de facteurs génétiques dans la susceptibilité/résistance à l'infection HCV.

### **3.132 Conclusions**

L'analyse des données a mis en évidence une forte corrélation entre la présence d'une infection VHC et les liens de parenté du 1 degré (mère/enfant, enfant/enfant) qui peut être expliquée par une combinaison particulière de modes de transmission dans la famille et une prédisposition génétique des sujets à l'infection. L'analyse des facteurs génétique par l'unité de Laurent Abel (Inserm U555), est en cours dans le second volet de l'étude.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### HCV

1. Morice Y, Roulot D, Grando V, Stirnemann J, Gault E, Jeantils V, Bentata M, Jarrousse B, Lortholary O, Pallier C, Deny P. Phylogenetic analyses confirm the high prevalence of hepatitis C virus (HCV) type 4 in the Seine-Saint-Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. *J Gen Virol.* 2001;82:1001-12.
2. Tamalet C, Colson P, Tissot-Dupont H, Henry M, Tourres C, Tivoli N, Botta D, Ravaux I, Poizot-Martin I, Yahi N. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates: a survey of 535 strains circulating in southern France. *J Med Virol.* 2003 Nov;71(3):391-8.
3. Nicot F, Legrand-Abravanel F, Sandres-Saune K, Boulestin A, Dubois M, Alric L, Vinel JP, Pasquier C, Izopet J. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4 strains circulating in southwestern France. *J Gen Virol.* 2005 Jan;86:107-14.
4. Thomas F, Nicot F, Sandres-Saune K, Dubois M, Legrand-Abravanel F, Alric L, Peron JM, Pasquier C, Izopet J. Genetic diversity of HCV genotype 2 strains in south western France. *J Med Virol.* 2007 Jan;79(1):26-34.
5. Schroter M, Zollner B, Schafer P, Reimer A, Muller M, Laufs R, Feucht H. Epidemiological dynamics of HCV among 747 German individuals: new subtypes on the advance. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1866-8.
6. R. Haus, C. Alloui, S. Alain, M. Bouvier, M. Branger, M.-L. Chaix, R. Cesaire, C. Delamare, J. Ducos, M. Gassin, A. Goffard, H. Lafeuille, M.-E. Lafon, P. Morand, J.-M. Pawlotsky, J. Riahi, K. Sandres, N. Sixt, F. Stoll-Keller, V. Thibault, M.-A. Trabaud, P. Trimoulet, F. Barin, P. Dény, E. Delarocque-Astagneau. Étude de faisabilité pour la création d'un observatoire national des sous-types du virus de l'hépatite C, novembre 2000-avril 2001. *BEH* 2002 n°46:231-34
7. Meffre, C., Le Strat, Y., Delarocque-Astagneau, E., Antona, D., and Desenclos, J. C. (2005). Estimation des taux de prévalence des anticorps anti-VHC et des marqueurs du virus de l'hépatite B chez les assurés sociaux du régime général de France métropolitaine, 2003-2004. *INVS Rapport préliminaire*, 1-14.
8. Mellor J, Walsh EA, Prescott LE, Jarvis LM, Davidson F, Yap PL, Simmonds P. Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based assay. *J Clin Microbiol.* 1996;34:417-2

### HBV pré-C

9. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of HBe Ag in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet.* 1989 9;2:588-91.
10. Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol.* 1990;64:1298-303.

11. Tong SP, Li JS, Vitvitski L, Trepo C. Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an inactive pre-C region. *Virology*. 1990;176:596-603.
12. Chu, C. J., Keeffe, E. B., Han, S. H., Perrillo, R. P., Min, A. D., Soldevila-Pico, C., Carey, W., Brown, R. S., Jr., Luketic, V. A., Terrault, N., and Lok, A. S. (2003). Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology* 38, 619-628.
13. M.L. Funk, D.M. Rosenberg and A.S.F. Lok, World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants, *J Viral Hepatol* 9 (2002), pp. 52–61.
14. Santantonio T, Jung MC, Miska S, Pastore G, Pape GR, Will H. Prevalence and type of pre-C HBV mutants in anti-HBe positive carriers with chronic liver disease in a highly endemic area. *Virology*. 1991;183:840-4.
15. Zarski JP, Marcellin P, Leroy V, Trepo C, Samuel D, Ganne-Carrie N, Barange K, Canva V, Doffoel M, Cales P; Federation nationale des Poles de reference etdes Reseaux Hepatites. Characteristics of patients with chronic hepatitis B in France: predominant frequency of HBe antigen negative cases. *J Hepatol*. 2006 Sep;45(3):355-60. Epub 2006 Apr 18
16. Manesis, E. K., and Hadziyannis, S. J. (2001). Interferon alpha treatment and retreatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 121, 101-109.
17. Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis et al.. PegIFN alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 2004 16;351(12):1206-17.

#### **ARMS PCR**

18. Punia et al P, *J hepatol* 2004 unia P, Cane P, Teo CG, Saunders N. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *J Hepatol*. 2004 ;40(6):986-92.
19. Wightman F, Walters T, Ayres A, Bowden S, Bartholomeusz A, Lau D, Locarnini S, Lewin SR. Comparison of sequence analysis and a novel discriminatory real-time PCR assay for detection and quantification of Lamivudine-resistant hepatitis B virus strains. *J Clin Microbiol*. 2004 ;42(8):3809-12.

#### **HCV type 4**

20. Pol S, Nalpas B, Bourliere M, Couzigou P, Tran A, Abergel A, Zarski JP, Berthelot P, Brechot C. Combination of ribavirin and interferon-alfa surpasses high doses of interferon- $\alpha$  alone in patients with genotype-1b-related chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2000 ;3:1338-44.
21. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med*. 2000; 15;132:296-305
22. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, El Khoby T, Abdel-Wahab Y, Aly Ohn ES, Anwar W, Sallam I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000; 11;355:887-91

23. Arafa N. , El Hoseiny M. , Rekacewicz C., Bakr I. , El-Kafrawy S. , El Daly M. , Aoun S. , Marzouk D. , Mohamed M.K. , Fontanet A. Changing pattern of HCV spread in rural areas of Egypt. J Hepatol. 2005 Sep;43(3):418-24.
24. El Gaafary MM, Rekacewicz C, Abdel-Rahman AG, Allam MF, El Hosseiny M, Hamid MA, Colombani F, Sultan Y, El-Aidy S, Fontanet A, Mohamed MK. Surveillance of acute hepatitis C in Cairo, Egypt J Med Virol. 2005 Aug;76(4):520-5.

## **IV Conseil et collaborations**

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

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

### **4.2 Collaborations Nationales et Internationales**

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

Le travail de l'équipe dirigée par ML Michel est orienté vers la prévention et l'immunothérapie des infections chroniques dues aux virus de l'hépatite B (VHB). L'équipe a montré que des réponses T spécifiques du VHB peuvent être induites ou réactivées chez des patients porteurs chroniques du virus.

Dans ce projet nous effectuons la caractérisation de la région PreC/gène HBx du VHB chez des patients porteurs chroniques du VHB, ayant une faible charge virale ou ayant contrôlé l'infection, pour lesquels une réponse T CD4+ spécifique d'HBx prédominante a été mise en évidence. (cf activité de recherche)

#### **4.2.2 Projet Transversal de Recherche:**

« Contribution de la diversité du VHC sur le développement des outils diagnostiques »

L'objectif de ce Projet Transversal de Recherche (PTR) soutenu par l'institut Pasteur de Paris est d'évaluer l'implication de la diversité génétique du VHC dans le diagnostic des infections virales en Europe du Sud Est et en Asie du Sud Est. (Participent à ce réseau : l'institut Pasteur de Grèce, de Roumanie, de Saint-Petersbourg, du Cambodge). L'efficacité et la spécificité des tests commerciaux actuels sur les isolats viraux circulants dans ces différents pays ont été déterminées dans la première partie du projet. Le développement d'outils sérologiques adaptés à ces types particuliers est en cours. (cf. § 2.22). Nous intervenons aussi comme conseil pour la virologie moléculaire auprès des membres du réseau IP inclus dans ce projet.

### **4.2.3 Épidémiologie et traitement des infections par le VHC en Égypte (Projet ANRS)**

Ce projet, dont A. Fontanet (Unité d'épidémiologie des virus émergents – Institut Pasteur) et M.K. Mohamed (faculté du Caire) sont les responsables scientifiques, vient d'obtenir une deuxième phase de financement (2006-8) par l'ANRS. Deux volets vont être poursuivies :

- projet d'épidémiologie génétique de la cohorte villageoise de 4000 participants au nord-ouest du Caire en collaboration avec Laurent Abel, INSERM U550
- la mise en place d'un système de surveillance des hépatites aiguës au Caire, avec notamment l'ouverture d'un site de recherche ANRS dédié à l'étude des hépatites virales au Caire.

### **4.2.4 Surveillance des hépatites aiguës B**

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

## **4.3 Information, Publication générale, formation**

### **4.31 Formation de stagiaires**

Le CNR assure la formation de stagiaires issus de pays étrangers. Par son appartenance à l'institut Pasteur notre CNR bénéficie de relations privilégiées avec des laboratoires étrangers. Par le biais du réseau des Instituts Pasteur plusieurs collaborations internationales ont été initiées. L'objectif de ces collaborations est de favoriser les échanges entre ces différents laboratoires afin de pouvoir implanter sur place des tests de caractérisation du VHC et ainsi de pouvoir recueillir des informations sur les isolats du VHC circulants dans ces pays. Au cours de l'année 2007 un stagiaires venant du Maroc (Faculté de Médecine d'Alger) sera formé aux techniques de caractérisation moléculaire d'isolats viraux et s'impliquera dans la détection des infections B occultes.

## V. Activité de recherche

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

### 5.1 Virus de l'hépatite C

#### **5.11 Compartimentation des quasiespèces de la capsid et de la protéine F du VHC, dans des hépatocytes de foie tumoral et non tumoral isolées par microdissection. (R. Sobesky, F. Rimlinger, V. Thiers).**

##### **5.111 Situation du sujet**

La protéine de capsid du virus de l'hépatite C (VHC) participe à la formation de la particule virale comme une protéine de structure mais elle module également l'expression de plusieurs gènes cellulaires, avec un effet sur la prolifération et la viabilité cellulaire. Dans les années 1990, une nouvelle protéine de poids moléculaire de 16 kDa a été découverte dans le génome du VHC. Cette protéine, nommée F pour frameshift (ARFP/core+1), est exprimée par un décalage ribosomique du cadre de lecture de type + 1 dans la région aminoterminal de la séquence codant pour la protéine de la nucléocapsid (Choi et al., 2003, Xu et al., 2001). La fonction de cette protéine est présentement inconnue. Toutefois, une équipe a observé la présence des anticorps spécifiques circulants chez des patients, indiquant que cette protéine est synthétisée lors de l'infection naturelle du VHC. (Bain et al., 2004)

Il a été suggéré que la distribution des quasiespèces du Virus de l'Hépatite C (VHC) ne se faisait pas au hasard entre le foie tumoral et non tumoral de patients atteints de carcinome hépatocellulaire. Des mutations ponctuelles du gène de la capsid du VHC pourraient jouer un rôle dans les différentes étapes de la carcinogenèse hépatique. En effet, des protéines de capsides codées de génomes isolés à partir des cellules tumorales présentent des effets biologiques différents de celles des cellules non tumorales<sup>8,9</sup>. Cependant ces études ont été limitées par l'hétérogénéité des lésions dans un foie infecté. D'autre part, la protéine F (ARFP/core+1), issue d'un décalage du cadre de lecture du gène de la capsid n'a jamais été étudié dans ce cas.

### **5.112 But de l'étude**

Notre projet a pour objectif d'associer les techniques de microdissection laser sur des fragments hépatiques de CHC lié au VHC pour l'analyse « in situ » de l'hétérogénéité intra hépatique de la capsidite du VHC et de la protéine F du VHC entre le foie tumoral et non tumoral.

### **5.113 Patients et méthodes**

Sept patients infectés par le génotype 1b du VHC atteint de cirrhose et opérés de carcinome hépatocellulaire ont été étudiés. À partir de coupes congelées, nous avons isolé par microdissection laser environ  $8.10^3$  hépatocytes dans le foie tumoral et dans 2 nodules cirrhotique de foie non tumoral. Le gène complet de la capsidite a été amplifié puis 10 clones ont été isolés pour chaque compartiment du foie. Pour deux 2 patients, le sérum était disponible et 40 clones ont été analysés. La diversité nucléotidique, les mutations synonymes (S) et non synonymes (N), (dS-dN) des séquences de capsidite et de protéine F ont été comparées dans les compartiments mais également entre les compartiments. La distribution intrahépatique des séquences de capsidite a été analysée par modélisation d'arbres phylogéniques et l'analyse multivariée des corrélations de matrices (test de Mantel).

### **5.114 Résultats**

La virémie était plus faible dans le foie tumoral par rapport au foie non tumoral pour 6 des 7 patients. Une augmentation de la diversité mais également de la complexité des quasiespèces était observée chez 6 patients sur 7. La différence dS-dN était plus faible pour la protéine F pour tous les compartiments chez 5 patients sur 7, suggérant une plus grande pression de sélection contre cette protéine putative par rapport à la protéine de capsidite. Pour chaque patient une analyse phylogénétique de l'ensemble clones obtenus pour chaque zones, met en évidence, dans la majorité des cas, une compartimentation des séquences tumorales. Pour les 2 patients dont le plasma a été analysé, des quasiespèces différentes ont été identifiées dans le foie tumoral, non tumoral et dans le sérum. Pour déterminer si cette observation est statistiquement relevante, un test de Mantel a été réalisé permettant la combinaison des matrices de distances génétiques avec des matrices phénotypiques (séquences issue de la tumeur, séquences issue de la non tumeur). L'analyse multivariée des corrélations des matrices a mis en évidence une forte compartimentation entre les hépatocytes tumoraux et non tumoraux pour les 7 patients mais également entre les nodules cirrhotiques chez 5 patients sur 7.

### **5.115 Conclusions**

En conclusion, il existe une plus faible répliation des quasiespèces virales dans le foie tumoral. Les quasiespèces issues du foie tumoral présentent une plus grande

diversité et sont soumises à une plus faible pression de sélection. Les variants mis en évidence par la microdissection laser dans les hépatocytes tumoraux et non tumoraux étaient différents de ceux trouvés dans le sérum, suggérant une transmission du virus de cellules à cellules dans le foie infecté. À l'aide de la microdissection laser permettant la localisation des variants « in situ », nos observations soulèvent l'hypothèse que des souches ayant des propriétés fonctionnelles modifiées pourraient être sélectionnées au cours de certaines étapes de la carcinogenèse liée au VHC.

## **5.2 Virus de l'hépatite B**

### **5.2 - Identification d'une séquence peptidique immunodominante reconnue par les lymphocytes T CD4+, indépendamment du type HLA, au cours de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (collaboration avec l'unité Inserm 812 ; article joint)**

Avec plus de 350 millions de porteurs chroniques et malgré l'existence d'un vaccin efficace, le virus de l'hépatite B (VHB) est toujours une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. Les traitements actuellement disponibles (interféron alpha et analogues de nucléosides) ont une efficacité insuffisante. Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques afin de prévenir l'évolution vers le cancer du foie. Une forte réponse cellulaire a été associée au contrôle de l'infection par le VHB. L'équipe de ML Michel a mis en évidence une nouvelle cible virale de la réponse immunitaire : la protéine X du VHB (HBx). Cette protéine transactivatrice, indispensable à l'établissement de l'infection virale, a été impliquée dans la carcinogenèse hépatique.

Au cours de l'infection virale la réponse T CD4+ joue un rôle central dans l'établissement et la maintenance de la réponse T CD8+ et par le biais de la production de cytokines anti-virales. Au cours d'un projet de recherche clinique réalisée chez 52 patients, cette équipe a mis en évidence une réponse T CD4+ spécifique d'HBx prédominante chez les patients porteurs chroniques du VHB ayant une faible charge virale ou ayant contrôlé l'infection. Cette réponse-cible est dirigée contre un peptide particulier de la protéine HBx qui est reconnu indépendamment du type HLA des patients.

Par ailleurs, des études ont montré que cette séquence peptidique est altérée chez les patients ayant des virus mutants HBeAg négatif, au cours d'hépatite fulminante ou chez des patients évoluant vers un hépatocarcinome. Nos résultats montrent que les cellules T spécifiques d'HBx perdent la capacité à reconnaître ces variants viraux. Pour quelques uns des patients étudiés le séquençage de la région preC a mis en évidence la présence de virus ayant des mutations de la région du génome viral (BCP) qui chevauche la région d'HBx que nous avons identifiée.

## Programme 2007-2008

- Poursuite du développement de la détection des mutants VHB du préC par lightcycler. Validation de la technique par utilisation des patients détectés comme porteurs de mutants par la technique de séquençage direct. Confrontation aux résultats obtenus par la technique LiPA.
- Mutant du préC : Les données récentes suggèrent que l'incidence de ces mutants est en augmentation en France. Ces mutants sont retrouvés chez des patients plus âgés, à prédominance masculine, et sont caractérisés par une charge virale inférieure à  $10^5$  copies/ml (Zarski et al. J hepatol 2006). Nous allons donc estimer dans différentes populations la fréquence des variants du préC. En France :
  - Sur la population d'assurés sociaux (enquête CPAM/INVS 2002-2003 : 120 isolats VHB) seront séquencés dans la région du gène S et préC. L'analyse des séquences permettra aussi d'évaluer la présence de mutants du VHB (mutants du préC, mutant du préS).
  - Sur les souches VHB collectées par l'intermédiaire de l'observatoire des hépatites aiguës en France
- Diversité des génotypes du VHB sur la population d'assurés sociaux (enquête CPAM/INVS 2002-2003 : 120 isolats VHB) (séquence dans la région du gène S et préC).
- Diversité des souches VHB (génotypes) rencontrées au cours des hépatites aiguës B faisant l'objet d'une procédure de déclaration obligatoire en collaboration avec l'unité de virologie transfusionnelle (INTS) dirigé par le Dr Syria Laperche et le laboratoire de virologie de la Pitié-Salpêtrière (Dr Vincent Thibault).

## Publications 2006-2007

### Revue internationale

Z. Kadi, P. Saint-Laurent, JF.Cadranel, C. Joly, P. Dumouchel, S. Jeanne, V. Thiers, O.Ciurana and P. Astagneau. Look back investigation of patients exposed to possible transmission of hepatitis C virus by a capillary blood glucose meter. 2006. *J Hosp Infect.* 2006 May;63(1):65-9.

Mohamed MK, Magder LS, Abdel-Hamid M, El Daly M, Mikhail NH, Abdel-Aziz F, Medhat A, Thiers V and Strickland GT. Transmission of hepatitis C virus between parents and children. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jul;75(1):16-20.

F Lot, E Delarocque-Astagneau, V Thiers, C Bernet, Rimlinger F, J-C Desenclos, T Dao, P Chaud, F Dumay. HCV transmission from a healthcare worker to a patient. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Feb;28(2):227-9.

Massari SL., Qiang D., Fontaine H., Houitte D., Rimlinger F., Thiers V., Maillere B., Pol S., Michel ML. Impact of hepatitis B Core promoter mutations on T-cell response to an immunodominant HBx-derived epitope. *Hepatology.* 2007 (in press)

Dos Santos A, Thiers V, Sar S, Derian N, Bensalem N, Yimaz F, Bralet MP, Ducot B, Brechot C., Demaugre F. Contribution of laser microdissection-based technology to proteomic analysis in hepatocellular carcinoma soumis. *Proteomics.* 2007 (in press)

Article en cours de soumission

A. Carbonne, V. Thiers, S. Kerneis, M. Aggoune, H. Creusvaux, P. Astagneau. Transmission of hepatitis C Virus from patient to patient of different operating rooms through general anesthetic products. (*soumis Infect Control Hosp Epidemiol.*)

Sobesky R., Feray C., Rimlinger F., Derian N., Dos Santos A., Roque-Afonso AM., Samuel D., Brechot C., Thiers V. Distinct hepatitis C virus core and F protein quasispecies in tumoral and non tumoral hepatocytes isolated by microdissection (*submitted Hepatology*)

Plancoulaine S., Mohamed MK., Arafa N., Bakr I., Reckacewicz, Tregouet DA., El Daly M., Thiers V., Feray C., abdel-Hamid M., Abel L., Fontanet A. Dissection of familial correlations in Hepatitis C (HCV) seroprevalence provides evidence for intrafamilial viral transmission and genetic predisposition to infection. (*submitted JAMA*)

### Articles en preparation

Feray C., El Daly M, Abdel-Hamid M, El-Kafrawy S., Rimlinger F., Reckacewicz C., Mohamed MK, Fontanet A, Thiers V. Intrafamilial and household clustering of hepatitis C virus in rural Egypt: a phylogenetic and matrix correlation tests analysis.

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

#### **Communications et Posters**

Feray C, El Daly M, Thiers V., El-Kafrawy S., Fontanet A, Rekacewicz C., Rimlinger F., Mohamed MK, Abdel-Hamid M, Intrafamilial and household clustering of hepatitis C virus in rural Egypt: a phylogenetic and matrix correlation tests analysis. 12<sup>th</sup> International Symposium on viral Hepatitis and liver Disease Paris July,1-5, 2006 pS45: O.146

El Daly M., Abdel-Hamid M, El-Kafrawy S., Fontanet A., Rekacewicz C., Rimlinger F., Mohamed MK, Thiers V. Phylogeny of HCV in a rural village of Egypt: intrafamilial comparison of sequences. 12<sup>th</sup> International Symposium on viral Hepatitis and liver Disease Paris July,1-5, 2006 pS129: P.219.

Sobesky R, Feray C, Rimlinger F, Derian N, Dos Santos A, Roque-Afonso AM, Samuel D, Brechot C, and Thiers V. Compartmentalization of hepatitis C virus quasispecies in tumoral and non-tumoral hepatocytes isolated from cirrhotic liver by laser-capture microdissection. 42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of The Liver April 11-15, 2007, Barcelona, Spain