

CNR DES HEPATITES B, C ET DELTA

RAPPORT D'ACTIVITE 2008 - 2009

Mai 2009

I

STRUCTURE ET MISSIONS DU CNR

1- Rappel des missions du CNR

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

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

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

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

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

- Participer, le cas échéant et en liaison avec l'Institut de Veille Sanitaire, aux travaux à l'échelon européen,

- Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire toute suspicion de cas groupés et à l'AFSSAPS tout problème concernant un réactif.

2- Description de la structure du CNR

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

- CNR des hépatites virales B, C et delta : localisée dans le service de Bactériologie-Virologie-Hygiène et de l'équipe de recherche "Physiopathologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques" (INSERM U955) de l'hôpital Henri Mondor, Créteil (Responsables : Pr. Jean-Michel PAWLOTSKY, Dr Stéphane CHEVALIEZ),

- Laboratoire associé CNR des hépatites virales B, C et delta en transfusion sanguine : localisé à l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS), Paris (Responsable : Dr. Syria LAPERCHE),

- Laboratoire associé responsable de la recherche et du développement : localisé au sein de l'unité mixte de recherche Institut Pasteur-INSERM à l'hôpital Paul Brousse, Villejuif (Responsable : Dr. Valérie THIERS),

- Laboratoire associé pour les hépatites delta : localisé dans le service de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Avicenne, Bobigny (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 les publications communes à certains d'entre eux.

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

- Les acteurs institutionnels : Institut National de Veille Sanitaire (InVS), Direction Générale de la Santé (DGS), Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), Etablissement Français du Sang (EFS), Agence de la Biomédecine (EFG), Institut Pasteur (IP), Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS).
- Les réseaux de surveillance et de recherche Européens : réseau 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 troisième année de fonctionnement

La troisième année de fonctionnement du CNR a été une année de collaboration entre les différents partenaires, de renforcement des liens avec l'InVS et de mise en place de nouvelles études. Elle a en particulier vu la mise en place d'une étude de la prévalence du VIH, du VHB et du VHC chez des homosexuels masculins fréquentant les lieux de rencontre commerciaux parisiens (étude de faisabilité PREVAGAY), qui se déroulera du 28 avril au 6 juin 2009. Cette étude a reçu un financement de l'ANRS dans le cadre de son deuxième appel d'offres 2008 et portera sur 800 sujets. Une étude de surveillance nationale de l'infection chronique par le VHB a également été mise en place à partir des pôles de référence et réseaux

hépatites. Elle a reçu un avis favorable du CCTRIS et de la CNIL. Elle comporte un versant rétrospectif concernant les patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B au cours de l'année 2008, qui implique 29 des 37 pôles de référence et réseaux hépatites, et un versant prospectif à partir de 2009 qui impliquera 32 des 37 sites.

Cette année a également permis au CNR localisé à l'hôpital Henri Mondor de poursuivre la mise en place de nouvelles techniques (biologie moléculaire, recherche sérologique d'anticorps à partir de papiers buvards). Ces technologies sont essentielles à la réalisation des études en cours (étude de faisabilité PREVAGAY) ou devront être implémentées dans la déclaration obligatoire des hépatites aiguës B ou dans des études à venir (enquête COQUELICOT de prévalence du VHC, du VHB et du VIH chez les usagers de drogues, prévue en 2010). Cette mise en place a été facilitée par l'augmentation du personnel dédié aux activités du CNR faisant suite à une redistribution des ressources du service de Bactériologie-Virologie-Hygiène de l'hôpital Henri Mondor.

Cette année a également vu la poursuite des activités du laboratoire associé en charge des hépatites virales en transfusion sanguine, handicapée cependant par un problème d'accès aux prélèvements maintenant résolu, tandis que le laboratoire associé consacré à la recherche et au développement a poursuivi et complété les études en cours.

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

II**RESUME DES ACTIVITES**

**CNR DES HEPATITES VIRALES B, C ET DELTA
ANNEE 2008**

Le Centre National de Référence (CNR) des Hépatites Virales B, C et delta est localisé au sein du laboratoire de virologie de l'hôpital Henri Mondor de Créteil. Sa direction est assurée par le Professeur Jean-Michel Pawlotsky. Le CNR comprend également 3 laboratoires associés, localisés respectivement à l'Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris (Hépatites virales en transfusion sanguine ; responsable : Dr. Syria Laperche), à l'hôpital Paul Brousse, Villejuif (Recherche et développement ; responsable : Dr. Valérie Thiers), et à l'hôpital Avicenne, Bobigny (Virus de l'hépatite delta ; responsable : Pr. Paul Dény).

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

Le CNR a, au cours de sa troisième année de fonctionnement, renforcé les collaborations avec l'organisme de tutelle, l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), et différents autres partenaires. Plusieurs études nouvelles ont été mises en place, comme l'étude de la prévalence du VIH, du VHB et du VHC chez des homosexuels masculins fréquentant les lieux de rencontre commerciaux parisiens (étude de faisabilité PREVAGAY, co-financée par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales, ANRS). Une autre étude concerne la surveillance nationale de l'infection chronique par le VHB à partir des pôles de référence et des Réseaux Hépatites et porte sur les patients nouvellement pris en charge.

Cette année a également permis au CNR localisé à l'hôpital Henri Mondor de poursuivre la mise en place de nouvelles techniques. De nouveaux tests de biologie moléculaire ont été implémentés, et des techniques de recherche des génomes viraux par biologie moléculaire et des anticorps spécifiques par techniques immuno-enzymatiques à partir de sang déposé sur papiers buvards sont en cours de mise au point. Les activités du laboratoire associé consacré aux hépatites virales en transfusion sanguine se sont poursuivies, dont certaines en collaboration avec le CNR localisé à l'hôpital Henri Mondor. Les laboratoires associés en charge de la recherche et du développement et du virus de l'hépatite delta ont poursuivi les études en cours.

CNR des hépatites virales B, C et delta

Le CNR des Hépatites Virales B, C et delta du laboratoire de Virologie et de l'INSERM U955 de l'hôpital Henri Mondor a assuré l'évaluation technique et la mise en place de très nombreuses techniques diagnostiques et de typage viral. Certains de ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire associé en charge des hépatites virales en transfusion sanguine. Ces techniques concernent la détection et la quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC par les techniques, récemment développées, de PCR en temps réel. La capacité de trousse commerciale d'identifier correctement le sous-type de plus de 500 souches de VHC de génotype 1, étape essentielle au traitement de ces malades par les nouveaux antiviraux en développement, a également été étudiée. Ces travaux ont donné lieu à des publications dans des revues internationales à Comité de Lecture.

Le CNR a mis en place une plate-forme complète de typage moléculaire et d'analyse des génomes du VHB et du VHC (PCR, clonage, séquençage, analyses génétiques et phylogéniques) nécessaires à la réalisation d'études en épidémiologie moléculaire des hépatites virales, en particulier en contexte épidémique. Le CNR des hépatites B, C et delta met à la disposition des cliniciens et des laboratoires qui en font la demande l'ensemble de ces outils. Dans ce cadre, une étude prospective réalisée dans une unité d'hémodialyse au Bénin a permis de décrire une épidémie liée à 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. Le CNR a également réalisé l'investigation de cas groupés de transmission du VHB et du VHC ou de cas isolés de transmission nosocomiale de ces virus

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. Un certain nombre de 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. Les résultats ont montré que l'utilisation en combinaison de la lamivudine et de l'adéfovir, *de novo* ou en stratégie d'addition, prévenait l'apparition de la résistance à l'une ou l'autre des deux molécules. La

substitution amino-acidique en position 181 (rtA181V) confère la résistance aux deux molécules et est responsable d'une faible incidence de résistance du VHB chez les patients recevant la combinaison de lamivudine et d'adéfovir. Dans deux études récentes, le CNR a étudié l'effet d'inhibiteurs spécifiques de la protéase NS3 du VHC en cours de développement, le telaprevir et le boceprevir, et analysé la fréquence de la sélection de variants résistants à ces molécules et la dynamique de ces variants au cours et après le traitement. Les rechutes ou échappements en cours de traitement par un inhibiteur de protéase en combinaison à l'interféron alpha pégylé associé ou non à la ribavirine ou après l'arrêt de celui-ci sont associées à la sélection de mélanges complexes de variants viraux portant des substitutions amino acidiques qui confèrent une résistance à l'inhibiteur avec une augmentation du fitness des souches résistantes.

Cette troisième année du CNR a été également consacrée à la poursuite de la mise en place des outils de la plate-forme de surveillance de la résistance des virus d'hépatites en France. Cette plate-forme s'appuiera sur la création prochaine d'une nouvelle Action Coordonnée (AC) au sein de l'ANRS consacrée à la "Résistance des virus d'hépatites aux antiviraux", présidée par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY.

Laboratoire associé : Hépatites virales en transfusion sanguine

Le laboratoire associé en charge des hépatites virales en transfusion sanguine a réalisé des activités d'expertise dans le domaine de la sécurité transfusionnelle. Une collection de souches issues de donneurs de sang infectés par le VHB ou le VHC a été mise en place et alimentée depuis 1996. Cette collection permet de contribuer à la surveillance de la diversité génétique de ces virus chez les donneurs de sang. Le CNR a élaboré différents panels d'échantillons destinés à la réalisation de contrôles de qualité et coordonné deux études multicentrique françaises portant sur la détermination du génotype du VHC et la détection quantification de l'ARN du VHC sous l'égide de l'ANRS. Des panels ont été également distribués dans 5 pays d'Afrique francophone. Ces études ont permis de mettre en évidence un défaut de sensibilité des tests rapides de dépistage de l'antigène HBs.

Ce laboratoire a également assuré l'expertise de techniques de dépistage, une des bases fondamentales sur laquelle repose la sécurité des produits sanguins.

Dans ce cadre, les performances intrinsèques de 2 trouses permettant la détection combinée de l'antigène de capsid et des anticorps anti-VHC ont été évaluées quant à leur capacité à détecter les infections précoces par le VHC à partir de panels de séroconversion commerciaux et internes. Une étude prospective de la prévalence des infections mixtes, réalisée auprès de 200 donneurs AgHBs-positifs, a également été réalisée.

Laboratoire associé : Recherche et développement

Le laboratoire associé a mis en place une technique de PCR grand fragment permettant l'amplification du génome complet du VHB à partir d'échantillons avec une charge virale d'environ 4 Log₁₀ copies/mL. Des essais sont en cours visant à améliorer la sensibilité de cette technique. Des essais de mise au point d'une méthode de détection des mutants du gène préC-C par PCR en temps réel ont été infructueux. Le laboratoire associé a développé des amorces chevauchantes permettant d'amplifier des fragments d'environ 800 paires de bases couvrant le génome complet du VHC. Il poursuit également la constitution d'une banque de séquences de capsid du VHC isolées à partir de foie tumoral et non tumoral ou de patients atteints d'hépatite cholestatique fibrosante sévère. La caractérisation phénotypique de ces séquences est en cours.

Le laboratoire associé en charge de la recherche et du développement participe à l'analyse des données de l'enquête de surveillance des infections chroniques B et C réalisée auprès de plus de 15000 individus inscrits au régime général de la sécurité sociale. Il participe également à la surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France. L'étude d'une cohorte égyptienne de plus de 4000 individus vivant dans une zone rurale dans le delta du Nil a permis de montrer l'importance des injections dans le mode de dissémination du VHC ainsi qu'un rôle important des transmissions intrafamiliales. Un nouveau sous-type, assigné provisoirement 4u, a été identifié.

L'activité de recherche de ce laboratoire est principalement centrée sur l'impact de la variabilité génétique des virus B et C sur l'évolution de la maladie hépatique. Certaines protéines virales mutées, isolées à partir de cellules tumorales de patients ayant un CHC, comme la protéine X du VHB et la protéine de capsid du VHC, pourraient être impliquées dans la persistance virale. L'objectif du laboratoire

est d'élargir la banque de séquences codant la protéine de capsidie par clonage dans des vecteurs d'expression de protéines de capsidie isolées de foie tumoral et non tumoral par microdissection laser à partir de patients atteints de carcinome hépatocellulaire. L'ensemble des séquences générées permettra d'étudier l'impact sur la voie de signalisation du TGF- β .

Laboratoire associé : Virus de l'hépatite delta

Le laboratoire associé pour l'infection par le VHD a assuré l'expertise de techniques diagnostiques de sérologie détectant les anticorps anti-VHD. Cette évaluation a porté sur 186 échantillons et deux trousse sérologiques. Le laboratoire associé a par ailleurs assuré la caractérisation de 154 nouvelles souches de VHD. L'origine géographique des patients chez qui ces nouvelles infections ont été diagnostiquées était : Afrique, 49,4% ; Europe de l'Est, 20,1% ; Europe de l'Ouest, 14,9% ; Asie, 5,8%. En 2008, deux génotypes viraux ont été trouvés en France : le génotype 1 (HDV-1) et le génotype 5 (HDV-5). L'étude des facteurs de risque de transmission de l'infection par le VHD à partir de sujets nés et vivants en France a montré que la toxicomanie intraveineuse ou intranasale sont les deux principaux facteurs de risque de transmission du VHD.

Le laboratoire a débuté plusieurs collaborations internationales en vue de caractériser la diversité génétique du HDV à travers le monde : Angleterre, Burundi, Niger, Cameroun, Mauritanie, Syrie, Argentine et Algérie. D'autre part, dans le cadre de ces recherches, de nouvelles souches recombinantes HBV D/E hautement prévalentes au Niger et en Mauritanie ont été caractérisées

En partenariat avec l'INSERM U845, le laboratoire participe au travail visant à étudier le rôle des protéines delta dans la cancérogenèse et également dans l'induction du stress oxydant de la cellule et l'activation des facteurs de transcription STAT-3 et NF- κ B. D'autre part en partenariat avec l'INSERM U871, le laboratoire étudie la rôle du virus delta dans l'inhibition de la réplication du VHB en fonction de la variabilité génétique des souches virales.



CNR DES HEPATITES VIRALES B, C ET DELTA

Laboratoire de Virologie et INSERM U955

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

- Personnel non médical :

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

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

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

Les personnels suivants sont affectés au fonctionnement du CNR :

- . 0,15 Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 0,40 Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier,
- . 0,40 Praticien Hospitalier,
- . 1,00 Ingénieur d'Etudes,
- . 0,30 Moniteur d'Etudes Biologiques,
- . 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, le laboratoire de Virologie de l'hôpital Henri Mondor s'est engagé dans la démarche d'accréditation conforme à l'application du rapport Ballereau, afin de garantir la qualité des examens réalisés dans le cadre de l'activité de qualification des donneurs d'organes de tissus et de cellules destinés à la greffe, activité à fort potentiel médico-légal, et dans celui du CNR des Hépatites Virales B, C et Delta dans ses missions d'expertise. Un état des lieux a été réalisé afin d'identifier les écarts à la norme et de définir un plan d'action, ainsi que les moyens humains et

financiers nécessaires. Un audit des secteurs impliqués dans le projet d'accréditation a été réalisé par la société Eupraxie Conseil de juillet à octobre 2008 et a fait l'objet d'un rapport détaillé. La création d'un comité de pilotage du projet a été préconisée, tandis que les besoins en formation, les besoins financiers et les besoins humains étaient répertoriés. Un comité de pilotage a été mis en place à l'échelon du Pôle de Biologie de l'hôpital. Un référent qualité a été nommé. Les formations suivantes ont été suivies par les personnels concernés : formation à la norme du chef de projet et du référent qualité du laboratoire, participation au 1^{er} symposium sur le management de la qualité dans les laboratoires de biologie médicale (Paris, 12-13 février 2009), formation à l'accréditation. Le processus d'accréditation suit son cours.

1.3- Locaux et équipements

Le laboratoire hospitalo-universitaire de virologie occupe 250 m² de laboratoire, 105 m² de bureau, 175 m² de surface d'accueil, laverie et réserves, bibliothèque (certains locaux sont communs avec le secteur de Bactériologie-Hygiène) ; 30 m² sont réservés à la garde de nuit. Le laboratoire fonctionne 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Les équipements à la disposition du CNR des Hépatites B, C et delta sont les suivants :

- Automates de sérologies virales

- . 3 VIDAS (BioMérieux),
- . 1 ACCESS II (Beckman),
- . 1 LIAISON (DIASORIN),
- . 1 VITROS 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_{SP}* (Abbott),
- . 1 automate pour "ADN branchés" Siemens 340 (Siemens),

- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS TAQMAN 96 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS TAQMAN 48 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel *m2000_{RT}* (Abbott),
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel LIGHTCYCLER 1.0 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel ABI7300 (Applied Biosystems),
- . 1 automate pour PCR compétitive COBAS AMPLICOR (Roche),
- . 1 thermocycleur à gradient MASTERCYCLE (Eppendorf),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 9700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2400 (Applied Biosystems),
- . 2 thermocycleurs ABI GENEAMP 9600 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur UNO II (Biometra).

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

- . 1 automate d'analyse des hybridations inverses AUTOBLOT 3000 (Siemens),
- . 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^{er} janvier 2008

. 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,

. 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, par technique d'hybridation inverse de seconde génération, qui inclut des sondes dirigées contre la région 5' non codante et la région codant la protéine de capsid (InnoLipa v2.0), et par technique de PCR en temps réel utilisant des amorces et sondes dans la région 5' non codante et dans la région NS5B (Abbott),

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

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

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

. Détection des mutations de résistance du VHB associées à la chimiothérapie antivirale par séquençage direct du domaine transcriptase inverse de l'ADN

polymérase, hybridation inverse (Ino-LiPA HBV DR v3), caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB, et technique de deep-sequencing ou pyroséquençage,

- . 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 2008

- . Mise en place d'une technique de PCR ultra-sensible permettant la détection très précoce des variants du VHB résistants à la chimiothérapie antivirale,
- . Optimisation de la méthode de détermination du génotype du VHC par séquençage direct de la région core/E1,
- . Technique de quantification de l'antigène HBs par chimioluminescence.

- Techniques en développement

- . Technique de recherche des génomes viraux en biologie moléculaire et de recherche d'anticorps par méthode sérologique à partir de sang total recueilli sur papier buvard,
- . Développement d'une base de données des mutations de résistance du VHB aux antiviraux,
- . Mise en place d'une technique de RT-qPCR en temps réel pour la détection et la quantification de l'ARN du virus de l'hépatite delta,

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

Les performances intrinsèques de la plate-forme de PCR en temps réel Cobas Ampliprep-Cobas TaqMan 48 (CAP/CTM, Roche Molecular Systems) 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 ($1,7 \text{ Log}_{10} \text{ UI/ml}$ à $8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UI/ml}$) 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 $4,5 \text{ log UI/ml}$, sans impact majeur sur la prise en charge clinique et thérapeutique (Chevaliez et al., J Clin Microbiol 2008, 46(5) : 1716-23).

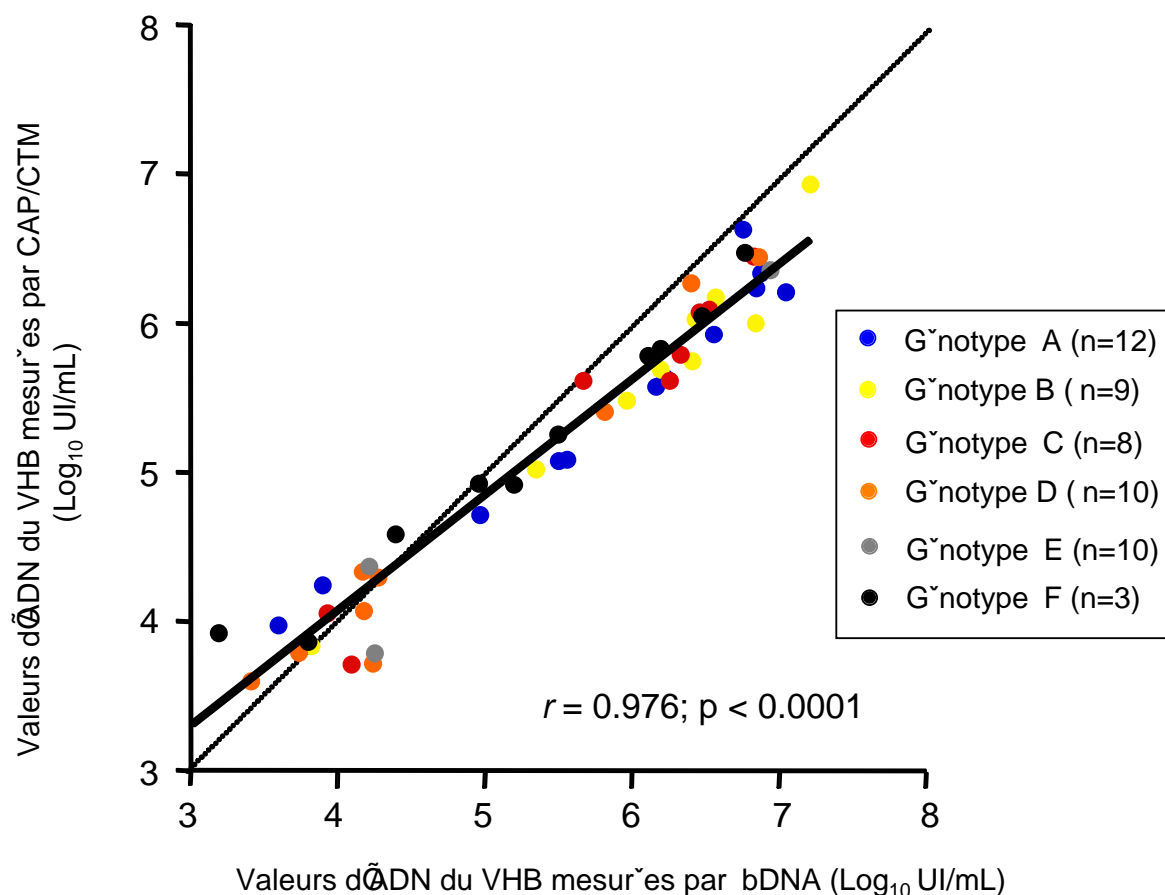


Figure 1 : Corrélation des valeurs d'ADN du VHB mesurées dans 52 échantillons plasmatiques par la plate-forme de PCR en temps réel CAP/CTM (Roche) le bDNA de troisième génération.

Les performances intrinsèques de la plate-forme de PCR en temps réel $m2000_{SP}/m2000_{RT}$ (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%), une excellente précision (coefficients de variation : 0,26% à 3,64%) et une excellente reproductibilité (coefficients de variation : 1,98% à 3,61%). L'ARN de 141 sérums de patients infectés par les 6 génotypes du VHC a été quantifié à l'aide de la plate-forme $m2000_{SP}/m2000_{RT}$ et par la méthode des ADN branchés de 3^{ème} génération (bDNA, Siemens). Les valeurs de charge virale obtenues avec la plate-forme $m2000_{SP}/m2000_{RT}$ étaient modérément surestimées (médiane de la différence $m2000_{SP}/m2000_{RT}$ moins bDNA : +0,3 Log_{10} 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., J Clin Microbiol 2009, sous-presse).

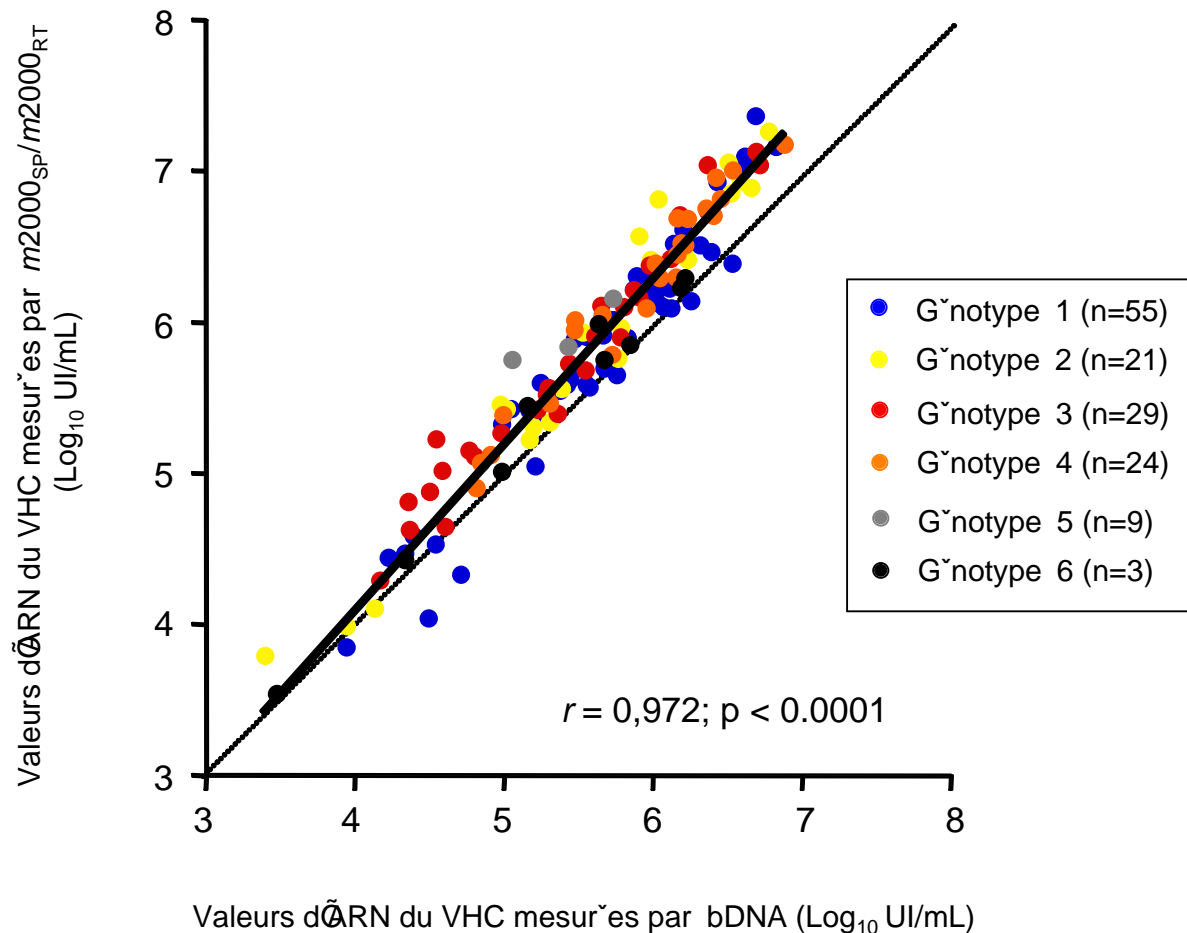


Figure 2 : Corrélation des valeurs d'ARN du VHC mesurées dans 141 sérums par la plate-forme de PCR en temps réel $m2000_{SP}/m2000_{RT}$ (Abbott) et le bDNA.

Nous avons également rapporté deux cas de malades infectés par un VHC de génotype 4 pour lesquels l'ARN du VHC était indétectable par la technique CAP/CTM de Roche, alors que la charge virale était trouvée élevée par la technique $m2000_{SP}/m2000_{RT}$ (Abbott) et par la technique de bDNA (Siemens), voir tableau ci-dessous. L'absence de détection était liée à la présence de deux substitutions nucléotidiques au sein de la séquence cible de la sonde Taqman. Ces informations corroboraient notre publication antérieure d'une sous-quantification de l'ARN du VHC

par la technique CAP/CTM dans environ 30% des cas, lorsqu'une seule des substitutions est présente (Chevaliez et al., Hepatology 2009 ; 49(4):1397-8).

Patient	Génotype	CAP/CTM (Roche)	$m2000_{SP}/m2000_{RT}$ (Abbott)	bDNA 3.0 (Siemens)
A	4h	Indétectable <12 UI/mL	5,0 log UI/mL	5,4 log UI/mL
B	4l	Indétectable <12 UI/mL	5,7 log UI/mL	6,0 log UI/mL

Les nouveaux inhibiteurs spécifiques du VHC (inhibiteurs de protéases et de la réplication virale) peuvent avoir une activité antivirale différente vis-à-vis des différents sous-types de VHC de génotype 1. La barrière génétique à la résistance et les profils de résistance observés varient également en fonction des différents sous-types du VHC de génotype 1. La détermination précise du sous-type du génotype 1 est donc indispensable dans le contexte du développement et de l'optimisation des nouveaux traitements de l'hépatite C. Cinq cents patients infectés par un VHC de génotype 1 inclus dans un essai thérapeutique multicentrique français ont été étudiés. L'analyse phylogénique d'une portion de la région codant la protéine non structurale NS5B (méthode de référence) a permis de montrer que 237 d'entre eux étaient infectés par un VHC de sous-type 1a et 263 par un VHC de sous-type 1b. La capacité des méthodes commerciales suivantes d'identifier correctement le sous-type des souches de VHC de génotype 1 a été évaluée : (a) analyse d'une portion de la séquence nucléotidique de la région 5'NC (Trugene HCV 5'NC Assay, Siemens) ; (b) hybridation inverse avec la bandelette INNO-LiPA de première génération utilisant des sondes oligo-nucléotidiques ciblant la région 5'NC (LiPA HCV 1.0, Innogenetics) ; (c) bandelette INNO-LiPA de deuxième génération utilisant des sondes ciblant les régions 5'NC et codant la protéine de capsid ; (d) PCR en temps réel utilisant des amorces spécifiques du génotype et du sous-type ciblant les régions 5'NC et NS5B (Abbott). Les performances de chaque trousse dans la différenciation des souches de sous-type 1a ou 1b sont présentées ci-dessous.

	Analyse phylogénique de la région 5'NC	1 ^{er} génération Line Probe assay (LiPA 1.0)	2 ^e génération de Line Probe assay (LiPA 2.0)	PCR en temps réel
1a (n=237)	72,2% (n=171)	69,6% (n=165)	97,5% (n=231)	92,8% (n=220)
1b (n=263)	90,4% (n=238)	91,2% (n=240)	96,2% (n=253)	86,3% (n=227)

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

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 analysées 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 (Chevaliez et al., manuscrit en préparation).

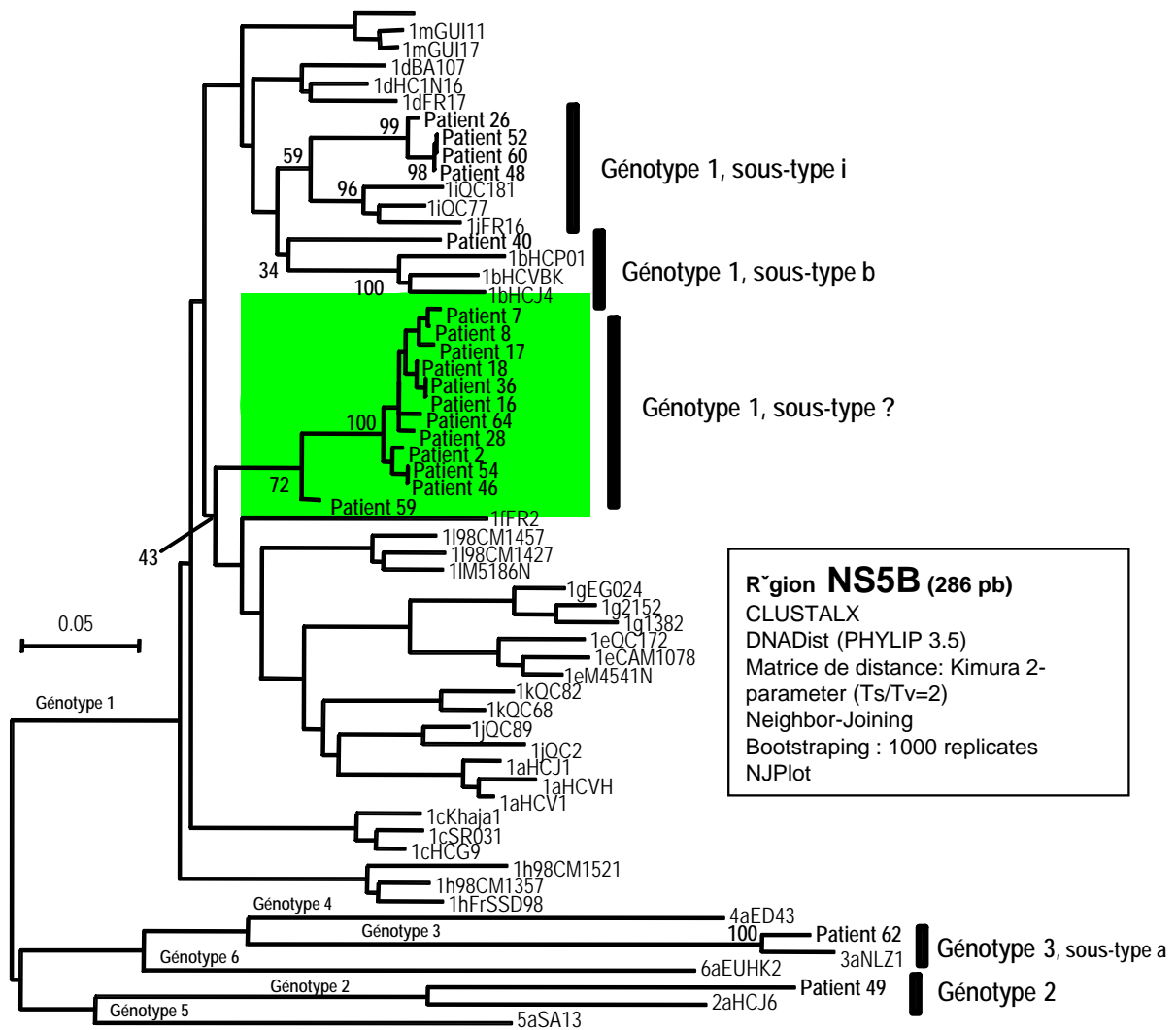


Figure 3 : Détermination du génotype du VHC par analyse phylogénique d'une portion de la région NS5B (286 nucléotides). Les chiffres en gras correspondent aux valeurs de ré-échantillonnages après 1000 réplicats.

En réponse à des demandes spécifiques de services cliniques ou laboratoires de biologie, le CNR des hépatites B, C et delta a étudié la réactivation virale B chez un patient transplanté rénal qui avait, au moment de sa greffe, un profil sérologique d'hépatite ancienne et guérie avec un titre en anticorps anti-HBs de 31 mUI/mL. Le cas étudié a permis de mettre en évidence une substitution amino acide au niveau du déterminant « a » de la région hydrophile majeure (G145R), couramment décrite comme associée à des modifications des structures antigénique et immunologique de l'antigène HBs, ainsi que deux substitutions localisées en dehors de ce domaine, respectivement aux positions 175 (L175S) et 178 (P178L). Aucune

délétion n'a été mise en évidence au niveau des régions PréS codant la grande et la moyenne glycoprotéine de surface du VHB. Les anticorps anti-HBs présents en faible quantité n'étaient plus capables de reconnaître les virus portant un déterminant « a » muté. Cette réactivation virale est probablement à mettre en relation avec le degré d'immunosuppression, en particulier le traitement par l'acide mycophénolique et les glucocorticoïdes, comme cela a été suggéré dans certaines études (manuscrit en préparation).

2.4- Investigation des cas isolés et groupés de transmission

L'investigation des cas groupés de transmission du VHB et du VHC ou des cas isolés de transmission nosocomiale de ces virus a donné lieu à plusieurs études. Une première étude a concerné un cas de transmission nosocomiale d'infection par le VHC au cours d'une endoscopie, en l'absence d'autres facteurs de risque. Le support de la transmission pourrait être l'endoscope. L'analyse génétique et phylogénique de plusieurs régions du génome viral (region HVR1 et régions codant les protéines E1 et NS5B) de prélèvements issus de trois patients, un patient source potentiel et deux cas index, suggèrait fortement que les trois patients étaient infectés par la même souche de VHC (Figure 4). Le caractère nosocomial de la transmission de l'infection virale C au cours du geste invasif est donc probable.

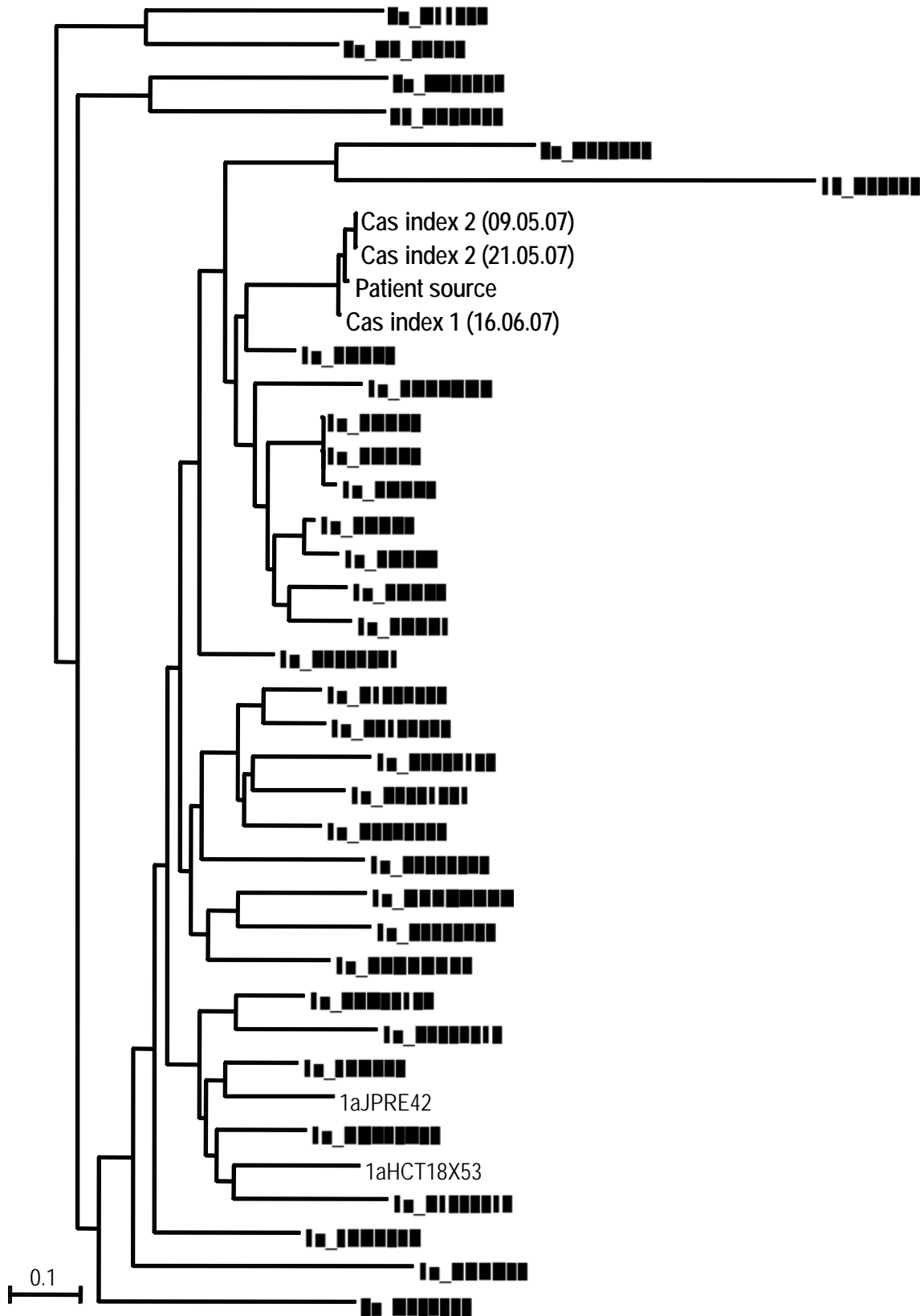


Figure 4 : Arbre phylogénique construit à partir des séquences codant la région hypervariable 1 (HVR1) de la glycoprotéine d'enveloppe E2, d'une longueur de 81 nucléotides. La construction des arbres phylogéniques a été réalisée par la méthode

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 $Ts/Tv=2,0$.

Une étude de transmission du VHC a été réalisée chez 2 patients suivis dans une unité de dialyse à la clinique du Tonkin à Villeurbanne. 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 4 non sous-typable. 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 98,5% et 92,6%, soit 8 et 6 différences nucléotidiques respectivement pour les régions HVR1 et E1). L'étude des régions codant la glycoprotéine d'enveloppe E1 et HVR1 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 incluses 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 VHC 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 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'adefovir. Cinquante patients (74% d'hommes, d'âge moyen 51 ± 11

années) ont été traités par la combinaison de lamivudine, 100 mg/jour, et d'adéfovir, 10 mg/jour, 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 viraux 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 d'addition, prévient l'apparition de la résistance à l'une ou l'autre des deux molécules. La substitution amino-acidique en position 181 (rtA181V) confère la résistance aux deux molécules et est responsable d'une faible incidence de résistance du VHB chez les 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 (Lille, Bordeaux, Grenoble).

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), et avons analysé la fréquence de la sélection de variants résistants à ces molécules et la dynamique de ces variants au cours et après le traitement.

Dans l'étude de Phase II PROVE-2, coordonnée par le Professeur Jean-Michel Pawlotsky et récemment publiée dans le *New England Journal of Medicine* (Hézode et al., N Engl J Med 2009 ; 360(18) : 1839-50), évaluant l'activité antivirale du telaprevir chez 320 patients naïfs de tout traitement infectés par un VHC de génotype 1, 20 malades ont été inclus dans le service d'Hépatologie de l'hôpital Henri Mondor. Six patients (4 de sous-type 1a et deux de sous-type 1b) recevant le telaprevir à la dose de 750 mg toutes les 8 heures en association à l'interféron alpha-2a pégylé à la dose de 180 µg par semaine sans ribavirine pendant 12 semaines ont rechuté sous traitement (non-répondeurs) ou après l'arrêt de celui-ci (répondeurs-rechuteurs), tandis que deux patients sous trithérapie associant le telaprevir, l'interféron alpha pégylé et la ribavirine n'ont pas éliminé le virus. Pour chaque patient, la population virale sauvage a été remplacée par un mélange complexe de variants viraux portant des substitutions amino acidiques connues pour conférer la résistance au telaprevir (V36L/M/A, T54A/S, R155K/E/T/A). Ces populations fluctuaient au cours du temps en fonction de la pression de sélection imposée par le

traitement. De plus, la plupart des variants résistants sélectionnés par le traitement portaient des changements amino-acidiques supplémentaires (R26K, A40T, T42S, Y56F, T91A, G174S). La modélisation tridimensionnelle de la protéase NS3 suggèrait qu'aucune de ces mutations nouvellement identifiées n'affecte la liaison du télaprévir à son site catalytique, à l'exception peut-être des mutations en positions 42 et 40. Dans le système du réplicon subgénomique du VHC, ces mutations supplémentaires ne semblent pas modifier la sensibilité au télaprévir, ce qui suggère que leur sélection est associée à une augmentation des capacités répliquatives des variants résistants au télaprévir. En conclusion, les rechutes en cours de traitement par télaprévir et interféron pégylé associé ou non à la ribavirine ou après l'arrêt de celui-ci sont associées à la sélection de mélanges complexes de variants viraux portant des substitutions amino acidiques qui confèrent une résistance au télaprévir avec une augmentation du fitness des souches résistantes au télaprévir (Chevaliez et al., manuscrit en préparation). Une nouvelle substitution amino acidique conférant la résistance a été identifiée en position 36 (V36C) chez un patient sous trithérapie ayant arrêté son traitement précocement. Cette nouvelle mutation augmente d'un facteur 8,6 la concentration de telaprevir nécessaire pour inhiber 50% de la réplication virale (IC50). Les autres paramètres (capacité de réplication in vitro et paramètres pharmacocinétiques) ne sont pas modifiés par rapport à la souche sauvage (Barbotte et al., manuscrit soumis).

Une étude similaire a été réalisée chez des patients recevant le boceprevir : l'étude de Phase II SPRINT-1, qui évalue l'efficacité antivirale de ce dernier chez 400 malades naïfs de tout traitement infectés par un VHC de génotype 1. Six malades ont été inclus dans le service d'Hépatologie de l'hôpital Henri Mondor : 2 patients de sous-type 1a recevant le traitement standard (interféron alpha-2b pégylé et ribavirine) pendant les 4 premières semaines, suivi de la combinaison du boceprevir à la dose de 800 mg 3 fois par jour à l'interféron alpha-2b pégylé à la dose de 1,5 µg/kg/semaine et à la ribavirine pendant les 24 semaines suivantes ont rechuté après l'arrêt du traitement (répondeurs-rechuteurs), et 1 patient a rechuté sous trithérapie associant boceprevir d'emblée, interféron alpha-2b pégylé et ribavirine. Pour chaque patient, la population virale sauvage a été remplacée par un mélange plus ou moins complexe de variants viraux portant des substitutions amino acidiques connues pour conférer la résistance au boceprevir (V63L, T54S, R155K, I170V). La

plupart des variants résistants sélectionnés par le traitement portent des mutations supplémentaires (A29V, Q89P, V107I, T98A, G122S).

Au cours de l'année 2008, 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) et de l'hôpital Intercommunal de Créteil.

Cette troisième année du CNR a été consacrée à la poursuite de la mise en place des outils de la plate-forme de surveillance de la résistance des virus d'hépatites en France. Cette plate-forme s'appuiera sur la création prochaine d'une nouvelle action coordonnée (AC) au sein de l'ANRS consacrée à la "Résistance des virus d'hépatites aux antiviraux", présidée par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY. Le principe de cette création a été accepté par le Directeur de l'ANRS. Les objectifs de cette nouvelle AC sont :

- 1- De constituer un groupe de réflexion et d'action pluri-disciplinaire sur la problématique de la résistance du VHB et du VHC aux antiviraux.
- 2- De coordonner l'action des services cliniques (en collaboration avec la Fédération Nationales des Pôles de Référence et Réseaux Hépatites), des laboratoires de virologie, et des plates-formes de recherche existantes.
- 3- De développer et mettre en place de nouvelles technologies appliquées à l'étude de la résistance des virus d'hépatites.
- 4- De mettre en place une base de données centralisées de la résistance du VHC et du VHB, en coordination avec le group HCV DRAG (Drug Resistance Advisory Group) animé par le Forum for Collaborative HIV Research.
- 5- De mettre en place un observatoire national de la résistance du VHB aux antiviraux.
- 6- De mettre en place une Cohorte de malades infectés par le VHC naïfs et non répondeurs traités, afin d'assurer de façon prospective, dans le contexte d'une montée en charge prochaine de l'utilisation des nouvelles molécules, la recherche en épidémiologie, en virologie et en thérapeutique sur la résistance du VHC.

- 7- De mettre en place un Réseau d'analyse de la résistance croisée, fondé sur l'analyse systématique par les plates-formes existantes de la sensibilité aux nouveaux antiviraux de toutes les substitutions décrites comme conférant la résistance à une molécule disponible sur le marché ou en développement.
- 8- D'assurer la centralisation et la veille scientifique via un site internet dédié (publications, analyses et commentaires, résultats des études institutionnelles et industrielles,)

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

Les activités du CNR en matière de surveillance sur le plan national qui étaient connectées jusqu'à fin 2008 avec le réseau d'excellence européen ViRgil (Combating Viral Resistance to Treatments), seront désormais connecté avec le futur réseau européen ViRgil-HEP dont la coordination sera assurée par le Professeur Michael MANNES (Hochschule Hanover, Hanovre, Allemagne) et le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY. Ce réseau européen prendra la suite des activités du réseau d'excellence européen VirGil, et 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

2008

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. Keeffe EB, Dieterich DT, Pawlotsky JM, Benhamou Y. Chronic hepatitis B: preventing, detecting and managing viral resistance. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2008; 6: 268-274.
5. 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.
6. 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; 43(1): 73-80.
7. 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; 48(1): 16-27.
8. Germanidis G, Metallidis S, Lazaraki G, Pawlotsky JM, Nikolaidis P. NS5A sequences of hepatitis C virus genotype 1 and interferon resistance: where are we? **J Infect Dis** 2008; 198: 154-155.
9. 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; 48(6): 932-8.
10. 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; Mar 24.
11. 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; 135(4): 1185-91.
12. Pawlotsky JM. Building a liver disease policy in the European Union. **J Hepatol** 2008; 48(6): 889-91.
13. Girou E, Chevaliez S, Challine D, Thiessart E, Morice Y, Lesprit P, Tkoub-Scheirlinck, L, Soing-Altrach S, Cizeau F, Cavin C, André M, Lang P, Pawlotsky JM. The determinant role of environment in patient-to-patient transmission of hepatitis C virus. Investigation in a chronic hemodialysis unit. **Clin Infect Dis** 2008; 47(5): 627-33.
14. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, Craxi A, Donato F, Ferrari C, Gaeta GB, Gerlich WH, Levrero M, Locarnini S, Michalak T, Mondelli MU, Pawlotsky JM, Pollicino T, Prati D, Puoti M, Samuel D, Shouval D, Smedile A, Squadrito G, Trépo C, Villa E, Will H, Zanetti AR, Zoulim F. Statements from the Taormina Expert Meeting on occult hepatitis B virus infection. **J Hepatol** 2008; 49: 652-657.
15. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: antigens, antibodies and viral genomes. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2008; 22(6): 1031-48.

2009

16. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Interferons and their use in persistent viral infections. **Handb Exp Pharmacol** 2009; 189: 203-41.
17. Pallier C, Rodriguez C, Brillet R, Nordmann P, Hézode C, Pawlotsky JM. Complex dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir dipivoxil. **Hepatology** 2009; 49: 50-59.
18. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Castéra L, Pawlotsky JM. The Cobas Ampliprep/Cobas Taqman real-time PCR assay fails to detect hepatitis C virus RNA in highly viremic genotype 4 clinical samples. **Hepatology** 2009; 49(4): 1397-1398.
19. Pawlotsky JM. EASL Clinical Practice Guidelines. **J Hepatol** 2009; 50: 243.
20. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. **J Hepatol** 2009; 50: 227-242
21. Chevaliez S, Pawlotsky JM. How to use the virological tools for the optimal follow-up of chronic hepatitis C. **Liver Int** 2009; 29(s1): 9-14.
22. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virological techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B and C. **Ann Hepatol** 2009; 8(1): 7-12.
23. Morice Y, Ratiner M, Miladi A, Germanidis G, Chevaliez S, Wedemeyer H, Laperche S, Lavergne JP, Pawlotsky JM. Seroconversion against hepatitis C virus alternate reading frame protein during the acute infection. **Hepatology** 2009; 49(5) : 1449-1459.
24. Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, Bronowicki JP, Bourlière M, Gharakhanian S, Bengtsson L, McNair L, Kauffman RS, Alam J, Pawlotsky JM, Zeuzem S. Telaprevir and peginterferon-alfa-2a with or without ribavirin in chronic hepatitis C. **N Engl J Med** 2009; 360(18) : 1839-1850.
25. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM. Performance of the Abbott *m2000_{SP}/m2000_{RT}* real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus RNA quantification. **J Clin Microbiol** 2009 ; in press.

PUBLICATIONS NATIONALES

2008

1. Pawlotsky JM. Les techniques virologiques de diagnostic et de suivi de l'hépatite B. **Gastroenterol Clin Biol** 2008; 32: S56-S63.
2. Chevaliez S. Tests virologiques dans les hépatites B et C. **Hepato-Gastro** 2008 ; 15(5) : 345-353.

CHAPITRES DE LIVRES

I- LIVRES INTERNATIONAUX

2008

1. Pawlotsky JM. Hepatitis virus resistance. In: Antimicrobial resistance and implications for the 21st century. Fong IW, Drlica K, eds. Springer Science, New York (USA), 2008: 291-323.
2. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus variability and its consequences. In: BC/VH Viral Hepatitis. Buti M, Esteban R, eds. Schering-Plough Editions, Barcelona (Spain), 2008: 236-248.

II- LIVRES FRANCOPHONES

2008

3. Pawlotsky JM. Hépatite C: virologie. In: Hépatites virales. Marcellin P, Asselah T, eds. Doin, Rueil-Malmaison, France, 2008: 117-128.

2009

4. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Marqueurs virologiques de l'hépatite B et utilisation des tests. In : Hépatite B. Pawlotsky JM, Dhumeaux D, eds. EDK, Paris, France, 2009.
5. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Prévention, diagnostic et prise en charge de la résistance aux analogues nucléos(t)idiques. In : Hépatite B. Pawlotsky JM, Dhumeaux D, eds. EDK, Paris, France, 2009.
6. Pawlotsky JM. Variabilité génétique du virus de l'hépatite B. In : Hépatite B. Pawlotsky JM, Dhumeaux D, eds. EDK, Paris, France, 2009.

COMMUNICATIONS ORALES

I- INTERNATIONALES

2008

57. Dusheiko GM, Hezode 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. 43rd 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. 43rd 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).
59. Chevaliez S, Barbotte L, Ahmed-Belkacem A, Soulier A, Hezode C, Pawlotsky JM. Characterization of a new amino acid substitution (V36C) associated with telaprevir (VX-950) resistance in a patient treated with telaprevir, peginterferon alpha-2a and ribavirin. 50th Anniversary Meeting of the International Association for the Study of the Liver (IASL), San Francisco (USA), 31 Octobre- 2 novembre 2008.

2009

60. Chevaliez S, Ahmed-Belkacem A, Barbotte L, Soulier A, Bartels D, Zhou Y, Ardzinski A, Mani N, Rao G, Hezode C, George S, Kwong A, Pawlotsky JM. Molecular characterization of HCV resistance to telaprevir, a novel, potent HCV protease inhibitor. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen (Danemark), 22-26 avril 2009.
61. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlotsky JM. HCV genotype 1 subtype identification, a crucial step in new HCV drug development. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen (Danemark), 22-26 avril 2009.

I- NATIONALES

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^e 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^e Journées Francophones de Virologie, Paris, 27-28 mars 2008 (Abstract : Virologie 2008 ; 12 : S42).

CONFERENCES SUR INVITATIONS

I- INTERNATIONALES

2008

1. **Pawlotsky JM.** "Building a liver disease policy in the European Union". 15th Annual Viral Hepatitis B and C Meeting, Athens (Greece), 26-27 janvier 2007.
2. **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 ?". 15th Annual Viral Hepatitis B and C Meeting, Athens (Greece), 26-27 janvier 2007.
3. **Pawlotsky JM.** "New antiviral options in hepatitis C". 11th International Symposium "Current Topics in Infectious Diseases", Grindelwald (Switzerland), 27 janvier-1er février 2008.
4. **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.
5. **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.
6. **Pawlotsky JM.** "Specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C". 11th Interdisciplinary Winter Meeting, Obergugl (Austria), 1-6 mars 2008.
7. **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.
8. **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.
9. **Pawlotsky JM.** "Antiviral drug resistance and its prevention in chronic hepatitis B". Bristol-Myers Squibb Chinese Infectology Symposium, Seoul (Korea), 22 mars 2008.
10. **Pawlotsky JM.** "New HCV therapy in the pipeline". 18th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Seoul (Korea), 23-26 mars 2008.

11. **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.
12. **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.
13. **Pawlotsky JM.** "HCV resistance to antivirals: mechanisms and clinical implications". ViRgil-EASL Joint Workshop, 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan (Italy), 23-27 avril 2008.
14. **Pawlotsky JM.** "Summary of EASL activities". 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan (Italy), 23-27 avril 2008.
15. **Pawlotsky JM.** "Targets for HCV therapy". 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan (Italy), 23-27 avril 2008.
16. **Pawlotsky JM.** "Putting viral hepatitis on the global agenda". World Hepatitis Day Press Conference, World Health Organization, Genève (Switzerland), 19 mai 2008.
17. **Pawlotsky JM.** "Tackling the silent killer: prioritising viral hepatitis research". European Association for the Study of the Liver-European Liver Patients Association World Hepatitis Day Event, European Parliament, Strasbourg (France), 20 mai 2008.
18. **Pawlotsky JM.** "New targets and new drugs for hepatitis C treatment". 5th Annual Meeting of the ViRgil European Network of Excellence on Viral Resistance, Lyon, France, 27 mai 2008.
19. **Pawlotsky JM.** "New targets and new drugs for hepatitis C treatment". 5th Annual Meeting of the ViRgil European Network of Excellence on Viral Resistance, Lyon, France, 27 mai 2008.
20. **Pawlotsky JM.** "New targets and new drugs for hepatitis C treatment". 5th Annual Meeting of the ViRgil European Network of Excellence on Viral Resistance, Lyon, France, 27 mai 2008.
21. **Pawlotsky JM.** "Critical overview of new HBV treatment guidelines" Gilead symposium on hepatitis B therapy, Vouliagmani, (Greece), 30-31 mai 2008.
22. **Pawlotsky JM.** "Monitoring patients, using virology to assess disease stage, response to therapy and risk of progression". 4th European Interactive Summit on Hepatitis, Amsterdam (The Netherlands), 6-8 juin 2008.
23. **Pawlotsky JM.** "Resistance mutations in hepatitis C". Hong Kong-Shanghai International Liver Congress 2008, Hong Kong (China), 12-15 juin 2008.
24. **Pawlotsky JM.** "Emerging therapies for hepatitis C". Hong Kong-Shanghai International Liver Congress 2008, Hong Kong (China), 12-15 juin 2008.
25. **Pawlotsky JM.** "The roles of interferon and nucleoside analogues in the therapy of chronic hepatitis B". Hong Kong-Shanghai International Liver Congress 2008, Hong Kong (China), 12-15 juin 2008
26. **Pawlotsky JM.** "Monitoring and detection of HBV antiviral resistance". Distinguished Resistance Faculty Meeting, Barcelona (Spain), 19 juin 2008.
27. **Pawlotsky JM.** "HCV variability and its consequences". 9th International Symposium on Viral Hepatitis, Barcelona (Spain), 20-21 juin 2008.

28. **Pawlotsky JM.** "Virology for the clinician". European Tenofovir Launch Meeting, Berlin (Germany), 27-28 juin 2008.
29. **Pawlotsky JM.** "HBV mutations and alterations in therapy based on viral kinetics". American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Single Topic Conference "Viral hepatitis therapy: lessons to be learned from HIV", Chicago (USA), 24-26 juillet 2008.
30. **Pawlotsky JM.** "Resistance mutations in hepatitis C". Merck HCV Global Therapeutic Expert Forum, Philadelphia (USA), 8-9 septembre 2008.
31. **Pawlotsky JM.** "Past, present and future of hepatitis C therapy". University of Pennsylvania Grand Rounds in Gastrointestinal Diseases, U Penn, Philadelphia (USA), 10 septembre 2008.
32. **Pawlotsky JM.** "Hepatitis C therapy: from empiricism to eradication". 20th Congress of the Latin-American Association for the Study of the Liver, Isla Margarita (Venezuela), 15-17 septembre 2008.
33. **Pawlotsky JM.** "Virological diagnosis in the treatment of chronic hepatitis C". 20th Congress of the Latin-American Association for the Study of the Liver, Isla Margarita (Venezuela), 15-17 septembre 2008.
34. **Pawlotsky JM.** "New molecules in the treatment of hepatitis C". 20th Congress of the Latin-American Association for the Study of the Liver, Isla Margarita (Venezuela), 15-17 septembre 2008.
35. **Pawlotsky JM.** "Current and future challenges in HCV treatment and patient management: role of molecular diagnostics". Abbott Molecular Hepatitis Meeting, Des Plaines (USA), 10 octobre 2008.
36. **Pawlotsky JM.** "Advances in development of new HCV antivirals". 16th United European Gastroenterology Week, Vienna (Austria), 18-22 octobre 2008.
37. **Pawlotsky JM.** EASL Clinical Practice Guidelines on management of hepatitis B", Gilead International pre-AASLD HBV Meeting, Foster City (USA), 30 octobre 2008.
38. **Pawlotsky JM.** "Clinical significance of resistance to nucleos(t)ides in the treatment of hepatitis B infection".
39. **Pawlotsky JM.** "Hepatitis C : optimizing current therapies using viral kinetics". Post-Graduate Course Meet-the-Professor Luncheon, 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), San Francisco (USA), 31 octobre-4 novembre 2008.
40. **Pawlotsky JM.** "New aspects in hepatitis C therapy". Japanese Satellite Symposium, 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), San Francisco (USA), 31 octobre-4 novembre 2008.
41. **Pawlotsky JM.** "The future of hepatitis therapy: facts and issues". Mayo Clinic Grand Rounds in Gastroenterology and Hepatology, Rochester (USA), 6 novembre 2008.
42. **Pawlotsky JM.** "Clinical applications of hepatitis C virus quasispecies". 30th Anniversary of the discovery of viral quasispecies, Symposium organized by the Catalan Society for Virology, Barcelona (Spain), 18 novembre 2008.
43. **Pawlotsky JM.** "EASL HBV guidelines in practice". Hepatology Perspectives, Barcelona (Spain), 19 novembre 2008.

44. **Pawlotsky JM.** "Crossresistance". Bristol-Myers Squibb International Symposium on Hepatitis B Therapy, Istanbul (Turkey), 12-13 décembre 2009.
45. **Chevaliez S.** "Baraclude Faculty Masterclass". Hôtel Schératon, Aéroport Charles de Gaulle, Paris, France, 1-2 février 2008.
46. **Chevaliez S.** "Intérêts de la quantification du VHC en pratique clinique". Madrid, Espagne, 28 février 2008.
47. **Chevaliez S.** "Qu'est-ce que la PCR en temps réel change dans la prise en charge des hépatites virales". Early Morning Workshop, 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Milan, Italie, 26 avril 2008.

2009

48. **Pawlotsky JM.** "How to use virological tools for the optimal follow-up of chronic hepatitis C ?". 3rd Paris Hepatitis Conference, Paris (France), 19-20 janvier 2009.
49. **Pawlotsky JM.** "Progress and challenge in the development of small molecule inhibitors of HCV". 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Montreal (Canada), 8-11 février 2009.
50. **Pawlotsky JM.** "The role of HBV DNA monitoring". 19th Conference of the Asian-Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Hong Kong (China), 13-16 février 2009.
51. **Pawlotsky JM.** "Nomenclature and diagnosis of HBV resistance". 19th Conference of the Asian-Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Hong Kong (China), 13-16 février 2009.
52. **Pawlotsky JM.** "French HCV screening policy". Annual Meeting of the Israeli Society for the Study of the Liver, Kfar Blum (Israel), 5-6 mars 2009.
53. **Pawlotsky JM.** "EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B". Annual Meeting of the Israeli Society for the Study of the Liver, Kfar Blum (Israel), 5-6 mars 2009.
54. **Pawlotsky JM.** "Progress and challenges in hepatitis C therapy". Biotica, Cambridge (UK), 10 mars 2009.
55. **Pawlotsky JM.** "Development of small molecule HCV inhibitors". Merck Advisory Meeting, Annapolis (USA), 19 mars 2009.
56. **Pawlotsky JM.** "What is the mechanism of interferon's antiviral action against HCV and mechanisms of resistance". Roche Research Advisory Board Meeting, Washington, 20 mars 2009.
57. **Pawlotsky JM.** "Future approaches to therapy of HCV infection". 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases, Washington (USA), 20-24 mars 2009.
58. **Pawlotsky JM.** "Monitoring of treatment efficacy and antiviral drug resistance". EASL-ViRgil Joint Workshop, The International Liver Congress 2009, 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen (Denmark), 22-26 avril 2009.

59. **Chevaliez S.** "Early monitoring of viral responses in viral hepatitis treatment decisions". Early Morning Workshop, 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen, Denmark, 25 avril 2009.

II- NATIONALES

2008

1. **Pawlotsky JM.** "Hépatite C: quelles nouvelles molécules pour demain ?". Journées Roche "Hépatites virales", Paris, 1^{er}-2 février 2008.
2. **Pawlotsky JM.** "Les hépatites en Europe: état des lieux", Colloque "Hépatites Virales", Sénat (Palais du Luxembourg), Paris, 27 mars 2008.
3. **Pawlotsky JM.** "Peut-on se passer du point de vue du virologue dans le VHB ?". Réunion de lancement Viread, Paris, 23 octobre 2008".
4. **Chevaliez S.** "Quantification de l'ARN du VHC : intérêt et limites ; Mécanismes d'action de la ribavirine dans le traitement de l'hépatite chronique C". Conférence dans le service d'Hépatologie et de Gastroentérologie de l'hôpital Saint Antoine, Paris, 28 novembre 2008.

2009

5. **Chevaliez S.** "Prise en charge de l'hépatite B : Comprendre et diagnostiquer les résistances". Workshop Bristol-Mayers Squibb, Paris, 9 février 2009.
6. **Chevaliez S.** "Résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques". Conférence dans le service d'Hépatologie et de Gastroentérologie de l'hôpital Henri Mondor, Créteil, 1 avril 2009.

5- PROGRAMME D'ACTIVITE 2010-2011

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 de l'action coordonnée "Résistance des virus d'hépatites aux antiviraux" au sein 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 sur papier buvard pour la détection et éventuellement la quantification de l'ARN du VHC et de l'ADN du VHB, le génotypage des souches et l'étude de la résistance primaire aux antiviraux, ainsi que la détection des anticorps anti-VHC totaux et anti-VHB (IgM anti-HBc) dans le cadre de la déclaration obligatoire des nouvelles infections VHB symptomatiques.

III

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

**Institut National de la Transfusion Sanguine
Paris**

Rapport d'activité 2008
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^{er} janvier 2008. L'accréditation a été confortée lors de l'audit de suivi d'octobre 2008.

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

Trois secteurs d'activités peuvent être individualisés :

1) un secteur dit "d'expertise et de référence" comprenant des unités fonctionnelles distinctes permettant d'assurer, d'une part, les activités appartenant à l'immuno-sérologie et d'autre part,

les activités dédiées à la biologie moléculaire qui bénéficient de structures individualisées et séparées les unes des autres conformément aux exigences du GBEA.

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

3) un secteur occupé par les activités de virologie fondamentale avec notamment trois pièces dédiées à la culture virale sous un confinement de type P2.

2/ Activités d'expertise :

2-1 Capacités techniques du CNR

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

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

Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

Pour le VHB :

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

Pour le VHC :

Nous disposons de divers panels d'échantillons plasmatiques

Ceux-ci comprennent principalement :

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

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

2.2 Activités d'expertise de l'année 2008

Expertise dans le domaine de la sécurité transfusionnelle

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

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

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

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

Dans ce cadre, nous avons comparé les performances des 2 réactifs de dépistage combinés de l'Ag de capsid du VHC et des anticorps anti-VHC disponibles, dans leur capacité à détecter l'infection précoce de l'infection par le VHC sur des panels de séroconversions commerciaux et internes. Ces réactifs (Monolisa Ag/Ab HCV Ultra, Biorad, Murex HCV Ag/Ab combinaison, Abbott), en détectant 30 à 40% des sérums ARN positifs et Ac négatifs prélevés en phase très précoce de l'infection permettent de réduire la fenêtre sérologique et donc le risque transfusionnel lié au VHC. Ces outils sont une excellente alternative au dépistage génomique viral dans les dons de sang en particulier dans les pays où la recherche systématique de l'ARN ne peut être introduite. Les résultats de cette étude, en cours de publication, constituent une aide appréciable pour le choix des techniques à utiliser dans la qualification biologique des dons dans les pays en voie de développement.

Les contrôles de qualités

1) En France

Divers panels d'échantillons contenant du VHC ont été préparés dans le cadre de contrôles de qualité organisés par l'Agence nationale de recherche sur le SIDA et les Hépatites virales (ANRS). Nous avons coordonné deux études successives destinées à valider l'expertise des laboratoires appelés à collaborer à des protocoles multicentriques sous l'égide de l'ANRS, (groupe AC11) pour la détermination des génotypes du VHC et la détermination de la charge virale.

Les résultats de la première étude, (Laperche et al. J.Clin.Microbiol 2007 ;45 :3788-3790) impliquant 20 laboratoires avaient montré que les tests utilisés pour la détermination de la charge virale VHC fournissaient des différences non pas dues à une variation interlaboratoires mais à la nature même du réactif. Un net progrès avec des performances accrues en terme de sensibilité, a pu être constaté avec les nouveaux outils de PCR en temps réel utilisés essentiellement dans leur version automatisée.

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

Lors de cette dernière étude, il est apparu que certains échantillons négatifs pour l'ARN VHC fournissaient des résultats positifs mais inférieurs au seuil de détection de la technique. Ceci constituait des résultats faussement positifs qui pouvaient avoir un impact dans un suivi thérapeutique. De plus, un résultat de ce type était rendu alternativement positif ou négatif en fonction du laboratoire. L'objectif d'harmoniser le rendu des résultats sur des échantillons présentant des charges virales faible ou nulles, des laboratoires inclus dans le groupe de travail AC11 de l'ANRS, nous a conduit à constituer un nouveau panel. Celui-ci comprenait 32 échantillons incluant 10 négatifs et 22 ARN-VHC positifs correspondant à 2 échantillons de génotype 1a, dilué à des concentrations théoriques s'échelonnant de 0.5 à 500 UI/ml et 3a à des concentrations théoriques de 0.5 à 300 UI/ml. Alors que les résultats fournis par les automates étaient conformes aux attentes (scores de réponses correctes 98.1%), 44% (8/18) des laboratoires fournissaient une interprétation correcte sur les négatifs et les CV inférieures au seuil de détection, indépendamment des trousseaux et 39% (7/18) ne se prononçaient pas sur les négatifs qui étaient rendus le plus souvent « inférieurs au seuil de détection » et ce indépendamment des trousseaux. Des préconisations spécifiques d'interprétation des CV faibles seront apportées par le groupe de travail.

1) En Afrique

La sécurité transfusionnelle dans les pays émergents reste un problème préoccupant principalement lié aux ressources limitées et aux tests utilisés. Dans l'objectif d'évaluer les performances des réactifs utilisés dans la routine du dépistage des marqueurs viraux chez les donneurs de sang de certains pays d'Afrique, nous avons distribué à 5 pays d'Afrique francophone (Burkina Faso, Mauritanie, Niger, Cameroun, Gabon) un panel de 25

échantillons comprenant 8 négatifs, 5 AgHBs positifs à taux variables, 4 Ac-VHC positifs, 5 Ac-HIV positifs (4 HIV-1, 1 HIV-2), et 3 mélanges des 3 virus 2 à 2. Lors de cette étude (en cours de publication) nous avons mis en évidence un défaut de sensibilité des tests rapides particulièrement marqué pour le dépistage de l'AgHBs, puisque ceux-ci étaient dans cette étude, incapables de détecter un taux d'analyte inférieur à 13 ng/ml et ne présentaient qu'un score de sensibilité à 20%, indépendamment des laboratoires. Ce premier contrôle de qualité doit inciter à poursuivre cette expérience en organisant d'autres opérations de ce type de manière à apporter une aide à l'amélioration de la sécurité transfusionnelle dans ces pays.

Les enquêtes de transmission

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

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

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

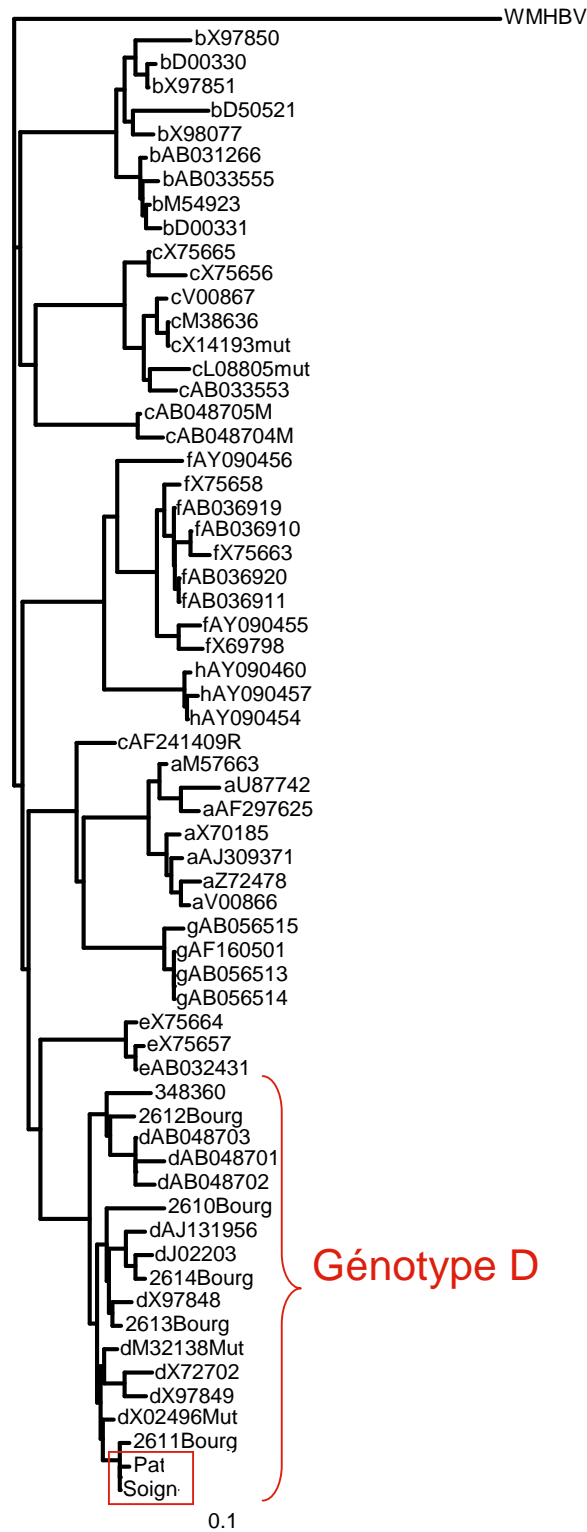
En 2008, nous avons procédé à **4 enquêtes de transmission** en coordination avec l'InVS, les CCLIN régionaux, les DDASS et les établissements hospitaliers concernés et le cas échéant l'EFS: 3 concernaient le VHB (2 enquêtes de suspicion de transmission nosocomiale et 1 enquête de transmission transfusionnelle) et une concernait le VHC dans une unité d'hémodialyse.

Enquête n°1 :

Suite à la séroconversion pour les marqueurs du VHB d'une patiente ayant subi une intervention chirurgicale, l'investigation pratiquée a permis de conclure à une probable transmission de soignant à patient. L'analyse moléculaire suivie d'une étude phylogénique des souches virales sur deux régions indépendantes du génome (région partielle du gène S et région partielle du gène C), a conclu à une infection par un génotype D chez les deux sujets (génotype dont la fréquence est de l'ordre de 30 à 40 % en France) avec une homologie de séquence de 99,8% dans les 2 régions génomiques étudiées (figure 1). L'audit des pratiques a mis en évidence un certain nombre de dysfonctionnements ayant pu jouer un rôle dans cette transmission, sans pour autant permettre d'élucider le mode exact de transmission. Cette

observation rappelle l'importance que revêt le respect des précautions standard et des règles de bonnes pratiques de soins et permet de rappeler le rôle essentiel du médecin du travail des établissements privés en terme de suivi de l'ensemble des professionnels et l'obligation pour tout professionnel médical d'assurer le suivi de leurs employés. Par ailleurs, la réflexion sur l'aptitude des professionnels virémiques effectuant des actes invasifs mérite d'être poursuivie. (BEH 2009 en cours de publication).

Figure 1 : Enquête 1 : analyse phylogénétique d'une région partielle du gène S (436pb), PCR nucléotide 99 à 568 du gène S



Enquête n°2 :

Cette enquête impliquant 4 personnes a été déclenchée à la suite d'une notification à la DDASS du Gard d'une hépatite virale B aiguë chez une jeune fille de 16 ans, dont le seul facteur de risque retrouvé était celui d'avoir eu des séances d'acupuncture réalisées dans un centre « d'énergétique chinoise ». Une inspection du centre constatait un exercice illégal de la médecine, une absence de respect des précautions d'hygiène avec suspicion de réutilisation d'aiguilles. Un arrêté préfectoral de cessation d'activité a été publié et une information des patients ayant eu des soins dans le centre était réalisée par voie de presse et au moyen d'un courrier aux médecins du département.

Ainsi, trois cas supplémentaires d'hépatite B aiguë étaient notifiés chez des personnes ayant reçu des soins d'acupuncture au même endroit durant les 6 mois précédents.

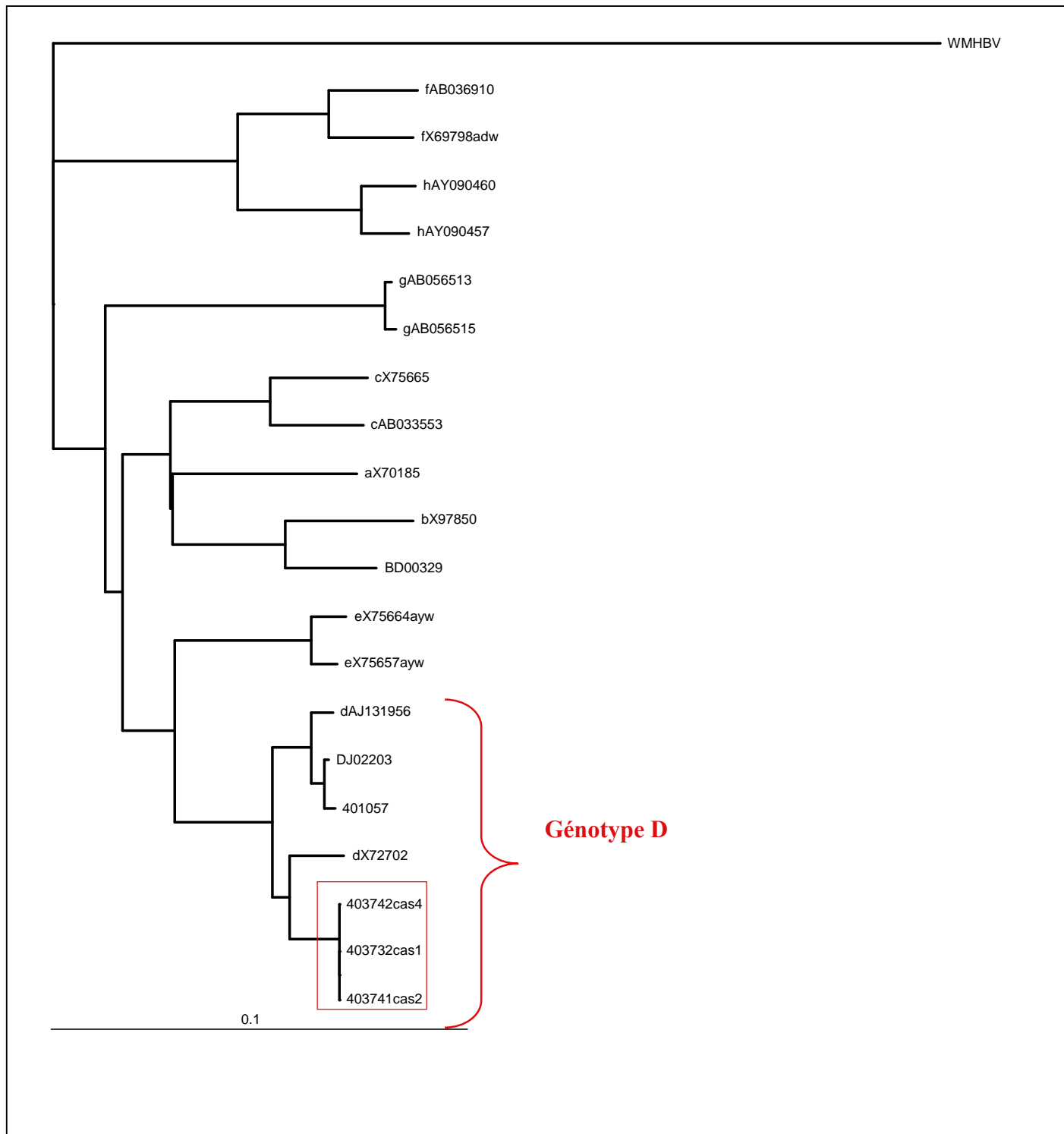
Les investigations moléculaires sur les 4 souches virales de VHB prélevées chez les 4 patientes montraient 4 souches de même génotype D, avec une homologie de 100 % sur les régions analysées (pour 3 souches l'intégralité des génomes viraux a pu être comparée) et l'existence d'une mutation dans le gène S (T131I) retrouvées dans les 4 cas (figure 2). Ces éléments moléculaires dans ce contexte avec une unité de lieu et de temps étaient en faveur d'une source commune de contamination qui n'a cependant pas pu être identifiée.

En l'absence de patient source parmi le personnel, l'hypothèse d'une transmission du virus de l'hépatite B de patient à patient, probablement par l'intermédiaire de matériels souillés et/ou partagés, était la seule pouvant être retenue. A noter que 3 patientes présentent à ce jour (moins de 6 mois après la découverte de l'épisode aigu) des signes biologiques de guérison. L'information n'est pas disponible pour la 4^{ème} patiente. Il s'agit du premier épisode de ce type identifié en France.

Enquête n°3 :

La transmission a été évoquée lors d'une enquête descendante menée après qu'un donneur a été trouvé porteur d'un anti-HBc sans AgHBs alors que le concentré de globules rouges issu du don antérieur (parfaitement négatif pour l'AgHBs et les anti-HBc), réalisé 3 mois auparavant, avait été transfusé. L'ADN viral détecté à un taux toutefois très faible sur la sérothèque de ce don a ainsi pu être comparé à celui du receveur ayant présenté des signes biologiques d'hépatite aiguë avec virémie. Seule l'analyse comparative de la région S a pu être réalisée en raison de la charge virale trop faible chez le donneur ne permettant pas l'étude de la région C chez celui-ci. Les souches étaient de génotype B avec 100% d'homologie. Malgré une analyse limitée à une seule région génomique, la faible fréquence du génotype B en France (de l'ordre de 6%) et les cinétiques biologiques observées étaient en faveur d'un lien entre les souches évoquant une transmission transfusionnelle du VHB. Ce cas de transmission est en accord avec les estimations du risque résiduel de transmission transfusionnelle du VHB (1/1 000 000 en 2005-07). A noter que le receveur a pu bénéficier d'un traitement précoce.

Figure 2 : Enquête 2 : analyse phylogénétique du génome (3060 pb) VHB pour 3 patientes (la troisième ayant une charge virale faible (253 UI/ml) n'a pu être comparée aux 3 autres patientes que sur les régions génomiques S et C)

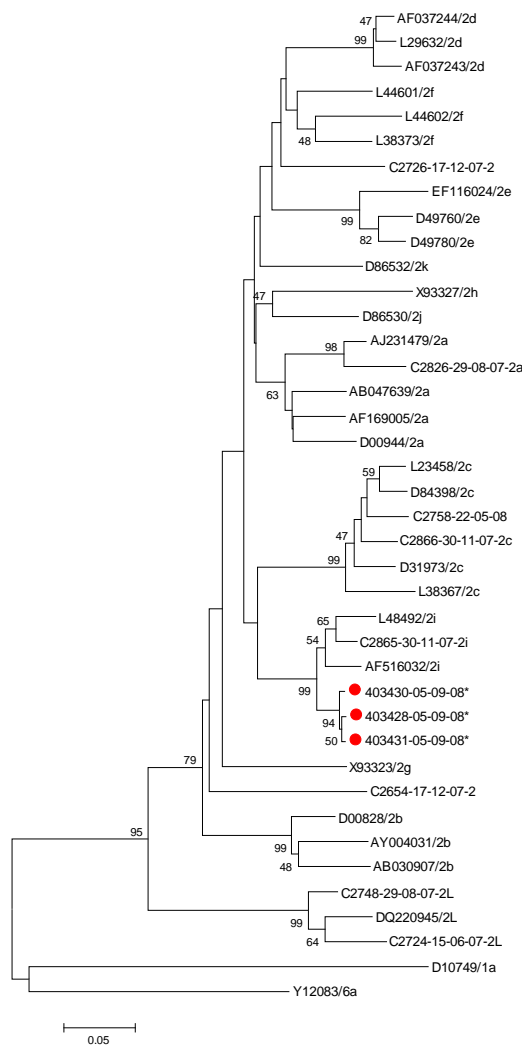


Enquête n°4 :

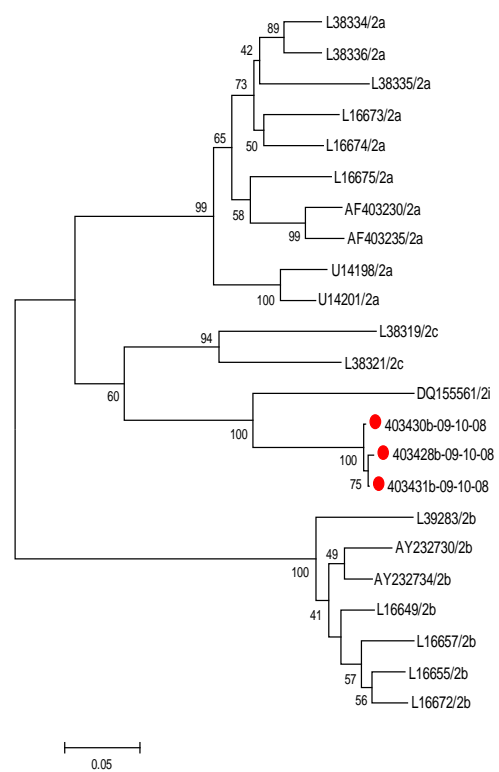
Cette enquête impliquait 3 sujets dans un centre d'hémodialyse et concernait le VHC. Il s'agissait d'un porteur chronique connu (patient source), d'un infirmier ayant été exposé par AES et d'une séroconversion chez un patient découvert lors d'un suivi systématique. Deux régions partielles de 2 régions génomiques indépendantes (NS5B et E1) du virus ont été analysées et ont révélé un génotype identique (2i dont la fréquence en France est de l'ordre de 2%) et des homologies de séquences allant de 98.3 à 99.5% entre les souches comparées 2 à 2 (figure 3). La faible fréquence du génotype 2i, les pourcentages élevés d'homologie dans 2 régions distinctes du génome viral et l'unité de lieu pour les sujets impliqués étaient en faveur d'une source commune de contamination. Comme précédemment pour le VHB, cette observation rappelle l'importance que revêt le respect des précautions standard et des règles de bonnes pratiques de soins.

Figure 3 : Enquête 4 : Comparaison phylogénique des 3 souches VHC des sujets impliqués

Région NS5B



Région E1



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: 38 jours pour l'Ag HBs, 66 jours pour les anticorps anti-VHC et 10 jours avec le DGV-VHC.

Pour le VHB, le calcul est assujéti à un ajustement de manière à prendre en compte le caractère transitoire de l'Ag HBs sur lequel est fondée l'estimation du risque résiduel. Ce facteur d'ajustement est responsable de variations observées dans le calcul du risque résiduel

lorsque le nombre de cas incidents Ag HBs est stable, voire à la baisse. Aussi, une seconde méthode de calcul du risque est réalisée en parallèle celle-ci consiste à supprimer l'utilisation du facteur de correction pour le calcul du RR VHB en évaluant le taux d'incidence de l'Ag HBs et de l'anti-HBc.

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

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

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

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

La surveillance virologique du VHB comprend :

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

2) La recherche de la **virémie** (débutée en 1998) par une méthode d'amplification par PCR d'un fragment de génome de la capsid virale (nucléotides 1955-2401), mise au point au laboratoire et dont la sensibilité analytique sur un échantillon de référence international (WHO) avait été estimée entre 500 et 1000 copies/ml. A partir de 2004, cette méthode a été remplacée par une PCR amplifiant une partie du gène S correspondant à la boucle antigénique de l'Ag HBs (nucléotides 256-723) et dont la sensibilité analytique a été évaluée à 500 copies /ml (référence internationale WHO) . La détermination de la charge virale est réalisée depuis 2005 avec le réactif Cobas Taq Man, Roche (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^{er} janvier 2000 et le 30 juin 2001, veille de la mise en place systématique du DGV du VHC. Cette recherche a été réalisée sur tous les dons anti-VHC confirmés positifs reçus au laboratoire et prélevés sur cette période de 18 mois, par le réactif AMPLICOR VHC 2.0 (Roche), dont le seuil de sensibilité annoncé était de 50 UI/ml.
- 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 2007. Seuls les éléments les plus significatifs sont présentés.

Le recueil des échantillons plasmatiques des donneurs de sang VHB et VHC positifs par le CNR a été suspendu le 1er janvier 2008 à l'initiative de l'Etablissement Français du Sang. Ainsi aucune donnée de surveillance sur l'année 2008 n'est disponible. L'application de l'arrêté du 6 février 2009 précisant les conditions de transmission de poches et d'échantillons de plasma issus de donneurs de sang prélevés par l'Etablissement français du sang au laboratoire de virologie transfusionnelle de l'Institut national de transfusion sanguine associé des centres nationaux de référence des virus des hépatites B, C et delta et de l'immunodéficience humaine paru au journal officiel le 19 février 2009, doit permettre la reprise des activités du CNR dans le domaine de la surveillance virologique dans la population des donneurs de sang.

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 2007 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 2007.

Année	Nouveaux donneurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux p. 10000 dons
1993	1168	23,8	96	0,33	1264	3,72
1994	935	20,1	56	0,21	991	3,17
1995	885	18,6	28	0,12	913	3,14
1996	717	16,2	20	0,09	737	2,67
1997	682	14,1	14	0,06	696	2,58
1998	569	12,6	8	0,04	577	2,23
1999	511	12,5	6	0,03	517	2,06
2000	431	10,3	7	0,03	438	1,77
2001	434	10,8	10	0,05	444	1,83
2002	424	11,7	9	0,04	433	1,76
2003	447	11,7	4	0,02	451	1,83
2004	420	11,1	4	0,02	424	1,70
2005	346	9,25	5	0,02	351	1,40
2006	327	8,61	6	0,03	333	1,29
2007	376	8,57	5	0,02	381	1,40

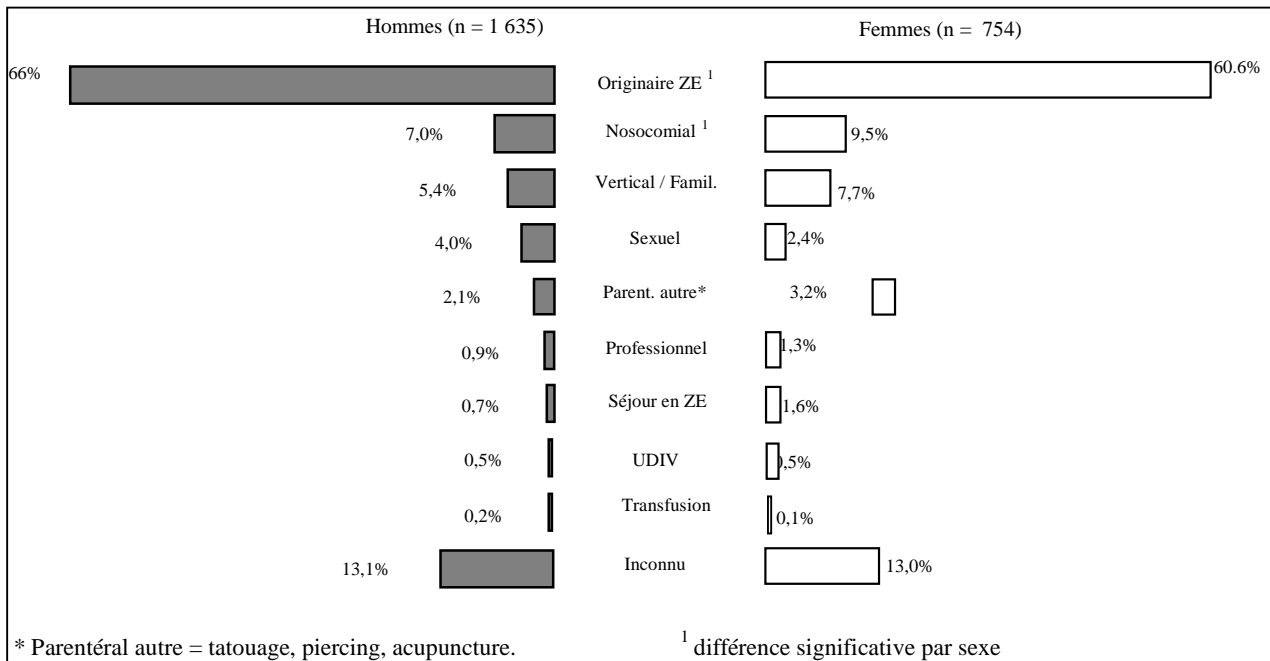
Une baisse régulière jusqu'en 2005 des taux est observée aussi bien chez les nouveaux donneurs que chez les donneurs connus. La diminution plus importante observée jusqu'en 1998 peut être attribuée à une pratique de plus en plus fréquente de la vaccination. Depuis 1998, le taux d'incidence et de prévalence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

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

Comme le montre la figure 2, qui fait état des facteurs de risque (hiérarchisés en fonction de leur probabilité de survenue) retrouvés chez 2389 (62.7%) des 3809 nouveaux donneurs positifs pour l'Ag HBs, prélevés en France métropolitaine entre 1998 et 2007, 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 1998-2007 (n=49), 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 2007 (n=2389).



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 :

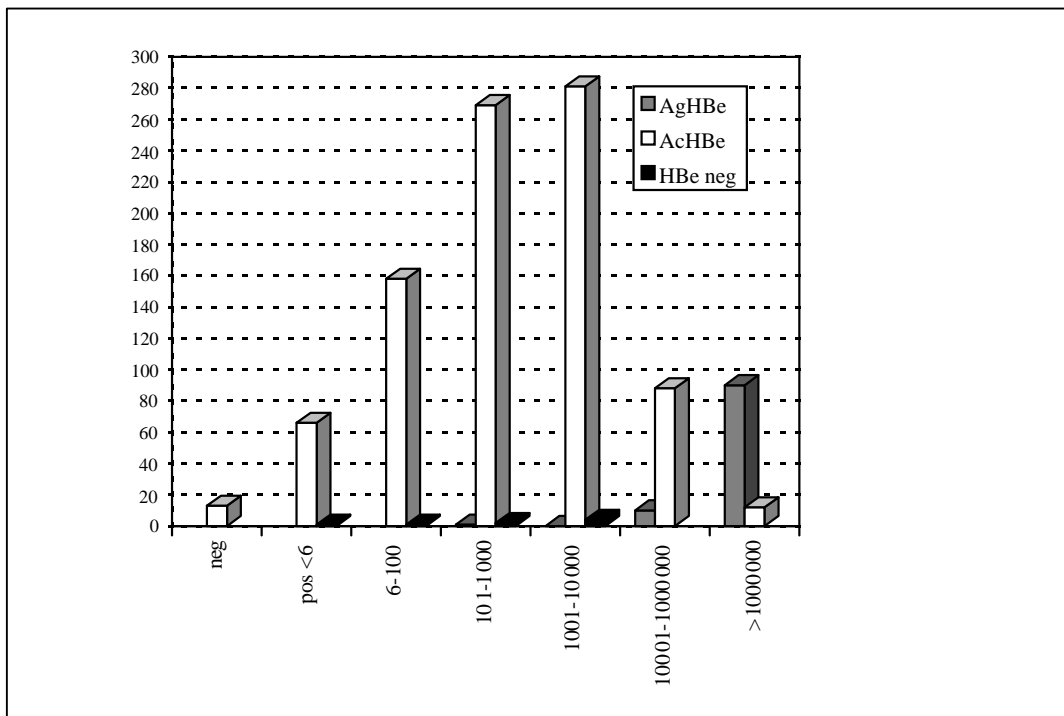
Tableau 2 : Evolution des titres de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1998 et 2007 (résultats partiels pour 2007)

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	5	1,5	18	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	20	6,0	199	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	60	18,1	717	21,8%
4 10 ³ – 10 ⁵	179	53,8	177	57,3	164	50,6	185	54,7	198	58,6	186	55,0	187	51,2	173	57,1	147	51,4	155	46,7	1751	53,2%
1,5 10 ⁵ – 7,5 10 ⁵	30	9,0	30	9,7	44	13,6	44	13,0	53	15,7	80	23,7	70	19,2	54	17,8	54	18,9	78	23,5	537	16,3%
> 7,5 10 ⁵	5	1,5	4	1,3	8	2,5	7	2,1	3	0,9	10	3,0	9	2,5	2	0,7	8	2,8	14	4,2	70	2,2%
Total testés	333	100	309	100	325	100	338	100	338	100	363	100	365	100	303	100	286	100	332	100	3292	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 87,7% (3460/3947) des dons Ag HBs positifs sont **Ac HBe** positifs. Comme le montre la figure 3, les dons Ag HBe positifs présentent des charges virales plus élevées.

Figure 3 : Relation entre la charge virale et le statut HBe sur 759 dons Ag HBs positifs collectés en 2005 et 2006 (75 AgHBe pos, 678 Ac HBe pos, 6 HBe neg).



Sur les 3398 donneurs trouvés Ag HBs positifs entre 1999 et 2007 (3357 en France métropolitaine entre 1999 et 2007 et 41 aux Antilles entre 2005 et 2007), 2901 (85,3%) ont bénéficié d'un **sous-typage de l'Ag HBs** et 86,3% d'entre eux (n = 2505) ont pu être entièrement typés. Les 13,7% n'ayant pas pu être entièrement sous typés correspondaient dans la majorité des cas à des échantillons présentant des titres d'AgHBs inférieurs au seuil de détection de la technique de sérotypage.

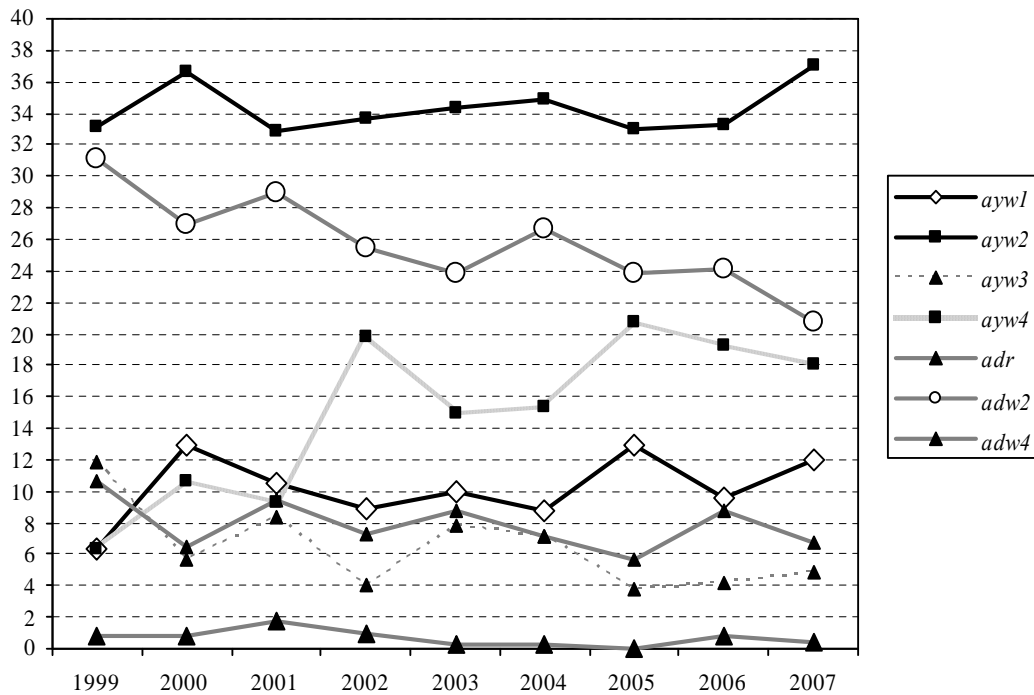
Le tableau 3 et la figure 4 montrent l'évolution de la répartition des différents sous-types de l'Ag HBs de 1999 à 2007.

Sur l'ensemble de la période 1999-2007, le sous-type *ayw2* (correspondant au génotype D, fortement prévalent dans le bassin-méditerranéen) était le plus fréquent (37,2%), suivi du sous-type *adw2* (génotype A ou B, majoritaire en Europe occidentale) (20,8 %). Les sous-types *ayw1* (génotype A (Afrique) ou B (Asie)), *ayw4* (génotype E originaire d'Afrique subsaharienne) et *adr* (génotype C, asiatique) étaient en proportions respectives de 12%, 18% et 6,7%. Toutefois, une dynamique des sous types a pu être observée au cours du temps comme montré dans la figure 3 puisque l'on note une diminution significative ($p=0.004$) des souches *adw2*) et *ayw3* ($p=0.001$) et une augmentation des *ayw4* ($p<10^{-4}$) 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 2007 (incluant les Antilles en 2006 et 2007)

Sous- types	1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>ayw1</i>	16	6,3	34	12,9	29	10,5	27	8,9	31	10,0	27	8,6	34	12,9	23	9.6	34	12	255	10,2
<i>ayw2</i>	84	33,1	97	36,7	91	32,9	102	33,7	106	34,3	109	34,9	87	33	80	33.5	105	37.2	861	34,4
<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	14	4.9	160	6,4
<i>ayw4</i>	16	6,3	28	10,6	23	8,3	60	19,8	46	14,9	48	15,4	55	20,8	46	19.2	51	18	373	14,9
<i>adr</i>	27	10,6	17	6,4	26	9,4	22	7,3	27	8,7	22	7,1	15	5,7	20	8.4	19	6.7	195	7,8
<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	59	20.8	644	25,7
<i>adw4</i>	2	0,8	2	0,8	5	1,8	3	1,0	1	0,3	1	0,3	0	0	2	0.8	1	0.4	17	0,7
	254	100,0	264	100,0	277	100,0	303	100,0	309	100,0	312	100,0	264	100,0	239	100	283	100	2505	100,0
N analysés	300		314		327		334		362		365		305		277		317		2901	
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%)		34 (10,7%)		396 (13,7%)	

Figure 4 : Evolution de la part relative (en %) des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2007 (incluant les Antilles en 2006 et 2007)



Le 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 (44,8%), le sous-type ayw2 avec le bassin Méditerranéen (51,2%), les sous-types ayw3 et adw2 avec l'Europe (68,8% et 65,4%, respectivement), le sous-type ayw4 avec l'Afrique sub-saharienne (79,3%) et du sous-type adr avec l'Asie (64,0%).

Tableau 4 : Proportion (%) des différentes origines géographiques des donneurs Ag HBs positifs en fonction du sous-type 1999-2007

Origine géographique	ayw1		ayw2		ayw3		ayw4		adr		adw2		adw4		Total sous typés	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Europe ¹	38	17.2	238	34.7	86	68.8	50	15.0	40	24.4	356	65.4	7	50.0	815	39.1
Bassin Méditerranéen	11	5.0	351	51.2	17	13.6	5	1.5	0	0	37	6.8	0	0	421	20.2
Afrique Saharienne	Sub 99	44.8	45	6.6	8	6.4	264	79.3	1	0.6	44	8.1	0	0	461	22.1
Asie	56	25.3	10	1.5	3	2.4	1	0.3	105	64.0	42	7.7	0	0	217	10.4
Autre	17	7.7	41	6.0	11	8.8	13	3.9	18	11.0	65	11.9	7	50.0	172	8.2
Sous total	221	100.0	685	100.0	125	100.0	333	100.0	164	100.0	544	100.0	14	100.0	2086	100.0
Ethnie inconnue	34 (13.3%)		176 (20.4%)		35 (21.9%)		40 (10.7%)		31 (15.9%)		100 (16.5%)		3 (17.6%)		419 (16.7%)	
Total	255 (10.2%)		861 (34.4%)		160 (6.4%)		373 (14.9%)		195 (7.8%)		644 (26.7%)		17 (0.7%)		2505 (100%)	

¹ Bassin Méditerranéen exclu

L'analyse moléculaire a été réalisée sur 923 dons Ag HBs positifs collectés de 2005 à 2007. Parmi ces 923 dons, 144 (15.6%) 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 (43,0%), suivie des génotypes A (26,2%) et E (17,5%) puis des génotypes B (6,5%), C (6,4%) et F (0,4%).

Cette répartition est en accord avec l'origine géographique des donneurs (A : Europe, B : Asie, C : Asie, D : bassin méditerranéen et Europe, E : Afrique). Le sexe ratio n'est pas différent en fonction des génotypes. En revanche, parmi les hommes, l'âge moyen est plus élevé chez les sujets infectés par le génotype D (34,4 ans) et les plus jeunes ont été observés dans le génotype E (24,8 ans, $p < 10^{-4}$). Les femmes infectées par le génotype A sont plus âgées que celles infectées par le génotype E (35,7 contre 23,4 ans, respectivement, $p < 10^{-4}$). Par ailleurs, il existe une différence ($p < 10^{-4}$) dans les charges virales observées entre les génotypes : les génotypes B avaient en effet une moyenne de la charge virale la plus élevée (4.67 log IU/ml) et les génotypes D la moins élevée (3.09 log IU/ml).

La répartition des génotypes observée dans notre population est sensiblement différente de celles décrites dans divers travaux réalisés en France puisque, même si les génotypes A et D restent les plus prévalents, leurs proportions respectives varient de 24% à 51% pour le génotype A (26.2% dans notre population) et de 18% à 41% (dans notre population) pour le génotype D. (Halfon P et al. J Viral Hepat 2006, Trimoulet P et al. Gastroenterol Clin Biol. 2007; Ganne-Carrie N et al, J Med Virol 2006). L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer ces différences est le biais lié au recrutement.

La corrélation entre sérotype et génotype figure dans le tableau 5. Sur les 937 échantillons étudiés, 795 (84.8%) ont été sérotypés et 779 (83.1%) génotypés. Parmi ces échantillons, 681 (72.7%) ont été caractérisés par les 2 méthodes, 44 (4.7%) n'ont pu être caractérisés par aucune des méthodes, 98 (10.5%) uniquement par séquençage et 114 (12.1%) uniquement par sérotypage.

Parmi les 681 échantillons caractérisés par les 2 méthodes, 9 (1.3%) étaient discordants selon la classification admise liées à des mutations modifiant le sérotype.

Par ailleurs, des mutations du gène S codant pour l'enveloppe virale décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination ou aux immunoglobulines ont été retrouvées pour 43 échantillons (5.5%). Toutefois, il convient de noter que les variants retrouvés dans cette population ont été détectés par les troupes utilisées dans le dépistage de l'Ag HBs sur les dons de sang. Par contre, il n'est pas exclu que leur détection soit altérée avec d'autres troupes ; cette possibilité est actuellement à l'étude.

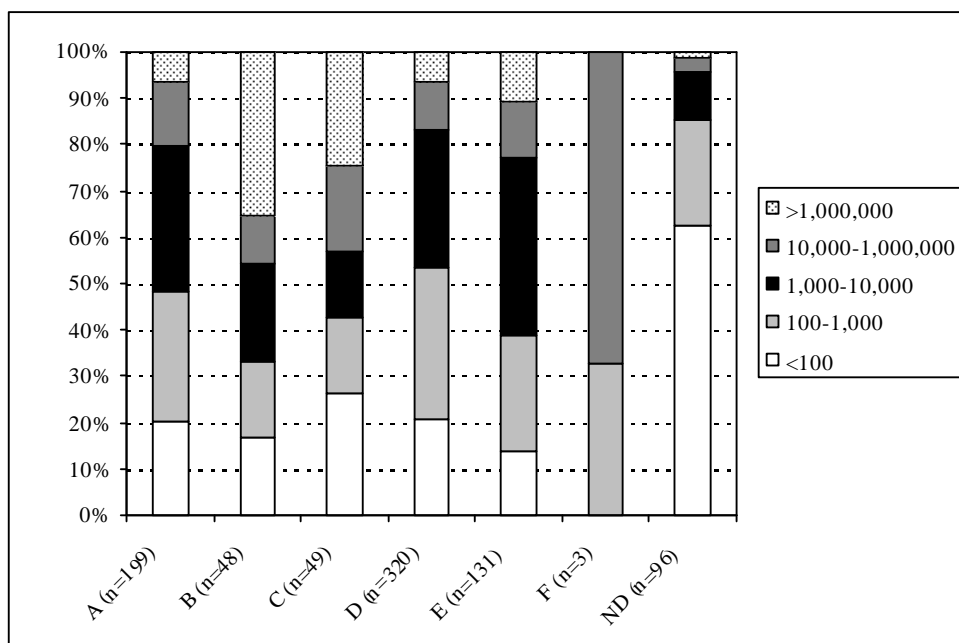
Tableau 5 : Répartition des génotypes du VHB et relation avec le sérotype chez 937 donneurs de sang entre 2005 et 2007

Genotypes	Subtypes ayw1	ayw2	ayw3	ayw4	adw2	adw4	adr	Total			TOTAL	
								ss typés	Non typable	Non testés		
A	47 (64.4%)	1 (0.4%)			139 (89.2%)			187	13	4	204	26.2%
B	26 (35.6%)				16 (10.2%)			42	9		51	6.5%
C		1 (0.4%)					45 (100%)	46	3	1	50	6.4%
D		240 (96.8%)	28 (100%)	4 (3.1%)				272	50	13	335	43.0%
E		6 (2.4%)		124 (96.9%)	1 (0.6%)			131	3	2	136	17.5%
F						3 (100%)		3			3	0.4%
<i>Total genotypés</i>	73	248	28	128	156	3	45	681	78	20	779	100%
Non genotypables	15	24	6	22	25		8	100	33	11	144	
Non testés	3	5	0	3	1		2	14			14	
TOTAL	91	277	34	153	182	3	55	795	111	31	937	

En gras les discordances de classification entre génotypes et sérotypes

La figure 5 fait état de la relation entre charge virale et génotype sur 807 souches. Cette représentation montre que les charges virales se situent majoritairement entre moins de 100 et 10⁴ UI/ml pour les génotypes les plus fréquemment rencontrés, A, D et E (79.9,5%, 83.4% et 77,1% respectivement). Les charges virales les plus élevées aont été observées chez les donneurs contaminés par le génotype B (moyenne 4,67 log UI/ml) et C (moyenne 3,99 log UI/ml) contre une moyenne générale de 3.0 log UI/ml (différence statistiquement significative).

Figure 5 : Proportions (%) des charges virales en fonction du génotype du VHB chez 807 donneurs de sang en 2005 et 2007 en fonction du génotype.



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	304	3394
Positifs	3	3	4	1	4	4	4	4	3	4	6	40
%	1,22	0,92	1,42	0,33	1,26	1,19	1,11	1,14	1,04	1,4	2,0	1,17

Parmi les donneurs Ag HBs positifs 1,17 % 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 2007 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 donateurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons
1993	1605	32,7	902	3,1	2507	7,4
1994	1281	28,2	266	1,03	1547	5,08
1995	1106	23,3	178	0,73	1284	4,42
1996	914	20,7	118	0,51	1032	3,74
1997	720	14,9	71	0,32	791	2,93
1998	601	13,4	51	0,24	652	2,52
1999	428	10,5	36	0,17	464	1,84
2000	337	8,1	39	0,19	376	1,52
2001	322	8,0	43 ⁽²⁾	0,21	365	1,51
2002	262	7,2	27 ⁽²⁾	0,13	289	1,17
2003	290 ⁽¹⁾	7,60	16	0,08	306	1,24
2004	225	5,97	28 ⁽²⁾	0,13	253	1,01
2005	210	5,61	14 ⁽²⁾	0,07	224	0,89
2006	188 ⁽²⁾	4,95	17	0,08	205	0,80
2007	178 ⁽²⁾	4,06	14 ⁽¹⁾	0,06	192	0,71

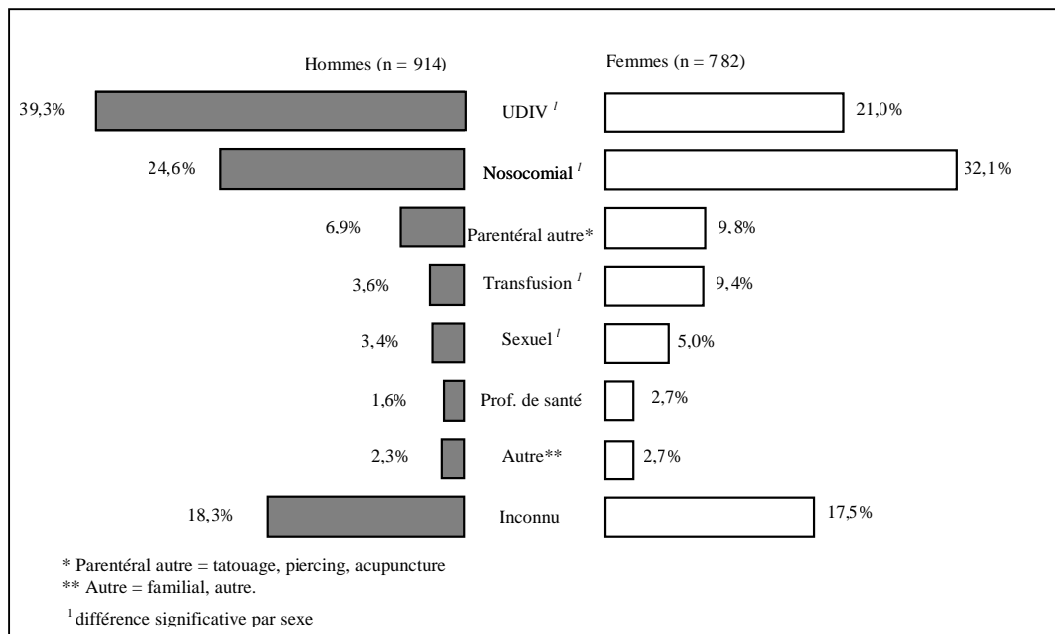
⁽¹⁾ dont 2 Ac nég DGV pos

⁽²⁾ 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 donateurs 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 donateurs 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 donateurs 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 donateurs connus sans facteur de risque identifié s'élève à 30%.

Figure 6 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHC+ interrogés sur FdR 1998-2007 (n = 1 696)



Surveillance virologique de l'infection par le VHC

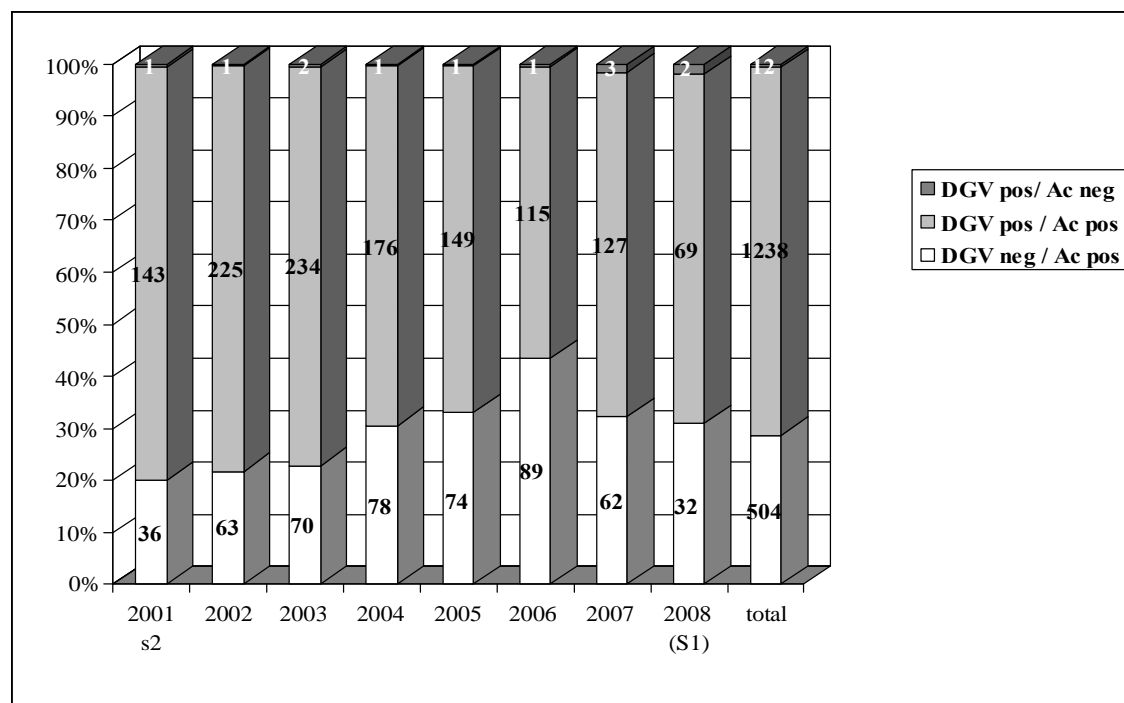
Sur la période 2000-2007, le laboratoire a reçu 1660 échantillons de donneurs VHC positifs, ce qui représente 75% des 2210 donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 8 ans.

Les résultats concernant la recherche de l'ARN du VHC fournis pour l'année 2000 et le 1^{er} trimestre 2001 sont issus des analyses pratiquées dans notre laboratoire, sur 64 % (358/561) des donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 18 mois et ceux fournis à partir du second semestre 2001 sont ceux du DGV et sont donc exhaustifs. Comme le montre le tableau 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 2008 (semestre 1) en fonction des résultats de la virémie.

	2000		2001 (S1)		2001 (S2)		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008 (S1)		total	
	N	%	N	%	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	127	66.1	69	67.0	1530	72,4
Ac+/ARN -	48	19	16	15	36	20,0	65	22,5	70	22,9	78	30,6	74	33	89	43,4	62	32.3	32	31.1	570	27,0
Ac -/ARN +	0		0		1	0,6	1	0,3	2	0,6	1	0,4	1	0,5	1	0,5	3	1.6	2	1.9	12	0.6
TOTAL	253		105		180		289		306		255		224		205		192		103		2112	

Figure 7 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2001 (semestre 2 : début du DGV) et 2008 (semestre 1) en fonction de la virémie (n=1754).



Sur les 1461 donneurs trouvés ARN VHC positifs entre 2000 et 2007, 91,4 % (n = 1335) 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 2000-2007, le génotype le plus fréquent est le génotype 1 (56,5 %), suivi par le génotype 3 (21,3 %), le génotype 2 (11,9 %) et le génotype 4 (8,7 %). Cette répartition est relativement stable au cours des 5 premières années d'étude (pas de différence significative). Toutefois, en 2006 une augmentation des génotypes 4, avec une baisse des génotypes 1 ont été observées, tendances non confirmées en 2007. Une analyse des facteurs en cause est en cours.

Figure 8 : Répartition des génotypes du VHC chez 1335 donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2007

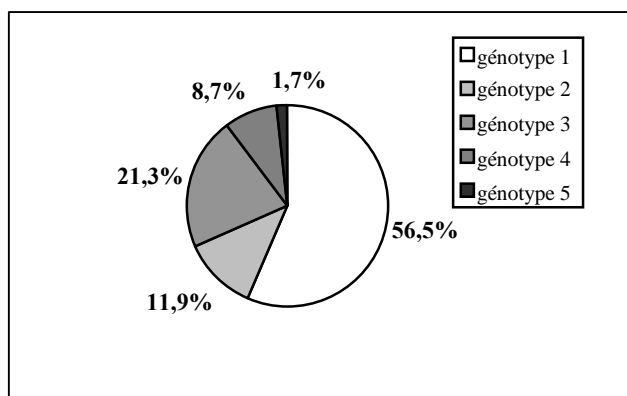
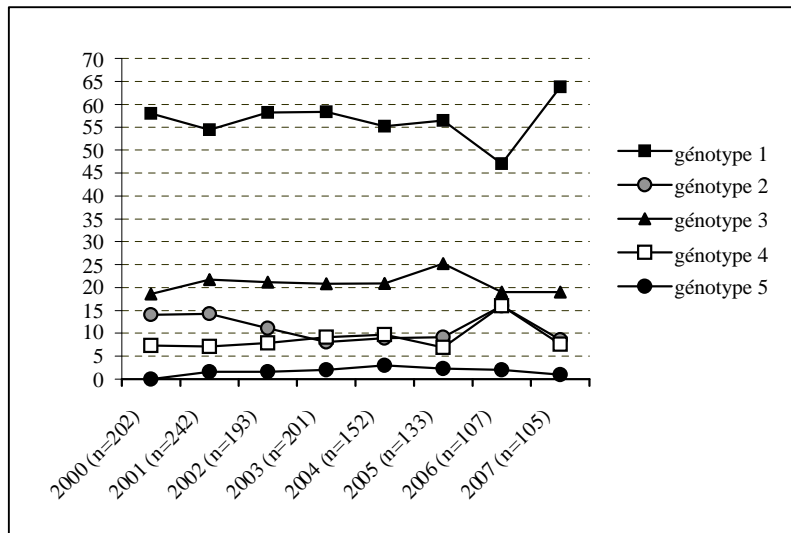


Figure 9 : Evolution de la répartition (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2007



L'analyse moléculaire par séquençage de 866 souches (507 génotypes 1, 113 génotypes 2, 147 génotypes 3, 85 génotypes 4, 14 génotypes 5) collectées durant cette même période rend compte d'une grande variabilité des sous-types, comme le montre le tableau 9.

Parmi les 507 donneurs infectés par le génotype 1, 53,1% sont de sous-type 1b et 46,5% de sous-type 1a. L'analyse des 113 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 43,5% et 41.2% des souches de ce génotype.

Tableau 9: Répartition des génotypes et des sous-types du VHC sur 866 souches étudiées par séquençage moléculaire.

	1 *	1a	1b	2 *	2a	2b	2c	2i	2k	2l	3a	4 *	4a	4d	4f	4h	4r	5a
n	2	236	269	15	32	13	18	15	10	10	147	7	37	35	3	2	1	14
% 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 2000-2007.

	1a		1b		1		2		3a		4		5		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Nombre de donneurs HCV génotypés	382		358		23		153		283		115		21		1335	
Donneurs non revus en consultation	148	38,7%	137	38,3%	12	52,2%	47	30,7%	111	39,2%	54	47,0%	6	28,6%	515	38,6%
Donneurs interrogés sur le facteur de risque	234	61,3%	221	61,7%	11	47,8%	106	69,3%	172	60,8%	61	53,0%	15	71,4%	820	61,4%
Facteurs de risque																
UDIV	112	47,9%	22	10,0%	2	18,2%	18	17,0%	81	47,1%	24	39,3%	0	0,0%	259	31,6%
Antécédents de transfusion	6	2,6%	24	10,9%	1	9,1%	15	14,2%	6	3,5%	1	1,6%	3	20,0%	56	6,8%
Nosocomial	56	23,9%	102	46,2%	3	27,3%	50	47,2%	32	18,6%	18	29,5%	12	80,0%	273	33,3%
Tatouage, percing, acuponcture	18	7,7%	23	10,4%	1	9,1%	4	3,8%	20	11,6%	7	11,5%	0	0,0%	73	8,9%
Sexuel	17	7,3%	8	3,6%	0	0,0%	5	4,7%	15	8,7%	4	6,6%	0	0,0%	49	6,0%
Familial, professionnel	2	0,9%	8	3,6%	0	0,0%	1	0,9%	7	4,1%	2	3,3%	0	0,0%	20	2,4%
Risque non retrouvés	23	9,8%	34	15,4%	4	36,4%	13	12,3%	11	6,4%	5	8,2%	0	0,0%	90	11,0%
Total	234	100,0%	221	100,0%	11	100,0%	106	100,0%	172	100,0%	61	100,0%	15	100,0%	820	100,0%

2.3 Bilan du DGV et risque résiduel

Depuis la mise en place du **DGV du VHC** le 1^{er} juillet 2001 et jusqu'au 30 juin 2008 près de 18 millions de dons ont bénéficié de cette mesure. Au terme de cette période 12 dons provenant de donneurs sans anticorps spécifiques ont été identifiés (voir les caractéristiques tableau 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 10 dons pour les 7 premières années de pratique du DGV, soit 0.66 par million de dons.

Tableau 11 : Caractéristiques des donneurs dépistés ARN positifs anticorps négatif entre le 1^{er} juillet 2001 et le 30 juin 2008

Cas	Année	Statut	Génotype	Charge Virale	Monolisa HCV Ag/Ab Pos si >1	Sexe/Age	ND/DC	Facteur de Risque	Remarques
1	2001	FS	3a	4.710 ⁷	0,93	M/62	DC	endoscopie	
2	2002	FS	3a	1.210 ⁵	0,10	M/35	DC	?	ALT +
3	2003	?	Non testé		Non testé	M/22	ND	?	
4	2003	IS	4a	> 510 ⁵	2,58	M/47	ND	?	
5	2004	FS	1b	1.810 ⁷ UI	0,50	F/58	DC	AES	
6	2005	FS	1a	2.210 ³ UI	0,20	M/20	DC	Partenariat VHC+	
7	2006	?	Non testé	Pos < 25 UI	Non testé	F/40	ND	?	Anti-HBc +
8	2007	FS	1a	1,210 ⁵ UI	0,44	F/39	DC	Partenaire VHC+ Professionnel	
9	2007	FS	1a	neg	Non testé	F/46	DC	Partenaire VHC+	CV : 4.3 log UI/ml (16/06/07)
10	2007	?	En cours	En cours	En cours	M/47	DC	Non investigué	
11	2008	En cours	En cours	En cours	1.77	M/64	DC	Nosocomial/sexuel ?	
12	2008	FS	1a	8000 UI/ml	0.55	F/37	DC	Partenaire VHC et toxicomane	

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

Le DGV VHB est pratiqué en unitaire dans les DOM depuis janvier 2005 et au CTSA depuis 2006: sur les 161180 dons en ayant bénéficié jusqu'au 30 juin 2008, 2 dons ont été retrouvés Ag HBs négatif et DGV positif. L'un avait un anti HBc et correspondait probablement à une infection dite « occulte » et le second était une fenêtre sérologique comme en a attesté le suivi sérologique. Le bilan net est donc de 6.2 par million de dons testés. Il convient d'être prudent sur ce taux car le nombre de dons testés est encore trop faible pour donner un crédit à ce chiffre.

Le risque résiduel sur la période 2005-2007 est de 1 pour 12 millions de dons (IC 95% : 0 – 1.5 millions) pour le VHC et 1 pour 1 million de dons (IC 95% : 0 – 570 000) 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	2004-2006
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 de recherche

Infection multigénotypique pour le VHB

Lors de l'analyse phylogénétique des souches VHB, 6,5% des échantillons n'ont pas pu être génotypés. L'électrophorégramme du produit d'amplification suggérait l'existence de profils d'infections mixtes, c'est-à-dire l'existence de plusieurs souches VHB de génotypes différents chez un même donneur. De telles infections ont été reportées dans la littérature à l'aide d'un test commercial (INNO-LiPA HBV genotyping assay, Innogenetics) dont le principe repose sur une hybridation inversée d'un amplicon sur des sondes spécifiques des différents génotypes du VHB (A à H) et fixées sur des bandelettes de nitrocellulose. Ainsi, ce test permet l'identification d'infections mixtes par plusieurs génotypes du VHB, contrairement au séquençage direct qui caractérise la souche majoritairement présente dans l'échantillon analysé.

Afin d'explorer le phénomène d'infection mixte à VHB dans la population des donneurs de sang infectés par ce virus et d'en établir la fréquence, nous avons entrepris une étude prospective sur 200 donneurs de sang prélevés au cours de l'année 2006, AgHBs positifs, virémiques et pour lesquels le génotypage avait été réalisé par séquençage direct.

Les échantillons ont été génotypés avec le test INNO-LiPA HBV genotyping assay. Ceux, pour lesquels une infection mixte a été mise en évidence, ont été étudiés par clonage moléculaire de la région couvrant les nucléotides 273 à 709 du génome. Dix à 20 clones par échantillons ont été analysés.

14% (28/200) des échantillons ont présenté un profil d'infection mixte avec le test INNO-LiPA. Parmi elles, 25 cas de doubles infections et 3 cas de triples infections ont été observés. L'association d'un génotype D à un génotype H est la double infection la plus fréquemment rencontrée (n=6), suivie des associations A+D (n=4), A+E (n=4), C+D (n=3) et D+E (n=3). D'autre part, les génotypes mis en évidence dans le cadre des infections mixtes correspondent aux génotypes les plus prévalents en France : 75% (21/28) de génotype D, 39% (11/28) de génotype A et 32% (9/28) de génotype E. La trousse INNO-LiPA révèle également une proportion non négligeable de souches de génotypes H (9/28) non détectées par la méthode de génotypage par séquençage direct.

Le clonage a confirmé l'existence de 11 cas d'infections mixtes parmi les 28 diagnostiquées en INNO-LiPA avec 9 concordances parfaites entre les deux techniques et 2 concordances partielles (un génotype supplémentaire mis en évidence par le clonage). Dans les 17 autres

cas, un seul génotype a été identifié lors de l'analyse phylogénétique des séquences clonales. Il est identique à celui déterminé par séquençage direct du produit PCR S.

Ce travail confirme l'existence d'infections mixtes à VHB, suspectée lors du génotypage par séquençage direct. Des infections par plusieurs génotypes VHB sont ainsi mises en évidence pour la première fois dans une population de porteurs asymptomatiques du VHB et en dehors de tout recrutement hospitalier. L'analyse épidémiologique permettra la mise en évidence éventuelle de modes de contaminations particuliers.

Par ailleurs, la concordance des résultats entre le test INNO-LIPA et le clonage observée dans seulement 38% des cas nous conduit à poursuivre les investigations pour permettre d'évaluer la spécificité de certaines réactivités du test INNO-LIPA.

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

Enseignement universitaire

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

Enseignement médical non universitaire

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

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

- Rétro-information à InVS

Comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang InVS

6/ Liste des publications et communications 2008

Publications

Cantaloube JF, Gallian P, Laperche S, Elghouzzi MH, Piquet Y, Bouchardeau F, Jordier F, Biagini P, Attoui H, de Micco P. Molecular characterization of genotype 2 and 4 hepatitis C virus isolates in French blood donors. *J Med Virol.* 2008;80:1732-1739

Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Laperche S, Pawlotsky JM. Performance of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1716-1723.

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

Laperche S, Maniez M, Barlet V, El Ghouzzi MH, Le Vacon F, Levayer T, Lunel F, Morel P, Mouillot L, Piquet Y, Pillonel J. A revised method for estimating hepatitis B virus transfusion residual risk based on antibody to hepatitis B core antigen incident cases. *Transfusion.* 2008;48:2308-2314.

Lefrère JJ, Laperche S, Roudot-Thoraval F. Hepatitis G virus: a suitable marker of in vivo efficacy for pathogen inactivation. *Vox Sang.* 2008;95:76-78.

Poujol I, Floret N, Servant-Delmas A, Marquant A, Laperche S, Antona D, Lot F, Coignard B. Hepatitis B virus transmission from a nurse to a patient, France, 2005. *Eurosurveillance.* 2008;13.

Communications orales.

Journées d'automne de la SFTS, Paris, 14 novembre 2008

Etude de la diversité virale du VHB chez les donneurs de sang en France

Servant-Delmas A, Girault A, Mercier M, Jourdain C, Caparros R, Dubois N, Razer A, Portal C, Laperche S

Communications affichées

XXXth Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Macao, Chine – 7-12 juin 2008

A revised method for estimating Hepatitis B Virus transfusion residual risk based on anti-HBc incident cases. Laperche S, Maniez M, Barlet V, Elghouzzi MH, Le Vacon F, Levayer T, Lunel F, Morel P, Mouillot L, Piquet Y, Pillonel J

Changes in characteristics of hepatitis C virus viremic blood donors in France
Bouchardeau F, Girault A, Portal C, Razer A, Cantaloube JF, De Micco P, Pillonel J, Laperche S

10 èmes Journées Francophones de Virologie, Paris, 27-28 Mars 2008

Limites de la phylogénie lors des enquêtes de transmission du VHB

Servant A, Girault A, Mercier M, Jourdain C, Razer A, Portal C, Caparros R, Laperche S

VIII Congrès national d'hémovigilance et de sécurité transfusionnelle, Perpignan 19-21 novembre 2008

Donneuse de sang porteuse d'une hépatite B occulte et séroconversion receveuse

Besse-Moreau M, Chevaleyre S, Laperche S, Delhoume M, Hantz S Piquet Y.

Séminaires et conférences sur invitation

- *Workshop científico egurança do banco de sangue no diagnostic BioRad Rio/Sao Paulo, Brésil 16-17, Avril, 2008*

Place of combo assays in the blood screening strategy

Laperche S

Worshop Biorad, Guangzhou, China 13 June 2008

What blood screening strategy for the viral blood safety ?

Laperche S

Abbott European Laboratory Symposium for infectious diseases, Delkenheim, June 19-20, 2008

Blood safety : triving for zero risk?

Laperche S.

Corso di alta formazione Rome , Italie 15 septembre 2008

Sicurezza trasfusionale: e rischio residuo

Laperche S.

Journée inter-régionale CCLIN Est Reims, 21 Octobre 2008

Les virus majeurs transmis par le sang

Laperche S.

7/ Programme d'activité 2009

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

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

2) Le virus Delta

L'analyse des donneurs coinfectés par le VHB et le Delta se poursuivra dans le cadre du CNR avec le laboratoire associé pour l'étude du Delta.

3) Mutants de l'enveloppe du VHB et impact diagnostique

Pour évaluer la capacité des trousse de détection de l'Ag HBs à reconnaître les particules virales des différents génotypes du VHB, ainsi que des mutants de l'enveloppe virale, nous allons poursuivre la constitution d'un panel comprenant à ce jour 17 échantillons de protéines HBs recombinantes (9 échantillons de génotypes A à F et 8 échantillons porteurs d'une ou plusieurs mutations situées dans la boucle antigénique et connues pour être à l'origine de faux négatifs lors du dépistage de l'Ag HBs). Les séquences HBs sont clonées dans un vecteur d'expression eucaryote et exprimées *in vitro* après transfection de cellules hépatiques Huh7. Les protéines sécrétées en quantité suffisante dans le surnageant de culture sont retenues pour la constitution du panel, qui a été calibré grâce à la présence de l'étiquette HA placée en C terminale des protéines recombinantes. Les premiers résultats montrent un défaut de reconnaissance du mutant G145R par une des trousse étudiées. Le panel sera complété par d'autres protéines d'intérêt. Ce panel ainsi qu'un panel de 18 souches naturelles portant des mutations décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination ou aux Ig sont en cours d'étude sur un éventail de 13 réactifs de dépistage de l'AgHBs parmi les plus utilisés en France de manière à évaluer leur capacité à détecter ces souches atypiques. Cette approche constitue une appréciation prospective des limites potentielles des tests actuellement utilisés en transfusion pour le dépistage de l'Ag HBs et pourrait contribuer à guider un élargissement du spectre de sensibilité de ces tests.

4) Infections à VHB à génotypes multiples

La mise en évidence d'infection du VHB par plusieurs génotypes dans la population des donneurs de sang sera élargie sur un plus grand nombre d'échantillons, de manière à pouvoir individualiser d'éventuelles caractéristiques épidémiologiques liées à cette population particulière. Le mécanisme le plus probable à l'origine de ces infections multiples est la surinfection par des souches de génotypes différents à la faveur d'expositions multiples, phénomène possible en particulier chez les sujets provenant de zones d'endémie. Pour explorer cette hypothèse nous envisageons d'étudier la fréquence de ces infections multiples dans d'autres populations de sujets infectés par le virus et en particulier chez des sujets en phase aiguë de l'infection. Une collaboration avec le laboratoire de la Pitié Salpêtrière ayant des échantillons de sujets inclus dans l'étude des hépatites B aiguës ayant fait l'objet d'une déclaration obligatoire sera établie avec cet objectif.

Par ailleurs, les coinfections étant propices au phénomène de recombinaison génétique, ce phénomène sera exploré lorsque possible en ayant recours au clonage et séquençage des génomes complets de ces souches afin de préciser les sites de recombinaison.

Ces coinfections représentent l'un des mécanismes d'évolution génétique du VHB, le suivi de la fréquence de tels phénomènes avec 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) Infections VHB aiguës

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

Un projet visant à établir la prévalence des mutants Pre C/Core du VHB dans la population des donneurs de sang comparativement à d'autres sujets infectés naïfs ou traités, et à analyser les facteurs virologiques (charges virales, génotypes..) et épidémiologiques y étant liés est en cours, en collaboration avec le laboratoire de virologie du CHU d'Angers dans le cadre de travaux menés dans le groupe « Agents transmissibles » de la Société Française de Transfusion Sanguine.

7) Tests Ag/Ac VHC et sécurité transfusionnelle

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, 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 quelque panels de séroconversions informatifs est en cours sur les 366 échantillons collectés. 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.

8) Génotypes du VHC chez les donneurs de sang égyptiens

Le génotype 4 fait l'objet d'une épidémiologie particulière en Egypte puisqu'il s'y trouve avec une prévalence notablement élevée. Lors de la détermination des génotypes du VHC chez 13 donneurs égyptiens dépistés en phase précoce de l'infection (ARN positifs et Ac-VHC négatifs), réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le centre de transfusion du Caïre, nous avons, contre toute attente, obtenu 6 génotypes non-4 (4 gen 1g, 1 gen 1a, 1 gen 3a). De manière à mettre en évidence une épidémiologie différente parmi les cas incidents, nous allons déterminer la répartition des génotypes parmi les donneurs de sang porteurs

chroniques du virus et collectés dans la même période que les précédents afin d'individualiser une différence avec les caractères épidémiologiques qui y sont liés.

8) Test d'incidence du VHC

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

Fait à Paris le 3 avril 2009
Syria LAPERCHE

IV

**LABORATOIRE ASSOCIE
RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT**

**Hôpital Paul Brousse
Villejuif**

Contribution à la surveillance épidémiologique

Résumé

1.1 Diversité des isolats VHC en France

L'enquête de veille épidémiologique menée par l'INVS sur des assurés sociaux (âgés de 18 à 80 ans) de 2003 à 2004 indique que la prévalence observée du VHC est restée stable (0.9%) depuis 1994. Nous avons montré que **la moitié** de cet échantillon national d'assurés sociaux dépistés anti-VHC(+) possède une charge virale définie comme « **haute** » (>600 000 UI/ml). La moyenne des charges virales mesurées pour chaque type (1 à 4) était proche suggérant une efficacité de détection similaire du test commercial utilisé. L'analyse de la diversité des souches VHC confirme la circulation en France d'une grande diversité de sous type des types 1, 2 et 4, initialement décrits chez des sujets originaires d'Afrique Centrale et d'Egypte (1d, 1e, 1h, 1l, 1i, 2j, 2k, 2l, 4f, 4k)(Cantaloube *et al.*, 2008; Morice *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2007).

Nous avons également étudié les modes résiduels de contamination du VHC afin de mieux cibler les mesures préventives. Par une étude collaborative 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. Cette étude a souligné l'importance de la transmission intrafamiliale en démontrant une forte corrélation entre la présence d'une infection VHC et les liens de parenté du 1 degré (mère/enfant, enfant/enfant). Ces résultats suggèrent une combinaison particulière de modes de transmission dans la famille et/ou une prédisposition génétique des sujets à l'infection (Plancoulaine *et al.*, 2008). Afin de déterminer l'importance actuelle de ce mode de transmission, et les facteurs de risque qui lui sont associés, une étude transversale ciblant la phase initiale de l'infection chez des adultes ayant développés une hépatite aigue symptomatique a été réalisée. Ce travail montre que 3% des nouvelles infections VHC au Caire sont liées à une transmission intrafamiliale. Le seul facteur de risque observé étant d'être marié à un porteur chronique. (Paez A. *et al. en préparation*).

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

L'enquête de prévalence nationale a aussi recherché des marqueurs sériques de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) dans cet échantillon. 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 plus de **90%** des assurés sociaux dépistés positifs pour l'antigène HBs étaient 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% <10⁴ UI/ml). L'analyse de la diversité des génotypes, malgré la faiblesse des effectifs, indique la circulation des génotypes A à F et confirme la prédominance des génotypes A et D comme précédemment observé en France. La détection des génotypes HBV-D et HBV-E indique, comme pour le VHC, la circulation en France de sous-types initialement décrits en dans le sud du bassin Méditerranéen. Des mutations localisées dans le déterminant « a » de l'enveloppe virale ou dans la polymérase virale (résistance aux analogues nucléotidiques) ont été identifiées pour plus de 10% des sujets séquencés. La circulation dans la population générale de ces variants viraux susceptibles de poser des difficultés, diagnostiques, de prise en charge thérapeutique ou d'efficacité vaccinale conduit à renforcer la surveillance de l'émergence de ces mutants.

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^{ième} 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 m²). 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 », (35m² situés au 1^{ième} 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 Master Université Paris XI 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 maison 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. Notre laboratoire a également accès au plateau technique du laboratoire de virologie pour effectuer la quantification par PCR en temps réel automatisée de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC.

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 (Thompson *et al.*, 1994). L'analyse phylogénétique des séquences ainsi obtenues est réalisée par comparaison à des souches de référence extraites des banques de données. Le modèle mathématique utilisé pour l'analyse phylogénétique est basé une analyse de matrices de distance (DNADIST, Kimura 2-Parameters). Un arbre phylogénétique est ensuite modélisé par utilisation de l'algorithme du « Neighbor-Joining ». La fiabilité de la structure des branches est mesurée par la réalisation d'une analyse de « Bootstrap » (n=1000). L'ensemble des programmes utilisés pour cette analyse est inclus dans le logiciel MEGA(Kumar *et al.*, 2004).

Détermination de domaines de conservation

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).

L'ensemble de ces outils sont à la disposition des laboratoires qui en font la demande.

2.12 Techniques en Développement

Mise en place d'une PCR grand fragment VHB sensible

La réalisation de PCR génome complet est fonctionnelle et permet une amplification complète du génome VHB (3200pb). La technique employée est une adaptation de la méthode publiée par Gunther (Gunther *et al.*, 1995) utilisant deux amorces chevauchantes en sens inverse et un mélange de deux ADN-polymérases thermo-résistantes. Cette méthode nous permet d'obtenir de façon reproductible une amplification positive de 3200pb pour des échantillons ayant en moyenne une charge virale de plus de 10^4 copies.

Afin d'améliorer la sensibilité de la PCR génome complet nous allons combiner une étape de préamplification basée sur l'utilisation l'ADN polymérase phi29 avec la PCR génome complet. L'ADN polymérase Phi29 permet d'augmenter considérablement la quantité d'ADN disponible et se caractérise par sa capacité à ouvrir la double hélice d'ADN (déplacement de brin) et à amorcer la réplication d'ADN simultanément à partir de plusieurs sites. Ces propriétés lui permettent d'envisager l'amplification exponentielle sans PCR d'une séquence spécifique à partir d'une matrice d'ADN circulaire (« Rolling Circle Amplification »).

Cette méthode a été adaptée par le groupe de Fabien Zoulim (Margeridon *et al.*, 2008) pour amplifier le VHB sérique. Après perméabilisation de la particule virale par action de détergents, la synthèse d'une molécule complète d'ADN double brin est réalisée par l'ADN polymérase virale endogène, puis une étape de ligation transforme cette molécule en une molécule d'ADN circulaire double brin. Cette dernière va alors servir de matrice pour l'ADN polymérase Phi29 dans le modèle « Rolling Circle Amplification. Des essais sont en cours.

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 « asymptotiques 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 une double mutation 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).

En 2008, ce projet n'a pas été poursuivi suite à des difficultés techniques principalement liée au manque de spécificité des amorces type-spécifique. Le séquençage qui s'est beaucoup simplifié reste le gold standard car il permet de révéler de nouvelles mutations. Par ailleurs, des tests commerciaux sont disponibles et bien validés (LiPA).

2.2 Activité d'expertise de l'année 2008

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

- 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 et l'analyse de la littérature récente nous a conduit à sélectionner des amorces chevauchantes, 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).

- Pour amplifier des isolats particuliers du VHC

Nous avons dessiné des amorces pour permettre l'amplification de régions complètes (core, E1-NS5B) d'isolats particuliers, identifiés chez des sujets porteurs d'hépatite fibrosante cholestatique de génotypes 1 et 4.

2.22 Classement d'isolats VHC

À la demande de laboratoires de virologie clinique, nous réalisons une identification fine du sous-type d'isolats du VHC donnant des résultats ambigus par les tests commerciaux. Dans le cadre de notre domaine d'expertise nous disposons de fichiers de séquences de tous les isolats actuellement identifiés et nous avons réalisé une analyse phylogénétique basée sur la région NS5B.

2.23 Surveillance et caractérisation de la résistance aux antiviraux

Les traitements des infections chronique par le VHB par des analogues de nucléosides en monothérapie conduisent à la sélection de mutants résistants. Le développement de ses résistances virales s'accompagnent d'une détérioration de la maladie hépatique. C'est un problème thérapeutique important qui nécessite d'être diagnostiqué de façon précoce, afin d'adapter les traitements antiviraux.

Dans le cadre de cette surveillance nous collaborons avec le laboratoire Virologie de l'hôpital Paul Brousse (Pr Dussaix) à la caractérisation phénotypique de variants du VHB isolés chez des patients résistants à la Lamivudine. Deux patients, d'origine Africaine, porteurs d'un VHB de génotype E ont présenté un échappement virologique après une durée moyenne de traitement de trois ans par la Lamivudine. Le séquençage direct du gène de la polymérase a permis d'identifier chez ces deux sujets le profil de substitution amino-acidique suivant : rtL180M+ rtA181V avec en plus pour l'un d'entre eux rtI233V. Il est à noter que ces deux sujets naïfs pour l'adéfovir, sont porteurs de la/des substitution(s) amino-acidique (rtA181V et rtI233V) conférant la résistance à cette molécule.

Pour effectuer la caractérisation phénotypique de ces isolats le clonage complet (système TA-cloning) du gène de la polymérase (1200 pb) a été réalisé à trois temps du suivi (avant traitement, au moment de l'échappement et point tardif). Pour chaque point, le séquençage d'une vingtaine de clones est en cours. L'estimation du niveau de résistance (IC50 et IC90) de ces isolats sera réalisée dans un système de culture in vitro en collaboration avec le laboratoire de F. Zoulim.

2.24 Participation à la constitution d'une Banque de séquences de Capside du VHC.

Dans le cadre de l'activité de recherche du CNR nous poursuivons la constitution d'une banque plasmidique de séquences de Capside du VHC. La séquence majoritaire complète de capsid de 10 isolats issus du foie tumoral, non-tumoral d'un même patient a été clonée. Pour 2 sujets, la capsid sérique a aussi été clonée. Parallèlement, nous avons aussi commencé le clonage en vecteur d'expression (pCMV) de 4 isolats VHC identifiés chez des sujets transplantés porteurs d'hépatite fibrosante cholestatique sévère. Trois points sont en cours d'analyse (serum avant TH, au moment de l'HFC et Foie avant TH).

En collaboration avec l'U785, une caractérisation phénotypique de ces séquences pour leur activité sur la voie de signalisation du TGF-béta est en cours. Aux données moléculaires, nous allons ainsi 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 (Meffre *et al.*, 2005)

1. Pour la séropositivité anti-VHC le niveau de prévalence observé (0.9%) est du même ordre que celui observé en 1994.
2. Pour l'infection chronique par le VHB un niveau de prévalence de l'AgHBs de 0,68% a été observé, supérieur à ce qui était proposé jusqu'à maintenant. Cette prévalence est compatible avec un nombre de porteurs de ce virus dans notre pays de l'ordre de 300 000 chez les personnes âgées de 18 à 80 ans.

Les données VHC et VHB qui ont déjà été présentées dans les rapports 2007 et 2008 sont brièvement évoquées.

Dans cette population considérée comme représentative de la population générale, nos données indiquent :

- Pour le VHC 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 moyenne des charges virales mesurées pour chaque type 1, 2, 3, et 4 était proche indiquant une efficacité de détection similaire des test commerciaux utilisés.

- Pour le VHB que plus de **90%** des assurés sociaux dépistés positifs pour l'antigène HBs 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% <10⁴ UI/ml). L'analyse de la diversité des génotypes, malgré la faiblesse des effectifs, indique la circulation des génotypes A à F et confirme la prédominance des génotypes A et D comme précédemment observé en France. Comme pour le VHC la détection des génotype HBV-D et HBV-E indique la circulation en France de sous-types initialement décrits en dans le sud du bassin Méditerranéen. La recherche de mutations dans le gène de l'enveloppe virale (87-226) montre chez un sujet la présence de la mutation d'échappement G145R aux immunoglobulines anti-HBs et chez quatre sujets, la présence de mutations à l'intérieur du déterminant « a » pouvant affecter la détection de l'antigène HBs par les trousses de dépistage M133I (n=3) et F/Y134L/N. Pour le gène de la polymérase (position 95 à 295) parmi les mutations qui confèrent une résistance aux analogues nucléotidiques, des mutations conférant la résistance à la Lamivudine /Adefovir (A181T) et Lamivudine /Telbivudine (M204I) et Tenofovir (Q215S) ont chacune été identifiées chez 1,1 et deux sujets respectivement.

- Perspective 2009

La compilation des fichiers VHC contenant les données obtenues par les différents intervenants a débuté courant 2008 [niveau moléculaire (CNR-Hépatite), sérologique (F. Dubois, CHU Tours), épidémiologique (E. Delaroque et C. Meffre, INVS)]. La compilation VHB doit être réalisée cette année et va permettre, après vérification de quelques incohérences l'interprétation globale des données.

3.12 Observatoire des hépatites aiguës B en France

Le projet d'une surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France, coordonné par le Dr Thibault (SERVI, GH Pitié-Salpêtrière) est mené en collaboration avec l'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. Le recueil des prélèvements a été effectué de Mars 2007 à Avril 2008. Au total 150 prélèvements ont été reçus au SERVI provenant de toutes les régions de France. L'index développé par V. Thibault, basé sur la mesure d'avidité des aHBc et le niveau des transaminases, indique que globalement les 2/3 des échantillons (n=86) reçus correspondraient à une hépatite B en phase aiguë.

Les premières données de ce travail collaboratif montre

La charge virale a été mesurée et aucune différence n'est apparue entre les sujets classés comme aigus et chroniques (réactivation hépatite B). L'analyse de la distribution des génotypes du VHB a montré que le génotype A était le plus fréquent observé (48%) suivi des génotypes E et D (19,5% et 18%, respectivement), puis de façon plus minoritaire les génotypes C (6%), F (5%), B (3%) et G (1%). Il ne semble pas y avoir de différence très marquée dans la répartition des génotypes du VHB en fonction du stade aigu ou chronique.

Quatre vingt dix pourcent des échantillons ont été amplifiés en PCR génome complet et ont permis d'obtenir 112 génomes complets (79 aigus, 33 chronique) et 11 génomes incomplets. L'analyse fine des séquences est en cours et recherchera la présence de génomes recombinants et de mutations comme celles du gène Core (1896, 1762, 1764) et de l'enveloppe du VHB ou la présence de mutations de résistance au traitement chez les sujets avec hépatite aiguë.

3.13 Comparaison de la distribution des génotypes du VHB dans trois population de sujets porteur chronique de l'AgHBs en France

Nous avons repris dans ces travaux collaboratifs les études réalisées à l'échelon national qui ciblaient les sujets porteurs chronique de l'AgHBs et pour lesquels un génotypage du VHB était disponible:

- l'Enquête nationale de prévalence (§ 3.11)
- l'Observatoire des hépatites aiguës B en France (§ 3.12)

Une comparaison visuelle rapide de la répartition des génotypes du VHB entre ces deux populations est présentée sur le graphique ci dessous (figure 1). Bien que la population des donneurs de sang ne puisse être assimilée à la population générale, nous avons à titre indicatif juxtaposé la prévalence des génotypes du VHB circulant chez les donneurs de sang (données publiées par le CNR en transfusion sanguine cf RA2007).

Cette comparaison indique que les fréquences observées des génotypes du VHB dans ces études ciblant des adultes dans toute la France ne sont pas exactement superposables. Le génotype A est le plus fréquent observé dans ces deux populations (34% et 44% respectivement). La fréquence du génotype E est comparable dans ces deux groupes (22%). En revanche, pour les autres génotypes, il existe des différences importantes pour :

- La fréquence du génotype D (31 % comparée vs 17% respectivement)
- La fréquence des génotypes B et C inversées.

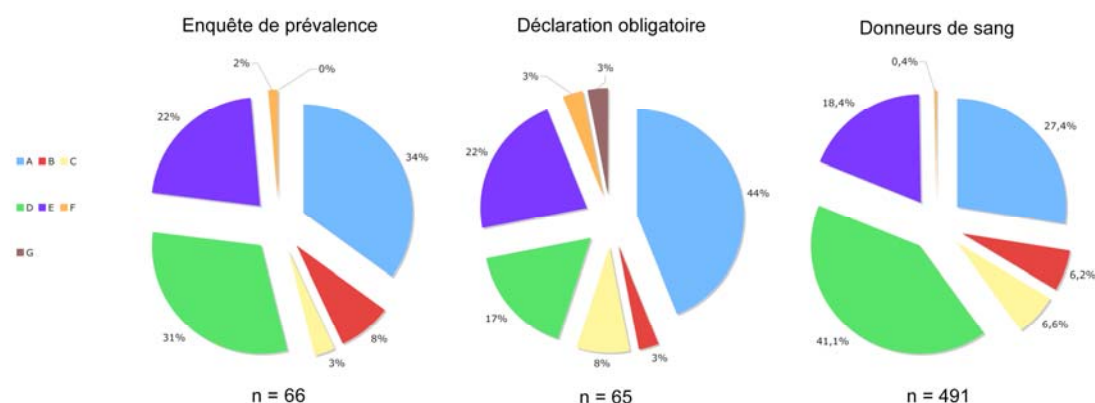


Figure 1 : Comparaison de la distribution des génotypes du VHB dans la population des assurés sociaux dépistés comme porteurs de l'antigène HBs (n=66) et chez les sujets classés comme porteurs chronique du VHB dans l'Observatoire des hépatites aiguës B (n=65).

Cependant, avant d'interpréter plus avant ces données une analyse des données épidémiologiques devrait permettre de vérifier que ces populations sont comparables (lieu de recrutement, origine géographique, facteurs de risque ...). Un biais d'ordre technique pourrait aussi être évoqué et concerner l'efficacité d'amplification des génotypes du VHB par PCR. Les travaux publiés par les différentes unités du CNR montrent que les outils automatisés de mesure de la charge virale, (Cobas Taq Man, Roche) utilisés dans cette étude présentent la même efficacité quelque soit le génotype (Chevaliez *et al.*, 2008). De plus, chez les donneurs de sang, il a été montré que la charge virale moyenne mesurée dans les génotypes les plus fréquents (A, D et E) sont similaires (Laperche S et al. , Rapport d'Activité CNR-2007).

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

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

- Diversité des isolats du VHC circulants dans une population rurale au Caire et confirmation d'une transmission intra-familiale du VHC

L'étude d'une cohorte égyptienne de 4000 individus vivant en zone rurale située dans le delta du Nil au nord-est du Caire a montré l'importance des injections dans le mode de dissémination de

l'épidémie. Cependant, ces causes iatrogènes n'expliquaient que la moitié des infections actuelles des adultes, et ne rendaient pas compte des infections observées chez les sujets de moins de 20 ans (Arafa *et al.*, 2005). Ces observations suggéraient une transmission intrafamiliale importante en zone hyper endémique soit par des comportements à risque communs ou soit par l'existence d'une susceptibilité génétique à l'infection.

Trois études basées sur des approches parallèles ont été réalisées et nous ont permis de confirmer ces hypothèses

(1) Caractérisation moléculaire des isolats.

De cette cohorte égyptienne ont été sélectionnés 135 sujets porteurs du VHC dont au moins un membre de la famille nucléaire (père mère enfants) était infecté par le VHC. Comme attendu, la grande majorité des isolats sont de type 4a. L'analyse phylogénétique confirme la grande hétérogénéité du type 4 avec la mise en évidence d'autres sous-types 4o, 4m et 4n. De plus, dans cette cohorte nous avons identifié un groupe de 20 échantillons qui ne se groupaient avec aucun autre sous-type 4. Une requête de classification a été déposée auprès du comité de classement des isolats du VHC et a conduit au classement provisoire de ces isolats comme un nouveau sous type du VHC «4u». Un premier article scientifique est en cours de finalisation présentant la caractérisation moléculaire de ce nouveau sous-type (*El Dali & Thiers et al. en préparation*)

(2) L'analyse phylogénétique des isolats a montré que les souches identifiées chez les membres d'une même famille étaient plus proches entre elles que de celles de sujets non apparentés. La combinaison de l'analyse phylogénétique et du test de Mantel en collaboration avec C. Feray (CIC-0004 Inserm, Nantes) a montré que la maison ($p < 0.0001$), les relations mère-enfants ($p = 0.002$) et les relations de fratrie ($p = 0.005$) étaient associées à la transmission intrafamiliale du VHC dans cette zone hyper endémique. Un second article scientifique illustrant l'apport du test de Mantel dans ce type d'étude est en cours de rédaction en collaboration avec C. Feray (*Thiers et al. en préparation*).

(3) Par ailleurs, la combinaison des données moléculaires avec une analyse basée sur l'utilisation de méthodes épidémiologiques adaptées à l'analyse de données corrélées a étudié la dépendance familiale à l'infection par le VHC sur la totalité de la cohorte (4000 sujets) en collaboration avec l'unité de Laurent Abel (Inserm U555). L'analyse des corrélations, familiales entre les membres du premier degré (mère/enfant, père/enfant et enfant/enfant) a confirmé nos résultats moléculaires en identifiant une forte corrélation entre la présence d'une infection VHC et les liens de parenté du 1 degré (mère-enfant, enfant-enfant). Ces résultats peuvent être expliqués par une combinaison particulière de modes de transmission dans la famille et une prédisposition génétique des sujets à l'infection. (*Plancoulaine et al., 2008*).

- **Surveillance des hépatites aiguës C**

L'étude de cohorte ciblant les porteurs chroniques du VHC a souligné l'importance de la transmission intrafamiliale, mais n'a pas identifié son importance actuelle, ou les facteurs de risque associés. De nouvelles études ciblant la phase initiale de l'infection, les hépatites aiguës, sont en cours afin

- (1) d'estimer l'importance actuelle de la transmission intrafamiliale
- (2) de cibler les facteurs de risques qui lui sont associés.

Surveillance des hépatites aiguës C dans les « fever hospital » au Caire

Une étude transversale a été conduite sur des patients adultes porteurs d'hépatite aigue C symptomatiques et sur les membres de leur famille chroniquement infectés. L'évaluation des facteurs de risque dans les six mois précédents les symptômes a été réalisée par questionnaire.

Parmi hépatites aiguës symptomatiques identifiées dans les hôpitaux public du Caire, 100 patients ont accepté de participer à cette étude et 18 avaient un membre de leur famille

chroniquement infecté (HCV-RNA+). Pour 55% d'entre eux (10/18) le porteur chronique familial était le conjoint et la durée de mariage était de plus de 15ans. La comparaison des isolats par le biais de l'analyse phylogénétique n'a pu être réalisée que pour 12 paires (aigue/chronique) et a montré que trois des sujet porteurs d'hépatite aigue étaient infectés par une souche apparentée à celle de leur conjoint. Aucun d'entre eux n'a rapporté d'exposition parentérale dans les six mois qui ont précédés l'infection, le seul facteur de risque étant d'être marié à un porteur chronique (*Paez A. et al en préparation*).

En conclusion, 3% des nouvelles infections VHC sont liées à une transmission intrafamiliale au Caire. Bien que ce risque soit de faible importance, par comparaison aux facteurs de risque majoritaires (injections thérapeutiques et toxicomanie intraveineuse), il représente un risque réel. L'ensemble des données obtenues dans l'étude de cohorte (transmission parent-enfant et enfant-enfant) et dans l'étude des hépatites aiguës (persistance de la transmission intrafamiliale) permettent de supposer que la transmission domestique (usage en commun de matériel contaminé) pourrait jouer un rôle plus important dans la transmission intrafamiliale que la transmission sexuelle.

Surveillance des hépatites aiguës C chez les enfants de la cohorte

Le même type de surveillance est en cours en zone rurale. Ainsi la proportion des nouvelles infections VHC chez les enfants de moins de 20ans dans les familles de la cohorte de villageois de 4000 individus sera déterminée et les séquences des isolats sont en cours de comparaison.

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 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.

4.2.3 Surveillance des hépatites aiguës B en France

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

4.3 Information, Publication générale, formation

4.31 Formation de stagiaires

Le CNR assure la formation de stagiaires issus de pays étrangers. Par son appartenance à l'institut Pasteur notre CNR bénéficie de relations privilégiées avec des laboratoires étrangers. Par le biais du réseau des Instituts Pasteur plusieurs collaborations internationales ont été initiées. L'objectif de ces collaborations est de favoriser les échanges entre ces différents laboratoires afin de pouvoir implanter sur place des tests de caractérisation du VHC et ainsi de pouvoir recueillir

des informations sur les isolats du VHC et VHB circulants dans ces pays. Au cours de l'année 2008 un stagiaire en Master de l'université Paris XI a été formé aux techniques de caractérisation moléculaire d'isolats viraux.

4.31 Formation de PH

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

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

Objectif

Poursuivre la caractérisation de variants naturels de la protéine capsid du VHC par clonage de façon à élargir la banque de séquences et pouvoir 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 (Irshad and Dhar, 2006; Levrero, 2006; Ray and Ray, 2001).

L'infection chronique par le VHC entraîne la production d'une quantité anormale des composants de la matrice extracellulaire aboutissant au développement d'une fibrose intensive. Parmi les cytokines impliquées dans le développement de la matrice extracellulaire, le TGF- β joue un rôle essentiel. De plus, une augmentation de la production de TGF- β au cours de l'infection par le VHC a été corrélée avec l'apparition de la fibrose. Une augmentation de l'expression du TGF- β a aussi été observée dans le développement d'un CHC (Schuppan *et al.*, 2003).

Le TGF- β 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- β , et perdent leur capacité à répondre aux effets antiprolifératifs ou apoptotiques de cette cytokine (Roberts and Wakefield, 2003; Siegel and Massague, 2003; Zavadil and Bottinger, 2005).

En partant des constatations suivantes :

- Augmentation de l'hétérogénéité des quasiespèces de la capsid du VHC avec la sévérité de la maladie associée une distribution différente des quasiespèces dans le foie tumoral. Les divergences de séquence nucléotidique entre la zone tumorale et non tumorale sont plus fréquemment retrouvées dans la région de la capsid par comparaison avec une autre région virale de référence (NS5b) (Ruster *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 1999; Sobesky *et al.*, 2007).
- Mutations ponctuelles du gène de la capsid, qui pourraient intervenir dans certaines étapes de la carcinogenèse, suggérant une influence de la variabilité de la capsid du virus de l'hépatite C sur la carcinogenèse hépatique liée à l'infection par le VHC (Akuta *et al.*, 2007).

- 4 variants naturels de la capsidie isolés à partir du tissu tumoral peuvent inhiber les voies de signalisation du TGF- β (Pavio *et al.*, 2005).

On peut donc suggérer une influence de la variabilité génétique et de la compartimentation des variants viraux dans les mécanismes de survenue d'un carcinome hépato cellulaire. Les résultats obtenus avec les 4 séquences tumorales nous incitent à poursuivre le clonage de variants de la protéine de capsidie 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, est de d'élargir la banque de séquences de capsides de patients infectés par le VHC. Nous avons déjà réalisé le sous-clonage dans des vecteurs d'expression des séquences de protéine de capsidie isolées par microdissection laser de groupes d'hépatocytes tumoraux et non tumoraux pour 7 patients avec CHC (Sobesky *et al.*, 2007). En collaboration avec l'équipe de cliniciens du centre hépatobiliaire (Dr Duclos-Vallée, Dr Sobesky et Dr Roque), des sujets infectés par le VHC et porteurs de pathologie hépatique bien caractérisée seront sélectionnés. Nous avons aussi débuté le clonage en vecteur d'expression de 4 isolats VHC identifiés chez des sujets transplantés porteurs d'hépatite fibrosante cholestatique sévère. Trois points sont étudiés (serum avant TH, au moment de l'HFC et Foie avant TH).

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- β , 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 (Malmassari *et al.*, 2007).

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.

Role du CNR et Partenariat

Dans cette étude collaborative nous effectuons la caractérisation moléculaire de la région PréC-C des patients faiblement virémiques inclus dans l'étude.

Programme 2008 - 2009

Ce programme aura pour objectif de compléter et finaliser les études qui ont été poursuivies depuis quatre ans. De nouvelles collaborations nationales et internationales seront développées afin de faire remonter sur le CNR des souches virales atypiques.

• Travaux complémentaires concernant la diversité des génotypes du VHB en France

- Enquête CPAM/INVS 2002-2003 (120 sujets AgHBs positifs). Afin d'augmenter l'effectif de la population VHB génotypée (génotype disponible pour 66) nous développons une PCR HBV-génome complet plus sensible pour permettre le typage par séquence d'échantillons VHB ayant une charge virale $< 10^4$.
- Par l'intermédiaire de « l'observatoire des hépatites aiguës en France » en collaboration avec le laboratoire de virologie de la Pitié-Salpêtrière (Dr Vincent Thibault coordonnateur), l'unité de virologie transfusionnelle (INTS) dirigé par le Dr Syria Laperche et notre laboratoire. Détermination de la fréquence de mutant du VHB (mutants gènes S et préC-C) par analyse des séquences.
- Surveillance des hépatites aiguës C chez les enfants de la cohorte villageoise en Egypte. L'objectif d'estimer la fréquence des transmissions enfant-enfant et recherche des facteurs de risque potentiels. Complément de séquençage dans les régions NS5B pour les nouveaux cas d'hépatites aiguës identifiés au cours du suivi des enfants de la cohorte et analyse phylogénétique permettant de rechercher des similarités de séquence chez les sujets appartenant à la même famille (Travail en collaboration avec S.Taylor).
- Poursuite du programme de surveillance de virus mutants émergents (VHB) susceptibles de poser des difficultés, diagnostiques, de prise en charge thérapeutique ou d'efficacité vaccinale.

• Finalisation des études menées en France

- Diversité des génotypes du VHB et du VHC circulants en France dans une population de 18 à 80 ans (Enquête CPAM/INVS 2002-2003). Nous allons confronter et réaliser la synthèse 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 en collaboration avec par les différents intervenants [niveau moléculaire (CNR-Hépatite), sérologique (F. Dubois, CHU Tours), épidémiologique (E. Delarocque et C. Meffre, INVS)].
- Épidémiologie moléculaire du VHB, étude à partir de la déclaration obligatoire des hépatites aiguës B en France. Ce projet de surveillance moléculaire des hépatites aiguës B en France est mené en collaboration avec le laboratoire de virologie de CHU Pitié-Salpêtrière (V. Thibault, coordinateur), l'institut de veille sanitaire (D. Antona, E. Delarocque), l'institut National de Transfusion Sanguine (S. Laperche).

- **Finalisation des études réalisées en Egypt**
- Diversité des isolats du VHC circulants dans une population rurale en Egypte (*Thiers et al., en cours de sousmission*)
- Surveillance des hépatites aiguës C dans les « fever hospital » au Caire. Evaluation de la fréquence des transmissions intrafamiliale chez les adultes et identification des facteurs de risques impliqués (*A. Paez et al. en préparation*).

Publications 2008-2009

Revue internationale

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 .

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. Gut. 2008 57 (9):1268-74.

Articles en préparation

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

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

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.

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y *et al* (2007). Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **46**: 1357-64.

Arafa N, El Hoseiny M, Rekacewicz C, Bakr I, El-Kafrawy S, El Daly M *et al* (2005). Changing pattern of hepatitis C virus spread in rural areas of Egypt. *J Hepatol* **43**: 418-24.

Cantaloube JF, Gallian P, Laperche S, Elghouzzi MH, Piquet Y, Bouchardeau F *et al* (2008). Molecular characterization of genotype 2 and 4 hepatitis C virus isolates in French blood donors. *J Med Virol* **80**: 1732-9.

Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Laperche S, Pawlotsky JM (2008). Performance of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification. *J Clin Microbiol* **46**: 1716-23.

Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H (1995). A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* **69**: 5437-44.

Irshad M, Dhar I (2006). Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract* **15**: 405-16.

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**: 150-63.

Levrero M (2006). Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* **25**: 3834-47.

Malmassari SL, Deng Q, Fontaine H, Houitte D, Rimlinger F, Thiers V *et al* (2007). Impact of hepatitis B virus basic core promoter mutations on T cell response to an immunodominant HBx-derived epitope. *Hepatology* **45**: 1199-209.

Margeridon S, Carrouee-Durantel S, Chemin I, Barraud L, Zoulim F, Trepo C *et al* (2008). Rolling circle amplification, a powerful tool for genetic and functional studies of complete hepatitis B virus genomes from low-level infections and for directly probing covalently closed circular DNA. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 3068-73.

Meffre C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau E, Antona D, Desenclos JC. (2005). INVS Rapport préliminaire, pp 1-14.

Morice Y, Roulot D, Grando V, Stirnemann J, Gault E, Jeantils V *et al* (2001). 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* **82**: 1001-12.

Pavio N, Battaglia S, Boucreux D, Arnulf B, Sobesky R, Hermine O *et al* (2005). 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* **24**: 6119-32.

Plancoulaine S, Mohamed MK, Arafa N, Bakr I, Rekacewicz C, Tregouet DA *et al* (2008). Dissection of familial correlations in hepatitis C virus (HCV) seroprevalence suggests intrafamilial viral transmission and genetic predisposition to infection. *Gut* **57**: 1268-74.

Ray RB, Ray R (2001). Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* **202**: 149-56.

Roberts AB, Wakefield LM (2003). The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8621-3.

Ruster B, Zeuzem S, Krump-Konvalinkova V, Berg T, Jonas S, Severin K *et al* (2001). Comparative sequence analysis of the core- and NS5-region of hepatitis C virus from tumor and adjacent non-tumor tissue. *J Med Virol* **63**: 128-34.

Sakai A, Kaneko S, Honda M, Matsushita E, Kobayashi K (1999). Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatology* **30**: 556-61.

Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG (2003). Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* **10 Suppl 1**: S59-67.

Siegel PM, Massague J (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 807-21.

Sobesky R, Feray C, Rimlinger F, Derian N, Dos Santos A, Roque-Afonso AM *et al* (2007). Distinct hepatitis C virus core and F protein quasispecies in tumoral and nontumoral hepatocytes isolated via microdissection. *Hepatology* **46**: 1704-12.

Thomas F, Nicot F, Sandres-Saune K, Dubois M, Legrand-Abrevanel F, Alric L *et al* (2007). Genetic diversity of HCV genotype 2 strains in south western France. *J Med Virol* **79**: 26-34.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-80.

Zavadil J, Bottinger EP (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**: 5764-74.

V

**LABORATOIRE ASSOCIE
CNR DES HEPATITES VIRALES DELTA**

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

**Rapport d'activité du laboratoire associé au Centre National de Référence
des hépatites B, C et Delta pour l'infection par le virus de l'hépatite Delta (HDV)
(Laboratoire de Virologie de l'hôpital AVICENNE)
Année 2008**

Rédigé par le Dr Emmanuel Gordien, M Frédéric Le Gal et le Pr. Paul Dény

1/ Introduction :

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

Au sein du CNR des hépatites B, C et Delta, le laboratoire associé de l'Hôpital Avicenne – UFR SMBH, Université Paris 13 (Bobigny) a pour mission d'étudier la problématique de l'infection par le virus de l'hépatite Delta (HDV). Il a également pour objectif d'évaluer et de développer les tests de diagnostic nécessaires au dépistage et à la prise en charge des patients infectés par ce virus. La localisation du laboratoire dans le département de Seine - Saint-Denis donne également l'opportunité d'étudier cette infection virale dans la population générale, 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 2008, l'activité de diagnostic du HDV a été marquée par : (i) une augmentation (+10% par rapport à 2007) du nombre de demandes de dépistage sérologique (Anticorps (Ac) Totaux). (ii) Une augmentation également des demandes de quantification de la charge virale HDV plasmatique (+12% par rapport à 2007). (iii) La caractérisation de 154 nouvelles souches virales HDV (chiffre supérieurs aux 2 années précédentes). L'origine géographique des patients chez qui ces nouvelles infections ont été diagnostiquées était : Afrique (49,4%), Europe de l'Est (20,1%), Europe de l'Ouest (14,9%) et Asie (5,8%). C'est la première fois que les infections des patients du continent asiatique dépassent 5% des nouvelles infections diagnostiquées. Les géotypes spécifiquement africains (HDV-5, -6, -7 et -8) représentent actuellement 17,4% des souches caractérisées. (iv) Différents travaux sont actuellement en cours pour la mise au point de la recherche et de la quantification des génomes viraux HDV dans les biopsies hépatiques. (v) Un contrôle national de qualité en sérologie et biologie moléculaire de l'infection HDV est prêt et sera distribués aux différents laboratoires courant 2009. (vi) 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. D'autre part, dans le cadre de ces recherches, de nouvelles souches recombinantes HBV D/E hautement prévalente au Niger et en Mauritanie ont été caractérisées.

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

- o Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

Paul Dény, PU-PH, Université Paris 13 – AP-HP, 10%,
Emmanuel Gordien MCU-PH, 20%, Université Paris 13 –AP-HP
Mariama Issoufou, TEC, 50% InVS,
Frédéric Le Gal, Tec AP-HP, 20%, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
Nora Belguerma Tec AP-HP 20% (dont le décès survenu accidentellement au cours de l'année 2008 affecte profondément l'ensemble du LACNR et du service)

o Organigramme

Pr Paul Dény (PU-PH), Directeur, actuellement en contrat d'interface INSERM, localisé sur Lyon à INSERM U871 (Pr. Fabien Zoulim) (construction de clones répliquants d'HDV africains)

Dr Emmanuel Gordien (MCU-PH, 1^e classe), Directeur adjoint, responsable du site de Bobigny.

Frédéric Le Gal (PhD, technicien, en demande d'un poste ingénieur auprès de l'AP-HP)

Mariama Issoufou (technicien InVS, 50%)

A ce jour, aucune reconduction par l'AP-HP du poste occupé par Mlle Nora Belguerma n'est prévu ou programmé.

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

Le laboratoire associé au CNR des hépatites B, C et delta a poursuivi la mise 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 920 souches HDV. De part son rôle de CNR, le laboratoire a réalisé 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 achevée. Les panels seront adressés courant 2009 à tous les laboratoires souhaitant participer à ce contrôle de qualité.

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

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

o surface, plan

Le laboratoire associé au CNR ne possède pas à proprement parler de surfaces dévolues spécifiquement à l'activité CNR. Il est localisé dans le bâtiment Lavoisier au 2^{ème} étage au sein du service de Bactériologie, Virologie - Hygiène de l'Hôpital Avicenne. Les surfaces de l'ensemble du laboratoire de Virologie sont de 100 m² répartis à raison de 60 m² à l'étage et de 40 m² au 3^{ème} étage dans le laboratoire commun de Biologie Moléculaire de l'hôpital. Manque cruellement un laboratoire de type P3 permettant la transfection en culture cellulaire des génomes complets de HDV et de HBV. Les réflexions ont été entamées pour la réalisation de ce P3 dans le cadre

- principaux équipements
 - PSM, Etuves à CO₂, chaîne du froid congélateurs +4°C, -20°C, -40°C, -70°C
 - Laveur ELISA, BEP 3 (Dade Behring), Vitros (Ortho Diagnostics system)
 - Extracteurs automatiques Abbott et Roche
 - Thermocycleurs PCR sprint et ABI 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 du nouveau centre hospitalier regroupant les hôpitaux d'Avicenne de Jean-Verdier et de René Muret-Bigottini, en liaison avec les unités de bactériologie dans le cadre d'activité de diagnostic et de recherche sur la tuberculose ; de l'UFR SMBH, Université Paris 13 à Bobigny, de l'AP-HP et du 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 réalise les techniques sérologiques de dépistage et de suivi des infections liées aux virus HBV, HIV, HCV, HAV, CMV, EBV, ParvovirusB19, Arbovirus(Dengue) et HTLV-1.

Dans le cadre du CNR Delta, le laboratoire effectue 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 même nous réalisons aussi en routine les nouveaux tests sérologiques (société Ingen) maintenant disponibles sur le marché : EIAGEN ANTI-HDV IgM KIT (Anti Hep Delta IgM) ; EIAGEN ANTI-HDV KIT (Anti Hep Delta totaux); EIAGEN HDV Ag KIT (Ag Hépatite Delta). Ces tests ont été évalués sur différents les panels d'échantillons constitués, et sont utilisés comme deuxième test au sein du laboratoire.

Techniques de Biologie Moléculaire :

*La technique de **RT-PCR quantitative** plasmatique pour le virus HDV mise au point au laboratoire en 2004 (Le Gal F. et al Journal of Clinical Microbiology 2005) est utilisée en routine depuis 2005. Devant le manque 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 (+12% par rapport à 2007) 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 (Radjef et al Journal of Virology 2004).*

Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B180 (n°4118).

La caractérisation du génotype des souches HDV est effectuée sur toute nouvelle souche mise en évidence, par l'amplification, **séquençage et interprétation phylogénétique** (par Distance et Neighbor-Joining) de la région R0 du génome viral (Radjef et al Journal of Virology 2004). La séquence ainsi obtenue (environ 320 paires de bases) est alignée avec des séquences de référence des différents types (clades 1 à 8) 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 dans le schéma de diagnostic clinique du patient.

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

En 2008, nous avons prévu plusieurs avancées techniques. Tout d'abord, 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. De même, nous avons prévu le développement de la quantification de la charge virale HDV par la technique de RT-PCR en temps réel citée ci-dessus sur des ponctions biopsies hépatiques (PBH) congelées ou incluses en paraffine pour le suivi des patients chroniques B-Delta. Nous en étions à la phase de validation de l'extraction de l'ARN Delta dans les différents prélèvements. D'autre part, fin 2007 une demande particulière de services de procréation médicalement assistée s'était fait jour. Une approche technique était envisagée pour la mise en place de la recherche et de la quantification de l'ARN du VHD dans les diverses fractions du liquide spermatique. La perte d'un technicien du laboratoire, non remplacé, nous a contraint de différer ces programmes. Le recrutement d'un technicien dédié à cette activité CNR est désormais devenu une nécessité impérieuse.

Au sein de la structure Inserm Lyonnaise sont abordées les techniques de transfection d'ADNc du virus de l'hépatite delta ainsi que la production de protéines delta des génotypes africains. Actuellement sont purifiées les petites protéines delta (sHD) des HDV clade 1, clade 6 et clade 8. Ces protéines sont testés sur des puces peptidique dans le cadre d'un projet de nanotechnologie a dans le cadre du diagnostic conjoint des hépatites virales.

- **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 (920 isolats ont été caractérisés à ce jour). 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.

o Description technique ('Souchothèque' CNR-Delta)

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

o Conditions de stockage (Souchothèque CNR-Delta)

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

o Conditions de mise à disposition de ces collections

Pour les virus des différents clades (HDV-1 à HDV-8) entièrement séquencés, nous avons entrepris une collaboration avec Monsieur Camille Sureau (INTS) pour cloner les séquences d'ADN complémentaires en vecteurs plasmidiques. Cette partie du travail étant terminée, les constructions ont été vérifiées. Différentes mutations ponctuelles survenues au cours du clonage, rendant les séquences défectives pour la réplication sont en évaluation et correction (P Dény, INSERM U871). Les souches étant publiées, elles sont disponibles pour la communauté scientifique.

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

o Listes des troussees existantes

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

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

Ag HDV (technique ELISA Sorin Biomedica) (sandwich)(indication exceptionnelle).

De nouvelles troussees sont maintenant disponibles (société EIAGEN), et ont été 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)
- Rendu des résultats en signifiant les valeurs seuil de détection (100 copies/ml) de nos techniques, ainsi que les valeurs de linéarité de notre quantification (entre 10^3 et 10^7 copies /ml)

Identification et génotypage

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

Suivi thérapeutique chez un patient traité

- RT-PCR quantitative

Depuis 2004, nous avons donc décidé au laboratoire associé au CNR B et C 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

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

186 échantillons consécutifs tout venant de sérums ou de plasmas ont été testés par les 2 techniques sérologiques, Diasorin et EIAGEN. 148 échantillons ont été retrouvés négatifs et 13 positifs dans les techniques. 25 échantillons étaient « douteux » (situés dans la « zone grise » des techniques) dont 1 dans les 2 techniques ; 20 en Diasorin et 4 en EIAGEN. Tous ces échantillons étaient négatifs en PCR qualitative Delta.

Parmi les 20 « douteux » retrouvés en Diasorin, 17 étaient liés à des prélèvements sur plasmas donc non conformes selon les instructions du fabricant. Les 3 échantillons restant correspondraient vraisemblablement à des traces sérologiques de patients ayant résolu leur infection Delta. Une étude prospective est en cours d'élaboration afin de déterminer le statut infectieux des patients présentant ce profil sérologique.

Ainsi, au total, les deux techniques ont montré des résultats similaires pour le diagnostic sérologique de l'infection delta. La technique Diasorin aurait une plus grande sensibilité de détection d'anticorps résiduels.

2.2 Activités d'expertise de l'année N

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

La recherche d'anticorps totaux anti-HDV (IgM et IgG) (1237 examens en 2008, soit +7%):

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) (190 examens en 2008 soit +13%)

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 (1541 examens en 2008 soit +12%)

Nous avons appliqué la détection quantitative de l'ARN HDV à 1541 échantillons pour l'année 2008. Cet aspect s'inscrit dans le suivi nécessaire de la mise sous traitement immunomodulateur (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 HDV proviennent 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 2008 et Décembre 2008

<i>Hôpitaux AP-HP / Ville (n = 1328)</i>	<i>Autres Hôpitaux / Ville (n = 96)</i>
<i>Antoine Béchère/ Clamart</i>	<i>Alphabio / Marseille</i>
<i>Ambroise Paré / Boulogne</i>	<i>Besançon</i>
<i>Avicenne / Bobigny</i>	<i>Caen</i>
<i>Beaujon / Clichy</i>	<i>Clermont Ferrand</i>
<i>Bicêtre / Le Kremlin-Bicêtre</i>	<i>Créteil Intercommunal</i>
<i>Bichat / Paris</i>	<i>Limoges</i>
<i>Cochin / Paris</i>	<i>Passy</i>
<i>Jean Verdier / Bondy</i>	<i>Montfermeil</i>
<i>Louis Mourier / Colombes</i>	<i>Montreuil</i>
<i>Laboratoire</i>	<i>MGEN</i>
<i>Necker / Paris</i>	<i>Nancy</i>
<i>Saint-Antoine / Paris</i>	<i>Nantes</i>
<i>Tenon / Paris</i>	<i>Orléans</i>
	<i>Reims</i>
	<i>Rennes</i>
	<i>Strasbourg</i>
	<i>Val de grâce</i>
	<i>Villeneuve St Georges</i>
	<i>Autres (adressés directement ou via Pasteur Cerba)</i>

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 éloignés (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 2008. Enfin, durant cette année 2008, 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 (J.O 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 2008 et Décembre 2008

Hôpitaux AP-HP / Ville (n = 891)	Autres Hôpitaux (n = 612)	Hôpitaux étrangers (n = 1)
Antoine Béclère/ Clamart	Amiens	St Pierre / Bruxelles
Ambroise Paré / Boulogne	Angers	
Avicenne / Bobigny	Argenteuil	
Beaujon / Clichy	Besançon	
Bicêtre / Le Kremlin-Bicêtre	Bordeaux	
Bichat / Paris	Caen	
Cochin / Paris	Créteil Intercommunal	
HEGP / Paris	Grenoble	
Henri Mondor / Créteil	Lille	
Hôtel-Dieu / Paris	Limoges	
Jean Verdier / Bondy	Passy	
Louis Mourier / Colombes	Montreuil	
Laennec	Orléans	
Laboratoire		
Necker / Paris		
Paul Brousse / Villejuif	Poitiers	
Raymond Poincaré	Reims	
Saint-Antoine / Paris	Rennes	
Saint-Louis / Paris	Strasbourg	
Tenon / Paris	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**

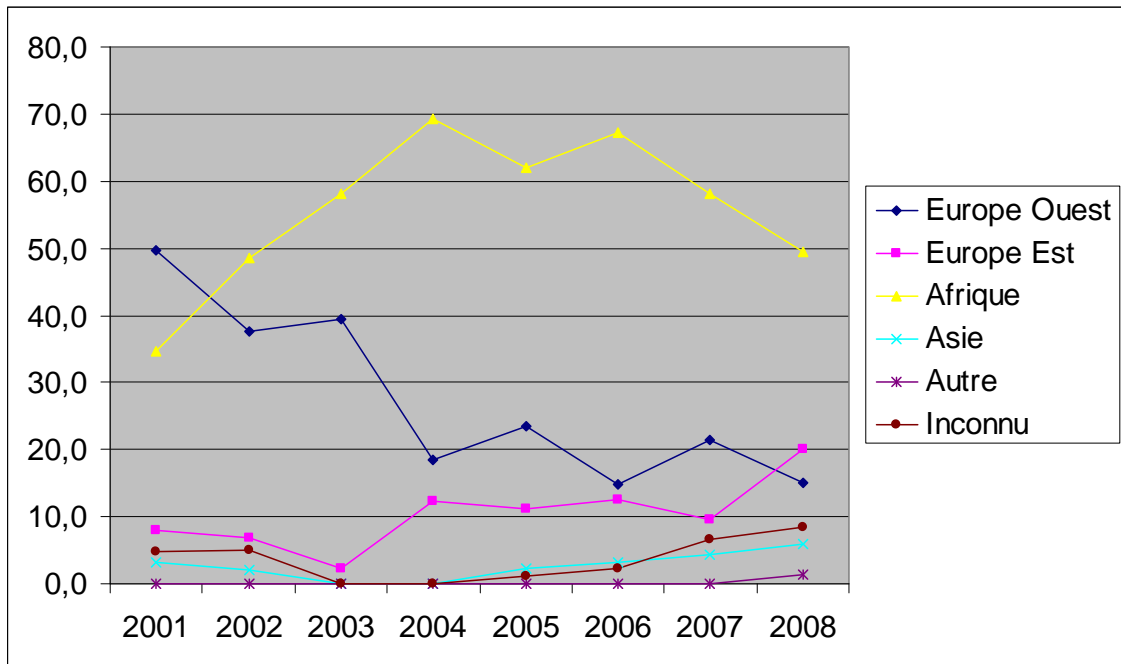
Toujours sans objet pour 2008. Rappelons que l'étude de la réplication virale des virus HBV, HCV et HDV nécessite une structure possédant un niveau de confinement de type L3, absente de l'hôpital Avicenne et du site de Bobigny. Le contrat d'Interface INSERM actuel en cours (2007-2009), en demande de prolongation pour 2010 - 2011 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**

Nos analyses indiquent qu'en 2008, 50% des isolats (contre 60 à 70% ces dernières années) ont été caractérisés à partir de patients originaires de l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Ainsi, sur les 154 échantillons répliquant l'HDV et recueillis chez des nouveaux patients infectés, une forte majorité provenaient de patients issus de pays d'endémie : Afrique sub-saharienne (76) et Europe de l'Est (31 contre 13 en 2007). Il est à noter cependant, une diminution de 10% de la fréquence des souches africaines compensée par une augmentation de 11% de souches provenant de patients d'Europe de l'Est (Figure 1).

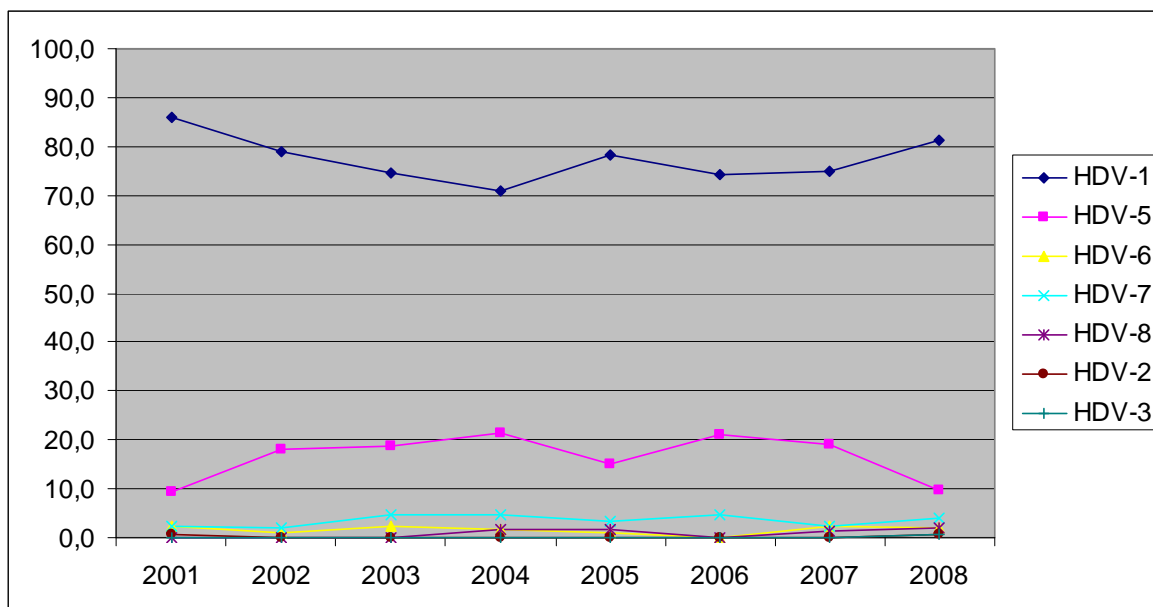
Figure 1 : Evolution du pays d'origine des patients nouvellement suivis au CNR Delta entre 2001 et 2008



Pour 2008, 2 génotypes ont été principalement mis en évidence en France (Figure 2): Génotype I ou clade 1 (HDV-1) ubiquitaire : n = 125 (102 en 2007) et le clade 5 (HDV-5), africain : n = 15 (26 en 2007). Nous avons aussi isolé 3 souches de clade 6 et de clade 8 et 6 souches de clade 7). De plus cette année 2008 une souche de clade 2 (asiatique) et une souche de clade 3 (sud américain) ont été identifiées. L'émergence de souches de type 3 en France devra faire l'objet d'une veille précise pour le suivi des patients, car la quantification de la charge virale de ces souches nécessite des amorces spécifiques (Le Gal et al. 2005).

L'HDV-1 représente toujours la majorité des infections présentes en France. Nous avons remarqué une augmentation de celles-ci de plus de 11%, correspondant à la détection de souches en provenance d'Europe de l'Est. Dans le même temps nous avons constaté une diminution des souches africaines, en particulier des souches de clade 5, passant de 19,1% à 9,7%. (Figure 2). Ces virus africains 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 2008



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

Entre l'année 2007 et 2008, nous avons pu noter une augmentation des demandes de sérologie de dépistage (+10%), mais également des demandes de charges virales HDV (+12%). 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 691 (47,65% des tests effectués) en 2008.

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

Marqueurs HDV	2004 N (n positifs)	2005 N (n positifs)	2006 N (n positifs)	2007 N (n positifs)	2008 N (n positifs)
Antigène HDV	0	0	0*	0*	0*
Anti-HDV Totaux	730 (145)	1030 (215)	1060 (138)	1162 (185)	1237(161)
Anti-HDV IgM	170 (83)	232 (111)	164 (67)	170 (55)	379 (54)
ARN HDV**	691 (226)	838 (470)	1130 (580)	1315 (585)	1541 (691)

* 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)

o 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 « maison ».

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

Sur l'ensemble des 691 échantillons positifs en 2008 pour l'ARN de l'HDV, 154 cas correspondaient à des souches nouvellement caractérisées

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

Dans le contexte de la réplication de l'HDV, on retrouve encore pour cette année en majorité des patients de sexe masculin (65%). L'âge médian est de 46 ans pour les hommes versus 36 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 2008

Europe Ouest = 23	<i>Italie = 1</i>
<i>France = 20</i>	<i>Espagne = 2</i>
Europe Est = 26	<i>Roumanie = 14</i>
<i>Bulgarie = 1</i>	<i>Russie = 1</i>
<i>Moldavie = 3</i>	<i>Georgie = 4</i>
<i>Arménie = 2</i>	<i>Ukraine = 1</i>
Afrique = 76	<i>Madagascar = 1</i>
<i>Burkina Fasso = 1</i>	<i>Mali = 9</i>
<i>Algérie = 1</i>	<i>Maroc = 2</i>
<i>Ghana = 1</i>	<i>Mauritanie = 8</i>
<i>Cameroun = 24</i>	<i>Mayotte = 1</i>
<i>Congo Brazzaville = 3</i>	<i>République de Centrafrique = 5</i>
<i>Cote d'Ivoire = 6</i>	<i>République Démocratique du Congo = 1</i>
<i>Egypte = 1</i>	<i>Sénégal = 5</i>
<i>Gabon = 4</i>	<i>Tchad = 1</i>
<i>Guinée = 1</i>	<i>Tunisie = 1</i>
Asie = 8	<i>Mongolie = 5</i>
	<i>Vietnam = 1</i>
	<i>Chine = 2</i>
Moyen-Orient = 6	<i>Turquie = 5</i>
	<i>Daghestan = 1</i>
Am. Sud / Antilles = 2	<i>Bolivie = 1</i>
	<i>Martinique = 1</i>
Inconnu = 13	

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

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

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

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

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

Sans objet. L'étude des résistances nécessitera un laboratoire L3 (programme triennal). Schématiquement les étapes de pénétration n'étant pas définies, il sera nécessaire de transférer le génome complet de l'HDV sous forme d'ARN ou d'un

cDNA. L'utilisation de plus d'une unité génomique s'avère nécessaire pour initier une réplication durable de l'ARN viral et étudier la résistance de cette réplication à certains composés antiviraux. L'infection cellulaire 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 suggère une contamination sur le territoire français dont le principal vecteur pourrait en être la toxicomanie par voie intra veineuse ou intra nasale. La caractérisation moléculaire de la région R0 du génome viral a mis en évidence une émergence récente des souches virales infectant 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 encore en cours d'investigation.

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

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

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

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

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 migratoires importants en particulier en provenance de pays d'endémie pour l'HDV, il nous a paru intéressant

d'aborder l'infection par HDV plus globalement au delà du territoire français et 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 initiées dès 2007 et seront bientôt finalisées. Elles avaient principalement pour but de caractériser au niveau moléculaire, les souches virales HDV mais également HBV circulant dans les pays concernés.

- **B/ les partenaires :**
- **C/ état d'avancement :**
- **D/ principaux résultats le cas échéant ou renvoi à une publication :**

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

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

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

Epidémiologie Moléculaire de l'Hépatite B-Delta en Afrique (travaux en cours)

Plusieurs coopérations ont été initiées en 2007 dans le but de caractériser les couples HBV-HDV circulant dans les pays concernés :

- 1- La Mauritanie en partenariat avec le CHU d'Angers (Pr. F Lunel-Fabiani)
- 2- Le Niger (Dr A. Garba et Mme M. Issoufou).
- 3- La République Centre Africaine (Institut Pasteur de Bangui : Dr Narcisse Kommas) et Inserm U871, Projet ANRS 12202
- 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 débutés) :

En lien avec un doctorant Syrien (M. 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 ont été rapatriés au laboratoire. Le dépistage sérologique vient de débuter et sera complété par 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 (Syrie), techniciens (Burundi) ou médecins (Algérie) ont été accueillis en

2008 et continueront à l'être au sein du laboratoire CNR Delta. Le projet avec la République Centre Africaine est accepté et comprend l'accueil au laboratoire d'un technicien de l'IP Bangui.

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.
- **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 cette année 2008. 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 2009.

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 (M. W. Mansour) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant en Mauritanie.
 - Doctorante 3^{ème} année (Mme M. Issoufou) : Caractérisation moléculaire des souches B-Delta circulant au Niger.
 - Doctorante 2^{ème} année (Mlle S. Brichler) : Approche des mécanismes moléculaires spécifiques de la pathogenèse hépatique du virus de l'hépatite delta.

En lien avec l'Inserm U871

- *Stagiaire M1 école de l'Inserm 2007-2008 (Mlle A. Conrad), Etude de la réplication du génome du virus de l'hépatite delta africain en culture cellulaire*
- *Stagiaire M2 (Melle Bloquel) UP5 2008-2009 : Production et caractérisation de protéines sHD synthétisées en système procaryote.*

- **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 (Octobre 2007 thèse de science de F. Le Gal).

Toujours en interne au laboratoire, le Guide de Bonne Exécution de Analyses (GBEA) peut servir à la bonne réalisation des techniques de routine destinée au diagnostic et de suivi de l'infection par HDV.

Enfin des réunions mensuelles orientées CNR Delta sont réalisées afin de diffuser et de rendre compte de l'avancement des divers travaux, à la fois au sein même du laboratoire de Virologie d'Avicenne mais également plus largement au sein de notre l'hôpital.

- **C/ Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :**

- o Rétro-information aux partenaires
- o Diffusion aux professionnels : conférences, Site web
Compte-rendu annuel, publications scientifiques et didactiques

- **D/ Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...) :**

Géré par la réception ou le secrétariat qui renvoie sur les techniciens ou les médecins du Laboratoire Associé en fonctions des renseignements demandés.

- **Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...) :**

ANAES pour la mise en place de la nomenclature pour les examens moléculaires de l'HDV

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

Pour le LA CNR des hépatites B, C et delta pour l'infection delta, les travaux de recherche sont effectués principalement en lien avec les Unités INSERM U845 (Paris) et U871 (Lyon).

Pour chacun de ces travaux, décrire :

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

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 positifs 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 (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- Rôle des protéines Delta dans l'induction du stress oxydant e la cellule et l'activation des facteurs de transcription STAT-3 et NF- κ B. Travaux en cours dans le cadre de la thèse d'université de Melle S. BRICHLER.
- 4- Déterminer le rôle de l'HDV dans l'inhibition de la réplication du B en fonction de la variabilité génétique des souches virales (INSERM U871 ; INTS ; Université Paris 13 et Hôpital Avicenne, L.A-CNR des hépatites B, C et delta) (contrat d'Interface 2007-2009) : Construction des clones delta répliquant les génotypes spécifiques africains (HDV-5, -6, -7 et -8). Production des protéines exprimées par les souches delta africaines.

7- Liste des publications et communications 2006-2009

Publications nationales

1- Le virus de l'hépatite delta, Frédéric Le Gal , Emmanuel Gordien & Paul Dény, in « Hépatites virale Eds, P Marcellin- T Asselah (Doin collection)

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- α/β Inducible MxA Gene (Soumis en juin 2009; en révision)

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

2- In vitro characterization of viral fitness of therapy-resistant hepatitis B variants. Villet S, Billioud G, Pichoud C, Lucifora J, Hantz O, Sureau C, Dény P, Zoulim F. Gastroenterology. 2009 Jan;136(1):168-176.

3- Management and prevention of drug resistance in chronic hepatitis B. Zoulim F, Durantel D, Dény P. Liver Int. 2009 Jan;29 Suppl 1:108-15.

4- Complete cure of HBV-HDV co-infection after 24weeks of combination therapy with pegylated interferon and ribavirin in a patient co-infected with HBV/HCV/HDV/HIV. Gozlan J, Lacombe K, Gault E*, Raguin G, Girard PM. J Hepatol. 2009 Feb;50(2):432-4.

5- 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.

6- 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

7- Manesis EK, Schina M, Le Gal F, Agelopoulou O, Papaioannou C, Kalligeros C, Arseniou V, Manolakopoulos S, Hadziyannis ES, Gault E*, Koskinas J, Papatheodoridis G. Quantitative analysis of hepatitis D virus RNA and hepatitis B surface antigen serum levels in chronic delta hepatitis improves treatment monitoring. *Archimandritis AJ. Antivir Ther*. 2007;12(3):381-8.

8- 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 Nov;45(11):3788-90. Epub 2007 Oct 3.

9- Lacombe K, Boyd A, Desvarieux M, Serfaty L, Bonnord P, Gozlan J, Molina JM, Miaillhes P, Lascoux-Combe C, Gault E, Girard PM. Impact of chronic hepatitis C and/or D on liver fibrosis severity in patients co-infected with HIV and hepatitis B virus. *AIDS*. 2007 Nov 30;21(18):2546-9.

10- Dény P.

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

*E Gault était membre du LACNR au moment du travail

Communications nationales

1- Frédéric Le Gal, Elyanne Gault, Nasser Al Hawajri, Ségoène 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 LHDAg promotes cell proliferation by activating Cyclin D1 Inhibits apoptosis by activating Bcl-xL and sequestering Bax
E. Gordien, V. Williams, S. Brichler, P. Dény
Communication orale : The Molecular Biology of Hepatitis B viruses August 17-21, 2008, San Diego, California

2- The Isoprenylated Large Hepatitis Delta Antigen activates STAT-3 and NFκB 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 NF κ B, via oxidative stress

Williams Virginie, Brichler 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

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 4 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

- *Mise en place effective du contrôle de qualité en sérologie et en biologie moléculaire pour le diagnostic HDV*
- *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 clones répliatifs et de sérum infectieux sur des cellules HepaRG en culture.*
- *Mise au point des nanopuces peptidiques pour le diagnostic des infections virales hépatotropes chroniques*
