

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

---

## **RAPPORT D'ACTIVITE 2007-2008**

**Mai 2008**

# I

## **STRUCTURE ET MISSIONS DU CNR**

## **1- Rappel des missions du CNR**

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

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

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

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

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

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

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

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

- CNR des hépatites virales B, C et delta : localisée dans le service de Bactériologie-Virologie-Hygiène et de l'équipe de recherche "Physiopathologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques" (INSERM U841) de l'hôpital Henri Mondor, Créteil (Responsables : Pr. Jean-Michel PAWLOTSKY, Dr Stéphane CHEVALIEZ),
- Laboratoire associé CNR des hépatites virales B, C et delta en transfusion sanguine : localisé à l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS), Paris (Responsable : Dr. Syria LAPERCHE),
- Laboratoire associé responsable de la recherche et du développement : 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 dans le service de Bactériologie-Virologie de 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 a 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 deuxième année de fonctionnement**

La deuxième année de fonctionnement du CNR dans sa forme nouvelle a été une année de collaborations entre les différents partenaires et de renforcement des liens avec l'InVS. En particulier à travers l'étude de la prévalence du VIH, du VHB et du VHC auprès des homosexuels masculins fréquentant les lieux de rencontre commerciaux parisiens (étude PREVAGAY) et les travaux liés à la surveillance de l'hépatite B au sein du réseau regroupant les pôles de référence et les réseaux de prise en charge des hépatites virales. Cette année a également permis au CNR

localisé à l'hôpital Henri Mondor de poursuivre la mise en place de nouvelles techniques essentielles au développement des activités du CNR. Cette mise en place a été facilitée par les moyens supplémentaires en personnel mis à la disposition du CNR.

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 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.

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**

## **1- STRUCTURE DU CNR**

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

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

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

### **1.1- Personnels dévolus**

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

- Personnel médical :

- . 1 Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 1 Praticien Hospitalier,
- . 1 Assistant Hospitalier Universitaire (en cours de titularisation Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier, avec maintien du poste d'Assistant),

- . 1 Praticien Attaché Consultant (en cours de titularisation Praticien Hospitalier),
- . 0,3 vacataire,
- . 1 Moniteur d'Etudes Biologiques.

- Personnel non médical :

- . 1 ingénieur d'études alloué au 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,
- . 0,40 Praticien Hospitalier,
- . 0,30 Assistant Hospitalier Universitaire,
- . 1,00 Ingénieur d'Etudes,
- . 0,30 Moniteur d'Etudes Biologiques,
- . 2,80 technicien,
- . 0,15 infirmière.

## **1.2- Démarche qualité du CNR**

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

ailleurs, la partie du laboratoire responsable de la qualification virale des dons d'organes, de tissus et de cellules est toujours en cours de certification spécifique.

### **1.3- 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 thermocycler pour PCR en temps réel ABI7300 (Applied Biosystems),
- . 1 automate pour PCR compétitive COBAS AMPLICOR (Roche),
- . 1 thermocycleur à gradient MASTERCYCLE (Eppendorf),

- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 9700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2400 (Applied Biosystems),
- . 2 thermocycleurs ABI GENEAMP 9600 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur UNO II (Biometra).

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

- . 1 automate d'analyse des hybridations inverses AUTOLIPA (Inogenetics),
- . 2 séquenceurs automatiques LONGREAD TOWER (Siemens),
- . 2 séquenceurs automatiques capillaires ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), disponibles 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.

## **2- RESUME DES ACTIVITES DE L'ANNEE**

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

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

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

associées à la chimiothérapie antivirale et l'ensemble des études épidémiologiques, de surveillance et de transmission des virus d'hépatites.

**- Liste des techniques disponibles au laboratoire au 1<sup>er</sup> janvier 2007**

. 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 région codant la protéine de capsid (InnoLipa v2.0),

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

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

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

. Détection des mutations de résistance du VHB associées à la chimiothérapie antivirale par séquençage direct du domaine transcriptase inverse de l'ADN polymérase, hybridation inverse (Ino-LiPA HBV DR) 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 hydrophile majeure (MHR) contenant des déterminants importants de la réponse humorale, appliquée aux études de transmission du VHB et à la recherche de mutants de l'AgHBs non détectés par les tests sérologiques (hépatites B dites "occultes").

**- Techniques implantées au cours de l'année 2007**

- . Mise en place d'une technique de PCR ultra-sensible permettant la détection très précoce des mutants d'échappements à la chimiothérapie antivirale,
- . Mise en place d'une technique de RT-qPCR en temps réel pour la quantification de l'ARN du virus de l'hépatite delta,
- . Optimisation de la méthode de génotypage du VHC par séquençage direct de la région core/E1.

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

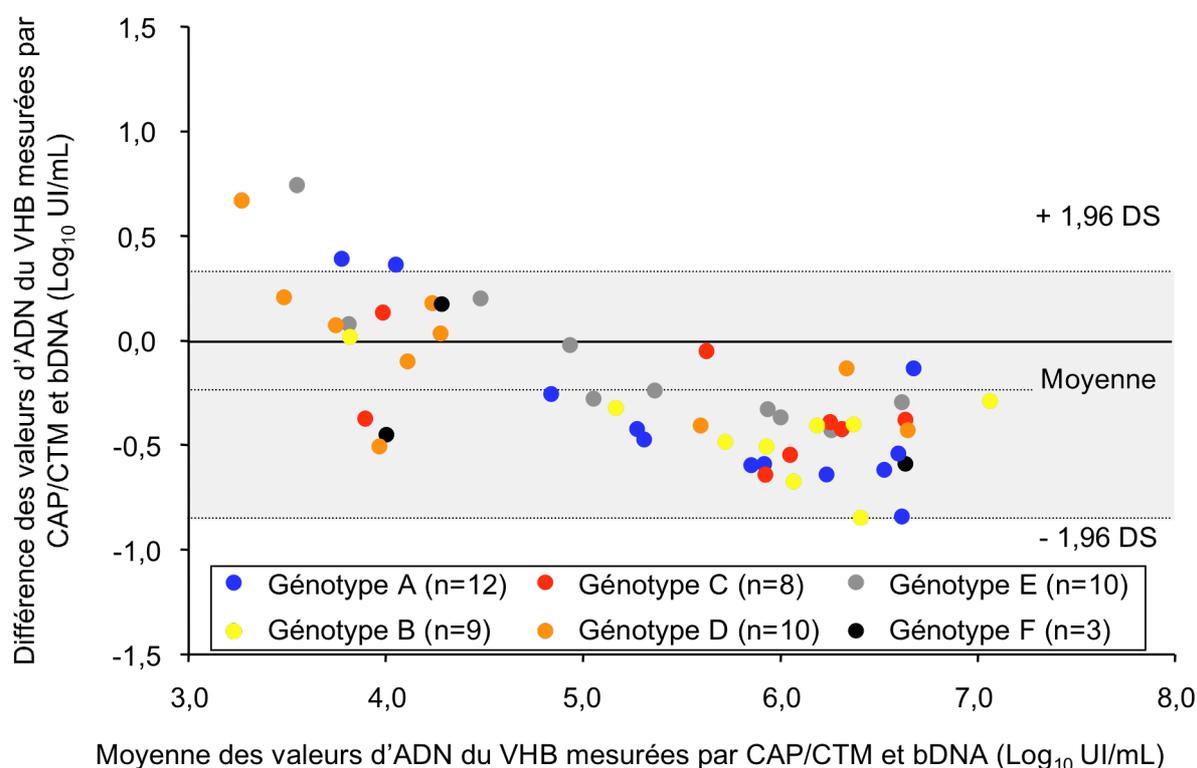
- . Méthode de détection des infections par plusieurs génotypes du VHB par RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*),
- . Développement d'une base de données des mutations de résistance du VHB aux antiviraux.

### **2.2- Activités de développement, de standardisation et d'évaluation des techniques diagnostiques et de typage**

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

Plusieurs évaluations de tests virologiques à visée diagnostique pour le VHB et le VHC ont été réalisées en partenariat avec les industriels qui les développent. Ces évaluations ont concerné les techniques de biologie moléculaire adaptées à la détection et/ou la quantification de l'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 des mutations de résistance après analyse des séquences nucléotidiques. Ces travaux ont donné lieu à des publications acceptées, soumises ou en préparation.

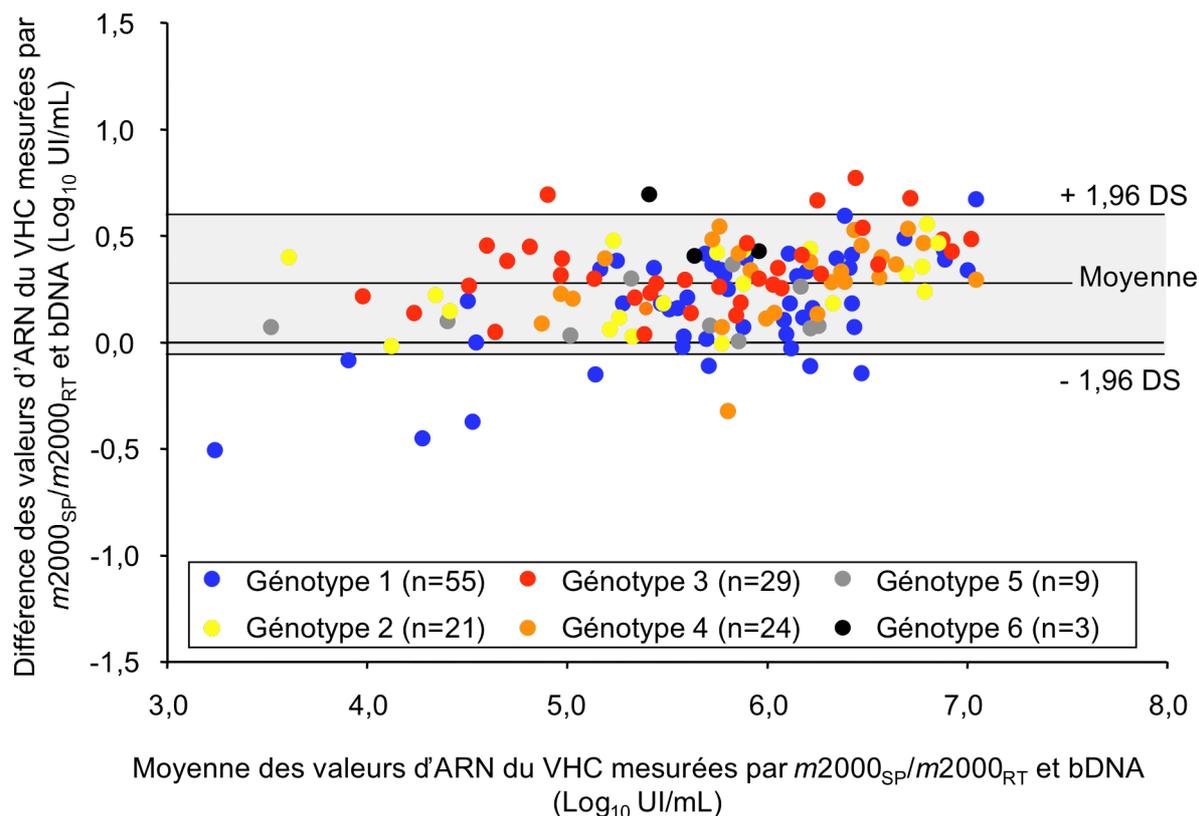
Les performances intrinsèques de la plate-forme de PCR en temps réel Cobas Ampliprep-Cobas TaqMan 48 (CAP/CTM, Roche Molecular Systems) ont été évaluées pour la quantification de l'ADN du VHB dans un contexte de pratique clinique (Figure 1). Les résultats ont montré des performances intrinsèques satisfaisantes en termes de spécificité (100%, intervalle de confiance à 95% : 98,1%-100%), de précision et de reproductibilité, avec respectivement des coefficients de variation de 0,22% à 2,68% et de 1,31% à 4,13%. 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 8,0 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 et thérapeutique (Chevaliez et al., Journal of Clinical Microbiology 2008, sous-pression).



**Figure 1** : Représentation de Bland-Altman des niveaux de l'ADN du VHB mesurés dans 52 échantillons plasmatiques par les plates-formes de PCR en temps réel

CAP/CTM (Roche) en comparaison au bDNA. La zone grise correspond à la moyenne  $\pm$  1,96 DS.

Les performances intrinsèques de la plate-forme de PCR en temps réel *m2000<sub>SP</sub>/m2000<sub>RT</sub>* (Abbott Diagnostics) ont été évaluées pour la quantification de l'ARN du VHC dans un contexte de pratique clinique (Figure 2). La trousse de quantification de l'ARN du VHC a montré une excellente spécificité (100% ; IC95% : 99-100%), précision (coefficients de variation : 0,26% à 3,64%) et reproductibilité (coefficients de variation : 1,98% à 3,61%). L'ARN de 139 sérums de patients infectés par les 6 génotypes du VHC a été quantifié à l'aide de la plate-forme *m2000<sub>SP</sub>/m2000<sub>RT</sub>*, et en parallèle par la méthode des ADN branchés de 3<sup>ème</sup> génération (bDNA, Siemens). Les valeurs de charge virale obtenues avec la plate-forme *m2000<sub>SP</sub>/m2000<sub>RT</sub>* étaient modérément surestimées (médiane de la différence *m2000<sub>SP</sub>/m2000<sub>RT</sub>* moins bDNA : +0,3 Log<sub>10</sub> UI/mL) et ce quels que soient le génotype et la valeur de charge virale considérés. Des dilutions sériées (10 échantillons par génotype de patients infectés par le VHC) ont montré une quantification linéaire de l'ARN du VHC sur la totalité de l'intervalle de quantification et ce, indépendamment du génotype viral (Chevaliez et al., article en préparation).



**Figure 2 :** Représentation de Bland-Altman des niveaux d'ARN du VHC mesurés dans 139 sérums par les plates-formes de PCR en temps réel  $m2000_{SP}/m2000_{RT}$  (Abbott) en comparaison au bDNA. La zone grise correspond à la moyenne  $\pm 1,96$  DS.

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 a concerné la mesure du niveau de l'ARN du VHC dans des échantillons biologiques. 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 une technique de PCR en temps réel utilisant la plate-forme  $m2000_{SP}/m2000_{RT}$  (Abbott). Les résultats de cette étude internationale 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 :

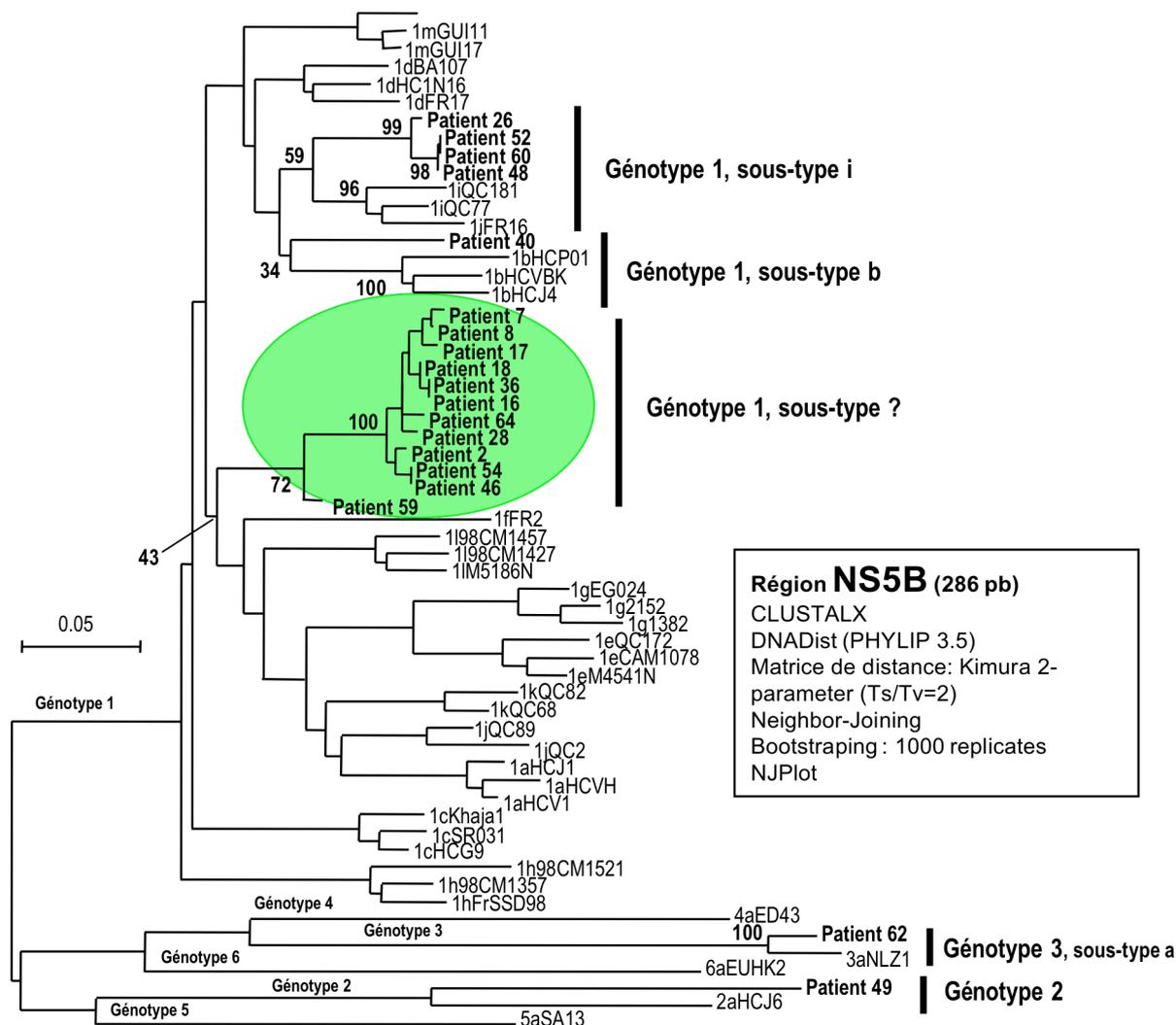
- . Test combinés antigène de capsid du VHC-anticorps anti-VHC (BioRad),
- . Technique d'hybridation inverse pour l'identification des mutants résistants à la lamivudine, à l'adéfovir et à l'entécavir (Innogenetics).

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

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

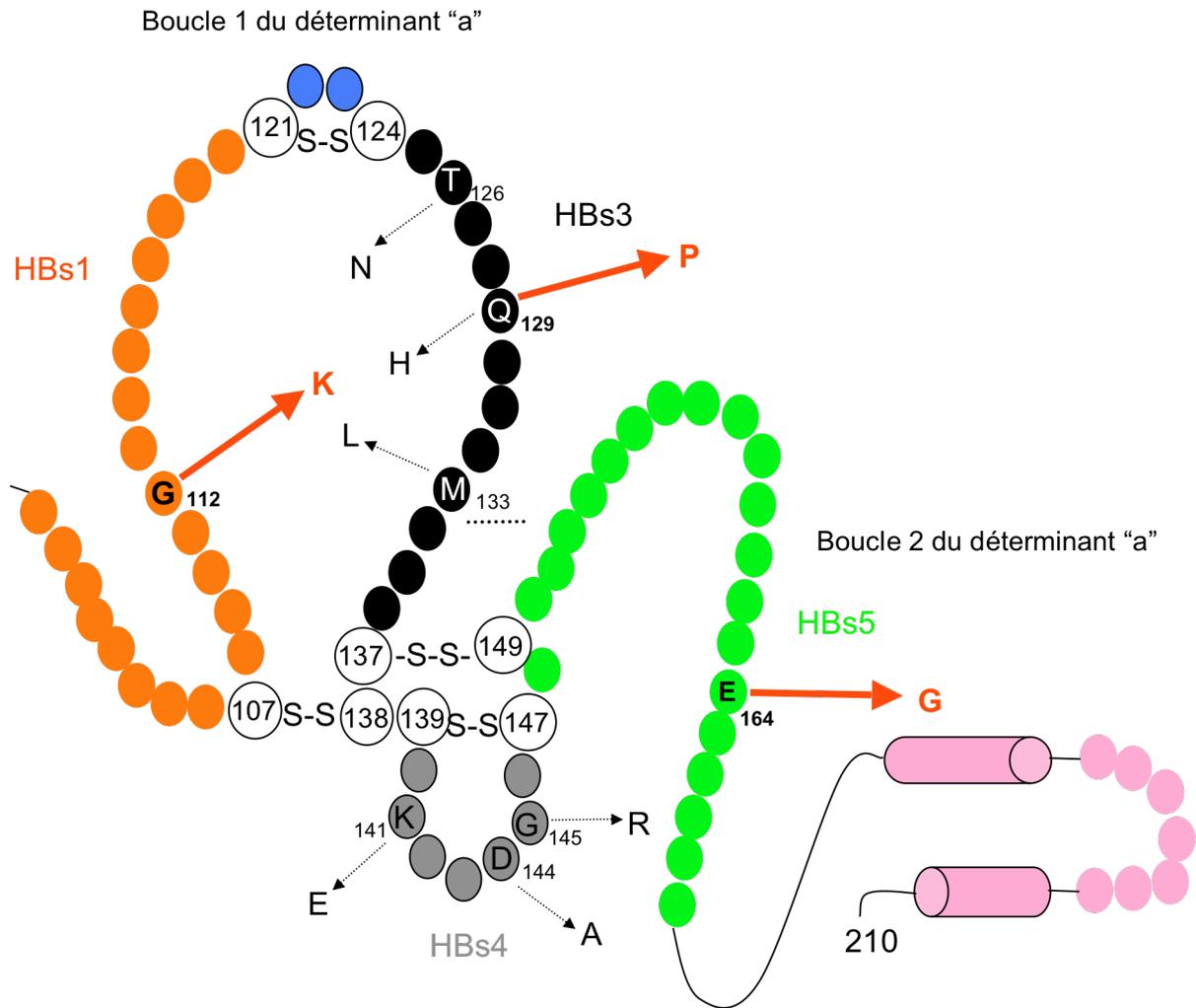
Dans ce cadre, une étude prospective réalisée dans une unité d'hémodialyse au Bénin chez 64 patients hémodialysés a permis de décrire une épidémie par un nouveau sous-type de VHC de génotype 1, point de départ éventuel de la diffusion d'une nouvelle souche virale à partir d'un foyer localisé dans un pays en développement. Les patients suivis en hémodialyse au centre national hospitalier universitaire Hubert Koutoukou Maga de Cotonou au Bénin ont été testés pour la présence d'anticorps anti-VHC et d'ARN du VHC. Dix-neuf patients (29,7%) avaient des anticorps anti-VHC et de l'ARN du VHC. Une analyse génétique et phylogénique des souches de VHC a été conduite. Dix-sept patients étaient infectés par une souche de VHC de génotype 1, un patient par une souche de génotype 2 et le dernier par une souche de génotype 3. Parmi les 17 patients infectés par une souche de VHC de génotype 1, 4 patients (23,5%) étaient infectés par un sous-type 1i, un patient (5,9%) probablement par un sous-type 1b et 12 patients (70,6%) par un sous-type indéterminé. Chez les patients chez qui le sous-type viral n'a pu être identifié, les séquences nucléotidiques des régions non structurale (NS) 5B codant l'ARN polymérase dépendante de l'ARN et core-E1 ont été analysés par différentes techniques de phylogénie (parcimonie et maximum de vraisemblance). Les souches étaient phylogéniquement très proches les unes des autres et formaient un groupe monophylétique avec une forte valeur de ré-échantillonnage, suggérant une transmission nosocomiale de l'infection virale C dans l'unité d'hémodialyse. Les souches étudiées différaient des autres souches de VHC de génotype 1 (sous-type

1a à 1l) par des différences nucléotidiques respectives de 16-26% et 24-33% dans les régions NS5B et core-E1. Ces résultats suggéraient l'existence d'un nouveau sous-type du génotype 1 du VHC, provisoirement désigné comme sous-type 1m. L'analyse de la séquence d'une des souches par séquençage complet de la phase ouverte de lecture a confirmé l'existence de ce nouveau sous-type.



**Figure 3 :** Détermination du génotype du VHC par analyse phylogénique d'une portion de la région NS5B (286 nucléotides). Les chiffres en gras correspondent aux valeurs de ré-échantillonnages après 1000 répliqués.

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 chez plus de 1 600 donneurs de tissus séronégatifs pour le VHB ou ayant un profil vaccinal par la seule présence des anticorps anti-HBs. L'ADN viral a été recherché chez tous ceux qui présentaient un ou plusieurs marqueurs du VHB. Un certain nombre de ces donneurs présentaient un ADN du VHB détectable en l'absence d'antigène HBs (seuil de détection des techniques 0,12 ng/mL à 0,29 ng/mL). 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 préS1-préS2-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. Les mutations de l'antigène HBs et les délétions des régions préS 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, en particulier en positions 112 (G112K), 129 (Q129P) et 164 (E164G) (Figure 4). 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 (Challine et al., *Gastroenterology* 2008, sous presse).



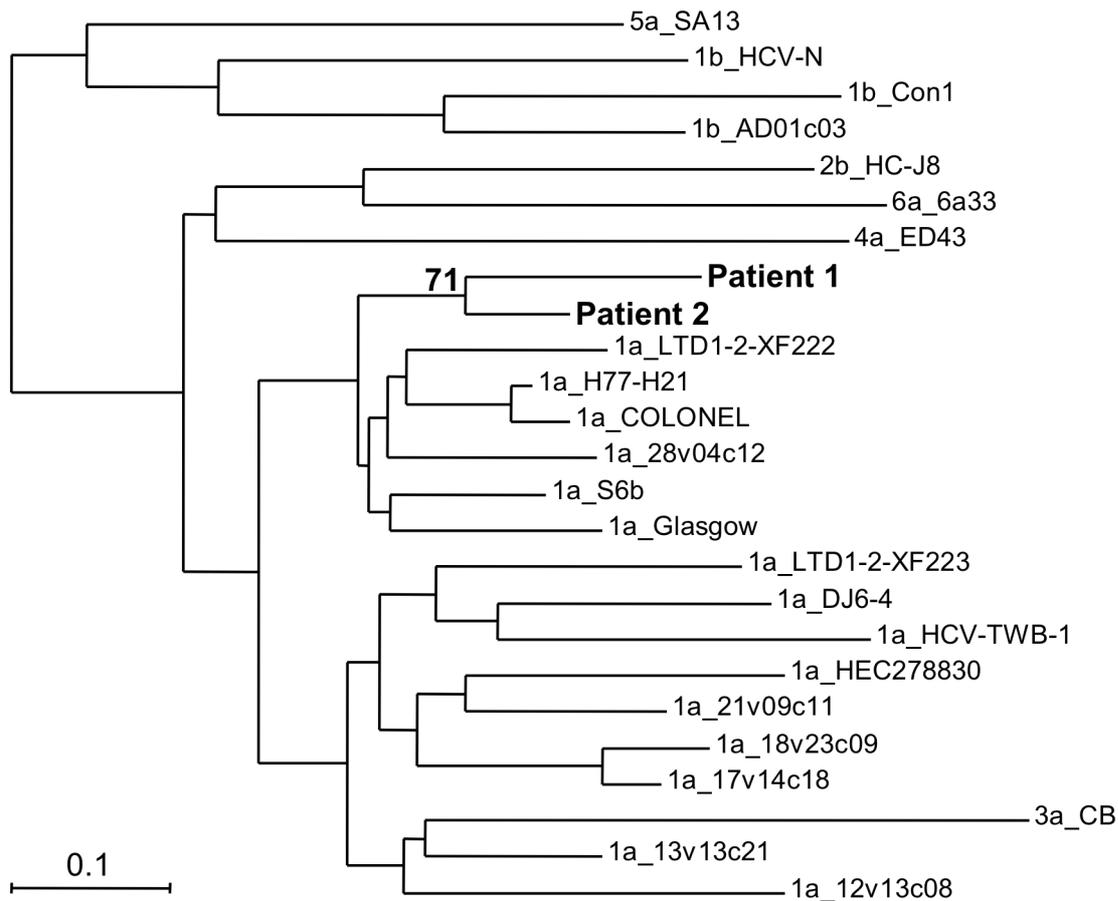
**Figure 4 :** Structure bidimensionnelle de la région hydrophile majeure (MHR) de l'antigène de surface (AgHBs) du VHB (position en acides aminés 99-160). La MHR est formée de 5 domaines antigéniques (HBs1 à 5) représentés par différentes couleurs. Le déterminant « a » est localisé au niveau des acides aminés 124 à 147 et constitue un des sites de neutralisation majeur du VHB. Des substitutions amino-acidiques au niveau des positions 121-124, 126, 129, 133, 141, 144, 145 ont été décrites dans la littérature comme responsables d'échappement à la vaccination, à l'immunoprophylaxie passive ou d'une absence de détection de l'AgHBs par les trousseaux sérologiques commercialisés. Les nouvelles substitutions amino-acidiques identifiées en position 112, 129 et 164 sont indiquées en rouge.

Enfin, en réponse à des demandes spécifiques de laboratoires de biologie, le CNR des hépatites B, C et delta a étudié l'absence de détection de l'antigène HBs et ce malgré une charge virale détectable chez un porteur chronique du VHB. Le cas étudié a permis de mettre en évidence des mutations au niveau du déterminant « a » de la région hydrophile majeure, couramment décrites comme associées à l'absence de détection de l'AgHBs par certaines trousse de sérodiagnostic (P142S et G145R).

#### **2.4- Investigation des cas isolés et groupés de transmission**

L'investigation des cas groupés de transmission du VHB et du VHC ou des cas isolés de transmission nosocomiale de ces virus a 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 un cas de transmission professionnelle d'infection par le VHC dans un supermarché de la région Lilloise, identifié devant l'absence de facteurs de risque autre que le fait que les deux patients travaillaient dans le rayon charcuterie du même supermarché. Le support de la transmission pourrait être la machine de découpe des produits tels que le jambon ou le saucisson. L'analyse génétique et phylogénique de plusieurs régions du génome viral (region HVR1 et les régions codant les protéines E1 et NS5B) de prélèvements issus de ces deux patientes suggèrent fortement qu'elles ont été infectées par la même souche de VHC (Figure 3). Le caractère professionnel de la transmission de l'infection virale C ne peut donc être exclu (Bocket et al., manuscrit en préparation).



**Figure 5 :** Arbre phylogénique construit à partir des séquences codant la région hypervariable 1 (HVR1) de la glycoprotéine d'enveloppe E2, d'une longueur de 81 nucléotides. La construction des arbres phylogéniques a été réalisée par la méthode des plus proches voisins, DNADist-Neighbor, implantée dans le programme PHYLIP v3.5 avec une matrice de distance Kimura 2-parameter et un taux de  $Ts/Tv=2,0$ . Les chiffres en gras correspondent aux valeurs de ré-échantillonnages après 1000 répliquates.

Une étude similaire a été réalisée chez 64 patients suivis dans une unité de dialyse au Centre National Hospitalier Universitaire Hubert Koutoukou 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 (89,5% 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).

Nous avons enfin réalisé une étude de transmission dans le cadre d'une suspicion de contamination nosocomiale par le VHC au cours d'une endoscopie. 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 (551 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 98,8% et 96,7% 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 58 séquences nucléotidiques essentiellement de génotype 1a disponibles dans les banques, montrait que les souches isolées chez les deux patients 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 issues de ces deux patients suggéraient très fortement que l'un des deux malades était la source de contamination de l'autre. Le caractère nosocomial de la contamination au cours du geste invasif de type endoscopie pouvait être suspecté.

## **2.5- Surveillance et caractérisation de la résistance aux antiviraux**

L'échec thérapeutique et la résistance du VHB et du VHC aux molécules anti-virales 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 deuxième année a cependant été consacrée à la poursuite de la mise en place des outils qui devraient permettre le fonctionnement d'une 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 2009, selon le degré d'investissement des partenaires (FNPRRH et ANRS). Cette plate-forme s'appuiera sur un groupe "Résistance des virus d'hépatites

aux antiviraux“, coordonné par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY et le Docteur Stéphane CHEVALIEZ au sein de l'AC11 de l'ANRS, permettant la mise en réseau des laboratoires de virologie français en connexion avec la FNPRRH. Le principe du groupe a été accepté par le Directeur Général de l'ANRS et la mise en place est prévue avant l'été 2008. Les cohortes mises en place par l'ANRS (hépatites B, malades non répondeurs au traitement de l'hépatite C) et les multiples thématiques qui leur seront associées représenteront une source importante d'études scientifiques sur la résistance.

Plusieurs travaux d'investigation ont été réalisés au sein du CNR dans cette thématique.

Le premier portait sur l'étude de l'incidence de la sélection de mutations de résistance au cours du traitement combiné de l'hépatite chronique B par la lamivudine et l'adéfovir. Cinquante patients (74% d'hommes, d'âge moyen  $51 \pm 11$  années) ont été traités par la combinaison de lamivudine,  $100 \text{ mg.jour}^{-1}$ , et d'adéfovir,  $10 \text{ mg.jour}^{-1}$ , pendant une durée moyenne de  $36,4 \pm 17,6$  mois. Un échappement virologique (augmentation de plus de 1 Log de l'ADN du VHB au-dessus du nadir) a été observé chez seulement deux d'entre eux (4%). L'analyse de la séquence amino-acidique a permis d'identifier chez l'un d'entre eux la sélection de variants portant les substitutions amino-acidiques rtM204V+rtL180M+rtA181V. En conclusion, l'utilisation en combinaison de la lamivudine et de l'adéfovir, de novo ou en stratégie "add-on" prévient l'apparition de la résistance à l'une ou l'autre des deux molécules. La substitution amino-acidique en position 181 (rtA181V) confère cependant la résistance aux deux molécules et est responsable d'une faible incidence de résistance du VHB chez des patients recevant la combinaison de lamivudine et d'adéfovir. Ce travail en cours d'extension avec le recrutement de patients provenant de plusieurs services d'hépatologie français.

Dans deux études récentes, nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs spécifiques de la protéase NS3 du VHC, le telaprevir (VX-950, Vertex Pharmaceuticals) et le boceprevir (SCH503034, Schering-Plough) dans des essais cliniques de phase II et avons analysé la fréquence de la sélection de variants résistants à ces molécules. Dans chacune des deux études, 6 patients ayant une hépatite chronique C liée à un virus de génotype 1 et ayant rechuté sous traitement ou après son arrêt ont été étudiés. Chez les 6 malades ayant rechuté sous telaprevir, nous avons identifié de

nouvelles mutations associées à la résistance, inconnues jusqu'alors, qui sont actuellement testées dans nos modèles *in vitro* (système enzymatique acellulaire, réplicon subgénomique. En ce qui concerne le boceprévir, nous avons étudié 6 malades ayant une hépatite chronique C et ayant rechuté sous traitement de 28 ou 48 semaines par l'association d'interféron alpha pégylé, de ribavirine et de boceprévir et avons identifié des mutations décrites dans la littérature comme associées à la résistance.

Au cours de l'année 2007, de nombreuses recherches de mutations de résistance à différentes molécules antivirales utilisées dans le traitement des hépatites B chroniques ont été demandées dans le cadre du diagnostic étiologique de l'échec thérapeutique secondaire. Les échantillons provenaient essentiellement d'hôpitaux de l'AP-HP (Saint Antoine, Bicêtre, Henri Mondor, Pitié-Salpêtrière) et de l'hôpital Intercommunal de Créteil.

### **3- 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 et dont l'échéance du financement initial a été fixée au mois d'octobre 2008. 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)). Un reformatage du réseau est prévu début 2009 et le futur réseau européen ViRgil-HEP, qui prendra la suite des activités du réseau d'excellence européen VirGil, associera les principaux centres cliniques et laboratoires de recherche européens impliqués dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour l'hépatite C et la compréhension des mécanismes moléculaires de l'échec thérapeutiques et de la résistance.

### **4- LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

## PUBLICATIONS INTERNATIONALES

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, Geurjon 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; 46 : 22-31.
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; 46 : 254-265.

12. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13 : 2461-2466.
13. **Chevaliez S, Brillet R, Hézode C, Pawlotsky JM.** Analysis of ribavirin's mutagenic properties in human hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007; 81 : 7732-7741.
14. 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; 46: 22-31.
15. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, **Pawlotsky JM**, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007; 46: 254-265.
16. Griveas I, Germanidis G, Visvardis G, Morice Y, Perelson AS, **Pawlotsky JM**, Papadopoulou D. Acute hepatitis C in patients receiving hemodialysis. *Ren Fail* 2007; 29: 731-6.
17. Pilli M, Zerbini A, Penna A, Orlandini A, Lukasiewicz E, **Pawlotsky JM**, Zeuzem S, Schalm S, von Wagner M, Germanidis G, Lurie Y, Esteban JI, Haagmans BL, Hézode C, Lagging M, Negro F, Homburger Y, Neumann AU, Ferrari C, Missale G. HCV-specific T-cell response in relation to viral kinetics and treatment outcome (DITTO-HCV project). *Gastroenterology* 2007; 133: 1132-1143.
18. Chevaliez S, **Pawlotsky JM.** Interferon-based therapy of hepatitis C. *Adv Drug Delivery Rev* 2007; 59: 1222-1241.
19. Laperche S, Bouchardeau F, Thibault V, Pozzetto B, Vallet S, Rosenberg A, Roque-Afonso AM, Gassin M, Stoll-Keller F, Trimoulet P, Gault E, Chanzy B, Mercier B, Branger M, **Pawlotsky JM**, Henquell C, Lunel F, Gaudy-Graffin C, Alain S, Chaix ML, Duverlie G, Izopet J, Lefrère JJ. Multicenter trials need to use the same assay for hepatitis C virus viral load determination. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3788-3790.
20. Araujo ES, Mendonca JS, Barone AA, Goncales Jr FL, Ferreira MS, Focaccia R, **Pawlotsky JM.** Consensus of the Brazilian Society of Infectious Diseases on the management and treatment of hepatitis C. *Braz J Infect Dis* 2007 ; 11 : 446-450.
21. Chevaliez S, **Pawlotsky JM.** Practical use of hepatitis C virus kinetics monitoring in the treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2007; 14 (Suppl. 1): 77-81.
22. **Pawlotsky JM.** Diagnosis and management of hepatitis B virus resistance to antiviral drugs. *Curr Hepat Reports* 2007; 6: 154-160.
23. Araujo ES, Mendonca JS, Barone AA, Goncales Jr FL, Ferreira MS, Focaccia R, **Pawlotsky JM.** Consensus of the Brazilian Society of Infectious Diseases on the management and treatment of hepatitis C. *Braz J Infect Dis* 2007 ; 11 (suppl. 1) : 1-5.
24. Araujo ES, Barone AA, **Pawlotsky JM.** Therapeutic perspectives for hepatitis C. *Braz J Infect Dis* 2007; 11 (suppl. 1): 73-78.
25. **Pawlotsky JM.** Diagnosis and management of hepatitis B virus resistance to antiviral drugs. *Curr Hepat B Reports* 2007; 1: 30-36.

26. **Pawlotsky JM**, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, Locarnini S, Martin P, Richman DD, Zoulim F. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology* 2008; 134: 405-415.
27. Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, Medkour F, **Pawlotsky JM**, Lotersztajn S, Mallat A. Daily cannabis use, a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008; 134: 432-439.
28. Smyk-Pearson S, Tester IA, Klarquist J, Palmer BE, **Pawlotsky JM**, Golden-Mason L, Rosen HR. Spontaneous recovery in acute human HCV infection: functional T cell thresholds and relative importance of CD4 help. *J Virol* 2008; 82: 1827-1837.
29. Keeffe EB, Dieterich DT, **Pawlotsky JM**, Benhamou Y. Chronic hepatitis B: preventing, detecting and managing viral resistance. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 268-274.
30. **Chevaliez S**, Bouvier-Alias M, **Laperche S**, **Pawlotsky JM**. Performance of the Cobas Ampliprep/Cobas Taqman (CAP/CTM) real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B virus DNA quantification. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1716-1723.
31. Westin J, Ydreborg M, Islam S, Alsio A, Dhillon AP, **Pawlotsky JM**, Zeuzem S, Schalm SW, Ferrari C, Neumann AU, Hellstrand K, Lagging M. A non-invasive fibrosis score predicts treatment outcome in chronic hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 2008 ; in press.
32. Piodi A, Chouteau P, Lerat H, Hézode C, **Pawlotsky JM**. Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. *Hepatology* 2008; in press.
33. Pugnale P, Herrmann E, Neumann AU, **Pawlotsky JM**, Schalm SW, Ferrari C, Homburger Y, Zeuzem S, Negro F. Hepatitis C viral kinetics in plasma and peripheral blood mononuclear cells during pegylated interferon-alpha2a/ribavirin therapy. *J Hepatol* 2008; in press.
34. Ward CL, Dev A, Rigby S, Symonds WT, Patel K, Zekry A, **Pawlotsky JM**, McHutchison JG. Interferon and ribavirin therapy does not select for resistance mutations in hepatitis C virus polymerase. *J Viral Hepat* 2008; in press.
35. Challine D, **Chevaliez S**, **Pawlotsky JM**. Hepatitis B virus (HBV) replication in organ, tissue and cell donors with and without HBV serological markers. *Gastroenterology* 2008; in press.
36. **Pawlotsky JM**. Building a liver disease policy in the European Union. *J Hepatol* 2008; in press.

## PUBLICATIONS NATIONALES

### 2007

1. Marcellin P, Bourlière M, **Pawlotsky JM**, Ouzan D. Patients VHC non répondeurs: définition de la non-réponse et stratégie thérapeutique. *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: S13-S19.

### 2008

2. **Pawlotsky JM.** Les techniques virologiques de diagnostic et de suivi de l'hépatite B. *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: S56-S63.

## ARTICLES A CARACTERE DIDACTIQUE

### I- REVUES NON FRANCOPHONES

**2007**

1. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** Diagnostic tools in hepatitis B. *Hot Topics in Viral Hepatitis* 2007; 4: 7-14.
2. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** The value of real-time polymerase chain reaction quantification in the diagnosis and management of chronic hepatitis B and C. *European Gastroenterology Review* 2007: 29-30.

## CHAPITRES DE LIVRES

### I- LIVRES INTERNATIONAUX

**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.
2. **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.
3. **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** Advances in molecular diagnosis of hepatitis B and C. In: *Nuevas fronteras in Gastroenterologia, Hepatologia y Endoscopia Gastrointestinal*. Valdovinos Diaz MA, Valdovinos Andraca F, Castro Narro C, Uribe Esquivel M, eds. Elsevier, Masson Doyma Mexico, Mexico (Mexique), 2007: 231-243.
4. **Pawlotsky JM.** New therapies for hepatitis C. In: *Nuevas fronteras in Gastroenterologia, Hepatologia y Endoscopia Gastrointestinal*. Valdovinos Diaz MA, Valdovinos Andraca F, Castro Narro C, Uribe Esquivel M, eds. Elsevier, Masson Doyma Mexico, Mexico (Mexique), 2007: 295-303.
5. **Pawlotsky JM.** The future in the treatment of hepatitis C. In: *Chronic hepatitis: metabolic cholestatic, viral and autoimmune*. Diehl AM, Hayashi N, Manns MP, Sauerbruch T, eds. Springer, Dordrecht (The Netherlands), 2007: 101-109.

## 2008

6. **Pawlotsky JM**. Hepatitis virus resistance. In: Antimicrobial resistance and implications for the 21<sup>st</sup> century. Fong IW, Drlica K, eds. Springer Science, New York (USA), 2008: 291-323.

## COMMUNICATIONS ORALES

## I- INTERNATIONALES

## 2007

1. Simister PC, Brillet R, **Pawlotsky JM**, Bressanelli S. Structural and genetic variability of the RNA-dependent RNA polymerase, NS5B, from hepatitis C virus (HCV). 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona (Espagne), 11-15 avril 2007 (Abstract : J Hepatol 2007 ; 46 (suppl.1): S30).
2. Pallier C, Rodriguez C, Brillet R, Hézode C, **Pawlotsky JM**. Complex dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir dipivoxil. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona (Espagne), 11-15 avril 2007 (Abstract : J Hepatol 2007 ; 46 (suppl.1): S26).
3. Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, **Pawlotsky JM**, Lotersztajn S, Mallat A. Cannabis use as an independent predictor of severe steatosis during chronic hepatitis C. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona (Espagne), 11-15 avril 2007 (Abstract : J Hepatol 2007 ; 46 (suppl.1): S10).
4. Lerat H, Foufelle F, **Pawlotsky JM**. Mechanisms of hepatitis C virus (HCV)-induced hepatic steatosis in transgenic mice. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona (Espagne), 11-15 avril 2007 (Abstract : J Hepatol 2007 ; 46 (suppl.1): S9).

## 2008

57. Dusheiko GM, Hézode C, Pol S, Goeser T, Bronowicki JP, Bourliere M, Buggisch P, Serfaty L, Berg T, Couzigou P, Benhamou Y, Forestier N, Bengtsson L, Gharakanian S, Kauffman R, Alam J, Ferenci P, **Pawlotsky JM**, Zeuzem S. Treatment of chronic hepatitis C with telaprevir (TVR) in combination with peginterferon alfa-2a with or without ribavirin: further interim analysis results of the PROVE2 study. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Milan (Italy), 23-27 avril 2008 (abstract: J Hepatol 2008; 48 (suppl. 2): S26).
58. Lerat H, Carmouse S, Pellerin M, Zucman-Rossi J, **Pawlotsky JM**. Functional compartmentalization of HCV NS5A variants within the tumoral and non-tumoral tissue from

patients with hepatocellular carcinoma. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Milan (Italy), 23-27 avril 2008 (abstract: J Hepatol 2008; 48 (suppl. 2): S34).

## I- NATIONALES

### 2007

7. **Chevaliez S**, Challine, Brillet R, **Pawlotsky JM**. Mutants de l'antigène HBs et détection du virus de l'hépatite B chez les donneurs d'organes, de tissus et de cellules. 31<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Pathologie Digestive, Lyon, 17-21 mars 2007.
8. **Chevaliez S**, Brillet R, Bouvier-Alias M, Vanderdenet C, **Pawlotsky JM**. Intérêt de l'analyse de séquence de la capsid pour discriminer les sous-types du génotype 1 du virus de l'hépatite C. 9<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris, 26-27 avril 2007 (Abstract : Virologie 2007; 11 : O22).
9. **Chevaliez S**, Girou E, Challine D, Thiessart, Morice Y, Lesprit P, Tkoub-Scheirlinck L, Soing-Altrach S, Cizeau F, Cavin C, André M, Lang P, **Pawlotsky JM**. Transmission du virus de l'hépatite C à partir de surface d'environnement en hémodialyse. 9<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris, 26-27 avril 2007 (Abstract : Virologie 2007; 11 : O61).
10. Lerat H, Foufelle F, **Pawlotsky JM**. Mécanismes de la stéatose induite par le virus de l'hépatite C (VHC) dans un modèle de souris transgénique. 9<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris, 26-27 avril 2007 (Abstract : Virologie 2007; 11 : O4).
11. Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, Medkour F, **Pawlotsky JM**, Lotersztajn S, Mallat A. Consommation quotidienne de cannabis : un nouveau facteur de risque de sévérité de la stéatose chez les malades atteints d'hépatite chronique C. 61<sup>èmes</sup> Journées de l'Association Française pour l'Etude du Foie, Grenoble, 26-29 septembre 2007.
12. Audard V, **Chevaliez S**, Alory Y, Matignon M, Lang P, Grimbert P. Rôle du BK virus dans la survenue des cancers du tractus urinaire après transplantation rénale. 7<sup>e</sup> Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation, Lyon, 5-8 décembre 2007.

### 2008

13. Lerat H, Carmouse S, Pellerin M, Zucman-Rossi J, **Pawlotsky JM**. Compartimentation fonctionnelle des variants de la protéine NS5A du virus de l'hépatite C dans le tissu tumoral et non tumoral de patients atteints de carcinome hépatocellulaire. Journées Annuelles du Réseau National Hépatites de l'ANRS, Paris, 24-25 janvier 2008.
14. Ahmed-Belkacem A, Brillet R, Pallier C, **Pawlotsky JM**. Une nouvelle classe d'inhibiteurs de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN du virus de l'hépatite C. Journées Annuelles du Réseau National Hépatites de l'ANRS, Paris, 24-25 janvier 2008.

15. Chevaliez S, Brillet R, Sehounou J, Barbotte L, **Pawlotsky JM**. Epidémie par un nouveau sous-type de virus de l'hépatite C (sous-type 1m) dans une unité d'hémodialyse. 10<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris, 27-28 mars 2008 (Abstract : Virologie 2008 ; 12 : S39).
16. Ahmed-Belkacem A, Brillet R, Pallier C, **Pawlotsky JM**. Une nouvelle classe d'inhibiteurs de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN du virus de l'hépatite C. 10<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris, 27-28 mars 2008 (Abstract : Virologie 2008 ; 12 : S42).

## CONFERENCES SUR INVITATIONS

### I- INTERNATIONALES

#### 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.
10. **Pawlotsky JM**. "New antiviral compounds in development and role of peginterferons in combination with new antivirals". Pegasys Global Advisory Board Meeting, Luzern (Suisse), 15-16 juin 2007.
11. **Pawlotsky JM**. "Update on new HCV therapies". 5<sup>th</sup> Annual Clinical Care Options for Hepatitis Symposium, Santa Barbara (USA), 21-24 juin 2007.

12. **Pawlotsky JM.** "Treatment optimization: the role of molecular testing for response-guided therapy". Post-Graduate Course "New Frontiers in Gastroenterology, Hepatology and Gastrointestinal Endoscopy", Mexico (Mexique), 5-7 juin 2007.
13. **Pawlotsky JM.** "New Therapies for hepatitis C". Post-Graduate Course "New Frontiers in Gastroenterology, Hepatology and Gastrointestinal Endoscopy", Mexico (Mexique), 5-7 juin 2007.
14. **Pawlotsky JM.** "Advances in molecular diagnosis of hepatitis B and C". Post-Graduate Course "New Frontiers in Gastroenterology, Hepatology and Gastrointestinal Endoscopy", Mexico (Mexique), 5-7 juin 2007.
15. **Pawlotsky JM.** "Hepatitis C therapy : today and tomorrow's advances and challenges". 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow (UK), 9-13 septembre 2007.
16. **Pawlotsky JM.** "HCV variability and biology/treatment differences". 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow (UK), 9-13 septembre 2007.
17. **Pawlotsky JM.** "Hepatitis C : the need for European action". World Hepatitis Day Workshop, European Parliament, Brussels (Belgium), 1<sup>er</sup> octobre 2007.
18. **Pawlotsky JM.** "Complex management issues in patients with hepatitis and HIV". 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Infectious Disease Society of America (IDSA), San Diego (USA), 4-7 octobre 2007.
19. **Pawlotsky JM.** "Antiviral drug resistance (HCV)". 15<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week (UEGW), Paris (France), 27-31 octobre 2007.
20. **Pawlotsky JM.** "New anti-HCV drug targets". Early Morning Workshop, 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, Massachusetts (USA), 2-6 novembre 2007.
21. **Pawlotsky JM.** "Guidelines for the treatment of hepatitis B and C (non-thalassemia)". Consensus Meeting on Viral Hepatitis of the Thalassemia International Federation (TIF), Nicosia (Cyprus), 14 novembre 2007.
22. **Pawlotsky JM.** "New roads to success: recent developments in HCV therapy". Roche Hepatitis PI Meeting, Marrakech (Morocco), 29-30 novembre 2007.
23. **Pawlotsky JM.** "New perspectives in hepatitis C virus therapy". 20<sup>th</sup> Course on Hepatobiliary Diseases, Coimbra (Portugal), 1<sup>er</sup> décembre 2007.
24. **Pawlotsky JM.** "Epidemiology, natural history and treatment of hepatitis B and C". Viral Hepatitis Seminar, Central Hospital, Maputo (Mozambique).
25. **Pawlotsky JM.** "Virological monitoring of HCV therapy: tools and practical use". Turkish National Virology Congress, Uludag (Turkey), 10-15 décembre 2007.
26. **Chevaliez S.** "Intérêts des méthodes moléculaires pour le diagnostic et le suivi des infections virales". Hôpital Central de Maputo, Mozambique, 6 décembre 2007

27. **Pawlotsky JM.** "Building a liver disease policy in the European Union". 15<sup>th</sup> Annual Viral Hepatitis B and C Meeting, Athens (Greece), 26-27 janvier 2007.
28. **Pawlotsky JM.** "Long-term/indefinite maintenance of the virological response by NUC monotherapy without development of HBV resistance: a realistic goal in HBeAg-negative patients or only a wishful thinking ?". 15<sup>th</sup> Annual Viral Hepatitis B and C Meeting, Athens (Greece), 26-27 janvier 2007.
29. **Pawlotsky JM.** "New antiviral options in hepatitis C". 11<sup>th</sup> International Symposium "Current Topics in Infectious Diseases", Grindelwald (Switzerland), 27 janvier-1er février 2008.
30. **Pawlotsky JM.** "HBV and HCV are not HIV". European Association for the Study of the Liver (EASL)-American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)-Asian-Pacific Association for the Study of Liver Diseases (APASL)-Latin-American Association for the Study of the Liver (ALEH)-International Association for the Study of the Liver (IASL) Special Conference on Hepatitis B and C Virus Resistance to Antiviral Therapies, Paris (France), 14-16 février 2008.
31. **Pawlotsky JM.** "HCV summary". European Association for the Study of the Liver (EASL)-American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)-Asian-Pacific Association for the Study of Liver Diseases (APASL)-Latin-American Association for the Study of the Liver (ALEH)-International Association for the Study of the Liver (IASL) Special Conference on Hepatitis B and C Virus Resistance to Antiviral Therapies, Paris (France), 14-16 février 2008.
32. **Pawlotsky JM.** "Specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C". 11<sup>th</sup> Interdisciplinary Winter Meeting, Obergugl (Austria), 1-6 mars 2008.
33. **Pawlotsky JM.** "Diagnosis of HBV infection: a matter of sensitivity ?". Workshop "Occult hepatitis B virus infection: biology and clinical impact", Taormina (Italy), 7-8 mars 2008.
34. **Pawlotsky JM.** "HCV response to interferon: response-guided algorithm of therapy". Symposium "Mystery of immune control of chronic viral hepatitis", Hepatology Today Congress, Moscow (Russia), 17 mars 2008.
35. **Pawlotsky JM.** "Antiviral drug resistance and its prevention in chronic hepatitis B". Bristol-Myers Squibb Chinese Infectology Symposium, Seoul (Korea), 22 mars 2008.
36. **Pawlotsky JM.** "New HCV therapy in the pipeline". 18<sup>th</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Seoul (Korea), 23-26 mars 2008.
37. **Pawlotsky JM.** "Present and future of HCV therapy". Annual Meeting of the Portuguese Association for the Study of the Liver (APEF), Cascais (Portugal), 3-5 avril 2008.
38. **Pawlotsky JM.** "Entecavir in the treatment of chronic hepatitis B". Symposium Bristol-Myers Squibb, Annual Meeting of the Portuguese Association for the Study of the Liver (APEF), Cascais (Portugal), 3-5 avril 2008.
39. **Pawlotsky JM.** "HCV resistance to antivirals: mechanisms and clinical implications". ViRgil-EASL Joint Workshop, 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan (Italy), 23-27 avril 2008.
40. **Pawlotsky JM.** "Summary of EASL activities". 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan (Italy), 23-27 avril 2008.

41. **Pawlotsky JM.** "Targets for HCV therapy". 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan (Italy), 23-27 avril 2008.
42. **Chevaliez S.** "Baraclude Faculty Masterclass". Hôtel Schératon, Aéroport Charles de Gaulle, Paris, France, 1-2 février 2008.
43. **Chevaliez S.** "Intérêts de la quantification du VHC en pratique clinique". Madrid, Espagne, 28 février 2008.
44. **Chevaliez S.** "Qu'est-ce que la PCR en temps réel change dans la prise en charge des hépatites virales". Early Morning Workshop, 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Milan, Italie, 26 avril 2008.

## II- NATIONALES

### 2007

1. **Chevaliez S.** "PCR du VHC en temps réel : intérêt et limites". 12<sup>e</sup> réunion d'hépatologie de l'hôpital Saint Philibert, Lille, 17 novembre 2007.
2. **Pawlotsky JM.** "Nouveaux traitements de l'hépatite C", Journée d'Hépatologie de l'hôpital Beaujon, Paris, 13 janvier 2007.
3. **Pawlotsky JM.** "Traitement de l'hépatite C: la révolution tranquille". Conférence Plénière, Journées Francophones de Pathologie Digestive, Lyon, 17-20 mars 2007.
4. **Pawlotsky JM.** "Perspectives thérapeutiques et résistance du virus de l'hépatite C". Journées Annuelles de l'Association Française pour l'Etude du Foie, Grenoble, 26-28 septembre 2007.
5. **Pawlotsky JM.** "Résistances: hier, aujourd'hui, demain". Journées Bristol-Myers Squibb, Cannes, 23-24 novembre 2007.
6. **Pawlotsky JM.** "Modèles d'infection par le VHC". Journée National du Groupe d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP), Paris, 29 novembre 2007.

### 2008

1. **Pawlotsky JM.** "Hépatite C: quelles nouvelles molécules pour demain ?". Journées Roche "Hépatites virales", Paris, 1er-2 février 2008.
2. **Pawlotsky JM.** "Les hépatites en Europe: état des lieux", Colloque "Hépatites Virales", Sénat (Palais du Luxembourg), Paris, 27 mars 2008.

## **5- PROGRAMME D'ACTIVITE 2009-2010**

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).

4- La mise en place du groupe "Résistance des virus d'hépatites aux antiviraux" au sein de l'AC11 de l'ANRS et la mise en place d'un observatoire 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**

**Rapport d'activité 2007**  
**CNR Hépatites B, C et Delta**  
**Laboratoire associé pour les hépatites B, C et Delta en transfusion sanguine**  
**Institut National de la Transfusion Sanguine**

**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,
- 7 techniciens de laboratoires,
- 1 assistant ingénieur
- 2 ingénieurs de recherche,
- 1 secrétaire,
- 1 chef d'unité médecin biologiste responsable du laboratoire.

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

- 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 Caisse Nationale d'Assurance Maladie.

**Les activités du laboratoire ont reçu l'accréditation du COFRAC selon la norme ISO-CEI 17025 sous le numéro 1-1950 à compter du 1<sup>er</sup> janvier 2008.**

Les locaux abritant le plateau technique de Virologie ont bénéficié d'une rénovation en 2000 ayant impliqué une restructuration totale des laboratoires. Ces travaux ont été dictés par les exigences de mise en conformité pour un fonctionnement compatible avec des activités de référence. La surface des locaux comprenant les laboratoires, les zones de stockage ambiant et froid et les bureaux est de 314 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 dédiés, incubateurs, laveurs de microplaques, spectrophotomètres,
- de l'analyse moléculaire : plateau d'analyse moléculaire des acides nucléiques comprenant des thermocycleurs, une plateforme de séquençage, des automates de PCR en temps réel (Cobas Taq Man et Lightcycler), plateau de clonage.

#### Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles :

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

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

Pour le VHB :

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

Pour le VHC :

Nous disposons de divers panels d'échantillons plasmatiques

Ceux-ci comprennent principalement :

- 70 séroconversions documentées et pour lesquelles il existe des prélèvements séquentiels.

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

Stockage en enceintes à  $-20^{\circ}\text{C}$  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 (G-MED).

En 2007, deux dossiers ont été expertisés pour le G-MED : 1 réactif de mesure de l'ADN du VHB, un réactif de dosage de l'AgHBs.

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<sup>TM</sup> 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). Ce réactif est désormais utilisé en routine dans notre laboratoire en substitution de la version précédente.

Dans le cadre d'études de collaboration entre les différentes unités du CNR, nous avons participé grâce à notre sérothèque, à une étude visant à évaluer les performances du réactif de mesure de la charge virale du VHB par PCR en temps réel automatisée, Cobas Ampliprep/Cobas Taq Man (Roche Diagnostics). Le détail des résultats de cette étude à paraître en 2008 (Chevaliez et al J.Clin.Microbiol 2008 in press), sera détaillé dans le compte rendu du CNR coordonateur. Brièvement, cette étude a montré que ce réactif était sensible, spécifique et reproductible dans les résultats fournis, quelque soit le génotype même si une légère sous estimation des charges virales supérieure à 4.5 log UI/ml par rapport au réactif b DNA était noté sans toutefois générer d'impact clinique majeur. Les performances constatées en font un excellent outil, notamment pour le management des patients traités pour une infection chronique à VHB.

Les hépatites B occultes sont définies par la présence d'ADN du VHB dans le sang ou le foie en l'absence d'AgHBs. La prévalence de ces infections B occultes est variable et dépend d'une part 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.

A l'heure où la mise en place du dépistage génomique du VHB est évoquée, la redéfinition de la place de chacun des marqueurs faisant partie du panel des tests de dépistage obligatoires paraît légitime. 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 et des pays 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 population 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 ». Afin de déterminer la prévalence des hépatites B occultes dans la population des donneurs de sang en France, la détection de l'ADN VHB (Cobas TaqMan Roche) a été réalisée sur 2 populations de donneurs de sang franciliens incluant 248 sujets négatifs pour tous les marqueurs viraux VHB (population contrôle) et de 1000 sujets Ag HBs négatifs, mais positifs pour l'anti-HBc (et/ou l'anti-HBe et/ou l'anti HBs). L'ADN VHB n'a été détecté dans aucun des spécimens négatifs pour tous les marqueurs viraux. Parmi les 1000 spécimens Ag HBs négatif, l'ADN VHB a été détecté à un taux faible (<6 à 10 UI/mL) chez 31 (3.1%) des sujets lors du screening. Seul 4 (0.4%) spécimens ont présenté des résultats répétables. La prévalence des infections occultes VHB chez les donneurs de sang en France se situe donc entre 0.4% (résultats positifs répétables) et 3.1% (résultats positifs initiaux). Le dépistage des anti-HBc obligatoire en France, contrairement à d'autres pays, permet de s'affranchir du risque potentiel de transmission du VHB par des donneurs qui se trouveraient dans cette situation clinique (manuscrit en cours de rédaction).

## **Les contrôles de qualité**

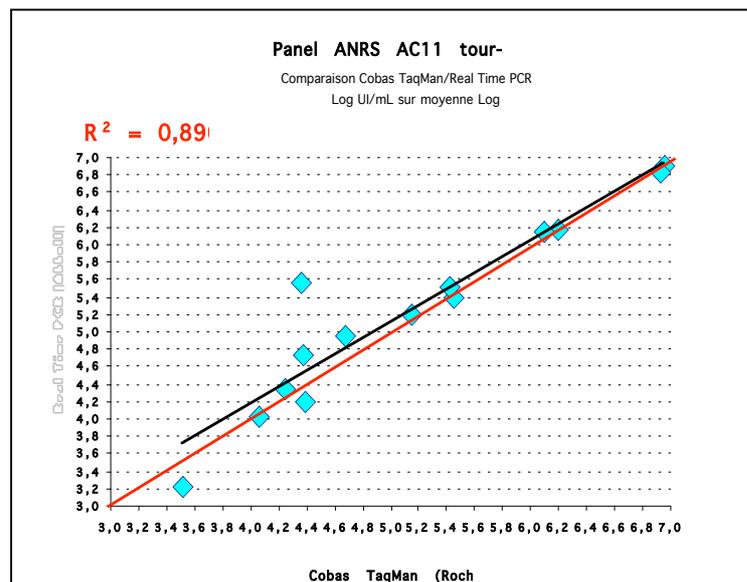
Divers panels d'échantillons contenant du VHC ont été préparés dans le cadre de contrôles de qualité organisés par l'Agence nationale de recherche sur le SIDA et les Hépatites virales (ANRS). Nous avons coordonné deux études successives destinées à valider l'expertise des laboratoires appelés à collaborer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

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

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

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

**Figure 1 : Comparaison entre Cobas Taq Man et Real Time PCR pour la quantification de l'ARN du VHC. Le point « aberrant » correspond à un génotype 4h**



## Les enquêtes de transmission

La démarche biologique adoptée pour les enquêtes de transmission horizontale est la suivante : la première étape consiste à déterminer le statut sérologique VHB des sujets notamment pour documenter l'infection aiguë chez le sujet nouvellement infecté. L'analyse moléculaire est réalisée dans un second temps à l'aide d'une PCR maison couvrant la région hydrophile majeure de la protéine d'enveloppe « S » (région amplifiée : nucléotide 99 à 568). La transmission est écartée si le génotype est différent ou si les séquences ne sont pas liées sur l'arbre phylogénétique. En revanche si le génotype est identique et que les souches sont proches phylogénétiquement, la poursuite des investigations moléculaires est réalisée. En pratique courante, l'analyse par PCR du génome complet est à privilégier quoique complexe à mettre en oeuvre. En cas d'échec, l'analyse d'une seconde région plus variable (région partielle du gène Core, région amplifiée : nucléotide 60 à 557) est contributive. Après séquençage direct, la phylogénie est réalisée grâce à un alignement avec plusieurs séquences disponibles dans Genbank et représentatives de chacun des génotypes. Des banques spécifiques par exemple de souches retrouvées dans la région où se fait l'enquête peuvent être contributives.

Nous avons procédé à la comparaison phylogénétique de souches du VHB impliquant 2 couples

d'individus dans une suspicion de transmission dans une unité d'hémodialyse (enquête n°1) et dans une transmission transfusionnelle (enquête n°2).

Enquête n°1 :

La transmission évoquée a eu lieu dans un centre d'hémodialyse entre un patient chroniquement infecté et un autre patient de l'unité partageant la même pièce.

L'analyse du gène « S » des 2 souches a permis d'identifier des souches de génotype D avec une homologie de 100%. Une autre souche (Y) de notre banque, sans aucun lien épidémiologique apparent, était identique aux 2 autres. L'analyse du génome complet du virus a montré que sur 3100 pb les souches des 2 patients présentaient une homologie de 100% alors que la souche Y avait 9 mutations en nucléotides dont 8 étaient non synonymes. Un contrôle effectué trois mois plus tard confirmait l'identité parfaite des souches des 2 patients sur les régions partielles « S » et « C ».

Enquête n°2 :

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

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

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

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

Parallèlement à cette veille épidémiologique descriptive, est menée une surveillance virologique plus spécifique. Elle a pour objectif de mieux caractériser le profil biologique des donneurs confirmés positifs pour les virus VHB et VHC et d'assurer une veille de la diversité virale des souches circulant dans la population des donneurs de sang. Cette surveillance est réalisée en prospectif depuis 2000 à partir d'un échantillon de chaque don confirmé positif. 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 différentes institutions de la transfusion, en fonction des éléments scientifiques et épidémiologiques les plus récents et des nouvelles techniques disponibles. Les informations sont fournies par les correspondants d'hémovigilance, en relation avec les responsables des plateaux de qualification virologique des dons de l'EFS et concernent les dons homologues et autologues.

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

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

(ii) les estimations des durées respectives des fenêtres silencieuses publiées dans la littérature: 56 jours (25-109) pour l'Ag HBs, 66 jours pour les anticorps anti-VHC et 10 jours avec le DGV-VHC.

Pour le VHB, le calcul est assujéti à un ajustement de manière à prendre en compte le caractère transitoire de l'Ag HBs sur lequel est fondée l'estimation du risque résiduel. 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)

(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 (Laperche et al J Viral Hepatitis, 2001) basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux de spécificité restreinte. La sensibilité de cette méthode obtenue par l'analyse de dilutions successives d'échantillons de différents sous-types a été estimée entre 10 et 1000 ng/ml d'Ag HBs.

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

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

### **La surveillance virologique du VHC comprend :**

1) La recherche de l'**ARN plasmatique** pratiquée sur les dons anti-VHC positifs collectés entre le 1<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 exhaustifs obtenus depuis le début de la mise en place de la surveillance virologique jusqu'à la fin de l'année 2006. L'année 2007 n'a pu être prise en compte que partiellement 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 : 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

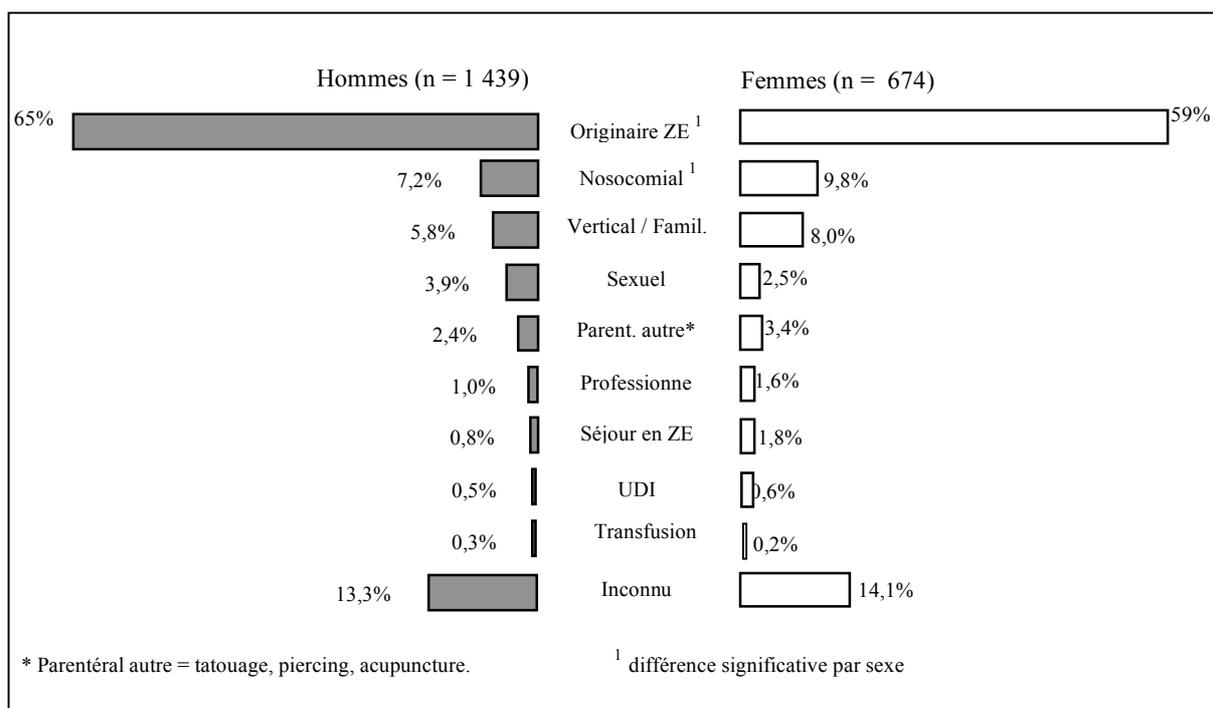
une pratique de plus en plus fréquente de la vaccination. Depuis 1998, le taux d'incidence chez les donneurs connus semble s'être stabilisé.

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

Comme le montre la figure 2, qui fait état des facteurs de risque (hiérarchisés en fonction de leur probabilité de survenue) retrouvés chez 2113 (61%) des 3446 nouveaux donneurs positifs pour l'Ag HBs, prélevés en France métropolitaine entre 1998 et 2006, 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 1998-2006 (n=45), le risque sexuel se retrouve au premier plan. Il convient de souligner, que chez 13,5% des nouveaux donneurs et dans 32% des cas chez les donneurs connus, le facteur de risque n'a pas été identifié.

**Figure 21 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs Ag HBs positifs en France métropolitaine entre 1998 et 2006 (n=2113).**



### 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 2007 :

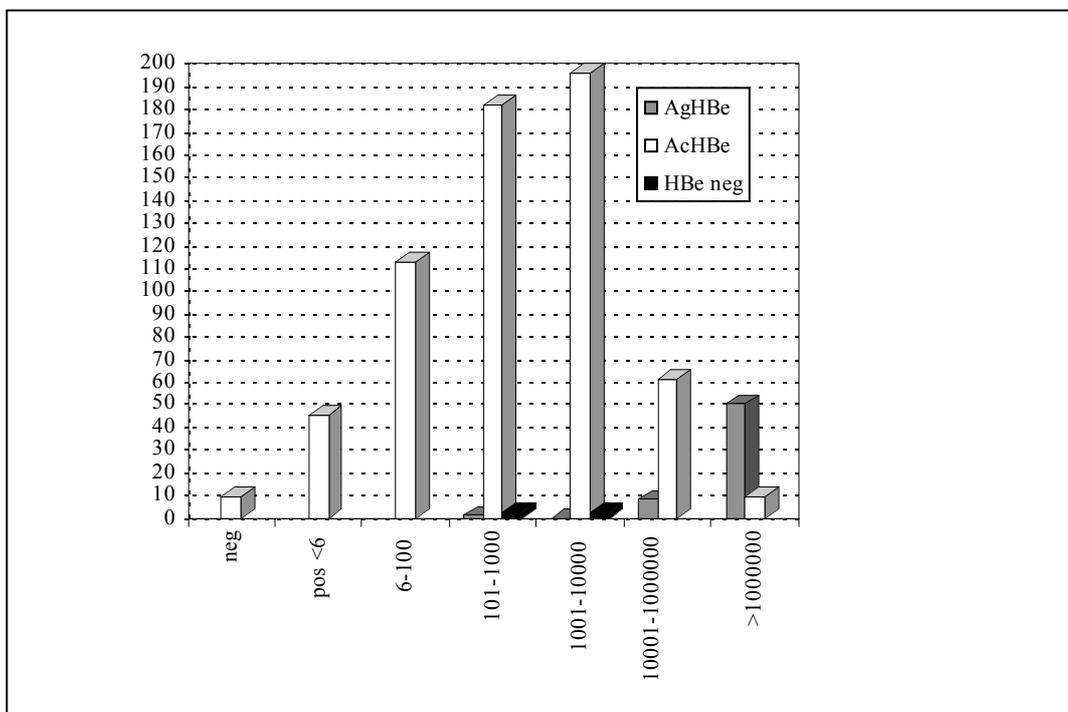
**Tableau 2 : Evolution des titres de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1998 et 2007 (résultats partiels pour 2007)**

Ag HBs (ng/ml)	1998		1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
< 0,25	2	0,6	0	0,0	1	0,3	0	0,0	4	1,2	0	0	2	0,5	3	1	1	0,3	2	1,1	15	0,5%
0,25-50	16	4,8	27	8,7	19	5,9	19	5,6	11	3,3	17	5,0	33	9,0	19	6,3	18	6,3	9	5,1	188	6,0%
50 - 3 990	101	30,3	71	23,0	89	27,5	83	24,6	69	20,4	70	20,7	64	17,6	52	17,2	58	20,3	37	21,0	694	22,1%
4 10 <sup>3</sup> – 10 <sup>5</sup>	179	53,8	177	57,3	164	50,6	185	54,7	198	58,6	186	55,0	187	51,2	173	57,1	147	51,4	81	46,0	1677	53,5%
1,5 10 <sup>5</sup> – 7,5 10 <sup>5</sup>	30	9,0	30	9,7	44	13,6	44	13,0	53	15,7	80	23,7	70	19,2	54	17,8	54	18,9	41	23,3	500	15,9%
> 7,5 10 <sup>5</sup>	5	1,5	4	1,3	8	2,5	7	2,1	3	0,9	10	3,0	9	2,5	2	0,7	8	2,8	6	3,4	62	2,0%
Total testés	333	100	309	100	325	100	338	100	338	100	363	100	365	100	303	100	286	100	176	100	3136	100,0%

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 87,9% (3176/3613) 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 6 UI/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 98,5% des dons Ac HBe positifs).. Par ailleurs, comme le montre la figure 3, les dons Ag HBe positifs présentent des charges virales plus élevées. Ces observations sont concordantes avec une étude que nous avons menée 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 3 : 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 3031 donneurs trouvés Ag HBs positifs entre 1999 et 2006, 2567 (84.7%) ont bénéficié d'un **sous-typage de l'Ag HBs** et 86,6% d'entre eux (n = 2222) ont pu être entièrement typés. Les 13,4% n'ayant pas pu être entièrement sous typés correspondaient dans la majorité des cas à des échantillons présentant des titres d'AgHBs inférieurs au seuil de détection de la technique.

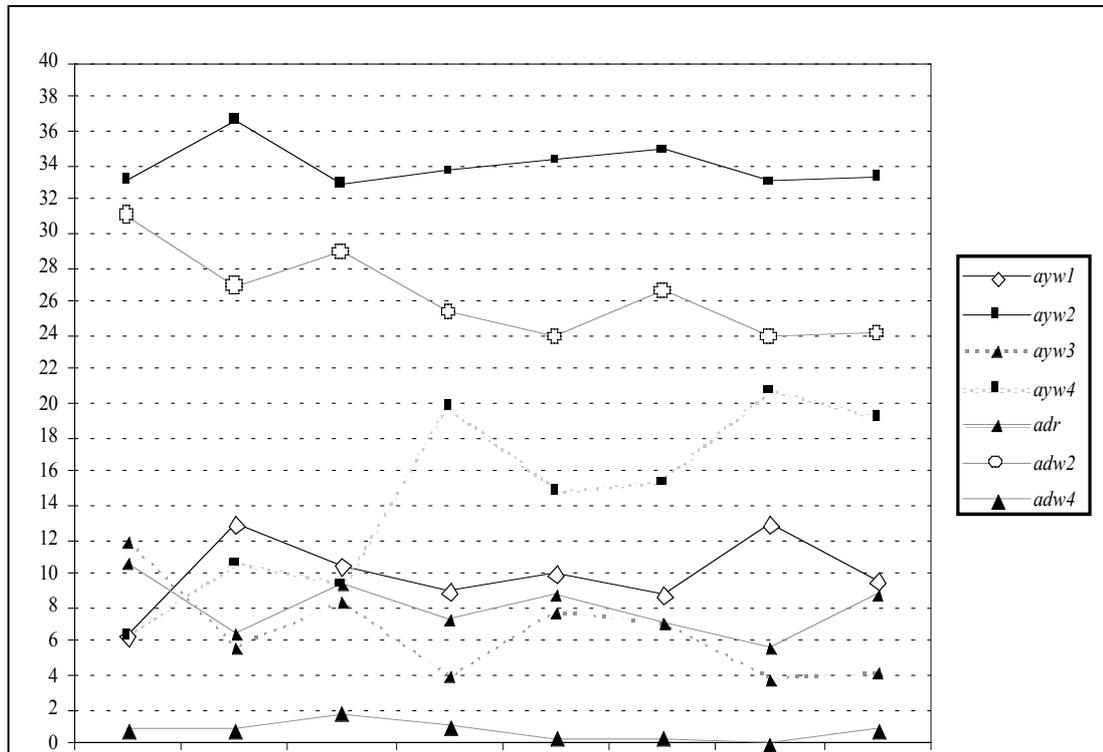
Le tableau 3 et la figure 4 montrent l'évolution de la répartition des différents sous-types de l'Ag HBs de 1999 à 2006.

Sur l'ensemble de la période 1999-2006, le sous-type *ayw2* (correspondant au génotype D, fortement prévalent dans le bassin-méditerranéen) était le plus fréquent (34,0%), suivi du sous-type *adw2* (génotype A ou B, majoritaire en Europe occidentale) (26,3 %). Les sous-types *ayw1* (génotype A (Afrique) ou B (Asie)), *ayw4* (génotype E originaire d'Afrique subsaharienne) et *adr* (génotype C, asiatique) étaient en proportions équivalentes, autour de 10 %, Toutefois, une dynamique des sous types a pu être observée au cours du temps comme montré dans la figure 3 puisque l'on note une diminution significative ( $p=0.04$ ) des souches *adw2* (maximum 31.1% en 1999, minimum 23.9% en 2003) et *ayw3* ( $p=0.002$ ) (maximum 11.8% en 1999, minimum 3.8% en 2005) et une augmentation des *ayw4* ( $p<10^{-4}$ ) (minimum 6.3% en 1999, maximum 20.8% en 2005). Depuis 2002 une relative stabilisation des proportions est observée.

**Tableau 3 : Répartition des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1998 et 2006 en France métropolitaine.**

Sous- types	1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>ayw1</i>	16	6,3	34	12,9	29	10,5	27	8,9	31	10,0	27	8,6	34	12,9	23	9,6	<b>221</b>	<b>9,8</b>
<i>ayw2</i>	84	33,1	97	36,7	91	32,9	102	33,7	106	34,3	109	34,9	87	33	80	33,5	<b>756</b>	<b>33,1</b>
<i>ayw3</i>	30	11,8	15	5,7	23	8,3	12	4,0	24	7,8	22	7,1	10	3,8	10	4,2	<b>146</b>	<b>7,4</b>
<i>ayw4</i>	16	6,3	28	10,6	23	8,3	60	19,8	46	14,9	48	15,4	55	20,8	46	19,2	<b>322</b>	<b>14,2</b>
<i>adr</i>	27	10,6	17	6,4	26	9,4	22	7,3	27	8,7	22	7,1	15	5,7	20	8,4	<b>176</b>	<b>8,2</b>
<i>adw2</i>	79	31,1	71	26,9	80	28,9	77	25,4	74	23,9	83	26,6	63	23,8	58	24,3	<b>585</b>	<b>27,3</b>
<i>adw4</i>	2	0,8	2	0,8	5	1,8	3	1,0	1	0,3	1	0,3	0	0	2	0,8	<b>16</b>	<b>0,7</b>
	<b>254</b>	100,0	<b>264</b>	100,0	<b>277</b>	100,0	<b>303</b>	100,0	<b>309</b>	100,0	<b>312</b>	100,0	<b>264</b>	100,0	<b>239</b>	100	<b>2222</b>	<b>100</b>
N analysés	300		314		327		334		362		365		305		277		2584	
N non typables	46 (15,3%)		50 (16,5%)		50 (15,3%)		31 (9,3%)		53 (14,6%)		53 (14,5%)		41 (13,4%)		38 (13,7%)		362 (14,40)	

**Figure 4 : Evolution de la part relative (en %) des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2006 en France métropolitaine.**



La tableau 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 (40,8%), le sous-type ayw2 avec le bassin Méditerranéen (51,1%), les sous-types ayw3 et adw2 avec l'Europe (67,0% et 66,0%, respectivement), le sous-type ayw4 avec l'Afrique sub-saharienne (79,6%) et du sous-type adr avec l'Asie (63,0%).

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

Origine géographique	ayw1		ayw2		ayw3		ayw4		adr		adw2		adw4		Total sous typés		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Europe <sup>1</sup>	36	19.0	207	34.8	75	<b>67.0</b>	40	14.1	38	26.0	324	<b>66.0</b>	7	<b>53.8</b>	727	39.7	
Bassin Méditerranéen	11	5.8	304	<b>51.1</b>	16	14.3	4	1.4	0	0	34	6.9	0	0	369	20.2	
Afrique Saharienne	Sub	77	<b>40.8</b>	37	6.2	8	7.1	226	<b>79.6</b>	1	0.7	38	7.7	0	0	387	21.1
Asie		49	25.9	10	1.7	3	2.7	1	0.3	92	<b>63.0</b>	38	7.7	0	0	193	10.6
Autre		16	8.5	37	6.2	10	8.9	13	4.6	15	10.3	57	11.7	6	46.2	154	8.4
Sous total		189	100	595	100	112	100	284	100	146	100	491	100	13	100	1830	100
Ethnie inconnue		32 (14.5%)		161 (21.4%)		34 (23.3%)		38 (11.8%)		30 (17.0%)		94 (16.1%)		3 (18.8%)		392 (17.6%)	
Total		221 (9.9%)		756 (34.0%)		146 (6.6%)		322 (14.5%)		176 (8.0%)		585 (26.3%)		16 (0.7%)		2222 (100%)	

<sup>1</sup> Bassin Méditerranéen exclu

**L'analyse moléculaire** a été réalisée sur 581 dons Ag HBs positifs collectés en 2005 et 2006. Parmi ces 581 dons, 91 (15.7%) n'étaient pas génotypables en raison principalement de chromatogrammes de séquençage ne permettant pas de conclure de façon formelle sur la séquence obtenue (doubles populations par exemple). La répartition des génotypes est donnée dans le tableau 5 ainsi que leur correspondance avec les sous-types. On note une prévalence plus élevée de génotype D (41,4%), suivie des génotypes A (27,6%) et E (18,5%) puis des génotypes B (6,2%) et C (6,6%).

Des 91 échantillons non génotypables 59 (64.8%) ont été sérotypés. Des 581 échantillons ayant bénéficié d'un sérotypage, 77 (13.3%) n'ont pas pu être caractérisés. Parmi eux, 53 (68.8%) ont été caractérisés par génotypage. Sur un total de 599 échantillons étudiés, seuls 32 (5.3%) n'ont pas pu être caractérisés, ni par sérotypage ni par séquençage montrant ici la complémentarité des deux méthodes notamment pour les charges virales faibles qui ne peuvent très souvent bénéficier d'une analyse de séquence. Des 427 échantillons qui ont été à la fois sous typés et génotypés 8 (1.9%) présentaient des résultats discordants en prenant en compte la classification admise (Norder et al J Gen Virol 2004) : 7 ayw2 étaient classés génotype A (n=1), génotype C (n=1) et génotype E (n=5); 1 adw2 a été classé génotype E.

A noter qu'aucune de ces 2 méthodes n'est en mesure d'identifier les infections multiples puisque seule la souche majoritairement présente sera mise en évidence.

Par ailleurs, des mutations du gène S codant pour l'enveloppe virale décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination ou aux immunoglobulines ont été retrouvées pour 26 échantillons (5.3%). 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.

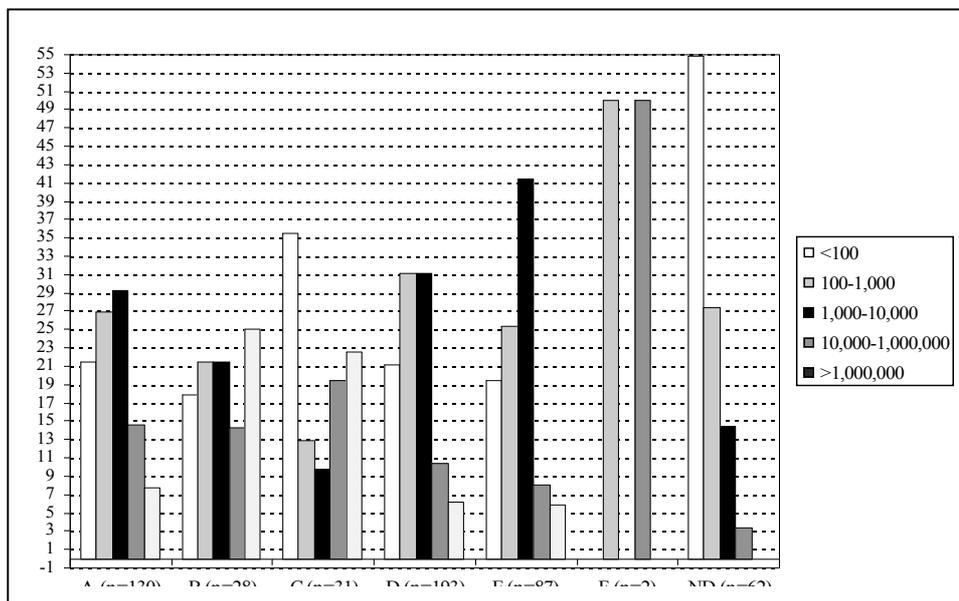
**Tableau 5 : Répartition des génotypes du VHB chez les donneurs de sang en 2005 et 2006 et relation avec le sous-type**

Génotype	Sous type	ayw1	ayw2	ayw3	ayw4	adw2	adw4	adr	Non typable	Non testés	TOTAL	
A		26 (60.5%)	<b>1 (0.7%)</b>			95 (91.4%)			9	4	135	27.6%
B		17 (39.5%)				8 (13%)			5		30	6.2%
C			<b>1 (0.7%)</b>					28 (100%)	2	1	32	6.6%
D			142 (95.3%)	17 (100%)	3 (3.5%)				35	4	201	41.4%
E			<b>5 (3.3%)</b>		81 (96.4%)	<b>1 (9.6%)</b>			2	1	90	18.5%
F							2 (100%)				2	0.4%
Total genotypés		0	149	16	0	104	2	28	53	10	491	100%
Non typables		12	13	2	13	15		4	24	8	91	
Non testés		2	5	1	4	2		4			18	
TOTAL		14	167	20	101	121	2	36	77	18	599	

En gras les discordances de classification entre génotypes et sérotypes

La figure 5 fait état de la relation entre charge virale et génotype sur 533 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 (54,5%, 60.0% et 64,4% respectivement). Toutefois, des charges virales plus élevées a été observée chez les donneurs contaminés par le génotype B (moyenne 4,21 log UI/ml) et C (moyenne 3,79 log UI/ml) contre une moyenne générale de 2.9 log UI/ml (différence statistiquement significative). 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 533 donneurs de sang en 2005 et 2006.**



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

**Tableau 6 : Prévalence des anticorps anti-Delta chez les donneurs de sang Ag HBs positifs de 1997 à 2007 (résultats partiels pour 2007)**

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Total
n testés	246	326	282	305	318	336	359	350	294	274	21	3111
Positifs	3	3	4	1	4	4	4	4	3	4	0	34
%	1,22	0,92	1,42	0,33	1,26	1,19	1,11	1,14	1,04	1,4	0	1,09

Parmi les donneurs Ag HBs positifs 1,09 % 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%).

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

## 2.2 Le VHC

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

Le tableau 7 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 7 : Taux des 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>(2)</sup>	4,95	17	0,08	205	0,80

<sup>(1)</sup> dont 2 Ac nég DGV pos

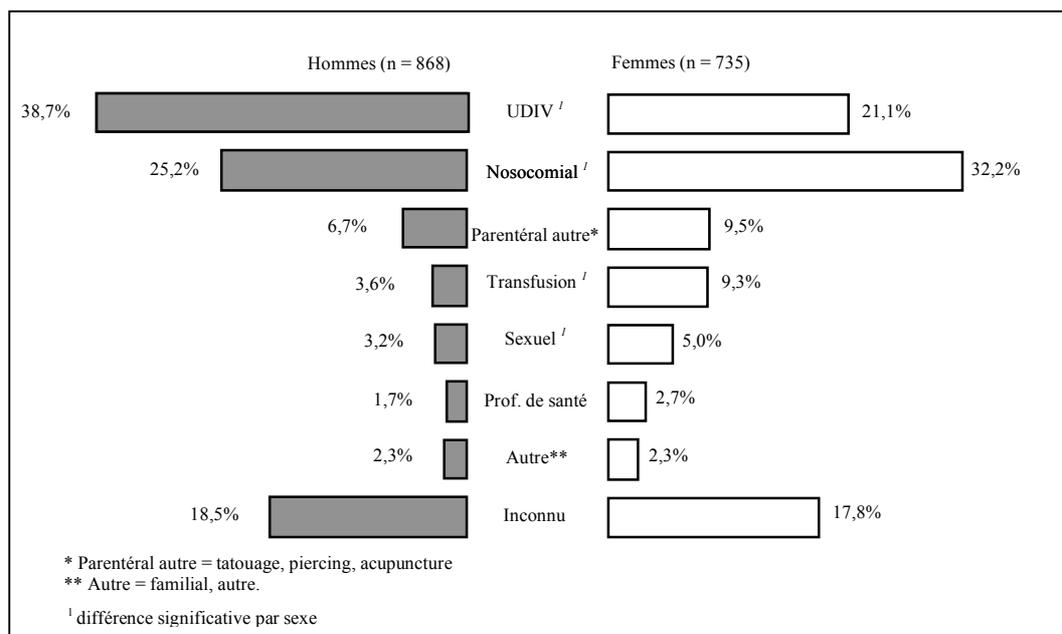
<sup>(2)</sup> dont 1 Ac nég DGV pos

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% (1603) des 2863 nouveaux donneurs VHC positifs entre 1998 et 2006 (figure 6) , montrent que près de 20% n'ont aucun facteur de risque identifié, et que la toxicomanie (38,7% chez les hommes et 21 % chez les femmes) et les expositions nosocomiales (25,2% chez les hommes et 33.2% chez les femmes) restent au premier plan des modes de contaminations potentiels retrouvés chez ces sujets. Par contre (résultats non montrés), chez les 165 donneurs connus ayant présenté une séroconversion documentée et interrogés sur leur facteur de risque (soit 72% des 228 de cette catégorie entre 1994 et 2006), la toxicomanie par voie IV représente le facteur de risque le plus fréquemment identifié chez les hommes (24%) alors que pour les femmes il s'agit d'un partenaire connu pour être HCV positif (23%). 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 1998-2006 (n = 1 603.)**



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

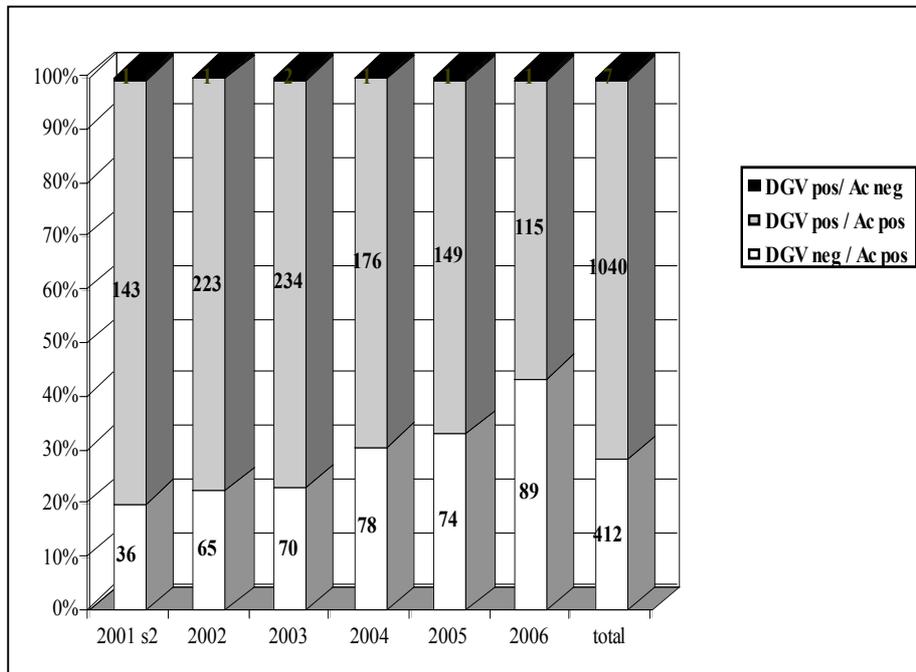
Sur la période 2000-2006, le laboratoire a reçu 1517 échantillons de donneurs VHC positifs, ce qui représente 75% des 2018 donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 7 ans.

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 8, la proportion de dons VHC positifs virémiques est en moyenne de 75.6 % avec toutefois une tendance à la baisse de cette catégorie (figure 7). Aucune différence dans les caractéristiques démographiques et épidémiologiques entre le groupe des donneurs virémiques et celui des non virémiques n'a pu être mise en évidence pour expliquer ce phénomène.

**Tableau 8 : 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		2006		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ac +/ARN+	205	81	89	85	143	79,4	223	77,2	234	76,5	176	69,0	149	66,5	115	56,1	1334	73,4
Ac+/ARN -	48	19	16	15	36	20,0	65	22,5	70	22,9	78	30,6	74	33	89	43,4	476	26,2
Ac -/ARN +	0		0		1	0,6	1	0,3	2	0,6	1	0,4	1	0,5	1	0,5	7	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>205</b>		<b>1817</b>	

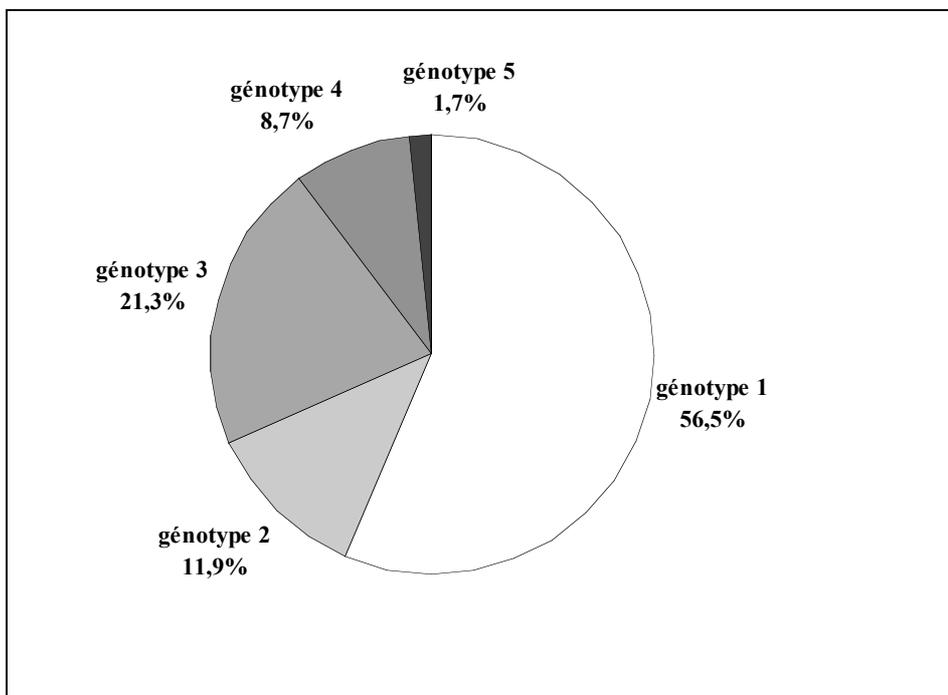
**Figure 7 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2001 (semestre 2 : début du DGV) et 2006 en fonction de la virémie.**



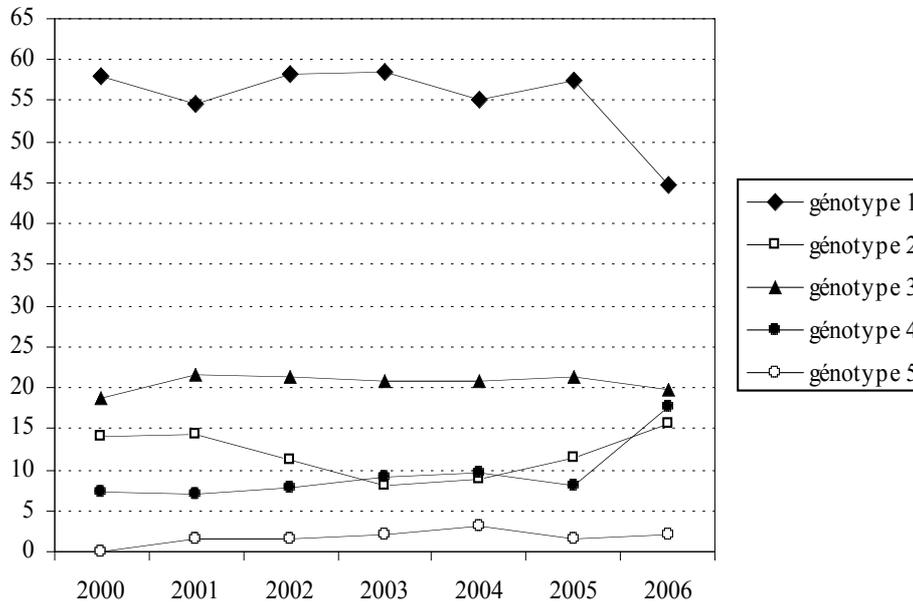
Sur les 2018 donneurs trouvés VHC positifs entre 2000 et 2006, 60,0 % (n = 1212) ont bénéficié d'une détermination du génotype. La figure 8 montre la répartition des génotypes sur l'ensemble de la période, et la figure 9 l'évolution des génotypes dans le temps.

Sur la période 2000-2006, le génotype le plus fréquent est le génotype 1 (56,5 %), suivi par le génotype 3 (21,3 %), le génotype 2 (11,9 %) et le génotype 4 (8,7 %). Cette répartition est relativement stable au cours des 5 premières années d'étude (pas de différence significative). Toutefois, en 2006 une augmentation des génotypes 4, avec une baisse des génotypes 1 ont été observées. Cette évolution nécessite une confirmation avant analyse.

**Figure 8 : Répartition des génotypes du VHC chez 1212 donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2006.**



**Figure 9 : Evolution de la répartition (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2006.**



L'analyse moléculaire par séquençage de 750 souches (433 génotypes 1, 103 génotypes 2, 124 génotypes 3, 77 génotypes 4, 13 génotypes 5) collectées durant cette même période rend compte d'une grande variabilité des sous-types, comme le montre le tableau 9.

Parmi les 750 donneurs infectés par le génotype 1, 53,8% sont de sous-type 1b et 45,7% de sous-type 1a. L'analyse des 103 souches de génotype 2 montre une très grande variabilité de ce génotype avec toutefois plus d'un quart des souches appartenant au sous type 2a. Les génotypes 3 et 5 sont très homogènes : 100% des souches sont de sous type 3a et 5a respectivement. Enfin, le génotype 4 est aussi très variable en dehors des sous types 4a et 4d, qui représentent respectivement 41,6% et 42,9% des souches de ce génotype.

**Tableau 9: Répartition des génotypes et des sous-types du VHC sur 750 souches étudiées par analyse moléculaire.**

	1 *	1a	1b	2 *	2a	2b	2c	2i	2k	2l	3a	4 *	4a	4d	4f	4h	4r	5a
n	2	198	233	15	28	13	15	14	9	9	124	7	32	33	2	2	1	13
% du sous type dans le génotype	0,5	45,7	53,8	14,6	27,2	12,6	14,6	13,6	8,7	8,7	100	9,1	41,6	42,9	2,6	2,6	1,3	100

\* sous type non déterminé

La relation entre les génotypes et les facteurs de risque retrouvés chez les donneurs VHC positifs entre 2000 et 2006 est exposée dans le tableau 10. Les facteurs de risque ont été hiérarchisés en fonction de la probabilité d'occurrence la plus élevée. Cette hiérarchisation, adoptée au sein du comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang » chez les sujets présentant plus d'un facteur de risque, est par ordre de fréquence décroissante : usage de drogue par voie intraveineuse, antécédents de transfusion avant 1991, exposition nosocomiale, expositions parentérales autres (tatouage, piercing, acupuncture), sexuel, autre (familial, professionnel).

Cette analyse montre que génotypes et facteurs de risques sont significativement liés ( $p < 10^{-4}$ ). Chez les donneurs ayant un génotype 1a ou 3a, une proportion plus élevée (47,6 % et 47,1 % respectivement) ont été contaminés par toxicomanie intraveineuse comparativement aux autres génotypes. Chez les donneurs avec un génotype 1b ou 2, une proportion plus élevée (47,1 % et 45,3 % respectivement) ont été contaminés par voie nosocomiale, comparativement aux autres génotypes.

**Tableau 10: Répartition des facteurs de risque du VHC (hiérarchisés) chez les donneurs de sang en fonction du génotype sur la période 2000-2006.**

	1a		1b		1		2		3a		4		5		total	
Nbre de donneurs VHC génotypés	325		332		28		144		258		105		20		1212	
Donneurs non revus en consultation	117	36,0%	128	38,6%	12	42,9%	38	26,4%	101	39,1%	50	47,6%	9	45,0%	455	37,5%
Donneurs interrogés sur le facteur de risque	208	64,0%	204	61,4%	16	57,1%	106	73,6%	157	60,9%	55	52,4%	11	55,0%	757	62,5%
<b>Facteur de risque</b>																
UDIV	99	<b>46,6%</b>	23	11,3%	3	18,8%	17	16,0%	74	<b>47,1%</b>	22	40,0%	0	0,0%	238	<b>31,4%</b>
Antécédents de transfusion	5	2,4%	19	9,3%	1	6,3%	15	14,2%	6	3,8%	1	1,8%	2	18,2%	49	6,5%
Nosocomial	53	25,5%	96	<b>47,1%</b>	4	25,0%	48	<b>45,3%</b>	28	17,8%	17	30,9%	9	81,8%	255	<b>33,7%</b>
Expositions parentérales autres *	15	7,2%	23	11,3%	1	6,3%	5	4,7%	19	12,1%	7	12,7%	0	0,0%	70	9,2%
Sexuel	15	7,2%	7	3,4%	1	6,3%	5	4,7%	15	9,6%	4	7,3%	0	0,0%	47	6,2%
Autre (familial, professionnel,...)	2	1,0%	5	2,5%	0	0,0%	2	1,9%	6	3,8%	1	1,8%	0	0,0%	16	2,1%
Risque non retrouvé	19	9,1%	31	15,2%	6	37,5%	14	13,2%	9	5,7%	3	5,5%	0	0,0%	82	10,8%
<b>Total</b>	<b>208</b>	<b>100%</b>	<b>204</b>	<b>100%</b>	<b>16</b>	<b>100%</b>	<b>106</b>	<b>100%</b>	<b>157</b>	<b>100%</b>	<b>55</b>	<b>100%</b>	<b>11</b>	<b>100%</b>	<b>757</b>	<b>100%</b>

\* tatouage, piercing, acupuncture.

### 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 16 millions de dons ont bénéficié de cette mesure. A la fin 2007, 10 dons provenant de donneurs sans anticorps spécifiques ont été identifiés (voir les caractéristiques tableau 11); parmi ceux-ci 1 avait un taux élevé de transaminases et 1 présentait des anti HBc. Ces 2 dons auraient été écartés : le bilan net du DGV se porte donc à 8 dons pour les 6,5 premières années de pratique du DGV, soit 0.5 par million de dons.

**Tableau 11 : Caractéristiques des donneurs dépistés ARN positifs anticorps négatif entre le 1<sup>er</sup> juillet 2001 et le 31 décembre 2007**

Cas	Année	Statut	Génotype	Charge Virale	Monolisa HCV Ag/Ab Pos si >1	Sexe	ND/DC	Facteur de Risque	Remarques
1	2001	FS	3a	4.710 <sup>7</sup>	0,93	M	DC	endoscopie	
2	2002	FS	3a	1.210 <sup>5</sup>	0,10	M	DC	?	ALT +
3	2003	?	Non testé		Non testé	M	ND	?	
4	2003	IS	4a	> 510 <sup>5</sup>	2,58	M	ND	?	
5	2004	FS	1b	1.810 <sup>7</sup> UI	0,50	F	DC	AES	
6	2005	FS	1a	2.210 <sup>3</sup> UI	0,20	M	DC	Partenariat VHC+	
7	2006	?	Non testé	Pos < 25 UI	Non testé	F	ND	?	Anti-HBc +
8	2007	FS	1a	1,210 <sup>5</sup> UI	0,44	F	DC	Partenaire VHC+ Professionnel	
9	2007	FS	1a	neg	Non testé	F	DC	Partenaire VHC+	CV : 4.3 log UI/ml (16/06/07)
10	2007	?	En cours	En cours	En cours	M	DC	Non investigué	

FS : fenêtre sérologique, IS : immunosilencieux, ? : inconnu

ND : nouveau donneur, DC : donneur connu

Le DGV VHB est pratiqué en unitaire dans les DOM depuis janvier 2005 et au CTSA depuis 2006: sur les 99231 dons en ayant bénéficié jusqu'au 30 juin 2007, 2 dons ont été retrouvés Ag HBs négatif et DGV positif. L'un avait un anti HBc et correspondait probablement à une infection dite « occulte » et le second était une fenêtre sérologique comme en a attesté le suivi sérologique.

Le risque résiduel sur la période 2004-2006 est de 1 pour 7.7millions de dons pour le VHC et 1 pour 1 million de dons pour le VHB.

La méthode révisée pour le VHB fournit une estimation peu différente statistiquement, mais moins variable dans le temps (voir tableau 12). Cette méthode semble plus robuste que la méthode classique et montre une relative stabilité du risque VHB.

**Tableau 12 : Comparaison des résultats obtenus pour chaque période en fonction de la méthode d'estimation du risque résiduel du VHB employée.**

	2000-2002	2001-2003	2002-2004	2003-2005	2004-2005
Cas incidents Ag HBs	13	8	2	5	8
Cas incidents Ac HBc	12	14	16	13	4
RR avec FS de 45 jours et ajustement	1/660 000	1/1 010 000	1/4 000 000	1/ 2 040 000	1/1 190 000
RR révisé	1/943 000	1/952 00	1/1 060 000	1/1 150 000	1/ 2 040 000

#### **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'Hémodiagnostique, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
- Diplôme Universitaire de Médecine Transfusionnelle, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, depuis 1997
- Diplôme Universitaire de médecine transfusionnelle,
- Diplôme Universitaire de biologie transfusionnelle, EFS Ile de France
- Diplôme Universitaire « Principes thérapeutiques des infections virales », UFR St Antoine
- DES de Biologie, Ile de France

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

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

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

- Rétro-information à InVS

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

## 5/ Liste des publications et communications

### Publications

**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.

Delarocque-Astagneau E, Pillonel J, de Valk H, Perra A, **Laperche S**, Desenclos JC. An incident case-control study of modes of hepatitis C virus transmission: methodological approaches [javascript:AL\\_get\(this, 'jour', 'Rev Epidemiol Sante Publique.'\);](#) in France *Annals of Epidemiol* **2007**; 17:755-762

**Laperche S**, **Bouchardeau F**, Thibault V, Pozzetto B, Vallet S, Rosenberg AR, Roque-Afonso AM, Gassin M, Stoll-Keller F, Trimoulet P, Gault E, Chanzy B, Mercier B, Branger M, **Pawlotsky JM**, Henquell C, Lunel F, Gaudy-Graffin C, Alain S, Chaix ML, Duverlie G, Izopet J, Lefrère JJ. Multicenter trials need to use the same assay for hepatitis C virus viral load determination. *J Clin Microbiol.* **2007**;45:3788-90.

**Servant-Delmas A**, **Mercier M**, **Girault A**, **Laperche S**. Impact clinique, thérapeutique et diagnostique de la diversité virale du virus de l'hépatite B. *Virologie* **2007**; 11:297-307.

Lefrère JJ, **Laperche S**, Girot R. Repository of blood samples from recipients of red blood cell transfusion in France. *Transfusion* **2008**;48:195.

[javascript:onClickMarkAll\(document.frmAbs\)](#)

**Laperche S**. Antigen-antibody combination assays for blood donor screening: weighing the advantages and costs *Transfusion*, **2008**,48 : 576-579.

**Chevaliez S**, **Bouvier-Alias M**, **Laperche S**, **Pawlotsky JM**. Performance of the Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan (CAP /CTM) Real time Polymerase chain reaction assay for hepatitis B virus DNA quantification. *J Clin Microbiol.* **2008** in press

### Communications orales.

*XXIIIème Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Tours, 2-5 juillet 2007*  
Diversité génétique du virus de l'hépatite B chez les donneurs de sang en France métropolitaine

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

Sécurité transfusionnelle : sensibilité des trousse de dépistage de l'antigène HBs (AgHBs) vis-à-vis de mutants de l'enveloppe virale du virus de l'hépatite B (VHB).

**Mercier M**, **Servant-Delmas A**, **Girault A**, **Caparros R**, **Laperche S**

Place de la vaccination contre le virus de l'hépatite B (VHB) en transfusion sanguine

**Laperche S**.

Caractérisation de souches du virus de l'hépatite C appartenant aux sous-types 2 et sous-types 4 chez des donneurs de sang français : identification de nouveaux sous-types.

Cantaloube JF, **Laperche S**, Gallian P, Bouchardeau F, Biagini P, Elghouzzi MH, Piquet Y, de Micco P.

### **Communications affichées**

*9 èmes Journées Francophones de Virologie, Paris, 26-27 Avril 2007*

Diversité génétique du virus de l'hépatite B chez les donneurs de sang en France métropolitaine

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

*XXIIIème Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Tours, 2-5 juillet 2007*

Relation entre génotypes et facteurs de risque chez les donneurs de sang trouvés VHC positifs en France de 2000 à 2005

**Bouchardeau F, Cantaloube JF, Pillonel J, Le Marrec N, Girault A, Portal C, de Micco P, Laperche S.**

Bilan de la mise en place du Dépistage Génomique Viral (DGV) pour le Virus de l'Hépatite B (VHB) dans la population des donneurs de sang en Guadeloupe.

**Bap C, Annabelle Servant A, Assal A, Vezon G, David B, Laperche S.**

*XVIII<sup>th</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Hanoi, Vietnam, 10 – 13 novembre 2007*

Sensitivity of four new hepatitis B surface antigen assays (Architect, Hepanostika ultra, Monolisa Ultra and Modular II)

**Ly TD, Roque-Afonso AM, Servant-Delmas A, Mercier M, Ebel A, Dussaix E, Laperche S**

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

*XVIIth Regional Congress of the ISBT, Madrid, Espagne, 23-27 juin 2007*

Influence of epidemiological factors on blood transfusion.

**S. Laperche.**

*Chiron mediterranean region meeting, Siena, Italie, 29 Mai 2007*

Place of serology and NAT in the blood screening

**Laperche S.**

*XVIII th regional ISBT congress Biorad Symposium, Hanoi, Vietnam, 11 Novembre, 2007*

Place of serology and NAT in the blood screening

**Laperche S.**

*IPFA/PEI 14th workshop on « Surveillance and screening of blood borne pathogens » Varsovie, Pologne, 14-15 Juin 2007*

Place of serology and NAT in the blood screening

**Laperche S.**

## **6- Programme d'activité 2008**

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

2) L'analyse des donneurs coinfectés par le VHB et le Delta se poursuivra 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 4% des échantillons VHB positifs qui ont été phylogénétiquement analysés, le séquençage direct est apparu difficilement interprétable suggérant l'existence d'infections mixtes. Un test (test INNO-LiPA HBV Genotyping, Innogenetics) basé sur l'hybridation de sondes spécifiques permet de détecter les coinfections. Sur la base de ce test, la fréquence des infections mixtes varie selon les études de 10% (dans une étude canadienne chez des sujets infectés nouvellement diagnostiqués) à 16% (dans une étude française chez des patients chroniquement infectés suivis à l'hôpital). Pour explorer ce phénomène dans la population des donneurs de sang, nous avons entrepris 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.

L'objectif du travail est (i) de dépister les possibles coinfections à l'aide du test INNO-LiPA HBV Genotyping, Innogenetics et de confirmer ces résultats par une technique de clonage moléculaire, (ii) de déterminer la fréquence de telles infections chez les donneurs de sang infectés par le VHB, et éventuellement isoler des souches recombinantes et enfin (iii) d'évaluer les éventuelles conséquences virologiques de ces infections.

Les résultats préliminaires montrent que parmi les 257 dons de sang AgHBs positifs de 2005, 6 échantillons pouvaient être suspectés appartenir à des porteurs d'une infection mixte lors du séquençage. Les 6 échantillons ont été testés à l'aide de la trousse INNO-LiPA HBV Genotyping, Innogenetics selon les instructions du fabricant. Pour trois échantillons, un

génotype unique était retrouvé (génotype A). En revanche, pour les trois autres échantillons, une infection mixte a été identifiée avec une association des génotypes A/D, D/E et A/C/D/H. Par ailleurs, parmi les 200 premiers dons de sang AgHBs positifs consécutifs déclarés sur 2006 en France quelque soit le résultat de génotypage déterminé par séquençage direct, 32 (16%) présentaient plusieurs génotypes du VHB à l'aide de la trousse d'Innogenetics. Les principales associations retrouvées étaient les génotypes D/H (18,7%) et A/D (18,7%), A/E (15,6%), D/E (12,5%). Chaque coinfection est en cours de confirmation par une technique de clonage moléculaire suivi du séquençage d'au moins dix clones afin d'étudier l'ensemble des populations virales présentes dans l'échantillon initial. Les coinfections étant propices au phénomène de recombinaison génétique. Le clonage permettra de documenter de tels mécanismes. Dans ce cas, le clonage et séquençage des génomes complets de ces souches seront réalisés afin de préciser les sites de recombinaison. L'étude d'une population de patients consultant en service spécialisé complétera celle-ci de manière à identifier des spécificités propres à chacun des deux groupes des sujets testés. Ces coinfections représentent l'un des mécanismes d'évolution génétique du VHB, le suivi de la fréquence de tels phénomènes et surtout l'exploration de souches recombinantes peut conduire à une amélioration du suivi épidémiologique des donneurs de sang et surtout une veille virologique visant à évaluer la performance des outils de diagnostic vis à vis de telles souches. Par ailleurs, on ne connaît pas les conséquences de ces infections mixtes sur l'évolution de la maladie et la prise en charge thérapeutique.

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

6) De manière à évaluer la place respective des tests de dépistage combiné de l'Ag de capsid et des anticorps VHC et du DGV VHC dans leur capacité à assurer la sécurité transfusionnelle vis à vis de ce virus, nous mettrons en place une collaboration internationale visant à tester avec les 2 tests de dépistage combiné disponibles sur le marché (Monolisa HCV Ag/Ab Ultra, Bio Rad et Murex Ag/Ab HCV combination Abbott) les dons DGV positifs et anticorps négatifs dans les pays ayant introduit le DGV et acceptant de participer à l'étude, ainsi que quelques panels de séroconversions informatifs. Les objectifs de cette étude seront (i) d'établir une comparaison de performances en terme de sensibilité pour la détection de la phase précoce de l'infection (ii) de comparer la capacité des tests ELISA et DGV à détecter les différents génotypes viraux (iii) d'établir du ratio coût- efficacité des différentes stratégies de dépistage de ce virus.

7) Dans le cadre des activités de contrôle de qualité que nous menons au sein des travaux de l'AC11 de l'ANRS, un panel constitué d'échantillons comprenant de l'ARN VHC à taux faible et d'échantillons dépourvus d'ARN viral, sera distribué à 21 laboratoires dans l'objectif d'évaluer la spécificité des trousse de quantification de l'ARN VHC par PCR en temps réel et d'harmoniser le rendu des résultats au clinicien. En effet, il est apparu lors d'un contrôle de qualité pratiqué en 2007, que certains échantillons négatifs pour l'ARN VHC fournissaient des résultats positifs mais inférieurs au seuil de détection de la technique. Ceci constituait des résultats faussement positifs qui pouvaient avoir un impact dans un suivi thérapeutique. De

plus, un résultat de ce type était rendu alternativement positif ou négatif en fonction du laboratoire. Il nous est donc apparu important de faire des recommandations précises pour harmoniser les pratiques. Celles-ci découleront des résultats obtenus par cette étude.

8) La sécurité transfusionnelle dans les pays émergents reste un problème préoccupant principalement lié aux ressources limitées et aux tests utilisés. Dans l'objectif d'évaluer les performances des réactifs utilisés dans la routine du dépistage des marqueurs viraux chez les donneurs de sang de certains pays d'Afrique, nous avons distribué à 5 pays d'Afrique francophone (Burkina Faso, Mauritanie, Niger, Cameroun, Gabon) un panel de 25 échantillons comprenant 8 négatifs, 5 AgHBs positifs à taux variables, 4 Ac-VHC positifs, 5 Ac-HIV positifs (4 HIV-1, 1 HIV-2), et 3 mélanges des 3 virus 2 à 2. Les résultats apporteront une aide à l'amélioration de la sécurité transfusionnelle dans ces pays.

Fait à Paris le 24 avril 2008  
Syria LAPERCHE

\*\*\*\*\*

**IV**

**LABORATOIRE ASSOCIE  
RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT**

**Hôpital Paul Brousse  
Villejuif**

LABORATOIRE ASSOCIE

RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT

RAPPORT D'ACTIVITE SCIENTIFIQUE

2007

Dr Valérie THIERS

Directeur Adjoint

CNR Hépatites B, C et D

## Table des matières

<b>Résumé Contribution à la surveillance épidémiologique.....</b>	<b>3</b>
I - Infrastructure utilisée .....	4
<b>II - Activité d'expertise.....</b>	<b>5</b>
2.1 Capacités techniques du CNR.....	5
2.2 Activité d'expertise .....	7
<b>III - Activité de surveillance de l'année 2007.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Enquêtes ponctuelles concourant à la surveillance.....</b>	<b>9</b>
3.11 Surveillance des infections chroniques B et C au niveau National .....	9
3.12 Infections à VHB occulte chez les donneurs de sang en Algérie . .....	12
3.13 Observatoire des hépatites aiguës B en France .....	14
3.14 Surveillance des hépatites aiguës C au Caire .....	14
3.15 Surveillance des isolats VHC circulants en Roumanie .....	15
<b>VI Conseils et Collaborations Nationales et Internationales.....</b>	<b>17</b>
4.1 Demandes d'expertises .....	17
4.2 Collaborations Nationales et Internationales .....	17
4.3 Information, publication générale, Formation .....	17
<b>V - Activité de recherche.....</b>	<b>19</b>
5.1 Virus de l'hépatite B.....	19
5.2 Virus de l'hépatite B.....	20
<b>VI - Programme 2007-2008.....</b>	<b>22</b>
<b>VII - Publications .....</b>	<b>22</b>
<b>Articles en preparation.....</b>	<b>22</b>
<b>Communications et Posters.....</b>	<b>22</b>
<b>REFERENCES Bibliographiques.....</b>	<b>23</b>

## Contribution à la surveillance épidémiologique

### Résumé

#### 1.1 Diversité 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 (âgés 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 80% des assurés sociaux dépistés anti-VHC positifs avaient une multiplication virale élevée (charge virale médiane  $1,6 \cdot 10^6$  UI/ml). L'analyse de la diversité des souches VHC montre que le génotype 1 reste le plus fréquent observé (54 %). Les 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, dont certains n'ont pas encore été répertoriés dans les bases de données (1d, 1e, 1h, 1l, 1i, 2j, 2k, 2l, 2non classés, 4f, 4k). Comme le montre ces données, nous assistons à la circulation de génotypes plus atypiques. Nous avons donc poursuivi la mise en place de collaborations nationales et internationales afin de faire remonter sur le CNR des souches virales plus atypiques. Il est important de déterminer les modes de contamination résiduels du VHC afin de mieux cibler les mesures préventives. Par une collaboration avec l'université du Caire dans le cadre d'un projet soutenu par l'ANRS (coordinateur A. Fontanet) nous avons étudié la transmission intrafamiliale du VHC en Egypte, sur une cohorte de 4000 individus vivant en zone rurale. 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) (c.f. RA-2006). Cependant cette première étude n'a pu élucider les facteurs de risques associés à cette transmission intrafamiliale. Une nouvelle étude ciblant la phase initiale de l'infection, une cohorte d'hépatites aiguës, a été initiée et devrait permettre de mieux identifier ces facteurs de risques.

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

Cette enquête de prévalence nationale et régionale a aussi recherché des marqueurs sériques de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) dans cet échantillon d'assurés sociaux. Le niveau de prévalence observé pour le VHB était supérieur à ce qui était proposé et 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 faible (charge virale médiane 984 UI/ml). L'analyse de la diversité des souches de VHB réalisée sur 65 échantillons indique la circulation des génotypes A à F avec une prédominance des génotypes A et D. La détection des génotypes D et E indique, comme précédemment mentionné pour le VHC, la circulation en France de sous-types initialement décrits dans le sud du bassin Méditerranéen. Enfin, des mutations de l'enveloppe virale pouvant affecter la détection de l'antigène HBs par les trousseaux de dépistage ont été identifiées pour 4 des 65 échantillons. Parmi les mutations décrites dans la littérature, qui confèrent une résistance aux analogues nucléotidiques, seule la mutation A181T située dans le domaine B de l'ADN polymérase a été identifiée pour un échantillon.

L'amélioration de la sensibilité des techniques de détection moléculaire a fait apparaître la présence d'une faible positivité en ADN viral avec ou sans marqueur sérologique d'une infection par le VHB, soulevant l'hypothèse de l'existence de mutants du VHB (mutant du gène S, mutants du gène preC/C). Les données récentes suggèrent que ces mutants possèdent une répartition mondiale et que leur incidence est en augmentation en France, de l'ordre de 20%. La détection par PCR en temps réel (mutants preC A1896T) ou par séquençage (mutant du gène S) de ces variants est en cours de développement.

# 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>ième</sup> étage (aile Sud) du Centre Hépato Biliaire (CHB).

## Infrastructure

Le Laboratoire Associé est constitué de 3 modules (double module de bureau et module laboratoire de post-PCR). Il possède en propre tout l'équipement nécessaire à la réalisation de sa mission (machines PCR, congélateurs -20 C°, -80°, centrifugeuses, postes informatiques, 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>ième</sup> sous-sol du CHB pièce d'extraction, pièce de MIX), et permettent d'assurer en toute sécurité (expérimentateur et échantillon) la manipulation de sérums et de tissus infectieux. Les modules PCR sont sous sa responsabilité.

## 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) qui ont été 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 VHB ou VHC par l'intermédiaire de techniques de référence. Cette identification se fonde sur une analyse phylogénétique des séquences virales obtenues en suivant la méthodologie établie par le comité d'experts pour le classement des isolats. Nous étudions deux sous régions distinctes du génome viral, qui sont représentatives 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 (1). 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 la réalisation d'une analyse de « Bootstrap » (n=1000). L'ensemble des programmes utilisés pour cette analyse est inclus dans le logiciel MEGA(2).

#### Détermination de séquences consensus

Les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C sont caractérisés par une variabilité génétique importante conduisant à l'identification de nombreux génotypes. La technique d'amplification génique fait appel à l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques localisées de part et d'autre de la région ciblée. Toute l'efficacité de l'amplification repose sur l'hybridation de ces amorces sur le génome viral. Afin d'identifier les zones conservées du VHB et du VHC nous avons réalisé une séquence consensus pour chacun de ces deux virus par alignement des séquences complètes du VHB (A n=16, B n=9, C n=8, D n=9, E n=8) et du VHC (1a n=3, 1b n=5, 1c n=2, 2a n=4, 2b n=3, 2c, 2k, 3a n=4, 3b, 3k, 4a n=7, 4d, 5a n=2, 6a, 6b, 6g, 6h, 6k, 6g, 7a n=1 ) présentes dans les bases de données de séquence. Ces séquences consensus sont régulièrement enrichies par les isolats viraux non recombinants nouvellement caractérisés, en particulier l'addition d'un nouveau type VHC le génotype 7a (Murphy, D. ; résultats non publiés n° accession EF108306).

#### 2.12 Techniques en Développement

##### 2.121 Détection des mutants du PréCore 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) et pourraient conduire à une évolution plus sévère (3-5). 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 gardé une multiplication virale active.

### État d'avancement du travail

En 2007, ce projet n'a été que très peu abordé, faute de disponibilité. En bref, nous avons choisi une réorientation vers une amplification sélective en temps réel ou « PCR allèle spécifique » (cf. RA-2006)(6, 7). Ce système est basé sur le positionnement stratégique de la mutation sur l'amorce qui conduit à une amplification sélective de la souche d'intérêt. Les premiers essais d'amplification avec ces amorces spécifique d'allèle (*Tetra-primer ARMS-PCR*) ne conduisent pas à une discrimination parfaite des souches mutées et non mutées. Il est probable qu'une utilisation d'amorces de type « molecular beacon », formant à l'état libre des structures secondaires stables, va permettre d'améliorer la spécificité de la réaction d'amplification (8).

Des isolats supplémentaires porteurs de mutations du préC-C ont été identifiés par utilisation du test LiPA et sont en cours de caractérisation (cf. §. 4.2.1, §5.21).

### Calendrier

1. Test des amorces type « ARMS\_Beacons » par des expériences de reconstruction sur plasmides.
2. Évaluation de la spécificité, sensibilité et reproductibilité sur des mélanges de plasmides sauvages mutés.
3. Évaluation d'échantillons VHB, de phénotypes connus
4. Comparaison aux techniques de référence séquençage direct de la région préC et technique LiPADrv2.

## 2.122 Mise en place d'une PCR VHB pour la détection des mutants du gène S

L'objectif est de mettre en place une PCR VHB très sensible afin de pouvoir caractériser par séquençage ces infections VHB silencieuses qui auront été identifiées par les trousse de diagnostic nucléaire (Cobas, Roche). La prévalence de l'infection en France serait en constante augmentation dans la population, de l'ordre de 20%. Elle serait caractérisée par une charge virale basse, inférieure à  $10^4$  UI/ml, souvent à 100 UI/ml.

Nous allons utiliser une PCR de type emboîté (nested) qui amplifie un segment du gène S, de l'ordre de 500pb, incluant la boucle antigénique portant les épitopes reconnus par les anticorps anti-HBs. Deux couples universels d'amorces ont été ciblés à partir de la séquence VHB consensus décrite précédemment. Le fragment amplifié correspond aussi à une zone informative pour le typage viral.

### 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. Pour d'augmenter la sensibilité de la technique nous avons modifié un certain nombre de paramètres dont le volume de sérum analysé et développé un protocole de PCR optimisé pour amplifier de l'ADN faiblement représenté.

Avec ce protocole, nous obtenons un produit en quantité suffisante pour un séquençage à partir de charge virale basse ( $\geq 10^2$  UI/ml). Cependant du fait de l'hétérogénéité des séquences du VHB il n'existe pas toujours une relation linéaire entre la charge virale et le succès de la PCR.

### **2.13 Collections de souches**

De par, sa localisation au sein du centre Hépato Biliaire, 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, biologique et histologique, sont stockés dans de bonnes conditions (-80°C ou -30°C). Ces collections seront utilisées pour la mise en place et l'évaluation de nouvelles techniques de typage moléculaire.

## **2.2 Activité d'expertise de l'année 2007**

L'épidémiologie des génotypes du VHB et 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. Par son appartenance à l'institut Pasteur notre laboratoire bénéficie de relations privilégiées avec des laboratoires étrangers. 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 ou du VHB.

### **2.21 Modélisation d'amorces**

#### **2.21.1 Pour le séquençage du génome complet du VHB**

Dans le cadre du projet sur la surveillance moléculaire des hépatites aiguës un séquençage complet des isolats sera effectué. Les séquences conservées du VHB ont été identifiées sur la séquence consensus du VHB précédemment mentionné. L'identification des zones conservées combinées à une analyse de la littérature récente nous a conduit à sélectionner des couples d'amorces chevauchant, formant des produits amplifiés d'environ 800pb en moyenne, couvrant le génome entier du VHB. Ces amorces sont en cours d'évaluation par le groupe de V. Thibault (GH Pitié-Salpêtrière).

#### **2.21.2 Pour amplifier des isolats particuliers du VHC**

Dans le cadre d'un projet transversal de recherche de trois ans (2004-2007 coordination P. Mavromara - IP Hellénique) des membres du réseau des instituts Pasteur (Paris, Grèce, Roumanie, Saint-Petersbourg, Cambodge, Vietnam) ont été associés (§4.2.2). Dans ce projet nous avons apporté principalement un soutien bioinformatique et réalisé le séquençage de certains isolats. Nous avons dessiné des amorces pour permettre l'amplification de régions complètes (core, E1- E2, NS3, NS4B, NS5B, ...) d'isolats particuliers, peu fréquents dans les bases de données. 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.

### **2.22 Participation à la constitution d'un Panel d'isolats VHC-Génotype**

Dans le cadre du réseau des Instituts Pasteur (§4.2.2) 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 capsidite et NS4B du VHC synthétisé au cours de ce projet (voir § ci-dessus).

### **2.23 Participation à la constitution d'une Banque de séquences de Capsidite du VHC Phénotypées.**

Dans le cadre de l'activité de recherche du CNR nous avons constitué une banque plasmidique de séquences de Capsidite du VHC. La séquence majoritaire complète de capsidite de 10 isolats issus du foie tumoral, non tumoral et pour 2 du sérum d'un même patient a été clonée. Ces séquences vont être phénotypées pour leur activité sur la voie de signalisation du TGF bêta. Aux données moléculaires, nous allons pouvoir associer un certain nombre de paramètres permettant de classer ces isolats en fonction du phénotype clinique (activité fibrosante, récurrence de la tumeur), ou cellulaire (inhibition des voies de signalisation cellulaire ; c.f. R &D § 5.1).

## 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 (9)

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

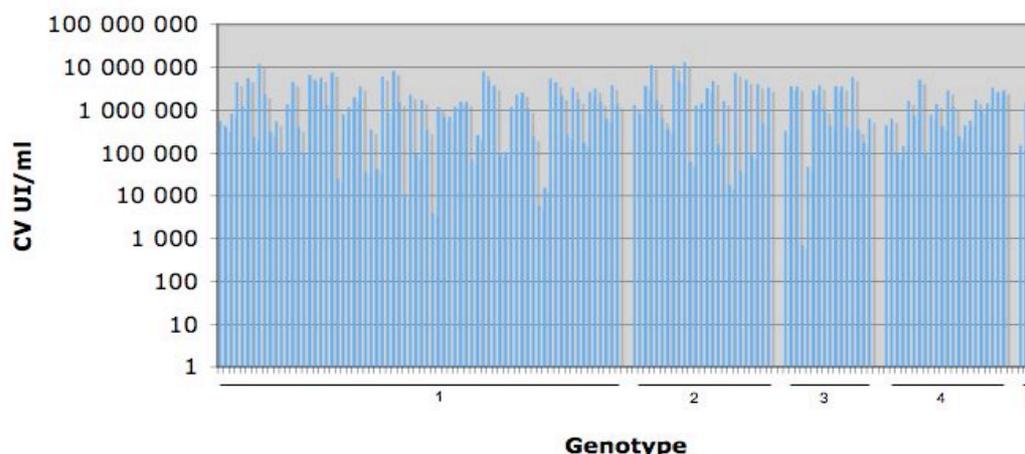
L'étude moléculaire a volontairement été **réalisée en aveugle**. La compilation des fichiers VHC et VHB contenant les données obtenues par les différents intervenants est en cours [niveau moléculaire (CNR-Hepatitis), sérologique (F. Dubois, CHU Tours), épidémiologique (E. Delaroque et C. Meffre, INVS)] et va permettre, après vérification de quelques incohérences, l'interprétation des données. Les données VHC et VHB qui ont déjà été présentées dans le rapport 2006 sont brièvement évoquées.

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

##### Détermination de la charge virale (Rappel)

Nous avons réalisé la recherche de l'ARN du VHC par PCR-nichée chez les 233 assurés sociaux dépistés comme séropositifs pour les anti-VHC. Nous avons montré qu'environ **60%** des assurés sociaux dépistés anti-VHC positifs avaient une multiplication virale active avec des valeurs qui s'étendent de 698 à  $1,3 \cdot 10^7$  UI/ml avec une médiane à  $1,2 \cdot 10^6$  UI/ml. La valeur de la charge virale mesurée pour la population de France métropolitaine âgée de 18 à 80 ans pour 2003-2004 fonction des types du VHC est représentée sur la figure ci-dessous. La moyenne de la charge virale mesurée dans l'ensemble des types 1, 2, 3, et 4 était proche suggérant une efficacité de détection similaire.

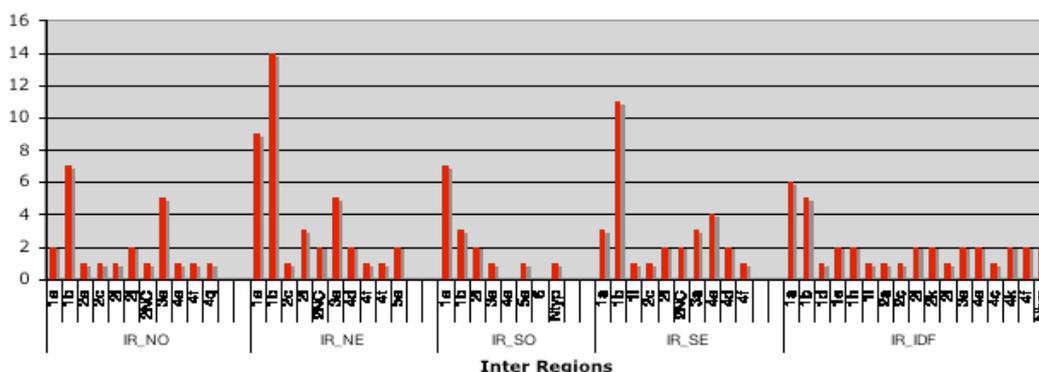
**Charges virales en fonction des génotypes du VHC**



### Détermination des génotypes (Rappel)

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 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 distribution des sous-types du VHC par inter région de résidence pour la population de France métropolitaine âgée de 18 à 80 ans pour 2003-2004 est présentée sur le graphique ci-dessous. Pour l'ensemble des inter-régions françaises les types 1a et 1b restent majoritaire. Cependant, pour les génotypes 1, 2 et 4 on assiste à une diversification des sous-types avec l'identification des sous-types 1 (d, e, h, i). Le même type de constatation est observée pour les types 2 (i, l, k) et 4 (c, d, f).

Génotypes du VHC et Inter Régions



\* IR-NO, Inter Région Nord Ouest ; IR-NE, Inter Région Nord Est ; IR-SO, Inter Région Sud Ouest ; IR-SE, Inter Région Sud Est ; IR-IDF, inter Région Ile de France ; Ntyp : échantillons dont le typage est en cours ; 2NC, pas de soustype homologues dans les bases de données possible nouveau sous type

### Conclusions (Rappel)

Dans cette population considérée comme représentative de la population générale, nos données indiquent que **la moitié** de l'échantillon national d'assurés sociaux de 18 à 80 ans possède une charge virale définie comme « **haute** » (>600 000 UI/ml) lors de la prise en charge thérapeutique. L'analyse de la diversité des souches VHC circulant dans cette population confirme une modification de la prévalence des génotypes du VHC et indique la circulation en France d'une grande diversité de sous type du VHC pour les types 1, 2 et 4, initialement décrits chez des sujets originaires d'Afrique Centrale et d'Egypte. La confrontation des données moléculaires et épidémiologiques permettra de déterminer, en accord avec les études récentes réalisées en France, que

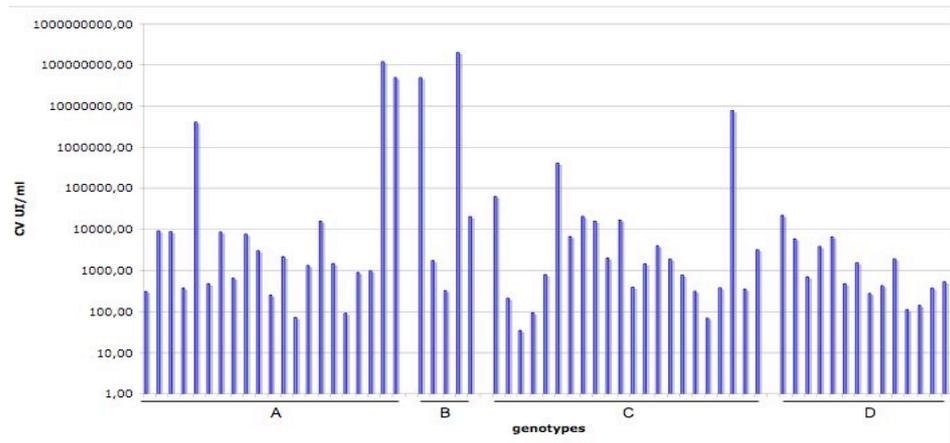
- les génotypes 4a, 4d et 2a, sont identifiés chez des sujets d'origine française et plus généralement associés à des individus jeunes contaminés par toxicomanie intraveineuse
- les isolats plus hétérogènes 1 (d, e, h, i), 4 (c, k, f, q) et 2 (c, i, j, k, l,) sont associés à l'origine non européenne des sujets (10, 11, 12, 13).

## 3.112 Epidémiologie du VHB

### Détermination de la charge virale (Rappel)

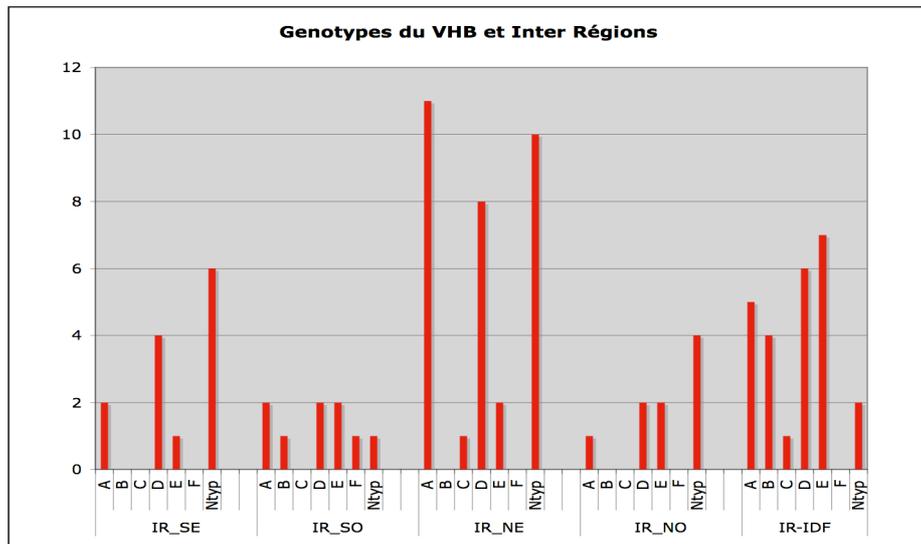
La recherche quantitative l'ADN du VHB (COBAS TaqMan HBV, ROCHE) chez 107 des assurés sociaux aHbC positifs et dépistés comme porteurs de l'AgHBs a montré que 92% avaient une multiplication virale active (ADN+) avec des valeurs qui s'étendent de 34 UI/ml à >10<sup>11</sup> UI/ml avec une médiane à 984 UI/ml. La valeur de la charge virale mesurée pour la population de France métropolitaine âgée de 18 à 80 ans pour 2003-2004 en fonction des types du VHB est représentée sur la figure ci-dessous.

Charges virales en Fonction des génotypes du VHB



### Détermination des génotypes

Sur les 99 échantillons positifs par PCR, 66% (n=65) ont été génotypés et 26% avaient une charge virale basse (<24UI/ml), non compatible avec la méthodologie employée. L'analyse de la distribution des génotypes du VHB a été effectuée par séquençage direct d'un fragment du gène de l'enveloppe. Nous avons observé que les génotypes A et D étaient les plus fréquents observés (35% et 31% respectivement), suivi des génotypes E (21,5%), B (8%) et de façon très minoritaire les génotypes C (3%) et F (1,5%) (figure-1). La répartition des génotypes du VHB par inter région de résidence pour la population de France métropolitaine âgée de 18 à 80 ans pour 2003-2004 est présentée sur le graphique ci-dessous.



\*IR-NO, Inter Région Nord Ouest ; IR-NE, Inter Région Nord Est ; IR-SO, Inter Région Sud Ouest ; IR-SE, Inter Région Sud Est ; IR-IDF, inter Région Ile de France ; Ntyp, échantillons positif mais de charge virale < 24Ui/ml

### Recherche de mutations dans les gènes de l'enveloppe virale et de la polymérase

La traduction en acide aminé (position 95 à 295) des séquences nucléiques et leur alignement nous ont permis de rechercher la présence de mutations pouvant affecter la détection de l'antigène HBs par les trousse de dépistage, en particulier les mutations à l'intérieur du déterminant « a » (position 124-147) au sein de la région hydrophile majeure (résidus 100-170). La mutation G145R, associée à l'échappement aux immunoglobulines anti-HBs administrées à titre prophylactique ou au vaccin, a été identifiée chez un patient. D'autres mutations affectant le diagnostic ont été identifiées chez trois patients : M133I (n=2) et F/Y134N. Ces trois patients ont été détectés par les trousse utilisées pour le

dépistage de l'antigène HBs.

Par la présence de phase de lecture chevauchante, le déterminant 'a' de l'AgHBs est situé dans la région de liaison variable située entre les domaines A(410-426) et B(498-528) de l'ADN-polymérase (ADN-P). Des mutations situées dans le domaine catalytique de l'ADN-P, ont tendance à survenir en association avec l'administration d'analogues nucléotidiques (14). Parmi les mutations décrites dans la littérature qui confèrent une résistance aux analogues nucléotidiques, seule la mutation A181T située dans le domaine B de l'ADN polymérase a été identifiée chez un sujet. Cette mutation a été récemment associée à un phénomène d'échappement chez des patients sous traitement par la Lamivudine ou l'Adéfovir. In vitro un travail récent montre que cette seule mutation peut induire une résistance croisée à la Lamivudine et l'Adéfovir (15).

Il est à noter que la technique employée, le séquençage direct, ne permet de détecter que les variants qui atteignent au moins 20% de la population virale étudiée.

### Conclusions

L'analyse de la charge virale à partir d'un échantillon national d'assurés sociaux dépistés positifs 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). Les génotypes du VHB de A à F ont été identifiés. L'analyse de la diversité des génotypes confirme la prédominance des génotypes A et D comme précédemment observé en France, cependant la faiblesse des effectifs pour les différentes régions ne permet pas de produire de conclusion (16, 17). Comme pour le VHC la détection des génotypes HBV-D et HBV-E indique la circulation en France de sous-types initialement décrits en dans le sud du bassin Méditerranéen.

### 3.113 Perspectives

L'étude moléculaire a volontairement été **réalisée en aveugle** et la confrontation des données moléculaires obtenues pour le VHB et VHC dans cet échantillon d'assurés sociaux de 18 à 80 ans aux données démographiques et biochimiques et permettra d'effectuer une analyse plus complète, p.e.

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

### 3.12 Pévalence des infections à VHB occulte chez les donneurs de sang en Algérie .

Ce projet constitue le travail de thèse du Dr Réda Yeddou, inscrit à la faculté des sciences d'Alger.

Le dépistage de l'infection par le VHB est habituellement basé sur la détection de l'antigène de surface (antigène HBs). Toutefois, le risque de contamination par transfusion pose encore problème par la présence d'une fenêtre sérologique relativement longue (un à trois mois en moyenne), et aussi par l'existence de variants du VHB. Ces VHB dits cryptiques, ont un profil sérologique qui est caractérisé par l'absence de détection de l'antigène HBs par certaines troupes commerciales de détection de l'antigène de surface ; ils ne peuvent être détectés que par la recherche du génome viral (18-20). 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. Plusieurs études ont fait état de la présence d'ADN du VHB dans le sérum de 30 à 35% des patients avec hépatite chronique, et chez environ 10% chez les sujets

anti-HBc positifs avec ou sans anti-HBs, en particulier chez les donneurs de sang (18, 21). Ce phénomène de persistance peut être consécutif à plusieurs facteurs non exclusifs associés

- À l'hôte
- Au virus, et notamment aux variants du gène S. En effet, l'apparition de mutations dans la petite protéine d'enveloppe (protéine S), plus particulièrement dans la séquence polypeptidique qui porte les épitopes reconnus par les anticorps anti-HBs pose des problèmes de détection avec les trousse commerciales de dépistage de l'AgHBs (22). D'autres mutations identifiées de part et d'autre de la boucle antigénique peuvent modifier sa conformation et ainsi masquer les sites reconnus par les anticorps anti-HBs (23). Enfin, une hypothèse d'ordre quantitatif, doit aussi être évoquée pour expliquer cette absence de détection par les trousse de dépistage. La présence de mutations, situées sur le reste du génome viral - extra-gène S -, pourraient entraîner une réplication virale à bas bruit, conduisant à une production insuffisante des particules d'enveloppe appelées "particules HBs".

La fréquence du diagnostic des infections occultes 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, souvent de l'ordre de  $10^2$  UI/ml (24, 25). Ces infections silencieuses sont probablement une des raisons qui pourrait expliquer l'augmentation de l'incidence de l'atteinte par le VHB, notamment dans les pays pauvres ou les normes de prévention ne sont pas toujours respectées et où le dépistage génomique viral (DGV), n'est pas mis en place (26, 27).

L'objectif de ce travail est de déterminer la prévalence des infections à VHB silencieuses ou des infections par des souches variantes en Algérie dans une population de donneurs de sang. En Algérie, la prévalence de l'hépatite B est d'environ 3 % dans la population générale. Le don de sang est effectué avec des échantillons dépistés comme négatif pour l'antigène de surface du VHB (AgHBs -) mais dont certains peuvent être porteurs d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid du VHB (aHBc isolés, ou aHBc et aHBs positifs).

### Population étudiée

Il s'agit d'une étude prospective portant sur 1500 personnes testées sur une période supérieure ou égale à trois ans. La population étudiée sera recrutée parmi les donneurs de sang, au niveau du poste de transfusion sanguine de l'hôpital de Zéralda, commune située à 29 Km à l'ouest d'Alger. Les donneurs inclus dans cette étude seront sélectionnés sur un statut sérologique précis permettant d'évoquer la présence de telles infections : AgHBs négatif et anti-HBc positif avec ou sans anti-HBs (28).

### État d'avancement du travail

Pour le moment, 667 sujets ont été inclus dans l'étude. L'ensemble de ces sujets est négatif pour la détection de l'antigène HBs en utilisant la trousse de dépistage Murex. La détection des anticorps anti-HBc a identifié 51/667 (7,65%) sujets positifs. L'utilisation d'une seconde trousse de dépistage de l'antigène HBs sur ces 51 sujets porteurs d'anticorps anti-HBc (Eti-MAK4, DiaSORIN) a identifié 3 sujets AgHBs positifs. La forte densité optique (DO de 8,9) observée pour deux des trois échantillons confirme la mise en défaut de la première trousse utilisée pour le dépistage. Parallèlement, une recherche d'ADN du VHB quantitative a été effectuée et a aussi identifié trois échantillons PCR positifs, dont 2 étaient identifiés comme positifs pour l'AgHBs. L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau ci-dessous.

Échantillons	28942	47024	47527	817985
AgHBs DiaSORIN (Eti-MAK4)	Pos	Pos	Pos	<b>Neg</b>
Densité optique*	8,9	0,049	8,9	0,009
PCR HBV (Cobas TaqMan)	< 24 UI/ml	Neg	906 UI/ml	<b>&lt; 24 UI/ml</b>

\*Cut off : 0,034

Malheureusement, la faiblesse des charges virales ( $<24\text{Ui/ml}$ ) ne permettra l'obtention de données moléculaires que pour un seul des échantillons.

#### **Conclusion préliminaire**

Les premiers résultats indiquent la présence d'infection à VHB persistante chez 8% (4/51) des donneurs de sang Algériens porteurs d'anticorps anti-HBc isolés, dont 6% (3/51) possèdent une multiplication virale détectable. Ces données incitent à rechercher l'ADN viral chez des donneurs de sang ayant un profil sérologique d'infection virale B résolutive et confortent la nécessité d'évaluer la capacité des différents tests à reconnaître toute la diversité de ces virus en constante évolution.

### **3.13 Observatoire des hépatites aiguës B en France**

Le projet d'une surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France, coordonné par le Dr Thibault (SERVI, GH Pitié-Salpêtrière) est mené en collaboration avec l'institut de veille sanitaire. Ce projet a obtenu un soutien financier de l'ANRS (membres du projet V. Thibault, D. Antona, E. Delarocque, S. Laperche, V. Thiers) et l'accord de la CNIL. Les documents d'information concernant cet observatoire moléculaire du VHB sont en ligne sur le site de l'INVS.

L'objectif de ce projet est de recueillir des données moléculaires sur les souches de VHB responsables d'hépatites B aiguës en France. Les informations obtenues seront ainsi les premières à concerner la population générale pour ce type de maladie.

#### **État d'avancement du travail**

Le recueil des prélèvements a débuté en Mars 2007 et va s'effectuer sur une année. En janvier 2008, 90 prélèvements avaient été reçus. Les premiers échantillons ( $n=65$ ) ont été testés pour le test d'avidité des anti-HBc développé par Vincent Thibault et titrés pour les IgM HBc. Une bonne concordance a été observée par l'équipe de V. Thibault entre les deux tests et indique que la moitié des échantillons reçus correspond à une hépatite B en phase aiguë. Parallèlement la quantification de la répllication du VHB a été effectuée sur 84 échantillons. Les valeurs s'étendent de 40 à  $10^9$  UI/mL avec une médiane à  $10^6$  UI/mL. Environ 20% des prélèvements ont une répllication inférieure à 1000 UI/mL et seront donc plus difficilement séquençable. Les échantillons identifiés comme en phase aiguë sont en cours d'amplification du génome total, puis seront clonés et séquencés.

### **3.14 Surveillance des hépatites aiguës C au Caire**

Ce projet, dont A. Fontanet (Unité d'épidémiologie des virus émergents – Institut Pasteur) et M.K. Mohamed (faculté du Caire) sont les responsables scientifiques, a obtenu un financement de l'ANRS.

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 (29). Ces observations suggèrent l'intervention d'autres modes de transmission du VHC en zone hyper endémique, notamment dans le cadre familial. Dans un premier travail d'épidémiologie moléculaire, nous avons étudié la transmission intrafamiliale du VHC, sur une cohorte de 4000 individus vivant en zone rurale (c.f. RA-2006). 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). Cependant cette première étude n'a pu élucider les facteurs de risques associés à la transmission intrafamiliale. Une nouvelle étude ciblant la phase initiale de l'infection, les hépatites aiguës, devrait permettre de mieux cibler ces facteurs de risques.

#### **Population étudiée**

Une cohorte constituée de 200 patients a été formée au Caire, au sein des « *Fever Hospitals* », hôpitaux publics où viennent consulter des personnes présentant des problèmes

infectieux(30). Un bilan sanguin a été proposé aux patients présentant un tableau clinique évocateur d'une hépatite aiguë afin d'identifier ceux qui auraient été récemment infectés par le VHC.

#### **État d'avancement du travail**

L'étude est volontairement réalisée sous forme codée et se situe dans la phase d'obtention des données. Nous avons pour le moment reçu 58 échantillons dont 43 ont été séquencés. Comme attendue la majorité des isolats sont de génotypes 4 (88%), dont 79% sont de génotype 4a, 3 se groupent avec les types 1.

#### **3.15 Surveillance des isolats VHC circulants en Roumanie**

Travail réalisé en collaboration par G. Oprisan IP Roumanie, dans le cadre du projet transversal de recherche.

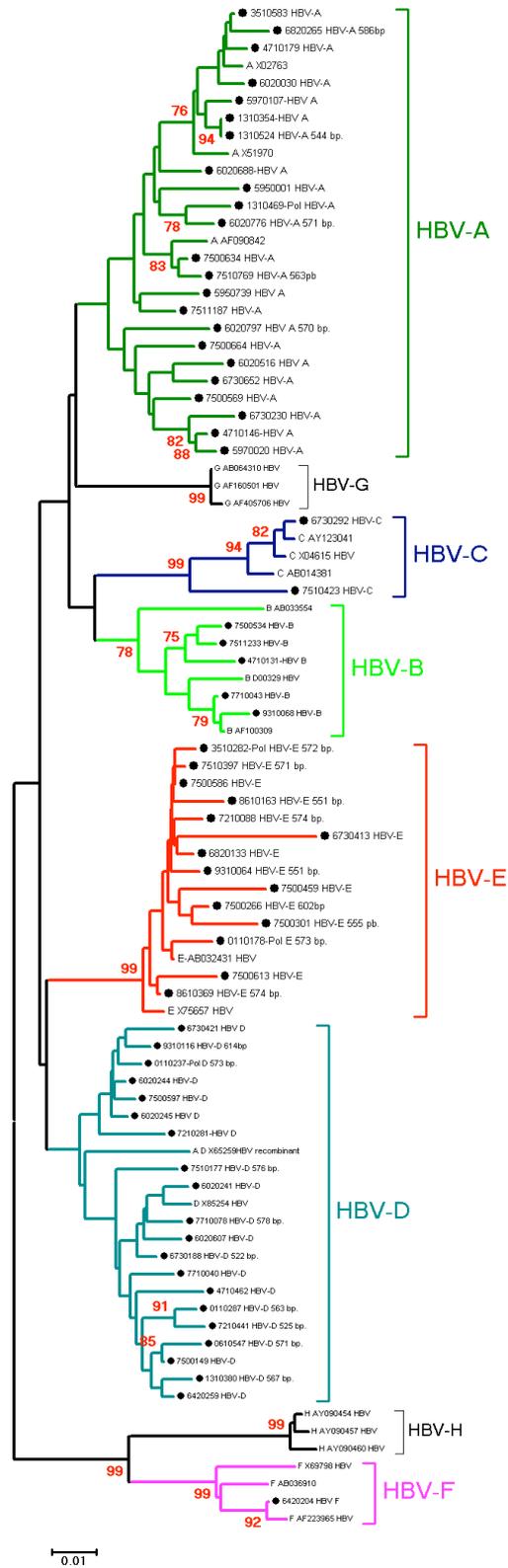
Trois systèmes d'amplification ont été testés (421pb de la région Capside, deux amplifications partiellement chevauchantes de la région NS5B 368pb et 577pb) sur 250 échantillons précédemment analysés par RFLP de la région 5'NC.

Les génotypes prédominants étaient 1b (95%), 1a (3%), 4a (1,5%) et le génotype 3a (0.5%). Les résultats discordants observés pour 4 échantillons entre le RFLP-5'NC et le séquençage sont associés au manque de discrimination de la région 5'NC (forte conservation de séquence).

L'analyse phylogénétique des séquences à par ailleurs permis d'identifier une même source d'infection chez trois usagers de drogue.

Une modification des prévalences des génotypes du VHC est aussi observée en Roumanie où l'on assiste à une diminution du génotype 1b et à une augmentation de génotype 1a associé à l'usage de drogue. La diffusion du génotype 4 a aussi été observée. Bien que le RFLP dans sa version simplifiée ne permette que de distinguer le génotype 1 des autres génotypes, cette donnée est suffisante pour la mise sous traitement des patients.

Figure 1 : Distribution des isolats du VHB dans la population des assurés sociaux dépistés comme porteurs de l'antigène HBs



Les échantillons appartenant à la cohorte d'assurés sociaux sont signalés par un point noir

## **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. (Participant 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 circulant 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. § 4.22).

« Diversité des isolats VHC circulants en Roumanie »

Nous intervenons aussi comme conseil pour la virologie moléculaire auprès des membres du réseau. Nous participons à la formation et la mise en place d'outil pour amplification et le génotypage. (c.f. § 3.14)

#### **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

- 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 en France**

Le projet d'une surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France mené en collaboration avec l'institut de veille sanitaire (D. Antona, E. Delarocque), le laboratoire de virologie 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 stagiaire venant du Maroc (Faculté de Médecine d'Alger) a été 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

#### **Modulation des effets biologiques du TGF- $\beta$ par des variants de protéine de capsid de l'hépatite C : Conséquences sur le développement de la fibrose hépatique et du carcinome hépatocellulaire**

##### **Objectif**

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

##### **Rationnel**

Plusieurs études, réalisées dans des systèmes où les protéines virales étaient exprimées de manière stable ou transitoire, ou encore en utilisant des souris transgéniques exprimant une ou plusieurs des protéines virales, ont mis en évidence l'implication de la protéine de capsid dans les mécanismes d'apoptose, dans la réponse immunitaire et dans la transformation cellulaire (31-33).

L'infection chronique par le VHC entraîne la production d'une quantité anormale des composants de la matrice extracellulaire aboutissant au développement d'une fibrose intensive. Parmi les cytokines impliquées dans le développement de la matrice extracellulaire, le TGF- $\beta$  joue un rôle essentiel. De plus, une augmentation de la production de TGF- $\beta$  au cours de l'infection par le VHC a été corrélée avec l'apparition de la fibrose. Une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$  a aussi été observée dans le développement d'un CHC (34).

Le TGF- $\beta$  il joue un rôle complexe dans les cancers épithéliaux. En effet, il agit comme un suppresseur de tumeurs au cours des stades précoces de la tumorigenèse en inhibant la prolifération et en provoquant l'apoptose des cellules précancéreuses. Au cours de la tumorigenèse, les cellules présentent une expression accrue de TGF- $\beta$ , et perdent leur capacité à répondre aux effets antiprolifératifs ou apoptotiques de cette cytokine (35-37).

En partant des constatations suivantes :

- Augmentation de l'hétérogénéité des quasiespèces de la capsid du VHC avec la sévérité de la maladie et une distribution différente des quasiespèces dans le foie tumoral. Les divergences de séquences nucléotidiques entre la zone tumorale et non tumorale sont plus fréquemment retrouvées dans la région de la capsid par comparaison avec une autre région virale de référence (NS5b) (38-40).
- Mutations ponctuelles du gène de la capsid pourraient intervenir dans certaines étapes de la carcinogénèse, suggérant une influence de la variabilité de la capsid du virus de l'hépatite C sur la carcinogénèse hépatique liée à l'infection par le VHC (41).
- 4 variants naturels de la capsid isolés à partir du tissu tumoral peuvent inhiber les voies de signalisation du TGF- $\beta$  (42).

On peut donc suggérer une influence de la variabilité génétique et de la compartimentation des variants viraux dans les mécanismes de survenue d'un carcinome hépatocellulaire. Les résultats obtenus avec les 4 séquences tumorales nous incitent à poursuivre le clonage de variants de la

protéine de capsid de façon à établir une corrélation entre l'hétérogénéité des séquences et une fonction biologique.

#### **Role du CNR et Partenariat**

Notre rôle dans ce projet, sera de d'élargir la banque de séquences de capsides de patients infectés par le VHC. Nous avons déjà réalisé le clonage dans des vecteurs d'expression des séquences de protéine de capsid isolées par microdissection laser de groupes d'hépatocytes tumoraux et non tumoraux pour 7 patients avec CHC (40). En collaboration avec l'équipe de cliniciens du centre hépatobiliaire (Dr Duclos-Vallée et Dr Sobesky), des sujets infectés par le VHC et porteurs de pathologie hépatique bien caractérisée, (p.e. échantillons de sujets atteints d'hépatite cholestatique fibrosante, de sujets porteurs de pathologies plus précoces) seront sélectionnés.

Le criblage des différentes séquences ainsi isolées sera effectué en collaboration avec le groupe de M. Bourgeade (Inserm U785). Ce groupe a mis en place un test haut débit utilisant une batterie de plasmides reporters présentant différentes séquences promotrices en amont du gène de la luciférase. Il est ainsi possible de déterminer rapidement l'impact d'une mutation sur la réponse à la voie spécifique du TGF- $\beta$ , ainsi que sur d'autres voies de signalisation.

## **5.2 Virus de l'hépatite B**

### **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 )**

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 (43).

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 préC 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 identifié.

Dans cette collaboration, notre rôle est de réaliser l'amplification et le séquençage de la région PréC-C des patients faiblement virémiques inclus dans l'étude.

## Programme 2008 - 2009

- Poursuite du développement de la détection des mutants VHB par PCR en temps réel. 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.
- Fréquence des variants du préC. Les données récentes suggèrent que l'incidence des mutants du 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 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 préC. L'analyse des séquences permettra aussi d'évaluer la présence de mutants du VHB (mutants du préC).
  - Sur les souches VHB collectées par l'intermédiaire de l'observatoire des hépatites aiguës en France
- Diversité des géotypes du VHC et VHB sur la population d'assurés sociaux (enquête CPAM/INVS 2002-2003). Confrontation des données moléculaires aux données démographiques et biochimiques obtenues pour le VHB et VHC dans cet échantillon d'assurés sociaux de 18 à 80 ans et permettra d'effectuer une analyse complète.
- Diversité des souches VHB (géotypes) 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 2007-2008

## Revue internationale

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

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. *Proteomics. Clin. Appl.* 2007. 1 (6): 545-554

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 May;45 (5):1199-209.

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. *Hepatology.* 2007 Dec;46 (6):1704-12.

Arrais TC, Van Dooren S, Vandamme AM, Brechot C, Rimlinger F, Silva AE, Perez RM, Ferraz ML, Thiers V. Change in hepatitis C virus genotype in hemodialysis patients after end-of-treatment response to interferon monotherapy relapse or re-infection ? *J Med Virol.* 2008 Jan; 80 (1):80-6.

## 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. (*submitted GUT*)

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 GUT*)

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

## Communications et Posters

**Détection ex vivo de cellules T CD4+ spécifiques HBx du virus de l'hépatite B (VHB) et reconnaissance de variants viraux** Silvina MALMASSARI, Hélène FONTAINE, Stanislas POL, Qiang DENG, François Rimlinger, Valérie Thiers, Marie-Louise MICHEL. 8e réunion du réseau national hépatites virales de l'ANRS. UICP espace congrès Paris, 24 et 25 janvier 2008.

**Evaluation of molecular tools, developed in the frame of the PTR 126, for genotyping and molecular epidemiology of HCV strains in Romania** G. Oprisan, V. Thiers, C. Szmál, S. Dinu, AM. Oprisoreanu, D. Otelea, P. Maillard, A. Budkowska and P. Mavromara. Conférence Scientifique Internationale du réseau international des instituts Pasteur. CIS Institut Pasteur, 26 et 27 juin 2008.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.
2. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5:150-163.
3. Zarski JP, Marcellin P, Leroy V, Trepo C, Samuel D, Ganne-Carrie N, Barange K, et al. Characteristics of patients with chronic hepatitis B in France: predominant frequency of HBe antigen negative cases. *J Hepatol* 2006;45:355-360.
4. Mrani S, Chemin I, Menouar K, Guillaud O, Pradat P, Borghi G, Trabaud MA, et al. Occult HBV infection may represent a major risk factor of non-response to antiviral therapy of chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2007;79:1075-1081.
5. Giovanna F, Bortolotti F, Francesco D. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* 2008;48:335-352.
6. Punia 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;40:986-992.
7. Wightman F, Walters T, Ayres A, Bowden S, Bartholomeusz A, Lau D, Locarnini S, et al. 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;42:3809-3812.
8. Waltz TL, Marras S, Rochford G, Nolan J, Lee E, Melegari M, Pollack H. Development of a molecular-beacon assay to detect the G1896A precore mutation in hepatitis B virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* 2005;43:254-258.
9. Meffre C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau E, Antona D, Desenclos JC. Estimation des taux de prévalence des anticorps anti-VHC et des marqueurs du virus de l'hépatite B chez les assurés sociaux du régime général de France métropolitaine, 2003-2004: INVS Rapport préliminaire; 2005.
10. Morice Y, Roulot D, Grando V, Stirnemann J, Gault E, Jeantils V, Bentata M, et al. Phylogenetic analyses confirm the high prevalence of hepatitis C virus (HCV) type 4 in the Seine-Saint-Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. *J Gen Virol* 2001;82:1001-1012.
11. Tamalet C, Colson P, Tissot-Dupont H, Henry M, Tourres C, Tivoli N, Botta D, et al. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates: a survey of 535 strains circulating in southern France. *J Med Virol* 2003;71:391-398.
12. Nicot F, Legrand-Abravanel F, Sandres-Saune K, Boulestin A, Dubois M, Alric L, Vinel JP, et al. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4 strains circulating in south-western France. *J Gen Virol* 2005;86:107-114.
13. Thomas F, Nicot F, Sandres-Saune K, Dubois M, Legrand-Abravanel F, Alric L, Peron JM, et al. Genetic diversity of HCV genotype 2 strains in south western France. *J Med Virol* 2007;79:26-34.
14. Locarnini S, Warner N. Major causes of antiviral drug resistance and implications for treatment of hepatitis B virus monoinfection and coinfection with HIV. *Antivir Ther* 2007;12 Suppl 3:H15-23.
15. Villet S, Pichoud C, Billioud G, Barraud L, Durantel S, Trepo C, Zoulim F. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J Hepatol* 2008.

16. Halfon P, Bourliere M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, et al. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat* 2006;13:329-335.
17. Trimoulet P, Boutonnet M, Winnock M, Faure M, Loko MA, De Ledinghen V, Bernard PH, et al. Hepatitis B virus genotypes: a retrospective survey in Southwestern France, 1999-2004. *Gastroenterol Clin Biol* 2007;31:1088-1094.
18. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology* 2001;34:194-203.
19. Liang TJ, Blum HE, Wands JR. Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without hepatitis B virus serologic markers. *Hepatology* 1990;12:204-212.
20. Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002;9:243-257.
21. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Nojiri N, et al. Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion* 2001;41:1093-1099.
22. Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1997;4 Suppl 1:11-20.
23. Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgtton K, Zhuang H, Locarnini SA, Fyfe J, et al. Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* 2002;293:305-313.
24. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Villari D, de Franchis R, Santantonio T, et al. Quantification of intrahepatic hepatitis B virus (HBV) DNA in patients with chronic HBV infection. *Hepatology* 2000;31:507-512.
25. Chemin I, Zoulim F, Merle P, Arkhis A, Chevallier M, Kay A, Cova L, et al. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *J Hepatol* 2001;34:447-454.
26. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang* 2004;86:83-91.
27. Goncales FL, Jr., Pereira JS, Da Silva C, Thomaz GR, Pavan MH, Fais VC, Magna LA, et al. Hepatitis B virus DNA in sera of blood donors and of patients infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:718-720.
28. Vitale F, Tramuto F, Orlando A, Vizzini G, Meli V, Cerame G, Mazzucco W, et al. Can the serological status of "anti-HBc alone" be considered a sentinel marker for detection of "occult" HBV infection? *J Med Virol* 2008;80:577-582.
29. Arafa N, El Hoseiny M, Rekacewicz C, Bakr I, El-Kafrawy S, El Daly M, Aoun S, et al. Changing pattern of hepatitis C virus spread in rural areas of Egypt. *J Hepatol* 2005;43:418-424.
30. El Gaafary MM, Rekacewicz C, Abdel-Rahman AG, Allam MF, El Hosseiny M, Hamid MA, Colombani F, et al. Surveillance of acute hepatitis C in Cairo, Egypt. *J Med Virol* 2005;76:520-525.
31. Irshad M, Dhar I. Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract* 2006;15:405-416.
32. Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 2006;25:3834-3847.
33. Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 2001;202:149-156.
34. Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003;10 Suppl 1:S59-67.

35. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8621-8623.
36. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:807-821.
37. Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005;24:5764-5774.
38. Ruster B, Zeuzem S, Krump-Konvalinkova V, Berg T, Jonas S, Severin K, Roth WK. Comparative sequence analysis of the core- and NS5-region of hepatitis C virus from tumor and adjacent non-tumor tissue. *J Med Virol* 2001;63:128-134.
39. Sakai A, Kaneko S, Honda M, Matsushita E, Kobayashi K. Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 1999;30:556-561.
40. Sobesky R, Feray C, Rimlinger F, Derian N, Dos Santos A, Roque-Afonso AM, Samuel D, et al. Distinct hepatitis C virus core and F protein quasispecies in tumoral and nontumoral hepatocytes isolated via microdissection. *Hepatology* 2007;46:1704-1712.
41. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, et al. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2007;46:1357-1364.
42. Pavio N, Battaglia S, Boucreux D, Arnulf B, Sobesky R, Hermine O, Brechot C. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway. *Oncogene* 2005;24:6119-6132.
43. Malmassari SL, Deng Q, Fontaine H, Houitte D, Rimlinger F, Thiers V, Maillere B, et al. Impact of hepatitis B virus basic core promoter mutations on T cell response to an immunodominant HBx-derived epitope. *Hepatology* 2007;45:1199-1209.

**V**

**LABORATOIRE ASSOCIE  
CNR DES HEPATITES VIRALES DELTA**

**Laboratoire de Bac teriology-Virology  
Hôpital Avicenne  
Bobigny**

**Rapport d'activité du laboratoire associé au Centre National de Référence  
des hépatites B, C et Delta pour l'infection par le virus de l'hépatite Delta (HDV)  
(Laboratoire de Virologie de l'hôpital AVICENNE, Université Paris 13)**

**Année 2007**

Rédigé par Frédéric Le Gal, Paul Dény et Emmanuel Gordien

**1/ Introduction :**

- **A/ Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR en terme de santé publique, son organisation, le cas échéant, la répartition des missions avec son ou ses laboratoires associés et ses principaux partenaires :**  
*Au sein du CNR des hépatites B, C et Delta, le laboratoire associé de l'Hôpital Avicenne – UFR SMBH, Université Paris 13 (Bobigny) a pour mission d'étudier la problématique de l'infection par le virus de l'hépatite Delta (HDV). Il a également pour objectif d'évaluer et de développer les tests de diagnostic nécessaires au dépistage et à la prise en charge des patients infectés par ce virus. La localisation du laboratoire dans le département de Seine - Saint-Denis donne également l'opportunité d'étudier cette infection virale dans la population générale, chez les usagers de drogues par voie intraveineuse et chez les migrants.*
- **B/ Résumé des activités de l'année N: faits marquants, points clefs, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte :**  
*Au sein du LA-CNR et au cours de l'année 2007, l'activité de diagnostic du HDV a été marquée par : (i) une augmentation (+10% par rapport à 2006) du nombre de demande de dépistage sérologique (Anticorps (Ac) Totaux). (ii) Une augmentation également des demandes de quantification de la charge virale HDV plasmatique (+16,5% par rapport à 2006). (iii) La caractérisation de 136 nouvelles souches virales HDV (chiffre comparable aux 2 années précédentes). L'origine géographique des patients chez qui ces nouvelles infections ont été diagnostiquées était : Afrique (61%), Europe de l'Est (11%), Europe de l'Ouest (24%) et Asie (4%). Les génotypes spécifiquement africains (HDV-5, -6, -7 et -8) représentent toujours 25% des souches caractérisées. (iiii) Une étude épidémiologique est en cours, afin de tenter de mettre en évidence un ou plusieurs facteurs de risque de transmission de l'infection HDV en France, chez les patients nés et vivant en France. (iv) Différents travaux actuellement sont en cours pour la mise au point de la recherche et de la quantification des particules virales HDV dans les biopsies hépatiques. (v) Enfin, le LA-CNR a débuté plusieurs collaborations internationales effectives en vue de caractériser la diversité génétique du HDV à travers le monde : Angleterre, Burundi, Niger, Cameroun, Mauritanie, Syrie, Argentine et Algérie. La mise en évidence d'une nouvelle souche recombinante HBV D/E hautement prévalente au Niger et retrouvée aussi et dans la région du Sahara (Mauritanie) a été caractérisée.*
- **C/ Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés**
  - o Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

*Paul Dény, PU-PH, 25%, (dans le cadre d'un contrat d'interface INSERM)  
Emmanuel Gordien MCU-PH, 20%, Université Paris 13, AP-HP  
Mariama Issoufou, Tec, 50%, (InVS/Université Paris 13 : 50%)  
Frédéric Le Gal, Tec AP-HP, 50%, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris*

- Organigramme

- Description de la démarche qualité du laboratoire (GBEA, accréditation, CRB)  
*Le laboratoire associé au CNR des hépatites B, C et delta a poursuivi la mise en place du GBEA au fur et à mesure de l'évolution des techniques depuis 2002. Ainsi toutes les approches : sérothèques, tissu-thèques, techniques sérologiques et moléculaires mises en place au sein du laboratoire et du CNR sont référencées dans le guide de bonne exécution des analyses du laboratoire de Bactériologie, Virologie – Hygiène de l'Hôpital Avicenne. Cette démarche a permis à ce jour de référencer près de 800 souches HDV. De part son rôle de CNR, le laboratoire est en train de réaliser un panel sérologique et un panel de charges virales HDV de souches de différents génotypes destinés à être testés en inter-laboratoire (pour test qualitatif et/ou quantitatif). Cette procédure initiée en 2007, est en cours de finalisation. Des premiers tests ont été mis en place avec le CHU de Toulouse (Pr. J. Izopet).*

*L'accréditation de l'hôpital Avicenne et du laboratoire de Bactériologie, Virologie – Hygiène est effective depuis 2003. La certification de l'établissement est toujours en cours.*

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

- surface, plan

*Le laboratoire associé au CNR ne possède pas à proprement parler de surfaces dévolues spécifiquement à l'activité CNR. Il est localisé dans le bâtiment Lavoisier au 2<sup>ème</sup> étage au sein du service de Bactériologie, Virologie - Hygiène de l'Hôpital Avicenne. Les surfaces de l'ensemble du laboratoire de Virologie sont de 100 m<sup>2</sup> répartis à raison de 60 m<sup>2</sup> à l'étage et de 40 m<sup>2</sup> au 3<sup>ème</sup> étage dans le laboratoire commun de Biologie Moléculaire de l'hôpital. Manque cruellement un laboratoire de type P3 permettant la transfection en culture cellulaire des génomes complets de HDV et de HBV.*

- principaux équipements

- PSM, Etuves à CO<sub>2</sub>, chaîne du froid congélateurs +4°C, -20°C, -40°C, -70°C
- Laveur ELISA, BEP 3 (Dade Behring), Vitros (Ortho Diagnostics system)
- Extracteurs automatiques Abbott et Roche
- Thermocycleurs PCR sprint et ABI 9700, ABI 7000 (PCR temps réel),
- Séquenceur ABI3100 (4 capillaires)
- Lecteur de microarray MWG.

*- Demande de création d'un laboratoire de sécurité P3 formulée auprès de l'Hôpital Avicenne, l'UFR SMBH, Université Paris 13 à Bobigny, l'AP-HP et le Conseil général de Seine Saint-Denis*

## **2/ Activités d'expertise :**

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

- **A/ Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage,**

## évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

- Techniques disponibles

### **Techniques Sérologiques :**

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

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

### **Techniques de Biologie Moléculaire :**

*La technique de **RT-PCR quantitative** plasmatique pour le virus HDV mise en place au laboratoire en 2004 est utilisée en routine depuis 2005 (Le Gal F. et al Journal of Clinical Microbiology 2005). Devant le manque récurrent de tests équivalents disponibles chez les industriels pour les laboratoires de diagnostic, nous avons vu au cours de l'année 2007 une augmentation importante des demandes d'examen (+16,5% par rapport à 2006) confirmant son intérêt majeur pour le suivi de l'infection par HDV.*

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

*La **détection qualitative de l'ARN HDV** peut-être effectuée si le résultat de PCR quantitative est négatif pour les échantillons de patients ayant eu au préalable une détection d'ARN delta positive. Cette technique est une RT-PCR qui consiste à amplifier une partie du génome viral (appelée R0) recouvrant la fin du gène codant la grande protéine jusqu'à la séquence du ribozyme antigénomique. Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B180 (n°4118).*

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

*Cette identification génotypique entre dans le cadre épidémiologique du CNR mais n'intervient pas encore dans le schéma de diagnostic clinique du patient. De plus, pour des isolats au profil original, d'autres approches phylogénétiques sont effectuées afin de préciser le positionnement taxonomique (maximum de vraisemblance, approches bayésiennes).*

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

*En 2008, en plus du témoin externe de quantification correspondant à un cDNA*

*d'HDV, nous avons prévu la mise en place d'un témoin interne de quantification permettant de valider chaque phase technique de la quantification de la charge virale HDV par la technique de RT-PCR en temps réel.*

*Egalement en 2008, la quantification de la charge virale HDV par la technique de RT-PCR en temps réel citée ci-dessus sera réalisée sur d'autres prélèvements biologiques, en particulier à partir de ponctions biopsies hépatiques (PBH) pour le suivi des patients chroniques B-Delta. Nous sommes actuellement la phase de validation de l'extraction de l'ARN Delta dans les différents prélèvements, à la fois sur biopsie congelées mais aussi sur biopsies incluses en paraffine. Nous prévoyons une validation définitive de la quantification pour le dernier trimestre 2008.*

*Une demande particulière de services de procréation médicalement assistée s'est fait jour. Une approche technique est envisagée au deuxième semestre 2008, pour la mise en place de la recherche et de la quantification de l'ARN du VHD dans les diverses fractions du liquide spermatique.*

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

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

*Schématiquement, 3 approches sont complémentaires :*

*1 - Région dite R0 incluant la portion 3' terminale du gène codant pour la grande protéine delta.(codons 195-214)*

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

*3 - Séquence complète (1700 nucléotides)*

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

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

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

○ Description technique ('Souchothèque' CNR-Delta)

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

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

*Ces souches sont enregistrées dans un tableau informatique, rangées et conservées dans un congélateur à -80°C.*

○ Conditions de mise à disposition de ces collections

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

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

- Listes des troussees existantes

*Ac anti-HDV totaux (technique ELISA Sorin Biomedica) (compétition)*

*Ac anti-HDV IgM (technique ELISA Sorin Biomedica) (immunocapture)*

*Ag HDV (technique ELISA Sorin Biomedica) (sandwich)(indication exceptionnelle). De nouvelles troussees sont maintenant disponibles (société Ingen), et seront évaluées au sein du laboratoire (voir infra).*

*ARN delta ou ARN HDV recherche qualitative (technique RT-PCR interne au CNR)*

*ARN delta ou ARN HDV recherche quantitatif (technique RT-PCR sondes TaqMan® interne au CNR).*

*Génotypage des souches HDV par séquençage (technique interne au CNR)*

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

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

- *Recherche d'anticorps totaux anti-delta chez un patient porteur chronique de l'antigène HBs*
- *En cas de positivité des anticorps totaux, recherche des anticorps de type IgM.*

*Diagnostic d'une infection avec réplication virale :*

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

*Identification et génotypage*

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

*Suivi thérapeutique chez un patient traité*

- *RT-PCR quantitative*

*Depuis 2004, nous avons donc décidé au laboratoire associé au CNR des hépatites B, C et delta d'utiliser de façon exceptionnelle la détection de l'antigène delta dans l'approche du diagnostic de l'infection par ce virus. A notre sens, ce test devrait logiquement disparaître de la nomenclature compte tenu de la sensibilité beaucoup plus grande des approches moléculaires et de leur inscription récente*

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

## **2.2 Activités d'expertise de l'année N**

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

**La recherche d'anticorps totaux anti-HDV (IgM et IgG) (1162 examens en 2007):**

Cette recherche se fait chez le patient Ag HBs positif. De façon exceptionnelle, nous avons pu démontrer rétrospectivement en collaboration avec le Dr Ph. Podevin de l'Hôpital Cochin, que le virus de l'hépatite delta pouvait surinfecter et provoquer une hépatite très sévère chez un patient porteur chronique d'un variant antigène HBs négatif (par mutation 144E et 145R), résistant à la Lamivudine (Gordien et al., Int J STD AIDS 2006). Plus simplement, la détection des anticorps totaux anti-HDV devrait être faite lors de tout dépistage de patients porteurs de l'antigène HBs, pour d'une part sur le plan personnel éliminer ou confirmer une infection delta et d'autre part déterminer avec précision la prévalence de marqueurs HDV chez le patient porteur de l'Ag HBs en France.

**La détection des immunoglobulines de la classe M (IgM anti-HDV) (170 examens en 2007)**

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

**La détection de l'ARN viral (1315 examens en 2007)**

Nous avons appliqué la détection quantitative de l'ARN HDV à 1315 échantillons pour l'année 2007. Cet aspect s'inscrit dans le suivi nécessaire de la mise sous traitement immuno-modulateur (interféron alpha) ou antiviral parfois associé. L'accès à des formes retard d'interféron permettra peut-être d'améliorer l'efficacité du traitement anti-HDV. Ainsi, la fonctionnalité de la technique ouvre des perspectives de projets multicentriques en fonction des thérapeutiques proposées.

**Provenance des demandes de Sérologies**

Les demandes de sérologies virales orientés vers le HDV sont issues essentiellement d'hôpitaux de l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (Tableau 1).

**Tableau 1 :** liste des sites hospitaliers ayant envoyé des prélèvements (nombre d'échantillons analysés) pour des analyses de sérologie au laboratoire entre Janvier 2007 et Décembre 2007

Hôpitaux AP-HP / Ville (n = 1049)	Autres Hôpitaux / Ville (n = 113)
Antoine Béclère/ Clamart	
Ambroise Paré / Boulogne	
Avicenne / Bobigny	
Beaujon / Clichy	
Bicêtre / Le Kremlin-Bicêtre	
Bichat / Paris	
Cochin / Paris	
HEGP / Paris	

---

*Henri Mondor / Créteil*  
*Hôtel-Dieu / Paris*  
*Jean Verdier / Bondy*  
*Louis Mourier / Colombes*  
*Necker / Paris*  
*Paul Brousse / Villejuif*  
*Rothschild / Paris*  
*St Antoine / Paris*  
*St Louis / Paris*  
*Tenon / Paris*

---

*Provenance des demandes de quantification de la charge virale plasmatique HDV*

*Outre les hôpitaux Avicenne, Jean Verdier et René Muret, (AP-HP du département de Seine Saint-Denis, 93), le laboratoire est référent HDV pour l'ensemble des hôpitaux de l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (voir Tableau 2), des hôpitaux d'Ile-de-France (Créteil intercommunal, Montreuil, Saint-Denis ...); de plus nous recevons un nombre croissant de prélèvements en provenance de centres plus distants (Tableau 2). Les prélèvements adressés au laboratoire d'analyse Pasteur-Cerba pour la recherche de l'ARN de l'HDV nous sont toujours systématiquement ré adressés en 2007. Enfin, durant cette année 2007, des demandes de quantification de la charge virale plasmatique HDV nous sont parvenues de l'étranger et plus précisément de Belgique (Tableau 2). Cette analyse moléculaire est à la nomenclature (JO de Mars 2005).*

**Tableau 2 :** *liste des sites hospitaliers ayant envoyé des prélèvements (nombre d'échantillons analysés) pour des analyses moléculaires au laboratoire entre Janvier 2007 et Décembre 2007*

<i>Hôpitaux AP-HP / Ville (n = 766)</i>	<i>Autres Hôpitaux (n = 547)</i>	<i>Hôpitaux étrangers (n = 2)</i>
<i>Antoine Béclère/ Clamart</i>	<i>Amiens</i>	<i>St Pierre / Bruxelles</i>
<i>Ambroise Paré / Boulogne</i>	<i>Angers</i>	
<i>Avicenne / Bobigny</i>	<i>Argenteuil</i>	
<i>Beaujon / Clichy</i>	<i>Besançon</i>	
<i>Bicêtre / Le Kremlin-Bicêtre</i>	<i>Bordeaux</i>	
<i>Bichat / Paris</i>	<i>Caen</i>	
<i>Cochin / Paris</i>	<i>Créteil Intercommunal</i>	
<i>HEGP / Paris</i>	<i>Grenoble</i>	
<i>Henri Mondor / Créteil</i>	<i>Lille</i>	
<i>Hôtel-Dieu / Paris</i>	<i>Limoges</i>	
<i>Jean Verdier / Bondy</i>	<i>Passy</i>	
<i>Louis Mourier / Colombes</i>	<i>Montreuil</i>	
<i>Necker / Paris</i>	<i>Nancy</i>	
<i>Paul Brousse / Villejuif</i>	<i>Nantes</i>	
<i>Trousseau / Paris</i>	<i>Orléans</i>	
<i>St Antoine / Paris</i>	<i>Poitiers</i>	
<i>St Louis / Paris</i>	<i>Reims</i>	
<i>Tenon / Paris</i>	<i>Rennes</i>	

---

Lariboisière / Paris

Strasbourg  
Rouen  
Troyes  
Tours  
St Denis  
Val-de-Grâce  
Laboratoire Alphabio /  
Marseille  
Creil Laennec  
Clermont Ferrand  
Villeneuve St Georges  
Autres  
(adressés directement ou  
via Pasteur-Cerba)

---

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

*Toujours sans objet pour 2007. Rappelons que l'étude de la réplication virale des virus HBV, HCV et HDV nécessite une structure possédant un niveau de confinement de type L3, absente de l'hôpital Avicenne et du site de Bobigny. Le contrat d'Interface INSERM actuel en cours (2007-2009) a pour mission d'aborder la réplication du virus en culture de cellule et de transférer ces approches au Laboratoire associé au CNR pour les hépatites B, C et Delta, et ce dans le contexte de création d'un laboratoire de sécurité L3 sur le campus balbynien. Cette technologie nous permettrait de tester des souches virales HDV à la sensibilité aux anti-infectieux.*

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

*Le clonage du cDNA infectieux de l'HDV est en cours pour les génotypes Africains HDV-5, HDV-6, HDV-7 et HDV-8 caractérisés au laboratoire d'Avicenne dans le cadre du contrat d'interface INSERM.*

*Nous avons été sollicité pour transmettre un plasmide témoin d'amplification pour la PCR quantitative delta auprès de plusieurs laboratoires.*

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

*Entre l'année 2006 et 2007, nous avons pu noter une augmentation des demandes de sérologie de dépistage (+10%), mais également des demandes de charges virales HDV (+16,5%). Ces évolutions sont le reflet d'une augmentation de la prise en compte de l'infection HDV sur notre territoire et de l'intérêt médical porté au test de quantification de la charge virale plasmatique HDV pour le suivi des patients. De plus, la mise en place de l'algorithme décisionnel concernant les marqueurs HDV dans la routine depuis 2004, nous a permis de mieux cibler l'infection HDV au sein du centre de référence.*

*Le nombre de résultats positifs ou douteux en anticorps anti-delta totaux représente 16% des analyses effectuées chez les patients porteurs de l'antigène HBs et le nombre de patients infectés répliquant l'HDV est de 44,26% en 2007.*

**Tableau 3 : Marqueurs sérologiques et moléculaires d'infection par le virus HDV pratiqué au laboratoire de l'Hôpital Avicenne (résultats 2003-2007)**

Marqueurs HDV <sup>1</sup>	2003	2004	2005	2006	2007
	N (n positifs)				
Antigène HDV	692 (2)	0	0	0*	0*
Anti-HDV	692 (62)	730 (145)	1030 (215)	1060 (138)	1162 (185)
Totaux					
Anti-HDV IgM	692 (37)	170 (83)	232 (111)	164 (67)	170 (55)
ARN HDV**	636 (260)	691 (226)	838 (470)	1130 (580)	1315 (585)

\* test non réalisé pour la routine en 2006 \*\* PCR Qualitative ou Quantitative

### **3/ Activités de surveillance :**

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

##### **- A/ Réseau de partenaires :**

###### o description des partenaires :

Les laboratoires de l'AP-HP.

Les laboratoires de CHU

Les laboratoires des CHG

Le laboratoire Pasteur Cerba

Certains laboratoires privés

Certains Médecins spécialistes

###### o répartition par type d'activités :

Schématiquement 2 types d'envoi :

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

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

###### o répartition géographique :

Bonne représentation en France-Nord

Sites un peu moins nombreux en France-Sud

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

○ estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau  
*A l'AP-HP la couverture est excellente.*

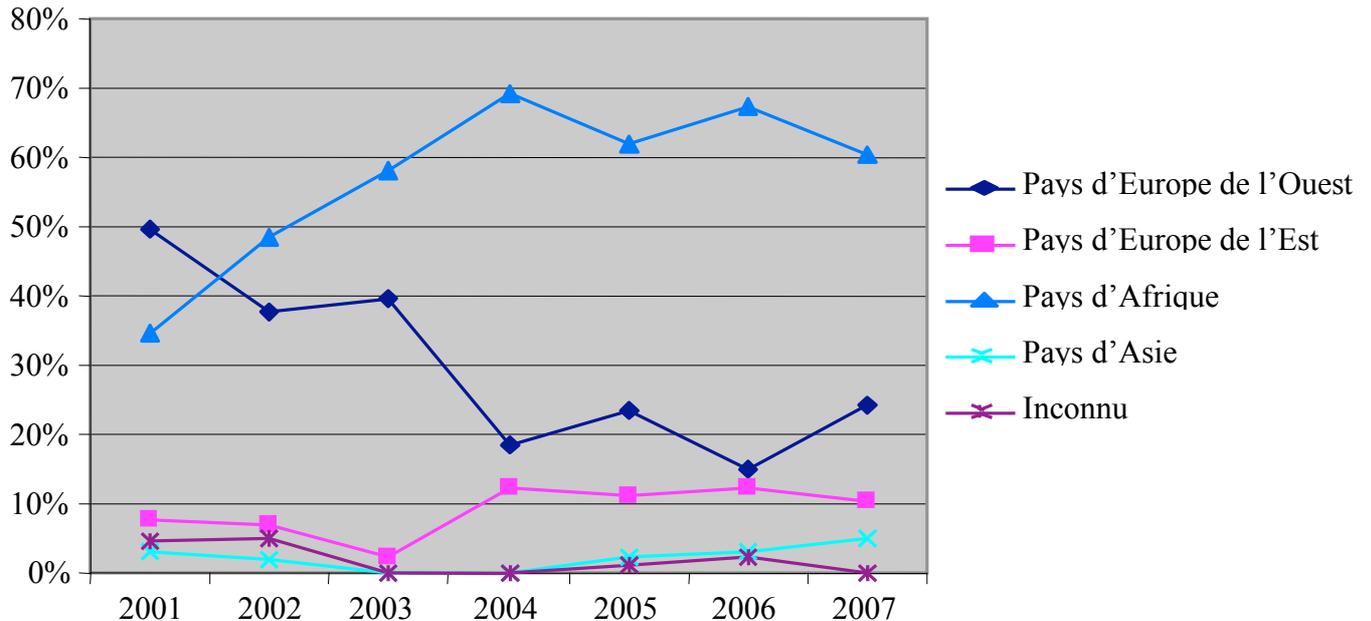
*Pour le reste du pays, la couverture est assez bonne. Une PCR quantitative delta différente de celle de Bobigny existe à Toulouse et à Angers. Des contacts ont été conduits pour étalonner ensemble ces techniques « maisons ».*

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

*Sur l'ensemble des 585 échantillons positifs en 2007 pour l'ARN de l'HDV, 136 cas correspondaient à des souches nouvellement caractérisées*

Nos analyses indiquent qu'également en 2007, entre 60 à 70% des isolats ont été caractérisés à partir de patients originaires de l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Ainsi, durant cette année encore, sur les 136 échantillons répliquant HDV et recueillis chez des nouveaux patients infectés par l'HDV, une forte majorité provenaient de patients étrangers issus de pays d'endémie (Afrique sub-saharienne et Europe de l'Est) (Figure 1).

**Figure 1** : Evolution du pays d'origine des patients nouvellement suivis au CNR Delta entre 2001 et 2007

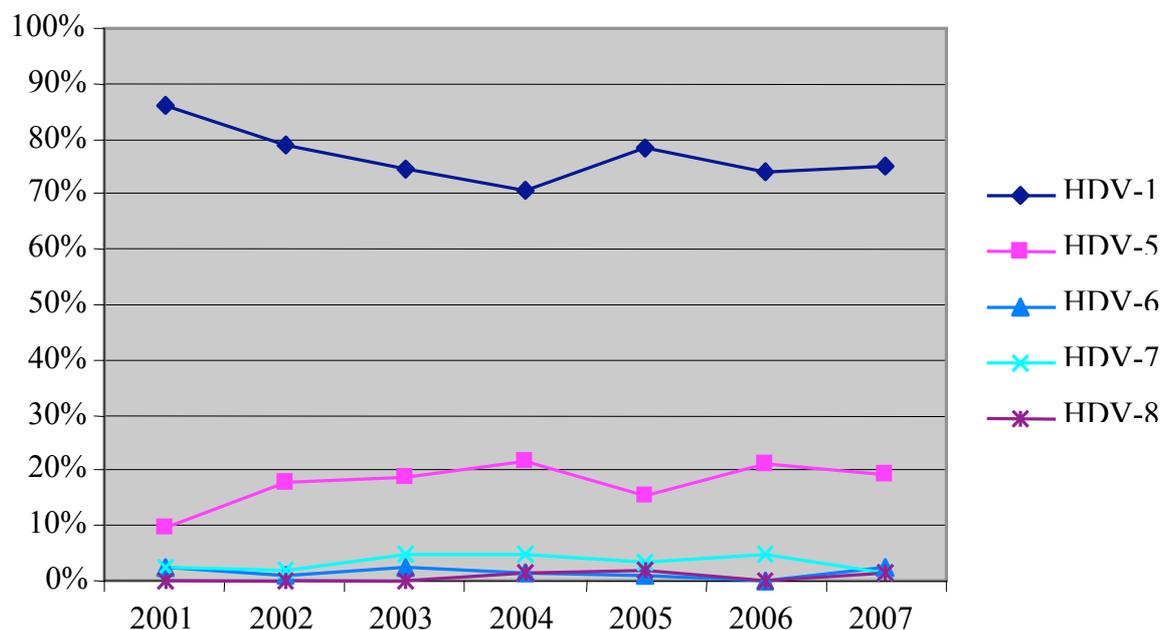


L'évolution sur les 5 dernières années nous a incité à répondre à une lettre publiée dans « Hepatology » permettant de comparer les situations épidémiologiques des infections Delta en France et en Allemagne (Le Gal et al Hepatology 2007) ; 2 situations bien différentes : en France, la majorité des infections recensées touche une population d'origine africaine ; en Allemagne, les infections par l'HDV touchent en majorité une population originaire de l'Europe de l'Est. Une étude récente semble montrer une situation intermédiaire à ces 2 pays, en Angleterre dans la région de Londres (Cross TJ et al J. Med. Virol. 2008).

Pour 2007, en ce qui concerne les génotypes HDV caractérisés au sein du CNR Delta, des isolats affiliés à 2 génotypes ont été principalement mis en évidence en France (Figure 2): Génotype I ou clade 1 (HDV-1) ubiquitaire : n = 102 et le Clade 5 (HDV-5), africain : n = 26. Cependant nous avons pu isoler des souches de Clade 6 (n=3), de Clade 7 (n=3) et de Clade 8 (n=2).

Si l'HDV-1 représente toujours la majorité des infections présentes en France, les clades africains (en particulier le clade 5) présentent 25 % des infections caractérisées au laboratoire (Figure 2). Ces virus n'ont, à notre connaissance, pas encore été décrits dans d'autres pays européens. Cependant il est possible que l'amélioration des outils diagnostiques développés dans notre laboratoire contribue à les mettre en évidence dans d'autres pays.

**Figure 2 :** Evolution des génotypes HDV caractérisés au CNR Delta entre 2001 et 2007



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

Dans le contexte de la réplication de l'HDV, on retrouve en majorité des patients de sexe masculin (65%). L'âge médian est de 44 ans pour les hommes versus 40,5 ans pour les femmes. L'origine géographique des patients infectés indique l'importance des isolats d'origine africaine sub-saharienne (Tableau 3)

**Tableau 3 : Origine géographique des patients nouvellement caractérisés en 2007**

<b>Europe Ouest = 29</b>	<b>Italie = 5</b>
France = 23	Portugal = 1
<b>Europe Est = 11</b>	<b>Roumanie = 4</b>
Bulgarie = 1	Russie = 3
Moldavie = 2	Pologne = 1
<b>Afrique = 79</b>	<b>Madagascar = 4</b>
Burkina Fasso = 1	Mali = 7
Algérie = 2	Maroc = 3
Bénin = 1	Mauritanie = 5
Cameroun = 16	Niger = 1
Congo Brazzaville = 1	République de Centrafrique = 9
Cote d'Ivoire = 12	République Démocratique du Congo = 2
Egypte = 2	Sénégal = 3
Gabon = 1	Tchad = 1

Guinée =7	Tunisie = 1
<b>Asie = 5</b>	Mongolie = 2
	Vietnam = 2
	Chine = 1
<b>Moyen-Orient = 3</b>	Turquie = 2
	Pakistan = 1
<b>Inconnu = 9</b>	

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

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

- **E/ Décrire les collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines suivants : santé animale, alimentaire, environnement**

*Sans objet, à notre connaissance, aucune infection satellite delta n'a été caractérisé dans des échantillons de primates sauvages malgré la présence d'HBV dans ces animaux. Il n'y a pas de transmission virale de l'HDV par l'alimentation ou l'environnement. De façon claire, il importe que l'environnement proche d'un patient infecté par le virus de l'hépatite delta soit vacciné contre l'HBV pour éviter la transmission virale par un contact familial.*

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

*Sans objet. L'étude des résistances nécessitera un laboratoire L3 (programme triennal). Schématiquement les étapes de pénétration n'étant pas définies, il sera nécessaire de transfecter le génome complet de l'HDV sous forme d'ARN ou d'un cDNA. L'utilisation de plus d'une unité génomique s'avère nécessaire pour initier une réplication durable de l'ARN viral et étudier la résistance de cette réplication à certains composés antiviraux. L'infection cellulaire nécessite des hépatocytes primaires ou des cellules HepaRG (cf. travaux du groupe de Camille Sureau), cellules difficiles à utiliser dans un contexte de routine ou semi-routine. A cet effet, une collaboration active est en cours avec le Pr. Dény dans le cadre de son contrat d'interface au sein de l'unité INSERM de Lyon pour la réalisation de modèle d'infection de sérum delta infectieux sur la lignée cellulaire HepaRG.*

*Ainsi les projet en cours de constructions spécifiques de chaque Clade Africain dans le cadre du projet d'Interface, permettront, une fois ce modèle d'infection mis au point, d'analyser la réplication des différents clades HDV et de tester la résistance à différents antiviraux.*

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

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

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

*Une étude de mise en évidence d'un ou plusieurs facteurs de risque de transmission de l'infection par HDV en France a été initiée en 2007. Elle a été centrée sur les patients nés et vivant en France et suivi au sein du CNR Delta (ceci nous laisse supposer la survenue d'une contamination sur le territoire français). La caractérisation moléculaire de la région R0 du génome viral a déjà mis en évidence un propagation récente des souches virales entre ces patients du fait d'une divergence génétique moyenne extrêmement faible d'environ 1,93% entre les souches. Les facteurs de risques liés à ce phénomène sont en cours d'investigation et les résultats finaux donneront lieu à une information auprès de l'InVS et une publication scientifique.*

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

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

*Le laboratoire est inclus dans des réseaux locaux (CISIH93, Groupe GERCOVIH, Réseau hépatite C Nord –Francilien) et Nationaux (HCV ANRS AC11, HIV-HBV ANRS AC11). Il entretient également des liens privilégiés pour l'étude de l'infection HDV avec C Sureau (INTS).*

*Au niveau international, le laboratoire est en contact avec plusieurs équipes travaillant sur le HDV : Dr Benetti – CIBIC - Argentine / Dr Dazhuang Shang (Institute of Liver Studies King's College Hospital Denmark Hill London SE5 9RSUK). Ces équipes nous ont interpellé en tant que référent international sur la variabilité HDV pour leur fournir soit des échantillons positifs de différents génotypes, soit des plasmides de quantification en vue de la mise en place du test de PCR en temps réel.*

### **3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance**

#### **- A/ les objectifs de l'enquête :**

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

#### **- B/ les partenaires :**

#### **- C/ état d'avancement :**

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

*Suivi des charges virales plasmatiques HDV sur une cohorte en Grèce (Manesis et al Inter. Med. Press 2007)*

*En 2007, nous avons finalisé cette étude internationale avec la Grèce. Elle avait pour but de quantifier l'ARN de l'HDV chez des patients traités par interféron pégylé et Lamivudine avec le Dr Manesis. Ces mesures venaient compléter différentes mesures biologiques et concluaient à l'intérêt de la quantification combinée de l'AgHBs et de l'ARN HDV dans le suivi des patients infectés de façon chronique par HBV et HDV.*

Caractérisation de l'épidémiologie moléculaire B et delta en Turquie (article soumis) :  
le but du travail était de caractériser les souches d'HBV et d'HDV circulant en Turquie en particulier à l'Est du pays où près de 56% de la population AgHBs positive est infectée par l'HDV. Les principaux résultats confirment en Turquie l'association « méditerranéenne » : HBV/D et HDV-1. Il est intéressant de constater que cette association est également présente en Mongolie, traduisant peut-être une épidémiologie virale superposée aux migrations de populations.

Epidémiologie Moléculaire de l'Hépatite B-Delta en Afrique (travaux en cours)  
Plusieurs coopérations ont été initiées en 2007 dans le but de caractériser les couples HBV-HDV circulant dans les pays concernés :

1- La Mauritanie en partenariat avec le CHU d'Angers (Pr. F Lunel-Fabiani) projet soutenu par l'ANRS.

2- Le Niger (Dr A. Garba et Mme M. Issoufou).

3- La République Centre Africaine (Dr Narcisse Kommas)

4- Le Burundi (Dr T.Niyongabo) en lien avec le Pr O. Bouchaud (service des maladies infectieuses d'Avicenne). Etude réalisée sur plus de 200 échantillons.

5- L'Algérie (D.r S. Gourari). Etude réalisée sur plus de 150 échantillons.

Caractérisation de l'épidémiologie moléculaire B et delta en Syrie (travaux débuté) :  
En lien avec un doctorant Syrien (Mr W. Mansour) réalisant ces travaux aux CHU Avicenne (Dr. E. Gordien) et Angers (Pr. F Lunel-Fabiani) environ 200 échantillons provenant de patients AgHBs positif ont été collectés sur tout le territoire syrien. Ces échantillons sont en cours de rapatriement pour réaliser les différentes analyses moléculaires et sérologiques sur les virus HBV et HDV.

#### - **E/ la contribution du CNR**

Au cours de chacune de ces études, il a été proposé aux pays concernés un partenariat en vue d'un transfert de technologie leur permettant d'acquérir localement les outils de diagnostic et de suivi de l'infection par HDV. Dans ce but un ou plusieurs étudiants ou médecins ont été accueillis en 2007 et continueront à l'être au sein du laboratoire CNR Delta.

Bien évidemment, parallèlement en France, et avec le groupe Deltavir, nous souhaitons mettre au point le suivi virologique des patients infectés en France dans le cadre d'une étude thérapeutique multicentrique qui serait nationale. Cette étude serait une étude pilote pour étudier le bénéfice potentiel d'une association d'un analogue nucléos(t)idique anti HBV différent de la lamivudine avec l'interféron Pégylé au cours de l'infection delta.

#### **4. Alerte :**

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

La procédure d'alerte serait mise en place dans le cadre de cas groupés d'hépatites aiguës ou fulminantes survenant soit dans un contexte de facteur de risque identifié, principalement par voie parentérale chez l'adulte, soit chez des patients porteurs chroniques de l'Antigène HBs

- **B/ descriptif des phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année :**  
*Il n'y a pas eu de phénomène nécessitant un signalement d'infections HDV dans le cadre d'une procédure d'alerte. Toutes les données actualisées sont répertoriées dans une lettre récente publiée dans Hepatology en 2007.*
- **C/ analyse des tendances et du fonctionnement du système :**  
*L'infection delta est responsable en règle générale d'une maladie chronique du foie ; L'alerte ne se concevrait qu'en présence de cas groupés d'hépatites aiguës ou fulminantes delta, ce qui n'a pas été le cas en 2007. Dans notre pays, il est hautement probable qu'une telle propagation ne surviendrait que dans un contexte précis de transmission et de promiscuité (Usagers de Drogues, Migrants...). L'étude de ces facteurs de risques de transmission chez les patients nés et vivant en France a été initiée en 2007 et se poursuivra en 2008.*

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

- **A/ Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires :**
  - *Cours magistraux, à la faculté de médecine de Paris 13 ; de Paris 7*
  - *Staffs, conférences sur invitation, et dans les services cliniques de l'APHP et dans les sessions scientifiques organisées par des laboratoires pharmaceutiques*
  - *Cours à l'Institut Pasteur de Paris (Virologie systématique) ;*
  - *Stagiaire en provenance d'Algérie (Dr. S. Gourari) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Algérie.*
  - *Stagiaire en provenance du CHU Angers (Mr W. Mansour) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Mauritanie.*
  - *Doctorant 3<sup>ème</sup> année (M. F. Le Gal) : Diversité génétique du HDV en Europe et en Afrique. Caractérisation et implication en virologie médicale.*
  - *Doctorante 3<sup>ème</sup> année (Mme M. Issoufou) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant au Niger.*
  - *Doctorante 3<sup>ème</sup> année (Mlle V. Williams) : Inhibition de la réplication du HBV auxiliaire ; Approche des mécanismes moléculaires spécifiques de la pathogenèse hépatique.*
- **B/ Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)**  
*Les différentes thèses de sciences, produites aux sein du CNR-Delta, servent de support scientifiques et techniques en interne au laboratoire dans la mise en place des études et protocoles techniques (en Oct 2007 thèse de science de M. F. Le Gal).*  
  
*Toujours en interne au laboratoire, le Guide de Bonne Exécution de Analyses (GBEA) sert à la bonne réalisation des techniques de routine destinée au diagnostic et de suivi de l'infection par HDV.*  
  
*Enfin des réunions mensuelles orientées CNR Delta sont réalisées afin de diffuser et de rendre compte de l'avancement des divers travaux, à la fois au sein même du laboratoire de Virologie d'Avicenne mais également plus largement au sein de notre l'hôpital.*
- **C/ Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :**
  - o Rétro-information aux partenaires

- Diffusion aux professionnels : conférences, Site web  
*Rendu des résultats, Compte-rendu annuel, publications scientifiques et didactiques*
- **DI/ Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)** :  
*Géré par la réception ou le secrétariat qui renvoie sur les techniciens ou les médecins du Laboratoire Associé en fonctions des renseignements demandés.*
- **Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)** :  
*ANAES pour la mise en place de la nomenclature pour les examens moléculaires de l'HDV*

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

*Pour le LA CNR des hépatites B, C et delta pour l'infection delta, les travaux de recherche sont effectués principalement en lien avec l'EA3406 et Unités INSERM U845 (Paris, groupe de Dina Kremsdorf), l'institut national de Transfusion Sanguine, (Groupe de Camille Sureau), et U871 (Lyon, Pr Fabien Zoulim).*

**Pour chacun de ces travaux, décrire :**

- **les objectifs,**
  - **les partenariats et l'apport du CNR**
  - **l'état d'avancement et le cas échéant les principaux résultats.**
- 1- *L'étude initiée fin 2006 avec le Dr S. Laperche de l'Institut National de Transfusion sanguine et qui portait sur des poches de sang positives pour AgHBs a été complétée en 2007. Cette étude avait pour but de déterminer la prévalence de l'infection Delta au sein de cette population de donneurs de sang. En 2006, nous avons retrouvé 45 échantillons positifs ou douteux pour la recherche des Ac Totaux HD entre 1997 et 2004. Parmi ceux-ci, 6 avaient des charges virales HDV élevées. Ces patients étaient tous d'origine africaine et les virus détectés étaient de génotypes HDV-7 (n=1) et HDV-1 sous-type « africain » (n=5). En 2007 sur 9 nouveaux échantillons positif ou douteux en Ac Totaux HD, un seul était retrouvé positif en ARN delta. Le génotype de la souche correspondante était de génotype HDV-1 et a été isolée chez un militaire de retour de mission en Afrique.*
  - 2- *Rôle des protéines delta dans la cancérogenèse : Déterminer les interactions cellulaires et des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse liée à l'infection par l'HDV ; Interactions de la grande protéine delta et de voies de signalisation cellulaires (EA3406 ; INSERM U845 et Hôpital Avicenne, LA CNR des hépatites B, C et delta). La grande protéine Delta, ou p27 joue un rôle majeur à la fois dans les mécanismes d'inhibition de la réplication du virus HBV auxiliaire, fréquemment retrouvé, et aussi dans le pathogénèse spécifique propre de l'HDV. Ces travaux sont les résultats obtenus au laboratoire dans le cadre de la thèse d'université de Melle WILLIAMS.*
  - 3- *Déterminer le rôle de l'HDV dans l'inhibition de la réplication du B en fonction de la variabilité génétique des souches virales (INSERM U871 ; INTS ; Université Paris 13 et Hôpital Avicenne, L.A-CNR des hépatites B, C et delta) (contrat*

d'Interface 2007-2009) : Construction des clones delta répliquant les génotypes spécifiques africains est en cours (HDV-5, -6, -7 et -8).

## **7- Liste des publications et communications**

### Publications nationales

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

### Publications internationales

**1- Hepatitis Delta Virus Proteins p24 and p27 Suppress Hepatitis B Virus (HBV) Replication by Trans Repression of HBV Enhancers and by Activation of the IFN- $\alpha$ / $\beta$  Inducible MxA Gene (Soumis en février 2008)**

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

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

**3- Vallet S, Gouriou S, Nkontchou G, Hotta H, Vilerio M, Legrand-Quillien MC, Beaugrand M, Trinchet JC, Nousbaum JB, Dény P, Gaudy C, Goudeau A, Picard B, Payan C. Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma? J Viral Hepat. 2007 Feb;14(2):96-106**

**4- Dény P.**

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

### Communications nationales

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

**2- Epidémiologie moléculaire du virus de l'hépatite delta en France**

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

### Communications internationales

**1- The Isoprenylated Large Hepatitis Delta Antigen activates STAT-3 and NF $\kappa$ B via Endoplasmic Reticulum Stress and Production of Reactive Oxygen Species  
Williams V., Brichler S., I. Dusanter, I. Komla-Soukha, C. Sureau, Fagard R., Dény P. and E. Gordien**

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

**2- the isoprenylated large isoform of hepatitis delta virus protein activates STAT-3 and NFκB, via oxidative stress**

**Williams Virginie, Bricler Ségolène, Komla Soukha Isabelle, Sureau Camille, Kremsdorf Dina, Dény Paul and Gordien Emmanuel**

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

Conférences sur invitations

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

**E. Gordien**

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

**2- Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades?**

**P. Dény**

**Communication orale au pré-congrès international de biologie moléculaire de l'HBV Rome célébrant le trentenaire de la découverte de l'HDV, septembre 2007**

**8- Programme d'activité N+1 et N+2**

Fournir les perspectives et grandes lignes du programme d'activité de l'année N+1 sur la base du présent rapport et du programme quadriennal proposé en 2005 pour les années 2006-2009.

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

- *Etude comparative des différents tests sérologiques dans le cadre du bilan de l'infection HDV*
- *Mise en place d'un contrôle de qualité en sérologie et en biologie moléculaire*
- *Mise au point de la quantification de la charge virale HDV sur des prélèvements biologiques autres que le sérum ou le plasma :*
  - 1- *sur des biopsies hépatiques congelées ou incluses en paraffine*
  - 2- *et dans les différentes fractions du liquide spermatique.*
- *Mise au point d'un modèle d'infection delta in vitro, à partir de sérum infectieux sur des cellules HepaRG en culture.*
- *Production de clones infectieux HDV (poursuite du contrat d'interface).*

\*\*\*\*\*